

Funktionelle Charakterisierung des humanen und des murinen Nicotin1-Proteins (NICN1)

Von dem Fachbereich für Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biochemikerin Bianca Backofen
geboren am 26. Februar 1977 in Auetal

2004/2005

Referent : Prof. Dr. Walter Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent : Prof. Dr. Bernd Otto
Institut für Physikalische Chemie
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion : 9. Dezember 2004

Zusammenfassung

Trotz des schnellen Fortschreitens der Genomsequenzierungsprojekte, existieren ca. 1000 Gene in den Datenbanken, deren biologische Funktion noch nicht näher entschlüsselt worden sind [International Human Genome Sequencing Consortium, 2001]. Zu diesen zählt das 2000 zuerst beim Hund entdeckte *Nicolin1* (NICN1)-Gen [Leeb *et al*, 2000]. Dieses codiert für ein 213 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa, das bis jetzt keiner bekannten Proteinfamilie zugeordnet werden konnte. *NICN1* ist säugerspezifisch und die hohe Homologie zwischen den murinen, caninen und humanen Aminosäuresequenzen deutet auf eine konservierte biologische Funktion hin. Das Protein ist im Kern lokalisiert ohne jedoch eines der bekannten Kernlokalisationssignale (NLS) aufzuweisen.

Im Rahmen einer Funktionsanalyse sollten neben der Erzeugung einer *Nicolin1*-Knockout Maus Expressionsstudien sowie eine Analyse des Kerntransportes durch rekombinante Proteinexpression durchgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass *Nicolin1* im adulten Tier gewebespezifisch exprimiert wird und während der Embryogenese der Maus ubiquitär nachweisbar ist. Sowohl die Transfektion von murinen embryonalen Stammzellen (mES) mit einem konditionalen Knockout-Konstrukt, als auch die Erzeugung einer stabilen Zell-Linie mit Hilfe eines NICN1-myc-His-Fusionsplasmides in MDCK-Zellen führten während der Selektionsphase zu einem frühzeitigen Zelltod. Für dessen mögliche Ursachen können eine Überexpression des Gens, eine erschwerte Zugänglichkeit des Genortes sowie die Verwendung eines ungeeigneten negativen Selektionsmarkers in Betracht kommen. Eine Gewinnung des *Nicolin1* in Form eines rekombinanten Proteins aus *E.coli* war nach einem Wechsel des Stimulationsmetaboliten IPTG nur noch in Form von inclusion bodies möglich, die wahrscheinlich Folge einer Überexpression waren. Ein bei den elektrophoretischen Auswertungen häufig beobachteter Bandshift der *Nicolin1*-Bande konnte nach Isolation des Gel-Stücks in einem Massenspektrometer (MALDI-TOF) analysiert werden. Die Auswertung der erhaltenen Massen zusammen mit einer Datenbankrecherche konnten die Hypothese einer als Ursache für die bereits beschriebenen Ergebnisse angenommenen posttranslationalen Modifikationen in Form einer proteolytischen Spaltung für das *Nicolin1*-Protein bekräftigen.

Abstract

The *nicolin1* gene (*NICN1*) was first discovered in dogs (Leeb *et al*, 2000). It does not belong to any known gene family and was found to be localised in the nucleus. In a BLAST search of genetic databases, ESTs from other mammalian species were found, but the gene was found to be absent from any non-mammalian species. Within this project we have utilised a variety of different functional analysis methods in order to determine the function of this gene/protein. These methods included: the development of a knockout mouse, expression studies with Northern blotting, RT-PCR, and whole mount *in-situ* hybridisation, recombinant GST fusion protein expression in *E coli*, development of a stable cell line, gradient centrifugation and MALDI-TOF analysis. As Nicolin1 does not contain a known NLS, we had hypothesised that the protein had a binding partner which could allow the protein's entrance into the nucleus

Expression studies in foetal mouse development showed uniform expression of the gene throughout the foetus, while the expression level in adult human and mice was tissue specific. The development of the knockout mouse with conditional constructs as well as the establishment of a stable cell line with a *NICN1*-myc-His fusion plasmid may have been hindered by the over expression of the gene, early cell death was brought on by effects of the negative selection markers, and the locus may not be suitable for homologous recombination. A GST fusion protein was used to determine how the gene gets into the nucleus. After changing the provider of a specific reagent (IPTG), there were high levels of expression, but the protein could not be isolated. We believe that the protein may be toxic to *E. coli* and that the cells placed the protein within inclusion bodies making it unable to be isolated. In all electrophoresis studies we noticed a band shift, which occurred in previous studies, too.

To determine the cause of the band shift, MALDI-TOF was used. Three bands were isolated, unfortunately none of these bands turned out to be the predicted protein. We believe that the protein undergoes post-translational modifications, which does not allow the protein to be detected by MALDI-TOF.

Stichwörter : Nicolin1, Funktionsanalyse, Knockout, Expressionsstudien

Keywords : Nicolin1, function analysis, knockout, expression analysis

Meinem Vater

Zu diesen elementaren Gesetzen
führt kein logischer Weg, sondern nur
die auf Einfühlung in die Erfahrung
sich stützende Intuition.

Albert Einstein, *Mein Weltbild*, 1934

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden aus Prioritätsgründen in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Backofen B, Leeb T. (2002)

Genomic organization of the murine aminomethyltransferase gene (Amt) DNA Seq.;13(4):179-83.

Backofen B, Jacob R, Serth K, Gossler A, Naim HY, Leeb T. (2002)

Cloning and characterization of the mammalian-specific nicolin 1 gene (NICN1) encoding a nuclear 24 kDa protein. Eur J Biochem.;269(21):5240-5.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
Einleitung	20
1.1 Das <i>Nicolin1</i> -Gen.....	22
1.1.1 Entdeckung des <i>Nicolin1</i> -Gens	22
1.1.2 Analyse der <i>NICN1</i> -cDNA-Sequenz.....	23
1.1.3 Die genomische Struktur des <i>NICN1</i> -Gens.....	23
1.1.4 Das <i>NICN1</i> - Protein.....	25
1.2 Die Kernlokalisation.....	26
1.3 Gene targeting.....	30
1.3.1 Historische Entwicklung.....	30
1.3.2 Prinzipieller Aufbau eines <i>Targeting</i> -Vektors	31
1.3.3 Selektionsmarker.....	33
1.3.4 Grenzen des konstitutiven <i>Gene-Targetings</i>	35
1.4 Konditionale Genmodifikation.....	35
1.4.1 Aufbau und Funktion von Genschaltern	35
1.4.2 Modifikationen der Rekombinasen	38
1.4.3 Konditionelle Mutagenese	39
1.4.4 Generierung einer Knockout-Maus.....	41
1.5 Rekombinante Proteinexpression.....	43
1.5.1 Das Expressionssystem <i>E.coli</i>	44
1.6 MALDI-TOF	48
1.7 Dichtegradientenzentrifugation.....	49
1.7.1 Zentrifugationstechniken	50
1.7.2 Gradientenlösungen	50
1.8 Aufgabenstellung.....	51
Material und Methoden	53
2.1 Material.....	53
2.1.1 Geräte.....	53
2.1.2 Material.....	55
2.1.3 Chemikalien.....	56
2.1.4 Proteine, Proteasen-Inhibitoren, Protein-Marker	57
2.1.5 Detergenzien	58
2.1.6 Antibiotika	58
2.1.7 Verwendete Kits	58
2.1.8 Medien und Lösungen für die Behandlung eukryontischer Zellen.....	58
2.1.9 DNA- und RNA spezifische Enzyme	59
2.1.10 Radioaktive Substanzen.....	59
2.1.11 Vektoren und DNA-Marker	59
2.1.12 Bakterienstämme und Zelllinien	60

2.1.13	Mäusestämme	61
2.1.14	Antikörper	61
2.1.15	Hardware und Software	61
2.1.16	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien.....	62
2.1.17	Stocklösungen	66
2.1.18	Verwendete Programme	67
2.2	Methoden	69
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	69
2.2.1.1	Kultivierung und Behandlung von prokaryontischen Zellen	69
2.2.1.2	Plattenkultur.....	70
2.2.1.3	Transformation.....	70
2.2.1.4	Kryokonservierung.....	70
2.2.1.5	Erzeugung von transformationskompetenten <i>E.colis</i>	71
2.2.2	Allgemeine Methoden zur Behandlung von DNA	72
2.2.2.1	Fällung der DNA mit Ethanol	72
2.2.2.2	Lyophilisation von DNA.....	73
2.2.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	73
2.2.2.4	Auftrennung der DNA (<20 kb)	73
2.2.3	DNA-Isolierung	74
2.2.3.1	Isolierung kleiner DNA-Fragmente (<20 kb)	74
2.2.3.2	Isolierung der DNA aus Gelstücken mittels des QIAEX Kits 2	75
2.2.3.3	Aufreinigung der DNA aus Lösungen mittels des QIAEX Kits 2	75
2.2.3.4	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.Coli</i>	75
2.2.3.5	Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	76
2.2.4	Enzymatische Behandlung von DNA.....	77
2.2.4.1	Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen	77
2.2.4.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	77
2.2.4.3	Phosphorylierung.....	77
2.2.4.4	Ligation	78
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	78
2.2.5.1	Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte.....	79
2.2.5.2	Nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA	80
2.2.5.3	RT-PCR	81
2.2.6	RNA und cDNA spezifische Methoden	82
2.2.6.1	<i>Northern-Blots</i>	82
2.2.6.2	Herstellung der radioaktiv markierten Sonde.....	83
2.2.7	Zellkulturtechnische Methoden	84
2.2.7.1	Präparation von embryonalen Mäusefibroblasten	84
2.2.7.2	Kultivierung der verwendeten Zellarten	85
2.2.7.3	Trypsinisierung	86
2.2.7.4	Kryokonservierung.....	86
2.2.7.5	Revitalisierung der verwendeten Zellarten	87
2.2.7.6	Mitomycin-C-Behandlung	87

2.2.7.7	Transfektion.....	87
2.2.7.8	Radioaktive Markierung von Zellen	92
2.2.7.9	Selektion.....	93
2.2.8	Methoden der Protein- und Biochemie	93
2.2.8.1	Herstellung von Zelllysaten aus verschiedenen Geweben und Zellen	93
2.2.8.2	Dichtegradientenzentrifugation.....	96
2.2.8.3	Immunpräzipitation (IP)	97
2.2.8.4	Pull-down-Methode (<i>pull down assays</i>).....	98
2.2.8.5	Eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	100
2.2.8.6	Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mittels Coomassie.....	101
2.2.8.7	Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mittels Silberfärbung ..	102
2.2.8.8	Trocknung von Gelen	102
Ergebnisse		103
3.1	Etablierung der Knockout-Maus-Technik für <i>Nicolin1</i>	104
3.1.1	Strategie zur Herstellung der konditionalen Knockout-Vektoren	104
3.1.2	Erzeugung des konditionalen Knockout-Konstruktes pKOC30	111
3.1.3	Erzeugung des Knockout-Vektors mit TK-Kassette	113
3.1.4	Durchmusterungsstrategie zur Analyse eines Rekombinationsereignisses	113
3.1.5	Klonierung eines hypothetischen Knockouts.....	114
3.1.6	Genotypisierungs-PCR zur Unterscheidung des Rekombinationsereignisses.....	115
3.1.7	Nachweis der homologen Rekombination über <i>Southern-Blot</i>	116
3.1.7.1	<i>Southern-Blot</i> -Strategie	116
3.1.7.2	<i>Southern-Blot</i> -Test und Verdünnungsreihe	119
3.1.8	Bestimmung der Geneticintoleranzdosis	121
3.1.9	Elektroporation und Selektion (Transfektionsversuche)	122
3.1.10	Zusammenfassung der Ergebnisse der Transfektionsversuche	134
3.2	Herstellung neuer Konstrukte	135
3.2.1	Strategie zur Herstellung der Knockout-Vektoren	135
3.2.2	Generierung der neuen Knockout-Vektoren.....	137
3.2.3	Strategie zur Erzeugung der cDNA-Konstrukte.....	140
3.2.4	Generierung der cDNA-Vektoren	142
3.3	Expressionstudien	145
3.3.1	<i>Northern-Blot</i> und RT-PCR.....	145
3.3.2	„ <i>In-situ</i> “-Hybridisierung im Totalpräparat („ <i>whole mount</i> “)	149
3.4	Bindungsexperimente	150
3.4.1	Strategie	150
3.4.2	Codon-Analyse	151
3.4.3	Herstellung eines NICN1-GST-Fusionkonstruktes	152
3.4.4	Expression des rekombianten Nicolin1-GST-Fusionsprotein in <i>E. coli</i>	152
3.4.5	Optimierung der Expressionsbedingungen	156
3.4.6	Zusammenfassung der Versuche.....	163
3.5	Erzeugung einer stabilen Zell-Linie	163
3.5.1	Erzeugung des Fusionkonstruktes	164

3.5.2	Transfektion der MDCK-Zellen	164
3.6	Dichtegradientenzentrifugation	165
3.6.1	Vorversuch.....	166
3.6.2	Dichtegradientenzentrifugation	168
3.7	Charakterisierung der Bandenverschiebung (<i>bandshift</i>) mittels MALDI-TOF	170
Diskussion	180
4.1	Generierung einer <i>Nicolin1</i> -Knockout-Maus	181
4.1.1	Targeting-Strategie	181
4.1.2	Generierung der <i>Nicolin1</i> -Knockout-Vektoren	183
4.1.3	Generierung von rekombinanten Klonen	186
4.1.4	Mögliche Gründe für den ES-Zelltod während der Selektion.....	189
4.1.5	Neue Knockout-Konstrukte	191
4.2	Erstellung eines Expressionsprofils des humanen und murinen <i>Nicolin1</i> -Gens.....	193
4.3	Rekombinante Proteinexpression in <i>E.coli</i>	195
4.4	Erzeugung einer stabilen Zell-Linie.....	200
4.5	Dichtegradientenzentrifugation	201
4.6	Charakterisierung des Bandenverschiebung mittels MALDI-TOF	203
4.7	Fazit	206
Summary	207
Literaturverzeichnis	210
Anhang	225
Danksagung	236

Abbildungsverzeichnis

Kapitel 1

Abb. 1- 1: Organisation des caninen <i>Nicolin 1</i> -Genlocus	22
Abb. 1- 2: Vergleich der Aminosäuresequenzen	25
Abb. 1- 3. Kernlokalisierung des Nicolin1-Proteins	26
Abb. 1- 4: <i>nuclear pore complex</i> (NPC)	27
Abb. 1- 5: Rekombinationsereignisse	33
Abb. 1- 6: Schematischer Aufbau einer <i>loxP</i> -Sequenz.....	36
Abb. 1- 7: Cre-vermittelte Rekombinationen.....	37
Abb. 1- 8: Konditionales <i>Gene-Targeting</i>	39

Kapitel 3

Abb. 3- 1: Konditioneller Knockout-Vektor	105
Abb. 3- 2: Spaltungsmuster des PAC-Klons P2.....	107
Abb. 3- 3: Einbau des negativen Selektionsmarkers	108
Abb. 3- 4: Methode der PCR-Ligation-PCR	109
Abb. 3- 5: Einführung der konditionalen Elemente	110
Abb. 3- 6: Einführung des langen homologen Arms	110
Abb. 3- 7: Klonierungsergebnis des negativen Selektionmarkergens	111
Abb. 3- 8: Kontroll-PCR	116
Abb. 3- 9: <i>Southern-Blot</i> -Analyse	117
Abb. 3- 10: Positives <i>Targeting</i> -Ereignis.....	119
Abb. 3- 11: <i>Southern-Blot</i>	120
Abb. 3- 12: Verdünnungsreihe	121
Abb. 3- 13: Fluoreszierende ES-Zellen.....	128
Abb. 3- 14: MEF-Kolonie nach 14 Tagen Selektion im Phasenkontrast.....	130
Abb. 3- 15: pKOC30 transfizierte MEF Kolonie	131
Abb. 3- 16: pKOC30-Kolonien und Tyk-Kolonie nach 12 Tagen Selektion.....	133
Abb. 3- 17: Klonierungsstrategie des konstitutiven Konstrukts	137
Abb. 3- 18: Herstellung des <i>loxP/neo/loxP</i> -Vektors	138
Abb. 3- 19: Klonierungsschema des pNTK5-Plasmids	139
Abb. 3- 20: Zwischenstufe für die cDNA-Vektoren	141
Abb. 3- 21: Erzeugung der cDNA-Konstrukte	142
Abb. 3- 22: Kontrollspaltungen der Vektoren pEFZeo und pZ ₁₂	143
Abb. 3- 23: Kontrollspaltung der Zwischenstufe pEGFP-C1- <i>NICN1</i>	144
Abb. 3- 24: Kontrollspaltung des cDNA-Konstruktes pZ ₁₂ -GFP- <i>NICN1</i>	144
Abb. 3- 25: <i>Northern-Blots</i> des humanen und murinen <i>Nicolin 1</i> Gens.....	146
Abb. 3- 26: Semiquantitative RT-PCR–Analyse des humanen und murinen <i>Nicn1</i> - Gens	147
Abb. 3- 27: Quantifizierung der <i>NICN1</i> -Expression in verschiedenen Geweben.....	148
Abb. 3- 28: „whole mount“ <i>in-situ</i> -Hybridisierung Antisense und Sense.....	149
Abb. 3- 29: Codon-Analyse.....	151
Abb. 3- 30: Expressionsversuch	154

Abb. 3- 31: Aufreinigung des Fusionproteines GST-NICN1 über Sepharose beads.....	155
Abb. 3- 32: GST-NICN1 Kontrollgel.....	157
Abb. 3- 33: Opmierung der Proteinexpression	158
Abb. 3- 34: Expressionsversuch 4.....	160
Abb. 3- 35: Optimierung der Zentrifugationsschritte.....	162
Abb. 3- 36: Vorversuch.....	167
Abb. 3- 37: Dichtegradientenzentrifugation	168
Abb. 3- 38: Dichtegradientenzentrifugation mit einem Gradienten (2-15%).....	170
Abb. 3- 39: SDS-Gel zur Isolierung der Banden.....	171
Abb. 3- 40: Spektren der MALDI-TOF-Analyse	172

Kapitel 4

Abb. 4- 1: Aminosäuresequenz des GST-NICN1-Fusionskonstruktes	198
---	-----

Tabellenverzeichnis

Kapitel 1

Tab. 1- 1 Gegenüberstellung der Exon-Introngrößen des <i>Nicn1</i> -Gens bei Maus und Hund	24
--	----

Kapitel 2

Tab. 2- 1: Trypsinisierungsbedingungen.....	86
Tab. 2- 2: Gegenüberstellung der Elektroporationen (<i>BioRad</i>)	90
Tab. 2- 3: Gegenüberstellung der Elektroporationen (<i>AMAXA</i>).....	91

Kapitel 3

Tab. 3- 1: Primerkombination zur Überprüfung eines Rekombinationsereignisses	114
Tab. 3- 2: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 1	123
Tab. 3- 3: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 2	124
Tab. 3- 4: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 3	125
Tab. 3- 5: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 4	126
Tab. 3- 7: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 5	128
Tab. 3- 8: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 6	129
Tab. 3- 9: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 7	131
Tab. 3- 10: Bedingungen für die Expression des rekombinanten Proteins in <i>E.coli</i>	152
Tab. 3- 11: Bedingungen für das zweite Experiment	156
Tab. 3- 12: Bedingungen für das dritte Experiment	157
Tab. 3- 13: Bedingungen für das vierte Experiment	159
Tab. 3- 14: Bedingungen für das fünfte Experiment	161
Tab. 3- 15: Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchung.	173
Tab. 3- 16: Bedingungen für die massenspektrometrische Bestimmung des Trypsins	174
Tab. 3- 17: Autoproteolyse des bovinen Trypsins.....	175
Tab. 3- 18: Bedingungen für die massenspektrometrische Bestimmung des Nicolin1	176
Tab. 3- 19: Vergleich zwischen berechnetem und gemessenen m/z-Werten.....	177
Tab. 3- 20: Nicolin1 (theoretisch berechnet).....	178
Tab. 3- 21: Isoliertes Molekül1	178
Tab. 3- 22: Isoliertes Molekül 2.....	179
Tab. 3- 23: Isoliertes Molekül 3.....	179

Kapitel 4

Tab. 4- 1: Übereinstimmungen zwischen theoretischen und gemessenen m/z-Verhältnissen.....	205
---	-----

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>AMT</i>	Aminomethyltransferase Gen
Arg	Arginin
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum-Albumin)
CaCo-2	Colon-Carcinom-Zell-Linie
cDNA	komplementäre DNA
COS-1	humane Nierenzellen
Cre	cyclization recombination (Cre-Rekombinase)
<i>DAG1</i>	Dystroglykan Gen
dATP	2`-Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxycytosin-5`-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-Dextran
Dextran 70S	Dextran mit Molekulargewicht von 70 kDa
dGTP	2`-Desoxyguanin-5`-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>DT</i>	Diphtherie-Toxin Gen
dTTP	2`-Desoxythymidin-5`-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	embryonale Fibroblasten
ES	Embryonale Stammzellen
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
<i>et al.</i>	et altera (und andere)
FCS/ FKS	fötales Kälberserum
Flp	Flp-Rekombinase
<i>FRT</i>	<i>Flp recognition target</i> (Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase)

G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
GFP	Grünfluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein)
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HSV	<i>Herpes simplex Virus</i>
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kbp	1000 Basenpaare
kDA	Kilodalton
KO	knockout
kV	1000 Volt
LB	Luria broth
<i>LIF</i>	Leukemie Inhibitory Factor
<i>loxP</i>	Locus of X-over (Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase)
Lys	Lysin
mA	Milliamper
MALDI	Matrix-assisted-laser desorption/ionisation
MDCK	canine Nierenzellen
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
μ F	Microfarrad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NaAc	Natriumacetat
<i>NAD</i> ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natronlauge
<i>neo</i>	Neomycinphosphotransferase Gen

NES	Kernexportsignal (Nuclear export signal / sequence)
NLS	Kernimportsignal (Nuclear location signal / sequence)
NPC	Poren-Komplex (engl.: nuclear pore complex)
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (engl.: open reading frame)
ori	origin of replication
pA	polyA
PAC	P1 derived artificial chromosome
<i>PAGE</i>	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
Pen	Penicillin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGK	Phosphoglukokinase
pH	potentium hydrogenium
Pro	Prolin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfat)
SINE	short interspersed nuclear elements
SSC	Natriumcitrat (engl.: sodium salt citrate)
Strep	Streptomycin
SV40	Simian Virus 40
TA	Transaktivator
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung
TE	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<i>TK</i>	Thymidin-Kinase Gen
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
tTA	Tetracyclin-Transaktivatorprotein
U	Einheit (engl.: unit)
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-b-D-Galaktosid

Einleitung

Man kann darüber diskutieren, ob Nukleinsäuren oder Proteine die wichtigsten biologischen Moleküle sind. Als Träger der Erbinformation steht die DNA als Kandidat an erster Stelle. Allerdings erfüllt diese Information keine Funktion, solange sie nicht über die RNA als Zwischenstufe in eine Proteinsequenz übersetzt wird. Sowohl die Transkription als auch Translation werden durch Proteine erst ermöglicht und kontrolliert. Damit kann man die relative Bedeutung der beiden „Substanzklassen“ nicht sinnvoll unterscheiden, da beide voneinander abhängig sind. Fest steht, dass das Leben, wie wir es kennen, ohne Proteine nicht möglich ist [Goody, 1995].

Durch den raschen Fortschritt der Genomsequenzierungsprojekte wuchs das Wissen über DNA- und Proteinsequenzen viel schneller an als das über die jeweilige biologische Funktion. Allein beim Menschen konnten die Sequenzen der 30000 bis 40000 Gene entschlüsselt werden. Die biologische Funktion der daraus resultierenden Proteine ist allerdings von nur 15000 Genen bekannt. Damit wurde das wissenschaftliche Interesse geweckt, die Funktion aller bekannten Sequenzen zu entschlüsseln.

Mit der Verfügbarkeit der kompletten Genomsequenzen ist es über die vergleichende Analyse konservierter Proteinsequenzen möglich, die Funktion

und andere proteinchemische Eigenschaften vorherzusagen [Mittenhuber, 2002]. Die Anwendung der phylogenetischen Analyse verwandter Sequenzen für die vorläufige Bestimmung der Funktion unter Einbeziehung eines Vergleichs von Gen- bzw. Speziesstammbäumen wird unter dem Begriff „*phylogenomics*“ zusammengefasst, der von Jonathan A. Eisen geprägt wurde [Eisen, 1998]. Die Rekonstruktion der Evolution von Genen zur Funktionsvorhersage noch nicht charakterisierter Gene ist deshalb möglich, da Gen- bzw. Proteinsequenzen zusammen entwickeln [Mittenhuber, 2002].

Es gibt jedoch ca. 1000 Gene in den Datenbanken, denen über die Phylogenomik aufgrund fehlender Homologien zu bekannten Proteinfamilien keine biologische Funktion zugeordnet werden kann. Durch die Entschlüsselung der Genome einiger Modellorganismen steht die differenzielle Genexpression zur Funktionsanalyse solcher Gene im Mittelpunkt. Während das Genom eines Organismus im Wesentlichen statisch und eindeutig definiert ist, ist das Proteom dagegen variabel und nur durch die Festlegung einer Vielzahl von Parametern für einen Zustand des Organismus eindeutig definiert. Die gezielte Expression oder Deletion eines Gens in einem Modellorganismus ermöglicht es, diese Zustände näher zu analysieren. Andere Techniken wie die 2D-Gelelektrophorese und die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) spüren die Proteincharakteristika wie isoelektrischen Punkt und Molekülmasse auf, die ebenfalls Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion erlauben. Expressionsprofile, die mit Hilfe von *Northern-Blots* oder RT-PCR aufgestellt werden, geben Auskunft über die Gewebe, in denen das untersuchte Protein exprimiert wird, sowie über die gebildete Menge an Transkript. Damit tragen auch sie zur Funktionsanalyse der noch nicht näher bestimmten Gene bei.

Zu diesen ca. 1000 noch „funktionslosen“ Genen, gehört auch das in dieser Arbeit untersuchte *Nicolin1*, dessen physiologische Charakterisierung auf den nächsten Seiten näher beschrieben wird.

1.1 Das *Nicolin1*-Gen

1.1.1 Entdeckung des *Nicolin1*-Gens

Das Gen, ursprünglich als *p24* bezeichnet, wurde erstmals bei der genomischen Charakterisierung des caninen Dystroglykan-Gens *DAG1* auf dem Hundechromosom 20q15.1-15.2 entdeckt [Leeb *et al.*, 2000a]. Aufgrund der Homologie zu menschlichen EST`s mit den EMBL-Accession-Nummern H86023 und AA701640 konnte gezeigt werden, dass das Gen aus 6 Exons besteht. Der offene Leserahmen des *p24*-Gens umfasst dabei 642 Nukleotide, deren Translation ein 213 Aminosäuren großes Protein mit einer relativen Molekülmasse von 24 kDa erzeugt, aus dem die erste Bezeichnung des Gens abgeleitet wurde [Leeb *et al.*, 2000b]. Flankiert wird *Nicolin1* von der Sequenz des *DAG1*- und des *AMT*-Gens. Letzteres codiert für das Aminomethyltransferase-Protein, ein Enzym aus dem Glycin-Metabolismus. Dessen Transkriptionsstart liegt beim Hund nur 803 bp entfernt vom Polyadenylierungssignal des *Nicolin1*-Gens [Leeb *et al.*, 2000b]. Abbildung 1-1 zeigt die zur dieser Zeit bekannte genomische Organisation des caninen *Nicolin1*, hier noch als *p24* bezeichnet.

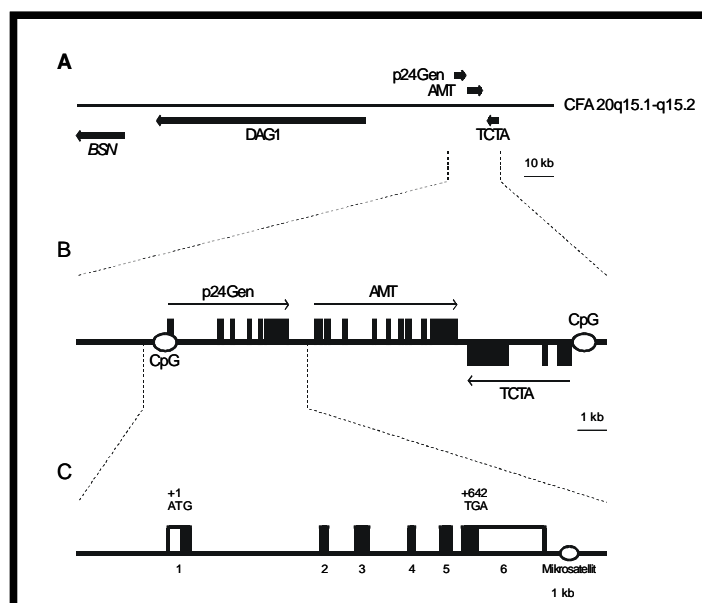


Abb. 1- 1: Organisation des caninen *Nicolin1*-Genlocus

Die Abbildung zeigt die durch Leeb *et al.* (2000b) ermittelte genomische Sequenz des murinen *Nicolin1*-Gens, hier noch als *p24* bezeichnet. **A** Physikalische Karte einer 162 kb langen genomischen Sequenz des Hundes. Das *p24* Gen wurde in direkter Nachbarschaft zum *DAG1* und zum *AMT*-Gen gefunden. **B** eine Ausschnittsvergrößerung der physikalischen Karte zeigt

die Intron/Exon-Grenzen der *p24*-, *AMT*- und *TCTA*-Gene auf. Diese drei Gene werden von CpG-Inseln flankiert. **C** Eine weitere Ausschnittsvergrößerung der Karte verdeutlicht die genomische Struktur des *p24*-Gens. Die untranslatierten Bereiche des ersten und letzten Exons sind als offene Kästchen dargestellt. Der offene Leserahmen ist durch die Nummerierung gekennzeichnet. [modifiziert nach Leeb *et al.*; 2000b]

1.1.2 Analyse der *NICN1*-cDNA-Sequenz

Die weitere Analyse der beim Hund neu entdeckten Sequenz erfolgte mit Hilfe der EST-Datenbanken, in denen sich mehrere Übereinstimmungen mit hoher Signifikanz fanden. Eine weitere Suche mit der ermittelten cDNA des *Nicolin1*- (*NICN1*) Gens erbrachte 85 säugerspezifische Übereinstimmungen mit einem E-Wert von $<10^{-10}$. Damit gilt die Existenz des Transkriptes in verschiedenen Säugetieren wie Mensch, Maus, Ratte, Schwein und Rind als bestätigt. Zudem machte ein Vergleich der humanen, murinen und caninen cDNA-Sequenz auf eine hohe Konservierung des offenen Leserahmens aufmerksam. Keine Homologie konnte dagegen bei den nicht zu den Säugetieren gehörenden Organismen nachgewiesen werden.

1.1.3 Die genomische Struktur des *NICN1*-Gens

Die weitere Studie der murinen und caninen genomischen Struktur erfolgte über den Sequenzvergleich auf BAC- und PAC-Klonen (AJ012166 und AJ422131). Die weitere Untersuchung der humanen genomischen Struktur erfolgte anhand der im Internet verfügbaren *draft sequences* (NT_022439). Daraus ergab sich, dass die murine ebenso wie die canine Sequenz aus 6 Exons besteht, die eine Basenanzahl von 72-234 bp umfassen. Die durchschnittliche Introngröße bei der Maus beträgt 639 bp und ist im Vergleich zum Hund wesentlich größer (siehe Tabelle 1-1).

Tab. 1- 1 Gegenüberstellung der Exon-Introngrößen des *Nicn1*-Gens bei Maus und Hund

<i>Nicn1</i> -Gen der Maus				<i>Nicn1</i> -Gen des Hundes			
Exon	Exongröße (bp)	Intron	Intron-größe (bp)	Exon	Exongröße (bp)	Intron	Intron-größe (bp)
1	234	1	2647	1	> 174	1	1552
2	177	2	418	2	177	2	239
3	114	3	401	3	114	3	456
4	72	4	371	4	72	4	332
5	105	5	74	5	105	5	74
6	> 606			6	> 368		

Daraus ergibt sich insgesamt eine murine genomische Größe von 6377 bp. Die Exon/Intron-Übergänge sind zwischen Mensch, Maus und Hund vollständig konserviert. Die caninen Spleiß-Übergänge entsprechen ausschließlich der für Eukaryonten typische AG/GT-Konsensus-Sequenz [Brenig und Brem, 1989; Brenig und Brem, 1992]. Bei der Maus hingegen kommt es zu einer Abweichung am Beginn des dritten Exons, bei dem ein Basenaustausch von „GT“ nach „GC“ vorliegt. Diese ungewöhnliche Sequenz kommt in der Natur zu 0,7 % vor und wird von den herkömmlichen U1/U2 enthaltenden Spleißosomen erkannt [Burset *et al.*; 2001].

Obwohl weder in der murinen noch in der caninen Sequenz TATA-Box-Motive erkennbar sind, konnten 300 bp vor dem Transkriptionsstart Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer Protomotorregion gefunden werden. Der GC-Gehalt liegt in diesem Bereich bei 56 % und das Verhältnis $CpG_{abs.}/CpG_{exp.}$ bei 0,7. Dies deutet auf das Vorhandensein einer CpG-Insel hin, die häufig in Promotorregionen anzutreffen ist.

Die chromosomale Lokalisation des humanen und murinen Gens ergab sich durch die vergleichende Genomkartierung und konnte für den Menschen auf Chromosom 3p21.2-p21.1, bei der Maus auf Chromosom 9F festgesetzt werden. Dabei handelt es sich bei der Maus um ein *single-copy-Gen*, während beim Menschen ein Pseudogen auf HSAXp11.22-11.3 existiert.

Die zunächst beim Hund ermittelte enge Nachbarschaft zum *AMT*-Gen konnte auch für die murine und humane Sequenz bestätigt werden [Backofen und Leeb, 2002].

1.1.4 Das NICN1- Protein

Die Sequenzen des *Nicolin1*-Gens von Mensch, Maus und Hund codieren ein 213 Aminosäuren langes Protein mit einer relativen Molekülmasse von 24 kDa. Die folgende Gegenüberstellung verdeutlicht die große Homologie der Aminosäuresequenzen.

	exon 1	↓	exon 2		
human	MSRVLVPCHVKGSVALQVGDVRTSQGRPGVLVLDVTFPSPVAPPFELQELTFKNYYTAFLSI			60	
dog	---S-----T-----M-----				
mouse	-----ST-----M-----V-----NI-----M-----				
			↓	exon 3	
human	RVRQYTSAHTPAKWVTCCLRDYCLMPDPHSEEGAQYVSLFKHQMLCDMARISELRLLRQ			120	
dog	---H--T-----M-----VL-----				
mouse	---QS-M-A-----D-----N-VL-----				
		↓	exon 4	↓	exon 5
human	PSPLWLSFTVEELQIYQQGPKSPSVTFPKWLSHPVPCQPALIREGLPDPSPRSVSEVQQM				180
dog	-----M-----P-I-----N-----				
mouse	-----LA-----SN---PRL-----				
		↓	exon 6		
human	WALTEMIRASHTSARIGRFDVDCYDLNLLSYT			213	
dog	-----T-----				
mouse	-----T-----				

Abb. 1- 2: Vergleich der Aminosäuresequenzen

Die kleinen Striche verdeutlichen die Homologie der Aminosäuren in den drei Spezies. Die Exongrenzen werden in Hinsicht zu der Proteinsequenz durch Pfeile gekennzeichnet. Die große Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen lässt auf eine biologisch konservierte Funktion des Proteins schließen.

Die Identität zwischen den Nicolin1-Proteinen von Mensch und Hund beträgt 94 %, zwischen denen von Mensch und Maus 89 %. Daraus lässt sich eine biologisch konservierte Funktion des Genproduktes ableiten. Eine Zuordnung des Proteins in bekannte Proteinfamilien ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich. Es besitzt kein N-terminales Signal für die Translokation ins Endoplasmatische Retikulum und beinhaltet auch keine hydrophobe Transmembran-Domäne.

Eine Besonderheit des Proteins konnte mit Hilfe eines GFP-Fusionkonstruktes in COS-1-Zellen aufgezeigt werden. Nicolin1 ist ein Kernprotein, dessen cDNA-

Sequenz jedoch keine Informationen über eine der bekannten Kern-Lokalisations-Erkennungssequenzen enthält.

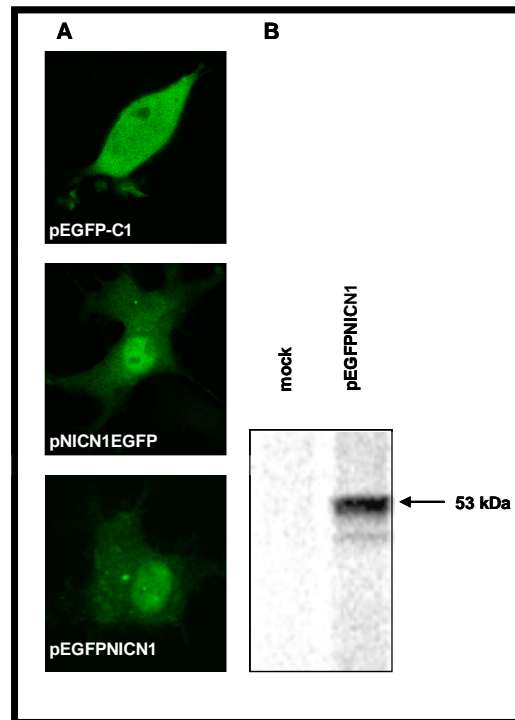


Abb. 1- 3. Kernlokalisierung des Nicolin1-Proteins

Abbildung **A** zeigt die konfokalen Aufnahmen von COS-1 Zellen, die mit dem pEGFPNICN1 und dem pNICN1EGFP-Konstrukt transfiziert wurden. Die Zellen zeigten in beiden Fällen eine starke nukleare Fluoreszenz, die eine Translokalisierung des Fusionsproteins in den Kern bestätigt. Diese Translokalisierung konnte sowohl mit einem N- als auch mit einem C-terminalen NICN1-GFP-Konstrukt gezeigt werden. Im Vergleich dazu konnte mit Hilfe des Kontroll-Plasmids pEGFP-C1, welches das GFP ohne fusionierte Proteinsequenz codiert, eine cytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden. **B** Um die korrekte Expression des gesamten Fusionsproteins bestätigen zu können, erfolgte eine Immunpräzipitation mit einem COS-1-Zellextrakt. Transient transfizierte COS-1-Zellen wurden hierzu für zwei Stunden mit [³⁵S]—Methionine inkubiert und anschließend über einen GFP-Antikörper aufgereinigt.

1.2 Die Kernlokalisierung

Generell lässt sich aus dem Aufenthaltsort eines Proteins seine biologische Funktion ableiten. Der Aufenthaltsort im Kern ist von besonderer Bedeutung, da für den Transport bestimmte Voraussetzungen gelten.

Translokationen in den Kern können sich sehr schnell vollziehen. Ca. 100 Moleküle pro Pore und Sekunde werden transportiert. Der Transfer erfolgt immer über den Kernporenkomplex (NPC, *nuclear pore complex*). Er spielt aufgrund der Kompartimentierung der Zelle eine zentrale Rolle beim Austausch

von Ionen und Molekülen zwischen Kern und Cytoplasma. Die Anzahl der NPCs korreliert eng mit der metabolischen Aktivität in der Zelle. So finden sich in Säugerzellen einige Tausend von ihnen [Allen *et al.*, 2000; Gerace und Burke, 1988]. NPCs bestehen aus 50-100 verschiedenen Proteinen [Fontoura, 1999], die auch als Nukleoporine bezeichnet werden und in unterschiedlicher Kopienanzahl vorliegen. In höheren Eukaryonten besitzen solche Komplexe eine Größe von 125 MDa [Reichelt *et al.*, 1990]. Bei den einzelnen Nukleoporinen handelt es sich nicht nur um Strukturkomponenten, sondern auch um Interaktionsstellen, die für eine vorübergehende Bindung von Transportfaktoren verantwortlich sind [Görlich und Kutay, 1999]. Zum einen handelt es sich dabei um Zinkfinger motive [Yasan und Blobel, 1999], zum anderen um eine Vielzahl von kurzen Peptidsequenzen, die C-terminal mit einem Phenylalanin und einem Glycin enden, beispielsweise FXFG, wobei X für eine kleine oder polare Aminosäure steht [Delphin *et al.*; 1997]

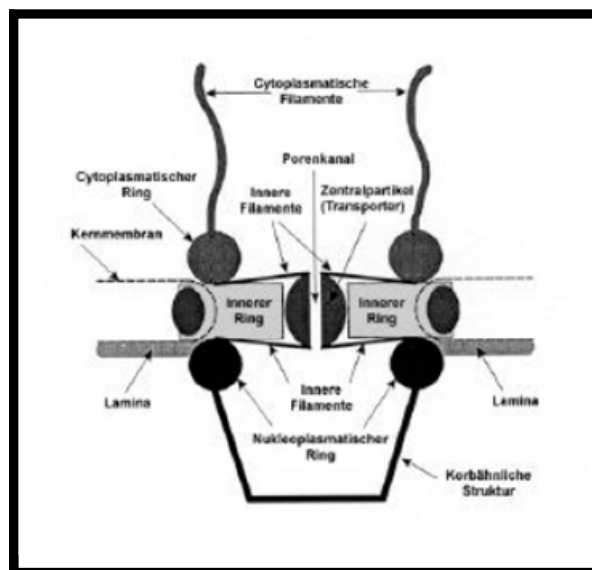


Abb. 1- 4: nuclear pore complex (NPC)

Die abgebildete Schemazeichnung eines Kernporenkomplexes ist ein Schnitt durch deren Längsachse. Es zeigt die cytoplasmatischen Filamente, den cytoplasmatischen Ring, den inneren Ring, den nukleoplasmatischen Ring, der aus nukleoplasmatischen Filamenten und äußerem Ring gebildet den korbähnlichen Struktur und den zentralen Transporter. Die Darstellung entspricht dem von Akey *et al.* favorisierten Modell der NPC-Struktur. [Akey und Radermacher 1993; Wentz 2000]

In Abbildung 1-4 ist der Aufbau eines solchen NPCs dargestellt: Dieser weist eine achtfache Symmetrie auf und besitzen neben einem cytoplasmatischen

einen zentralen und einen nukleoplasmatischen Ring. Von dem cytoplasmatischen Ring gehen insgesamt acht cytoplasmatische Filamente aus. Dies trifft ebenfalls auf den nukleoplasmatischen Ring zu, dessen acht nukleare Filamente zu einer korbähnlichen Struktur ausgebildet sind, die in einem vierten, etwas kleineren Ring enden [Moroianu, 1999]. Umstritten ist die Existenz und Bedeutung eines Zentralpartikels, das durch die Mitte der von den Nukleoporinen gebildeten Pore verläuft.

Die Art der Translokalisierung lässt sich in zwei Wege aufteilen:

- a) Der aktive Transport. Hierbei handelt es sich um einen signalvermittelten Weg, der direkt oder indirekt über Transportrezeptoren erfolgt und auch gegen ein Konzentrationsgefälle stattfinden kann.
- b) Der passive Transport. Dessen treibende Kraft beruht auf einem Konzentrationsgradienten. Somit läuft er ohne jegliche Interaktion zwischen NPC und zu transportierendem Molekül ab [Talcott und Moore, 1999].

Der aktive Transport beschreibt die rezeptorvermittelte Translokalisierung eines Moleküls. Es kommt zu einem direkten Kontakt mit dem NPC oder mit einem intermediären Transportrezeptor. Wichtige Voraussetzung für diese Bindung sind Signalsequenzen, so genannte NLS (*nuclear localisation signals*), die den Import initialisieren. NES (*nuclear export signals*) initialisieren den Export. Ohne diese Sequenzen ist keine Affinität zu den Nukleoporinen gegeben und damit kein Ein- bzw. Auslass möglich. Mittlerweile sind viele verschiedene Kernimport-Sequenzen bekannt, die keine Homologie zueinander aufweisen. Sie werden von unterschiedlichen Rezeptoren erkannt und gelangen auf verschiedenen Transportwegen in den Kern. Erste Hinweise auf das Vorhandensein solcher Sequenzen erkannte Dingwall [Dingwall *et al.*, 1982] bei der Untersuchung von Nukleoplasmin-Akkumulationen im Kern der *Xenopus laevis*-Oocyten. Zwei Cluster aus basischen Aminosäuren waren für den Transport verantwortlich [Valderon *et al.*, 1984, Landford und Butol, 1998, Robbins *et al.*, 1991]. Die weit aus bekannteste und am besten untersuchte NLS ist die des großen T-Antigens des Affen-Krebsvirus SV40, der der Sequenz dem Namen SV40NLS verlieh. Hierbei handelt es sich um eine kurze Abfolge basischer Aminosäuren (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val), die durch Bindung beispielsweise an Rinderalbumin zu dessen Akkumulation im Kern führt [Valderon *et al.*, 1984, Landford und Butol, 1998, Robbins *et al.*, 1991].

Hierbei kommt es zunächst zur Ausbildung eines Import-Komplexes, der aus dem NLS-tragenden Protein, Importin α und Importin β besteht. Importin α ist für die Erkennung und Bindung an die Signalsequenz verantwortlich und dient gleichzeitig als Komplexbildner mit Importin β . Importin β agiert dabei als eigentlicher Transportvermittler. Wie wichtig die Bindung an die Nukleopore ist, konnte durch kompetitive Hemmung mittels transportfaktorähnlicher Moleküle gezeigt werden [Finlay *et al.*, 1987, Kutay *et al.*, 1997]. Für die Dissoziation des Komplexes im Kern ist die kleine GTPase *Ran* verantwortlich. Durch ihre Bindung und die Freisetzung von Energie treibt sie den Komplex auseinander. Da Importin α und β auf der cytoplasmatischen Seite wieder benötigt werden, müssen sie den Kern verlassen. Dies geschieht auf unterschiedliche Art und Weise. Importin α bindet an den Export-Komplex CAS und wird durch eine energieabhängige Reaktion mit der GTPase *Ran* ausgeschleust. Importin β bildet einen Komplex mit GTP-*Ran* und gelangt so aus dem Kern. Dabei wird eine erneute Bindung an Importin α im Kern verhindert. Um ein konstantes Recyceln der beiden Importine zu gewährleisten, ist die Hydrolyse des an *Ran* gebundenen GTP notwendig. Hierbei behilflich sind zwei cytoplasmatische Faktoren, *RanBPI* und das *Ran* aktivierende Protein (*RanGAP*). Beide zusammen bewirken eine Stimulation der GTPase-Aktivität. Mittlerweile sind eine Reihe von Transportfaktoren bekannt, die in den meisten Fällen zu der Familie der Importin- β -Faktoren gehören oder Ähnlichkeiten zu ihr besitzen. Nicht immer ist für den Transport einer der Transportfaktoren notwendig, es finden auch direkte Bindungen an den NPC statt, die eine Translokation bewirken können. In diesen Fällen spricht man auch von einer leichten Diffusion, die unter anderem für das HIV-Protein *Vpr* postuliert wurde [Fouchier *et al.*, 1998]. Dieses bindet direkt an die Nukleopore und katalysiert seinen Transport damit selbst [Jenkins *et al.*, 1998]. Ebenfalls nicht zwingend erforderlich ist die Hydrolyse von GTP, wie Versuche mit Energieträger-Analoga gezeigt haben [Schwoebel *et al.*, 1998]. ATP-abhängige Schritte werden ebenfalls nicht benötigt [Talott und Moore, 1999]. Nicht jeder aktive Transport ist *Ran* abhängig [Englmeier *et al.*, 1999].

Für den Kerntransport über Diffusion werden zwei Modelle postuliert, die über ein Ein- oder Zwei-Schranken-Modell verfügen. Für den ersten Fall nimmt Hinshaw [Hinshaw *et al.*, 1992] Diffusionskanäle an, die im Randbereich der

zentralen Öffnung des NPCs lokalisiert sind. Sie bestehen aus 8 Kanälen, die Moleküle und Ionen ungehindert durchlassen können. Feldherr und Akin (1997) postulieren hingegen einen zentralen Kanal im Transportelement, in dem sowohl aktiver als auch passiver Transport stattfinden kann. Der Transporter fungiert dabei gleichzeitig als Schranke und begrenzt somit die Größe der diffundierenden Proteine. Erst bei aktivem Transport ist die Öffnung so groß, dass auch größeren Proteinen Durchgang gewährt wird. Das Zwei-Schranken-Modell ist aus den inneren Filamenten der cytoplasmatischen und nuklearen Seite aufgebaut [Kinsleva *et al*, 1998, Goldberg *et al.*, 1999]. Durch spezielle Untersuchungen von Bonner (1987) konnte gezeigt werden, dass Kanäle für passive Diffusion einen Durchmesser von 9 nm besitzen. Diese ermöglichen eine ungehinderte Diffusion für Proteine, die kleiner als 40-60 kDa sind. Der Transport bei größeren Molekülen ist teilweise erschwert oder unmöglich. Versuche zeigten, dass ein 17 kDa großes Protein ca. 2 min braucht, um das Konzentrationsgleichgewicht zwischen Cytoplasma und Kern zu erreichen, während ein 44-kDa-Protein ca. 30 min benötigt [Lang *et al*, 1986]. Die Diffusion korreliert nicht nur mit der Größe eines Proteins, sondern auch mit dessen Konformation. Es gibt Vermutungen, dass die Diffusion im Gegensatz zum aktiven Transport nicht regulierbar stattfindet. Neuere Erkenntnisse gehen davon aus, dass die Kaliumabhängigkeit im Lumen der Kernmembran die Permeabilität der Moleküle reguliert [Wang und Clapham, 1999].

1.3 Gene targeting

1.3.1 Historische Entwicklung

Schon immer spielte das Verständnis über regulatorische Systeme in der Genetik eine zentrale Rolle. Mit Hilfe der Funktionsanalyse können Krankheitsmodelle erstellt und entwicklungsbiologische Fragen geklärt werden. Diesen Analysen liegen Techniken zu Grunde, mit denen gezielt Veränderungen in einem Genom vorgenommen werden können. Man bezeichnet dies auch als *Gene targeting*.

Zunächst musste sich die klassische Genetik bei der Funktionsanalyse *in vivo* auf die Untersuchung von unspezifischen Mutationen beschränken. Beginnend in den 1970er und frühen 1980er Jahren konnte die gezielte Genveränderung in

der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) etabliert werden. Evans, Kaufmann und Martins gelang 1981 der Versuch, diese Technik auf Säugerzellen oder ganze Organismen zu übertragen. Sie isolierten murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus der inneren Zellmasse von Blastozysten und kultivierten sie, ohne dabei einen Verlust der Pluripotenz der Zellen herbeizuführen [Evans und Kaufmann, 1981; Martin 1981]. Ein Jahr später erzeugte Palmiter die erste transgene Maus, indem ihm die Insertion eines Wachstumshormon-Gens in die Keimbahn des Tieres gelang. Das Ergebnis war eine Maus, die schwerer und größer war als ihre Artgenossen [Palmiter *et al.*, 1982]. Der eigentliche Durchbruch wurde 1987 von Thomas und Capecchi erbracht, die einen Nachweis für die homologe Rekombination eines Genkonstruktes in das Genom von ES-Zellen erbringen konnten. Die Integration der Fremd-DNA erfolgt dabei über einen doppelten „*Crossing over*“ und einer Enzymkatalysierten Ausbildung eines Heteroduplex mit so genannter Holliday-Struktur [Capecchi 1994, Haber 1999, Rafferty *et al.*, 1996]. Dies führte 1988 zur Einführung des Begriffs des „*Gene targeting*“ durch Capecchi, der damit eine ortspezifische Modifikation eines Gens durch intermolekulare homologe Rekombination beschreibt [Mansour *et al.*, 1988]. Darunter fallen unter anderem die gezielte Inaktivierung von Genen (*Knockout*), Genaustausche (*Knockin*), sowie die gezielte Einführung von Punktmutationen. Diese genetischen Manipulationen führen zu einem veränderten Phänotyp in der betreffenden Maus, durch dessen Analyse Rückschlüsse auf die Funktion des Gens gezogen werden können [Catenhusen *et al.*, 1989]. 1989 folgten die ersten durch gezielte Genmodifikation transgenen Tiere [Thomas *et al.*, 1989]. Seither sind zahlreiche genetisch veränderte erzeugt worden, die zum Verständnis der genetischen Kontrollmechanismen vieler grundlegender Lebensvorgänge beigetragen haben.

1.3.2 Prinzipieller Aufbau eines *Targeting*-Vektors

Die Deletion eines Zielgens (*Target*) mittels definierter Genkonstrukte (*Targeting*-Vektor) führt zu einer *Knockout*-Maus. Die *Targeting*-Vektoren besitzen im einfachsten Fall eine homologe Sequenz zum Zielgen, ein Plasmidrückgrat, einen positiven Selektionsmarker [Hogan *et al.*, 1994] und

Schnittstellen zum Linearisieren des Vektors [Torres und Kuhn, 1997; Joyner 2001]. Sie werden als konstitutive Vektoren bezeichnet.

Typischerweise ersetzt das Selektionsmarkergen einen funktionell essentiellen Bereich, der nach Integration in das Zielgen dessen Funktionsverlust bewirkt. Für die homologe Rekombination stehen zwei Vektortypen, der *Replacement*- und der *Insertions*-Vektor [Hasty *et al.*, 1991] zur Verfügung. Der *Replacement*-Vektor besitzt zwei separate homologe Arme, die durch einen nicht homologen Bereich unterbrochen werden. Das Charakteristikum des Vektors ist die außerhalb der homologen Arme platzierte Linearisierungsstelle. Diese Eigenschaften führen zu einer nichtreziproken, homologen Rekombination in das Zielgen und somit zu einer Irreversibilität der Integration.

Insertions-Vektoren besitzen nur eine homologe Region, in der auch die Linearisierungsstelle platziert ist. Der dabei auftretende Doppelstrangbruch stimuliert eine klassische reziproke Rekombination in dem zum *Target* homologen Bereich. Dabei wird die endogene Sequenz durch die Integration des Vektors verdoppelt. Dies führt in einigen Fällen sogar zur Deletion des Vektors aus dem Chromosom. Die Reaktion ist damit reversibel. Aus diesem Grund werden *Insertions*-Vektoren selten zur Erzeugung von Knockout-Mäusen eingesetzt.

Die Größe der homologen Bereiche [Hasty *et al.*, 1991], ebenso die Art des verwendeten Vektors sowie das Vorhandensein von Polymorphismen zwischen Vektor und *Target* beeinflussen die Frequenz, mit der ein *Targeting*-Ereignis stattfindet. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sind die homologen Bereiche in einer Größe von 5-10 kb zu wählen [Deng *et al.*, 1993]. Zusätzlich sollte die Anzahl an Basenaustauschen (Polymorphismen) zwischen dem DNA-Konstrukt und der Zielsequenz so gering wie möglich sein. Dies lässt sich am leichtesten erreichen, wenn die DNA zur Konstruktion des Vektors aus demselben Mausstamm kommt, in dem später das *Targeting*-Ereignis stattfinden soll. Wie Experimente zeigten, führt dies unabhängig vom verwendeten Vektortyp zu einer fünffachen Verbesserung der Rekombinationsfrequenz [Deng und Capecchi, 1987].

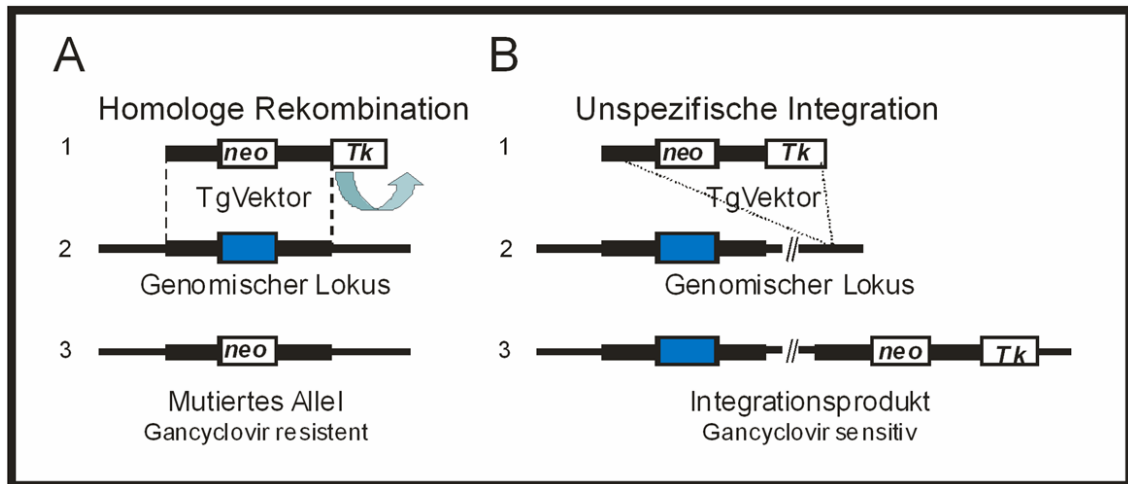


Abb. 1- 5: Rekombinationsereignisse

Möglichkeiten der Integration eines konstitutiven Vektors (TgVektor). **A** Konstitutive *Replacementvektoren* führen durch die Integration eines positiven Selektionsmarkers (*neo*) in den essentiellen Bereich eines Gens zu dessen Deletion. Bei dieser gewünschten Integration lassen sich die positiven Klone über den Selektionsmetaboliten Geneticin 418 selektieren. Die Resistenz gegenüber dem ansonsten cytotoxischen Stoff erwerben die Zellen durch das eingeführte *neo* Gen. Eine weitere Selektion kann über die Zugabe des Metaboliten Gancyclovir erfolgen. Dieser wird nach Phosphorylierung durch eine Thymidin-Kinase anstelle des Nucleotids dTTP in die DNA eingebaut und führt so zur DNA-Degradation, die den Zelltod herbeiführt. Die säugerspezifische Thymidin-Kinase kann aufgrund ihrer Substratspezifität diesen Metaboliten nicht umsetzen. Die Zellen besitzen somit eine Resistenz. **B** Neben der gewünschten homologen Rekombination kann es auch zur zufälligen Integration des Vektors an einer beliebigen chromosomalen Lokalisation (illegitime Rekombination) kommen. Obwohl die Art des Einbaus von verschiedenen experimentell nicht kontrollierbaren Faktoren abhängt, ist in vielen Fällen die Frequenz der unerwünschten zufälligen Integrationen höher als die der homologen Rekombination. Diese Zellen sind gegen den cytotoxisch wirkenden Stoff Gancyclovir sensitiv. Durch die illegitime Rekombination kommt es gleichzeitig zur Integration des Herpes-Simplex Thymidin-Kinase (*Tk*). Diese ist in der Lage, Gancyclovir umzusetzen und somit den Zelltod herbeizuführen.

1.3.3 Selektionsmarker

Homologe Rekombinationsereignisse sind selten im Vergleich zu Integrationen an zufälligen Stellen. Deshalb werden geeignete Selektionsmethoden eingesetzt, die die Isolation gewünschter ES-Zellklone ermöglichen.

Positive Selektionsmarker erfüllen zwei Funktionen. Zum einen dienen sie der Anreicherung von positiven Klonen, zum anderen wirken sie als Mutagen,

indem sie den essentiellen Bereich zerstören und somit zum Funktionsausfall führen [Deng *et al.*, 1993]. Der am meisten verwendete Selektionsmarker ist das bakterielle Neomycin-Phosphotransferase-Gen (kurz *neo*). Dieses wird häufig durch den Promotor der Phosphoglycerat-Kinase PGK1 reguliert [Adra *et al.*, 1987]. Die Expression des Gens in Säugerzellen ermöglicht die Resistenz gegenüber dem cytotoxischen Stoff Neomycin und seinen Derivaten (Geneticin, G418). Da positive Selektionsmarker mit der Funktion von Genen, die sich in der näheren Umgebung des Targets befinden, interferieren können, sollten sie nach der Selektion der Zellen entfernt werden [Olson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997].

Negative Selektionsmarker dienen der Unterscheidung von unspezifischen Integrationsereignissen an beliebiger chromosomaler Lokalisation. Die dafür codierenden Sequenzen befinden sich im Plasmidrückgrat und damit außerhalb des homologen Bereiches. Die letale Expression des Gens wird durch zufällige (*Random-*) Integrationen des Vektors in das Zielgen verursacht. Dieser illegitime Einbau erfolgt durch Rekombination außerhalb der homologen Arme oder durch vorangegangene Bildung von Konkatameren [Torres und Kuhn, 1997; Joyner 2001]. Das Thymidinkinase-Gen des Herpes-Simplex-Virus (HSV-TK) ist der bekannteste negative Selektionsmarker. Er führt zur Anreicherung von gewollt modifizierten Klonen gegenüber denjenigen Zellen, die ein unerwünschtes Integrationsereignis tragen. Deshalb wird er häufig zur Positiv-Negativ-Selektion eingesetzt [Mansour *et al.*, 1988]. Regulation und Expression des Gens werden typischerweise durch die Verwendung des PGK-Promotors ermöglicht. Das virale Enzym kann aufgrund seiner Substratspezifität neben dTTP auch Thymidin-Analoga wie Gancyclovir oder 5-FIAU nach Phosphorylierung in die neu synthetisierte DNA einbauen. Dies führt zur Hemmung der Elongation und somit zum Zelltod [Mansour *et al.*, 1988]. Das säugerspezifische Protein ist gegenüber diesen Metaboliten inert.

Ein weiterer wichtiger negativer Selektionsmarker ist das Gen für das Diphtherie-Toxin (DT). Dieses aus dem *Corynebacterium diphtheriae* stammende Exotoxin gehört zu den so genannten A-B-Toxinen. Fragment B ist dabei für die spezifische Bindung des Giftes an einen Zellrezeptor des Wirtes verantwortlich. Nach erfolgreicher Bindung ermöglicht die proteolytische Spaltung der Fragmente A und B das Eindringen von A ins Cytoplasma. Dort

unterbricht es die Proteinbiosynthese, indem es die Aminosäurenübertragung von der tRNA auf die wachsende Polypeptidkette blockiert. Dies erfolgt durch die Übertragung einer Adenosinphosphoribose von NAD⁺, die die spezifische Inaktivierung des Elongationsfaktors 2 zur Folge hat. Die Proteinbiosynthese kommt somit zum Erliegen und die Zelle stirbt. Als Selektionsmarker gen wird nur die codierende Sequenz der A-Untereinheit verwendet, da sich das Toxin bereits in der Zelle befindet.

1.3.4 Grenzen des konstitutiven *Gene-Targetings*

Die bis jetzt erwähnten Elemente und ihre Zusammenführung in einen Vektor ergeben einen konstitutiven Knockout. Das heißt, sobald die gewünschte Integration stattgefunden hat, ist die Funktion des betreffenden Gens zerstört. Dies kann zu Schwierigkeiten führen, wenn das Gen beispielsweise essentiell ist und schon während der Selektion letal wirkt. Gleiche Probleme können auftauchen, wenn das Gen für die Embryonalentwicklung notwendig ist. Liegt der Verlust der Funktion unter anderem in verschiedenen Geweben vor, kann der beobachtete Phänotyp die Summe unterschiedlicher Defekte sein, die sich gegenseitig beeinflussen können [Sauer 1998]. Um diese unerwünschten Effekte zu umgehen, setzt man in der Natur vorkommende Schalter ein. Sie ermöglichen die Wahl des Zeitpunktes und/oder des Gewebes, in dem der Knockout stattfinden soll. Sie werden deshalb als konditionale Elemente bezeichnet.

1.4 Konditionale Genmodifikation

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist die räumlich und zeitlich begrenzte Deletion von Genen in vielen Fällen notwendig. Die hierfür eingesetzten Genschalter (konditionale Elemente) haben die *Gene-Targeting*-Technik weiter verbessert [Kilby *et al.*, 1993].

1.4.1 Aufbau und Funktion von Genschaltern

Es handelt sich dabei um zwei Rekombinasesysteme, die bei der Maus etabliert sind [Lasso *et al.*, 1992, Organ *et al.*, 1992, Gut *et al.*, 1994, Dymecki *et al.*, 1996]: das virale Cre/*loxP* (*causes recombination / locus of x-ing over*) aus dem Bakteriophagen P1 [Sauer *et al.*, 1989] und das Flp/*FRT* System aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [O'Groman *et al.*, 1991]. Beide

Rekombinasen sind Mitglieder der λ -Integrase Superfamilie der ortsspezifischen Rekombinasen [Agros *et al.*, 1986, Sadowsky 1993]. Das 38-kDa Enzym Cre gehört zu den wenigen Mitgliedern dieser Familie, die weder Kofaktoren noch akzessorische Proteine für die Rekombination benötigen [Abremski und Hoess, 1984; Stark *et al.*, 1992]. Beide Systeme katalysieren eine konservierte DNA-Rekombination zwischen zwei 34 bp langen asymmetrischen [Stark *et al.*, 1992] Zielsequenzen. Cre bindet dabei an seine Erkennungssequenz *loxP*, Flp an die *FRT*-Site. Jedes dieser Erkennungssequenzen besteht aus einem asymmetrischen Zwischenstück (*spacer*), das dem gesamten Element die Orientierung gibt [Hoess *et al.*, 1984]. Flankiert wird dieser Bereich durch zwei palindrome Sequenzen (*inverted repeats*) von 13 bp. Während der Rekombination binden jeweils zwei der vier Untereinheiten des Enzyms an die palindrome Struktur in jedem der Elemente, wobei eine räumliche Näherung der Bindungsstellen erzeugt wird. Die DNA wird im Zwischenstück geschnitten, die Enden ausgetauscht und die DNA anschließend religiert [Schwenk *et al.*, 1996].

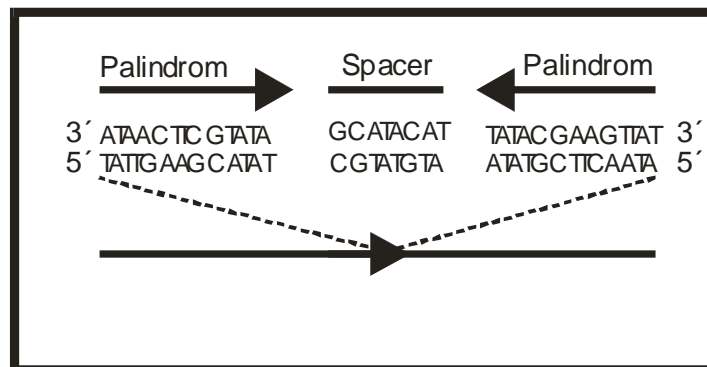


Abb. 1- 6: Schematischer Aufbau einer *loxP*-Sequenz

Dargestellt ist der Aufbau einer Erkennungssequenz der Rekombinase Cre. Sie besteht aus zwei 13 bp langen palindromischen Sequenzen. Diese flankieren ein asymmetrisches Zwischenstück, das dem gesamten Element die Orientierung gibt. Jeweils eine Untereinheit der Rekombinase bindet an eine palindrome Struktur. Dadurch kommt eine räumliche Näherung zustande. Die DNA im Zwischenstück kann geschnitten werden. Gefolgt wird diese Reaktion durch den Austausch der Enden und der Religation der DNA.

Das Produkt der katalytischen Reaktion ist von der relativen Orientierung der Erkennungssequenzen zueinander abhängig. Befinden sich zwei *loxP*-Sequenzen in *cis* (in gleicher) Orientierung auf dem DNA-Strang, so erfolgt eine Exzisionsreaktion der geflochten (von *loxP* flankierten) Sequenz in Form einer zirkulären Struktur [Sauer 1993, Sauer 1998]. Ein intaktes *loxP*-Element bleibt

auf jedem der beiden Rekombinationsprodukte erhalten. Die in der Abbildung 1-7 dargestellte Reversibilität der Reaktion ist in der Zelle nicht gegeben, da das zirkuläre Rekombinationsprodukt degradiert. Befinden sich die *loxP*-Elemente in gegenläufiger Orientierung in *cis* auf dem DNA-Strang, kommt es zu einer Inversion der geflochten Elemente. Hin- und Rückreaktion befinden sich im Gleichgewicht [Sauer und Henderson, 1990]. Liegen die *loxP*-Elemente *trans*, also auf verschiedenen Chromosomen findet eine Translokation durch reziproken Austausch der flankierten DNA-Segmente statt [Smith *et al.*, 1985]. Dieses Reaktionsgleichgewicht lässt sich auf die Produktseite verschieben, wenn man in die Sequenzen jeweils unterschiedliche Punktmutationen einführt. So werden zwei nicht homologe *loxP*-Sequenzen erzeugt, die nur sehr erschwert miteinander rekombinieren können [Albert *et al.*, 1995].

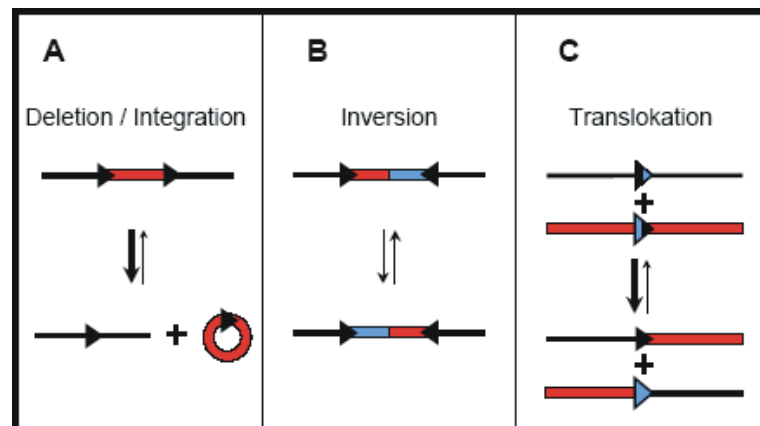


Abb. 1- 7: Cre-vermittelte Rekombinationen

Dargestellt sind drei Cre-vermittelte Rekombinationen zweier *loxP*-Sequenzen in Abhängigkeit ihrer relativen Orientierung zueinander. Bei den Abbildung **A** und **B** handelt es sich um intramolekulare Reaktionen, während **C** eine inter-molekulare Rekombination darstellt.

A Sind die *loxP*-Elemente in *cis*-Anordnung auf dem DNA-Strang, so erfolgt eine Exzisionsreaktion der geflochten (von *loxP* flankierten) Sequenz in Form einer zirkulären Struktur. Ein intaktes *loxP*-Element bleibt auf jedem der beiden Rekombinationsprodukte erhalten. **B** Bei einer gegenläufigen Orientierung in *cis* auf dem DNA-Strang kommt es zu einer Inversion. **C** Bei einer Ausrichtung der *loxP* Elemente in *trans* kommt es zu einer Translokation durch reziproken Austausch der flankierten DNA Segmente. [Verändert nach Torres und Kühn, 1997]

1.4.2 Modifikationen der Rekombinasen

Die häufige Anwendung der Rekombinasen Cre und Flp konnten immer mehr verbessert und an die jeweiligen Bedingungen angepasst werden. Mittlerweile existieren mehrere Varianten und Mutanten. In vielen Fällen sind die Veränderungen an dem weniger gebräuchlichen Flp/*FRT*-System vorgenommen worden. Die höhere Effizienz des Cre/*loxP*-Systems führt unabhängig von den ansonsten geringen Unterschieden zur Flp-Rekombinase zum vermehrten Einsatz des viralen Systems. Um die Hefe-spezifische Rekombinase verstärkt einsetzen zu können, wurde ihr Temperaturoptimum so weit verändert, dass es mit der Körpertemperatur der Maus von 37 °C übereinstimmt [Buchholz *et al.*, 1998].

Bei der Cre-Rekombinase führt das Anhängen einer zusätzlichen Kernlokalisationssequenz (NLS) [Gu *et al.*, 1993; Lewandoski *et al.*, 1997] *in vitro* zu einer Erhöhung der Rekombinationsfrequenz [Lee *et al.*, 1999]. Die Wirkungsweise dieser Mutante *in vivo* ist allerdings noch fraglich, denn der Wildtyp von Cre ist ebenfalls mit einem NLS ausgestattet [Lee *et al.*, 1999]. Bislang konnten die Auswirkungen von zwei Erkennungssequenzen noch nicht bestimmt werden.

Ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt ist der Einfluss der Cre- und der Flp-Rekombinase auf den Metabolismus der Keimzellen *in vivo*. Dessen ungeachtet werden sie in Literatur als harmlos beschrieben, da noch keine zu den *loxP*- und *FRT*-Elementen vergleichbaren endogenen Sequenzen in Säugerzellen gefunden worden sind [O'Gorman *et al.*, 1997; Lewandoski *et al.*, 1997]. *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass eine erhöhte Expression von Cre zu einer DNA-Schädigung und einer Hemmung des Wachstums führt [Thyagarajan *et al.*, 2000; Loonstra *et al.*, 2000]. Dies wird unter anderem durch degenerierten *FRT*- und *loxP*-Stellen hervorgerufen, die mit einer reduzierten Effizienz arbeiten. Ebenso kam es in gleichwertigen Versuchen unter Verwendung von männlichen Keimzellen zu chromosomalen Veränderungen und zur Sterilität. Es ist daher anzunehmen, dass solche Schäden auch *in vivo* auftauchen können [Schmidt *et al.*, 2000].

1.4.3 Konditionelle Mutagenese

Das klassische *Targeting* (konstitutiv) führt nach homologer Rekombination durch die Deletion des Gens mit dem positivem Selektionsmarker zu dessen Funktionsausfall. Im Gegensatz dazu lässt sich der Knockout mit Hilfe der Rekombinase-Systeme in bestimmten Geweben und/oder zu definierten Zeitpunkten induzieren. Häufig verwendet man dabei einen von *loxP*-Site gefloxt positive Selektionskassette, die im nicht kodierenden Bereich des Konstruktes lokalisiert. Damit der essentielle Bereich ebenfalls gefloxt vorliegt, wird eine dritte, identisch orientierte Erkennungssequenz inseriert (siehe Abbildung 1-8).

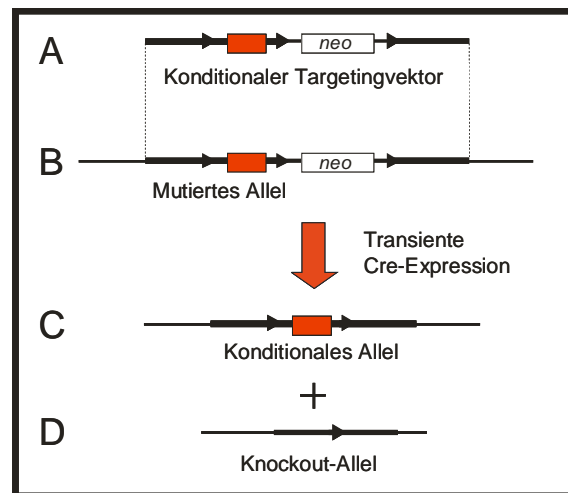


Abb. 1- 8: Konditionales Gene-Targeting

A Dargestellt ist ein einfacher Aufbau eines konditionalen Knockout-Vektors. Er besitzt neben den homologen Bereichen (dickere Linien), drei *loxP*-Sequenzen in gleicher Orientierung und eine positive Selektionskassette (*neo*). **B** Nach homologer Rekombination entsteht ein mutiertes Allel. **C** und **D** Der essentielle Bereich lässt sich durch die transiente Cre-Expression deletieren. Dabei kommt es zur Ausbildung eines konditionalen Allels mit gefloxt kodierenden Genabschnitt (**C**) und eines Knockout-Alles, dessen gefloxter essentieller Bereich deletiert worden ist (**D**).

Das Ergebnis der homologen Rekombination nach transienter Transfektion eines Cre-Expressionsplasmids führt zu zwei Produkten. Zum einen entsteht ein konditionales Allel, mit einem gefloxt kodierenden Genabschnitt. Zum anderen wird ein Knockout-Allel erzeugt, dessen gefloxter essentieller Bereich deletiert worden ist.

Je nach Fragestellung oder Untersuchung können solche Genmodifikationen gewebe- bzw. entwicklungspezifisch oder durch Induktion mit einem Signalstoff ganz gezielt hervorgerufen werden. Die drei Möglichkeiten unterscheiden sich nur in der Wahl der für die Cre-Expression verwendeten Promotoren:

Die induzierbare Genmanipulation erfolgt durch eine Expression der Cre-Rekombinase durch einen *ex vivo* steuerbaren Promotors. Ein solcher Genschalter beruht auf dem Tetracyclin-Operon, welches auf dem *E.coli*-TN-10-Transposon lokalisiert ist. Dieses ist aus zwei essentiellen Elementen aufgebaut. Bei dem ersten handelt es sich um die codierende Sequenz für ein Fusionsprotein. Dieses besteht aus dem DNA-bindenden Tetracyclin-Repressor und der C-terminalen Domäne des HSV-VP16-Transaktivators, was insgesamt auch als Transaktivatorprotein tTA bezeichnet wird. Das zweite Element enthält das Rekombinasegen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit multiplen *tet*-Operator-Stellen. Die Transkription des Transgens, welches unter der Kontrolle dieses Minimalpromotors steht, wird durch den Transaktivator aktiviert. Dieser kann nur in der Gegenwart von Tetracyclin an die DNA gebunden werden. Als Nachteil erweist sich die lange Halbwertszeit des Tetracyclins von 4-12 Stunden, die ein Aus- und Einschalten des Transgens erschwert. Für die Anwendung eines solchen Tetracyclin-Systems in der Maus sind zwei separate Integrationsereignisse nötig. Zunächst wird die codierende Sequenz der Cre-Rekombinase hinter den Tetracyclin-induzierbaren Minimalpromotor kloniert und in eine Maus transferiert. Die Expression des aktivierbaren tTA-Transaktivators erfolgt in einer zweiten Maus ubiquitär oder zelltypspezifisch. Durch Kreuzung beider Tiere erhält man eine tTA/Cre-Maus. Diese wird mit einer Maus angepaart, die das Zielgen enthält. Die anschließende Aktivierung der sequenzspezifischen Rekombination in den Zellen, die tTA exprimieren erfolgt durch die Injektion von Tetracyclin.

Die Klonierung der codierenden Sequenz von Cre hinter Promotoren, die nur in bestimmten Geweben oder zu einem definierten Zeitpunkt aktiv sind, bewirkt die gewebe- oder entwicklungspezifische Aktivierung der Rekombinase.

1.4.4 Generierung einer Knockout-Maus

Bei der Maus handelt es sich um ein gut charakterisiertes Säugetier, das in seiner Genetik dem Menschen sehr ähnlich ist. Aus diesem Grund ist es das gebräuchlichste Modell für Gen- und Krankheitsforschung [Bogue, 2003, Buer und Ballung 2003]. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist eine Vielzahl von genetisch homogenen Inzuchtstämmen erzeugt worden [MGI-Webseite]. Die neusten Erkenntnisse ergeben sich durch den publizierten Entwurf des sequenzierten Mausgenoms, sowie durch weitere Funktionsanalyse der Gene [Okazaki, 2001]. Weitere Unterstützung bietet die Bioinformatik, mit dessen Hilfe eine Fülle von Informationen über die Struktur sowie phylogenetische Beweise ermittelt werden können [Mount, 2001]. Damit bildet sich die Betrachtung von Veränderungen im lebenden Organismus, also *in vivo*, zunehmend zu einer Standardmethode heraus. In den letzten zehn Jahren hat sich die Technologie der konventionellen Erzeugung von transgenen Tieren oder Knockouts als wesentlicher Bestandteil für die Erforschung von genetischer Organisation, Genfunktionen, sowie Toxin- und Drogenuntersuchungen herausgestellt [Bockamp 2002, Thyagrajan 2003].

Die häufigste eingeführte Modifikation bei der Maus ist die Mutation eines bestimmten DNA-Lokus (*Gene Targeting*). Neben ihr wird die neuere Methode des *Gene silencing* auf posttranskriptionalem Weg, welches auch als RNAi-Technologie oder *Knockdown* bezeichnet wird [Schramke und Allshire 2003], eingesetzt.

Die Erzeugung transgener Mäuse erfolgt auf verschiedenen Wegen und orientiert sich an der zu lösenden Fragestellung:

- **Injektion** von Fremd-DNA in die Zellmasse eines Embryos führt zur Herstellung transgener Tiere.
- **Injektion** eines Expressionsvektors **in den Pronukleus** eines Embryos bewirkt die Überexpression des zu untersuchenden Proteins. Zunächst kommt es zu einer zufälligen Integration des Konstruktes ins Genom der Maus. Nach dem Transfer der Embryos in scheinchwangere Mäuse und der Geburt der Jungen überexprimieren diese transgenen Tiere ein bestimmtes Protein. Es werden häufig mehr Kopien der DNA pro Genom eingebaut, was zu starken Irritationen führen kann. Der Phänotyp wird damit stärker als gewollt beeinflusst.

- **Transfektion** von pluripotenten [Feng et al., 2002] ES-Zellen mit dem Genkonstrukt resultiert in der Erzeugung einer chimären Maus [Tohrres und Kuhn, 1997; Hogan *et al.*, 2001].

Die Transfektion ist eine der häufigsten Methoden zur Generierung von transgenen Mausmodellen, da die Anpaarung von Chimären zu Knockout Mäusen führt, die zur Analyse der Funktion entscheidend beitragen. Um diese zu erzeugen, müssen die Zellen nach Elektroporation auf das stattgefundene Rekombinations-Ereignis überprüft werden. Zunächst erfolgt in der Selektionsphase die Identifizierung der stabil transfizierten Zellen durch die Zugabe des Selektionsmetaboliten G418. Zellen, die das Konstrukt ins Genom eingebaut haben, sind resistent gegenüber dem cytotoxischen Stoff. Zellen, die durch illegitime Rekombination in den Besitz des *neo*-Gens gelangt sind, werden durch die negativen Selektionsmarker ausgesondert. Im Falle des Diphtherie-Toxins sterben diese Zellen ohne die Zugabe von weiteren Metaboliten auf Grund der Expression der die Proteinbiosynthese hemmenden A-Untereinheit. Unter Verwendung des negativen Selektionsmarkers Thymidin-Kinase als Kasette findet die Selektion ca. 2 Wochen nach der Behandlung mit Geneticin statt. Dem Medium wird nun Gancyclovir zugefügt, welches zum Absterben der Zellen führt. Die resistenten modifizierten ES-Zellen werden weiter kultiviert und mittels PCR und/oder *Southern-Blot* auf das Vorhandensein des Integrationsereignisses überprüft. Es folgt die Injektion der Zellen in Blastocysten, die wiederum in den Uterus von scheinchwangeren Mäusen verpflanzt werden. Die dabei verwendeten Blastocysten stammen häufig aus weißen Mausstämmen, während die zur Manipulation eingesetzten ES-Zellen aus braun oder schwarz gefärbten Mäusen gewonnen werden. Nach 19 Tagen kommen die chimären Jungen zur Welt. Die Fellfarbe dient dabei als Indikator für die Integration der manipulierten ES-Zellen. Dies ist möglich, da die genetisch veränderte Blastocyste am Aufbau der Haut und der Haar-Follikel der Maus beteiligt ist. Je höher der Anteil an eingebauten, manipulierten ES-Zellen, desto stärker dunkel gefärbt sind die Jungen. Damit steigert sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich genetisch veränderte Zellen auch in den Keimbahnen befinden [Hogan *et al.*, 1994]. Als nächstes folgt die Kreuzung dieser Tiere mit einem Mausstamm, der eine andere Pigmentierung als der

verwendete ES-Zell-Donor-Stamm aufweist. Man spricht von Keimbahntransmission für die Fellfarbe, wenn die Nachkommen (heterozygote Tiere) die Fellfarbe des ES-Zell-Donors aufweisen. Mittels *Southern-Blot*-Analysen und/oder PCR lässt sich überprüfen, ob die Tiere wirklich das mutierte Allel tragen. Aufgrund der Nichtkopplung von Fellfarbe und Mutation sollten 50 % der Nachkommen mit der Pigmentierung des ES-Mausstammes heterozygot bezüglich der gewünschten Genmodifikation sein [Hogan *et al.*, 1994]. Nach der Kreuzung zweier heterozygoter Tiere entsteht mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % die homozygote Maus (Knockout). Sie trägt die gewünschte Mutation auf beiden Allelen. Selbst ein rezessiver Phänotyp kann nun nicht mehr durch ein Wildtyp-Allel unterdrückt werden. Die Untersuchung dieses Tieres kann sowohl auf molekularbiologischem, histologischem, biochemischem und elektrophysiologischem Wege als auch verhaltensorientiert erfolgen [Hogan *et al.*, 1994].

1.5 Rekombinante Proteinexpression

Seit dem letzten Jahrzehnt hat die Zahl der verschiedenen Expressionssysteme für die rekombinante Proteinexpression zugenommen. Wissenschaftler können zwischen Säuger-, Insekten-, Hefe- und prokaryontischen Wirtsstämmen wählen. Ermöglicht wird dies durch eine Vielzahl von Vektoren, die die Expression in verschiedenen Organismen gestatten. Durch die ständig wachsende Anzahl an verfügbaren cDNAs und Protein-codierenden Sequenzinformationen ist die Entwicklung solcher Systeme für die Beantwortung von Fragestellungen in der Biologie und Medizin von großer Bedeutung. Fussenegger setzt hierfür einige Eigenschaften der Expressionssysteme voraus [Fussenegger 2001]:

Spezifität: Das System darf nicht mit endogenen Regulationssystemen interferieren und muss durch exogene, nicht toxische Faktoren aktiviert werden.

Induzierbarkeit: Während des reprimierten Zustandes kommt es nur zur einer niedrigen bis keiner Basalexpression. Erst nach Induktion findet eine vermehrte Expression statt.

Verfügbarkeit: Ihre exogen zugeführten Regulationsfaktoren können in alle Gewebe gelangen und sowohl die Plazenta, als auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

Irreversibilität: Das System ist in der Lage wieder, in den Ausgangszustand zurückzugelangen.

Immunogenität: Sowohl die Komponenten des Systems als auch die Regulationsfaktoren rufen keine Immunantwort hervor.

Dosisabhängigkeit: Die Expression des Systems kann durch exogene Faktoren gesteuert werden.

Trotz der ungehinderten Weiterentwicklung der eukaryontischen Systeme erfolgt die rekombinante Proteinexpression in den allermeisten Fällen in *E.coli*-Stämmen. *E.coli* ist vergleichsweise leicht zu transformieren, wächst schnell in einfachen Medien, und Wachstum und Lagerung erweisen sich als wenig aufwendig. In vielen Fällen produziert das Bakterium adäquate Mengen an Protein für die jeweilige Fragestellung.

1.5.1 Das Expressionssystem *E.coli*

Vektoren für die Expression in *E.coli* enthalten einen transkriptionalen Promotor. Dieser besteht aus zwei DNA-Hexameren, die -35 und -10 relativ zum Transkriptionsstart liegen. Weiter enthalten die Vektoren eine ribosomale Bindungsstelle, eine Translations-Initiations-Stelle, einen Selektionsmarker und einen Replikationsstart (*origin of replication*). Beeinflussung jeglicher Art dieser Bereiche führt zu einer Veränderung des gesamten Systems. Viele Hersteller bieten Vektoren mit stärkeren Promotoren an. Deren Einsatz ist jedoch zweifelhaft, da die verstärkte Produktion von RNA eine Sättigung der Translation bewirken kann. Gleichzeitig wird die Löslichkeit des Proteins beeinflusst.

Einige Promotoren weisen eine geringe Hintergrund-Aktivität auf. Diese können durch Zugabe geeigneter Substanzen oder durch Temperaturveränderungen während der nicht induzierten Phase weiter gesenkt werden.

Die Translation des rekombinanten Proteins kann unter Umständen durch an das Startcodon angelagerte Nukleotide beeinträchtigt sein. Auch führen Sekundärstrukturen der mRNA zu einer eingeschränkten Translation, da die Bindung an die Ribosomen beeinflusst wird [Tessier *et al.*, 1984, Looman *et al.*, 1986, Lee *et al.*, 1987]. In einigen bestimmten Fällen kann die Stabilität des rekombinanten Proteins in *E.coli* herabgesetzt werden. Die häufigste vorkommende Proteindegradation ist die Entfernung terminaler Methioninyl-Wiederholungen in der Aminosäuresequenz. Diese durch die Methioninyl-

Amino-peptidase katalysierte Reaktion läuft langsamer ab, wenn die Aminosäure an der +2-Position eine größere Seitenkette aufweist [Hirel *et al.*, 1989, Lathrop *et al.*, 1992]. Eine intakte Methionin-Wiederholung verleiht Stabilität gegenüber jeglichen Angriffen in der Zelle. Einzige Ausnahme bildet der Abbau durch Endopeptidasen. Tobias *et al.*, (1991) haben einen Zusammenhang zwischen den terminalen Aminosäuresequenzen eines Proteins und seiner Stabilität in Bakterien aufgestellt, die sie als „*N-end-Rule*“ bezeichnen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Arg, Lys, Phe, Leu, Trp und Tyr am N-Terminus der Sequenz die Halbwertszeit eines Proteins auf 2 min reduzieren. Im Vergleich dazu führten alle anderen Aminosäuren am N-Terminus zu Halbwertszeiten, die über 10 Stunden lagen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die zu exprimierende Proteinsequenz nach Aminosäurewiederholungen im +2-Bereich zu untersuchen und ggf. gegen Aminosäuren mit protein-stabilisierende Wiederholungen auszutauschen.

Generell können alle einfachen Proteine, die sowohl in Prokaryonten, als auch in Eukaryonten vorkommen, in *E.coli* exprimiert werden. Eine gute Proteinproduktion liefern monomere Proteine mit wenig Cysteinen oder prosthetischen Gruppen, die eine durchschnittliche Größe von 60 kDa nicht überschreiten. Probleme können dagegen bei Membranproteinen mit unterschiedlichen Transmembrandomänen und bei eukaryontischen Sekretproteinen auftreten. Eine genauere Analyse der Aminosäuresequenz lässt sogar Abschätzungen der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen in *E.coli* zu [Wilkinson und Harrison, 1991].

Vor der eigentlichen Klonierung gilt es, einige wichtige Punkte in Erfahrung zu bringen:

Das Startcodon. Viele kommerziell erhältliche Vektoren besitzen ein Startcodon für den Transkriptionsstart. In anderen Systemen muss das Startcodon vom Gen mit übertragen werden. Hierbei gilt es zu beachten, dass die betreffende codierende Sequenz in den Leserahmen des Vektors eingeführt werden muss. *E.coli* benötigt weiterhin ca. 5-12 zusätzliche Basenpaare, die zwischen ribosomaler Bindungsstelle und Startcodon liegen.

C/G-Gehalt. Ein zu hoher CG-Gehalt (mehr als 70%) setzt die Expressionsrate in *E.coli* stark herab. In solchen Fällen ist ein Wechsel des Expressionssystems angebracht.

Codon-Häufigkeit. Besteht das betreffende Gen aus Codons, die in *E.coli* gewöhnlich nicht so häufig Verwendung finden, kann die Expressionsrate negativ beeinflusst werden. Sind ein oder zwei seltene Codons in der Sequenz vertreten, kann es zu einer Pause während der Translation kommen, die die Degradation der mRNA zur Folge haben kann [Zhang, Zubay und Goldmann, 1991, Sorensen, Kurland und Pederson, 1989]. Dies ist häufig bei Proteinen der Fall, die eine Größe von mehr als 60 kDa aufweisen und bei denen damit die Anzahl an seltenen Codons sehr groß ist. Anhäufungen von seltenen Codons innerhalb eines kurzen Sequenzabschnittes verursachen ebenfalls Probleme. Mittlerweile existieren im Internet frei zugängliche Programme, in denen die Sequenz des rekombinanten Proteins dahingehend untersucht werden kann. Ein Beispiel hierfür ist der *graphical codon usage analyser* der im Internet unter der Adresse www.gcuu.de zu finden ist.

Sekundärstrukturen. Sekundärstrukturen, die sich in der Nähe des Startcodons ausbilden, blockieren die Translation [Gold *et al.*, 1981, Buell *et al.*, 1985]. Sie können auch eine Translationspause verursachen, die zur vorzeitigen Beendigung der Translation und zur „Verstümmelung“ des Proteins führen. Eine Möglichkeit dieses Problem der Sekundärstrukturen zu umgehen, ist die synthetische Herstellung der codierenden Sequenz. Mittels überlappender Primer, die nach dem Hybridisieren in einer PCR verlängert werden, kann die Sequenz durch anschließende Ligation der einzelnen Fragmente erzeugt werden. Es sind bereits einige Versuche bekannt, bei denen durch diese Technik das Problem der Sekundärstrukturen umgangen werden konnte [Koshiba *et al.*, 1999].

Größe des Proteins. Eine Faustregel besagt, dass Proteine mit einer Größe von mehr als 100 kDa und weniger als 5 kDa in *E.coli* nur schwer zu erzeugen sind. Kleine Proteine mit kleinen Sekundärstrukturen können leicht in den Bakterien degradieren. Werden die Proteine als Konkamere erzeugt, die mit proteolytischen oder chemischen Spaltungsstellen zwischen den einzelnen Monomeren ausgestattet sind [Hostomsky, Smrt and Paces, 1985], kann dies verhindert werden. Eine Alternative dazu ist die Expression als Fusionsprotein, die in den meisten Fällen über eine geeignete Spaltungsstelle zur Trennung der Proteine verfügen.

Einige Expressionsmuster sind in *E.coli* nur schwer oder überhaupt nicht möglich. Hierunter fallen posttranslationale Modifikationen, vor allem, wenn sie für die Funktion des Proteins von besonderer Bedeutung sind. Auch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinen in translatierten Proteinen ist aufgrund der reduzierenden Umgebung des Cytoplasmas in *E.coli* ineffektiv [Bassette *et al.*, 1999]. Ebenfalls zu Problemen führen Proteine, die in ihrer natürlichen Umgebung mit Membranen verbunden sind oder Transmembrandomänen besitzen.

Vor einer Expression eines rekombinanten Proteins in *E.coli* ist die Toxizität des Proteins auf die Zelle abzuschätzen. Dies ist besonders leicht, wenn die Funktion des Proteins bekannt ist. Spezielle Proteasen und Nukleasen können z.B. toxisch auf das System wirken. Ist eine Toxizität unter Umständen nicht auszuschließen, sollten Vektoren verwendet werden, die unter einem sehr leicht regulierbaren Promotor stehen. Damit ist eine Minimierung der Expression möglich.

Häufige Anwendung finden Fusionsproteine. Dabei wird die zu exprimierende Sequenz N-terminal oder C-terminal mit einem Fusionspartner verbunden. Dieser ermöglicht zum einen eine stabilere Expression in *E.coli*, gerade wenn es sich um sehr kleine zu untersuchende Proteine handelt. Zum anderen existieren Isolierungssysteme, die auf den Bindungspartner abgestimmt sind. Zum Beispiel kann ein myc-His getaggetes Protein sowohl über einen myc-Antikörper, als auch über paramagnetische Nickel-Kügelchen (*beads*) aufgereinigt werden. Damit die biologische Funktion des zu untersuchenden Proteins nicht durch den Fusionspartner beeinflusst wird, besitzen solche Systeme Erkennungsschnittstellen für Enzyme, die nach der Isolierung für eine Trennung der beiden Proteine voneinander sorgen.

1.6 MALDI-TOF

Die Massenspektrometrie ist eine Analysemethode zur Bestimmung der Molekülmassen von Ionen im Hochvakuum. Für den Aufbau eines Massenspektrometers sind eine Ionenquelle, in der aus einer Substanzprobe ein Strahl ionisierten Gases erzeugt wird, ein Massenanalysator, der die Ionen hinsichtlich ihrer Masse/Ladungsquotienten (m/z) auftrennt, und ein Ionendetektor nötig [Bantscheff und Glockner, 2001].

Die MALDI-Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption ionisation*) nutzt aus, dass eine schlecht absorbierende Verbindung durch Einstrahlung eines Laserimpulses bei wesentlich niedrigeren Energiedichten ionisiert wird, wenn sie in einem Gemisch mit einer stark absorbierenden Verbindung – der Matrix – vorliegt [Winston und Fitzgerald, 1997]. Diese absorbiert den Hauptteil der Energie aus dem Laserpuls und schützt die Proben somit vor (proteolytischer) Zersetzung. Gleichzeitig leitet sie die zur Desorption notwendige Energie auf die Probenmoleküle und stellt die für die Ionisierung notwendigen Ladungsträger zur Verfügung. Die Matrix reduziert auch die Wechselwirkungen der Probenmoleküle untereinander sowie mit der Metalloberfläche des Probenträgers und erleichtert dadurch die Desorption.

Für die Untersuchung wird die Probe deshalb mit einem Überschuss an Matrixsubstanz vermischt, auf einen Probenträger aufgetragen und bestrahlt. Welche Art von Matrix dazu verwendet wird, hängt von der Einstrahlänge des Lasers sowie von den zu untersuchenden Analytmolekülen ab.

MALDI-Geräte gibt es in verschiedenen Ausführungen. Ein weit verbreitetes Modell ist das MALDI-TOF-Massenspektrometer, auch unter der Bezeichnung Flugzeitmassenspektrometer (*time of flight*, TOF) bekannt. Hier errechnet sich die Masse eines Moleküls aus der Ionenflugzeit zwischen Quelle und Detektor, für die zwei Konstruktionsprinzipien existieren: bei linearen TOF-Instrumenten besteht die feldfreie Driftstrecke zwischen Quelle und Detektor aus einer geraden Flugbahn. Bei der Reflektor-TOF-Analyse (reTOF) werden die Ionen auf ihrer Flugstrecke in den Detektor mindesten einmal reflektiert. Dadurch erfolgt eine Fokussierung, die sowohl zu einer höheren Auflösung als auch zu einer höheren Präzision der Massenbestimmung führt.

Die MALDI-TOF-Untersuchungen ermöglichen nicht nur die Bestimmung der Masse eines Proteins, sondern können auch hilfreiche Informationen zu seiner Struktur liefern. Überwiegend wird die Massenspektrometrie zur Analyse einer Vielzahl von Biopolymeren (Proteine, Peptide, [Oligo-]Nukleotide, und [Oligo-]Glykoside) eingesetzt [Costello, 1999]. Die genaue Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen und Peptiden ist bis ca. 1000 kDa möglich [Beavis und Chait, 1996]. Eine weitere Einsatzmöglichkeit ist Produktkontrolle bei der Herstellung von (rekombinanten) Proteinen. Sie ermöglicht zusätzlich das *monitoring* von Proteinfaltungsreaktionen [Happersberger *et al.*, 1998, Happersberger und Glockner, 1998] und unterstützt die bioanalytische Charakterisierung von Proteinen [Winston und Fitzgerald, 1997].

Ein neues Einsatzgebiet der Massenspektrometrie ist die *Peptide-mapping*-Analyse. Hier werden Proteine durch spezifische enzymatische oder chemische Spaltungsreaktionen (Proteolyse) in Peptidfragmente zerlegt, welche massenspektrometrisch aus dem Gemisch (oder nach vorangehender chromatographischer Trennung) charakterisiert und identifiziert werden [Bantscheff, *et al.*, 1999, Billeci und Stults, 1993]. Mit Hilfe der *Peptide-mapping*-Analyse können Isoenzyme strukturell differenziert, die Primärstrukturen von rekombinanten Proteinen überprüft und kovalente Primärstrukturmodifikationen identifiziert werden [Bantscheff und Glockner, 2001].

1.7 Dichtegradientenzentrifugation

Die Zentrifugation ist eine der ältesten Techniken zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen. Weitere Anwendungsgebiete sind die Zellfraktionierung und die Isolierung von Zellorganellen. Das Grundprinzip der Zentrifugation ist die Bewegung der Teilchen in einem flüssigen Medium, angetrieben durch die Zentrifugalkräfte [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Mittlerweile ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Techniken bekannt. Eine davon ist die Dichtegradientenzentrifugation. Ihr allgemeines Prinzip beruht auf dem Aufbau einer Flüssigkeitssäule zur quantitativen Trennung der Bestandteile [Winter und Noll, 1998]. Die Dichte der als Gradient verwendeten Lösung nimmt zum Boden hin zu. Dieser Aufbau unterstützt die Stabilität der

Flüssigkeitssäule gegen Störungen durch mechanische oder thermische Konvektionsströmungen [Urbanke, 1998].

1.7.1 Zentrifugationstechniken

Abhängig von der Art der Auftrennung können zwei Techniken unterschieden werden.

In der Dichtegradienten-Gleichgewichtszentrifugation, auch als isopyknische Zentrifugation bezeichnet, erfolgt die Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Schwebedichte [Urbanke, 1997]. Bei relativ niedrigen Rotorgeschwindigkeiten wird, solange zentrifugiert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation der Teilchen zum Boden und ihrer Rückdiffusion zum Meniskus hin eingestellt hat. Die Moleküle befinden sich dann an einem Ort, wo ihre Dichte mit der des Gradienten übereinstimmt. Häufig verwendet man dafür Lösungen, die erst während der Zentrifugation einen Gradienten ausbilden [Urbanke, 1997].

Bei der differentiellen Sedimentation ist die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in dem Gradienten verantwortlich für die Auftrennung der Teilchen. Diese wird durch die unterschiedliche Größe der zu trennenden Moleküle hervorgerufen, die aufgrund verschiedener Sedimentationsgeschwindigkeiten zum Boden des Röhrchens wandern [Winter und Noll, 1998]. Der Dichtegradient erfüllt dabei zwei Aufgaben. Auf der einen Seite minimiert er die Konvektion. Auf der anderen werden schnellere Teilchen abgebremst. Diese würden mit steigender Geschwindigkeit aufgrund der mit zunehmender Entfernung von der Rotorachse steigenden relativen Zentrifugalbeschleunigung sedimentieren [Lottspeich und Zorbars, 1998].

Die zur Herstellung eines differentiellen Gradienten verwendeten Lösungen haben immer eine geringere Dichte als die zu untersuchenden Partikel.

1.7.2 Gradientenlösungen

Die Gradientenlösungen können aus verschiedenen Substanzen bestehen. Wichtige Voraussetzung ist, dass die verwendeten Materialien keinen Einfluss auf die zu trennenden Moleküle ausüben. Häufige Anwendung zur Trennung von RNA- und DNA-Molekülen findet der Cäsiumchlorid-Gradient. Eine der preiswertesten Chemikalien ist die Saccharose. Diese wird häufig zur Trennung

von Proteingemischen eingesetzt. Sie bietet den Vorteil, in Wasser leicht löslich zu sein und den Dichtegradienten während der Zentrifugation sehr konstanten aufrechtzuerhalten [Pingoud und Urbanke, 1998]. In Lösung liegt sie als elektrisch neutrales Molekül vor, so dass Wechselwirkungen mit den zu untersuchenden Proben ausgeschlossen werden können. Ihr einziger Nachteil ist die hohe Osmolarität [Urbanke, 1997], die die Trennung von hochmolekularen Substanzen nicht gestattet. In solchen Fällen bestehen die Gradienten aus Ficoll- oder Dextran-Lösungen [Pingoud und Urbanke; 1997]. Die Herstellung und der Transfer der Gradientenlösung sollte kurz vor dem Lauf erfolgen, damit die Stabilität der Flüssigkeitssäule nicht gefährdet wird. Dafür verwendet man Gradientenmischer. Diese bestehen aus einem Zweikammersystem, in dem zwei unterschiedlich konzentrierte Lösungen während der Befüllung des Zentrifugenröhrchens miteinander vermischt werden [Winter und Noll, 1998]. Die in einem geringen Volumen aufgenommene Probe wird anschließend auf den Gradienten transferiert. Nach dem Lauf werden die Röhrchen vorsichtig entnommen. Mittels des Gradientenmischers lassen sich nun einzelne Fraktionen entnehmen, deren Dichten über den Brechungsindex bestimmt werden. Mit dessen Hilfe lässt sich beispielsweise die Masse eines Moleküls bestimmen.

1.8 Aufgabenstellung

Nicolin1 gehört zu den ca. 1000 Genen, deren Sequenz in der Datenbank hinterlegt und somit bekannt sind. Dennoch kann das daraus resultierende Protein keinem bekannten Protein oder einer bekannten Proteinfamilie zugeordnet werden. Die biologische Funktion ist damit unbekannt. Es existieren eine Reihe von Methoden und Techniken, die erfolgreich zur Funktionsanalyse eingesetzt werden. Eine immer populärere Technik ist die Herstellung einer Knockout-Maus, die die Beobachtung und Untersuchung *in vivo* erlaubt. Da dieses Tiermodell dem Menschen sehr ähnlich ist, können die hier gewonnen Erkenntnisse auch auf humane Prozesse übertragen werden. Hilfreiche Unterstützung liefern dabei auch Techniken, die sich ausschließlich auf das Protein konzentrieren. So kann die Herstellung des rekombinanten *Nicolin1* in anderen Expressionssystemen sowohl in humanen und caninen Zell-Linien als auch im prokaryontische System *E.coli* die Verfügbarkeit an Protein

sicherstellen. Darüber hinaus liefert es nähere Informationen zum Protein selbst, zu dessen Aufbau, Struktur und vorhandenen Reaktionspartnern.

Ziel dieser Arbeit war die Funktionsanalyse des humanen und murinen *Nicotin1*-Gens und des dazugehörigen Proteins, unter Einsatz von Standardtechniken wie der Erzeugung einer Knockout-Maus und der Herstellung des rekombinanten Proteins in weiteren Expressionssystemen.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklaven	Bio-Rad Laboratories, München
BioDocAnalyzer	Biometra, Göttingen
<i>Bio</i> Photometer	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
<u>Brutschrank</u>	
WaterJacket	Sanyo
Brutschrank	Interga
Eismaschine	
Elektrophorese-Kammern DNA/Protein	Bio-Rad Laboratories, München
<u>Elektroporationsmaschinen</u>	
AMAXA	AMAXA GmbH, Köln
Gene Pulser TM und Capacitance extender	Bio-Rad Laboratories, München
Gefrierschränke	Liebherr
Geltrockner	Biometra
Heizblock	Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Konvokales Mikroskop	Licra
LI-COR DNA Analyzer	LI-COR Inc., Lincoln, Ne, USA
Gene Reader 4200	
Magnetrührer	IKA works, Wilington NC
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Bosch
Minishaker MS2	IKA works, Wilington NC
Mörser und Pistille	Roth
<u>PCR-Maschinen</u>	
PTC-100™ Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc; Watertown Massachusetts, USA
PTC-200™ Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc; Watertown Massachusetts, USA
PCR-Maschine Primus 96 ^{plus}	MWG-Biotech GmbH, Ebersberg
<u>Pipetten</u>	
Pipetman 20, 200, 1000µl	Gilson
Multikanalpipette	Micronic Systems
Pasteurpipetten	Roth
Glaspipetten	Roth
Hamilton 8 Kanal	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
Power supplier	Bio-Rad Laboratories, München
Speed Vac Plus SC110A	Savant
Steril-Werkbank	Savant
Ultraschallgerät	Savant
Videoprinter	Sony
Wasserbad	Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Burgwedel
<u>Zentrifugen</u>	
Megafuge 1.0R (Rotor BS 4402/A)	Heraeus Instruments, Osterode
Biofuge Stratos (Rotor # 3331)	Heraeus Instruments, Osterode
Biofuge A	Heraeus Instruments, Osterode
Centrikon H-401 (Rotor A 6.14)	Kontron Instruments, Neufahrn

2.1.2 Material

Zellkultur-Schaber	Sarstedt Inc., Newton
Cell Strainer	FALCON Becton Dickinson Labware, New Jersey
3MM-Chromatographiepapier	Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA
Einmal-Kanülen 18Gx1, 20Gx1	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Einweg Zellkulturpipetten 5, 10, 25, 50 ml	FALCON Becton Dickinson Labware, New Jersey ; Sarstedt Inc., Newton ; Greiner GmbH, Nürtingen
Einweg-Küvetten	amaxa GmbH, Köln
Einweg-Spritzen 5 ml	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Glasgefäße 10, 50, 100, 250, 1000, 2000 ml	Schott, Mainz
Kryo-Gefäße 1.8 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
Mehrweg-Küvetten	Bio-Rad Laboratories, München ;
Parafilm ^R	American National Can TM , Neenah, USA
2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
2-ml-PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
96-well-Platten für PCR	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200, 1000 µl	Kontron Instruments, Neufahrn
Ppn-Röhrchen 10 ml	Greiner GmbH, Nürtingen
Reaktionsgefäße 1.5 und 2 ml	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Sterile Reaktionsgefäße 15 ml	Sarstedt, Braunschweig
Sterile Reaktionsgefäße 50 ml	FALCON Becton Dickinson Labware, New Jersey ; Nunc GmbH, Wiesbaden
Zellkultur Platten 6-well	FALCON Becton Dickinson Labware, New Jersey

Zellkultur-Schalen 60, 100, 150 mm Durchmesser	FALCON Becton Dickinson Labware, New Jersey ; Sarstedt Inc., Newton
--	---

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien, Detergenzien und Antibiotika (Reinheitsgrad „Für die Analyse“) wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Chemie (München), Roth (Karlsruhe), Merck (E. Merck AG, Darmstadt), Amersham Bioscience (Freiburg) oder Invitrogen (GmbH, Karlsruhe) bezogen.

30% Acrylamid / 0.8 % Bisacrylamid	Roth
Agarose (Ultra pure) DNA	GibcoBRL Life Technologies, Heidelberg
Ammoniumacetat	Roth
5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Appllichem, Darmstadt
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
Chemikalien	
Chloroform	Roth
Chloroquin	Sigma
Coomassie	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O)	Merck
Dithiotreitol (DTT), <i>ultra pure</i>	Sigma
dNTP-Mix (10 mM)	
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA),	Roth
Ficoll 400	Amersham
Glutathion-S-Transferase- <i>beads</i>	Invitrogen
Harnstoff	Roth

Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG, C ₉ H ₁₈ O ₅ S)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kolloidal-Coomassie	Serva, Heidelberg
LB-Agar	Sigma
LB-Broth	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
N,N-Dimethylformamid	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
NZCYM-Broth	Sigma
Paraffinöl	Roth
Phenol	Roth
Salzsäure	Merck
Tris-(Hydroxymethyl)- amoniummethan (Tris)	Sigma
Ultra pure Sequagel ^R Complete Buffer Reagent	National Diagnostic, Atlanta
Ultra pure Sequagel ^R Extended Range	National Diagnostic, Atlanta

2.1.4 Proteine, Proteasen-Inhibitoren, Protein-Marker

Bovines Albumin Serum Fr. V (BSA)	Roth
Complete	Roche Diagnostics, Penzberg
Complete, Mini	Roche Diagnostics, Penzberg
Complete, Mini, EDTA free	Roche Diagnostics, Penzberg
Glutathion, reduziert (GSH)	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma

Prestained Protein MW Standard	Sigma
--------------------------------	-------

2.1.5 Detergenzien

Saccharose	Sigma
Natriumdesoxycholat	Merck
Natriumdesoxymaltosit	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma

2.1.6 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Geneticin Disulfat (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Kanamycin	Sigma
Mitomycin C	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Tetracyclin	Sigma
Zeocin	Invitrogen

2.1.7 Verwendete Kits

QIAEX II gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi, Maxi-Prep Kit	QIAGEN, Hilden

2.1.8 Medien und Lösungen für die Behandlung eukaryontischer Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum für ES-Zellen	HyClone, Logan, Utha; Pan Biotech
Knock out Medium	GMBH, Eidenbach
Knock out Serum	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Minimum Essential Medium (MEM) Medium	Gibco BRL, Eggenstein

mLIF-Faktor ESGRO™	Chemicon International, Inc., CA, USA
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypanblau	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein

2.1.9 DNA- und RNA spezifische Enzyme

Alkaline Phosphatase II (aus <i>E.coli</i>)	Boehringer, Ingelheim, Biberach
<i>Bam</i> HI	Boehringer, Ingelheim, Biberach
Kinase	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt, Frankfurt
RNAse	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase (GL)	Qiagen, Hilden

2.1.10 Radioaktive Substanzen

α -[³² P]-dCTP, Redivue 3000 Ci/mmol	Amersham Biosciences
L-[³⁵ S]-Methionin / -Cystein, wässrige Lösung 14 mCi/mmol	Amersham Biosciences

2.1.11 Vektoren und DNA-Marker

Knockout-Konstrukte

pEFZeo	Geschenk von Dr. Karaghiosoff, VMU Wien
pK-11	Geschenk von Dr. Gail Martin, UCSF, USA
pKO Scrambler V820	Geschenk von Dr. Karaghiosoff, VMU Wien (ursprünglich Stratagene)
pKO Scrambler V920	Geschenk von Prof. Gossler, MH-Hannover (ursprünglich Stratagene)

pKO Select DT	Geschenk von Prof. Gossler, MH-Hannover (ursprünglich Stratagene)
pKO Select TK	Geschenk von Prof. Gossler, MH-Hannover (ursprünglich Stratagene)
pKO+NeoR	Geschenk von Dr. Karaghiosoff, VMU Wien
pKS/oxpNTK	Geschenk von Dr. Karaghiosoff, VMU Wien
pPNT lox ²	Geschenk von Prof. Gossler, MH-Hannover
pTyk2-KO1	Geschenk von Dr. Karaghiosoff, VMU Wien

Expressionsvektoren

pcDNA4/myc-HisB	von Invitrogen, als Geschenk von Prof. Jakob, Uni Marburg erhalten
pEGFP-C1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pEGFP-N1	Clontech Palo Alto, CA, USA
pGEX-2T	Amersham Biosciences
DNA-Marker (1kb-Leiter)	Invitrogen

2.1.12 Bakterienstämme und Zell-Linien

<i>E.coli</i> XL – blue (Genotyp F': Tn10 proA+B+laqqΔ (laqZ)M15recA1 endA1 gyrA96(Nal ^r) thi hsdR17 (rkm+k) supE44 relA 1 lac)	Zur Verfügung gestellt vom Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung, TiHo-Hannover (ursprünglich von Stratagene, Heidelberg)
<i>E.coli</i> BL21 (genotype F', ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm (Studier und Moffatt, 1986)	Amersham Biosciences Freiburg
E14:[(129/Sv x 129/J)F1], Aw, Tyr ^{c-ch/+Tyr-c} , p/+ _p (Typ Sv-129 Ola)	Freundlicherweise vom Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt

MDCK (canine Nierenzellen)	Freundlicherweise vom Institut für Physiologische Chemie, Prof. Naim, TiHo-Hannover zur Verfügung gestellt
COS-1 (humane Nierenzellen)	
CaCO	

2.1.13 Mäusestämme

SV 129 Ole	Freundlicherweise vom Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt
------------	--

2.1.14 Antikörper

anti-myc	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
----------	----------------------------

2.1.15 Hardware und Software

Hardware

Laptop TopNote F	TopNote
LI-COR Computer	LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA

Software

Windows 2000, Windows XP	Microsoft™
Office 2000	Microsoft™
Acrobat Reader 5.0™	Adobe™
Sequencher 4.0.5	
OS2	
Edit Seq™	DNASTAR™

2.1.16 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Nicht näher beschriebene Lösungen und Standardmedien für *E.coli*-Bakterien wurden gemäß etablierter Protokolle angesetzt [Ausubel F.M. *et al.*, 1993; Sambrook J. und Russell D.W., 2001]. Es ist immer die Zusammensetzung der 1x-Lösung angegeben, Abweichungen werden gesondert vermerkt.

Für molekulargenetische Untersuchungen

LB-Medium :	10,00	g	Trypton
	5,00	g	Hefeextrakt
	5,00	g	NaCl
ad	1000,00	ml	H ₂ O bidest., autoklavieren
LB-Agar :	10,00	g	Trypton
	5,00	g	Hefeextrakt
	5,00	g	NaCl
	15,00	g	Bacto-Agar
ad	1000,00	ml	H ₂ O bidest., autoklavieren
Puffer P1 :	50,00	mM	Tris/HCl, pH 8.0
	10,00	mM	EDTA
			RNAse A in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, gelagert bei 4 °C
Puffer P2 :	200,00	mM	NaOH
	100,00	%	SDS
Puffer P3 :	3,00	M	KOAc, pH 5.5
Puffer QBT :	750,00	mM	NaCl
	50,00	mM	Na-MOPS, pH 7.0
	15,00	% (v/v)	Isopropanol
	0.15	% (v/v)	Triton X-100
Puffer QC :	1,00	M	NaCl
	50,00	mM	Na-MOPS, pH 7.0
	15,00	% (v/v)	Isopropanol

Puffer QF :	1.25	M	NaCl
	50,00	mM	Tris-Cl, pH 8.5
	15,00	%	(v/v) Isopropanol
TE (10/1) : (<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA)	10,00	mM	Tris-Cl, pH 8.0
	1,00	mM	EDTA
TE (10/0.1) :	10,00	mM	Tris-Cl, pH 8.0
	0.1	mM	EDTA
NZCYM-Medium :	10,00	g	NZ-Amine A
	5,00	g	Hefeextrakt
	5,00	g	NaCl
	2,00	g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	ad 1000,00	ml	H ₂ O bidest., autoklavieren
10x TBE-Laufpuffer : (<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA)	121,00	g	Tris
	51.4	g	Borsäure
	3.72	g	EDTA
	ad 1000,00	ml	H ₂ O bidest., autoklavieren
10x Auftragspuffer :	20,00	%	(w/v) Ficoll 400
	0.1	M	EDTA, pH 8.0
	0.25	%	(w/v) Bromphenolblau
	0.25	%	Xylencyanol
Für proteinchemische Untersuchungen			
Sammelgel-Puffer :	1,00	M	TrisHCl, pH 6,8
Trenngel-Puffer :	2,00	M	TrisHCl, pH 8,8
Ladepuffer :	75	%	3x Lämmli
	12,50	%	DTT
	12,50	%	10% SDS
5x Lämmli-Puffer :	0,32	M	Tris-HCl, pH 6,8
	44,00	%	(v/v) Glycerol
	25,00	%	(v/v) β-Mercaptoethanol
	12,50	%	(v/w) SDS
			Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung :	50,00	%	(v/v) Methanol
	10,00	%	(v/v) Eisessig
	0,40	%	(w/v)Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassie-Entfärbelösung :	10,00	%	(v/v) Methanol
	5,00	%	(v/v) Eisessig
Fixierlösung : (Silberfärbung)	30,00	%	Ethanol
	10,00	%	Essigsäure
Thiosulfatlösung : (Silberfärbung)	300,00	ml	Ethanol
	25,00	ml	4M Natriumacetatlösung, pH 6.0
	ad 675,00	ml	H ₂ O bidest.
	davon 100,00	ml	mit 100 mg Thiosulfat versetzten ca. 10 min vor Gebrauch herstellen
Silbernitratlösung :	0,10	mg	Silbernitrat
	ad 100,00	ml	H ₂ O bidest. mit 100 µl Formaldehyd versetzen ca. 10 min vor Gebrauch herstellen
Reduktionslösung : (Silberfärbung)	2,50	mg	Natriumcarbonat
	ad 100,00	ml	H ₂ O bidest. 150 ml davon mit 50 µl Formaldehyd versetzten frisch herstellen
Waschpuffer 1 : (für IP)	50,00	mM	TrisHCl
	60,00	mM	Kaliumchlorid
	0,20	%	NP-40 pH auf einen Wert von 7,5 einstellen

Waschpuffer 2 : (für IP)	10,00	mM	TrisHCl, pH 7,5
Lysepuffer 1 : (für Bakterien)	8,00	g	Natriumchlorid
pro 1g Gewebe 5 ml	0,20	g	Kaliumchlorid
Lysepuffer eingesetzt	1,15	g	Dinatriumhydrogenphosphat
	0,20	g	Kaliumdihydrogenphosphat
ad	500,00	ml	H ₂ O bidest, Salze lösen und einen pH-Wert von 7,2-7,4 einstellen
ad	1000,00	ml	H ₂ O bidest, autoklavieren
Lysepuffer 2 :	50,00	mM	Tris-HCl, pH 8
pro 1g Gewebe 5 ml	100,00	mM	Natriumchlorid
Lysepuffer eingesetzt	10,00	mM	DTT
	1,00	%	TritonX-100
	1,00	%	Deoxynatriumcholat
Lysepuffer 3 :	50,00	mM	TrisHCl, pH 8
pro 1g Gewebe 5 ml	250,00	mM	Kaliumchlorid
Lysepuffer eingesetzt	1,00	mM	EDTA
	1,00	mM	DTT
	0,20	%	TritonX-100
Für die Zellkultur			
ES-Medium :	500,00	ml	DMEM
mit 15 % FKS	75,00	ml	FKS (HighClone)
	1,00	%	Pen/Strep
	1,00	%	L-Glutamin
	1000,00	U/ml	mLIF (Endkonz.)
ES-Knockout- Medium :	500,00	ml	Knockout-Medium
mit 15 % FKS	75,00	ml	Knockout-Serum
	1,00	%	Pen/Strep
	1,00	%	L-Glutamin
	1000,00	U/ml	mLIF (Endkonz.)
EF-Medium :	500,00	ml	DMEM
mit 5 % FKS	25,00	ml	FKS (Gibco)
	1,00	%	Pen/Strep
	1,00	%	L-Glutamin

Einfriermedium ES :	8,00	ml	ES-Medium
	1,00	ml	FKS (Gibco)
	1,00	ml	DMSO
Einfriermedium EF :	7,00	ml	EF-Medium
	2,00	ml	FKS (Gibco)
	1,00	ml	DMSO
Mitomycin-C-Medium:	2,00	mg	Mitomycin C lösen in 200 ml EF-Medium mit Alufolie vor Licht schützen
PBS : (<i>phosphate-buffered saline</i>)	8,00	g	Natriumchlorid
	0,20	g	Kaliumchlorid
	1,15	g	Dinatriumhydrogenphosphat
	0,20	g	Kaliumdihydrogenphosphat
			H ₂ O bidest, Salze lösen und einen pH-Wert von 7,2-7,4 einstellen
ad	500,00	ml	
ad	1000,00	ml	H ₂ O bidest, autoklavieren

2.1.17 Stocklösungen

500x Ampicillin :	50,00	mg/ml	in H ₂ O bidest., gelagert bei -20 °C
1000x Tetracyclin :	12,50	mg/ml	in 70 % Ethanol, gelagert bei -20 °C (lichtempfindlich)
1000x Kanamycin :	50,00	mg/ml	in H ₂ O bidest, gelagert bei -20 °C
100x RNase A :	10,00	mg/ml	in H ₂ O bidest., zur Inaktivierung von DNAsen für 15 min auf 100 °C erwärmt, gelagert bei -20 °C

2.1.18 Verwendete Programme

Die humane Genomsequenz kann sowohl auf dem *golden path* – Browser der Universität Santa Cruz (Kalifornien) <http://genome.ucsc.edu/index.html> als auch auf dem Ensembl-Browser <http://www.ensembl.org/> sowie beim NCBI unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/> abgerufen werden.

***Pfam*-Proteindatenbank am Sanger Center:**

<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam>

In der *Pfam*-Datenbank (*Protein families database of alignments and HMMs*) finden sich unter anderem Beschreibungen zu einzelnen konservierten Proteindomänen.

NCBI Homepage:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Auf der Homepage des *National Center for Biology and Information* (NCBI) finden sich zahlreiche Links zu Programmen und Datenbanken. Die am häufigsten verwendeten sind im Folgenden aufgeführt:

ORF-Finder:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

Mit dem Programm ORF-Finder kann man sich offene Leseraster in allen 6 Leserahmen anzeigen lassen und die vorhergesagte Proteinsequenz im FASTA-Format herunterladen.

Human-Mouse Homology Map:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Homology/>

In dieser Homologie-Karte von Mensch und Maus sind die homologen Chromosomenabschnitte mit den orthologen Genen der beiden Spezies gegenübergestellt. Dabei stehen allerdings bei der Maus zurzeit nur die genetisch kartierten Gene zur Verfügung, auf der humanen Seite kann man direkt auf die Daten des humanen Genomprojekts zugreifen.

NCBI mouse genome resources:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/M_musculus.html

Unter *mouse genome resources* kann man alle zurzeit verfügbaren Daten des Mausgenomsequenzierungsprojekts abrufen, z.B. die fertig sequenzierten BACs aber auch die Rohdaten als „*trace files*“.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, [Altschul *et al.*, 1990]:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>

Mit dem Programm Blast wurden neue Sequenzen auf Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sequenzen überprüft. Man kann Nukleotidsequenzen untereinander (blastn), Nukleotidsequenzen mit Proteinsequenzen (blastx) oder auch translatierte Sequenzen mit Proteinsequenzen (tblastx) vergleichen.

Dabei stehen eine Reihe von unterschiedlichen Datenbanken zur Verfügung:

nr (non-redundant genebank) umfasst alle bekannten Gene und auch komplett sequenzierte BACs.

EST (*expressed sequence tag*) enthält exprimierte Sequenzen in Form von Endsequenzen von cDNA Klonen.

htgs (*high throughput genome sequence*) enthält unvollständige BAC-Sequenzen aus den Genomsequenzierungsprojekten von Mensch, Maus und Ratte.

mmtrace (*Mus musculus trace files*) enthält Rohdaten aus dem Genomsequenzierungsprogramm der Maus.

Mit „Blast 2 sequences“ kann man zwei ausgewählte Sequenzen miteinander vergleichen.

Mascot

www.matrixscience.com

Dieses Programm erlaubt unter anderem die Suche nach Proteinen anhand von massenspektrometrischen Daten. Die Suche kann mit Hilfe der Aminosäuresequenz und/oder der gemessenen Massen/Ladungsverhältnisse erfolgen.

ProteinProspector

<http://prospector.ucsf.edu/>

Dieses Programm gleicht in seiner Funktion der Mascot-Seite.

g c u a

<http://gcu.de/>

g c u a steht für *graphical codon usage analyser*. Dieses Programm ist sehr hilfreich, wenn rekombinante Proteine exprimiert werden sollen. Es vergleicht die Häufigkeit von Codons zwischen Wirt und Ursprungstamm. Dadurch lässt sich zum Beispiel abschätzen, ob ein eukaryontisches Protein in einem prokaryontischen Wirt exprimiert werden kann. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt graphisch in Form eines Balkendiagramms. Dort ist die Häufigkeit der einzelnen Codons prozentual dargestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Behandlung von prokaryontischen Zellen

Flüssigkultur [Ausubel *et al.*, 1990]

Autoklaviertes und mit entsprechendem Antibiotikum versetztes Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) wurde mit Bakterien einer Plattenkultur oder einer bakterienhaltigen Flüssigkultur angeimpft und zwischen 8-20 Stunden im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe der Antibiotika in die Medien erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

Ampicillin: 100 µg/ml

Tetracyclin: 12.5 µg/ml

Kanamycin: 50 µg/ml

2.2.1.2 Plattenkultur

(Nach Ausubel *et al.*, 1990)

Autoklavierter und auf 50 °C abgekühlter LB-Agar wurde, je nach Selektionsanforderung mit Ampicillin (100 µg/ml), Tetracyclin (12.5 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) versetzt und ca. 5 mm hoch in sterile Petrischalen gegossen. Es folgte die Trocknung der Platten über Nacht bei Raumtemperatur und die anschließende Verpackung unter sterilen Bedingungen. In dieser Form war die Lagerung bei 4 °C für mehrere Wochen möglich.

Mittels einer sterilen Pipette wurden 50 – 500 µl Flüssigkultur auf eine Platte gegeben, diese mit einer sterilen Öse gleichmäßig verteilt und für 12-19 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Transformation

50 µl auf Eis aufgetaute kompetente *E.coli* XL1-Blue wurden mit 30 µl DNA-Lösung vermischt. Diese enthielt ca. 50-200 ng ligierte Plasmid-DNA oder 10-50 ng superspiralisierte Plasmid-DNA. Es folgte die Inkubation des Ansatzes auf Eis für mindestens 2 Minuten. Anschließend fand für 115 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 statt. Dem Gemisch wurde danach 250 µl NZCYM-Medium hinzugefügt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C. 50-300 µl des Transformations-Ansatzes wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert.

2.2.1.4 Kryokonservierung

Um Bakterienkulturen dauerhaft bei -80 °C aufbewahren zu können, wurde eine 5 ml LB-Kultur mit entsprechenden Antibiotika mit einer einzelnen Kolonie einer Platte angeimpft und im Schüttler bei 37 °C für 12-16 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Vereinigung von 700 µl Kultur und 300 µl Glycerin in einem Kryoröhrchen. Die sich daran anschließende Lagerung fand bei einer Temperatur von -80 °C statt.

2.2.1.5 Erzeugung von transformationskompetenten *E.colis*

Die Art der eingesetzten Methode zur Herstellung chemisch kompetenter *E.colis* richtet sich nach dem verwendeten Stamm.

Erzeugung von transformationskompetenten XL1-Blue-Zellen

[Hanahan, 1983]

3 ml LB-Medium, versetzt mit 12,5 µg/ml Tetracyclin, wurden mit einer *E.coli*-XL1-Blue-Kolonie angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. 0,5 ml dieser Kultur diente der Animpfung von 20 ml warmen Medium. Sobald die Kultur nach der Inkubation auf dem Schüttler bei 37 °C eine OD₆₀₀ von 0,5 -0,8 erreicht hatte, erfolgte der Transfer in einen 2 l Schikanekolben und die Zugabe von 80 ml entsprechendem Medium. Die Zellen wurden unter den bereits erwähnten Bedingungen abermals bis zu einer optischen Dichte (bei 600 nm) von 0,5 -0,8 inkubiert und mit bei Raumtemperatur/bei 37°C vorgewärmtem Medium auf 500 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Es folgte eine weitere Inkubation bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Abkühlung der Kultur in einem Eis/Salz-Bad gestoppt und die Zellen in der vorgekühlten Zentrifuge bei 2 °C und 4000 Upm im GSA-Rotor für 10 min pelletiert. Es folgte die Resuspendierung in 100 ml auf 0 °C abgekühlten TfBI Puffer und die erneute Zentrifugation. Die Bakterien wurden in 20 ml und ebenfalls 0 °C kaltem TfBII-Puffer aufgenommen. Anschließend fand eine Aliquotierung (je 200 µl) der Lösung in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße statt. Danach erfolgte das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und die Lagerung der *E.coli* bei -80 °C.

TfB-I-Puffer :

(*transformation buffer*)

30 mM Kaliumacetat
50 mM Manganchlorid
100 mM Kaliumchlorid
10 mM Calciumchlorid
15 % Glycerin
Lösung steril filtrieren

TfB-II-Puffer :

(*transformation buffer*)

10 mM Natrium-MOPS, pH 7,0
75 mM Calciumchlorid
10 mM Kaliumchlorid
15 % Glycerin
Lösung autoklavieren

Erzeugung von chemisch kompetenten BL-12-*E.coli*

(Basierend auf der DMSO-Methode von Chung, C.T *et al.*, 1989)

50 ml entsprechendes Medium werden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 (nach ca. 3-6 h) bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Zellen bei 6000 Upm (GSA-Rotor) und 4 °C für 15 min.

Nach Resuspendierung des Pellets in 5 ml eiskaltem TSS-Puffer wurden die Bakterien in vorgekühlten Tubes aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TSS-Puffer :	0,5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	Natriumchlorid
	10,0 g	Polyethylenglycol (M.W. 3350)
	0,5 ml	DMSO
	5,0 ml	1M Magnesiumchloridlösung
ad	70 ml Wasser, pH-Wert auf 6,5 einstellen	
ad	100 ml Wasser , steril filtrieren (0.2 µm) und bei 4 °C lagern	

2.2.2 Allgemeine Methoden zur Behandlung von DNA

2.2.2.1 Fällung der DNA mit Ethanol

Die Fällung mit Ethanol diente der Aufkonzentrierung von DNA. Hierfür wurden zu der Lösung 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 2,5 Volumina 100%iges Ethanol gegeben. Durch Invertieren des Reaktionsgefäßes erfolgte die Vermischung der einzelnen Lösungen und das Ausfällen der DNA. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 min bei -80 °C fand die Zentrifugation der Proben in der Tischzentrifuge bei 4 °C und 14.000 Upm für 30 min statt. Es folgte die Waschung der Pellets mit 70%igem eiskaltem Ethanol. Nach Trocknung wurde die DNA in einer geeigneten Menge Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.2.2 Lyophilisation von DNA

Um größere Mengen DNA für die Transfektion lagern zu können, wurden die entsprechenden Konstrukte nach ihrer Linearisierung pelletiert.

Zunächst wurde das Restriktionsenzym mittels Hitzeschock bei 68 °C für 20 min inaktiviert. Es erfolgte die Zugabe 1,3 Volumina Phenol und die Invertierung des Tubes zur Mischung der Lösung. Zur Phasentrennung fand eine Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 14.000 Upm für 5 min statt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen transferiert und mit 1,3 Volumina Chloroform versetzt. Nach Durchmischung der Lösung wurde diese kurz zentrifugiert, die wässrige Phase erneut in ein neues Röhrchen überführt und mit 1,3 Volumina Chloroform versetzt. Es folgte die Zentrifugation und Entnahme der wässrigen Phase, die im Anschluss der normalen Ethanolfällung zugeführt wurde. Für die längere und stabilere Lagerung der DNA wurde das mit 70%igem Ethanol gewaschene Pellet bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die Konzentration der DNA eindeutig bestimmen zu können, wurde zunächst die Absorption bei 260 nm erfasst. Die Messung erfolgte in einer einen Zentimeter breiten Quarzküvette. Zusätzlich wurden 4 µl der DNA-Lösung auf ein analytisches Gel aufgetragen, um die Konzentration im Vergleich zum aufgetragenen Längenstandard zu bestimmen.

Das verwendete Photometer gab bei jeder Erfassung zusätzlich den Warburg-Quotienten (A_{260}/A_{280}) an. Dieser gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der betreffenden Probe und sollte in einem Bereich von A_{260}/A_{280} 1.8 –2.0 liegen.

2.2.2.4 Auftrennung der DNA (<20 kb)

Die Gelelektrophorese ist eine Technik, in der geladene Moleküle, wie z.B. DNA und Proteine aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften (Größe, Masse, Ladung) in einer Gelmatrix aufgetrennt werden. Die treibende Kraft ist die an das Gel angelegte Spannung.

Analytische Gele

Die Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese erfolgte wie bei Ausbuel *et al.*, 1987 beschrieben. Verwendung fanden horizontale Agarose-Gele von 5-10 mm Dicke und 10-25 cm Länge. Die Auswahl der Agarose-Konzentration erfolgte nach Größe der zu untersuchenden DNA und lag in einem Bereich von 0.5-2 %. Die jeweilige Menge Agarose wurde in einen Erlenmeyer-Kolben überführt, mit dem entsprechenden Volumen 1x TBE versetzt und kurz aufgeköcht. Die homogene Lösung wurde auf 50 °C abgekühlt und mit einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in H₂O) zu einer Endkonzentration von 0.4 µg/ml versetzt. Daraufhin erfolgte der Transfer der Gel-Lösung in eine Form und das Setzen des Kammes zur Ausbildung der Taschen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit 1x TBE-Laufpuffer aufgefüllten Kammer überführt und der Kamm vorsichtig gezogen. Die DNA-Lösung ist daraufhin mit 0.1 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt und in eine Tasche des Gels pipettiert worden. Die Elektrophorese erfolgte bei Feldstärken von 1-10 V/cm. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid wurden die Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels einer CCD-Kamera dokumentiert.

Präparative Gele

Präparative Gele finden dann Verwendung, sobald bestimmte DNA-Fragmente zur weiteren Analyse durch Ausschneiden der betreffenden Bande aus dem Gel isoliert werden. Sie unterscheiden sich in der Durchführung nicht von analytischen Gelen. Lediglich das Gelvolumen wird um 15 % erhöht, um tiefere Taschen zu erhalten. Um die daraus isolierte DNA für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, darf diese durch das UV-Licht nicht zerstört werden. Aus diesem Grund wurde auf einen UV-Tisch mit schwächerer Energie (366nm) ausgewichen.

2.2.3 DNA-Isolierung

2.2.3.1 Isolierung kleiner DNA-Fragmente (<20 kb)

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Gelelektrophorese wurde die gewünschte Bande auf einem UV-Leuchttisch (366 nm) ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge wurde die DNA-haltige Lösung freigesetzt und für weitere Anwendungen zugänglich gemacht.

2.2.3.2 Isolierung der DNA aus Gelstücken mittels des QIAEX 2 Kits

Die isolierten Gelstücke wurden in geeignete Tube überführt und gewogen. Es erfolgten Zugaben von 3 Volumen Puffer QX1 und gut resuspendierter QIAEX II-Lösung. Anschließend fand eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge statt. Es folgte die sorgfältige Entfernung des Überstandes und die Resuspension des Pellets in 500 µl QX1-Puffer. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 Upm für 30 Sekunden wurde der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 500 µl Puffer PE gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl TE (10/1) wurde die Lösung in der Tischzentrifuge für 30 Sekunden zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.3 Aufreinigung der DNA aus Lösungen mittels des QIAEX 2 Kits

Zur Entsalzung von PCR-Produkten und Vektoren wurde das QIAEX-II-Kit nach dem Protokoll *Aufreinigen und Entsalzen* verwendet: Zu der DNA-haltigen Lösung wurde 3 Volumen Puffer QX eine Stunde hinzugefügt und mit 10 µl gut resuspendierter QIAEX-II-Lösung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert und dabei alle 2 Minuten gemischt. Im Anschluss daran fand die Zentrifugation 30 Sekunden lang in einer Tischzentrifuge bei 13000 Upm und die sorgfältige Entfernung des Überstandes statt. Die Reinigung des Pellets erfolgte durch zweimalige Zugabe von je 500 µl Puffer PE sowie die anschließende Entfernung des Überstandes nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge. Hierauf wurde das Pellet 15 Minuten an der Luft getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (10/1) für 5 Minuten bei 50 °C inkubiert. Zur Gewinnung des DNA-haltigen Überstandes fand eine Zentrifugation bei 13000 Upm für 30 Sekunden statt.

2.2.3.4 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Eine 5-ml-LB-Kultur mit entsprechenden Antibiotika wurde mit einer einzelnen Kolonie von einer Platte angeimpft und im Schüttler bei 37 °C für 12-16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Kultur bei 5000 Upm (Rotor BS 4402/A) und 4 °C für 10 min und die Überführung des in 150 µl Puffer P1 resuspendierten Pellets in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die Bakterien lysierten max. 5 Minuten durch die Zugabe von 150 µl des Puffers P2. Daraufhin

erfolgte die Zugabe von 150 µl des Puffers P3, die anschließende kurze Mischung und Zentrifugation bei 22000 Upm (Rotor #3331) für 20 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 100 %igem Ethanol versetzt und kurz gemischt. Die DNA zentrifugierte für 20 min bei 4 °C und 22000 Upm (Rotor #3331) ab. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit 1 ml 70%igem -20 °C kaltem Ethanol. Vor der Aufnahme in 50 µl TE-Puffer (10/0.1) wurde das Pellet im Vakuum für 5 Minuten getrocknet.

2.2.3.5 Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

(Mit Hilfe der Qiagen Isolierungs-Kits)

Für die Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmide wurden Qiagen-Plasmid-Kits eingesetzt, deren Funktion folgendermaßen beschrieben werden kann: Durch eine NaOH/SDS-Behandlung werden die Bakterien lysiert. Proteine und assoziierte genomische DNA werden anschließend durch Kaliumacetat gefällt. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Ionenaustauscher-Chromatographie.

100-500 ml Bakterienkultur wurden für 15 Minuten bei 6000 Upm (Rotor BS 4402/A) und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet danach in einer entsprechenden Menge Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterienlyse erfolgte durch die Zugabe eines gleich großen Volumens des Puffers P2. Nach vorsichtiger Durchmischung der Lösung fand die Zugabe eines weiteren gleich großen Volumens des Puffers P3 und die Inkubation für max. fünf Minuten bei RT statt. Die Abtrennung der durch kurzes Invertieren des Tubes ausgefallenen Proteine konnte durch Zentrifugation bei 6000 Upm und 4 °C nach 30 min erreicht werden. Der Überstand wurde auf eine mit QBT-Puffer äquilibrierte Säule transferiert. Die Reinigung erfolgte über die Zugabe von QC-Puffer. Im Anschluss daran konnte die DNA mittels des Puffers QF eluiert und durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol gefällt werden. Durch Zentrifugation bei 6000 Upm (Rotor BS 4402/A) und 4 °C war es nach 60 Minuten möglich, die DNA vollständig abzutrennen und das Pellet mit -20 °C kaltem 70%igen Ethanol zu waschen. Nach dem Trocknen bei RT erfolgte die Aufnahme der DNA in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer (10/1). Die Konzentration konnte durch Messung der optischen Dichte im Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt werden.

2.2.4 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.4.1 Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Gereinigte DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Einstellung der Reaktionsbedingungen richtete sich nach den Angaben der Hersteller. Je nach Reinheitsgrad der DNA erfolgte die Zugabe von 1 bis 5 Einheiten Enzym pro μg DNA und die Inkubation für mindestens 1 Stunde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen trägt das 5'-Ende der gespaltenen DNA-Fragmente eine Phosphatgruppe, die zur Religation von linearisierten Plasmiden führen kann. Um dies zu verhindern, wurde dieser Phosphat-Rest mittels der alkalischen Phosphatase bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ für 1 Stunde abgespalten.

Reaktionsansatz :

	10 μg	linearisierte DNA
	8 μl	10 x Reaktionspuffer des Herstellers
	5 μl	alkalische Phosphatase (1U/ μl)
ad	80 μl	ml H_2O bidest.

Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte nach 20 Minuten Inkubation bei $68\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.4.3 Phosphorylierung

Zur Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten müssen die 5'-Enden Phosphatgruppen tragen.

Folglich müssen PCR-Produkte vor einer Ligation mit einem weiteren PCR-Produkt phosphoryliert werden.

Kinasierungs-Ansatz:

ca.	100 ng	PCR-Produkt 1
ca.	100 ng	PCR-Produkt 2
	3 μl	10x Reaktionspuffer des Herstellers
	1 μl	T4-Polynukleotid-Kinase (10U/ μl)
ad	30 μl	H_2O bidest.

Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die Kinase für 20 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

2.2.4.4 Ligation

Mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase können unter ATP-Verbrauch zwei DNA-Enden durch Verknüpfung von Phosphodiester-Bindungen kovalent verbunden werden. Voraussetzung hierfür ist ein 5`-Phosphat-Gruppen tragendes DNA-Ende.

Ligations-Ansatz	50 ng	Vektor-DNA
	X ng	Insert-DNA (molares Verhältnis Insert: Vektor ~ 1:1)
	3 µl	10x Reaktionspuffer des Herstellers
	1 µl	T4-DNA-Ligase
ad	30 µl	H ₂ O bidest.

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert oder alternativ 4-6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

(Nach Saiki *et al.*, 1988)

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion [Saiki *et al.*, 1988] handelt es sich um ein schnelles *in-vitro*-Verfahren zur enzymatischen Amplifikation eines spezifischen DNA-Segmentes. Im Ansatz sind drei Nukleinsäure-Segmente vorhanden. Zum einen die doppelsträngige genomische DNA (*template*), von der amplifiziert werden soll, sowie zwei einzelsträngige Oligonukleotide-Primer, die den Doppelstrang an einem Abschnitt flankieren. Die Primer sind verglichen mit der zu amplifizierenden DNA im Überschuss vorhanden. Der Ansatz besteht des Weiteren aus dem Enzym DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosid-Triphosphaten, Puffern, sowie Salzen.

Ein Zyklus besteht aus Denaturierung, *Annealing* und Synthese. Während der Denaturierung wird der doppelsträngige DNA-Strang aufgetrennt, somit werden die beiden Einzelstränge als Matrizen für die folgende Synthese freigesetzt. Die Primer hybridisieren mit den DNA-Strängen (*Annealing*) und stehen sich mit ihrem 3`-Ende gegenüber. Das Wachsen der neuen Stränge in 5` à 3`-Richtung wird durch die DNA-Polymerase katalysiert. Ein Syntheseyklus führt zu neuen Strängen, die in weiteren Zyklen als Vorlage einer neuen Amplifikation dienen. Aus

diesem Grund steigert sich die Menge des Amplifikates von Zyklus zu Zyklus exponentiell ($2^{(n-1)}$). Das Designen von Primer-Paaren ist für PCR-Reaktionen von entscheidender Bedeutung und wurde nach folgenden Grundregeln durchgeführt: Die Länge eines PCR-Primers sollte zwischen 18 und 22 Basen liegen. Die Schmelztemperaturen (T_m) eines Primerpaares sollten möglichst nahe beieinander liegen und sich um nicht mehr als 2 °C unterscheiden. Die Kenntnis der Schmelztemperaturen ist für die Festlegung der *Annealing*-Temperatur notwendig. Die Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers in einer PCR ist von den Konzentrationen an Salz und Tris-HCl im Reaktionspuffer sowie der Länge, der Konzentration und der Sequenz des Primers abhängig. Um T_m zu bestimmen wird im Allgemeinen die folgende Formel verwendet: $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - (0 \text{ bis } 10)$, wobei T_m maximal gleich der optimalen Synthesetemperatur der thermostabilen DNA-Polymerase sein sollte (70-74 °C). Der G/C-Gehalt der Primer betrug zwischen 45 % und 60 %, wobei G und C sich möglichst über die gesamte Sequenz gleichmäßig verteilen. Am 3'-Ende endeten die Primer möglichst mit den Nukleotiden A/T, G/C, G/C. Es wurde vermieden, Primer zu entwerfen, die während des *Annealings* dimerisieren könnten.

2.2.5.1 Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte

Geeignete Primerpaare wurden aus den vorliegenden Sequenzen herausgesucht. Der Standardansatz umfasste ein Gesamtvolumen von 50 µl mit ca. 100 ng Matrizen-DNA, 5 µl 10x Puffer des Herstellers, je 50 pmol Primer, 200 µM Desoxyribonukleosidtriphosphate und 2.5 U DNA-Polymerase. Die Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis pipettiert, gemischt und die Reaktionsgefäße in einem auf 94 °C vorgeheizten Thermocycler überführt.

Nach Ende der Reaktion erfolgte die Analyse der PCR-Produkte durch Agarose-Gel-Elektrophorese. Eine daran angeschlossene QIAEX-2-Aufreinigung macht die Amplifikate für weitere Reaktionen zugänglich. .

Allgemeine Bedingung

Wiederholung 20-30	[94 °C	5 min	Denaturierung
		94 °C	30 sec	Denaturierung
		60 °C	45 sec	<i>Annealing</i>
		72 °C	45 sec	Elongation
		72 °C	5 min	Elongation
		4 °C	hold	Kühlung

2.2.5.2 Nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA

(Nach Sanger *et al.*; 1977)

Sequenzreaktionen konnten mit dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deata-dGTP durchgeführt werden. Es wurden 200 fmol Plasmid-DNA (ca. 200 ng pro kb) mit 2 pmol IRD 800- oder 700-markierten Primer und 1 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und mit H₂O bidest. auf 26 µl aufgefüllt. Jeweils 4 µl von diesem Ansatz wurden zu 2 µl des jeweiligen Terminationsmixes pipettiert und mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Die anschließende Durchführung der PCR erfolgte auf einem Primus 96^{plus} - Thermocycler.

Nach der Reaktion wurden die Proben mit 5 µl Abstopp-Puffer versetzt.

Bedingung

Wiederholung 20-30	[94 °C	5 min	Denaturierung
		94 °C	45 sec	Denaturierung
		58 °C	45 sec	Annealing
		70 °C	45 sec	Elongation
		70 °C	5 min	Elongation
		4 °C	hold	Kühlung

Sequenzdatenauswertung

Die Auftrennung der nicht radioaktiven Sequenzreaktionen erfolgte auf dem LICOR Modell 4200, an der die Steuersoftware BaselmagerIR vs4.10 angeschlossen ist. Als Gelmatrix für die Auftrennung von bis zu ca. 900 bp kam das Sequagel XR unter Zusatz von 1 % DMSO in 0.2 mm dicken und 41 cm langen Gelen zum Einsatz. Die Auftrennung erfolgte bei 1500 V, 35 mA und 31 W für ca. 14 Stunden. Als Lauf-Puffer diente 1x TBE. Nach dem Lauf wurden die Sequenzen mit dem Programm Image Analysis vs4.10 automatisch gelesen, korrigiert und in das SCF-Datei-Format umgewandelt. Die Sequenzen sind mit Hilfe des Programms Sequencher ausgewertet worden.

2.2.5.3 RT-PCR

(durchgeführt von Frau Dr. Martins-Weiß)

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR lassen sich seltene Transkripte nachweisen und analysieren. Der Vorteil gegenüber dem klassischen *Northern-Blot* liegt bei dieser Methode in der hohen Sensitivität.

Für die Expressionsanalyse des humanen und murinen *NICN1*-Gens kamen cDNAs von 8 humanen und 12 murinen Geweben (Clontech) zum Einsatz. Als Kontrolle wurden die im Kit mitgelieferten Primer der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) von Mensch und Maus verwendet. Zuerst erfolgte das Gestalten von *NICN1*-spezifischen Primern (*NICN_R555* und *NICN_V362*). Im Anschluss daran wurde eine PCR auf sowohl humaner, als auch muriner cDNA aus verschiedenen Geweben durchgeführt. Je 5 µl Probe wurden nach 22, 26, 30, 34 und 38 Zyklen entnommen, mit 5 µl Auftragspuffer gemischt und auf ein Gel aufgetragen. Die Konzentration der Gele betrug 1 % für die Kontrollen und 1.8 % für den Probenauftrag.

PCR-Ansätze :

NICN 1

4.5 µl cDNA
5 µl Puffer
0.2 µl *NICN_V362* (20 pmol/µl)
0.2 µl *NICN_R555* (20 pmol/µl)
2 µl dNTP's (5 mM)
0.4 µl Taq-Polymerase
37.7 µl ddH₂O

GAPDH

4.5 µl cDNA
5 µl Puffer
2 µl *G3PDH_Primer1* (20 pmol/µl)
2 µl *G3PDH_Primer2* (20 pmol/µl)
2 µl dNTP's (5 mM)
0.4 µl Taq-Polymerase
36.1 µl ddH₂O

Bedingungen :

NICN1

94 °C	5	Min	Denaturierung
94 °C	30	Sec	Denaturierung
60 °C	45	Sec	Annealing
72 °C	45	Sec	Elongation
72 °C		hold	Elongation

GAPDH

94 °C	5	min	Denaturierung
94 °C	30	sec	Denaturierung
68 °C	120	sec	Annealing
72 °C		hold	Elongation

2.2.6 RNA und cDNA spezifische Methoden

2.2.6.1 Northern-Blots

Genexpression ist die Umwandlung von genetischer Information in ein funktionstüchtiges Protein. Die Expression eines Gens kann eine relativ einfache oder aber ein Teilstück einer komplexen Kaskade von Ereignissen sein, die eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA, die Transkription und Entstehung von mRNA, sowie die Translation und die messbare Bildung von Protein beeinflusst.

Viele Proteine werden in bestimmten Lebenszyklen oder unter definierten Bedingungen exprimiert. Zwei Methoden, die die Gene und ihre Expression in verschiedenen Stadien nachweisen können sind der *Southern-* sowie der *Northern-Blot*.

Nukleinsäure-*Blots* werden zur quantitativen und qualitativen Erfassung von spezifischen Nukleinsäuren, die auf einer Membran immobilisiert worden sind, verwendet. Hierfür werden markierte einzelsträngige DNA oder RNA mit komplementären immobilisierten Nukleinsäuren hybridisiert. Häufig befindet sich die *target*-Nukleinsäure in einer komplexen Lösung mit weiteren Fragmenten, die elektrophoretisch nach der relativen Fragmentgröße aufgetrennt und anschließend auf eine Membran (Nylon oder Nitrozellulose) geblottet worden sind.

Der *Nothern-Blot* (benannt in Analogie zu dem *Southern-Blot*) wird zur Charakterisierung einer oder mehrere RNA-Transkripte in einem RNA-Pool verwendet. Die RNA, zunächst denaturiert, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet, wird mit einer markierten und komplementären DNA- oder RNA- Probe hybridisiert. Häufige Anwendung finden *Northern-Blots* bei der Fragestellung nach der Größe eines mRNA-Transkriptes, nach dem Vorhandensein alternativer Spleißprodukte oder nach genetisch sehr verwandten Spezies.

Für diese Arbeit wurden vorgefertigte *Northern-Blots* der Firma Clontech eingesetzt. Auf ihnen sind murine und humane cDNAs verschiedener Gewebe immobilisiert worden. Diese wurden mittels einer murinen und humanen cDNA Sonde hybridisiert.

2.2.6.2 Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

(Mit dem *Random Primer Labelling System*)

25 ng DNA gelöst in 2-5 µl TE (10/1) wurden in einem kochenden Wasserbad für 5 Minuten denaturiert und anschließend für die weitere Verarbeitung sofort auf Eis gestellt. Zur Lösung wurden je 1 µl 500 µM dATP, dGTP und dTTP hinzupipettiert und mit 20 µl 2.5x *Random Primer Solution* gemischt. Im Anschluss daran wurden 5 µl 10 mCi/ml [α -³²P]dCTP hinzugefügt, der Ansatz mit H₂O bidest. auf 49 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und nach vorsichtigem Mischen mit 1 µl Klenow-Fragment vervollständigt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für mindestens 10 Minuten. Zur Aufreinigung der Sonde wurde eine Sephadex-G50-Säule (*nick colum*) mit TE-Puffer (10/1) äquilibriert, der Markierungsansatz eingefüllt und die DNA mit 350 µl TE-Puffer (10/1) gewaschen. Die Eluierung der Sonde erfolgte nach einer Zugabe von weiteren 500 µl TE-Puffer. Die Lösung wurde in einem Schraubdeckel-Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Aktivität geprüft. Es folgte die Denaturierung für 3 Minuten in kochendem Wasser. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Sonde auf Eis gelagert.

Hybridisierung der Filter

Für die Prähybridisierung wurde der Filter in geeignete Röhren überführt, mit 5 ml vorgewärmter ExpressHyb-Lösung versetzt und 30 Minuten bei 68 °C inkubiert. Nach Austausch des Puffers konnte die radioaktive Sonde hinzugefügt und die Membran bei 68 °C für 1 h hybridisiert werden. Um die Filter zu waschen, wurde die Hybridisierungsflüssigkeit entfernt und die Membran in der Röhre insgesamt 40 min lang mit dem Waschpuffer 1 gespült. Nach dem Transfer der Membran in eine geeignete Plastikschaale erfolgte die zweimalige Waschung für je 40 min in Waschlösung 2 unter kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur. Der Filter wurde auf Filterpapier von überschüssiger Waschlösung befreit, auf Whatman-Papier gelegt und mit Frischhaltefolie bedeckt. Die Detektion der Signale erfolgte über Röntgenfilme, die für 1-2 Tage bei -80 °C exponiert wurden.

Waschlösung 1 :

1 mM	EDTA
40 mM	Phosphat-Puffer, pH 7.2
1 %	SDS

Waschlösung 2 :	0.5 %	kristallines BSA (Fraktion V)
	1 mM	EDTA
	40 mM	Phosphat-Puffer, pH 7.2
	5 %	SDS
1 M Phosphat-Puffer, pH 7.2 :	142 g	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
	3 ml	H ₃ PO ₄
	ad 1000 ml	H ₂ O bidest

Nach erfolgreicher Exposition fand die Entfernung der Sonde durch Schwenken in einer 0,5%igen und 90-100 °C heißen SDS-Lösung für 10 min statt. Zur Kontrolle wurden im Anschluss Hybridisierungen mit den mitgelieferten Kontrollsonden nach beschriebenem Protokoll durchgeführt.

2.2.7 Zellkulturtechnische Methoden

2.2.7.1 Präparation von embryonalen Mäusefibroblasten

Um die Pluripotenz von ES-Zellen in Kultur zu erhalten, werden häufig embryonale Fibroblasten (EMFIS) als „Layer“ eingesetzt [Martin, 1981 und Doetschmann *et al.*, 1985]. Aufgrund der begrenzten Teilungskapazität solcher Primärzellen in Kultur müssen die EMFIS wiederholt frisch aus Mäuseembryonen isoliert werden.

Das Muttertier wurde zwischen dem 13-15. Trächtigkeitstag per Genickbruch getötet, der Uterus herauspräpariert und mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Entfernung der Embryonen und die Überführung in eine mit PBS gefüllte Petrischale. Hier fand die Entfernung der inneren Organe und der Kopf statt. Anschließend wurden die Föten mit Penicillin/Streptomycin-haltigem PBS (5 % Endkonzentration) gewaschen, in ein steriles neues Gefäß überführt und mechanisch zerkleinert. Durch Zugabe von sehr wenig EF-Medium konnten die Gewebestücke durch ein Sieb gepresst und die Suspension mit einer Pasteurpipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren weiter zerkleinert werden. Bei dem folgenden Waschgang, der sich mindestens drei mal wiederholte wurde das Zellgemisch mit frischem Medium versetzt, anschließend bei 1500 Upm für 5 min bei RT zentrifugiert. Es erfolgte die Aufteilung des Pellets in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 10 mm Schale und die Inkubation über Nacht. Zur Entfernung von toten Zellen und Erythrozyten wurden die angehefteten Fibroblasten am nächsten Tag mehrmals mit PBS gewaschen und dabei neues EF-Medium hinzugefügt. Nach 2-3 Tagen waren die Fibroblasten konfluent und wurden im

Verhältnis 1:5 auf 15-mm-Schalen verteilt. Nach erneuter 100%iger Konfluenz wurden die Zellen in einer Dichte von $0.5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro Röhrchen kryokonserviert.

2.2.7.2 Kultivierung der verwendeten Zellarten

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer wassergesättigten Umgebung bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt, Abweichungen werden im Folgenden gesondert erwähnt.

ES-Zellkultur

Die Kultivierung der ES-Zell-Linie E14 erfolgte auf mitotisch inaktiven *Feeder*-Zellen. Das Kultur-Medium wurde aufgrund der starken Übersäuerung durch die proliferierenden ES-Kolonien täglich gewechselt und mit LIF (*Leukemia Inhibitor Factor*) versetzt, um das Ausdifferenzieren der Zellen zu verhindern. Die Passagierung erfolgte in Abhängigkeit der Zelldichte nach 2-3 Tagen. Sobald Veränderungen im morphologischen Erscheinungsbild erkennbar wurden, mussten die Zellen nach Trypsinisierung auf eine neue Schale gleicher Größe transferiert werden. Mit jeder Passage nahm die Eignung zur Transfektion ab. Für die Elektroporation wurden nur ES-Zellen mit weniger als 4 Passagen verwendet.

EF-Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in EF-Medium, das jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Zur Revitalisierung und Vermehrung wurden je $0.25-0.5 \times 10^6$ Zellen in einer 15-mm-Schale aufgetaut und bis zu einer Konfluenz von 70 % wachsen gelassen. Danach erfolgte die Aufteilung auf zwei neue 15-mm-Schalen. Durch jeden neuen *Split* erhöhte sich die Passage und somit das „Alter“ der Zellen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Fähigkeit, an der Platte zu adhären ab. Fibroblasten dritter Passage wurden deshalb entweder als *Feeder* für ES-Zellen verwendet und somit einer Mitomycin-C-Behandlung unterworfen oder aber verworfen.

CACO-, COS- und MDCK-Zellkultur

Die drei Zellarten wurden bis zu einer 100%igen Konfluenz in antibiotikahaltigem Medium kultiviert und daraufhin 1:5 gesplittet. Unter normalen Bedingungen fand ein Mediumwechsel nur nach Trypsinisierung oder jeden 4.Tag statt. Während der Selektion wurde jeden zweiten Tag ein Austausch vorgenommen.

2.2.7.3 Trypsinisierung

Die Zellen wurden vom Medium befreit und dreimal mit warmem PBS gewaschen. Je nach Schalenvolumen erfolgte die Zugabe von Trypsin-EDTA (siehe Tabelle 2-1). Die anschließende Inkubation fand bei 37 °C für nicht länger als 10 min statt. Die Reaktion des Trypsins wurde mit einer geeigneten Menge Medium abgestoppt und die Zelllösung für 5 min bei RT und 2000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Es erfolgten die Aufnahme des Pellets in einer geeigneten Menge Mediums und die Vereinzelung der Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mittels einer 5-ml- oder einer Pasteurpipette. Versuchsabhängig wurde ein kleines Aliquot entfernt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Suspension wurde abschließend in der gewünschten Menge auf einzelne mit Medium versetzte Schalen verteilt (*Split*).

Tab. 2- 1: Trypsinisierungsbedingungen

Schalengröße [Ø]	Menge Trypsin [ml]	Menge Abstopfflüssigkeit [ml]
5 mm	1ml	4 ml
10 mm	3 ml	7 ml
15 mm	5 ml	10 ml

2.2.7.4 Kryokonservierung

Die Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme in einer geeigneten Menge vorgekühlten Einfriermediums und die Aliquotierung (je 1ml) in vorgekühlte Kryo-Röhrchen. ES- und EF-Zellen wurden für zwei Stunden bei -20 °C gelagert und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Die Überführung in flüssigen Stickstoff erfolgte am nächsten Tag. Alle übrigen Zellen wurden in einen Behälter mit Isopropanol überführt und bei -80 °C über Nacht gelagert. Die Einlagerung in flüssigen Stickstoff konnte einige Tage später erfolgen.

2.2.7.5 Revitalisierung der verwendeten Zellarten

Die Kryo-Röhrchen wurden in sehr kurzer Zeit im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Je ein 1 ml Zelllösung (entspricht einem Röhrchen) wurde in 9 ml entsprechend warmen Medium überführt und für 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert. Es erfolgte die Resuspendierung des Pellets in einer geeigneten Menge Medium und die Überführung in ein entsprechendes Kulturgefäß. Um eine Schädigung der Zellen durch DMSO zu vermeiden, wurde das Medium am darauf folgenden Tag gewechselt.

2.2.7.6 Mitomycin-C-Behandlung

Feeder-Zellen sind für die Kultivierung von ES-Zellen von großer Bedeutung. Es handelt sich dabei um STO- [Ware *et al.*, 1972] oder embryonale Fibroblasten, die durch das „Spindelgift“ Mitomycin C [Martin *et al.*;1975] mitotisch inaktiviert worden sind.

Mitomycin C führt zum Absterben der Spindelfasern, indem es das Auseinanderweichen der Schwester-Chromatide verhindert. Zusätzlich erfolgt eine Kondensierung des Chromatins.

Für die Verwendung als Feeder durften die Fibroblasten nicht älter als 2 Passagen sein. Das Medium wurde durch Mitomycin-C-haltiges ersetzt und für 2.5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Wirkstoff wurde durch mehrmaliges und gründliches Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte wahlweise die Trypsinisierung und Aufteilung der Zellen auf die gewünschte Plattengröße oder die Zugabe von frischem Medium. Mit Mitomycin C behandelte Fibroblasten waren nur 5 Tage kultivierbar.

2.2.7.7 Transfektion

Hierbei handelt es sich um die Einschleusung von Fremd-DNA in eine eukaryontische Zelle. Prinzipiell können zwei Arten unterschieden werden: die stabile und die transiente Transfektion.

Wird die Fremd-DNA durch Rekombination in das Wirtsgenom eingebaut, dort repliziert und an die Nachkommen weitervererbt, handelt es sich um eine stabile Transfektion. Da der Vorgang der Rekombination ein sehr seltenes Ereignis ist

(Wahrscheinlichkeit von 1×10^{-6}), werden spezielle Vektoren eingesetzt. Diese enthalten neben dem zu untersuchenden Gen ein Resistenzgen. Durch Zugabe der Antibiotika in das Medium wird ein Selektionsdruck aufgebaut, der einerseits zum vermehrten Einbau der Fremd-DNA, andererseits zum Absterben der untransfizierten Zellen führt. Häufig verwendete Antibiotika sind G418 (Geneticinsulfat), Zeocin oder Hygromycin B.

Bei der transienten Transfektion findet ebenfalls eine Aufnahme der Fremd-DNA in den Kern, dafür aber keine Rekombination in das Wirtsgenom statt. Durch den nukleolytischen Abbau sowie der Ausdünnung während der anschließenden Zellteilungen ist die DNA nur etwa 12-72 Stunden stabil.

Für den Gentransfer stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Diese können sowohl für die stabile, als auch die transiente Transfektion eingesetzt werden. Im Folgenden werden die Varianten näher beschrieben, die für den weiteren Verlauf der Arbeit am Verfolgungswürdigsten sind.

DEAE-Dextran-Methode:

Bei dieser chemischen Transfektionsmethode bilden die Polykationen des Diethylaminoethyl-Dextrans einen Komplex um die polyanionische DNA [Valerie und Pagano, 1958]. Nach Zugabe des Kulturmediums adsorbiert dieser an der Zelloberfläche, gelangt über Phagozytose in die Zelle und wird dann in Endosomen eingeschlossen. Die DNA-Aufnahme steigt proportional mit der Inkubationszeit an, gleichzeitig erhöht sich die Zytotoxizität. Um die Degradation der transfizierten DNA zu verhindern, findet im Anschluss an die Transfektion eine Chloroquin-Behandlung [Luthmann und Magnusson, 1983] der Zellen statt, bei der durch lysosomatotrope Wirkung der pH-Wert in den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten angehoben wird.

Transfektion mittels Lipofektamin

Diese von Felgner *et al.*, 1987 entwickelte biologische Methode der Transfektion beruht auf der ionischen Bindung der Fremd-DNA an Liposome. Kleine unilamellare Vesikel aus dem kationischen Lipid 1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid (DOTMA) und dem natürlichen Helferlipid

Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE) werden in einem bestimmten Verhältnis mit der DNA vermischt, so dass eine positive Nettoladung entsteht. Damit kommt es zur Anheftung an die Zelloberfläche, wo vermutlich die Bindung an den Sialinsäureresten stattfindet, und die anschließende Aufnahme in die Zelle. Auf welchem Weg die DNA in den Zellkern gelangt, ist noch unklar.

Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine physikalische Methode des Gentransfers [Neumann *et al.*, 1982]. Sie basiert auf der Beobachtung, dass biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert werden, ohne dass die Membranstruktur zerstört wird. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen. In dieser Arbeit sind zwei verschiedene Methoden der Elektroporation zum Einsatz gekommen. Bei der herkömmlichen Variante erfolgt ein DNA-Transport nur bis ins Cytoplasma. Die eingebrachten Konstrukte gelangen erst während einer Zellteilung in geringen Mengen in den Kern. Eine neuere Technik ermöglicht mit gezielten Stromstößen einen DNA-Transport direkt in den Nukleus.

Die aus einer Maxi-Präparation aufgereinigte DNA wurde nach der Linearisierung einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung unterzogen. Entsprechend dem gewählten Elektroporationsverfahren erfolgte die Aufnahme in PBS, Medium oder Elektroporationslösung.

Transfektion von ES-Zellen

Bio-Rad-Elektroporation

Die ES-Zellen wurden trypsinisiert und zusammen mit der entsprechenden Menge DNA (s. Tabelle 2-1) mit 800 µl geeigneten Medium gemischt dabei für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung in einer Küvette und die Elektroporation unter den in der Tabelle aufgeführten Bedingungen. Unverzüglich nach dem Puls wurden die Küvetten auf Eis gekühlt und der Inhalt anschließend auf frische *Feeder*-Zellen in ES-Medium (10-cm-Platten) ausplattiert. Die Selektion begann 2 Stunden nach der Elektroporation.

Tab. 2- 2: Gegenüberstellung der Elektroporationen (*BioRad*)

Bedingungen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
Zellkonzentration per EL	5x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶ , 10x10 ⁶
DNA-Konzentration per EL	20µg und 40µg	20 µg und 40µg	20µg und 40µg	20 µg , 40 µg
Konstrukt	pKOC30	pKOC30	pKOC30	pKOC30, Tyk, pNTK4, pEGFP
Programm	250µF, 340 kV	500µF, 280 kV	250µF, 340 kV	250µF, 340 kV
Elektroporationsmedium	Knockout-Medium und Knockout-Serum	PBS	ES-Medium HighClone-Serum	ES-Medium HighClone-Serum

Elektroporation mittels *AMAXA*-Nukleofektion-Kit

Die Elektroporation mittels des *AMAXA*-Nukleofektion-Kits erfolgte strikt nach dem mitgelieferten Protokoll für die jeweilige Zellart.

Transfektion von ES-Zellen

Es wurden ES-Zellen verwendet, die sich in einer frühen Wachstumsphase befanden und nur wenige Passagen (bis zu 3 Passagen maximal) alt waren. Vier bis zwölf Stunden vor der Transfektion erfolgte die letzte Fütterung der Zellen. Bedingt durch die störende Anwesenheit von Feeder-Zellen während der Elektroporation, wurden die ES-Zellen vom Feeder durch partielles Absetzen abgetrennt. Die Zellen durchliefen dabei eine Trypsinisierung und anschließende Ausplattierung auf feederfreie Kulturschalen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden unter Standardbedingungen konnten die noch nicht adherenten ES-Zellen durch Absaugen des Mediums isoliert werden. Mittels Zentrifugation für 5 min bei 80 g und 4 °C erfolgte die vollständige Abtrennung der gewünschten Menge an Zellen (siehe Tabelle 2-2) vom Medium. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und in 90 µl *Nucleofector Solution for Mouse ES Cells* gelöst. Parallel dazu wurde die linearisierte DNA in 10 µl der mitgelieferten Lösung resuspendiert. Angelehnt an die Anzahl der durchzuführenden Elektroporationen fand die Auffüllung von Reaktionsgefäßen mit frischem, auf 37 °C vorgewärmten Medium und Bereitstellung von frischen feederhaltigen Kulturschalen unter Kulturbedingungen statt. Die ES-Zellen wurden mit der vorbereiteten DNA-Lösung durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Es erfolgte die blasenfreie Überführung der Suspension in die Küvetten. Nach Auswahl des betreffenden Programms wurde die Lösung elektroporiert. Unverzüglich danach fand die Überführung der

Suspension mit Hilfe der mitgelieferten Pipetten in die vorbereiteten Reaktionsgefäße statt. Nach Abschluss aller durchzuführenden Elektroporationen, wurden die Inhalte der einzelnen Reaktionsgefäße auf die vorbereiteten Kulturschalen verteilt und unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Revitalisierung der Zellen erfolgte ein Wechsel des Mediums nach 24 Stunden.

Tab. 2- 3: Gegenüberstellung der Elektroporationen (AMAXA)

Bedingungen	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Zellkonzentration per EL	2×10^6	2×10^6	2×10^6
DNA-Konzentration per EL	5000 ng, 1 μ g und 20 μ g	10 μ g	10 μ g
Konstrukt	pEGFP	pKOC30	pKOC30, Tyk, pNTK4, pEGFP
Programm	A23, A24, A30	A23	A23
Elektroporationsmedium	<i>Nucleofector Solution for Mouse ES Cells</i>	<i>Nucleofector Solution for Mouse ES</i>	<i>Nucleofector Solution for Mouse ES</i>

Transfektion von EF-Zellen

Für die Transfektion von EF-Zellen wurde ausschließlich die AMAXA-Nucleofections-Methode verwendet. Zunächst wurde die Elektroporationslösung V auf Zimmertemperatur gebracht und währenddessen 10-cm-Schalen mit speziellem EF-Medium vorbereitet. Nach Trypsinisierung und Waschung erfolgte die Resuspendierung von je 2×10^6 Zellen in 100 μ l Elektroporationslösung und die anschließende Mischung mit jeweils 10 μ g DNA. Nachdem die Suspension in die Küvette überführt und verschlossen wurde, konnte das Elektroporationsprogramm A-23 ausgelöst werden. Die Küvette wurde unverzüglich nach dem akustischen Signal entfernt, der Inhalt mit 1 ml warmem Medium versetzt und auf eine vorbereitete Kulturschale überführt. Zur Vitalisierung der Zellen wurde das Medium am folgenden Tag gewechselt.

Transfektion von MDCK-Zellen

Die verwendeten MDCK-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in antibiotikafreies Medium überführt und bis zu einer 90%igen Konfluenz über Nacht inkubiert. Für jede einzelne Transfektion erfolgte die Herstellung der Lösung, indem jeweils 24 μ g DNA mit 1.5 ml serumfreiem Medium gemischt wurden. Anschließend fand die Vorbereitung des Lipofektamins statt. Dieses wurde zunächst gemischt und in 1.5 ml serumfreies Medium aufgenommen. Daraufhin

find die Inkubation für 5 min bei RT inkubiert statt. Es folgte die Vereinigung der DNA-Suspension mit dem Transfektant und die Inkubation der Lösung für 20 min bei RT. Das Gemisch wurde dann dem Zellmedium zugeführt, gleichmäßig verteilt und für 4 h inkubiert. Um die Zellen nicht weiter zu schwächen, wurde das Medium nach Ablauf der Zeit mit normalem Medium ausgetauscht und die Zellen 48 h kultiviert.

Transfektion von COS-1 Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:4 gesplittet. Kurz vor der Transfektion erfolgte die Vereinigung von je 5 µg DNA mit 1.5 ml DMEM-Hepes und 9 µl DEAE-Dextran. Nach zweimaliger Reinigung der Zellen mit PBS wurde die Transfektionslösung aufgetragen. Während der Inkubation von 1,0-1.5 h mussten die Platten ca. alle 15 min geschwenkt werden, um eine gleichmäßige Verteilung des Transfektionsreagenzes zu ermöglichen. 10 ml Medium wurden im Anschluss mit 10 µl Chloroquin gemischt und nach Entfernung der Transfektionslösung auf die Zellen gegeben. Nach weiteren vier Stunden Inkubation wurde auch dieses durch frisches Medium ersetzt; die Zellen konnten für weitere 40-60 h inkubiert werden.

2.2.7.8 Radioaktive Markierung von Zellen

Eine radioaktive Markierung von Proteinen *in vivo* erfolgt über den Einbau von ³⁵S-Methionin. Dieses wird dem Medium der Zellen nach einer Aushungerung hinzugefügt.

Die Zellen wurden zunächst mit PBS zweimal gewaschen, in 5 ml Methionin-freies Medium überführt und unter Standardbedingungen inkubiert. Die Aushungerung von COS-Zellen erfolgte über eine Stunde. Nach Ablauf der Zeit kam es zu einem erneuten Mediumwechsel mit 3.5 ml MEM-Medium, das mit 3.5 µl ³⁵S-markiertem Methionine versetzt wurde. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen für vier Stunden. Im Anschluss folgte die Entfernung des Mediums und ein zweimaliges Waschen mit PBS (optional konnten die Platten auch bei -20 °C eingefroren werden). Auf jeder Schale wurden 20 µl des Proteinaseinhibitor-Gemisches und 1 ml eiskalter Lysepuffer 2 transferiert. Die Lyse fand durch

Abschaben der Zellen mit einem Zellkulturschaber statt. Nachdem die Viskosität des Puffers stark zugenommen hatte, wurde die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13000 Upm und 4 °C für 15 min fand ein Transfer des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß statt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die lysierten Zellen bei -20 gelagert.

2.2.7.9 Selektion

Selektion von ES-Zellen

Die Selektion der ES-Zellen erfolgte einen Tag nach der Elektroporation. Das alte Medium wurde entfernt und durch G418-haltiges Medium ersetzt. Um in den ersten Tagen der Selektion einen erhöhten Selektionsdruck auf die Zellen auszuüben, wurde eine Konzentration von 350 µg/ml eingesetzt. Nach vier Tagen wurde konstant bis zum Picken der Klone eine Konzentration von 200 µg/ml verwendet.

Selektion von EF-Zellen

Die Selektion in G418-haltigem Medium (500 µg/ml) begann zwei Tage nach der Elektroporation und wurde bis zur Isolierung der transienten Klone aufrechterhalten.

Selektion von MDCK-Zellen:

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsinisiert und in den Verhältnissen 1:30, 1:15 und 1:10 aufgeteilt. Es erfolgte die Zugabe der Selektionsdroge Zeocin in einer Endkonzentration von 600 µg/ml, die bis zum Picken der Klone aufrechterhalten wurden.

2.2.8 Methoden der Protein- und Biochemie

2.2.8.1 Herstellung von Zell-Lysaten aus verschiedenen Geweben und Zellen

Die Zell-Lyse ist der erste Schritt in der Zellfraktionierung und Proteinaufreinigung, in der ein Protein-Extrakt (Lysat) von den unlöslichen Zelltrümmern (Membranen) getrennt wird. Eukaryontische Zellen sind leichter aufzuschließen, da hier die

Plasmamembran nur eine teilende Barriere zwischen Zellinhalt und Umgebung darstellt. Bakterienmembranen hingegen sind zusätzlich von einer starren Zellwand umgeben, die Peptidoglykane enthält und somit nicht leicht zugänglich ist. Dementsprechend muss die Technik für die Zerstörung der Zellen auf den vorliegenden Zelltyp abgestimmt werden.

Für die Lyse der Zellen stehen verschiedene Methoden zur Auswahl: Die **mechanische Zerstörung** der Zellen eignet sich besonders gut für große komplexe Gewebe und Organe. Die Gewebe werden dabei in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend in einem Mörser mit einem Pistill zerkleinert. Die **Ultraschallbehandlung** ist eine rein physikalische Zerstörung der Zellen. Diese Methode nutzt pulsierende hochfrequente Schallwellen zur Lyse von Zellen und Bakterien. Durch die Energie wird Wärme frei, die zur Denaturierung der Proteine führen kann. Deshalb wird die Behandlung in kurzen Einzelstufen von ca. 30 sec und auf Eis durchgeführt. Die **Einfrier-/Auftau-Methode** ist die am häufigsten verwendete Technik zur Lyse von Bakterien. Die Zellen werden zunächst -20 °C oder -80 °C eingefroren und anschließend auf Raumtemperatur oder 37 °C gebracht. Durch Eiskristalle schwellen während des Einfrierprozesses die Membranen an, beim Auftauen kontrahieren sie wieder. Dies führt letztendlich zum Bruch der Zellwände.

Wichtig bei der Herstellung von Zell-Lysaten ist die Zugabe von Proteaseinhibitoren (PI). Die in dieser Arbeit hergestellten Lysate wurden mit aufgelösten PI-Tabletten der Firma Roche, einer Mischung aus verschiedenen Enzymen, versetzt. Da die aktive Endkonzentration der Inhibitoren abhängig von der Art der Inkubationsflüssigkeit ist, können keine genauen Angaben über die tatsächlich zugeführte Menge an PIs gemacht werden. Die Dosierung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei eine Tablette pro 10 ml Lysepuffer verwendet wurde.

Bakterien

Das Bakterienpellet wurde nach abgeschlossenem Expressionsversuch bei -20 °C für mindestens 16 h eingefroren. Anschließend erfolgten das Auftauen bei Raumtemperatur und die Resuspendierung in 2 – 5 ml Lysepuffer. Nach Zugabe von Proteaseinhibitoren und Lysozym (die eingesetzten Mengen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen) wurden die Zellen bei 360 Upm und 37 °C für 15-30

min geschüttelt. Die Zellen wurden mittels Ultraschall mehrmals unter ständiger Kühlung (Eis) jeweils 30 sec lang geschert. Durch Zentrifugation bei 6000 Upm (Rotor BS 4402/A) und 4 °C für 30 min konnten größere Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand weiteren Versuchen zugänglich gemacht werden.

Gewebe

Das bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen und mit dem Lysepuffer 3 (siehe Materialteil) und Proteaseinhibitoren versetzt. Die Lyse fand durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension mittels einer Pasteurpipette statt. Nachdem die Lösung leicht zähflüssig erschien (Zeichen der vollständigen Lyse), erfolgte die Abtrennung größerer Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4000 Upm (Rotor BS 4402/A) für 10 min. Der Überstand wurde in sterile Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Blut

Für die Herstellung von Zell-Lysaten aus Blut wurden nur Leukozyten verwendet. Diese mussten zunächst isoliert werden.

30 ml frisches und nicht geronnenes Blut wurde mit 100 ml sterilem Wasser in einem geeigneten Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt, durch leichtes Schwenken kurz gemischt und anschließend bei 4800 Upm (Rotor BS 4402/A) für 10 min bei 20 °C zentrifugiert. Es folgte die Entfernung des Überstandes bis auf ein Restvolumen von 10 ml, die erneut Wasser (30 ml) gemischt wurden. Die Vorgänge des Zentrifugierens, Entfernen des Überstandes bis auf einen 10-ml-Rest und die erneute Zugabe von Wasser wiederholten sich so lange, bis das entstandene Pellet fast weiß erschien. Um die Leukozyten zu lysieren, wurden sie mit Proteaseinhibitoren versetzt und in Lysepuffer mittels einer Spritze resuspendiert. Sobald die Lösung klar und leicht viskos wirkte, erfolgte die Überführung in ein steriles Gefäß und die Lagerung bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.2.8.2 Dichtegradientenzentrifugation

Die Zentrifugation ist eine der ältesten Techniken zur Zellfraktionierung und Isolierung von Zellorganellen. Durch die Zentrifugalkraft und den daraus resultierenden unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten einzelner Moleküle ist eine sehr genaue Isolierung möglich.

Mittels der Dichtegradientenzentrifugation können unter anderem Biomoleküle, die sich nur in ihrer Isotopenzusammensetzung unterscheiden, getrennt werden.

Hierfür wird in einem Zentrifugengefäß eine Lösung derart eingefügt, dass ein Dichtegefälle entsteht. Die Lösung mit der höheren Dichte befindet sich dabei am Boden des Gefäßes. Während der Zentrifugation wandern die Teilchen solange im Gradienten, bis ihre Dichte mit dem umgebenden Medium übereinstimmt. An diesem Punkt ist die Zentrifugalkraft gleich der Auftriebskraft des Teilchens.

Die meisten Gradienten für eine solche Zentrifugation bestehen aus einer Saccharose- oder Glycerin-Lösung. Saccharose wird häufig zur Trennung subzellulärer Organellen über die Zonenzentrifugation eingesetzt. Sie besitzt den Vorteil, nicht-ionisch und relativ inert gegenüber biologischen Materialien zu sein.

Zunächst wurden die für den Gradienten bestimmten Zellen geerntet und in Gradientenpuffer lysiert. Mittels eines Gradientenmischers erfolgte die Auffüllung der Zentrifugenröhrchen mit den Gradientenlösungen. Im Anschluss daran fand die Beladung der Röhrchen mit dem Zell-Lysat (Proben wurden auf den Gradienten geladen) und die Zentrifugation über Nacht bei 4 °C und 12000 rpm statt.

Unter Zuhilfenahme des Gradientenmischers wurden 1-ml-Fractionen entnommen und diese weiteren Studien zugänglich gemacht.

Gradientenpuffer :	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	6 mM	Dodecyl- β -laurylmaltosit
Gradientenlösung 1 :	2 %	Saccharose in Gradientenpuffer gelöst
Gradientenlösung 2 :	10 %	Saccharose in Gradientenpuffer gelöst
Gradientenlösung 3 :	15 %	Saccharose in Gradientenpuffer gelöst
Gradientenlösung 4 :	30 %	Succrose in Gradientenpuffer gelöst

2.2.8.3 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation ist die meistverbreitete Methode zur Antigendetektion und -reinigung. Eine wichtige Eigenschaft der IP ist ihr Potential, nicht nur das zu untersuchende Protein (*target protein*) zu liefern, sondern auch die Moleküle, die mit dem *target* interagieren.

Das Prinzip der IP lässt sich folgendermaßen darstellen: Ein Antikörper, (monoklonal oder polyklonal), gerichtet gegen ein spezifisches Antigen des gesuchten Proteins, kann in einer bestimmten Probe, z.B. einem Zell-Lysat, einen Immunkomplex mit dem *Target* ausbilden. Dieser Komplex kann wiederum durch ein festes Trägermaterial (Sephrose-Kügelchen, *beads*), an dem Protein A oder G immobilisiert ist, aus der Probe isoliert werden. Dieser Schritt wird als Präzipitation bezeichnet. Alle anderen Proteine, die nicht durch das immobilisierte Protein A oder G präzipitiert worden sind, werden in einem weiteren Schritt durch Waschen entfernt. Abschließend können alle Komponenten des Immunkomplexes vom Trägermaterial eluiert und näher analysiert werden. Durch die nativen Bedingungen, die während der gesamten IP vorliegen, werden auch Bindungs- oder Interaktionspartner des gesuchten Proteins, die an den Komplex gebunden sind, isoliert.

Um unspezifische Proteine zu entfernen, wurde zunächst ein *Preclearing* durchgeführt: je 30 µl einer 50 %igen Protein-A-Sephrose-Lösung wurden zur 1 ml Zellesuspension transferiert und für mindestens eine Stunde auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine kurze (max. 15 sec.) Zentrifugation bei 6500 rpm in der Tischzentrifuge und die Überführung des Überstandes in ein neues Röhrchen. Um das Nicolin1-myc-His-Fusionsprotein zu immunpräzipitieren, wurde dem Überstand 0,5 µl der myc-Antikörperlösung hinzugefügt und das Gemisch für 60 min bei 4 °C auf dem Schüttler vorinkubiert. Im Anschluss folgte die Zugabe von 50 µl Protein-A-Sephrose-Lösung (50%ig) und die Inkubation im Kühlraum (4 °C) über Nacht unter ständiger Bewegung. Am nächsten Tag wurde die Proteinlösung in der Tischzentrifuge (5000 rpm) für eine Minute zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 50 µl Waschpuffer 1 resuspendiert. Dieser Vorgang wiederholte sich zunächst ein weiteres Mal für den Waschpuffer 1 und insgesamt zweimal für den Waschpuffer 2. Das Pellet wurde anschließend in 25

bis 50 µl Ladepuffer aufgenommen, kurz aufgeköcht und unter rascher Abkühlung für den Auftrag auf das Gel bereitgestellt.

2.2.8.4 Pull-down-Methode (*pull down assays*)

(Expression und Aufreinigung vom *NICN1*-GST-Fusionsprotein)

Die *Pull-down*-Methode ist eine *in-vitro*-Technik zur Bestimmung von Interaktionen zwischen zwei oder mehreren Proteinen. Sie ermöglicht einerseits die Bestätigung einer Protein-Protein-Wechselwirkung, die durch andere Methoden, wie z.B. IP, postuliert wurden, und andererseits ist sie eine wirkungsvolle *Screening*-Methode, um unbekannte Proteininteraktionen nachzuweisen. Für die Durchführung einer solchen Technik benötigt man nur das aufgereinigte, zu untersuchende, getaggte Protein (*bait* = Köder GST-NICN1), mit dem man den vermuteten Bindungspartner (*prey* = Beute) „fängt und mitzieht“.

Die *Pull-down*-Methode ist eine Form der Affinitätschromatografie und ähnelt sehr stark der Immunpräzipitation, mit dem Unterschied des Einsatzes eines Köderproteins. Dieses getagte Protein (GST-NICN1) wird durch einen immobilisierten spezifischen Liganden (GSH) gebunden. Dieser sorgt damit indirekt dafür, dass an dem getaggen Proteine gebundene Moleküle ebenfalls gefischt werden.

Der Vorteil dieser Methode liegt unter anderem darin, dass ein solcher Assay auch unter nativen Bedingungen durchgeführt werden kann. So wird das „Köderprotein“ und der vermeintliche Bindungspartner in ihrer biologischen Funktion nicht beeinträchtigt.

Die Expression von rekombinanten Proteinen wurde in *E.coli* (Stamm BL-21) durchgeführt. Dies geschah unter der Verwendung eines Expressionsplasmids, dessen offener Leserahmen unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors steht (pGEX-2T).

Expression

Das Expressionskonstrukt pGEX-2T-NICN1, in welchem das humane Nicolin1 an die Glutathion-bindende Domäne von Glutathion-S-Transferase (GST) im Vektor pGEX-2T fusioniert ist, wurde in *E.coli*-Bakterien vom Stamm BL-21 transformiert (Selektion mit 100 µg/ml Ampicillin). Von dieser transformierten Linie erfolgte das

Animpfen von 5 ml einer Übernacht-Kultur. Anschließend fand die Verteilung der Start-Kultur auf einen 250-ml-Kolben mit jeweils 100 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) und die Kultivierung bis zu einer OD_{600} von 0.6-0.8 statt. An diesem Punkt konnte die Expression des GST-NICN1-Fusionsproteins mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (genaue Angaben sind dem Ergebnisteil zu entnehmen) induziert und die Bakterien bei 25-37 °C für weitere vier Stunden kultiviert. Zur Kontrolle wurden in regelmäßigen Abständen Proben (1 ml) entnommen, die Bakterien pelletiert und in SDS-Auftragspuffer aufgenommen.

Lyse der Bakterien

Nach Ablauf der Expression wurden die Kulturen für 10 min auf Eis gekühlt. Nach Pelletierung der Bakterien bei 4°C, für 10 min mit 6000 rpm (SV614-Rotor) sind diese in unterschiedlichen Mengen Lysepuffer lysiert worden. Es erfolgte die weitere Zugabe von Proteaseinhibitoren und Lysozym. Die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Von dieser Stelle an musste alle weiteren Schritte auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt werden. Es folgte der Transfer des Lysates in sterile Falcon-Röhrchen und die Sonifizierung für jeweils 30 sec, unterbrochen von jeweils einminütigen Intervallen. Zelltrümmer wurden bei 6000 rpm und 4 °C über 30 min abzentrifugiert.

Vorbereitung der Glutathion-Sepharose

Vor Gebrauch erfolgte die Durchmischung der Sepharose-Kügelchen auf dem Vortexer. Pro Röhrchen wurden 26,6 µl der Originallösung mit 20 µl kaltem PBS gemischt, um eine 50%ige Gebrauchsmischung zu erhalten. Es folgte eine kurze (5 min) Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 500 rpm. Der Überstand wurde entfernt und die beads mit je 200 µl eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Entfernung des Überstandes folgte die Resuspendierung des Pellets in 20 µl kaltem PBS. Für die Aufreinigung des Fusionsproteins wurden pro Mikroliter Lysat 0,3 µl der gereinigten Gebrauchslösung in ein neues Röhrchen transferiert.

Aufreinigung und Eluation des Fusionsproteins

Je nach Versuchsanordnung wurde entweder das Bakterienlysat oder ein Gemisch aus Zell-Lysat und Fusionsprotein in die mit der 50 %igen Sepharose-Gebrauchslösung befüllten Röhrchen transferiert. Nach 30 min Inkubation bei RT

unter Rotation, erfolgte zur Entfernung des Überstandes eine Zentrifugation für 30 sec. bei 1400 rpm in der Tischzentrifuge. Der Überstand wurde entfernt und die *beads* 4x mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen (jeweils 30 sec Zentrifugation mit 1400 rpm in der Tischzentrifuge). Abschließend erfolgte die Eluierung des NICN1-Fusionsproteins mit 50 µl reduziertem Glutathion durch Inkubation bei RT unter ständigem Schütteln. Bis zur weiteren Verwendung wurden das in Aliquots abgefüllte Protein bei -20 °C gelagert.

2.2.8.5 Eindimensionale Polyacrylamid-Geleektrophorese (SDS-PAGE)

Mit dieser von Lämmli 1970 entwickelte Methode können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei werden die Moleküle zuvor mit dem ionischen und denaturierend wirkenden Detergenz Natriumdodecylsulfat versetzt. Dessen Sulfatgruppen sorgen zusätzlich für eine gleichmäßige Verteilung von negativer Ladung und führen somit zur Maskierung der Eigenladung der Proteine. Die Auftrennung erfolgt in einer Gelmatrix aus Acrylamidpolymeren, die über N'N'-Methylen-bisacrylamid quervernetzt sind. Die Dichte und somit die Durchlässigkeit der Matrix ist abhängig von der Konzentration der Polyacrylamid-Monomere und dem Grad der Quervernetzung, d.h. der Konzentration der bifunktionalen Gruppen. Die Polymerisation wird durch die freien Radikale des Ammoniumpersulfats (APS) in einer Radikalkettenreaktion hervorgerufen und kann durch die Anwesenheit von TEMED beschleunigt werden. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird dem eigentlichen Trenngel noch ein Sammelgel von ca. 1/10 Länge der Trenngelstrecke vorgeschaltet. Diese weist einen um zwei Einheiten geringen pH-Wert auf als das Trenngel. Dies führt zu einer Verdichtung der Proteinprobe vor dem Eintritt in das Trenngel und somit zu einer schärferen Trennung der jeweiligen Proteinbanden.

In dieser Arbeit wurden sowohl Minigele der Größe 8.5 cm x 8.0 cm als auch größere Gele mit den Maßen 17.5 x 18.0 cm verwendet. Die Laufstrecke des Trenngels belief sich auf 6 cm bei den kleinen und 13 cm bei den großen Gelen. Die Polyacrylamidkonzentration der Sammelgele wurde konstant bei 5 % gehalten, die der Trenngele variierte zwischen 10-15 %. In der folgenden Tabelle sind die Mengen der einzelnen Bestandteile aufgelistet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Damit ein sauberer Abschluss zum Sammelgel bestand, erfolgte die

Überschichtung mit Isopropylalkohol. Dieser wurde nach vollständiger Polymerisation durch mehrmaliges Spülen mit Wasser entfernt. Während das Sammelgel auspolymerisierte, wurden die Proben mit Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Es folgte die Auftragung der Proben und des Standards. Die Elektrophorese wurde im Sammelgel bei einer Versorgungsspannung von 80 V, in Trenngelen bei 135 V durchgeführt. Bei großen Gelen erfolgte die Auftrennung der Proteine über Nacht bei 6 mA pro Gel.

	Trenngel		Sammelgel	
	10%	12%		
30 % Acrylamid/ 0.8 Bisacrylamid	10 ml	12 ml	3,9 ml	
Trenngelpuffer	7,7 ml	7,7 ml	2,9 ml	Sammelgel- puffer
10 %ige SDS-Lösung	310 µl	310 µl	230 µl	
TEMED	23 µl	23 µl	23 µl	
10 %ige APS-Lösung	310 µl	310 µl	230 µl	
Ad ddH ₂ O	11,9 ml	9,9 ml	15,6 ml	

2.2.8.6 Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mittels Coomassie

Eine seit den 1960er Jahren weit verbreitete Methode ist die Färbung mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliantblau. Diese doch recht einfach durchzuführende Methode weist nachteilig eine mäßige Empfindlichkeit (Minimum 200-400 ng Protein pro Bande) auf. Der Vorteil liegt darin, dass sich die gefärbten Proteine weiterverarbeiten lassen, z.B. für einen *Blot*.

Die Gele wurden nach dem Abbau kurz mit Wasser gespült und dann für mindestens eine halbe Stunde unter ständigem Schütteln im Coomassie-Bad gefärbt. Anschließend fand die Transferierung in die mehrmals zu wechselnde Entfärbelösung statt.

2.2.8.7 Detektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mittels

Silberfärbung

Die Silberfärbung von Gelen, erstmals entwickelt von Merril *et al.* (1981), ist wesentlich empfindlicher als die Färbung mit Coomassie. So können schon 50-100 pg Protein pro Bande nachgewiesen werden [Heukeshoven und Dernik, 1988]. Bei dieser Methode bilden die Reste der Aminosäuren Glutamin, Asparagin und Cystein einen Komplex mit den Silberionen aus. Die Zugabe von alkalischem Formaldehyd sorgt für die Reduzierung des Silber zu reinen Silberkeimen. Der Einsatz von weiteren starken Reduktionsmitteln sorgt für die vollständige Umwandlung in metallisches Silber, bevorzugt in der Nähe der Silberkeime. Durch rasche Veränderung des pH-Wertes mittels konzentrierter Essigsäure oder Glycinlösung wird das Anfärben des gesamten Gels verhindert.

So vorteilhaft die Nachweisgrenze dieser Methode erscheint, müssen doch einige Einschränkungen genannt werden: Die Silberfärbung dauert wesentlich länger als die Coomassie-Färbung, ist aufgrund der ständig wechselnden Lösungen umständlicher und färbt die verschiedenen Proteine mit unterschiedlicher Intensität. Da sie darüber hinaus in der Lage ist, Nukleinsäuren zu färben, wurde diese Methode nur zum Nachweis von Proteinen nach einer IP gewählt.

Zur Fixierung wurden die Gele zunächst für 30 min in einer Ethanol-Essigsäure-Lösung geschwenkt und im Anschluss daran für eine weitere halbe Stunde in einer Thiosulfatlösung getaucht. Es folgte die dreimalige Waschung der Gele mit Wasser für jeweils 6-10 Minuten.

2.2.8.8 Trocknung von Gelen

Die entfärbten Gele wurden mit Wasser gespült, auf Whatman-Papier gelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Anschließend erfolgte die Trocknung der kleinen Gele bei 90 °C für eine Stunde und der großen Gele bei 80 °C für drei Stunden auf dem Trockentisch.

Ergebnisse

Die physiologische Bedeutung des Nicolin1-Proteins im murinen Organismus ist bis heute unklar. Weder seine genomische Struktur [Backofen *et al.*, 2002], noch seine Kernlokalisation [Backofen *et al.*, 2002] lieferten Hinweise auf die Funktion. Analysen der Proteinsequenz wiesen keine Anzeichen von typischen DNA-Bindungsdomänen oder bekannten Enzymmustern auf. Da jegliche Anhaltspunkte fehlen, dem Nicolin1-Protein eine biologisch fundierte und bekannte Funktion zuzuweisen, wurden in verschiedenen Richtungen Experimente durchgeführt. Für die funktionelle Analyse einzelner Proteine in komplexen Geweben bietet sich die Technologie des gezielten Gen-Knockouts an. Das Fehlen des Proteins und damit seine Auswirkung können anhand des Tiermodells im Gesamtorganismus untersucht werden. Man bezeichnet dieses Verfahren als „*reverse genetics*“ Reverse Genetik (Abschnitt 1.3.). Die Frage, wie Nicolin1 in den Kern gelangt, lässt sich mit der Methode der rekombinanten Proteinexpression beantworten. Durch die Überexpression als Fusionsprotein in einem prokaryontischen (*E.coli* BL21) oder eukaryontischen (MDCK und COS-Zellen) System können adäquate Mengen des zu untersuchenden Proteins unter einfachen Bedingungen erzeugt werden. Der als „*Tag*“ angehängte

Fusionspartner ermöglicht seinerseits die leichte Isolierung und Aufreinigung des Fusionproteins, sowie der Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen

Die im Folgenden angegebene Reihenfolge der Versuche entspricht der tatsächlichen Durchführung und wurde jeweils durch die erhaltenen Ergebnisse bestimmt.

3.1 Etablierung der Knockout-Maus-Technik für *Nicolin1*

3.1.1 Strategie zur Herstellung der konditionalen Knockout-Vektoren

Eine allgemeine Strategie zur Generierung transgener Null-Mutanten basiert auf dem Austausch einer Gensequenz („*target*“) gegen einen *in vitro* gezielt modifizierten Genabschnitt, dem „*targeting*-Konstrukt“ [Thomas und Capecchi, 1987]. Eine Möglichkeit, einen vollständigen Funktionsausfall zu erzeugen beruht auf der Deletion des ersten Exons und der Promotor-Region des zu untersuchenden Gens [Zhang *et al.*, 1994]. Damit wird eine korrekte Transkription und anschließende Translation unterbunden. Dies erreicht man durch den Einsatz von Resistenz-Genen, die auch als Selektionsmarker bezeichnet werden. Ein häufig eingesetzter Selektionsmarker ist das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, kurz *neo*. Dieses Gen erfüllt zwei Aufgaben: Zum einen vermittelt es Resistenz gegen den cytotoxischen Stoff Neomycin und seine Derivate (Geneticin, G418). Zum anderen wirkt es als Mutagen für das erste Exon des zu untersuchenden Gens, um dessen Sequenz zu deletieren [Deng *et al.*, 1993].

Die Frequenz, mit der ein *Targeting*-Ereignis stattfindet, liegt bei etwa einer von 10^5 - 10^9 Zellen. Sie wird durch die Art des verwendeten Vektors, der Größe der homologen Bereiche [Hasty *et al.*, 1991] und dem Vorhandensein von Polymorphismen zwischen Vektor und Zielgen beeinflusst [de Wind *et al.*, 1995]. Das Konstrukt wurde deshalb so entwickelt, dass die homologen Arme einen Bereich von 5-10 kb umfassen [Deng *et al.*, 1993]. Zusätzlich entsprach die DNA zur Generierung des Vektors demselben Mausstamm, in dem später das *Targeting*-Ereignis durchgeführt werden sollte.

Die Entscheidung, einen konditionalen einem konstitutiven (konventionellen) Vektor vorzuziehen, resultierte aus folgenden Überlegungen. Konstitutive

Knockout-Verfahren führen zur Inaktivierung oder Modifikationen eines Gens in sämtlichen Geweben des Organismus. Einsetzend mit dem Beginn seiner Entwicklung halten diese für die gesamte Lebensdauer an. Bei *Nicolin1* ist nicht bekannt, ob das inaktive Genprodukt in einer frühen Entwicklungsphase benötigt wird. Beim konstitutiven Konstrukt würde deshalb die Möglichkeit des Auftretens von Effekten, die eine Kompensation des fehlenden Proteins durch andere Genprodukte herbeiführen, bestehen. Es kann zu fehlgeleiteten Entwicklungsprozessen kommen oder sogar zur Letalität führen. Solche phänotypischen Erscheinungen stehen in keinem Zusammenhang zu den Funktionen des Proteins im adulten Tier und führen zu falsch positiven Ergebnissen.

Dieser Aspekt wurde auch deshalb besondere Aufmerksamkeit geschenkt, weil die Promotorregion des dicht benachbarten *AMT*-Gens, das für ein essentielles Protein codiert, nicht identifiziert werden konnte. Es besteht somit die Möglichkeit, dass dieser im *Nicolin1*-Gen lokalisiert ist. Ein konventioneller Knockout hätte im ungünstigsten Fall zur Folge, dass sich die Deletion dieses Promotors letal auf den Organismus auswirkt. Eine eindeutige Zuordnung des phänotypischen Erscheinungsbildes wäre nicht möglich. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt, der den Einsatz der konditionalen Elemente unterstützt, ist die Möglichkeit der gewebe- und entwicklungsspezifischen Deletion des *Nicolin1*-Gens. Sie gestatten genauere Studien des Proteins und möglicher Reaktionspartner.

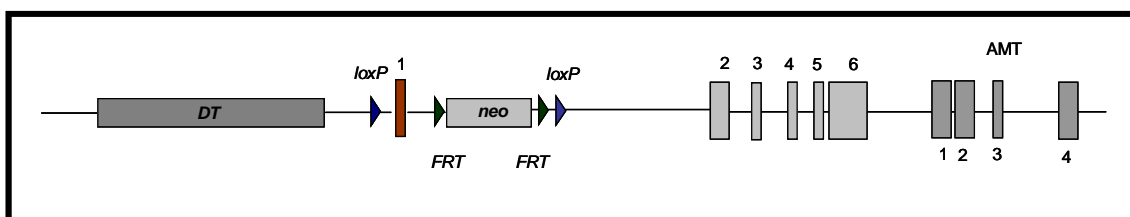


Abb. 3- 1: Konditioneller Knockout-Vektor

Dargestellt ist der konditionelle Knockout-Vektor zur Deletion des ersten Exons des murinen *Nicolin1*-Gens. Bei den konditionalen Elementen handelt es sich um Rekombinase Systeme aus dem Bakteriophagen P1 (Cre/*loxP* blaues Dreieck) und aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Frt/FLP grünes Dreieck). Als negativer Selektionsmarker wurde die codierende Sequenz der A-Untereinheit des Diphtherie Toxins (*DT*) eingesetzt. Bei dem positiven Selektionsmarker handelt es sich um das Neomycinphospho-Transferase-Gen *neo*. Der lange homologe Arm umfasst die Exons 2-6 des *Nicolin1*-Gens und Exon 1-4 des *AMT* Gens. Der kurze Arm besteht aus einem kurzen Sequenzbereich vor dem ersten Exon.

Abbildung 3-1 zeigt den Aufbau des *Targeting*-Konstruktes, dessen Ziel die Deletion des ersten Exons ist [Zhang *et al.*, 1994]. Verwendet wurden hierfür die Rekombinasen Cre (*causes recombination*) aus dem Bakteriophagen P1 [Sauer *et al.*; 1989] und Flp aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [O`Groman *et al.*; 1991]. Ihre Erkennungssequenzen *loxP* und *FRT*, (konditionale Elemente, siehe Dreiecke) flankieren wie in der Abbildung 3-1 dargestellt das erste Exon sowie das positive Selektionsmarkergen *neo*. Die Orientierung und die Anzahl der eingesetzten Elemente bestimmen die Art und Vielseitigkeit der Rekombinationsprodukte (Abschnitt 1.4). Um eine gewünschte Deletion zu erzielen, bedarf es jeweils zweier *loxP* und *FRT*-Sites in gleicher Orientierung. Das Cre // *loxP*-System ist für die spätere Deletion des ersten Exons zuständig, während die Flp-Rekombinase für die Entfernung der *neo*-Kassette sorgt. Die Elimination des für die Isolation der homologen Rekombinanten benötigten Selektionsmarkers ist eine der gebräuchlichsten und einfachsten Verwendungen der Rekombinase-Systeme. Im Zusammenhang mit Gen-Extraktions-Studien konnte gezeigt werden, wie wichtig die Entfernung der Kassette vom endogenen Locus ist: die Präsenz des Marker-Gens führt nicht nur zur Regulation des *Target*-Bereiches. Es kann zusätzlich zur Beeinflussung von Genorte führen, die sich mehr als 100 kB entfernt davon befinden [Fiering *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996; Pham *et al.*, 1996; Bories *et al.*, 1996 und Gorman *et al.*, 1996]. Die Deletion des Markergens ist sowohl in den ES-Zellen *in vitro* vor der Generierung der Maus als auch *in vivo* nach Einführung in die Keimbahn möglich.

Konstruiert wurde ein so genannter *Replacement*-Vektor, der sich durch eine Linearisierungsstelle außerhalb des homologen Bereiches auszeichnet. Die Frequenz, mit der die Gendisruption stattfindet, ist geringer als beim ebenfalls Verwendung findenden *Insertions*-Vektor. Das Ereignis der homologen Rekombination ist dafür aber irreversibel. Ebenfalls von Bedeutung für die Gestaltung des Vektors war die Position des *neo*-Gens innerhalb der homologen Bereiche. Ihre Festlegung erfolgte in Abhängigkeit von der Nachweismethode zur Bestimmung der korrekten Integration. In diesem Fall wurde der Selektionsmarker asymmetrisch in den Vektor eingebaut, so dass ein langer und ein kurzer homologer Arm entstand. Mit Hilfe dieser Anordnung ist

es möglich, das Integrationsereignis über Amplifikation spezifischer PCR-Produkte (Abschnitt 1.3) nachzuweisen.

Neben dem positiven Selektionsmarkergen *neo*, wurde auch ein negativer Selektionsmarker in den Vektor integriert (*DT*). Ihre Verwendung ist in den unterschiedlichen Integrationsmöglichkeiten des Konstruktes in das Zielgen begründet. Die nur nach illegitimer Rekombination stattfindende Expression der Markergene führt zum Absterben der Zelle. Damit unterstützen sie die Selektion von Zellen mit dem gewünschten *Targeting*-Ereignis [Thomas *et al.*, 1986].

Die Klonierungs-Strategie zur Herstellung des Knockout-Konstruktes lag der physikalischen Kartierung des murinen *nicolin1*-Lokus zu Grunde [Backofen *et al.*, 2002; Backofen und Leeb, 2001]. Das in einer ECL-Hybridisierung erhaltene Spaltungsmuster bestimmte die Art und Weise der durchzuführenden Klonierungsschritte

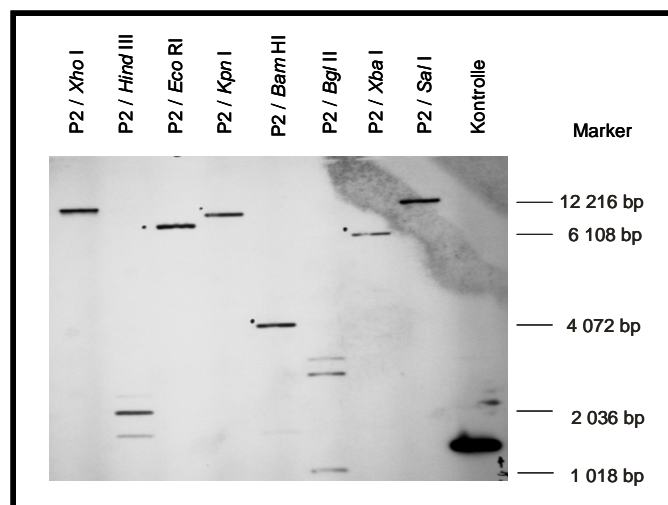


Abb. 3- 2: Spaltungsmuster des PAC-Klons P2

Dargestellt ist das nach der ECL-Hybridisierung erhaltene Spaltungsmuster des PAC-Klons P2. Nur die Enzyme *Xho* I, *Kpn* I, *Bam* HI, *Xba* I und *Sal* I führten zur einer Linearisierung des Klons. Da diese nur einmal im *Nicolin1*-Gen schneiden, wurden sie für die Erzeugung der Knockout-Konstrukte herangezogen.

Es kamen nur die selten schneidende Enzyme *Xho* I, *Kpn* I, *Sac* II, *Rsr* II und *Not* I für die Erzeugung des Knockout-Konstruktes in Frage. Damit wurde gleichzeitig auch die Wahl des Knockout-Vektors festgelegt. Eingesetzt wurde der von Stratagene angebotene pKOV920 Scrambler (Vektordaten siehe

Anhang). Das daraus abgeleitete Klonierungsschema gliederte sich in folgende Abschnitte.

Der Einbau des negativen Selektionsmarkers sollte über die im Vektor vorhandene *Rsr* II-Schnittstelle erfolgen. Dieses Enzym flankiert in dem Plasmid pKO Select DT die codierende Sequenz für die A-Untereinheit des Diphtherie-Toxins und kann darüber isoliert und anschließend in das Knockout-Konstrukt kloniert werden.

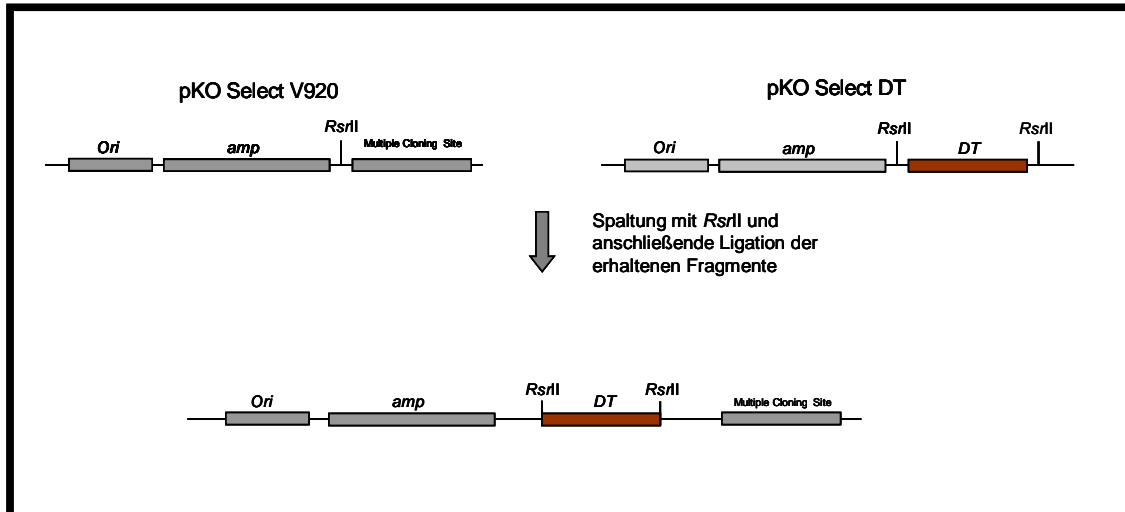


Abb. 3- 3: Einbau des negativen Selektionsmarkers

Die Darstellung zeigt den schematischen Einbau der codierenden Sequenz der A-Untereinheit des Diphtherie-Toxins (*DT*). Die Klonierungs-Strategie sah vor, die Kasette über eine *Rsr*II-Spaltung aus dem Vektor pKO Select DT zu gewinnen. Anschließend sollte die Klonierung in den Knockout-Vektor erfolgen. ori = origin of replication (Replikationsstart); amp = Ampicillinresistenzgen.

Als nächstes sollte das zu deletierende Exon zusammen mit der ersten *loxP*-Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *Kpn* I und *Sac* II in den Vektor kloniert werden. Die Erzeugung dieses Fragments erfolgte über die Methode der PCR-Ligation-PCR. Sie ermöglicht die Verbindung der über PCR gewonnenen Amplifikate durch die Kombination aus Phosphorylierung und Ligation (Abbildung 3-4). Der daraus resultierende kurze homologe Arm von 712 bp gestatten die spätere Überprüfung des gewünschten Integrationsereignisses.

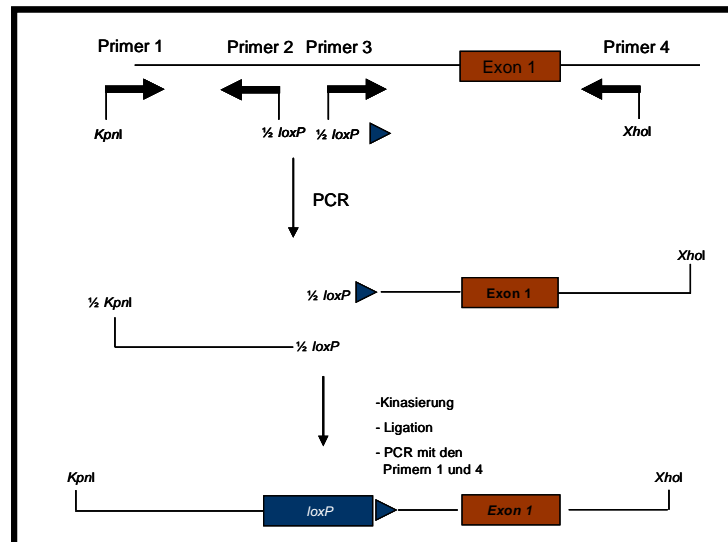


Abb. 3- 4: Methode der PCR-Ligation-PCR

Der Einbau der ersten *loxP*-Site (blauer Pfeil) und das erste Exon sollte über die Methode der PCR-Ligation-PCR erfolgen. Zunächst würden dafür die Primer erzeugt werden, von denen zwei (Primer 1 und 4) zusätzliche Enzym-Erkennungssequenzen enthalten. Primer 2 und 3 sind jeweils die Hälfte der *loxP*-Erkennungssequenz als *Tag* angehängt worden. Nach der **PCR** auf dem PAC-Klon P2 entstehen zwei Amplifikate, nach Phosphorylierung miteinander durch die *loxP*-Site ligiert werden können (**Ligation**). Eine weitere **PCR** mit den Primern 1 und 4 sorgte für die Herstellung von ausreichendem Amplifikat des gesamten Fragments. Mittels der die beiden Primer eingeführte Schnittstellen *Kpn* I und *Xho* I ist es möglich, den ersten konditionalen Abschnitt in Knockout-Vektor zu klonieren.

Für den Einbau der neo-Kassette und der benötigten konditionalen Elemente wurde der vorhandene Vektor herangezogen. Dieser verfügt über die Kombination *FRT-neo-FRT-loxP*. Mittels getaggtter Primer (enthalten Erkennungssequenzen für *Xho* I und *Sac* II) sollte dieser Bereich amplifiziert und dann in den Knockout-Vektor kloniert werden.

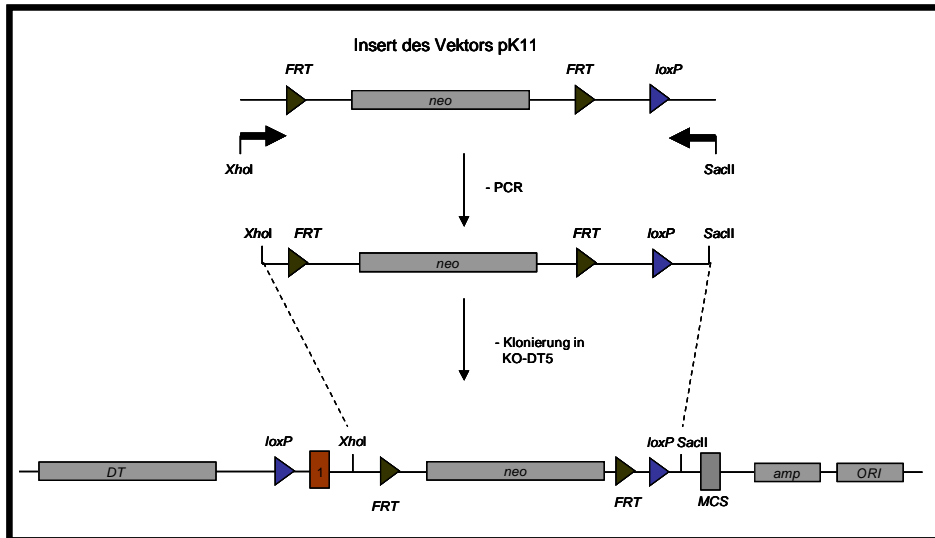


Abb. 3- 5: Einführung der konditionalen Elemente

Die Einführung der zweiten *loxP*-Site, sowie der mit *FRT*-Sequenzen flankierten neo-Kassette erfolgt über PCR. Mittels getaggtter Primer (Pfeile) sollte auf dem Plasmid pK11 das betreffende Amplifikat erzeugt und nach erfolgreicher Spaltung mit den Enzymen *Xho* I und *Sac* II in den Vektor pKO DT5 kloniert werden.

Der letzte Schritt sah die Einführung des langen homologen Arms, der durch eine PCR auf dem PAC-2-Klon erzeugt werden sollte, vor. Der Einbau des Produktes in das Konstrukt sollte über die Restriktionsschnittstellen für *Sac* II und *Not* I, die durch die Primer eingeführt wurden, erfolgen.

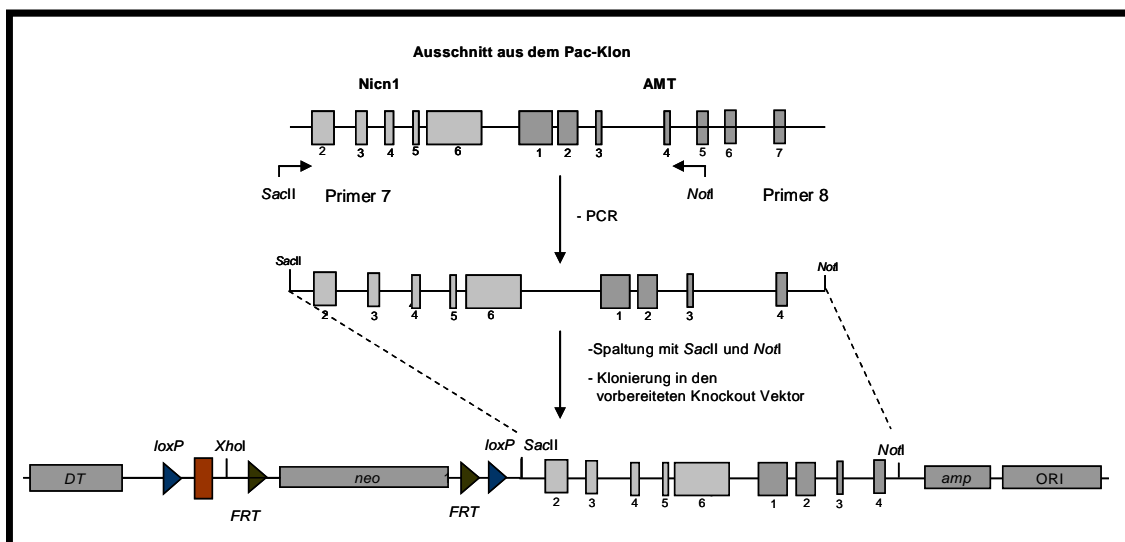


Abb. 3- 6: Einführung des langen homologen Arms

Die Darstellung zeigt die schematische Einführung des langen homologen Arms. Zunächst sollte das 6000 bp große Fragment mittels PCR erzeugt werden. Die durch die getaggtten

Primer 7 und 8 eingeführten Restriktions-Erkennungssequenzen ermöglichten nach Spaltung die spätere Klonierung in den Knockout-Vektor.

Um sicherzustellen, dass während der Amplifikation der einzelnen Fragmente des Knockout-Konstruktes keine Mutationen aufgetaucht sind, sollte nach jedem Schritt eine Sequenzierung der erhaltenen Klone durchgeführt werden. Dazu konnten die schon zur genomischen Charakterisierung des murinen *Nicolin1*-Gens eingesetzten Sequenzierprimer (siehe Anhang) verwendet werden.

3.1.2 Erzeugung des konditionalen Knockout-Konstruktes pKOC30

Zu Beginn wurde das negative Selektionsmarker-Gen *DT* (codierende Sequenz für die A-Untereinheit des Diphtherie Toxins) über eine *Rsr* II-Schnittstelle aus dem Vektor pKOSelect DT (Vektordaten siehe Anhang) isoliert und in den Knockout-Vektor kloniert.

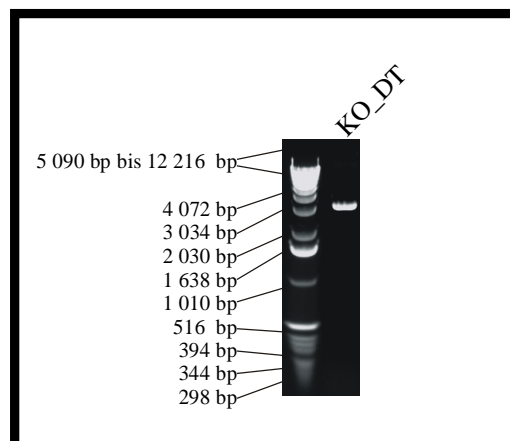


Abb. 3- 7: Klonierungsergebnis des negativen Selektionsmarkergens

Dargestellt ist das analytische Gel nach der Linearisierung des Vektors KO-DT mit *Xho* I. Erwartet wurde ein Fragment mit einer Größe von 3500 bp. Diese Größe errechnete sich aus der Klonierung des ungefähr 1500 bp großen *DT*-Sequenz mit dem 2000 bp großen Vektor pKO Scrambler V920.

Um den erfolgreichen Einbau des negativen Selektionsmarkergens *DT* dokumentieren zu können, wurde der Klon KO_DT mit den Enzymen *EcoR* I und *Hind* III gespalten. Das erwartete 3500-bp-Fragment konnte durch das analytische Gel bestätigt werden.

Die darauf folgende Einführung des kurzen homologen Arms und der ersten *loxP*-Sequenz erfolgte in drei Schritten, in denen das Verfahren der PCR-Ligation-PCR angewendet worden ist (Abbildung 3-4). Die an den Primern angehängten Sequenzen bildeten überhängende Enden („*sticky ends*“). Diese konnten durch Phosphorylierung und anschließende Ligation miteinander verbunden werden. Durch die erneute Amplifikation mit dem *forward*-Primer des 5'- und dem *reverse*-Primer des 3'-Fragments, die mit entsprechenden Erkennungssequenzen getaggt sind, entstanden nun ausreichende Mengen an Produkt. Dieses wurde nach Spaltung und Aufreinigung aus einem präparativen Gel in den Vektor KO-DT kloniert. Durch die Behandlung der erhaltenen Klone KO_DT 5 und KO_DT 8 mit den Enzymen *Kpn* I und *Xho* I konnte das gewünschte Insert mit einer Größe von 1700 bp und der Vektor mit 3500 bp in einem analytischen Gel nachgewiesen werden. Die darauf folgenden Sequenzierung mit den Primern ORF_V_-60 und ORF_V-642 konnte die Richtigkeit der Sequenz bestätigen.

Um die drei weiteren konditionalen Elemente und die *neo*-Kassette in das Konstrukt einbauen zu können, erfolgte eine PCR auf dem Plasmid pK11 mit den Primern 5 und 6 (Sequenz siehe Anhang). Diese binden jeweils an einer repetitiven Rekombinase-Erkennungssequenz und zusätzlich an 20 Basen der flankierenden Vektorränder. Das Produkt wurde mit den Enzymen *Xho* I und *Sac* II gespalten und auf einem präparativen Gel aufgetragen. Nach anschließender Isolation der Bande erfolgte die Aufreinigung aus dem Gel und die Klonierung in den Vektor KO-DT. Von der ursprünglichen Durchführungsstrategie, dieses Fragment gleich in das Konstrukt KO_DT_5 zu klonieren, wurde abgewichen. Die Überprüfung der Sequenz auf mögliche Mutationen in diesem Vektor wäre nur mit wesentlich mehr Aufwand und Primern durchzuführen gewesen. Nachdem keine Mutationen nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Umklonierung in den Vektor KO_DT 5.

Die Amplifizierung des langen homologen Arms erfolgte mittels der Primer 7 und 8. Das Amplifikat wies eine Größe von 7989 bp auf, die nach der Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Not* I und *Sac* II auf einem analytischen Gel bestätigt werden konnten. Das Fragment wurde in das Konstrukt kloniert und

die erhaltenen Klone sequenziert. Da bei dem Klon pKOC30 keine Mutationen nachgewiesen werden konnten, sollte dieser als Knockout-Konstrukt eingesetzt werden.

3.1.3 Erzeugung des Knockout-Vektors mit TK-Kassette

Neben dem Diphtherie-Toxin als negativem Selektionsmarker findet häufig die kodierende Sequenz der Thymidin-Kinase, aktiviert vom Herpes-Simplex-Virus-Promotor (HSV-tk), Verwendung. Diese Kinase führt durch die Zugabe von Gancyclovir zum Absterben von Zellen, die ein unerwünschtes Rekombinations-Ereignis tragen [Thomas und Carpecchi, 1987]. Die Sensitivität gegenüber dieser Substanz erwerben eukaryontische Zellen nur über eine Virusinfektion oder im Experiment durch eine nicht homologe Rekombination.

Für die Einführung der TK-Kassette wurden zwei Vektoren herangezogen, zum einen das fertige Knockout-Konstrukt pKOC30, zum anderen der Vektor pPNTloxP², der freundlicherweise von Herrn Gossler zur Verfügung gestellt worden war. Dieser Vektor besitzt als Grundgerüst den Vektor pNTKV von Stratagene (siehe Anhang). Zusätzlich weist er ein *neo*-Gen, die HSV-*tk*-Kassette und mehrere Promotorregionen auf. Mit Hilfe der Enzyme *Not* I und *Kpn* I konnten alle störenden Elemente entfernt werden, so dass nur noch die benötigte TK-Kassette in dem Vektor zurückgelassen wurde. Mit denselben Enzymen wurde der Vektor pKOC30 gespalten, um den kurzen und langen homologen Arm, sowie die konditionalen Elemente zu entfernen. Nach erfolgreicher Klonierung und anschließender Kontrollspaltung konnte der zweite Knockout-Vektor pNTK4 der Sequenzierung übergeben werden.

3.1.4 Durchmusterungsstrategie zur Analyse eines Rekombinationsereignisses

Um ein positives Integrationsereignis nach einer homologen Rekombination nachweisen zu können und somit positive Klone zu isolieren, kann man sich zweier Methoden bedienen. Zum einen ist es möglich mittels *Southern-Blot*-Studien und einer geeigneten Sonde, das Vorhandensein des homolog rekombinierten Fragments nachzuweisen. Ein Nachteil dieser Technik ist die Schwierigkeit, Vektor und Sonde so zu konstruieren, dass zwischen Wildtyp und gewünschtem Integrationsereignis unterschieden werden kann. Unter

anderem limitiert die geringe DNA-Menge in einem frühen Stadium der Selektion die Einsatzfähigkeit des *Southern-Blots* (Abschnitt 1.3). Dem gegenüber steht die PCR. Mit ihrer Hilfe und durch einen geeigneten Aufbau des Konstrukts ist es möglich, Primer zu designen, die sowohl im homolog rekombinierten, als auch im genomischen Bereich binden. Durch die Amplifizierung von Fragmenten einer definierten Größe lässt sich feststellen, ob das Integrationsereignis wie gewünscht stattgefunden hat. Hierfür wurden 5 Primer entwickelt. Die *forward*-Primer KO_1 und KO_2 binden in einem Bereich, der vor dem kurzen homologen Arm des Konstrukts liegt. Bei einer homologen Rekombination sollte es zu keiner Beeinträchtigung dieser Bindungsstellen kommen. Primer KO_FRT bindet in der ersten *FRT*-Site. KO_loxP in der ersten *loxP*-Sequenz, während KO-neo im *neo*-Gen bindet. In Kombination mit den beiden *forward*-Primern ergeben sich folgende Amplifikatgrößen.

Tab. 3- 1: Primerkombination zur Überprüfung eines Rekombinationsereignisses

In der Tabelle sind die Primerpaare und die daraus resultierenden Amplifikate aufgelistet.

	KO_FRT	KO_loxP	KO_neo
KO_1	784 bp	1605 bp	2820 bp
KO_2	1149 bp	1970 bp	3185 bp

3.1.5 Klonierung eines hypothetischen Knockouts

Die Optimierung der PCR während der *Screening*-Phase nimmt zu viel Zeit und ES-Zellen in Anspruch. Deshalb sollte ein Konstrukt erzeugt werden, dessen Aufbau die Etablierung der PCR ermöglicht. Dafür musste dieses „hypothetische Knockout-Konstrukt“ die wichtigsten Bindungsstellen der *Screening*-Primer enthalten und gleichzeitig in einer Form vorliegen, dies ermöglichte die Konzentration an „*template*“ den realen Bedingungen anzugleichen.

Als Ausgangsmaterial wurde der Knockout-Vektor pKOC30 DT verwendet. Dieser verfügt über die gewünschten Bindungsstellen. Zusätzlich gestattet er über die vorhandenen *Rsr* II- und *Kpn* I-Schnittstellen das Einfügen des Abschnitts, der außerhalb des Targeting-Ereignisses liegt. Für die Herstellung des vorderen Abschnittes wurden die getaggen Primer KO_Hypothetisch_RsrII

und KO_Hypothetisch_KpnI entwickelt. Diese führen zur Amplifikation eines 330 bp großen Produktes, das im 3'-Bereich an den kurzen homologen Arm grenzt. Mit dem Beginn eines repetitiven Elements schließt es im 5'-Bereich ab. Nach erfolgreicher Klonierung in den Vektor fand die Transfektion in *E.coli* (Stamm XL1-Blue) statt. Die Kontrolle des Plasmids erfolgte über die Spaltung mit dem Enzym *EcoR* I. Daraus resultierten drei Fragmente, die jeweils eine Größe von 33, 65 und 13362 bp besitzen. Da die kleineren Banden in einem analytischen Agarosegel nicht sichtbar sind, konnte der Nachweis deshalb nur anhand des großen Fragmentes nachgewiesen werden.

3.1.6 Genotypisierungs-PCR zur Unterscheidung des Rekombinationsereignisses

Das Durchmustern (*Screening*) der positiven ES-Zell-Klone stellt eine große Herausforderung da. Die positiven ES-Zellen werden während dieser Zeit in 96-*well*-Platten kultiviert, was zu einer sehr starken Herabsetzung der Pluripotenz führt. Um dies zu verhindern, sollte die Untersuchung der Klone innerhalb weniger Stunden abgeschlossen sein. Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit an großen Mengen Material und Geräten. Das angewandte Durchführungsschema darf während der einzelnen Reaktionen nicht an Reproduzierbarkeit verlieren. Deshalb sollten die Bedingungen mit Hilfe des hypothetischen Konstrukts im Hinblick auf Materialverbrauch, Geräteanzahl und Reproduzierbarkeit optimiert werden. Die während dieser Phase entstandenen positiven PCR-Produkte waren als Ersatz für den in den analytischen Gelen eingesetzten Längenstandard vorgesehen.

Für den ersten Kontroll-Lauf der PCR wurden die im Labor als Standard-Bedingungen bezeichneten Zeiten und Temperaturen verwendet (siehe Anhang). Die Hybridisierungstemperatur errechnete sich aus der Schmelztemperatur der Primer. Die Elongationszeit wurde nach der Faustformel „pro kb 2 min“ angesetzt. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes belief sich zunächst auf 50 µl, konnte aber später auf 25 µl gesenkt werden. Die Erzeugung der Knockout-Maus und damit das Durchmustern der Klone sollte in dem Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien erfolgen. Damit musste die PCR auf einem Thermocycler durchgeführt werden, der in ausreichender Anzahl in beiden Laboren vertreten war. In Frage

dafür kam der MJ Research PT100. Die trotz identischer Seriennummer zwischen den Geräten vorkommenden Temperaturunterschiede waren in diesem Fall minimal. Die Anwendung der in Hannover ermittelten Bedingungen konnte uneingeschränkt übertragen werden.

Neben der *Screening*-PCR muss auch die Isolierung der DNA in kürzester Zeit ermöglicht werden. Dabei durfte kein Qualitätsverlust der DNA auftreten. Dieser würde sich negativ auf die PCR auswirken. Aus diesem Grund wurde der DNA-Isolierungs-Kit der Firma Qiagen benutzt. Hierüber war bekannt, dass die zur Isolierung verwendeten Puffer die PCR nicht beeinflussen würden.

Aus den Etablierungsversuchen konnten folgende *Screening*-PCR-Bedingungen aufgestellt werden:

<u>Ansatz (25 µl)</u>			<u>PCR-Bedingungen</u>			
1	µl	cDNA	5	min	94 °C	Denaturierung
2,5	µl	Puffer	45	sec	94 °C	Denaturierung
0,25	µl	P1 (50pmol/µl)	45	sec	56 °C	Annealing
0,25	µl	P2 (50 pmol/ml)	4	min	72 °C	Elongation
0,5	µl	dNTP's (5 mM)	10	min	72 °C	Elongation
2,5	µl	Taq-Polymerase	hold		4 °C	
20,3	µl	ddH ₂ O				

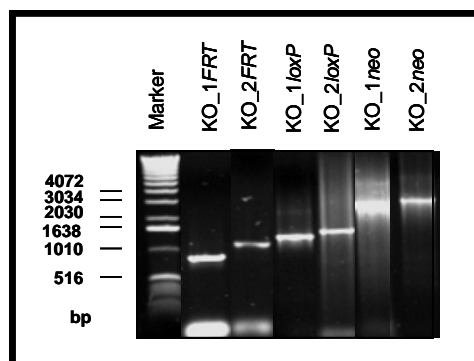


Abb. 3- 8: Kontroll-PCR

In der Abbildung sind die Ergebnisse der einzelnen Kontroll-PCRs dargestellt. Wichtig war hierbei, dass keine störenden Nebenprodukte durch unspezifische Bindung der Primer auftauchen. Die hier aufgetragenen Proben wurden jeweils gesammelt, um sie beim Screenen anstelle des Längenstandards einsetzen zu können.

3.1.7 Nachweis der homologen Rekombination über *Southern-Blot*

3.1.7.1 *Southern-Blot*-Strategie

Um während der Erzeugung der Knockout-Mauslinie das Integrationsereignis nachweisen zu können, sollte eine Sonde zur *Southern-Blot*-Analyse entwickelt werden.

Wichtig dabei ist, dass die verwendeten Schnittstellen und die Position der Sonde möglichst jede Form der Integration vom einfachen *Gen-Replacement* unterscheiden können. Idealerweise werden externe Sonden und Restriktionsschnittstellen eingesetzt.

In den meisten Fällen kann diese Bedingung jedoch nicht erfüllt werden. Es existieren selten Restriktionsschnittstellen, die im Vektor nicht schneiden bzw. gleichzeitig zu Fragmentgrößen führen, die im Gel auftrennbar sind.

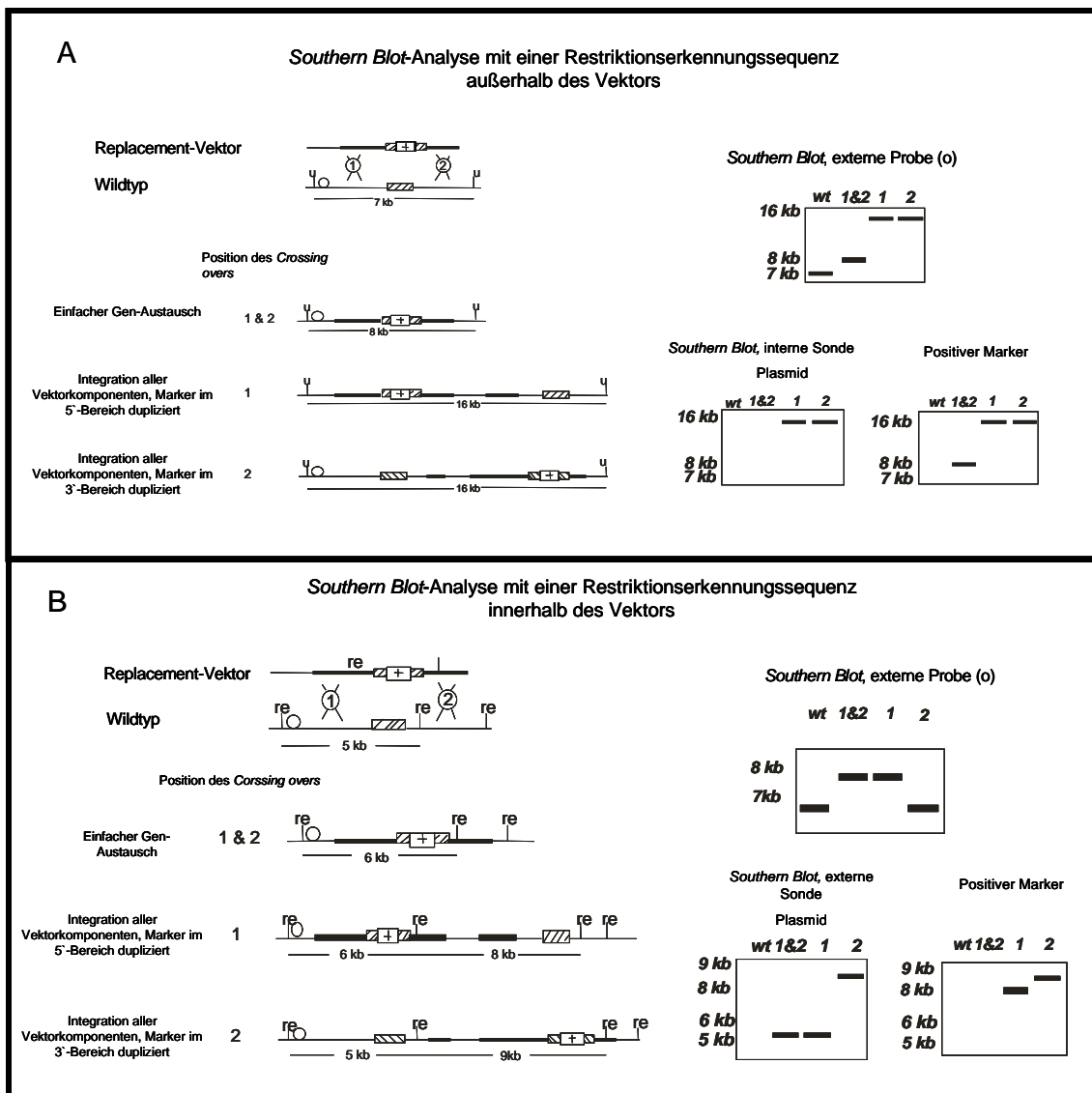


Abb. 3- 9: Southern-Blot-Analyse

Dargestellt sind unterschiedliche Typen eines Targeting-Ereignisses. *Southern-Blot*-Analysen ermöglichen die Unterscheidung eines einfachen Gen-Austausches gegenüber der Integration des gesamten Vektors in das Zielgen. Die Box mit dem Kreuz symbolisiert den positiven Selektionsmarker, während die gestrichelten Kästchen den zu deletierenden essentiellen Bereich darstellt. Der erste und der zweite Crossing Over-Bereich wird durch eine „X“

gekennzeichnet. Der Kreis definiert die Position der externen Sonde. Das Plasmid und der positive Selektionsmarker können als interne Sonden eingesetzt werden. Die Abbildungen auf der rechten Seite stellen Beispiele möglicher *Southern-Blots* dar. WT = Wildtyp, 1 und 2 sind einfache Gen-Austauschereignisse: 1 Integration des gesamten Vektors. Der positive Selektionsmarker ist im 5'-Bereich dupliziert worden. 2 Integration des gesamten Vektors. Der positive Selektionsmarker ist im 3'-Bereich dupliziert worden. **A** Zeigt die Analyse mittels *Southern-Blot* mit einem einzigen Restriktionsenzym „u“, die außerhalb des Vektors schneidet. **B** *Southern-Blot*-Analyse mit einem einzigen Restriktionsenzym „u“, welches innerhalb des Vektors schneidet. [nach Hasty *et al.*, 1999]

Wie aus Abbildung 3-9 hervorgeht, ist die Kombination von internen Schnittstellen und externen Sonden ebenfalls problematisch, da hier nur ein Arm des Targets nachweisbar ist. Die Integration des gesamten Vektors lässt sich dann von dem gewünschten Ereignis oder vom Wildtyp, je nach Art des stattgefundenen *Crossing over* nicht mehr unterscheiden. Ein weiteres Problem bei internen Restriktionsschnittstellen ist die Detektion von Zufalls-(*random*-)Integrationen. Dies führt immer dann besonders zu falsch negativen Ergebnissen, wenn sowohl der einfache Austausch am gewünschten Genort und zusätzlich eine separate *random*-Integration zusammen kommen. Mittels einer internen Sonde erscheint diese Kombination als Integration des gesamten Vektors in das Zielgen. Um diese Situation zu umgehen, sollten mehrere Restriktionsschnittstellen, am besten außerhalb des Vektors ausgewählt und überprüft werden.

Die idealen Bedingungen konnten auch bei dem pKOC30-Vektor des *Nicolin1*-Gens nicht eingehalten werden. Die murine Sequenz sowohl des *NICN1*- als auch des *AMT*-Gens, dessen Exons 1-4 ebenfalls im Vektor enthalten sind, enthalten mehrere repetitive Elemente. Erschwerend hinzukam, dass auch die meisten Restriktionsschnittstellen an idealen Stellen zu nicht auftrennbaren Fragmenten führten. In Frage kamen nur Enzyme, die schon während der genomischen Charakterisierung durch die ECL-Hybridisierung gefunden worden waren. Ausgewählt wurden die Enzyme *Xho* I und *Hind* III. Die Positionierung der Sonde erfolgte im 3'-Bereich des Konstruktes in das vierte Exons des *AMT*-Gens. Sie besitzen eine Größe von 695 bp und wurde mittels PCR auf dem P2-Klon erzeugt.

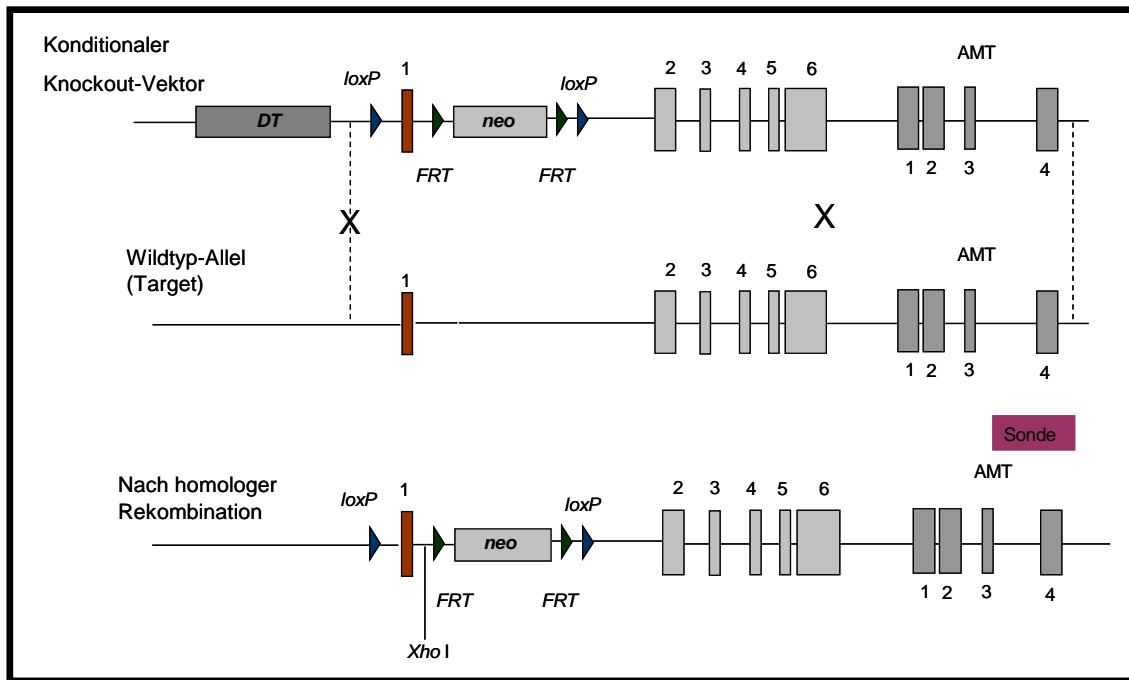


Abb. 3- 10: Positives Targeting-Ereignis

Die Abbildung zeigt das positive Targeting-Ereignis des konditionalen Vektors pKOC30 mit dem Nicotin1-Gen (*Target*). Die homologen Bereiche, zwischen denen die Rekombinationen stattfindet, sind durch „X“ gekennzeichnet. Das gewünschte Integrationsereignis kann dann durch die Sonde nachgewiesen werden.

3.1.7.2 Southern-Blot-Test und Verdünnungsreihe

Um die *Southern-Blot*-Analyse auch schon während der Durchmusterung der positiven ES-Zell-Klone einsetzen zu können, mussten Tests durchgeführt werden, mit der die Mindestmenge an detektierbarer DNA bestimmt werden. Eingesetzt wurde die für den Knockout verwendete ES-Zell-DNA der Zell-Linie E14. Diese DNA lag je einmal in Wasser, bzw. in TE gelöst vor. Jeweils 10 µg davon wurden mit *Hind* III und *Xho* I gespalten. Als Positiv-Kontrolle kam der Knockout-Vektor pKOC30 zum Einsatz, der ebenfalls mit beiden Enzymen behandelt wurde. Die Proben wurden teilweise verdünnt und zur besseren Übersicht auf zwei Gele verteilt. Der Transfer des Konzentrationsgradienten erfolgte mittels der *Nass-Blot*-Technik auf eine PVDF-Membran. Die Erzeugung des zweiten Blots fand durch Anwendung des *Trockenblot*-Verfahren statt. Nach Standard-Hybridisierung (Abschnitt 2.2.6) erfolgte die Exposition der Filme für 12 h. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildungen 3-11 und 3-12 dargestellt.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Sonde spezifisch ist und nicht an anderen Stellen im Genom bindet, da nur ein Signal pro Spur aufgetaucht ist. Im *Southern-Blot*, der die konzentrierten Proben enthält, sind neben der Positiv-Kontrolle nur noch zwei weitere Banden zu erkennen. Bei diesen handelt es sich um die mit *Hind* III und *Xho* I gespaltene ES-DNA, die im Lösungsmittel TE aufbewahrt wurde. Die in Wasser gelöste DNA scheint degradiert zu sein, da die Sonde nicht binden konnte. Abbildung 3-12 zeigt den Konzentrationsgradienten, der aus der Vektor-DNA aufgebaut ist. Mit dieser Reihe konnten die für den Nachweis minimale DNA-Menge von 60×10^{-10} g ermittelt werden.

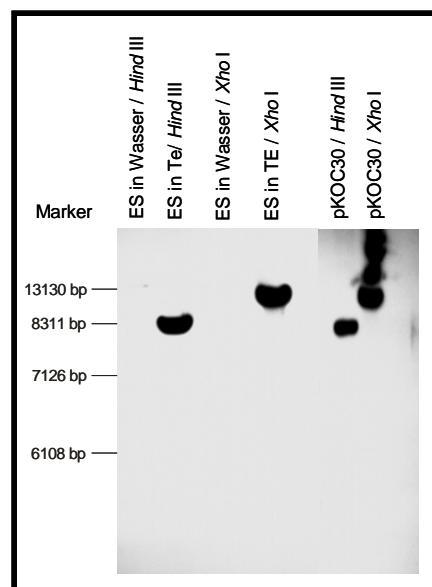


Abb. 3- 11: Souther- Blot

Dargestellt ist das Ergebnis des Trockenblots. Signale konnten nur bei der in TE gelösten ES-Zell-DNA und bei dem Konstrukt pKOC30 nachgewiesen werden. Die dabei erhaltenen Bandengrößen von 13130 bp (*Xho* I) und 8311 bp (*Hind* III) stimmen mit den vermuteten Größen überein. Das Vorhandensein von nur einem Signal pro Spur bestätigt die Spezifität der Sonde.

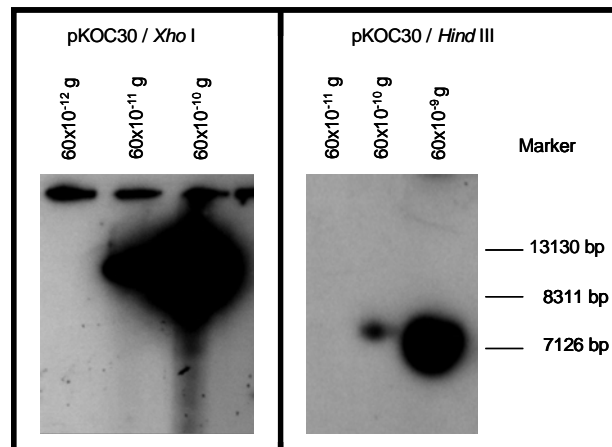


Abb. 3- 12: Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe wurde mit dem Konstrukt pKOC30 erstellt, der einmal mit dem Restriktionsenzym *Xho* I (links) und einmal mit *Hind* III (rechts) gespalten wurde. Aus dem erhaltenem Ergebnis lässt sich ableiten, dass zum Nachweis des betreffenden DNA-Abschnittes eine Mindestkonzentration von 60×10^{-10} g nötig ist.

3.1.8 Bestimmung der Geneticintoleranzdosis

Mit der Erstellung einer Sterbekurve wird die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G418) ermittelt. Diese variiert mit dem Zelltyp, der Aussaatdichte, dem proliferativen Status und dem verwendeten Medium. Zusätzlich erfordert der von Charge zu Charge differierende Gehalt an aktivem G418 bei einem Wechsel die Neubestimmung der Toleranzdosis. Ein solcher Vorversuch ermöglicht weiterhin, das morphologische Erscheinungsbild der Zellen näher zu studieren, um später während der Selektionsphase des Knockout-Experimentes den Zustand der Kultur genau beurteilen zu können. Gleichzeitig kann sowohl die Konzentration der Selektionsdroge, als auch der Zeitraum des aufzubauenden Selektionsdrucks ermittelt werden. Um eine solche Kurve zu erstellen, wurden untransfizierte ES-Zellen in einer Konzentration von 0.8×10^5 Zellen/well in eine 6-well-Platte auf *Feeder*-Zellen ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgten ein Mediumwechsel und die Zugabe unterschiedlicher G418-Konzentrationen. Die Beobachtung fand so lange statt, bis in einem *well* die Konfluenz auf fast 0% abgesunken war (nach 4 Tagen). Um die Bedingungen genauso konstant wie in der eigentlichen Selektion zu halten, wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. Aus dieser beobachteten Konfluenz konnte eine Sterbekurve

abgeleitet werden. Die Wirkung des Zellgiftes trat dabei schon nach wenigen Stunden ein und führte zu einem Abrunden der ES-Zellen, bis sich diese völlig von der Platte lösen. Die *Feeder*-Zellen hingegen gingen in eine lang gestreckte Form über, die von einer punktuellen Ablösung der Zell-Reste begleitet wurde. Unter Verwendung der vergleichsweise hohen G418-Konzentration von 400 µg/ml sank die Konfluenz in den ersten zwei Tagen auf ca. 50 %. Für genetisch veränderte ES-Zellen wäre dieser Selektionsdruck zu hoch, da die Zellen noch von der Transfektion geschwächt sind. Ein Verlust der gesamten Kultur wäre die Folge. Die relativ geringe Konzentration von 100 µg/ml Geneticin ist für die Selektion von ES-Zellen ebenfalls nicht geeignet. Die Zellen können weiterhin wachsen. Damit nimmt die Konfluenz zu und die Wirksamkeit der Droge ab. Der daraus resultierende geringe Selektionsdruck kann den vermehrten Abbau des Konstrukts in der Zelle zur Folge haben. Für die Selektion sollte deshalb eine Konzentration zwischen 200-350 µg/ml gewählt werden. Aus der Morphologie der Zellen lässt sich ableiten, dass ein hoher Selektionsdruck für wenige Tage möglich ist, die den verstärkten Einbau der Fremd-DNA begünstigt. Die anschließende Selektion bei 200 µg/ml sorgt für die Stabilität des Konstrukts im Genom und bewirkt gleichzeitig den gewünschten Effekt der Selektion.

3.1.9 Elektroporation und Selektion (Transfektionsversuche)

Für die Transfektion standen zwei Techniken zur Verfügung: bei dem ersten Gerät handelte es sich um den *Gene Pulser* der Firma *BioRad*, der eine freie Auswahl bei der Pulsstärke (kV), des Kondensatorwiderstands (µF) und des Elektroporationsmediums ermöglicht. Die für dieses Gerät angewendeten Protokolle stellen eine Kombination aus empfohlenen Protokollen der Firma *BioRad* und etablierten Erfahrungswerten dar. Diese wurden im Labor von Herrn Prof. Claus Pfeffer in München bei der Herstellung von Knockout-Mäusen gesammelt. Das weitgehend unbekannte, aber mit neuer Technik ausgestattete Modell der Firma *AMAXA* arbeitet mit definierten vorgegebenen Programmen. Diese liefern dem Benutzer keine Hinweise auf die verwendete Pulsstärke und den Widerstand (*black-box*-System). Auch die Inhaltsstoffe des im Lieferumfang enthaltenen Elektroporationsmedium sind unbekannt. Für diese Technik existierte zum Zeitpunkt der Transfektionen kein erprobtes Protokoll für die Elektroporation von ES-Zellen. Die von *AMAXA* vorgeschlagenen

Versuchsbedingungen waren stark an die Maßangaben für die schwer zu transfizierenden murinen embryonalen Fibroblasten (kurz MEFs) angelehnt. Lediglich das Transfektionsmedium war auf die Verwendung von ES-Zellen zugeschnitten. Da jeweils drei Programme und drei DNA-Konzentrationen für die Transfektion von ES-Zellen zur Verfügung standen, wurde zunächst eine Test-Elektroporation (siehe Versuch 4) durchgeführt. Daraus hervorgehend konnte die optimalste Kombination für die weitere Knockout-Erzeugung herangezogen werden.

Im Folgenden sind die einzelnen Elektroporationsversuche aufgelistet. Die für die einzelnen Transfektionen eingesetzten Bedingungen finden sich in den Tabellen der Versuchsabschnitte. Die jeweils verwendeten Konstrukte wurden mit dem Enzym *Not I* linearisiert und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und getrocknet. Vor jeder Transfektion erfolgte unter sterilen Bedingungen die Resuspendierung in dem geeigneten Elektroporationsmedium. Während die gelöste DNA für 2-5 min bei RT inkubierte, fand die Bereitstellung der Kulturschalen für die behandelten ES-Zellen statt: Das MEF-Medium der zwei Tage zuvor mit Mitomycin C behandelten *Feeder*-Zellen wurde durch LIF-haltiges Selektionsmedium (siehe Tabellen 3-2 bis 3-9) ersetzt und bis zur Ausplattierung der Küvetten-Inhalte im Inkubator vorgewärmt.

Versuch 1

Tab. 3- 2: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 1

Elektroporationssystem	<i>BioRad</i>
Zellkonzentration per EL	$5 \cdot 10^6$
DNA Konzenration per EL	20 μg und 40 μg
Konstrukt	pKOC30
Programm	250 μF , 340 kV
Elektroporationsmedium	Knockout Medium mit KO-Serum
Selektionsmedium	Knockout Medium mit KO-Serum
Selektionsdrogen-Konzentration	350 $\mu\text{g/ml}$ (ersten 4 Tage), konstant 200 $\mu\text{g/ml}$

Die erste Transfektion erfolgte mit dem *Gene Pulser* bei einer Kondensator-Kapazität von 250 μF und einer Pulsstärke von 340 kV. Jeweils $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit 20 oder 40 μg DNA in *Knockout*-Medium der Firma *Gibco* elektroporiert. Im Anschluss erfolgte die Aufteilung des Inhalts der insgesamt 6 Küvetten auf jeweils zwei mit *Feeder* und KO-Medium ausgestattete

Kulturschalen sowie die Inkubation unter Standardbedingungen. Nach 48 h fand ein Mediumwechsel und die Zugabe der Selektionsdroge Geneticin in einer Konzentration von 350 µg/ml statt. Dieser hohe Selektionsdruck wurde 4 Tage lang aufrechterhalten und anschließend auf eine Konzentration von 200 µg/ml bis zum Ende der Selektion herabgesetzt. Um die effektive Dosis des G418 konstant zu halten, erfolgte jeden zweiten Tag ein Wechsel des geneticinhaltigen Mediums.

Schon wenige Stunden nach der Elektroporation setzte sich der überwiegende Teil der ES-Zellen ab. Das morphologische Erscheinungsbild wies zu dem Zeitpunkt noch keine Besonderheiten auf. Kurze Zeit nach der Zuführung des G418-haltigen Mediums, kam es zum abnormalen Absterben der *Feeder*-Zellen. Diese lösten sich nicht, wie erwartet, punktuell von der Platte, sondern schwammen als zusammenhängender Film im Medium. Dadurch kam es zur Ablösung der ES-Zellen, von denen sich nur wenige konnten sich am Schalen-Boden erneut festsetzen konnten. Ein großes Problem stellte mit zunehmender Selektion der Mediumwechsel dar. Durch das Absaugen der Flüssigkeit wurden weitere Teile des Films teilweise mit entfernt oder rissen angeheftete ES-Klone vom Boden. Nach 14 Tagen Selektion konnten nur wenige stabile Kolonien nachgewiesen werden. Diese waren sehr klein und zeigten kein erkennbares Wachstum mehr. Als nach einer weiteren Woche das Gesamtbild der Kultur unverändert blieb und keine pickbaren Kolonien entdeckt werden, musste der Versuch abgebrochen werden.

Versuch 2

Tab. 3- 3: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 2

Elektroporationssystem	<i>BioRad</i>
Zellkonzentration per EL	$5 \cdot 10^6$
DNA Konzenration per EL	20 µg und 40 µg
Konstrukt	pKOC30
Programm	500 µF, 280 kV
Elektroporationsmedium	PBS
Selektionsmedium	Knockout Medium mit KO-Serum
Selektionsdrogen-Konzentration	350 µg/ml (ersten 4 Tage), konstant 200 µg/ml

Der zweite Transfektionsversuch wurde nur einige Tage nach dem ersten durchgeführt und ähnelt diesem in vielen Punkten. Der einzige Unterschied finden sich im Elektroporationsmedium, welches durch PBS ausgetauscht

wurde. Durch die nun veränderte Dichte und Salzzusammensetzung der Lösung herrschte ein anderer Widerstand in der Küvette. Um den verursachten Puls äquivalent zum ersten Versuch zu halten, wurden die Kondensator-Kapazität auf 500 μF herauf- und die Stärke des Pulses auf 280 kV herabgesetzt. Die Selektion erfolgte abermals in *Knockout*-Medium der Firma *Gibco*. Ähnlich wie bei der ersten Elektroporation wurde der Inhalt der 6 Küvetten auf jeweils 2 vorbereitete Platten verteilt und unter Standardbedingungen kultiviert. Während der Pulsgabe kam es zur Verklumpung der PBS-Lösung, was sich negativ auf das Absetzen und die Morphologie auswirkte. Die Selektion begann genau wie im ersten Versuch 48 h später mit einer Konzentration von 350 $\mu\text{g/ml}$ und wurde nach 4 Tagen auf 200 $\mu\text{g/ml}$ herabgesetzt. Am 5. Tag nach der Transfektion erfolgte der Abbruch dieses Versuches: Die *Feeder*-Zellen hatte sich abermals in einem Film von der Platte gelöst und rissen diesmal alle angehefteten ES-Zellen mit sich. Der nun in einem Stück umherschwimmende Zellteppich verhindert das Absetzen der Stammzellen und führte so zu ihrem Absterben.

Versuch 3

Tab. 3- 4: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 3

Elektroporationssystem	<i>BioRad</i>
Zellkonzentration per EL	$5 \cdot 10^6$
DNA Konzentration per EL	20 μg und 40 μg
Konstrukt	pKOC30
Programm	250 μF , 340 kV
Elektroporationsmedium	DMEM mit HighClone Serum
Selektionsmedium	DMEM mit HighClone Serum
Selektionsdrogen-Konzentration	350 $\mu\text{g/ml}$ (ersten 4 Tage), konstant 200 $\mu\text{g/ml}$

Da das Scheitern der ersten beiden Versuche eindeutig auf das während der Elektroporation und Selektion verwendete Medium zurückzuführen war, wurde ein erneuter Versuch mit herkömmlichen DMEM (*low Glucose*, *Gibco*) und *HighClone*-Serum (kurz ES-Medium) durchgeführt. Die dafür verwendeten Versuchsbedingungen sind aus der ersten Transfektion übernommen worden (siehe Tabelle 3-1).

Obwohl die Stammzellen nach der Elektroporation ein äußerst schlechtes morphologisches Erscheinungsbild aufwiesen, konnten sich 60% erfolgreich absetzen. Während der Selektion kam es dann wie erwartet, zu einem

punktuellen Ablösen der *Feeder*-Zellen. Dies führte zu einem ungehinderten Anheften der ES-Zellen am Schalenboden. Dennoch wurden 14 Tage später nur sehr kleine Kolonien sichtbar, die kein erkennbares Wachstum aufwiesen. Auch dieser Versuch musste aufgrund des unveränderten Gesamtbildes der Kultur nach einer weiteren Woche abgebrochen werden.

Versuch 4

Tab. 3- 5: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 4

Elektroporationssystem	AMAXA
Zellkonzentration per EL	$2 \cdot 10^6$
DNA Konzenration per EL	5, 10 und 20 μg
Konstrukt	pEGFP-Ci
Programm	A23, A24 und A30
Elektroporationsmedium	AMAXA Nucleofection-Solution for ES-Cells
Selektionsmedium	DMEM mit HighClone Serum
Selektionsdrogen-Konzentration	350 $\mu\text{g/ml}$ 14 Tage lang

Die ergebnislosen Versuche, stabile ES-Zell-Kolonien zu erzeugen führten zu der Überlegung, das Elektroporationssystem der Firma AMAXA einzusetzen. Von diesem Gerät war bekannt, dass es schonender elektroporierte. Schwer zugängliche Zellen wie murine embryonale Fibroblasten konnten mittels dieser Technik erfolgreich transfiziert werden. Da zu diesem Zeitpunkt keine Studien über die Elektroporation von ES-Zellen mit diesem Gerät bekannt waren, erfolgten zunächst eine Test-Transfektionen. Diese unterschied sich in den Programmen und in der Verwendung unterschiedlicher DNA-Konzentrationen. Um das Ergebnis dokumentieren und beurteilen zu können, erfolgte die Transfektion mit dem GFP-exprimierenden Vektor pEGFP-C1 (Daten siehe Anhang), der zuvor über eine *Eco* RI-Schnittstelle linearisiert worden war. Die durch den Puls ausgelöste sofortige Einschleusung der DNA in den Zellkern sollte zu einer GFP Expression schon wenige Stunden nach der Elektroporation führen. Damit konnte der Zustand der Zellen durch Messung der Fluoreszenzintensität dokumentiert werden.

Wichtige Voraussetzung für die Transfektion mit der AMAXA-Technik ist das möglichst vollständige Entfernen der *Feeder*-Zellen vor der Elektroporation. Dies erreicht man durch partielles Absetzen. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und auf unbehandelte Schalen ausplattiert. Nach ca. zwei Stunden hatten sich fast alle Fibroblasten abgesetzt, während die ES-Zellen im Medium

schwammen. Die Stammzellen konnten nun durch Absaugen der Lösung isoliert und durch Zentrifugation pelletiert werden. Es folgte die Aufnahme in eine geeigneten Menge Elektroporationsmediums (*Nucleofection-Solution for ES-Cells*). Die pelletierte und getrocknete DNA wurde ebenfalls in der Nucleofection-Lösung gelöst und für einige Minuten bei RT inkubiert. Jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit 5, 10 oder 20 μg gelöstem pEGFP-C1-Vektor vermischt, in die Küvette überführt und den Programmen A23, A24 oder A30 ausgesetzt. Anschließend erfolgten die schnelle Entfernung der Zellen aus der Küvette mittels spezieller Pipetten und der sofortige Transfer in vorgewärmtes ES-Medium. Dieses wurde danach auf *Feeder*-haltige Schalen überführt. Die Inkubation erfolgte dann unter Standardbedingungen. Insgesamt wurden neun Elektroporationen durchgeführt.

Die ES-Zellen zeigten nach der Transfektion ein gutes morphologisches Erscheinungsbild und schienen von der durchgeführten Behandlung kaum beeinträchtigt worden zu sein. Bereits vier Stunden nach der Elektroporation wiesen die Schalen mit den Programmen A23/10 μg und A30/10 μg schon fluoreszierende Stammzellen auf. Nach zwei Stunden konnten auf allen Schalen eine GFP-Expression nachgewiesen werden. Am deutlichsten und intensivsten war die Produktion bei den Zellen, die mit dem Programm A23 und A30 (10 μg DNA) transfiziert worden waren. Weitere vier Stunden später erfolgte der Wechsel in 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418-haltiges Medium. Diese hohe Konzentration entstammte der Empfehlung der Firma AMAXA und wurde bis zum Ende der Selektion konstant aufrechterhalten. Nach zwei Wochen hatten sich auf allen Platten isolierbare ES-Zellhaufen gebildet, die besonders bei der Verwendung der Programme A23 und A30 (10 μg DNA) eine Anzahl von 60-80 Kolonien umfassten.

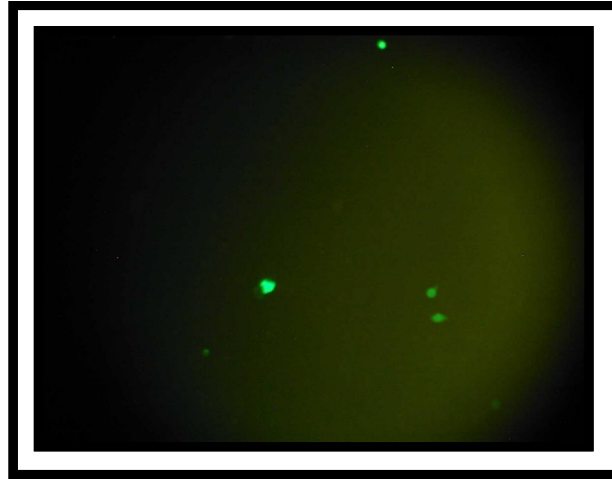


Abb. 3- 13: Fluoreszierende ES-Zellen

Die Abbildung zeigt die mit dem GFP-Konstrukt transfizierten ES-Zellen. Schon nach ca. vier Stunden konnte die Expression des GFP-Proteins unter Verwendung der Programme A23 und A30 mit dem AMAXA-Nucleofector beobachtet werden.

Versuch 5

Tab. 3- 6: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 5

Elektroporationssystem	<i>AMAXA</i>	<i>BioRad</i>
Zellkonzentration per EL	$2 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
DNA Konzentration per EL	10 μg	20 μg
Konstrukt	pKOC30	pKOC30
Programm	A23	250 μf , 340 kV
Elektroporationsmedium	AMAXA Nucleofection-Solution for ES-Cells	DMEM mit HighClone Serum
Selektionsmedium	DMEM mit HighClone Serum	DMEM mit HighClone Serum
Selektionsdrogen-Konzentration	350 $\mu\text{g/ml}$ (ersten 4 Tage), konstant 200 $\mu\text{g/ml}$	350 $\mu\text{g/ml}$ (ersten 4 Tage), konstant 200 $\mu\text{g/ml}$

Die erfolgreiche Durchführung der Testtransfektion sollte nun auf das Knockout-Konstrukt pKOC30 übertragen werden. Zusätzlich wurde ein direkter Vergleich zwischen der *AMAXA*-Technik und dem *Gene Pulser*-System der Firma *BioRad* angestrebt, um für spätere Knockout-Versuche ein effizientes System zur Verfügung zu stellen. In Tabelle 3-6 sind die Bedingungen für die Elektroporationen zusammengefasst. Es wurden insgesamt 5 Transfektionen pro Methode durchgeführt und jeweils der Inhalt einer Küvette auf zwei Schalen aufgeteilt.

Schon kurze Zeit nach der erfolgten Transfektion waren bereits deutliche Unterschiede sichtbar: Die mit den *Gene Pulser* behandelten Zellen sahen wesentlich mitgenommener aus und brauchten mehr als zwei Stunden zum Absetzen. Die mit der *AMAXA*-Technik elektroporierten Stammzellen wiesen hingegen eine erwartete Morphologie auf und hatten sich innerhalb einer Stunde an die *Feeder*-Zellen angeheftet. Einen Tag später konnte hier sogar ein deutliches Zellwachstum festgestellt werden. Während der frühen Selektionsphase sprachen die *BioRad*-behandelten Zellen wesentlich stärker auf das Geneticin an, ein vermehrtes Absterben war zu beobachten. Während der weiteren Selektionsphase kam es vereinzelt zur Ausbildung kleiner Zellanhäufungen. Es zeigt sich jedoch, dass diese weder ein Wachstum aufwiesen, noch überlebensfähig waren. Der Versuch wurde deshalb nach ca. neun Tagen abgebrochen.

Versuch 6

Tab. 3- 7: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 6

Elektroporationssystem	<i>AMAXA</i>
Zellkonzentration per EL	$2 \cdot 10^6$
DNA Konzenration per EL	10 µg
Konstrukt	pKOC30, pEGFP-Ci. Tyk
Programm	A23
Elektroporationsmedium	<i>AMAXA</i> Nucleofection-Solution for MEFs-Cells
Selektionsmedium	DMEM mit HighClone Serum
Selektionsdrogen-Konzentration	500 µg/ml 14 Tage lang

Aus den Ergebnissen von Versuch 5 konnte geschlossen werden, dass das verwendete Medium allein nicht für den Zelltod verantwortlich gemacht werden konnte. Es drängte sich die Vermutung auf, dass ein Defekt im Resistenzgen *neo* das rasche Absterben hervorrief. Da ES-Zellen äußerst empfindlich auf Gendefekte reagieren, wurde eine Transfektion mit murinen embryonalen Fibroblasten durchgeführt. Um eine mögliche Fehlkonstruktion des gesamten Vektors auszuschließen, kam neben den pKOC30 und dem pEGFP-C1 Vektoren, das konditionale Tyk-Knockout-Konstrukt (Vektordaten siehe Anhang) zum Einsatz. Dieser mit dem Restriktionsenzym *Not I* linearisierte Vektor wurde freundlicherweise von Frau Dr. Marina Karaghiosoff zur Verfügung gestellt. Er hatte bereits zu einer Knockout-Maus geführt und sollte nun als Positiv-Kontrolle eingesetzt werden.

Es lag keine zuverlässigen Versuchsvorschriften zur Transfektion von MEFs für den *Gene Pulser* von BioRad vor. Aus diesem Grund wurde das bereits etablierte und mehrfach angewandte Protokoll für den Nucleofector verwendet. In Tabelle 3-7 sind die Bedingungen der Transfektion aufgelistet. Es wurden pro Konstrukt zwei Elektroporationen durchgeführt, die jeweils auf 2 Schalen verteilt wurden.

Während sich die mit dem pEGFP-C1-Konstrukt transfizierten Zellen genauso wie in Versuch 4 verhielten, konnten deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Knockout-Konstrukten festgestellt werden. Während der frühen Selektionsphase (Tag 2-4) konnten zehnmal mehr Kolonien bei dem Tyk-Konstrukt gezählt werden, als bei dem Vektor pKOC30. Nach weiteren 5 Tagen verschlechterte sich der Zustand dieser Zellen. Diese wirkten zunehmend schmaler und bildeten zudem keinen Verband mehr aus. Viele Zellen hatten sich abgelöst und die Kolonien waren deutlich kleiner als bei dem Tyk-Konstrukt. Das Absterben nahm in den folgenden Tagen soweit zu, dass mit dem totalen Verlust dieser Transfektion gerechnet werden musste. Überraschender Weise erholten sich die mit dem pKOC30-Konstrukt transfizierten Fibroblasten jedoch wieder und nach 14 Tagen waren ca. 80 Kolonien deutlich erkennbar. Sie kamen aber bei weitem nicht an die Größe und Dichte der Tyk und pEGFP-C1 transfizierten Kolonien heran, die aufgrund ihrer großen Anzahl (ca. 300 Kolonien pro Platte) schon zu einem dichten Zellrasen zusammengewachsen waren.

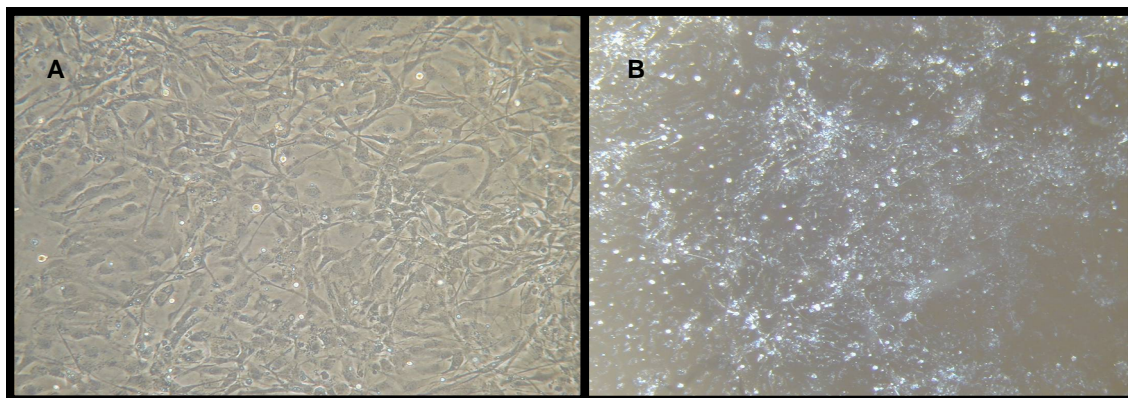


Abb. 3- 14: MEF-Kolonie nach 14 Tagen Selektion im Phasenkontrast

Die Abbildungen **A** und **B** zeigen dieselbe Kolonie einmal durchs Lichtmikroskop betrachtet (links) und ein zweites Mal im Phasenkontrast (rechts). Die Kolonie war aufgrund ihrer Größe

bereits mit anderen Zellansammlungen verwachsen, so dass eine klare Trennung nicht mehr möglich gewesen ist. Während im Lichtmikroskop der gute morphologische Zustand der Zellen betrachtet werden konnte, bot die Phasenkontrast-Betrachtung die Möglichkeit, die Zelldichte der Kolonie zu besichtigen.

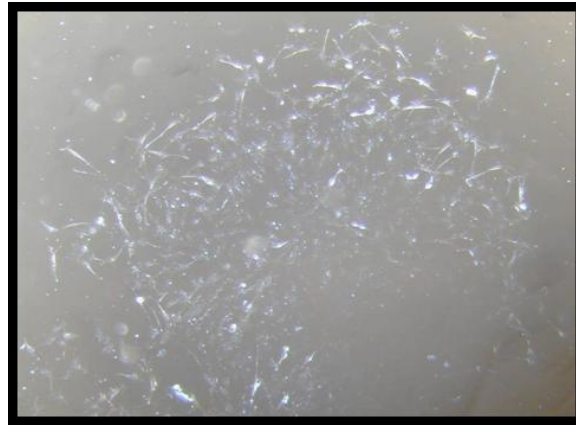


Abb. 3- 15: pKOC30 transfizierte MEF Kolonie

Diese mit dem Vektor pKOC30 transfizierte und für 14 Tage mit dem Wirkstoff Geneticin selektierte MEF-Kolonie konnte nur im Phasenkontrast als solche auffindig gemacht werden. Deutlich zu erkennen ist der sehr lockere Verband der Zellen, der unter dem Lichtmikroskop als ungeordnete Zellanhäufung sichtbar ist. Die Zellen weisen eine längliche Struktur auf, die auf den schlechten physiologischen Zustand hinweist. Auch die Größe der Kolonie und ihre runde Form sind nur ansatzweise zu erkennen.

Versuch 7

Tab. 3- 8: Übersicht über die Elektroporationsbedingungen für Versuch 7

Elektroporationssystem	BioRad	AMAXA
Zellkonzentration per EL	5*10 ⁶ und 10*10 ⁶	2*10 ⁶
DNA Konzentration per EL	20 und 40 µg	10 µg
Konstrukt	pKOC30, Tyk, pNTK4, pEGFP-CI	pKOC30, Tyk, pNTK4, pEGFP-CI
Programm	250 µf, 340 kV	A23
Elektroporationsmedium	DMEM mit HighClone Serum	AMAXA Nucleofection-Solution for ES-Cells
Selektionsmedium	DMEM mit HighClone Serum	DMEM mit HighClone Serum
Selektionsdrogen-Konzentration	200 µg/ml durchgehend	200 µg/ml durchgehend

In einem letzten Transfektionsversuch sollten die beiden Elektroporationstechniken noch einmal gegenübergestellt werden. Neben den drei Vektoren, die schon in Versuch 6 verwendet wurden, sollte nun der zweite Knockout-Vektor für das *Nicolin1*-Gens, das pNTK4 Konstrukt, zum Einsatz kommen. Es lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise das Diphtherie-

Toxin an dem vermehrten Zelltod beteiligt sein könnte. Gleichzeitig wurde die Konzentration der Selektionsdroge während der gesamten selektiven Phase auf 200 µg/ml herabgesetzt. Insgesamt wurden 11 Elektroporationen durchgeführt, die jeweils auf eine Schale ausplattiert worden sind. Das pEGFP-C1 Konstrukt wurde als Kontrolle nur beim *Gene Pulser* eingesetzt. In Tabelle 3-8 sind die Bedingungen der einzelnen Transfektionen zusammengefasst.

Nach erfolgreicher Transfektion konnten im direkten Vergleich Unterschiede in der Zellmorphologie nachgewiesen werden: Die AMAXA-elektroporierten Zellen wiesen keinerlei Zeichen einer Behandlung auf und setzten sich zu 70 % bereits innerhalb einer halben Stunde ab. Einen Tag später konnte sogar ein verstärktes Zellwachstum nachgewiesen werden. Die Zellen der *BioRad*-Elektroporation sahen, unabhängig vom transfizierten Konstrukt, sehr mitgenommen aus und bildeten eine kugelartige Form aus. Sie benötigten mehrere Stunden, um sich in einer Dichte von ca. 50-60% anzuheften. Während der Selektion traten entscheidende Veränderungen auf: innerhalb von sieben Tagen kam es zum fast vollständigen Zelltod aller *BioRad*-elektroporierten Zellen. Zwar lösten sich die *Feeder*-Zellen punktuell ab, dennoch konnten keine der äußerst kleinen ES-Zell-Kolonien am Schalenboden haften bleiben. Aufgrund des „fetzenartigen“ Ablösens der Zellen aus dem Verband wurden die Kolonien instabil. Die erneute Zugabe von frischen *Feeder*-Zellen konnte das Gesamtbild nicht mehr verändern. Es wurde eine maximale Anzahl von nur 9-17 Kolonien ausfindig gemacht, die aufgrund ihrer sehr geringen Größe und Morphologie (abgerundete kugelartige Zellen) nicht überlebensfähig waren.

Der Zustand der AMAXA-transfizierten Zellen verschlechterte sich kurze Zeit nach dem Beginn der Selektion drastisch: die Zellen wurden runder und schienen sich immer mehr abzulösen. Durch die Zugabe frischer *Feeder*-Zellen konnte das morphologische Erscheinungsbild der Zellen nur bedingt korrigiert werden: die Stammzellen, die das Tyk-Konstrukt integriert hatten, zeigten ein gutes Wachstum. Innerhalb von 14 Tagen wuchsen pickbare Kolonien heran, die aufgrund ihrer großen Anzahl von mehr als 300 Stück ineinander zu wachsen drohten. Die pKOC30-transfizierten Zellen konnten sich nur geringfügig nach der Zugabe von frischen *Feeder*-Zellen erholen. Die Zellen wurden kugelförmiger und der Zellverband immer lockerer. Nur 17 Kolonien

konnten nach 14-tägiger Selektion auffindig gemacht werden. Aufgrund ihrer sehr geringen Größe, die ca. einem Hundertstel einer Tyk-Kolonie entsprach, und der immer stärker werdenden Abrundung der Zellen waren diese nicht überlebensfähig. Ebenfalls nicht lebensfähig waren die ca. 80 äußerst kleinen Kolonien des pNTK4-Konstruktes. Ihre morphologische Struktur wirkte bei weitem nicht so zerrissen wie bei den pKOC30-transfizierten Zellen, dennoch konnte auch hier eine Ablösung des gesamten Zellverbandes ab einer bestimmten Koloniegröße beobachtet werden.

Aufgrund der in allen Transfektionen erhaltenen negativen Ergebnisse, sowohl mit dem pKOC30-, als auch mit dem pNTK4-Konstrukt, wurde von weiteren Versuchen abgesehen.

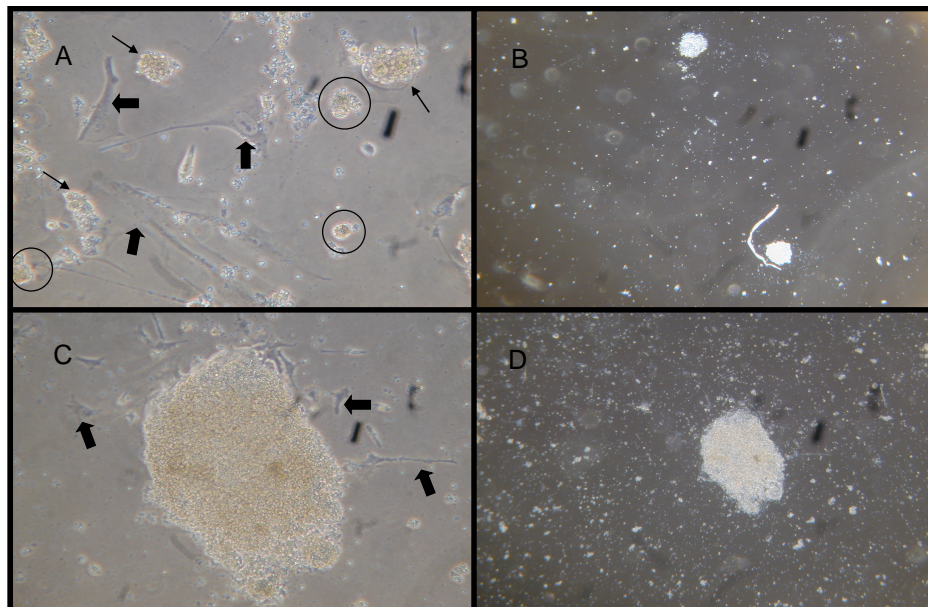


Abb. 3- 16: pKOC30-Kolonien und Tyk-Kolonie nach 12 Tagen Selektion

In der Abbildungen **A** sind ES-Zell-Kolonien (siehe Pfeil) dargestellt, die mit dem Knockout-Konstrukt pKOC30 mittels des AMAXA-Elektroporations-Systems transfiziert und 12 Tage lang mit der Selektionsdroge Geneticin in einer Konzentration von 200 µg/ml behandelt worden sind. Diese Zellhaufen sind um ca. ein Hundertstel kleiner als die dargestellt Tyk-Kolonie. Die kugelartige Form und der leuchtend erscheinende Rand dieser Ansammlung von Zellen, weist deutlich auf den schlechten physiologischen Zustand hin. Einige der Kolonien (siehe Kreise) haben sich bereits abgelöst und schwimmen im Medium. Die Blockpfeile weisen auf die frisch hinzugefügten Feeder-Zellen hin. Ihre breite und abgeflachte Form ist ein Zeichen für die erst vor kurzem durchgeführte Mitomycin-C-Behandlung. Abbildung **C** und **D** zeigen eine ES-Zell-Kolonie, die mit dem Tyk-Knockout-Konstrukt (Positiv-Kontrolle) mittels des AMAXA-Elektroporations-Systems transfiziert und 12 Tage lang mit einer Geneticin-Konzentration von 200 µg/ml selektiert worden ist. Dieser Zellhaufen weist die typische ovale Form auf und ist als

Stecknadelkopf großer weißer Punkt mit bloßem Auge auf dem Kulturschalenboden zu erkennen. Die Zellen sind in einem sehr guten biologischen Zustand, da die Kolonie von einem leuchtenden Rand umgeben ist. Um die Kolonie herum sind deutlich erkennbar Zelltrümmer der durch die Selektion abgestorbenen *Feeder*-Zellen zu erkennen (siehe Pfeile)

3.1.10 Zusammenfassung der Ergebnisse der Transfektionsversuche

Die 7 Transfektionsversuche haben folgendes gezeigt:

1. Die Einführung des konditionalen *Nicolin1*-Knockout-Konstruktes in ES-Zellen führt während der Selektion zum Zelltod.

Dabei kam es zunächst zu einer veränderten Morphologie, die sich in Form von abgerundeten Zellen äußerte. Auf dieses Erscheinungsbild folgte ein stark eingeschränktes Wachstum. Unter mildem Selektionsdruck (200 mg/ml, durchgehend) konnten sehr kleine Kolonien bestehend aus ca. 100 Zellen entdeckt werden, deren Vitalität mit zunehmender Größe (ca. 500 Zellen) immer stärker abnahm. Dies führte zum Ablösen des Zellverbandes vom Schalenboden, was trotz Zugabe von frischen *Feeder*-Zellen nicht verhindert werden konnte. In der Anfangsphase (Tag1-4) der Selektion kam es zu einem erhöhten Einsatz der Geneticin-Konzentration (350 µg/ml), die im weiteren Verlauf auf 200 mg/ml heruntersetzt wurde. Dabei konnte weder ein Wachstum noch eine damit verbundene Zellteilung festgestellt werden.

2. Der Vorgang der homologen Rekombination bzw. der Einbau des konditional veränderten genetischen Materials ins Genom von embryonalen Fibroblasten führt zu einer massiven Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen.

Im Vergleich zu einem Kontrollkonstrukt (Tyk) (siehe Anhang), kam es während der ersten Selektionstage trotz gleich bleibend niedriger Selektionsdrogen-Konzentration (350 µg/ml) für diesen Zelltyp zu erheblichen Wachstumseinschränkungen (Versuch 6). Die Fibroblasten gingen in eine lang gestreckte Form über. Die Dichte des Zellverbandes nahm rapide ab. Erst einige Tage später (10.-12. Tag der Selektion) konnte ein erneutes Wachstum verzeichnet werden, das am Ende der

Selektion zu kleinen, jedoch pickbaren Kolonien führte Diese setzten sich aus einem „lockeren“ Zellverband zusammen (siehe Abbildung 3-14).

3. Die Kolonienanzahl variiert mit der verwendeten Elektroporationstechnik.

Im Gegensatz zur der *BioRad*-Elektroporation, bei der die Zellen schon im Einzel-Zellstadium verstarben, waren Kolonien nur durch die AMAXA-Transfektion entstanden (Versuch7).

4. Die Kolonienanzahl variiert mit dem verwendeten Konstrukten.

Bei beiden Konstrukten für das *Nicolin1*-Gens waren Kolonien in gleicher Größe und morphologischer Gestalt zu erkennen, lediglich die Anzahl war unterschiedlich. Sie belief sich bei dem pNTK4-Konstrukt auf 80 und beim pKOC30-Konstrukt auf nur 17 Kolonien (Versuch 7)

3.2 Herstellung neuer Konstrukte

Um feststellen zu können, welche Gründe die Erzeugung einer *Nicolin1*-Knockout-Maus verhindert haben, sollten neue Konstrukte entwickelt werden. Dabei handelt es sich um vier cDNA-Konstrukte und drei neue Knockout-Vektoren.

3.2.1 Strategie zur Herstellung der Knockout-Vektoren

Die aus den Transfektionsversuchen erhaltenen Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass der dort immer wieder aufgetretene Zelltod auf die Konstruktion der beiden Vektoren zurückzuführen ist.

Es galt nun, die Beobachtungen der ersten Elektroporationsversuche (siehe Abschnitt 3.1.10) in die Konstruktion der neuen Vektoren einfließen zu lassen:

1. Alle neuen Knockout-Vektoren sollten nur noch mit dem Thymidin-Kinase-Gen als negativen Selektionsmarker ausgestattet werden, da der pNTK4 Vektor fünfmal mehr Kolonien bildete, als das pKOC30-Konstrukt.
2. Die Transkriptionsrichtung des *neo*-Gens soll in Anlehnung an das Tyk-Konstrukt, welches bereits erfolgreich zu einer Knockout-Maus geführt hat, in entgegen gesetzter Richtung zur Leserichtung des Knockouts laufen.

3. Die weitere Überlegung sah die Erzeugung eines konstitutiven Knockout-Vektors vor. Dieser Vektor (siehe Abbildung 3-16) bewirkt die vollständige Deletion des ersten Exons nach erfolgreicher homologer Rekombination und Anreicherung der positiven Zellen. Gleichzeitig zeigt er aber auch, ob eine homologe Rekombination möglich oder aber der Genort aufgrund struktureller Bedingungen schwer zugänglich ist. Seine Erzeugung beruht auf dem Grundgerüst des Vektors pKO+NeoR (Klon3) von Dr. Karagaioshoff, bei dem es sich um eine Zwischenstufe des Typ-Konstruktes handelt (Daten siehe Anhang). Für die Generierung des Vektors sollten neue homologe Bereiche entstehen: Der kurze homologe Arm wird durch Enzym-getaggtter Primer erzeugt, die ein 1081 bp großes Fragment auf dem P2-Klon in 5`-Richtung vor dem ersten Exon amplifizieren. Der lange homologe Arm wird durch Spaltung des P2-Klons mit den Enzymen *Bsa* BI und *Sal* I erzeugt. Das daraus resultierende 6100 bp große Fragment würde nur Teile des 6. Exons des *Nicotin1*-Gens und einige *AMT*-Bereiche enthalten.
 4. Ebenfalls angestrebt wurde die Generierung eines *Replacement*-Vektors mit konditionalen Elementen. Dieser sollte auf den konstitutiven Vektor aufbauen und unterscheidet sich von diesem nur in der gefloxten *neo*-Kassette. Damit wäre sichergestellt, dass die *neo*-Kassette keine negativen Einflüsse auf die Physiologie der Zelle nach erfolgreicher Selektion ausüben könnte (Abschnitt 1.3). Für die Erzeugung des Vektors sollte die *neo*-Kassette des konstitutiven Konstruktes mittels der Enzyme *Sac* II und *Xho* I entfernt werden. Diese wird durch das gefloxt Marker-Gen aus dem Vektor pKS loxpNTK, das mit denselben Enzymen erzeugt werden sollte, ersetzt. Die Änderung der Transkriptionsrichtung ergibt sich aus der umgekehrten Orientierung der verwendeten Enzyme.
- Beide Vektoren haben die sofortigen Deletion des ersten Exons und somit den Knockout des Gens zur Folge. Dadurch bieten beide die Möglichkeit, die damit verbundenen phänotypischen Veränderungen anhand der physiologischen Veränderungen der Zelle zu untersuchen, vorausgesetzt, die Deletion wirkt nicht letal.

5. Eine weitere Überlegung sah die Erzeugung eines konditionalen Vektors vor, der auf der Grundlage des pNTK4 Vektors konstruiert werden sollte. Dieser zeichnet sich durch ein gefloxtes erstes Exon und ebenfalls gefloxtes *neo*-Kassette aus. Folglich sind keine Flp-Rekombinase-Elemente enthalten. Dafür werden, wie in der Abbildung 3-15 zu sehen ist, nur noch drei *loxP*-Sequenzen benötigt. Die dafür eingefügte *neo*-Kassette kommt aus demselben Vektor wie bei dem *Replacement*-Konstrukt. Die Isolation erfolgt hier über die *Bam* HI und die *Xho* I-Schnittstelle.

3.2.2 Generierung der neuen Knockout-Vektoren

Für die Herstellung des konstitutiven Vektors wurde zunächst der kurze homologe Arm erzeugt. Es folgte die Spaltung mit den Enzymen *Kpn* I und *Xho* I und die Klonierung in den Vektor pKO+NeoR. Das Spaltprodukt von P2 wurde über die Enzyme *Bsa* BI und *Sal* I in die vorbereitete Zwischenstufe kloniert. Deren Spaltung fand zunächst mit dem Enzym *Hind* III statt. Dessen überhängenden Enden (*sticky ends*) wurden zu stumpfen Enden (*blunt ends*) aufgefüllt, bevor eine weitere Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Sal* I erfolgte. Die beiden Fragmente wurden kloniert und anschließend durch eine Kontrollspaltung überprüft.

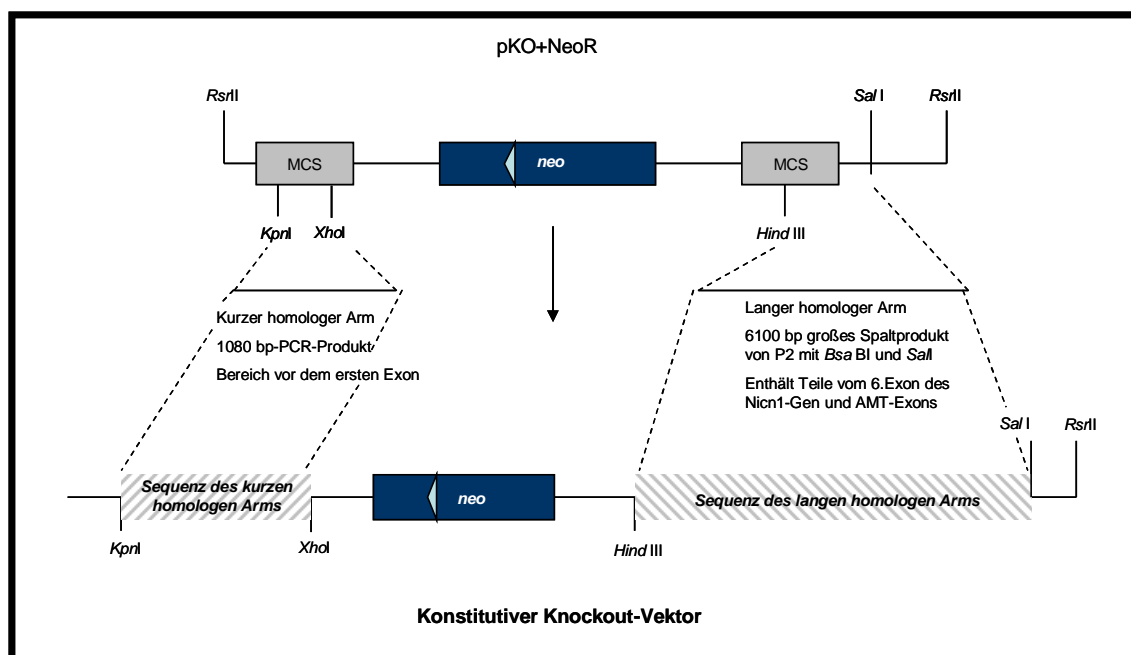


Abb. 3-17: Klonierungs-Strategie des konstitutiven Konstrukts

In der Abbildung ist das Klonierungsschema des konstitutiven Knockout-Vektors dargestellt. Ausgangsplasmid ist der Vektor pKO+NeoR. Dieser besitzt eine neo-Kassette, die in entgegengesetzter Richtung zur eigentlichen Leserichtung des Vektors gerichtet ist. Die Einführung des kurzen homologen Armes erfolgte über die Amplifizierung eines 1080 bp großen Fragments auf dem P2-Klon. Durch die an die Primer angehängten Erkennungssequenzen, konnte das Amplifikat nach Spaltung mit *Kpn* I und *Xho* I in den Vektor kloniert werden. Der lange homologe Arm wird über die Spaltung des P2-Klons mit *Bsa* BI und *Sal* I erzeugt. Durch die Erzeugung von blunt ends konnte die Klonierung in den Vektor erfolgen. Mit Hilfe dieses Konstruktes wird nach homologer Rekombination ein Funktionsausfall des *Nicolin1* bewirkt. Die Deletion des Gens erfolgt über die eingeführte *neo*-Kassette, die gleichzeitig zur Anreicherung der positiven Klone führt.

Für den *Replacement*-Vektor loxP/neo/loxP mit der geflochtenen *neo*-Kassette wurde zunächst ein positiver Klon des konstitutiven Konstruktes mit den Enzymen *Sac* II und *Xho* I gespalten. Anschließend erfolgte die Klonierung mit dem *Sac* II/*Xho* I-Fragment des pKS-loxpNTK-Plasmids. Zur Kontrolle wurden alle erhaltenen Klone mittels Spaltung auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts hin überprüft.

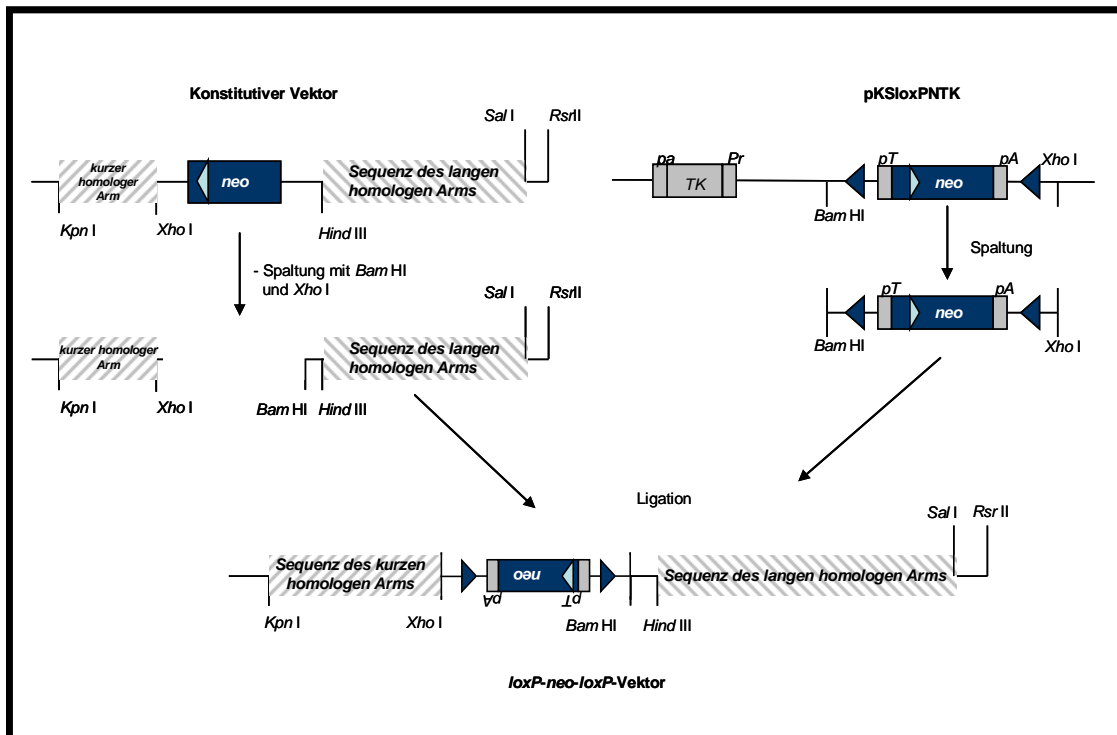


Abb. 3- 18: Herstellung des loxP/neo/loxP-Vektors

Dieses Konstrukt ist auf dem konstitutiven Knockout-Vektor aufgebaut. Er enthält zwei in gleicher Orientierung angeordnete *loxP*-Sequenzen. Diese ermöglichen die spätere Entfernung der *neo*-Kassette. Der geflochte Selektionsmarker wurde durch Spaltung des Plasmids pKSloxPNTK erzeugt. Durch die Enzyme *Xho* I und *Bam* HI konnte das Spaltungsprodukt in

den ebenfalls behandelten konstitutiven Vektor eingebaut werden. Dabei kam es zu einer Umkehrung der Leserichtung des *neo*-Gens (siehe grünes Dreieck).

Die Generierung des dritten neuen Konstruktes pNTK5 erfolgte über die Spaltung des Vektors pNTK4 mit dem Enzym *Sac* II, dessen überhängende Enden abgedaut wurden, und *Xho* I. In diesen Abschnitt wurde das mit den Enzymen *Bam* HI (Enden wurden abgedaut) und *Xho* I erzeugte Fragments aus dem Vektor pKS *loxP*NTK kloniert.

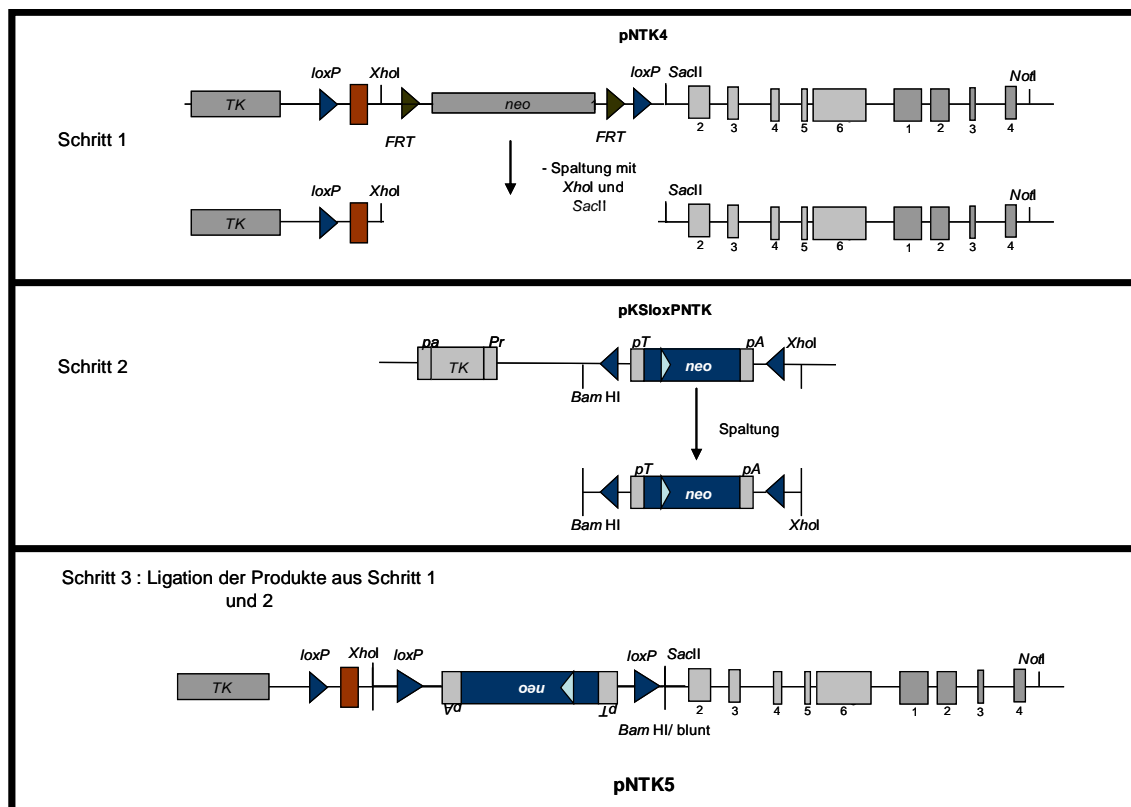


Abb. 3- 19: Klonierungsschema des pNTK5-Plasmids

Die Erzeugung des dritten Konstrukts erfolgte auf der Grundlage des vorhandenen pNTK4 – Vektors. Dieser wurde zunächst mit den Enzymen *Xho* I und *Sac* II zur Entfernung der von *FRT*-Sequenzen flankierten *neo*-Kassette gespalten. Im zweiten Schritt wurde das gefloxt *neo*-Gen mittels Restriktionsspaltung aus dem Vektor pKS *loxP*NTK isoliert. Durch die umgekehrte Enzymabfolge in den beiden Vektoren, ist die Leserichtung des neuen Selektionsmarker entgegengesetzt zur allgemeinen Richtung. Wie aus der Abbildung hervorgeht, sind mit dieser Einführung drei *loxP*-Elemente (blaue Dreiecke) vorhanden. TK = codierende Sequenz für die Thymidin-Kinase des Herpes-Simplex-Virus

3.2.3 Strategie zur Erzeugung der cDNA-Konstrukte

Der festgestellte Zelltod kann auch auf eine Überexpression des Gens zurückgeführt werden. Diese wird durch die vermehrte Einführung von linearisierter DNA in den Kern hervorgerufen, die auf Grund ihrer Struktur ebenfalls transkribiert wird. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden vier neue cDNA-Konstrukte entwickelt, die auf den Vektor pEFZeo und dem Rapalog-Plasmid pZ₁₂ aufgebaut sind.

1. Beide Vektoren sollten mit der humanen cDNA des *Nicolin1*-Gens ausgestattet werden: Damit ist es möglich neue Erkenntnisse über eine Überexpression zu sammeln und ggf. Zell-Linien für weitere Untersuchungen zu erzeugen.
2. Des Weiteren sollten zwei Fusionskonstrukte (GFP-NICN1) auf der Grundlage der Vektoren pEFZeo und pZ₁₂ generiert werden. Diese ermöglichen die einfache Studie des Proteins in der Zelle und der damit verbundenen physiologischen Aktivität. Die nähere Untersuchung der Kernlokalisation als auch das Auffinden eines evtl. vorhandenen Bindungspartners ist damit ebenfalls möglich.

Für die Generierung der vier Plasmide sollte zunächst die Zwischenstufe pEGFP_NICN1 erzeugt werden, die Grundlage für alle weiteren Klonierungsschritte darstellt. Dafür werden zunächst der Vektor pEGFP-C1 mit den Enzymen *Sal* I und *Bgl* II gespalten. Die Erzeugung des Inserts erfolgt über die Amplifizierung des mit den Erkennungssequenzen für *Sal* I und *Bam* HI (Isochizomer von *Bgl* II) ausgestatten 650-bp-Fragments auf der humanen cDNA. Vektor und Fragment können kloniert und anschließend mittels Kontrollspaltung überprüft werden.

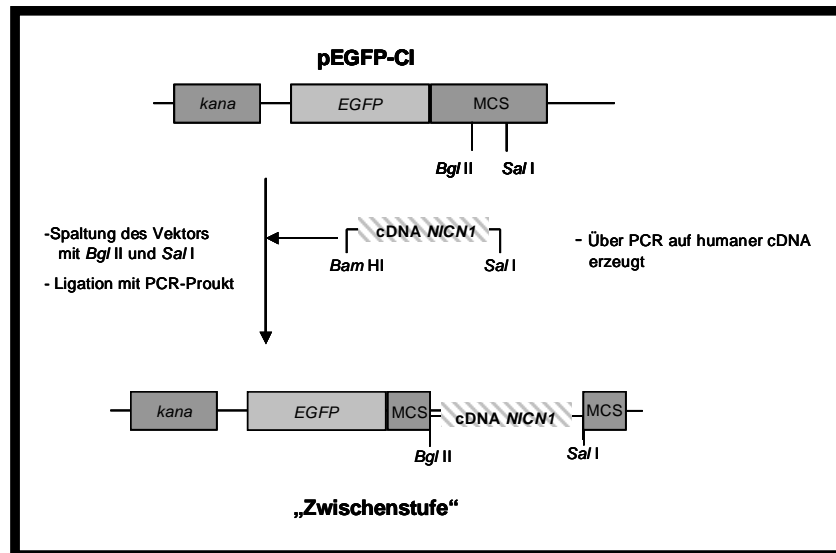


Abb. 3- 20: Zwischenstufe für die cDNA-Vektoren

Die Abbildung zeigt das Klonierungsschema für die Herstellung der cDNA-Zwischenstufe. Das Grundgerüst ist der Expressionsvektor pEGFP-C1. Er besitzt die codierende Sequenz für das GFP-Protein (*green fluorescent protein*). Dieses wird N-terminal an das Nicolin1 gehängt und mit diesem exprimiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops lässt sich dann die Position des Fusionsproteins in der Zelle bestimmen. Die Klonierung der cDNA in diesen Vektor erfolgt unter Verwendung der PCR. Die mit den Primern eingeführten Restriktionsschnittstellen ermöglichen dann die Klonierung des Amplifikats in den GFP-Vektor.

Wie in der Abbildung 3-20 dargestellt, sollten die Inserts der beiden einfachen cDNA Vektoren pEFZeo_NICN1 und pZ₁₂_NICN1 mit Hilfe von Primern erzeugt werden. Diese können an das Plasmid pEGFP_NICN1 binden. Zur Klonierung werden die Primer mit Erkennungssequenzen für die entsprechenden Enzymen ausgestattet.

Der Vektor pEF-Zeo sollte zunächst mit dem Enzym *Bam* HI gespalten, aus den Enden *blunt ends* erzeugt und anschließend mit dem Enzym *Apa* I behandelt werden. Die Gewinnung des Inserts erfolgt über eine *Nhe* I-blunt-*Apa* I-Kombination aus dem Zwischenprodukt. Ähnliche Schritte würden sich für den pZ12-GFP-NICN1-Vektor ergeben. Der reine Vektor muss zunächst mit der Kombination *Pst* I-blunt-*Bgl* II behandelt werden. Die Gewinnung des Inserts erfolgt hier über eine *Nhe* I-blunt-*Bam* HI Spaltung aus dem Zwischenprodukt und kann dann ebenfalls kloniert werden.

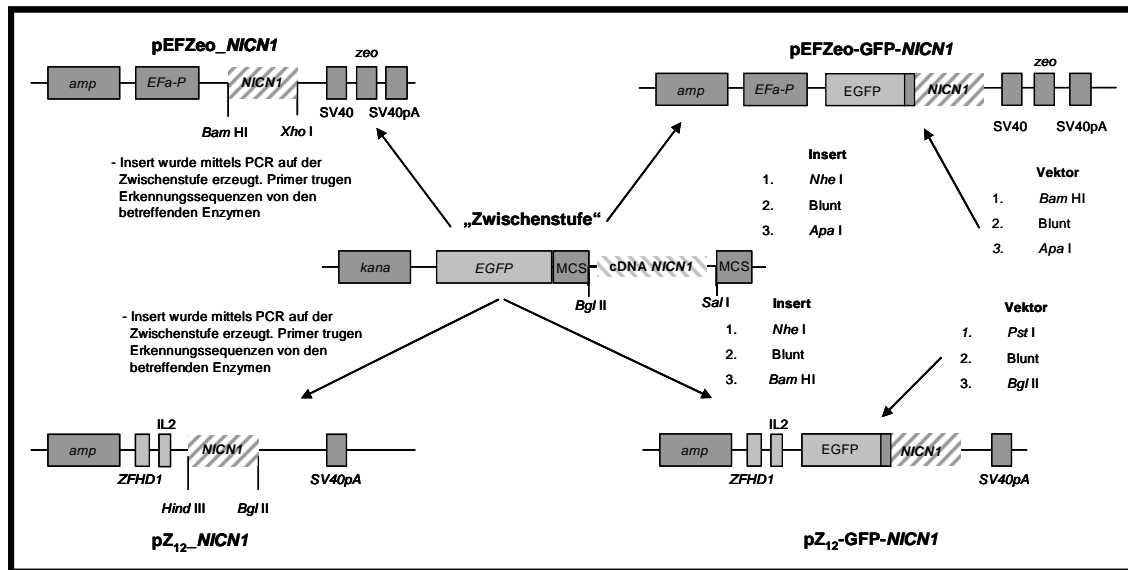


Abb. 3- 21: Erzeugung der cDNA-Konstrukte

Das hier dargestellte Schema zeigt die einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung der vier cDNA-Vektoren. Ausgangsplasmid ist das bereits beschriebene „Zwischenprodukt“ GFP-*NICN1*. Die cDNA-Vektoren besitzen als Plasmidrückgrat die Konstrukte pZ₁₂, einem Rapalog-Vektor, und pEFZeo. Über geeignete PCR-Primer, die an der Zwischenstufe binden, werden die beiden Plasmidtypen erzeugt, die nur die cDNA des *Nicolin1* Gens enthalten. Für die Fusionsproteine müssen die Vektoren zunächst mit geeigneten Enzymen gespalten werden. In den meisten Fällen werden stumpfe Enden erzeugt. Dieses Vorgehen ergibt sich aus der Tatsache, dass die zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen nicht in allen *Multiple--Cloning-Sequenzen* vorkommen. Dies trifft besonders auf den Rapalog-Vektor zu, der über sechs Spaltstellen nur verfügt (siehe Anhang).

3.2.4 Generierung der cDNA-Vektoren

Die Klonierung der einzelnen cDNA-Vektoren gestaltete sich schwierig, da die Karten für die Plasmide pEFZeo und pEGFP-C1 nicht mit dem erhaltenem Spaltungsmuster einer Testspaltung übereinstimmten. Aus diesem Grund erfolgte die Herstellung der Inserts für die Konstrukte pEFZeo-NICN1 und pZ₁₂NICN1 nicht auf dem Zwischenprodukt, sondern auf der cDNA. Der Zeo-Vektor verfügt über mehr als eine *Xho* I-Schnittstelle. Deshalb musste das für die Klonierung vorgesehene Enzym durch *Xba* I ersetzt werden.

In den Abbildungen 3-22 sind die Ergebnisse dieser Klonierungen in Form einer Testspaltung zu erkennen.

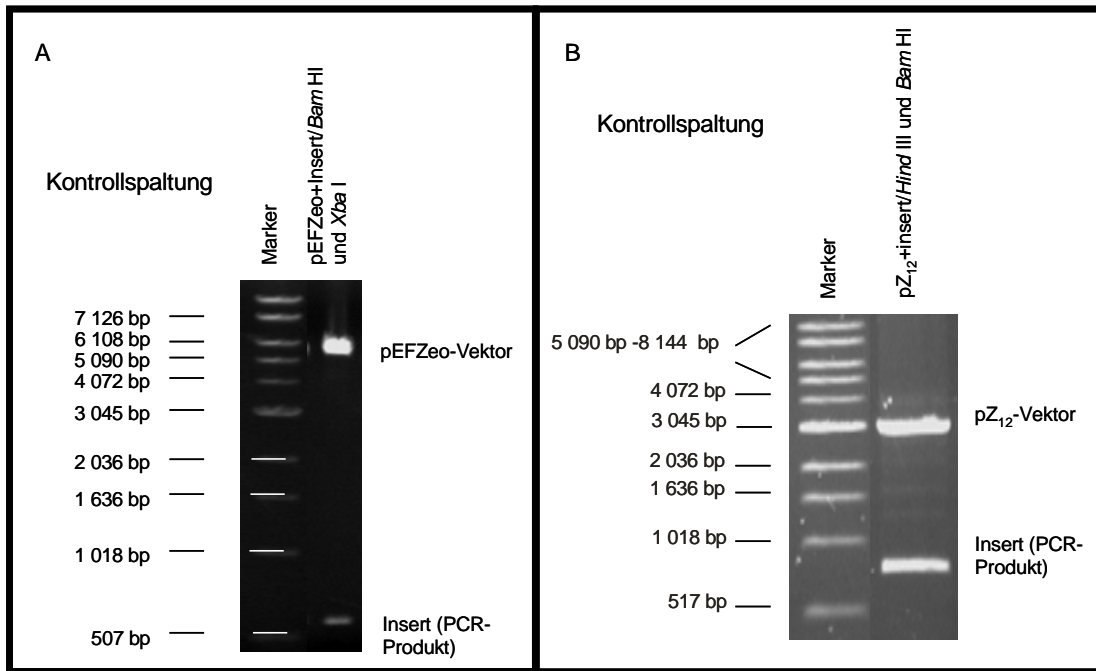


Abb. 3- 22: Kontrollspaltungen der Vektoren pEFZeo und pZ₁₂

In den beiden Abbildungen sind die Kontrollspaltungen nach der Einführung des cDNA-PCR-Produktes des *NICN1*-Gens dargestellt. **A** Der neu erstellte cDNA Vektor pEFZeo-*NICN1* wurde mit den Enzymen *Bam* HI und *Xba* I gespalten. Die daraus resultierenden Banden mit einer Größe von 5500 bp (Vektor) und 680 bp (cDNA-PCR-Produkt) sind deutlich auf dem Gel zu erkennen. **B** Der Vektor pZ₁₂-*NICN1* wurde zur Kontrolle mit den Enzymen *Hind* III und *Bam* HI gespalten. Durch den Einsatz dieser Restriktionsendonuklease konnte nicht nur das Insert mit einer Größe von 680 bp isoliert werden, sondern auch der SV40 late pA (ca. 200 bp) und der Promotor (ca.100 bp). Daraus ergaben sich zwei Banden mit einer Größe von ca. 980 bp (Insert+Promotor+SV40 late pA) und ca. 3100 bp (Vektor), die im Gel sichtbar sind.

Das Zwischenprodukt pEGFP-C1-*NICN1* konnte aus der Klonierung des neuen Ausgangsvektors (Spaltung mit *Sal* I und *Bgl* II) mit dem Insert (behandelt mit den Enzymen *Sal* I und *Bam* HI) erfolgreich generiert werden.

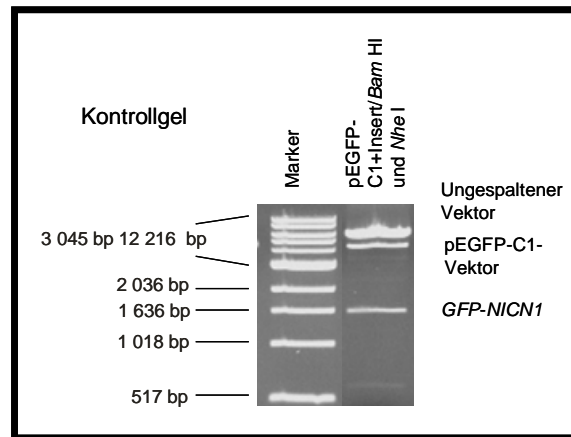


Abb. 3- 23: Kontrollspaltung der Zwischenstufe pEGFP-C1-NICN1

Mit Hilfe dieser Kontrollspaltung sollte zum einen die erfolgreiche Klonierung des *NICN1*-PCR-Produktes in den Vektor pEGFP-C1 als auch die Isolation des *GFP-NICN1*- Elementes dokumentiert werden. Das Fusionsgen besitzt eine Größe von ca. 1478 bp. Der gespaltene Vektor sollte eine Größe von ca. 3900 bp besitzen. Beide Fragmente konnten im Kontrollgel bestätigt werden.

Für die Herstellung des pZ₁₂-GFP-*NICN1*-Vektors wurde das pEGFP-C1-*NICN1*-Plasmid zunächst mit dem Enzym *Nhe* I gespalten, dann wurden stumpfe Enden erzeugt und anschließend mit *Bam* HI erneut gespalten. Nach Extraktion aus dem Gel erfolgte die Klonierung in den mit der Kombination *Pst* I-blunt-*Bgl* II behandelten Vektor. Der erfolgreiche Einbau des Inserts konnte durch eine Kontrollspaltung mit dem Enzym *Xba* I bestätigt werden.

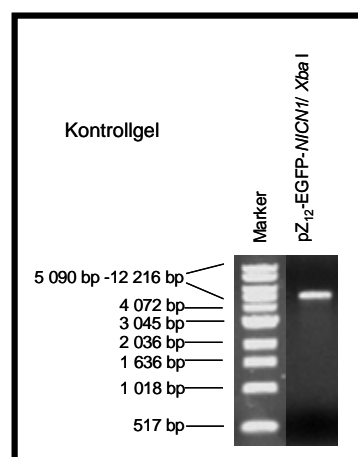


Abb. 3- 24: Kontrollspaltung des cDNA-Konstruktes pZ₁₂-GFP-*NICN1*

Um die erfolgreiche Klonierung des GFP-*NICN1*-Gens dokumentieren zu können, erfolgte eine Linearisierung des neuen cDNA-Konstruktes pZ₁₂-GFP-*NICN1* mit dem Enzym *Xba* I. Das

daraus resultierende Fragment sollte eine Größe von 5 kb aufweisen, welches durch das Kontrollgel bestätigt werden konnte.

Die Erzeugung des pEFZeo-GFP-*NICN1*-Konstrukts war aufgrund der unüberschaubaren Unstimmigkeiten zwischen Plasmidkarte und Spaltungsverhalten nicht möglich.

3.3 Expressionsstudien

Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens können auch über die Kenntnis der zeitlich und gewebespezifisch regulierten Expression gewonnen werden. Die dabei betrachteten RNA-Transkripte des betreffenden Gens werden mittels Analysen wie *Northern-Blot* und RT-PCR quantitativ und qualitativ in verschiedenen Geweben oder Zell-Linien bestimmt. Um im Anschluss definierte Aussagen über die Expression machen zu können, erfolgt eine Standardisierung der erhaltenen Ergebnisse durch den Vergleich mit einem ubiquitär exprimierten Gen.

3.3.1 Northern-Blot und RT-PCR

Um ein solches Expressionsprofil des humanen *Nicolin1*-Gens zu erhalten, wurden zunächst *Northern-Blot*-Studien [Thomas, 1980] durchgeführt. Zum Einsatz kamen dabei Filter der Firma Clontech. Auf ihnen waren RNA-Proben aus unterschiedlichen adulten Geweben von Mensch und Maus geblottet. Die Erzeugung geeigneter Sonden erfolgte über die Spaltung der betreffenden IMAGE-Klone. Bei der Sonde für den HumanRNA-Filter handelte es sich um ein 1194 bp großes Spaltprodukt des IMAGE-Klons 433564 mit *Eco* RI und *Not* I. Das 829 bp große Fragment, welches zur Hybridisierung der Maus-RNA-Membran eingesetzt worden war, entstammte einer *Eco* RI-Spaltung des IMAGE-Klons 1349406. Um später eine Quantifizierung der erhaltenen Ergebnisse durchführen zu können, erfolgte nach der Hybridisierung und anschließendem Entfernung der Sonde eine erneute Hybridisierung mit einer β -Actin-Sonde. Hierbei handelte es sich um β -Actin-mRNA, die in allen Geweben exprimiert wird.

In Abbildung 3-25 sind die Ergebnisse der beiden *Northern-Blots* und ihrer Kontrollen dargestellt. Sowohl beim Mensch als auch bei der Maus konnten spezifische Signale mit einer Größe von 2,5 und 2,3 kB nachgewiesen werden.

Das murine Transkript steht dabei in guter Übereinstimmung zu den bereits während der genomischen Charakterisierung des *NICN1* erhaltenen Werten [Leeb *et al.*, 2000a] und bestätigt somit die Größe der cDNA von 2133 Nukleotiden ohne Poly(A)-Schwanz.

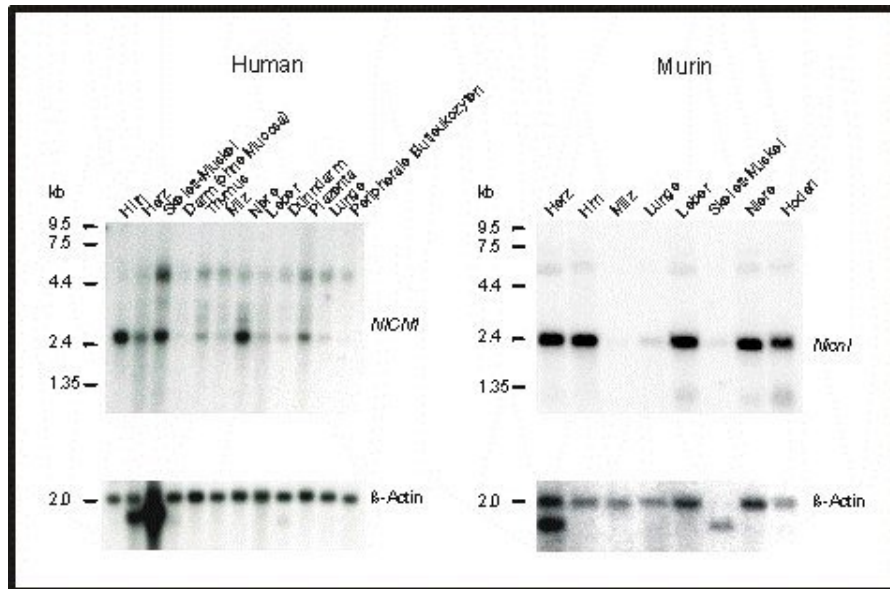


Abb. 3- 25: Northern-Blots des humanen und murinen *Nicolin 1* Gens

Die hier verwendeten Membranen enthalten pro Spur 2 µg Poly (A)-RNA von unterschiedlichen Geweben und wurden mittels ^{32}P -markierter Sonden hybridisiert. Um die Mengen an *Target* RNA in den einzelnen Spuren miteinander vergleichen zu können, wurden nach der Hybridisierung mit der humanen und murinen *NICN1* Probe Kontrolleexperimente mit einer β -Aktin-Sonde durchgeführt. Die Expositionszeiten betragen bei den *Nicolin1* Untersuchungen zwei Stunden, für die Kontrolleexperimente beim Menschen 2 h, bei der Maus 30 min.

Um die aus dem Autoradiogramm ermittelten Intensitäten der einzelnen Signale bestätigen zu können, wurden zusätzlich semiquantitative RT-PCR-Analysen auf normalisierten RNAs verschiedener Gewebe durchgeführt. Für die Erzeugung der einzelnen Banden wurden die Primerpaare *NICN1_V362* (5'-CATCACCCTGTGGCTGTC-3') und *NICN1_R555* (5'-CTCTGTCAGTGCCACATC-3') erstellt. Diese erzeugten sowohl bei der Maus als auch beim Menschen ein Amplifikat von 194 bp. Als Kontrolleexperiment wurden mitgelieferte Primer für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- (*GAPDH*) verwendet. Diese generierten ein ungefähr 800 bp großes Amplifikat dieses *Housekeeping* genes.

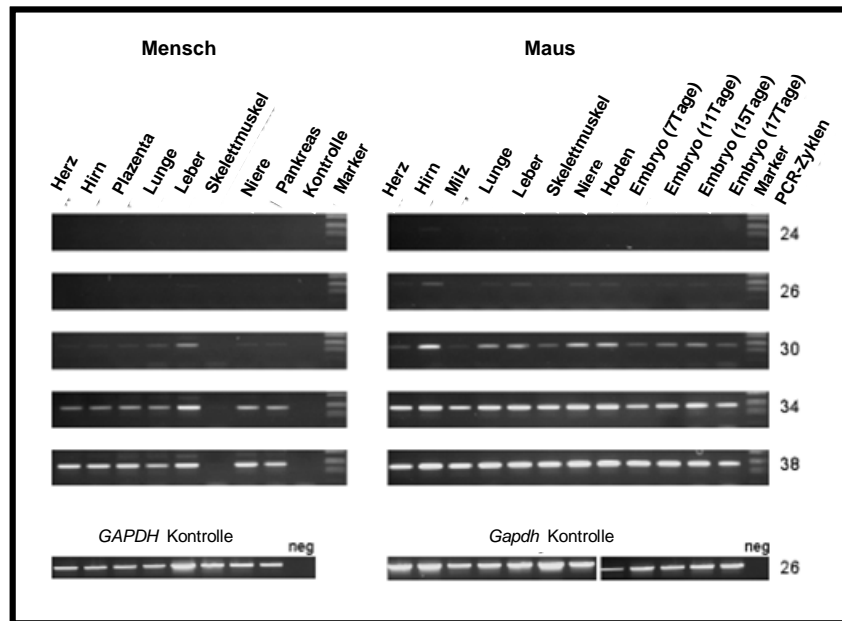


Abb. 3- 26: Semi quantitative RT-PCR–Analyse des humanen und murinen *Nicn1*- Gens

Als *Template*-DNA für diese semiquantitative RT-PCR wurden normalisierte cDNA aus verschiedenen Geweben eingesetzt. Die einzelnen Abbildungen zeigen die erhaltenen Produkte des *NICN1*-Fragments nach 24, 26, 30, 34 und 38 Zyklen der PCR. Die Amplifikation sowohl auf dem humanen, als auch auf dem murinen cDNA-Panel wurde unter Verwendung der gleichen Primer und Bedingungen produziert.

Um die Ergebnisse aus beiden Experimenten quantifizieren zu können, erfolgte eine graphische Aufstellung der einzelnen Daten, die in Abbildung 3-27 dargestellt ist. Diese Darstellung resultierte aus dem Intensitätsvergleich der einzelnen Ergebnisse mit den durchgeführten Kontrollexperimenten. Die Graphen für sich allein betrachtet weisen deutlich auf eine gewebespezifische Expression des *NICN1*-Gens hin. Vernachlässigt man zunächst die teilweise recht unterschiedlichen Expressionsintensitäten zwischen RT-PCR und *Northern-Blot*, so lässt sich eine grobe Einteilung der Expression vornehmen. Eine starke Expression ist in den Geweben Hirn, Hoden, Leber und Niere zu erkennen, eine etwas abgeschwächte Expression in Herz, Skelettmuskel, Plazenta, Pankreas und Lunge. Die Gewebe Milz, Thymus, periphere Blutleukozyten, Dünndarm und Dickdarm weisen eine schwache Expression auf.

Die meisten erhaltenen Signale lassen sich in dieses grobe Muster einordnen. Eine Ausnahmen bildet, z. B. die Leber: Sowohl in beiden Mäusexperimenten

als auch in der humanen RT-PCR ist eine deutliche Expression zu erkennen, nicht aber im humanen *Northern-Blot*.

Zusätzlich weisen die beiden Methoden innerhalb eine Spezies Intensitätsunterschiede auf. So wird *NICN1* in der Lunge im *Northern-Blot* wesentlich geringer exprimiert als in der RT-PCR. Dies spiegelt sich auch bei der Maus wieder, bei der neben der Lunge auch die Milz im *Northern-Blot* starke Intensitätseinbußen im Vergleich zur RT-PCR aufweist

Aus den murinen Ergebnissen lässt sich zusätzlich die murine Expression des Gens während der embryonalen Entwicklung (siehe Balken in Grafik) ableiten. Um diese Werte bestätigen zu können, wurde zusätzlich eine *in-situ*-Hybridisierung im Totalpräparat vorgenommen.

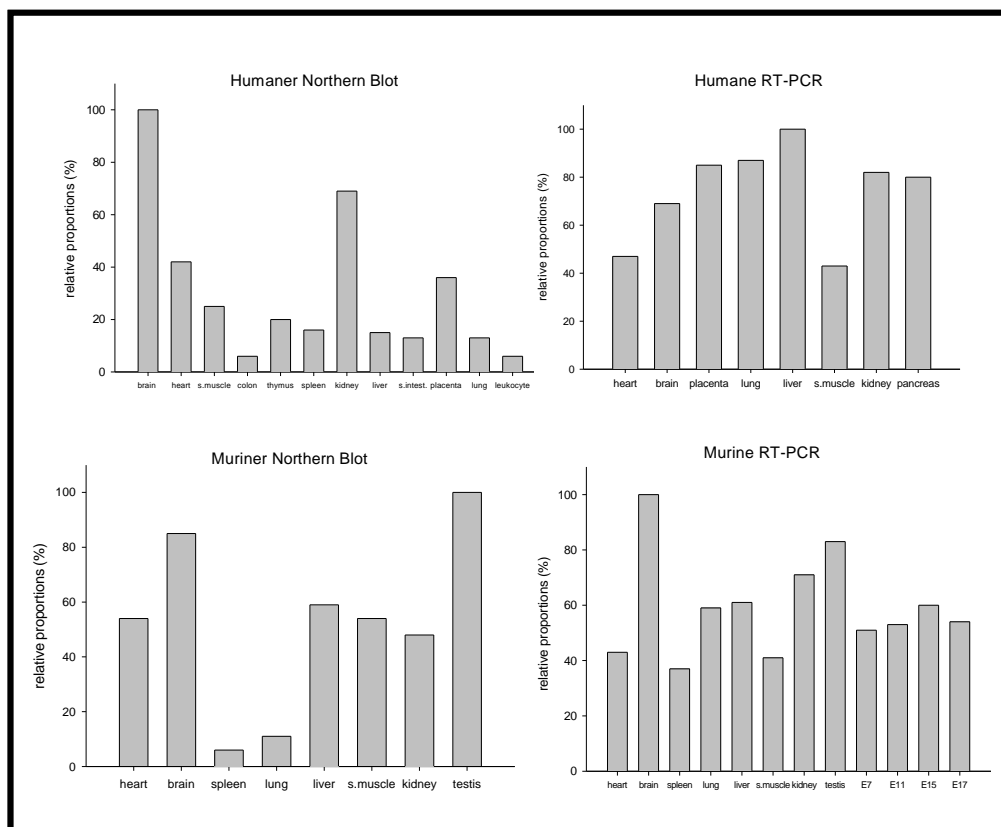


Abb. 3- 27: Quantifizierung der *NICN1*-Expression in verschiedenen Geweben

Die Graphen errechneten sich aus den Versuchen, die in Abbildung dargestellt sind. In jedem Experiment wurde das Gewebe mit dem höchsten Expressionslevel gleich 100 gesetzt. Die Höhe der anderen Balken in den jeweiligen Abbildungen spiegelten die relative Menge an *NICN1*-mRNA in den anderen Geweben wider. **A:** Im humanen *Northern-Blot* erfolgte die Berechnung der Expressionsintensitäten im Vergleich zum erzeugten β -Aktin-Signal. **B** In der humanen RT-PCR-Analyse wurden die *NICN1*-Signale nach 34 Zyklen im Vergleich zu den nach 26 Zyklen erhaltenen GAPDH-Signalen normalisiert. **C** Beim murinen *Northern-Blot*

erfolgte die Erstellung der Graphen im Vergleich zur β -Aktin-Kontrolle. **D** In der murinen RT-PCR wurden die Signalintensitäten des *Nicn1* nach 30 Zyklen PCR mit denen der GAPDH-Kontrolle nach 26 Zyklen verglichen.

3.3.2 „In-situ“-Hybridisierung im Totalpräparat („whole mount“)

Die während der RT-PCR erhaltenen Informationen über die Expression des *NICN1*-Gens während der frühen embryonalen Entwicklung gaben den Anlass zur *in-situ*-Hybridisierung im Totalpräparat. In Anlehnung zu den bereits erhaltenen Informationen wurden 8.5, 9.5, 10 und 10.5 Tage alte Mäuseembryonen mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden des *Sense*- (als Negativ-Kontrolle) und *Antisense*-Stranges hybridisiert. Zur besseren Verdeutlichung der Ergebnisse wurden die Präparate unterschiedlich langen Färbeprozeduren unterzogen. In Abbildung 3-28 sind die Ergebnisse dargestellt. Die deutlich zu erkennende gleichmäßige Färbung der Embryonen während der einzelnen Entwicklungstage ist auf die Präsenz des *NICN1*-Transkriptes in allen Geweben zurückzuführen. Damit konnten die Ergebnisse der RT-PCR bestätigt werden.

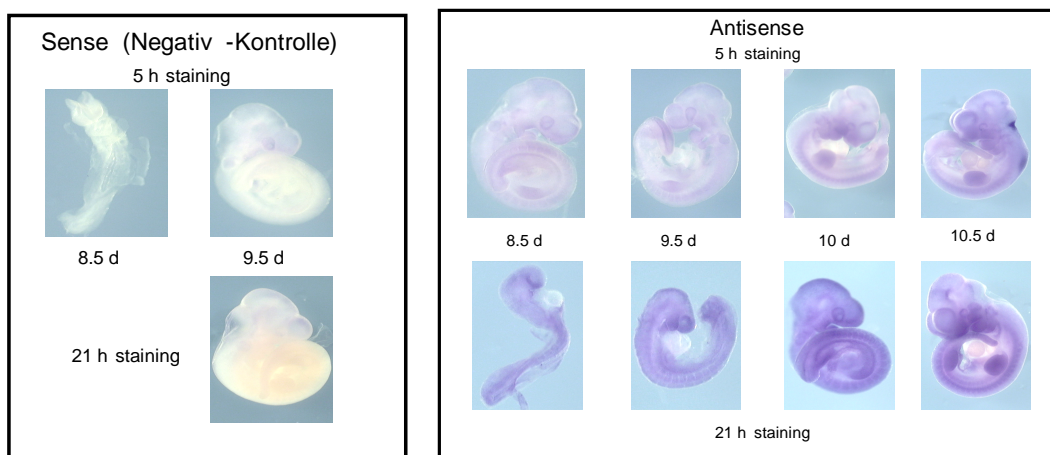


Abb. 3- 28: „whole mount“ *in-situ*-Hybridisierung Antisense und Sense

Dargestellt sind die Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung im Totalpräparat mit einer Digoxigenin markierten antisense-RNA. Die gleichmäßige Verfärbung der Embryonen weist auf das Vorhandensein des *Nicn1*-Transcriptes in allen Geweben und zu jedem Zeitpunkt der untersuchten Entwicklungsstadien hin. Die erste Abbildung zeigt die Negativ-Kontrollen, die mittels eines Sense-RNA-Stranges erzeugt wurden. Hier konnte auch nach längerer Inkubationszeit keine Verfärbung festgestellt werden.

3.4 Bindungsexperimente

Bei *Nicolin1* handelt es sich um Kernprotein ohne bekannte Kern-Lokalisations-Erkennungssequenz [Backofen *et al.*, 2002]. Ein Transport in den Kern könnte durch ein Bindungsprotein ermöglicht werden, das über die geeignete Sequenz verfügt. Ein solcher Mechanismus ist für die Glucokinase [Van Schaftingen, 1995] bekannt.

3.4.1 Strategie

Sowohl für die Aufreinigung von *Nicolin1* als auch für die Isolierung eines möglichen Bindungskomplexes steht kein Antikörper zur Verfügung. Deshalb sollte *NICN1* mit einem Protein-*Tag* fusioniert werden, das eine Isolierung unter nativen Bedingungen ermöglicht. Hierfür wird häufig ein GST (Glutathion-S-Transferase)-*Tag* und der damit verbundene *pull-down assay* mit GSH (reduziertem Glutathion) verwendet. Aus den Expressionsstudien war bekannt, dass *Nicolin1* zwar ubiquitär, aber nur in geringen Mengen in den einzelnen Geweben exprimiert wird. Deshalb wurde zur Expression des Fusionsproteins der *E.coli*-Stamm BL21 als ein prokaryontisches System gewählt. Hierfür galt es vorher festzustellen, ob der Stamm über eine ausreichende Anzahl der nötigen t-RNAs verfügt. Ein Mangel dieser führt zur Expression von Proteinen, die in den meisten Fällen unlöslich sind und in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) gesammelt werden. Sie sind damit für weitere Untersuchungen nur schwer zugänglich. Mittels geeigneter Programme, die im Internet frei zugänglich sind, lassen sich anhand der DNA-Sequenz die nötigen RNAs und ihre Häufigkeit im entsprechenden Expressionsorganismus berechnen. Das hier verwendete Programm ist der *graphical codon usage analyser* und ist im Internet unter der Adresse www.gcuu.de zu finden.

Für die Suche nach dem Bindungspartner wurden Zell-Lysate von Geweben hergestellt, in denen *Nicolin1* stark (humane Niere und Plazenta) und weniger stark (Blutzellen) exprimiert wird. Nach ausreichender Inkubation mit dem Fusionsprotein und anschließender Aufreinigung mittels *pull-down assay* unter nativen Bedingungen sollte der mögliche Bindungskomplex isoliert werden.

3.4.2 Codon-Analyse

Die unterschiedliche Codon-Benutzung bei einer heterologen Genexpression kann zu einer großen Anzahl von Problemen führen. In wieweit die Codon-Verwendung der betrachteten Organismen übereinstimmt, kann mit Hilfe des *graphical codon usage analyser* bestimmt werden. Dieser verdeutlicht die Häufigkeit der Verwendung eines betrachteten Codons auf graphischem Weg.

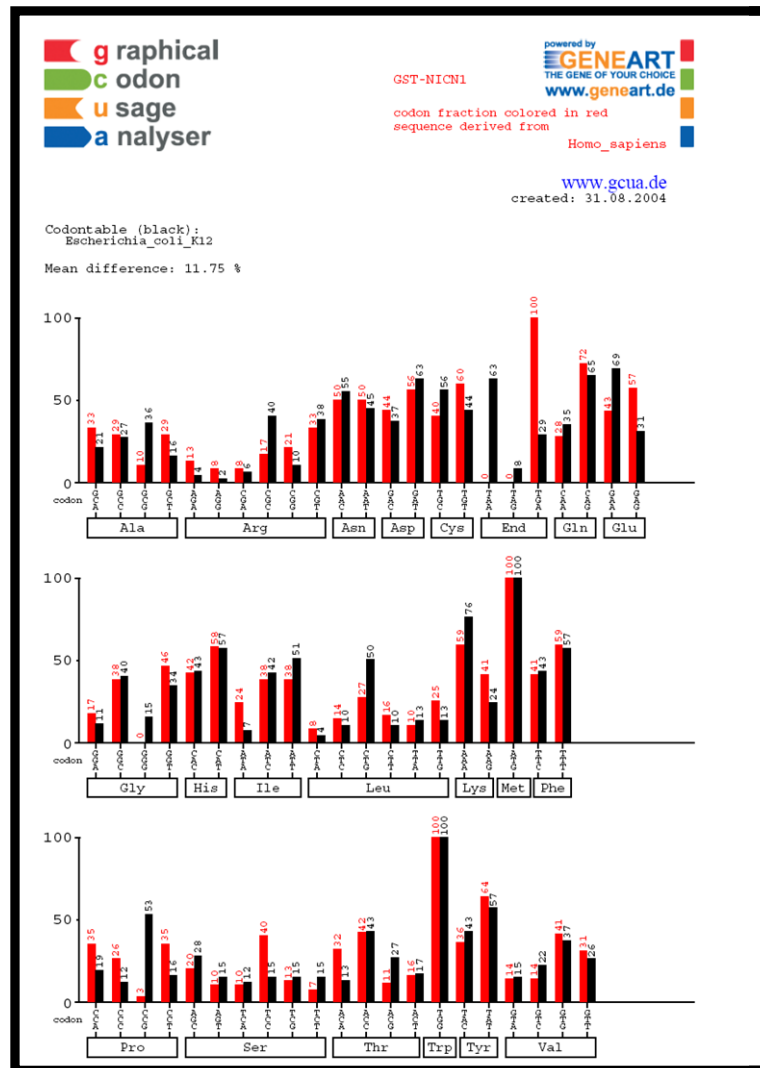


Abb. 3- 29: Codon-Analyse

Die Abbildung zeigt die graphische Gegenüberstellung der prozentualen Codon-Häufigkeiten in *E.coli* (schwarze Balken) und Mensch (rote Balken). Aus der Analyse ergibt sich eine durchschnittliche Abweichung von 10 %. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass eine ungehinderte Expression des humanen *Nicolin1* Proteins in *E.coli* möglich ist.

Die Abbildung 3-29 zeigt eine Gegenüberstellung der Häufigkeiten aller verwendeten Codon-Kombinationen im Ursprungsorganismus und im Expressionswirt. Ebenfalls dargestellt wird die durchschnittliche Abweichung

der benutzen Codons im Vergleich zum Expressionswirt. Wie aus der Graphik ersichtlich wird, stimmen die Häufigkeiten der verwendeten Codons in Mensch und *E.coli* K12 weitestgehend überein. Die mittlere Abweichung beträgt hier nur 11.75% und ist damit sehr niedrig. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine unbeeinträchtigte Expression des Fusionproteins GST-NICN1 in *E.coli* stattfindet.

3.4.3 Herstellung eines NICN1-GST-Fusionkonstruktes

Für die Expression des Proteins wurde der pGEX-2T-Vektor von Invitrogen verwendet. Dieser besitzt den Hybrid-Promotor *ptac*, der eine Kombination aus dem T7- und dem lacZ-Promtor ist. Er ermöglicht eine starke, aber regulierbare Expression.

Zunächst wurde mit Hilfe der Primer GST_NICN1_F und GST_NICN1_R, die mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Eco* RI getaggt sind, ein 250-bp-Fragment erzeugt. Als *Template* diente die humane cDNA des *Nicolin1*-Gens. Nach Spaltung des Produkts folgte die Klonierung in den entsprechend behandelten Vektor. Neben dem Fusionsplasmid wurde auch der unbehandelte pGEX-2T-Vektor zur Kontrolle in die chemisch kompetenten BL21-Bakterien transformiert.

3.4.4 Expression des rekombinanten Nicolin1-GST-Fusionsprotein in *E. coli*

Tab. 3- 9: Bedingungen für die Expression des rekombinanten Proteins in *E.coli*

Konstrukt	Temperatur [°C]	OD ₆₀₀	IPTG Konzentration [mM]
GST_NICN1 in BL21	37 °C	0,6	1
GST in BL21			1

Nach der Stimulation mit IPTG wurden Proben nach 0,5, 1,2,3 und vier Stunden, entnommen, pelletiert und auf ein Gel geladen

Zunächst wurden drei Kulturen angesetzt: Bei der ersten handelte es sich um die Negativkontrolle, die durch den Einsatz untransformierter BL21-Bakterien zustande kam. Die zweite Kultur diente der positiven Kontrolle; hier wurden die mit dem unbehandelten pGEX-2T transformierten Bakterien verwendet. Die dritte enthielt Bakterien, die das Fusionsplasmid trugen. Um die Ergebnisse im Anschluss vergleichen zu können, fanden die Inkubation und Stimulation durch das IPTG unter gleichen Bedingungen statt. Die Dokumentation der Expression erfolgte in Form von 1-ml-Proben, die jeweils vor der Zugabe des IPTGs sowie 30 Minuten später und dann nach jeder weiteren Stunde bis zum Abbruch der Reaktion entnommen worden waren. Die dort enthaltenen Bakterien wurden zunächst in der Tischzentrifuge pelletiert, durch Resuspendierung in Ladepuffer lysiert und bis zum Auftrag auf das Gel bei -20 °C gelagert. Die Hauptkultur wurde nach vier Stunden IPTG-Einflusses auf Eis abgestoppt und ebenfalls lysiert. Nach der Entfernung der Zelltrümmer erfolgte der Transfer auf die äquilibrierten Sepharose-Kügelchen. Um die Reinigung des Fusionsproteins auch im Hinblick auf weitere Versuche so effektiv wie möglich gestalten zu können, ohne dabei die biologische Aktivität des Nicotins zu beeinflussen, wurden dem Waschpuffer für das Fusionsprotein unterschiedlich konzentrierte Natriumchlorid-Lösungen (1M, 500 μ M und 300 μ M) hinzugefügt (siehe Abbildung 3-30). Nachdem der Waschschrift insgesamt viermal wiederholt worden war, fand die Elution mittels reduzierten Glutathions statt. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, kurz aufgeköcht und anschließend auf ein 12 %iges Gel aufgetragen. Die erfolgreiche Stimulation des GST-NICN1-Konstrukts ist in Abbildung 3-30 dargestellt.

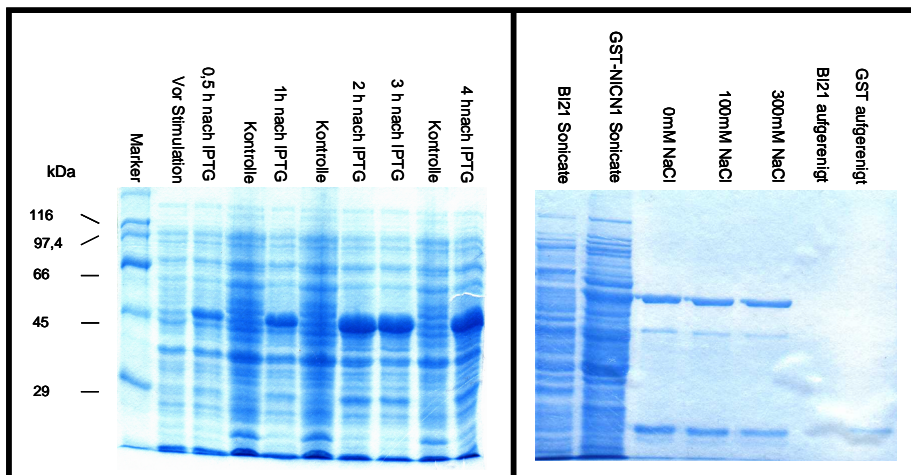


Abb. 3- 30: Expressionsversuch

Das Fusionsprotein GST-Nicolin1 wurde in BL21-Bakterien transfiziert und durch Stimulation mit IPTG exprimiert. Um die Expression dokumentieren zu können, wurden jeweils unmittelbar vor und eine halbe Stunde nach IPTG-Zugabe sowie nach jeder weiteren Stunde 1 ml Proben entnommen. Die Bakterien wurden pelletiert und in Ladepuffer aufgenommen. Die linke Abbildung zeigt das Ergebnis nach Auftrennung in einem SDS-Gel. Die erste Spur zeigt ein Proteinmuster vor der IPTG-Stimulation, in dem alle Banden gleich stark auftreten. Eine Veränderung ergibt sich schon eine halbe Stunde nach dem Start der Überexpression. Bei 50 kDa kann eine deutlich intensivere Bande nachgewiesen werden. Diese verstärkt sich mit zunehmender Stimulationszeit. Die Intensität und die Größe der Bande lassen den Schluss zu, dass es sich hierbei um die gewünschte Überexpression des Fusionsproteins handelt.

Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das Protein wurde über Glutathion-Sepharosekügelchen isoliert und aufgereinigt (*pull-down assay*). Die Abbildung dokumentiert anschaulich die Reduzierung der Banden auf das gewünschte Fusionssignal. Das obere stärkere Signal ist eindeutig dem Fusionskonstrukt zuzuordnen. Die etwas abgeschwächte Bande bei 29 kDa ist auf das GST-Protein zurückzuführen, die darunter befindliche Bande auf das Nicolin1.

Mit zunehmender Stimulationszeit ist auch eine deutliche Zunahme des Fusionskonstrukts bei 45 kDa festzustellen. Die eigentliche Bande des Konstruktes sollte bei genau 50 kDa liegen, aufgrund der großen Menge an gebildetem Protein kommt es jedoch zu einer Überladung des Gels und somit zu einer Bandenverschiebung (*band shift*). Ebenfalls deutlich zu erkennen ist die Reduzierung der Banden nach Aufreinigung über die Sepharose-Kügelchen (Abbildung 3-31).

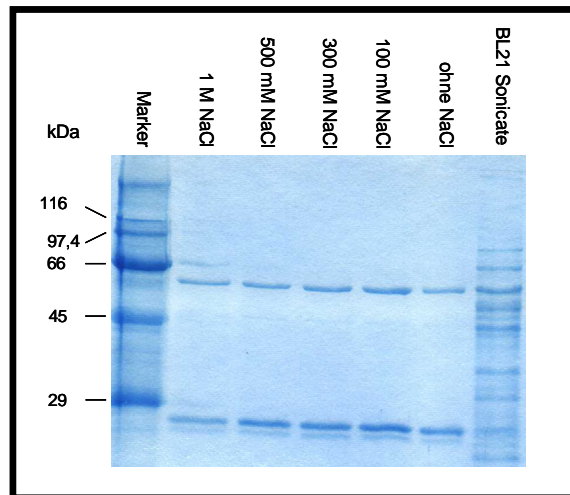


Abb. 3- 31: Aufreinigung des Fusionproteins GST-*NICN1* über Sepharose beads

Mittels Gluthation-Sepharosebeads war es möglich, das Fusionproteins aus dem Bakterienlysat zu isolieren und aufzureinigen. Der Waschpuffer wurde mit unterschiedlich konzentrierten Natriumchloridlösungen versetzt, um die Aufreinigung zu optimieren. Wie der Vergleich mit dem Bakterienzell-Lysat (BL21 Sonicate) zeigt, konnten alle bis auf drei Banden durch das Waschen entfernt werden. Bei der oberen Bande handelt es sich um das Fusionsprotein GST-*NICN1* (50 kDa), das mittlere (ca. 26 kDa) und das untere (ca. 24 kDa) resultieren aus der proteolytischen Spaltung des Fusionskonstruktes.

Bei dem oberen starken Signal handelt es sich das gewünschte Fusionskonstrukt. Die untere Bande ist auf das GST zurückzuführen, das etwas schwächere Signal bei 24 kDa auf das *NICN1*. Laut Hersteller sind die Vektoren so geartet, dass neben der Fusionsbande auch immer eine Kontrolle bei 26 kDa zu sehen ist. Wie die drei Abbildungen verdeutlichen, konnte das Fusionskonstruktes in *E.coli* exprimiert und durch GSH-Sepharose-Kügelchen aufgereinigt werden.

3.4.5 Optimierung der Expressionsbedingungen

Versuch 2

Tab. 3- 10: Bedingungen für das zweite Experiment

Konstrukt	Temperatur [°C]	OD ₆₀₀	IPTG Konzentration [mM]	Lysispuffer 1 [ml]	Lysozym [µl]	PI [µl]
GST in BL21	1,25	0.6	1	2,4	48	48
				2,25	45	45
GST_NICNI in BL21		0.6	1	2,45	49	49
				25	25	25

Um für die Bindungsexperimente größere Mengen aufgereinigten Fusionproteins zur Verfügung zu haben, wurden erneut Kulturen hergestellt, die sowohl Bakterien mit dem Fusionskonstrukt, als auch mit dem reinen pGEX-2T-Vektor enthielten. Die angewandten Versuchsbedingungen richteten sich streng nach dem bereits durchgeführten Protokoll. Folgende Änderung wurde vorgenommen: Aufgrund von Chemikalienmangel wurde das zur Stimulation eingesetzte IPTG durch eine kostengünstige Charge einer anderen Firma ersetzt. In der Tabelle 3-10 sind die Bedingungen des Versuchs aufgelistet. Auch hier wurden während der Stimulation Proben entnommen und zur Dokumentation auf ein Gel geladen. Wie die Abbildung 3-32 verdeutlicht, konnte keine Stimulation bewirkt werden. Es war nicht möglich, die Ergebnisse aus dem ersten Versuch zu reproduzieren .

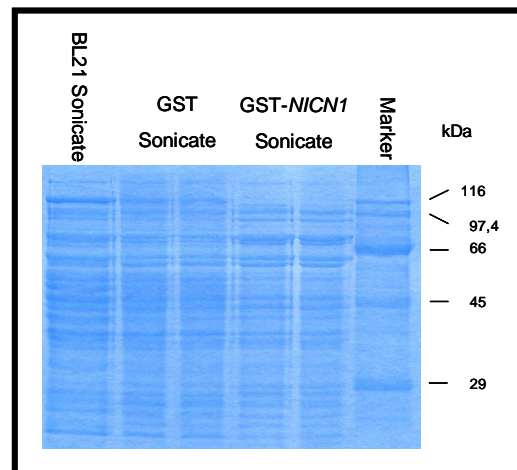


Abb. 3- 32: GST-NICN1 Kontrollgel

Auf dem abgebildeten Gel sind die Proben, die während des Versuches Nr. 2 entnommen worden sind, aufgetragen. Ein Vergleich der Spuren zeigt, dass keine Expression der beiden Proteine GST und GST-NICN1 stattgefunden hat. Da die Versuchsbedingungen unverändert blieben, ist dieses Ergebnis eindeutig auf den Wechsel des Stimulationsmetaboliten IPTG zurückzuführen.

Versuch 3

Tab. 3- 11: Bedingungen für das dritte Experiment

Konstrukt	Temperatur [°C]	IPTG Konzentration	Lysispuffer 1 [ml]	Lysozym [µl]	PI [µl]
GST in BL21	22	1000 µM	0,65	13	13
	30	1000 µM	0,70	14	14
	37	100 µM	0,80	16	16
		500 µM	0,90	18	18
		1000 µM	0,70	14	14
	42	5000 µM	0,85	17	17
42	1000 µM	0,75	15	15	
GST_NICN1 in BL21	22	1000 µM	0,90	18	18
	30	1000 µM	1,25	25	25
	37	100 µM	0,75	15	15
		500 µM	0,95	19	19
		1000 µM	0,95	19	19
		5000 µM	0,90	18	18
	42	1000 µM	0,75	15	15

Da die genutzte Methode unverändert blieb, schien es bis dahin unerklärlich, warum das erste Experiment nicht reproduziert werden konnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein erneuter Versuch gestartet, bei dem neben den

Temperaturen auch die IPTG-Konzentration, der einzige veränderte Punkt aus Versuch 2, variiert wurde. Sowohl das Kulturvolumen, die verwendeten Bakterienkulturen und die Stimulation von vier Stunden als auch die Lyse der Zellen blieben weiterhin unverändert. In den Abbildungen 3-33 sind die Ergebnisse der Expression von GST und dem Fusionskonstrukt GST-NICN1 unter den veränderten Bedingungen dargestellt. Im Falle des Fusionsproteins scheint weder die eingesetzte IPTG-Konzentration, noch die Temperatur, solange sie die 37 °C nicht übersteigt, einen Einfluss auf die Expression auszuüben. Ein Signal ist in der erwarteten Größe zu erkennen. Wesentlich deutlicher tritt die Beeinträchtigung der Expression durch die vorgenommenen Veränderungen beim GST-Protein in Erscheinung. Deutlich erkennbare Signale sind nur unter der Verwendung von 1 mM IPTG und bei 20-30 °C nachzuweisen. Alle anderen Temperaturen und Konzentrationen führen zu keiner merklich ansteigenden Expression des Proteins. Obwohl die Ergebnisse für das Fusionskonstrukt mehr als zufrieden stellend verliefen, gelang die Isolierung und Aufreinigung über die Sepharose-Kügelchen nicht. Es musste daher angenommen werden, dass zwar die für die reine Expression benötigten Bedingungen optimal waren, die für die Lyse und Isolierung des Proteins jedoch noch weiter verbessert werden mussten.

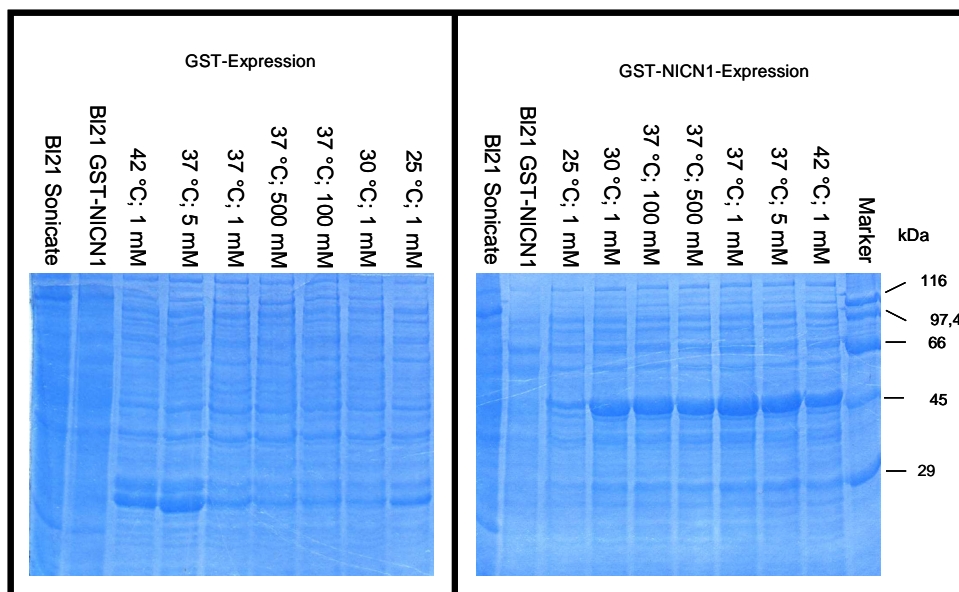


Abb. 3- 33: Optimierung der Proteinexpression

Die beiden Gele zeigen die Optimierungsversuche der Temperatur- und IPTG-Konzentration für die Expression von GST und Nicotin1. Für die Expression von GST konnte eine optimale

Temperatur von 37 °C und 5 mM IPTG ermittelt werden. Die Expression von Nicolin1 konnte durch verschiedene Bedingungen begünstigt werden. Für die nächsten Versuche wurde deshalb eine Inkubationstemperatur von 27 °C und eine IPTG-Konzentration von 0,5 mM gewählt.

Versuch 4

Tab. 3- 12: Bedingungen für das vierte Experiment

Konstrukt	Name	Kultur Vol. [ml]	Temp. [°C]	OD ₆₀₀	IPTG Konz. [mM]	Lysis-puffer 1 [ml]	Lysozym [µl]	PI [µl]	Lysozym Inkubations-Temp. [°C]	Amplitude Ultraschall
GST in BL21	G1	50	27	0.6	0.5	2,55	51	51	10	voll
	G2				1	2,30	46	46	37	halb
GST_NIC NI in BL21	1	10	27	0,6	0,5	2,50	50	50	10	voll
	2					1,15	23	23	10	halb
	3					1,65	33	33	37	Voll
	4					0,90	18	18	37	halb
	5				1	1,00	20	20	10	halb

In einem erneuten Experiment sollten die Aufschlussmethode und die Lyse der Zellen mit Lysozym näher untersucht werden. Hierfür kamen mehrere mit dem Fusionskonstrukt transformierte Bakterienkulturen sowie zwei Kontroll-Kulturen zum Einsatz. Diese exprimierten das GST. Um sicherzustellen, dass die IPTG-Konzentration die Lyse der Zellen in keinem direkten Zusammenhang beeinflusst, wurden neben den unterschiedlichen Aufschlussbedingungen zwei IPTG-Konzentrationen und ein niedriges Kulturvolumen eingesetzt. Die Kultivierung der Bakterien-Lösungen erfolgte zunächst unter normalen Bedingungen bei 37 °C. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6, fanden die Zugabe des IPTGs (Konzentrationen siehe Tabelle 3-12) und die weitere Kultivierung bei 27 °C unter permanentem Schütteln statt. Nach vier Stunden erfolgte der Abbruch der Reaktion auf Eis und die anschließende Lagerung der Bakterienpellets über Nacht bei -20 °C. Es folgten das langsame Auftauen bei Raumtemperatur und die Zugabe von Lysozym und Proteaseinhibitoren. Die darauf folgende Inkubation fand für 10 min bei 10 °C oder 37 °C unter ständigem Schütteln statt. Der weitere Aufschluss der Zellen wurde durch Ultraschall bewirkt, bei dem die auf Eis gekühlten Proben einmal der vollen und einmal der halben Amplitude ausgesetzt wurden. Während der einzelnen hier beschriebenen Phasen wurden 1-ml-Proben entnommen, mit Ladepuffer versetzt und anschließend zur Dokumentation der einzelnen Schritte auf ein SDS-Gel geladen. Die Abbildungen 3-34 zeigt die Ergebnisse nach den einzelnen Behandlungsschritten. Bild A verdeutlicht den Zustand der

Expression nach vier Stunden Stimulation mit IPTG. In allen vier Fällen tauchte ein signifikantes Signal in der gewünschten Größe auf, was auf eine unbeeinflusste Expression des Proteins hinweist. Etwas abgeschwächer und schwammiger erscheinen dagegen dieselben Kulturen nach der Lagerung bei -20 °C und langsamem Auftauen bei RT. Nach der Zugabe von Lysozym und der 10 minütigen Inkubation wird sichtbar, dass auch die Lyse durch Lysozym unter verschiedenen Bedingungen keinen erheblichen Einfluss auf das Fusionsprotein, noch auf das GST hat (Bild B). Wesentlich herausragender sind die Ergebnisse nach der Ultraschall-Behandlung und anschließender Zentrifugation: während das GST-Protein weiterhin in größeren Mengen in den betreffenden Lösungen vorhanden ist, scheint das Fusionsprotein vollständig abgebaut worden zu sein. Anhand des Bandenmusters lässt sich zwar ein Signal in der betreffenden Größe nachweisen. Diese weist nicht dieselbe Intensität wie vor der Ultraschallbehandlung auf. Um sicherzugehen, dass das Protein nicht durch Zentrifugation pelletiert worden ist, erfolgte die Kontrolle der Pellets ebenfalls auf dem Gel (Bild D). Doch hier konnte die Bande aufgrund der schlechten Auftrennung der Proteine nicht nachgewiesen werden.

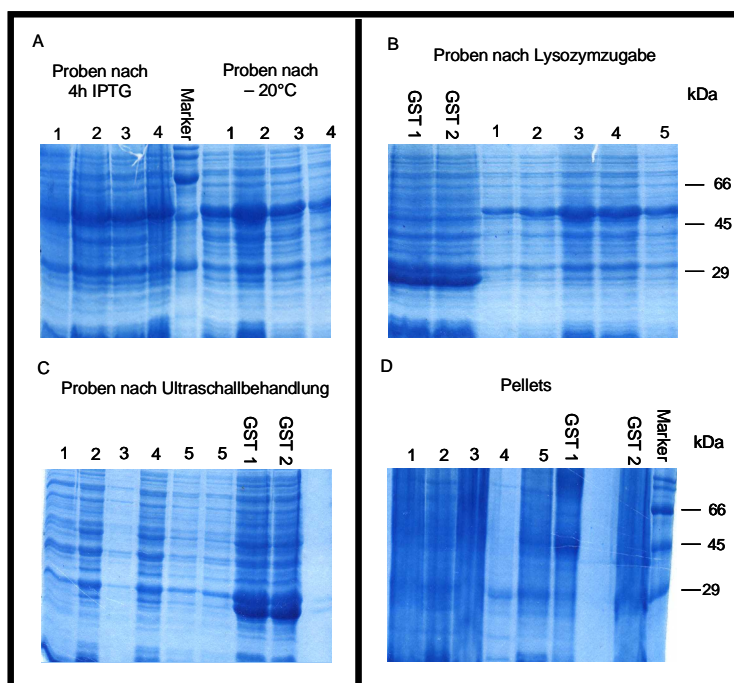


Abb. 3- 34: Expressionsversuch 4

In diesem Versuch sollten die einzelnen Durchführungsschritte näher untersucht werden. Eingesetzt wurden verschiedene IPTG-Konzentrationen. Daneben erfolgte die Lysis bei unterschiedlichen Temperaturen und Ultraschallstärken. Die einzelnen Schritte wurden durch

Entnahme von 1ml-Proben dokumentiert. **A** Die ersten vier Spuren (von links nach rechts) zeigen die vier Proben nach der IPTG-Stimulation. Deutlich zu erkennen ist das starke Signal bei 50 kDa. Nach der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht und nach langsamem Auftauen der Proben bei RT konnte abermals das erwartete Signal nachgewiesen werden. **B** Dieses Gelfoto zeigt neben den GST-Kontrollen auch die Proben nach unterschiedlichen Lysozymzugaben und unterschiedlichen Inkubationstemperaturen. Bei den Proben 1 und 2, bei denen die Inkubationstemperatur bei $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ betrug, hat die Intensität der GST-NICN1-Bande im Vergleich zu den anderen deutlich abgenommen. **C** Die Abbildung verdeutlicht die Ergebnisse nach der Ultraschallbehandlung bei unterschiedlichen Temperaturen. Bis auf die GST-Kontrollen konnten in keine der anderen Spuren noch das Fusionsproteinssignal nachgewiesen werden. Es lag die Vermutung nahe, dass das Protein abgebaut oder es aber durch die Zentrifugation pelletiert worden ist. **D** Die Pelletierung des Proteins konnte durch den Auftrag aufs Gel nicht bestätigt werden.

Versuch 5

Tab. 3- 13: Bedingungen für das fünfte Experiment

Konstrukt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	OD ₆₀₀	IPTG Konzentration [mM]	Lysisbuffer Nr	Lysisbuffer [ml]	Lysozym [μl]	PI [μl]
BL21 GST	30	0,6	0.5	2	2,9	58	435
				3	5	100	750
BL21 GST NICNI	30	0,6	0.5	2	2,75	55	413
				3	5	100	750

Zwei Ursachen könnten den Verlust des Proteins bewirkt haben. Zum einen die geringe Proteaseinhibitor-Konzentration, die den Abbau des Proteins während der Behandlungen nicht verhindern konnte. Der während der Ultraschall-Behandlung unkontrollierbare Temperaturanstieg kann den Abbau des Proteins noch verstärkt haben.

Zum anderen könnte das Protein in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vorliegen, die während der Zentrifugationen pelletiert werden. Diese Vermutungen sollten in einem letzten Versuch geklärt werden. Neben den in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzten Proteaseinhibitoren wurden verschiedene Zentrifugationsschritte eingeführt. Die Bedingungen sind in der Tabelle 3-13 aufgelistet. Zusätzlich erfolgte die Lyse in zwei neuen Puffern mit weniger denaturierenden Eigenschaften.

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte wie in Versuch 4 beschrieben. Stimuliert wurden alle Zellen mit 0.5 mM IPTG, für 4 h bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter permanentem

Schütteln. Nach Abstoppen der Reaktion auf Eis und anschließendem Einfrieren der Pellets über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte die Resuspendierung der bei RT aufgetauten Bakterien in Lysispuffer 2 und 3. Es folgte die Zugabe von Lysozym und Proteaseinhibitoren (siehe Tabelle 3-13) und die anschließende Inkubation für 10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Zellen wurden sonifiziert und vor der Zentrifugation Proben entnommen, die mit Ladepuffer versetzt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Ladung auf das Gel gelagert wurden. Die Zentrifugation erfolgte zunächst für 15 min bei 6000 rpm. Danach wurden erneut Proben entnommen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 6000 rpm. Sowohl von dem Pellet als auch vom Überstand wurden kleine Aliquots abgefüllt. Abbildung 3-35 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Schritte. Nach der Sonifizierung war sowohl ein Signal für das Fusionskonstrukt als auch eines für das GST-Protein vorhanden. Somit führte die Ultraschallbehandlung nicht zum Abbau des Proteins. Nach der ersten Zentrifugation wird deutlich, dass das Fusionskonstrukt pelletiert wurde, während das GST-Protein weiterhin im Überstand verblieb. Dieses konnte erst mit der zweiten Zentrifugation vollständig pelletiert werden. Somit kann die Zentrifugation als Ursache für das im Überstand fehlende Protein herangezogen werden.

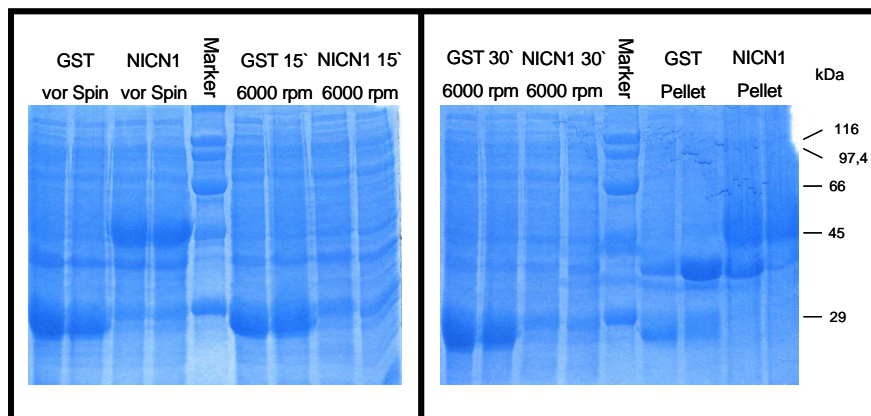


Abb. 3- 35: Optimierung der Zentrifugationsschritte

Aus den vergangenen Versuchen wurde deutlich, dass die Zentrifugationsschritte möglicherweise den Abbau oder den Verlust des Proteins begünstigen. Die ersten vier Spuren (von links nach rechts) zeigen deutlich die Signale des GST- und des Fusionsproteins. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 6000 rpm konnte nur noch die Expression des GST-Proteins dokumentiert werden. In den beiden Spuren des Fusionsproteins ließ sich die gewünschte Bande nicht mehr nachweisen. Auch nach 30 minütiger Zentrifugation bei 6000 rpm ist das Kontrollprotein weiterhin nachweisbar. Wie der Auftrag des Pellets zeigt, scheint das

Fusionsprotein während der ersten Zentrifugation pelletiert worden zu sein. Gleichzeitig muss ein proteolytischer Abbau stattgefunden haben, da die stärkeren Signale in den GST-NICN1-Spuren unter 45 kDa liegen.

3.4.6 Zusammenfassung der Versuche

Aus den einzelnen Experimenten geht folgendes hervor: Ein Wechsel der IPTG-Charge hat entscheidende Veränderungen bei der Expression des Fusionproteins bewirkt. So konnte das Protein zwar exprimiert, aber nicht mehr aus dem Bakterienlysat isoliert werden. Möglicherweise beeinträchtigte die herstellerbedingte Qualität der Chemikalie die Expression und damit die Löslichkeit des Proteins. Was in den Versuchen 2 bis 5 immer wieder auftrat, war der unangenehme Geruch während der Stimulation, der auf die steigende Toxizität des produzierten Proteins zurückzuführen sei. Die Unlöslichkeit des Proteins, die besonders deutlich in Versuch 5 nachgewiesen werden konnte, ist möglicherweise ein Indiz für die Bildung von *inclusion bodies*. Diese werden ebenfalls mit einer zu starken Überexpression und/oder einer Toxizität des Proteins in Verbindung gebracht.

3.5 Erzeugung einer stabilen Zell-Linie

Da die Expression eines Nicolin1-Fusionproteins im prokaryontischen System zu keinem Erfolg geführt hatte, sollte nun auf das eukaryontische Expressionssystem durch die Erzeugung einer stabilen Zell-Linie ausgewichen werden. Etablierte Zell-Linien werden immer dann eingesetzt, wenn rasch wachsende Zellen benötigt oder eine spezielle Fragestellung durch die Modifizierung der Zellen beantwortet werden kann (transgene Zell-Linien, Gen-*Silencing*). In diesem Fall sollte es zu einer transgenen Modifizierung von MDCK-Zellen mit dem Konstrukt NICN1-myc-His kommen. Diese Zell-Linie sollte zum einen Studien ermöglichen, die Aufschlüsse über das Zustandekommen der Kernlokalisierung liefern. Zum anderen kann die Überexpression genutzt werden, um ausreichende Mengen an aktives Protein zu erzeugen. Dieses kann aufgrund seines *Tags* durch paramagnetische Nickel-Kügelchen leicht isoliert und somit anderen Versuchen zugänglich gemacht werden.

3.5.1 Erzeugung des Fusionskonstruktes

Für die Herstellung des Fusionskonstruktes wurde der Vektor pCDNA4/myc-HisB der Firma Invitrogen verwendet. Über die Primer *myc_HisB_Bam* HI und *myc_HisB_Xho* I konnte auf der humanen cDNA ein 700 bp großes Amplifikat erzeugt werden. Dieses besitzt aufgrund der getaggen Primer Schnittstellen für die Enzyme *Bam* HI und *Xho* I, mit denen es in den Leserahmen des Vektors eingeführt worden ist. Nach erfolgreicher Klonierung wurden zwei der erhaltenen Klone durch Sequenzierung auf die Richtigkeit des Inserts hin überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Promotorregion nicht mit dem von Invitrogen angegebenen Promotor übereinstimmt. Da dieser Vektor bereits eingeführte cDNA-Fragmente erfolgreich exprimiert hat und das Insert fehlerfrei in den Leserahmen eingeführt worden ist, wurde dieser Beobachtung keine weitere Bedeutung zugemessen.

3.5.2 Transfektion der MDCK-Zellen

Die Transfektion der MDCK-Zellen erfolgte mittels Lipofektamin, das jeweils mit 24 µg des Konstruktes NICN1-myc-His pro Schale vermischt worden war. Nach 4 Stunden Inkubation erfolgte ein Austausch des Transfektionsmediums durch normales Medium. Die Zellen sahen nach der Transfektion ein wenig geschwächt aus, was sich durch eine leicht abgerundete Form zeigte. Nach 48 h Ruhepause fand die Selektion statt, dazu wurden die Zellen in den Verhältnissen 1:30, 1:15 und 1:10 verdünnt und neu ausgesät und mit der Selektionsdroge Zeozin in einer Endkonzentration von 600 µg/ ml pro Schale versetzt. Um die Konzentration während der gesamten Selektionsphase konstant zu halten, erfolgte der Wechsel des zeozinhaltigen Mediums an jedem zweiten Tag. Um die Auswirkungen der Droge möglichst genau beurteilen zu können, wurde eine untransfizierte Schale MDCK-Zellen ebenfalls der Selektion unterworfen.

Der Einfluss der Droge zeigte sich, im Gegensatz zu der Selektion der ES-zellen mit G418, erst nach ca. 5 Tagen. Innerhalb dieses Zeitraums zeigten die Zellen keine auffälligen Veränderungen und mussten aufgrund des ungehinderten Wachstums zweimal nach Erreichen einer 90 %igen Konfluenz in einem Verhältnis von 1:6 verdünnt und neu ausgesät werden. Erst danach konnten bei den untransfizierten Zellen erste Beeinträchtigungen festgestellt

werden, die sich durch eine lang gestreckte Form der Zellen widerspiegelte. Innerhalb von nur wenigen Tagen (2-3) trat dann unerwartet schnell der vollständige Zelltod ein.

Auch bei den transfizierten MDCKs konnte ein Absterben nach ca. 1,5 Wochen durch das Ablösen vom Schalenboden festgestellt werden. Die Konfluenz erreichte einen Wert von etwa 2 %. Obwohl die Zellen eine gute morphologische, wenn auch kleine Gestalt annahmen, kam es während der gesamten Selektionsphase zu keiner Koloniebildung. Lediglich kleine Ansammlungen von 2-4 Zellen konnten nachgewiesen werden. Aufgrund des fehlenden Wachstums der Zellen wurde der Versuch nach 25 Tagen Selektion abgebrochen.

3.6 Dichtegradientenzentrifugation

Während der Versuche zur Erzeugung eines rekombinanten Proteins in *E.coli* drängte sich die Vermutung auf, dass es sich bei dem Nicolin1-Protein möglicherweise um ein Dimer handelt, welches aufgrund seiner Aktivität und/oder Größe nach der Zell-Lyse pelletiert wird.

Um dieser Frage nachgehen zu können, sollte eine Dichtegradientenzentrifugation mit dem Fusionskonstrukt *NICN1*-myc-His durchgeführt werden. Dessen *Tag* ist wesentlich kleiner und sollte das Nicolin1-Protein nicht beeinflussen. Gleichzeitig kann das Fusionsprotein durch einen vorhandenen myc-Antikörper leichter isoliert und aufgereinigt werden. Besondere Aufmerksamkeit wurde auch dem Lyse- und Dichtegradientenpuffer gewidmet. Seine Bestandteile sollten so mild sein, dass kovalente Bindungen erhalten blieben, damit eine mögliche vorhandene Oligomerisierung des Proteins über die Lyse bis hin zur Dichtegradientenzentrifugation nicht beeinträchtigt wird. Die Wahl fiel auf einen Puffer (Zusammensetzung siehe 2.1.18), der sowohl für die Zell-Lyse, als auch für die Herstellung des Gradienten verwendet wurde. Um sicherzugehen, dass es sich bei den betrachteten Banden um das zu untersuchende Fusionskonstrukt handelt, sollten die einzelnen Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation mittels des vorhandenen myc-Antikörpers immunpräzipitiert werden.

3.6.1 Vorversuch

Zunächst galt es zu klären, wie stark die Expression des Fusionskonstruktes in dem verwendeten Zelltyp ist und wie viele Zellen benötigt werden, um das Ergebnis der Immunpräzipitation (IP) nach Fraktionierung darstellen zu können. Deshalb wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt, in dem zur Dokumentation der Ergebnisse die Zellen radioaktiv markiert wurden und ohne Dichtegradienten durchgeführt werden sollte.

von 4 Schalen mit COS-Zellen wurden mittels DEAE-Dextran-Methode mit jeweils 5 µg *NICN1*-myc-His-Konstrukt transfiziert (siehe 2.2.7.7). Die anderen zwei Platten erhielten an Stelle der DNA lediglich Wasser und dienten damit als Negativ-Kontrolle. Nach der Behandlung erfolgte die Kultivierung unter Standardbedingungen. Die Zellen wurden anschließend mit ³⁵S-markierten Methionine radioaktiv markiert und lysiert. Nach Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte das *Preclearing* der Lysate, um später unspezifische Bindungen zu vermeiden (Abschnitt 2.2.8.3). Nach der Immunpräzipitation fand die Resuspendierung der Kügelchen in 25 µl Ladepuffer und die Auftrennung in einem 12%igen Gel statt. Diese wurde getrocknet und über Nacht zur Exposition auf einen *Screen* gelegt.

In Abbildung 3-36 sind die Ergebnisse des Vorversuchs dargestellt. In der linken Spur sind die zusammengeführten (gepoolten), mit dem Fusionskonstrukt transfizierten Zellen aufgetragen, in der rechten Spur die ebenfalls vereinigten Negativ-Kontrollen. Sehr deutlich hervorstechend ist eine Bande bei einer ungefähren Größe von 29 kDa. Dies entspricht zwar nicht der errechneten Größe des Fusionproteins von 27,7 kDa. Es ist aber auf Grund der starken Intensität und im Hinblick auf die durchgeführte Immunpräzipitation anzunehmen, dass es sich bei dieser um die gewünschte Bande handelt. Damit bestätigt dieser *bandshift* Ergebnisse aus älteren Studien.

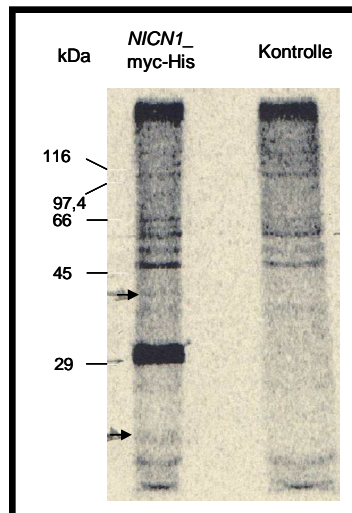


Abb. 3- 36: Vorversuch

Dargestellt ist das Ergebnis des Vorversuches. In der linken Spur ist das durch eine IP aufgereinigten Fusionsprotein NICN1-myc-His aufgetragen. Rechts ist die untransfizierte Kontrolle (ebenfalls durch die IP aufgereinigt) aufgetragen. In beiden Spuren tauchten mehr Banden auf, als erwartet. Dies ist auf eine unspezifische Bindungen an den myc-Antikörper zurückzuführen. Ein starkes Signal tritt bei ca. 32 kDa auf, das vermutlich aufgrund seiner Intensität auf die Expression des Fusionsproteins zurückzuführen ist. Die Pfeile kennzeichnen zusätzlich auftretende Banden, die in der Kontrolle nicht aufzufinden sind. Bei der größeren Bande (ca. 40 kDa) könnte es sich möglicherweise um einen Bindungspartner handeln, während das kleinere Signal möglicherweise auf ein Abbauprodukt des NICN1-myc-His-Proteins zurückzuführen ist.

Auch deutlich hervorgehoben und ebenfalls in der Kontrolle zu erkennen ist eine Bande bei ca. 50 kDa, die dem reinen myc-Antikörper zugeordnet werden kann.

Aus den erhaltenen Ergebnissen wird ebenso ersichtlich, dass der verwendete Antikörper auch an andere unspezifische Proteine bindet und diese präzipitiert. Dies geht aus den in der Kontrolle auftauchenden Banden hervor. Zwei weitere Proteine, eines bei einer ungefähren Größe von 10 kDa und ein anderes von ca. 40 kDa (siehe Pfeil), können in der Kontrolle nicht nachgewiesen werden. Ihre Bedeutung ist unbekannt. Die Vermutung liegt aber nahe, dass es sich möglicherweise bei dem größeren Protein um einen Bindungspartner handeln könnte.

Im Hinblick auf die durchzuführende Dichtegradientenzentrifugation hat der Versuch gezeigt, dass mindestens zwei Schalen pro Präzipitation transfiziert werden müssen, um das Protein in der Silberfärbung darstellen zu können.

3.6.2 Dichtegradientenzentrifugation

Für den eigentlichen Versuch wurden vier Schalen COS-Zellen zunächst mit dem NICN1-myc-His-Konstrukt mittels DEAE-Dextran-Methode transfiziert (siehe 2.2.7.7). Es folgte zunächst die Kultivierung unter Standardbedingungen und die anschließende Lyse der Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die viskose Lösung konnte danach auf den vorbereiteten Gradienten transferiert werden, der aus einer 10 %igen und eine 30%igen Saccharose-Lösung hergestellt worden war. Die Zentrifugation fand bei 4 °C und 12000 rpm über Nacht statt.

Mittels des vorhandenen Gradientenmischers wurde der Inhalt der Zentrifugenröhrchen in 12 Aliquots zu je 1 ml abgefüllt und immunpräzipitiert. Da die Proben durch einen Gradienten aufgetrennt worden waren, konnte auf das *Preclearing* verzichtet werden. Nachdem die Proben mit dem myc-Antikörper und der Protein-A-Sepharose über Nacht präzipitiert worden waren, erfolgte die Elution des Proteins 50 µl Ladepuffer. Die Auftrennung fand auf einem 12 %igen Gel statt. Mittels Silberfärbung konnten die aufgetrennten Banden sichtbar gemacht werden

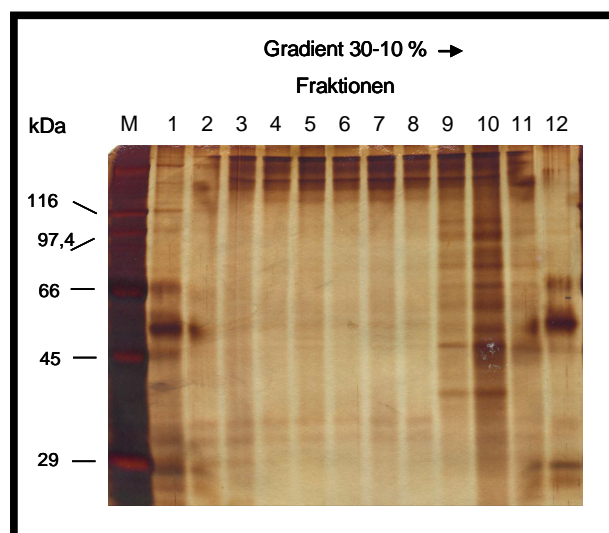


Abb. 3- 37: Dichtegradientenzentrifugation

Die Abbildung zeigt die durch IP isolierten Proteine aus den einzelnen Fraktionen, aufgetragen nach abfallender Saccharose-Konzentration des Gradienten (von links nach rechts). Die einzelnen Fraktionen weisen neben der ersten und der 12. Fraktion keine Banden auf, die dem Fusionsprotein zugeordnet werden konnten. Das starke Signal in der ersten Fraktion lässt darauf schließen, dass das Protein während der Zentrifugation nicht vollständig aufgetrennt,

sondern pelletiert worden ist. Die beiden stärkeren Banden (erste und 12. Fraktion) bei ca. 50 kDa konnte dem myc-Antikörper zugeordnet werden.

Zu erwarten gewesen wäre im Idealfall, dass in mehr als in einer Fraktion eine eindeutige Bande bei 27.7 kDa zu erkennen gewesen wären. Das erhaltenen Gradientenbild zeigt jedoch neben vielen Banden über 30 kDa nur noch zwei Banden in einem Bereich von 29 kDa, die sich in den Fraktionen mit der am höchsten und der am niedrigsten konzentrierten Saccharose-Lösung befanden. Aufgrund der Intensitäten und der bereits aus den Vorversuchen bekannten Bandenverschiebung lässt sich vermuten, dass es sich hier um die gesuchte Bande handelt. Bestätigt wird dies auch durch das ebenfalls deutlich erkennbare myc-Signal bei 50 kDa (siehe Abbildung 3-38). Damit entspricht das Gesamtbild dieser beiden Spuren dem Ergebnis des Vorversuches. Dennoch kann die Frage nach der Oligomerisierung nicht geklärt werden, da in beiden Rand-Fraktionen Banden zu erkennen sind. Es ist anzunehmen, dass die Wahl der eingesetzten Saccharose-Konzentrationen keine Trennung, sondern eine Pelletierung hervorgerufen haben. Aus diesem Grund sollte der Versuch unter den gleichen Bedingungen wiederholt werden. Die einzige Änderung ist die Zusammensetzung des Gradienten, der eine Konzentrationsspanne von 2-15 % umfasst. Hier wiesen die einzelnen Fraktionen keine Trennung auf, die die Einteilung in Einzelbanden gestattete. Lediglich in der Spur mit der höchsten Saccharose-Konzentration ließen sich schwache Signale bei ca. 50 kDa (myc-Antikörper) und 29 kDa (Fusionskonstrukt) ausmachen. Dennoch wird mit diesem Ergebnis die Frage nach der Oligomerisierung offen gelassen.

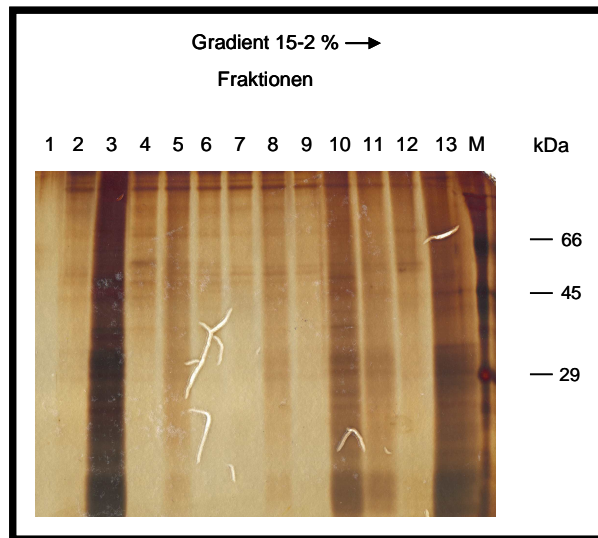


Abb. 3- 38: Dichtegradientenzentrifugation mit einem Gradienten (2-15%)

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der zweiten Dichtegradientenzentrifugation, bei der die Lösung eine Konzentration von 2-15 % aufwies. Die Auftrennung konnte auch hier nicht verbessert werden. Zudem lassen sich keine eindeutigen Einzelsignale nachweisen.

3.7 Charakterisierung der Bandenverschiebung (bandshift) mittels MALDI-TOF

Aus den Ergebnissen der Immunpräzipitation und der Dichtegradientenzentrifugation geht eine Bandenverschiebung der Nicolin1-myc-His-Bande hervor. Das gewünschte Signal tritt bei einer Größe von ca. 29-31 kDa auf und liegt damit höher als die errechnete Bande von 27,7 kDa.

Diese Verschiebung ist möglicherweise auf eine Modifikation des Nicolin1 in der Zelle zurückzuführen und sollte deshalb durch eine MALDI-TOF-Analyse näher charakterisiert werden.

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ermöglicht neben der Sequenzierung von Peptiden auch die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Die Massenanalyse der durch einen Laser erzeugten Ionen erfolgt bei MALDI-TOF-Untersuchungen mittels eines Flugzeitmassenspektrometers, auch TOF(*time of flight*)-Analysator genannt (Abschnitt 1.6). Die Auftrennung findet aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten statt. Die daraus resultierenden Flugzeiten der einzelnen Ionen und ihre m/z -(Masse/Ladungsverhältnis) Werten ergeben dann das Spektrum.

Für diese Analyse wurden mit dem NICN1-myc-His Konstrukt transfizierte COS-Zellen (insgesamt 20 Schalen) unter Verwendung des Gradientenpuffers lysiert. Es folgte die Immunpräzipitation des getaggtten Proteins über den Myc-Antikörper. Das an die Protein-A-Sepharose gebundene und aufgereinigte Protein wurde mittels Ladepuffer eluiert und zur besseren Auflösung auf ein großes 12%iges SDS-Gel geladen. Da eine Überladung der Geltaschen ebenfalls eine Bandenverschiebung auslösen kann, erfolgte die Aufteilung der Proben auf mehrere Spuren.

Üblicherweise werden für die MALDI-TOF-Bestimmung eingesetzten Gele mittels Coomassie-Brilliantblau gefärbt und die betreffenden Banden isoliert. Wie aus den Vorversuchen (Abschnitt 3.6) jedoch hervorging, reichte die Menge an aufgereinigtem Fusionsprotein nicht aus, um eine solche Färbung zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde auf die Silberfärbung zurückgegriffen, trotz der bekannterweise auftretenden Störung im MALDI-TOF.

Um die Beeinflussung der MALDI-Untersuchung dennoch so gering wie möglich zu halten, wurde die Färbereaktion sehr früh abgestoppt und das Gel im Anschluss mehrmals mit Wasser gespült. Aufgrund der besseren Auftrennung der Proben konnten insgesamt drei Banden ausgemacht werden, bei denen es sich um das gewünschte Expressionskonstrukt handeln könnte. In Abbildung 3-39, die eine Spur des erzeugten Gels zeigt, sind die mittels eines sterilen Skalpell isolierten Banden durch einen Pfeil gekennzeichnet.

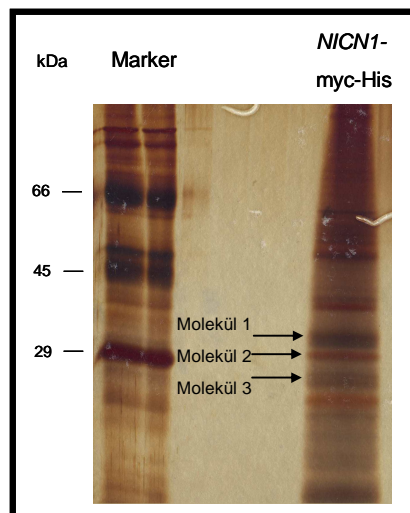


Abb. 3-39: SDS-Gel zur Isolierung der Banden

Die Abbildung zeigt das silbergefärbte SDS-Gel, aus denen die drei Banden (siehe Pfeil) für die Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS isoliert wurden. Aus der Auftragung geht deutlich hervor, dass trotz IP mehr Banden mit dem myc-Antikörper isoliert wurden.

Die einzelnen Gelstücke wurden an der Universität Marburg mittels MALDI-TOF untersucht. Die Tabellen 3-14 zeigen die für jedes Protein nach Spaltung mit bovinem Trypsin erzeugten Massen und ihre Intensitäten, mit denen sie detektiert worden sind. Ebenfalls dazu abgebildet sind die aus den Daten ermittelten Spektren.

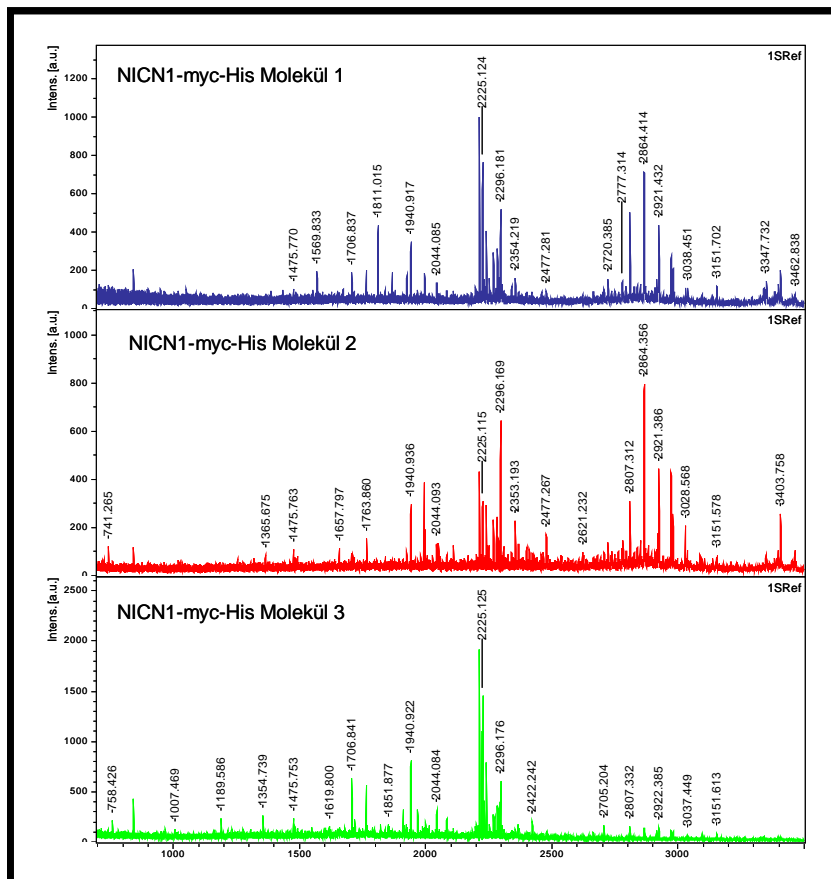


Abb. 3- 40: Spektren der MALDI-TOF-Analyse

Dargestellt sind die einzelnen Spektren der isolierten Nicotin1-Moleküle 1-3, diese entsprechen den Banden, die in Abbildung mit dem Pfeil nach erfolgreicher Immunpräzipitation erhalten und aus einem SDS-Gel isoliert worden sind. Für die Analyse wurden die einzelnen Proteine einer Trypsinspaltung unterzogen. In allen drei Abbildungen fällt ein Peak bei 2225 m/z auf, der aber keinem Peptid des Fusionsproteins zugeordnet werden kann. Auffällig sind auch die fast identischen Peaks in Spektrum A und B. Hier kann davon ausgegangen werden, dass es sich um identische Proteine handelt.

In der Tabelle 3-14 sind die einzelnen Massen/Ladungs-Verhältnisse (m/z)-Werte und die dazugehörigen Intensitäten der drei isolierten Banden dargestellt. Bei den farblich hinterlegten Zahlen handelt es sich um Werte, die sowohl in dem errechneten Spektrum (bunt) als auch bei allen drei Proteinen zu finden

sind (rot). Der Tabelle ist ebenfalls zu entnehmen, dass die diese wenigen nachweisbaren Daten eine zu geringe Intensität aufweisen, um aussagekräftig zu sein.

Tab. 3- 14: Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchung.

NICN1-Molekül1		NICN1-Molekül 2		NICN1-Molekül 3	
m/z	Intens.	m/z	Intens.	m/z	Intens.
1475.77	68.77	1365.675	40.79	1007.469	77.35
1551.808	57.58	1475.763	69.47	1189.586	183.92
1569.833	146.95	1657.797	59.03	1232.586	78.52
1706.837	150.23	1706.862	63.59	1354.739	189.27
1763.852	168.67	1763.86	76.25	1475.753	174.66
1811.015	360.22	1765.762	73.12	1482.738	87.9
1868.023	135.72	1922.941	63.29	1491.755	71.62
1925.034	121.31	1940.936	232.3	1619.8	95.94
1940.917	264.66	1997.974	94.44	1706.841	618.04
1997.959	82.07	2044.093	91.43	1718.875	148.01
2044.085	88.02	2051.019	85.76	1763.853	517
2225.124	600.35	2108.066	76.7	1766.767	109.01
2239.144	290.95	2225.115	237.25	1820.875	93.65
2268.136	186.37	2239.146	220.08	1851.877	126.67
2282.168	236	2268.13	144.09	1910.866	261.1
2287.227	126.66	2282.147	166.88	1923.909	97.21
2296.181	402.8	2287.218	99.18	1940.922	721.77
2354.219	95.29	2296.169	498.11	1967.913	251.14
2459.293	38.48	2353.193	151.24	1997.967	115.16
2477.281	47.29	2477.267	117.22	2044.084	232.39
2720.385	72.27	2621.232	47.72	2225.125	1127.98
2777.314	59.22	2777.305	54.74	2230.208	288.36
2807.37	316.44	2807.312	164.82	2239.144	585.29
2864.414	450.04	2864.356	502.74	2269.136	136.27
2915.58	43.63	2921.386	273.59	2273.053	182.66
2921.432	245.66	2971.555	201.74	2282.16	258.59
2971.629	127.01	2978.405	123.35	2287.173	231.98
2978.478	91.08	3028.568	107.82	2296.176	484.85
3038.451	29.43	3035.426	38.9	2366.221	85.45
3151.702	48.27	3086.571	25.39	2422.242	119.86
3347.732	48.98	3151.578	28.5	2662.355	45.82
3395.948	45.73	3347.668	29.69	2705.204	80.31
3404.614	35.26	3394.749	31.63	2807.332	84.65
3462.838	21.98	3403.758	75.04	2864.35	75.03
		3406.667	49.04	2915.522	40.69
		3461.743	39.46	2922.385	73.02
		741.265	91.6	2971.536	47.77
				2980.399	43.68
				3037.449	26.07
				3151.613	33.92
				758.426	157.82
				969.418	66.58

Vergleicht man die Spektren miteinander so fällt auf, dass die Verteilung der *Peaks*, aber auch die Intensitäten die Massen/Ladungsverhältnis-Intensitäten Werten (Spalte2) sich zwischen Molekül 1 und 2 nicht signifikant unterscheiden, während das dritte Molekül deutliche Abweichungen von diesem Muster aufweist. Man kann deshalb davon ausgehen, dass es sich bei den ersten beiden Spektren um ein und dasselbe Protein handelt. Die leicht abweichenden Intensitäten sind ein Resultat der unterschiedlichen Ionisierung des Moleküls.

Um nach Modifikationen suchen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass es sich zumindest bei einer der drei isolierten Banden um das Fusionskonstrukt NICN1-myc-His handelt.

Bevor die Daten dafür in geeignete Programme eingegeben werden konnten, mussten die Spektren zunächst auf störende *Peaks*, die durch eine mögliche Autoproteolyse des zur Spaltung der Proteine verwendeten bovinen Trypsins untersucht werden. Mit Hilfe des Programms *ProteinProspector 4.0.5 MS-Digest*. (Abschnitt 2.1.21) konnten die Spaltprodukte für das Trypsin erzeugt und die daraus resultierende Massen unter bestimmten vorgegebenen Bedingungen berechnet werden (siehe Tabelle 3-15). Durch einen direkten Vergleich der Werte mit den erhaltenen MALDI-Daten war es möglich, eine Autoproteolyse des Trypsins für alle drei Nicotin1-Fusions-Moleküle auszuschließen, da sich keiner dieser Werte auch unter Berücksichtigung einer gewissen Fehlerrate des Gerätes in den Spektren wieder finden ließ.

Tab. 3- 15: Bedingungen für die massenspektrometrische Bestimmung des Trypsins

Database	Bovines Trypsin
Considered modifications	Oxidation of M
Digest Used	Trypsin
Max. # Missed Cleavages	1
Peptide N terminus	Hydrogen
Peptide C terminus	Free Acid
User AA Formula 1	C3N1O1
Cysteine Modification	unmodified
Instrument Name	MALDI-TOF
Minimum Digest Fragment Mass	800
Maximum Digest Fragment Mass	4000
Minimum Digest Fragment Length	5

Tab. 3- 16: Autoproteolyse des bovinen Trypsins

m/z (mi)	m/z (av)	Mod	Missed Cleavages	Database Sequence
805.4168	805.8715		0	(K) SAASLNSR (V)
906.5049	907.0642		0	(K) NKPGVYTK (V)
1020.5036	1021.1850		0	(K) APILSDSSCK (S)
1046.5958	1047.2071		1	(K) LKSAASLNSR (V)
1111.5610	1112.3446		0	(K) VCNVSWIK (Q)
1153.5741	1154.2702		0	(K) SSGTSYPDLK (C)
1364.6918	1365.6644		1	(K) CLKAPILSDSSCK (S)
1433.7211	1434.6677		0	(K) LQGIVSWGSGCAQK (N)
1495.6157	1496.6249		0	(K) DSCQGDGGPVCVCSGK (L)
1497.7623	1498.7495		1	(K) SSGTSYPDLKCLK (A)
1725.8634	1727.0048		1	(K) VCNVSWIKQTIASN (-)
1999.0475	2000.3855		1	(K) NKPGVYTKVCNVSWIK (Q)
2163.0570	2164.3484		0	(R) LGEDNINVEGNEQFISASK (S)
2193.9949	2195.4935		0	(K) SAYPGQITSNMFCAGYLEGGK (D)
2209.9898	2211.4929	Metox	0	(K)SAYPGQITSNMFCAGYLEGGK(D)
2273.1600	2274.6176		0	(K) SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK (L)
2289.1549	2290.6169	Metox	0	(K)SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK(L)
2321.2076	2322.7086		1	(K) LQGIVSWGSGCAQKNKPGVYTK (V)
2514.3390	2515.9532		1	(K) SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK (S)
2530.3339	2531.9526	Metox	1	(K)SIVHPSYNSNTLNNDIMLIK(S)
2552.2489	2553.9346		0	(R) VASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTK (S)
2803.4226	2805.0934		1	(K) SGIQVRLGEDNINVEGNEQFISASK (S)
2910.3184	2912.2694		1	(K) DSCQGDGGPVCVCSGKLQGIVSWGSGCAQK (N)
3195.4801	3197.6552		1	(K) APILSDSSCKSAYPGQITSNMFCAGYLEGGK (D)
3211.4750	3213.6546	Metox	1	(K)APILSDSSCKSAYPGQITSNMFCAGYLEGGK(D)
3338.6473	3340.7827		1	(K) SAASLNSRVASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTK (S)
3670.5922	3673.0951		1	(K) SAYPGQITSNMFCAGYLEGGKDSCQGDGGPVCVCSGK (L)
3686.5871	3689.0945	Metox	1	(K)SAYPGQITSNMFCAGYLEGGKDSCQGDGGPVCVCSGK(L)
3686.8046	3689.1814		1	(R) VASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTKSSSGTSYPDLK (C)

Die Tabelle 3-17 zeigt die zu erwartenden Massen/Ladungsverhältnis-Werte für die Autoproteolyse des Trypsins unter Berücksichtigung einer nicht vollständigen Spaltung (Missed Cleavage 1). Vergleicht man die erhaltenen m/z-Ergebnisse mit denen der drei Moleküle, so können keine Übereinstimmungen gefunden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Autoproteolyse des Trypsins nicht vorliegt und die erhaltenen Peaks alle auf die zu untersuchenden Moleküle zurückzuführen sind.

Für die eigentliche Identitätsbestimmung der drei Proteine wurde als Vergleich und gleichzeitig als Positiv-Kontrolle ein theoretisches MALDI-TOF-Spektrum

aus der vorhandenen Aminosäuresequenz des Fusionsproteins erstellt, für dessen Erzeugung folgende Voraussetzungen angenommen worden sind :

Tab. 3- 17: Bedingungen für die massenspektrometrische Bestimmung des Nicolin1

In dieser Tabelle sind die Bedingungen aufgelistet, die für die Berechnung des theoretischen Spektrums herangezogen worden sind.

Database	Nicolin1
Considered modifications	Oxidation of M
Digest Used	Trypsin
Max. # Missed Cleavages	1
Peptide N terminus	Hydrogen
Peptide C terminus	Free Acid
User AA Formula 1	C3N1O1
Cysteine Modification	unmodified
Instrument Name	MALDI-TOF
Minimum Digest Fragment Mass	800
Maximum Digest Fragment Mass	4000
Minimum Digest Fragment Length	5

Die dabei erhaltenen Masse-Ladungs-Verhältnisse sind frei von Autoproteolyse-Werten des Trypsins und unter Berücksichtigung einer nicht getroffenen Spaltungsstelle nur auf das Fusionskonstrukt eindeutig zurückzuführen. Sollte es sich bei einem der drei Spektren um das gewünschte Protein handeln, so müssten sich, unter Einbeziehung geringer Gerätefehler, alle *Peaks* in den vorhandenen Spektren wieder finden. In der folgenden Tabelle 3-18 sind alle Massen aufgelistet, die sowohl im errechneten als auch im gemessenen Spektrum auftraten.

Tab. 3- 18: Vergleich zwischen berechnetem und gemessenen m/z-Werten.

In dieser Tabelle sind diejenigen Masse/Ladungsverhältnis-Werte (m/z) gegenübergestellt, die sich unter Berücksichtigung einer gewissen Fehlerrate des Gerätes in beiden Spektren wieder finden lassen. Die rot markierten Zahlen finden sich bei allen drei Molekülen wieder, die anders farbig gekennzeichneten Werte sind molekülspezifisch. Die Menge an Übereinstimmungen zwischen gemessenen und errechneten Spektren und die dazu gehörigen geringen Intensitäten der einzelnen *Peaks*, sind jedoch so gering, dass der Nachweis eines Fusionsproteins bei keinem der drei Moleküle erbracht worden ist.

Nicolin1 Molekül1 m/z Verhältnis		Nicolin1 Molekül 2 m/z Verhältnis		Nicolin1 Molekül 3 m/z Verhältnis	
errechnet	gemessen	errechnet	gemessen	errechnet	gemessen
2775	2777	3083	3086	1993	1940
1993	1940	2775	2777	1923	1923
1923	1925	2618	2621	1907	1910
1702	1706	1993	1940	1718	1718
		1923	1922	1702	1706
		1702	1706	1358	1354

Die rot markierten Zahlen weisen auf die Werte hin, die bei allen drei Spektren gefunden worden sind, während die farbig markierten Werte molekülspezifisch sind. Ihre Aussagekraft ist aber aufgrund der geringen Intensitäten (siehe Tabelle 3-18) zu schwach, um sie einem bestimmten Peptid eindeutig zuzuweisen. Diese minimalen Übereinstimmungen zwischen theoretischem und gemessenem Spektrum reichen nicht für einen Nachweis des gewünschten Konstruktes bei einem der isolierten Banden aus. Um bei dieser Aussage ganz sicher zu gehen, wurden die erhaltenen Werte der analysierten Banden sowie 16 weitere Werte des theoretisch berechneten Massenspektrums (Positiv-Kontrolle) in das Peptid-Massen-Fingerabdruck-Programm *ProteinProspector* 4.0.5 MS-FIT aus dem Internet eingegeben. Diese Suchmaschine findet anhand der eingefügten Masse/Ladungs-Verhältnisse dazu passende Proteine in bekannten Proteindatenbanken auf, in denen auch Nicolin1 hinterlegt ist. Die Ergebnisse dieser Datenbanksuche sind in Tabelle 3-19 dargestellt. Außer der Positiv-Kontrolle gibt keines der drei isolierten Proteine eine Übereinstimmung zu Nicolin1. Damit kann die Aussage, dass es sich bei allen drei isolierten Banden in keinem Fall um das Fusionsprotein handelt, bestätigt werden.

Im ersten Fall handelt es sich um die Daten der „Positiv-Kontrolle“, d.h. der mittels Programm bestimmten m/z-Verhältnisse. Die dafür eingestellten Bedingungen finden sich im Anhang. Im ersten Fall wurden nur 16 von

insgesamt 48 Werten für die Suche verwendet. Dennoch werden diese Peptidsequenzen dem Nicolin1 zugeordnet. Den drei isolierten Proteinen wird trotz Eingabe der gesamten m/z-Werte für jedes Molekül nicht das NICN1 zugeordnet. Damit steht nun eindeutig fest, dass es sich bei diesen Proteinen nicht um das gesuchte Fusionsprotein handelt.

Tab. 3- 19: Nicolin1 (theoretisch berechnet)

No.	#/16(%) Masses Matched	Mean Err ppm	Data Tol ppm	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Protein Name	
1	1.338e+04	75.0	-3.87	14987	24202/6.6	UNREADABLE	gi 14150084 ref NP_115692.1 nicolin1 [Homo sapiens]
2	247	25.0	1.35	685878	90673/9.4	UNREADABLE	gi 7706775 ref NP_057304.1 zinc finger protein (ZFD25) [Homo sapiens]
3	77.2	56.2	-4.40	668306	19265/8.3	HOMO SAPIENS	NPCEDRGP
4	72.1	25.0	1.53	157481	77081/7.0	HOMO SAPIENS	Transferrin
5	18.5	25.0	-9.30	565704	83013/5.8	UNREADABLE	gi 8924238 ref NP_061170.1 tripartite motif protein 36; zinc-binding protein Rbcc728 [Homo sapiens]

Tab. 3- 20: Isoliertes Molekül1

No.	#/23(%) Masses Matched	Mean Err ppm	Data Tol ppm	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Protein Name	
1	71.1	17.4	14.7	1053678	21346/8.6	HOMO SAPIENS	unnamed protein product
2	27.6	17.4	-13.6	1618658	51111/5.5	HOMO SAPIENS	dJ1154G13.1 (novel glycosyl hydrolase family 47 protein)
3	22.8	17.4	-13.6	1675558	60336/5.2	HOMO SAPIENS	C20orf31
4	21.3	17.4	-13.6	749344	64576/5.3	MUS MUSCULUS	unnamed protein product
5	21.3	17.4	-13.6	1759274	64596/5.3	MUS MUSCULUS	unnamed protein product

Tab. 3- 21: Isoliertes Molekül 2

No.	#/37(%) Masses Matched	Mean Err ppm	Data Tol ppm	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Protein Name	
1	151	10.8	11.9	1591292	62211/5.2	MUS MUSCULUS	unnamed protein product
2	109	10.8	11.9	1393068	87144/6.2	MUS MUSCULUS	unnamed protein product
3	109	10.8	11.9	926454	87156/6.2	UN READABLE	gij40254244 ref NP_766355.2 RIKEN cDNA 5830475I06 [Mus musculus]
4	29.4	10.8	23.5	973528	71252/7.9	UN READABLE	gij6755706 ref NP_035648.1 spleen tyrosine kinase [Mus musculus]
5	29.3	10.8	23.5	1128462	71343/7.9	MUS MUSCULUS	Spleen tyrosine kinase

Tab. 3- 22: Isoliertes Molekül 3

No.	#/42(%) Masses Matched	Mean Err ppm	Data Tol ppm	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Protein Name	
1	144	9.5	27.1	742625	33159/5.6	HOMO SAPIENS	SEC14L
2	90.0	11.9	10.7	1752892	93309/5.6	MUS MUSCULUS	unnamed protein product
3	50.8	9.5	27.1	20392	81216/6.1	HOMO SAPIENS	hypothetical protein
4	50.8	9.5	27.1	418107	81278/6.1	UNREADABLE	gij4506867 ref NP_002994.1 SEC14 (S. cerevisiae)-like 1 [Homo sapiens]
5	25.6	9.5	7.56	1268543	65721/9.3	HOMO SAPIENS	KIAA0523 protein

Diskussion

Das *Nicolin1* (*NICN1*) gehört zu den 20000 menschlichen Genen, deren biologische Funktion noch nicht näher charakterisiert ist [Backofen *et al.*, 2002, International Human Genome Sequencing Consortium, 2001]. Das Gen besteht aus 6 Exons, die eine genomische Sequenz von 6 kb umfassen. Es codiert für ein 213 Aminosäuren langes säugerspezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa, welches keine Homologien zu einer bekannten Proteinfamilie aufweist [Leeb, *et al.*, 2000a]. Das Protein besitzt weder ein N-terminales Signal für die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum noch konnte eine hydrophobe Transmembranregion entdeckt werden, die als Membran-Anker fungieren könnte. Experimente mit einem GFP (*green fluorescent protein*)-*NICN1*-Fusionprotein machten auf die Kernlokalisierung des Proteins aufmerksam, die ohne eines der bekannten Kernerkennungssignale stattfindet [Backofen *et al.*, 2002]. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des Proteins zu bestimmen und das Zustandekommen der Kernlokalisierung näher zu studieren. Hierfür standen verschiedene Techniken zur Verfügung: Eine neuere Methode ist die Phylogenomik. Sie bezeichnet die Nutzung der phylogenetischen Analyse verwandter Sequenzen für die vorläufige Bestimmung „funktionsloser“ Gene unter Einbeziehung von Gen- bzw.

Speziesstämmen [Mittenhuber, 2002]. Da dies für das *Nicolin1*-Gen aufgrund von fehlenden Homologien nicht möglich war, wurde die Erzeugung einer *Nicolin1*-Knockout-Maus angestrebt. Diese Methode ermöglicht die Analyse der Funktion durch die Deletion essentieller Bereiche des Gens nach homologer Rekombination [Mansour *et al.*, 1988, Catenhusen *et al.*, 1989]. Entwickelt wurde ein konditionales Knockout-Konstrukt [Kilby *et al.*, 1993], mit dessen Hilfe eine zeitliche Deletion des Gens möglich ist. Die Generierung der Knockout-Maus war jedoch nur bis zur Selektion der ES-Zellen möglich, da ein frühzeitiger Zelltod die weitere Entwicklung verhindert hatte. Gründe dafür werden in den folgenden Abschnitten näher diskutiert.

Um das Zustandekommen der Kernlokalisierung aufzuklären, war die rekombinante Expression des Fusionsproteins GST-NICN1 in *E.coli* vorgesehen. Ein Chargenwechsel beim Stimulationsmetaboliten IPTG führte jedoch vermutlich zu einer toxischen Überexpression des Gens. Diese hatte die Ausbildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) zur Folge, aus denen das Protein für weitere Untersuchungen nicht isoliert werden konnte. Die Möglichkeit, auf ein eukaryontisches Expressionssystem auszuweichen, gelang ebenfalls nicht, da hier vermutlich eine Überexpression des NICN1-myc-His-Konstruktes letal wirkte.

Die MALDI-TOF-Analyse und die Dichtegradientenzentrifugation wiesen darauf hin, dass es sich entweder nicht um das gewünschte Fusionsprotein handelt, oder eine posttranslationale Modifikation in Form einer Proteolyse die erhaltenen Ergebnisse beeinflusste.

4.1 Generierung einer *Nicolin1*-Knockout-Maus

Die Einführung eines Knockout-Konstruktes führt zum Zelltod.

4.1.1 Targeting-Strategie

Für die Modifikation von Genen in Mäusen gibt es zwei gebräuchliche Methoden. Das *Gene targeting* macht sich die Deletion eines bestimmten Genlokus zunutze. Beim *Gene silencing*, auch als RNAi- oder *knockdown*-

Technik bezeichnet, erfolgt die Modifikation auf posttranskriptionalen Weg [Tiscornia *et al.*, 2003; Voorhoeve *et al.* 2003]. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Transfektion von Einzel-Embryonen mit DNA-Molekülen, die ohne Keimbahntransmission, ES-Zell-Manipulation und Injektion von ES-Zellen in Mäuseembryonen auskommt. Der Nachteil ist die Beeinflussung des Phänotyps, wenn durch zufällige Integration die Funktion benachbarter Gene deletiert werden. Die Identifizierung der transgenen Tiere, die eine variierende Kopienanzahl der RNAi-Konstrukte exprimieren, erfolgt über die parallele Untersuchung der genetisch inhomogenen Populationen. Deren *Screening*-Methoden sind im Vergleich zum *Gene targeting* noch nicht weit entwickelt. Aus diesem Grund erfolgte die Funktionsanalyse des *Nicolin1*-Gens mittels der Knockout-Maus-Technik.

Der Funktionsverlust des *Nicolin1*-Gens sollte durch die Deletion der angenommenen Promotorregion und des ersten Exon erfolgen. Dies entspricht dem klassischen Schema, bei dem nach homologer Rekombination der essentielle Bereich des Gens durch den positiven Selektionsmarker ersetzt wird [Deng *et al.*, 1993]. Häufige Anwendung als Marker findet das für die Neomycinphosphotransferase codierende *neo*-Gen [Adra *et al.*, 1987]. Sein Nachteil besteht in der Beeinflussung benachbarter Gene [Olson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997]. Durch den geringen Abstand zum *AMT*-Gen wurde die *neo*-Kassette deshalb im *Nicolin1*-Knockout-Konstrukt durch konditionale Elemente flankiert (*FRT*), die nach Selektion der positiven Klone eine Entfernung des Gens erlauben [Kilby *et al.*, 1993]. Im weiteren Verlauf sollte der *Targeting*-Vektor durch Elektroporation in ES-Zellen überführt werden. Nach Integration des genetisch veränderten Materials durch homologe Rekombination in das Genom kommt es zur Selektion und Genotypisierung der Zellen. Durch den Transfer der positiven ES-Zellen in Blastocysten und anschließendem Transfer in scheinchwangere Mäuse entstehen Chimären. Sind die ES-Zellen an der Ausbildung der Keimzellen beteiligt, werden einige Nachkommen der Chimären heterozygot für die Mutation sein [Hogan *et al.*, 1994]. Diese Mäuse würden weiter zu homozygoten Tieren verpaart werden, bei denen in allen Zellen das modifizierte Gen auf beiden Allelen vorhanden ist. Zur Aktivierung des Knockouts käme es dann zur einer Verpaarung mit Tieren, die die Cre-

Rekombinase exprimieren. Das Resultat wären *Nicolin1*-defiziente Knockout-Mäuse.

Der Nachteil dieser Methode beruht auf dem Einsatz von ES-Zellen mit geringer Passagenanzahl [Nagy *et al.*, 1993]. Höhere Passagen weisen eine eingeschränkte Pluripotenz auf. Diese wiederum führt zu einem geringen modifizierten ES-Anteil in der chimären Maus.

Zusätzlich liefern nur bestimmte ES-Zell-Linien lebensfähige, fertile Nachkommen, deren Gewebe sich überwiegend aus den modifizierten ES-Zellen ableiten [Nagy *et al.*, 1990].

Daraus abgeleitet wurde für die Erzeugung der *Nicolin1*-Knockout Maus ES-Zellen der Linie 129/OlaHSD/ E14TG2a verwendet, die eine maximale Anzahl von insgesamt 19 Passagen nicht überschritten.

4.1.2 Generierung der *Nicolin1*-Knockout-Vektoren

Ein *Targeting*-Vektor wird so konstruiert, dass er eine Mutation an einem bestimmten chromosomalen Locus zur Folge hat. Wichtige Bestandteile des Konstruktes sind die homologen Arme, ein Plasmidrückgrat und Selektionsmarker [Hogan *et al.*, 1994]. Die Rekombination erfolgt durch die homologen Bereiche und führt zur Integration des fremden Genmaterials in das Chromosom [Mansour *et al.*, 1988]. Es existieren zwei Vektortypen, die die Grundlage für alle *Targeting*-Konstrukte in säugerspezifische Zellen liefern: der *Replacement*- und der *Insertions*-Vektor [Torres und Kuhn, 1997]. Untersuchungen zeigten, dass die Integrationsfrequenz trotz gleich gestalteter homologer Arme beim *Insertions*-Vektor um das 5- bis 20-fache höher als beim *Replacement*-Vektor ist [Hasty *et al.*, 1991]. Dennoch führt sie weder zu einer gesteigerten Produktion von spezifischen Integrationen pro erzeugten Klonen noch ist die *Screening*-Methode leichter durchzuführen. Aus diesen Gründen erfolgte die Generierung des *Nicolin1*-Knockout-Konstruktes auf den Grundlagen des *Replacement*-Vektors.

Die *Targeting*-Frequenz ist eng an die Länge der homologen Arme gekoppelt, die für die richtige Integration eine minimale Größe von 1 kb aufweisen sollten [Hasty *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 1992]. Aufgrund des starken Vorkommens von repetitiven Elementen musste das empfohlene Mindestmaß für den kurzen

homologen Arm des *Nicolin1*-Knockout-Konstruktes auf 717 bp herabgesenkt werden, während der zweite homologe Bereich eine Sequenz von 6159 bp umspannt.

Nicht nur die Länge der Arme korreliert eng mit der *Targeting*-Frequenz [Hasty *et al.*, 1991, Deng und Capecchi, 1992], auch die Häufigkeit von auftretenden Polymorphismen zwischen Target und Konstrukt beeinflussen die Integration negativ [Deng und Capecchi, 1987]. Um diesen Effekt vorzubeugen, erfolgte die Amplifizierung der einzelnen Konstrukt-Fragmente auf einem Klon (Pac-Klon RPCI21 469L13 im Vektor pPAC4 von der Mauslinie 129S6/SvEvTac), der einer ähnlichen Mauslinie entstammt wie die später verwendeten ES-Zellen. Durch die Verwendung einer *Proofreading*-Polymerase (PfuTurbo, Stratagene) und durch die anschließende Sequenzierung der einzelnen Konstruktzwischenstufen konnte sichergestellt werden, dass Vektor und Zielsequenz an den entsprechenden Stellen vollkommen identische Sequenzen aufwiesen.

Wie die Ergebnisse der Expressionsversuche in Abschnitt zeigen, wird *Nicolin1* auch während der Embryogenese ubiquitär exprimiert. Um zu verhindern, dass sich ein konstitutiver Knockout des Gens letal auf die Entwicklung der ES-Zellen auswirkt, wurden konditionale Elemente eingeführt. Diese Genschalter ermöglichen die Deletion und damit den Funktionsausfall des *NICN1*-Gens zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt [Kilby *et al.*, 1993]. Die aus dem Bakteriophagen P1 stammenden Erkennungssequenzen *loxP* der Rekombinase Cre flankieren dabei den essentiellen Bereich um das erste Exon, sowie das positive Selektionsmarkergen *neo* [Sauer *et al.*, 1989]. *Neo* wird gleichzeitig von den Erkennungssequenzen *FRT* der aus der Hefe stammenden Flp-Rekombinase umgeben [O`Groman *et al.*, 1991]. Diese sollen später die Deletion des *neo*-Gens nach erfolgreicher Selektion sicherstellen, damit der negative Einfluss des Selektionsmarkers auf benachbarte Gene so gering wie möglich bleibt [Olson *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997]. Am häufigsten werden zur gleichzeitigen Entfernung des essentiellen Bereiches sowie des positiven Selektionsmarkers drei *loxP*-Elemente eingesetzt. Das Ergebnis der homologen Rekombination nach transienter Transfektion eines Cre-Expressionsplasmids führt zu zwei Produkten. Zum einen entsteht ein konditionales Allel, mit einem geflochten kodierenden Genabschnitt. Zum anderen wird ein Knockout-Allel

erzeugt, dessen gefloxter essentieller Bereich deletiert worden ist. Der Nachteil hierbei ist, dass *neo* erst zu dem Zeitpunkt deletiert wird, zu dem auch der Knockout hervorgerufen wird. Für die Deletion des *Nicolin1*-Gens würde dies bedeuten, dass genug Zeit vorhanden ist, in der *neo* mit anderen Genen negativ interferieren könnte. Um dies zu verhindern, erfolgte die Flankierung des positiven Selektionsmarkers mit den *FRT*-Sequenzen. Da die Effizienz der Flp-Rekombinase niedriger im Vergleich zu Cre ist, wurde *neo* zusätzlich gefloxt (Abbildung 3-1).

Die Erkennungssequenzen der Rekombinasen Cre und Flp sind jeweils 34 bp lang und bestehen aus einem asymmetrischen Zwischenstück, das dem Element die Orientierung gibt [Hoess *et al.*, 1984]. Flankiert wird dieser Bereiche durch zwei palindrome Sequenzen, die aus jeweils 13 bp bestehen. Unbrauchbar für die Rekombinasen werden diese Erkennungssequenzen, wenn Punktmutationen vorliegen [Langer *et al.*, 2002]. Die Frequenz der spontanen Mutagenese in *E.coli* ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu 10^{10} Basenpaaren pro Replikation relativ niedrig [Lindahl, 1993]. Da sie dennoch stattfinden kann, wurden die *loxP*- und *FRT*-Sequenzen nach Plasmid-Präparation aus *E.coli* mittels Sequenzierung überprüft.

Der asymmetrische Aufbau des *Replacement*-Vektors aus einem langen und einem kurzen homologen Arm ermöglicht das Durchmustern der positiven Klone mittels PCR [Hasty *et al.*, 1999]. Die Primer müssen dabei zwischen dem gewünschten Ereignis, einer illegitimen Rekombination und dem Wildtyp-Allel unterscheiden [Hasty *et al.*, 1999]. In den meisten Fällen wählt man für die Position der Primer einen Bereich außerhalb des *Targeting*-Ereignisses und eine Bindungsstelle im positiven Selektionsmarker. Daraus abgeleitet, wurden insgesamt zwei *Forward*-Primer (KO_1 und KO_2) und drei *Reverse*-Primer (KO-FRT, KO_oxP und KO_neo) entwickelt. Letztere binden in den ersten konditionalen Elementen und zusätzlich im positiven Selektionsmarkergen. Die Auswahl der Position richtet sich nach der Schmelztemperatur, dem Vorkommen von repetitiven Elementen und der Möglichkeit, das Produkt innerhalb kürzester Zeit zu amplifizieren. Um die PCR schon vor dem eigentlichen Durchmustern zu testen und zu optimieren, erfolgte die Generierung eines hypothetischen Konstruktes, das ein positives

Integrationsereignis simuliert. Die dort ermittelten PCR-Bedingungen konnten dann ohne Einschränkung auf das eigentlich Ereignis übertragen werden.

Neben der PCR können die positiven Klone auch über Southern-Blot nachgewiesen werden [Hasty *et al.*, 1999]. Wichtige Voraussetzung hierfür ist, dass die Schnittstelle des Vektors und die Position der Sonde jede Art der Integration unterscheiden kann [Hasty *et al.*, 1999]. Optimale Ergebnisse ergeben sich aus der Wahl von externen Sonden und extern schneidenden Restriktionsenzymen. Jede andere Kombination kann bei bestimmten Ereignissen zu falsch positiven Ergebnissen führen [Hasty *et al.*, 1999]. Für das *Nicolin1*-Gen konnte weder eine externe Sonde noch ein extern schneidendes Restriktionsenzym gefunden werden (Abschnitt 3.1.7.1). In vielen Fällen waren die mit den Enzymen erzeugten Fragmente so groß, dass eine Auftrennung im Gel nicht möglich war. Verwendet werden konnte nur die Restriktionsendonukleasen, die schon für die Konstruktion des Vektors herangezogen worden waren. Damit war auch die Position der Sonde vorbestimmt. Diese ermöglicht, trotz ihrer internen Position, einen eindeutigen Nachweis der mittels *Hind* III und *Xho* I gespaltenen Enzyme, wie eine Kontrollhybridisierung mit ES-Zell-DNA beweisen konnte.

4.1.3 Generierung von rekombinanten Klonen

Die Herstellung des *Nicolin1*-Knockouts sollte auf dem genetischen Hintergrund von 129SV-Mäusen erzeugt werden. Diese gehörten neben LT-Mäusen zu den ersten Stämmen, die zur Gewinnung von ES-Zellen aus Embryonen eingesetzt worden waren [Stevens, 1983]. Obwohl sich die Methoden auch auf andere Mausstämme erweitert haben [Robertson *et al.*, 1983], gehören 129-ES-Zellen zu den meist verbreiteten und eingesetzten Zell-Linien [Hasty *et al.*, 1999]. Der 129-Stamm ist aus einer komplizierten Geschichte der Kreuzungen und Entwicklung verschiedener Substämme hervorgegangen [Simpson *et al.*, 1997]. Aus diesen konnten viele ES-Zell-Linien mit unterschiedlichen genetischen Markern abgeleitet werden [te Riele *et al.*, 1992, Deng und Capecchi, 1992]. Die Kenntnis über die vorkommenden Unterschiede zwischen den einzelnen Substämmen ist von besonderer Bedeutung:

1. Der Genotyp einer ES-Zell-Linie legt den Marker fest, mittels dessen die Chimären überprüft werden können.
2. Die Effizienz eines *gene targeting* hängt stark von der Isogenie der DNA zwischen Konstrukt und Target ab. Polymorphismen im genetischen Background können den Erfolg des *Targetings* entscheidend beeinflussen.

Die Wahl der ES-Zell-Linie für das *Nicolin1*-Knockout-Konstrukt richtete sich zusätzlich nach dem in Wien vorhandenen ES-Zell-Stamm. Bei diesem handelt es sich um den Substamm 129/OlaHsd und der daraus hervorgegangenen Zell-Linie E14TG2a. Für die Generierung des Konstruktes stand der Substamm 129/SvEvtac, aus dem die Zell-Linie W4 abgeleitet worden ist, zur Verfügung. Obwohl es sich hierbei um unterschiedliche Substämme handelt, konnten in der Literatur keine Hinweise über vorkommende Sequenz-Längen-Polymorphismen (SSLPs = *simple sequence length polymorphisms*) gefunden werden. Die DNA zwischen den beiden Stämmen wurde deshalb als isogen betrachtet.

Für den herkömmlichen Transfer von DNA in den ES-Zellen stehen die Elektroporation [Neumann *et al.*, 1985], retrovirale Transfektion [Stewart *et al.*, 1985] und die Methode mittels des Trägerstoffes Lipofektamin [Strauss und Jeanisch, 1992] zur Verfügung. Am häufigsten findet die Elektroporation Verwendung, da sie am einfachsten durchzuführen ist. Bei dieser Methode werden Zellsuspensionen in Gegenwart einer DNA-Lösung einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt [Gassen und Schrimpf, 1999]. Dadurch werden in den Zellmembranen Poren erzeugt, durch welche das DNA-Material in die Zelle gelangen kann [Sukharev, 1994]. Die Bildung der Poren ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Zellmembran stellt eine Isolierung des leitfähigen Cytoplasmas dar. Der elektrische Strom kann deshalb nur so lange durch die Zelle fließen, bis Poren in der Membran entstanden sind [Gassen und Schrimpf, 1999]. Wird nun elektrische Spannung angelegt, kommt es zu einer Polarisierung der Zellmembran. Erreicht die transmembranäre Spannung einen kritischen Wert, kommt es durch eine lokale Zerstörung der Membranintegrität zur drastischen Erhöhung ihrer Leitfähigkeit [Gassen und Schrimpf, 1999]. Dabei wandeln sich die hydrophoben Poren spontan in hydrophile um. Diese besitzen eine Lebensdauer von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten

[Sukjarev, 1994]. Durch Beteiligung von weiteren Proteinen kann dieser Zustand stabilisiert werden und die DNA entweder durch Diffusion oder unter Beteiligung von Elektrophorese in die Zelle gelangen [Gassen und Schrimpf, 1999]. Für die Wiederherstellung des Ausgangszustands müssen die Poren geschlossen werden. Dabei spielt neben der Temperatur vor allem die Zusammensetzung des Elektroporationsmediums eine Rolle. Führt das Medium zum kolloidosmotischen Anschwellen der Zelle, kann diese platzen [Gassen und Schrimpf, 1999]. Durch die Zugabe von Dextran oder Serum kann die Zerstörung der Zelle verhindert werden. Der einzige Nachteil dieser Methode ist die niedrige Effizienz der stabilen Transfektion, die zwischen 10^{-3} und 10^{-4} liegt und von den verwendeten Selektionsmarkern im Konstrukt abhängig ist [Matiese *et al.*, 1999].

Für die Transfektion der *Nicolin1*-Knockout-Konstrukte standen zwei Elektroporationsmaschinen zur Verfügung. Bei dem ersten Modell, dem *Gene Pulser*, handelt es sich um eine ältere Technik, die von der Firma *BioRad* vertrieben wird. Mit diesem Gerät ist es möglich, zwischen mehreren etablierten Programmen zu wählen oder die Elektroporationsbedingungen nach eigenen Erfahrungen zusammenzustellen. Die detaillierte Anzeige gibt dabei einen Überblick über die gewählte Pulsstärke (kV) und den Kondensatorkapazität. Beide werden durch das verwendete Elektroporationsmedium bestimmt. Der Nachteil dieser Technik liegt in der Art und Stärke des Pulses, die ausschließlich die Zellmembran für die DNA-Moleküle durchlässig machen. Damit die Konstrukte auch in den Zellkern, ihrem eigentlichen Wirkungsort, gelangen, muss sich die Zelle teilen. Dieses geschieht aber erst einige Stunden nach der Transfektion, da die Zellen sich erst wieder adaptieren müssen. In dieser Zeit werden die DNA-Moleküle im Cytosol abgebaut. Damit nimmt die Zahl der elektroporierten Konstrukte in der Zelle ab. Die neuere Technik der Firma *AMAXA* ermöglicht während des elektrischen Pulses die Durchlässigkeit der Kernmembran. Damit gelangen mehrere Konstrukte frühzeitig in den Kern. Nachteil dieser Methode ist, dass der Hersteller keine Angaben über das verwendete Elektroporationsmedium, die Pulsstärke und die Kondensatorkapazität macht. In dieser Arbeit kamen beide Systeme zum Einsatz, mit unterschiedlichem Erfolg: Die Morphologie der ES-Zellen nach Transfektion und später nach Selektion entsprach mehr dem gewünschten Bild

bei den *AMAXA*-transfizierten Zellen. Elektroporationsmedium und Pulsstärke schienen so aufeinander abgestimmt zu sein, dass kaum eine Beeinträchtigung der Zellen nachzuweisen war. Einige Stunden nach dem Transfer konnte ein Zellwachstum beobachtet werden, während die mit dem *Gene Pulser* behandelten Zellen mindestens einen Tag länger brauchten, um sich zu adaptieren.

4.1.4 Mögliche Gründe für den ES-Zelltod während der Selektion

Die Selektion der Zellen erfolgte über die Zugabe von Geneticin in das Medium 48 h nach der Transfektion. Bei den ersten beiden Elektroporationsversuchen konnte ein abnormales Verhalten der *Feeder*-Zellen beobachtet werden. Diese lösten sich nicht wie gewünscht punktuell, sondern in einem Zellfilm von der Platte ab. Die Ursachen lagen hier eindeutig in dem verwendeten Selektionsmedium. Das von der Firma Gibco angebotene Knockout-Medium minimiert neben der enzymatischen Aktivität von Trypsin auch den Einfluss der Selektionsdroge. Durch das Ablösen der *Feeder*-Zellen wurden die daran haftenden ES-Zellen mitgerissen. Diese konnten sich aufgrund des umherschwimmenden *Feeders* nicht an dem Plattenboden absetzen und wurden deshalb bei jedem Mediumwechsel mit entfernt.

Über die Ursachen der weiteren fehlgeschlagenen Elektroporationsversuche lassen sich nur Vermutungen äußern. Bestätigungen konnten jedoch keine gesammelt werden. Hinzugezogenen Kollegen, die über eine langjährige Erfahrung in der Knockout-Technik verfügen (Herr Prof. Gossler und Herr Prof. Pfeffer), konnten ebenfalls keine plausible Erklärung für den frühzeitigen Zelltod finden.

Mit der durchgeführten Testtransfektion in embryonale Fibroblasten konnte zum einen gezeigt werden, dass die stabile Integration in das Genom möglich ist und es zur Ausbildung von Kolonien kommen kann. Zum anderen führt der Transfer der *Nicolin1*-DNA zu einer massiven Beeinträchtigung der Lebensbedingungen der Zelle, die sich deutlich in der Morphologie, im Wachstum und in der Kolonienanzahl äußerten. Diese Beobachtungen konnten unabhängig bei allen eukaryontischen Zellen gesammelt werden, die mit einem *Nicolin1*-Konstrukt transfiziert wurden.

Mögliche Gründe für den Zelltod sollen im Folgenden näher diskutiert werden:

1. Überexpression Eine mögliche Ursache könnte die Toxizität des überexprimierten *Nicolin1*-Gens sein. Linearisierte DNA-Moleküle werden, sobald sie sich im Kern befinden, translatiert und die Gene exprimiert. Durch die *AMAXA*-Technik war es möglich, viele dieser Konstrukte in die Zelle zu schleusen. Wenn es sich bei *Nicolin1* um ein sehr stark reguliertes, nur in definierten Mengen vorkommendes Protein handelt, könnte die vermehrte Expression des Gens das Konzentrationsgleichgewicht empfindlich gestört haben. Zu berücksichtigen ist auch, dass *Nicolin1* während der Embryogenese ubiquitär exprimiert wird (Abschnitt 3.3.2) und möglicherweise entscheidend zur Entwicklung beiträgt. Geringe Konzentrationsschwankungen des Proteins könnten somit letale Folgen auch für die Entwicklung der ES-Zellen haben.
2. Knockout-Konstrukt: In den Versuchen konnte eine Abhängigkeit zwischen der Kolonienanzahl und dem verwendeten Konstrukt festgestellt werden. Der dabei maßgebliche Unterschied besteht in dem verwendeten negativen Selektionsmarker. Das DT-Gen wird im Gegensatz zur Thymidin-Kinase nicht durch einen externen Metaboliten „aktiviert“, sondern führt nach illegitimer Rekombination zur toxisch wirkenden Expression der A-Untereinheit. Normalerweise benötigt das Toxin die B-Untereinheit, um die Zellemembran zu überwinden. Möglicherweise reicht der durch die Elektroporation beeinträchtigte Zustand der Zellen aus, die aus den lysierten Zellen freigewordene A-Untereinheit über Diffusion aufzunehmen.
3. Das neo-Gen: Eine weitere Annahme bestand darin, dass eine Mutation im *neo*-Gen und der daraus resultierende Resistenzverlust zum Absterben der Zellen geführt hat. Unterstützt wurde diese Theorie zunächst aus der Beobachtung, dass die Zellen während der Selektion nicht an Größe gewonnen hatten. Die Sequenzierung erbrachte jedoch den Beweis, dass sich keine Mutationen in diesem Bereich befanden.

Ebenfalls wahrscheinlich ist die in der Literatur häufig beschriebene negative Interferenz des *neo*-Gens mit benachbarten Genen des Zielgens.

4. Polymorphismen zwischen den gewählten Stämmen: Wie bereits erwähnt, konnten in der Literatur keine Hinweise entdeckt werden, die die Isogenie zwischen der DNA der beiden 129-Substämme anzweifeln. Im Gegensatz dazu sind Elektroporationsversuche bekannt, in denen kein positives Integrationsereignis nachgewiesen werden konnte, wenn ein aus dem Stamm 129/SvJ abgeleitetes Konstrukt in eine 129/Sv-ES-Zell-Linie transfiziert wurde. Dieser Genort erschien „*untargetable*“. Erfolgte die Transfektion desselben Konstruktes in die Hybrid (129/Sv- +^{c-Tyr} +^P x129/SvJ)F₁ES-Zell-Linie, kam es zur homologen Rekombination zwischen Zielgen und Konstrukt [Bultmann und Magnuson, 1999]. Diese Versuche weisen darauf hin, dass die Isogenie zwischen den einzelnen Substämmen nicht immer gegeben ist.
5. Schwer zugänglicher Genort: Es existieren Genorte, die aufgrund von strukturellen Eigenschaften der DNA nicht so leicht für eine homologe Rekombination zugänglich sind (Dr. Marina Karaghiosoff, persönliche Mitteilung). Dies müsste jedoch im Vergleich zu der Kontrolltransfektion in MEFs bedeuten, dass die DNA hier eine andere strukturelle Umgebung aufweist als in den ES-Zellen. Beweise oder Literaturhinweise konnten für diese Vermutung jedoch nicht gesammelt werden.

4.1.5 Neue Knockout-Konstrukte

Mit Hilfe der neuen Konstrukte für das *Nicolin1*-Gen können einige der oben angeführten Vermutungen näher analysiert werden. Da nicht geklärt werden konnte, ob das Diphtherie-Toxin ebenfalls zum beobachteten Zelltod beigetragen hat, erfolgte die Ausstattung der neuen Knockout-Konstrukte ausschließlich mit dem *TK*-Gen als negativem Selektionsmarker. Gleichzeitig wurde die vorhandene *neo*-Kassette in allen Vektoren durch ein bereits

mehrmals erprobtes *neo*-Gen ersetzt, dessen Leserahmen sich in entgegengesetzter Orientierung zu den anderen Elementen befindet.

cDNA-Konstrukte

Mit ihrer Hilfe lässt sich nachvollziehen, ob die Überexpression für die Letalität der Zellen verantwortlich ist. Gleichzeitig handelt es sich bei den Plasmiden Rapalog und pEFZeo um Vektoren, die häufig zur Herstellung stabiler Zell-Linien auch aus schwer zu transfizierenden Zellen eingesetzt werden.

Konstitutiver Vektor

Der konstitutive Vektor ist nach dem klassischen und einfachsten Schema eines Knockout-Konstruktes konstruiert worden. Das positive Selektionsmarkergen *neo* zerstört nach homologer Rekombination einen großen Bereich des *Nicotin1*-Gens. Der dadurch erzeugte Funktionsausfall kann die Studie eines bereits erkennbaren Phänotyps ermöglichen. Gleichzeitig wird deutlich, ob der Genlocus für eine homologe Rekombination zugänglich ist.

loxP/neo/loxP-Konstrukt

Dieser *Replacement*-Vektor ist auf der Grundlage des konstitutiven Plasmids aufgebaut. Seine Erweiterung besteht in der geflochtenen *neo*-Kassette. Die damit mögliche Deletion des Gens zu einem beliebigen Zeitpunkt ermöglicht das Studium der bereits erwähnten negativen Interferenz des Selektionsmarkers.

Sowohl der konstitutive Vektor als auch das loxP/neo/loxP-Konstrukt haben einen entscheidenden Nachteil: Sie führen sofort nach homologer Rekombination zu einem Funktionsausfall des Gens (konstitutiver Knockout). Sollte es sich bei *Nicotin1* um ein in der Embryogenese essentielles Protein handeln, was aus dem Expressionsprofil (Abschnitt 3.3) abgeleitet werden könnte, würde die Deletion letal wirken. Die Generierung der Maus wäre somit nicht möglich. Ebenfalls nicht zu vernachlässigen ist, dass die Promotorregion des *AMT*-Gens bis jetzt noch nicht lokalisiert werden konnte. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie sich im *Nicotin1*-Gen befindet. Eine Deletion größerer Teile des Gens, wie sie die beiden Konstrukte vornehmen, könnte damit auch zur Zerstörung des *AMT*-Promotors führen. Dies würde sich

wiederum letal auf die Zellen auswirken. Der Phänotyp ist damit in beiden Fällen identisch und eine Unterscheidung der Ursache für den Zelltod wäre nicht möglich. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Vektor pNTK5 entworfen.

pNTK5

Dieser Vektor ist auf der Grundlage des pNTK4-Vektors, welcher bereits zur Transfektion der ES-Zellen verwendet wurde, aufgebaut. Der Unterschied zwischen diesen beiden Konstrukten besteht in dem Austausch des *neo*-Gens und der *FRT*-Elemente durch *loxP*-Sequenzen. Mit Hilfe dieses Vektors lässt sich feststellen, ob die Position und der Aufbau des positiven Selektionsmarkers verantwortlich für den Zelltod war. Gleichzeitig wird überprüft, ob der untersuchte Genort negativ auf die Einführung von konditionalen Elementen reagiert. In der Literatur wird diese Vermutung ausgeschlossen, weil bis jetzt keine vergleichbaren endogenen Sequenzen von *loxP* und *FRT* bekannt sind [O’Gorman *et al.*, 1997; Lewandoski *et al.*, 1997]. *In-vitro*-Versuche haben jedoch gezeigt, dass es bei männlichen Keimzellen durch die Einführung von Rekombinase-Erkennungs-Sequenzen zu chromosomalen Veränderungen gekommen ist [Schmidt *et al.*, 2000]. In Anbetracht dessen und unter Berücksichtigung, dass die Promotorregion des *AMT*-Gens bis jetzt noch nicht lokalisiert werden konnte, ist eine Beeinflussung der konditionalen Elemente nicht auszuschließen.

4.2 Erstellung eines Expressionsprofils des humanen und murinen *Nicolin1*-Gens

***Nicolin1* wird gewebespezifisch exprimiert und ist während der Embryogenese ubiquitär vorhanden.**

Die Ermittlung der die mRNA-Transkriptmenge in einer Zelle ist eine der meist verwendeten Methoden, um Informationen über die Auswirkungen von internen und externen Stimuli auf biologische Systeme oder Änderungen in entwicklungspezifischen Programmen zu sammeln [Yang *et al.*, 2002]. Mit Hilfe der *Northern-Blot*-Technik lassen sich die relativen oder absoluten

Mengen individueller mRNAs von verschiedenen Spezies leicht bestimmen. Nachteile dieser Methode ist die limitierten Sensivität, die sowohl individuenabhängig als auch abhängig vom Metabolismus des verwendeten Gewebes ist. Trotz kommerzieller Herstellung besteht dieser Nachteil weiterhin. Mit der RT (*Reverse-Transkriptase*)-PCR lassen sich die absoluten Mengen eines Transkriptes in einem bestimmten Gewebe oder Organismus bestimmen. Voraussetzung hierfür ist, dass geeignete Primer für das untersuchte Transkript entwickelt werden können.

In vielen Fällen korrelieren die mittels *Northern-Blot*-Technik gesammelten Ergebnisse mit denen der RT-PCR. Geringe mRNA-Transkriptmengen sind jedoch leichter durch die RT-PCR nachzuweisen [Yang *et al.*, 2002]. Daraus abgeleitet sollten Expressionsprofile für nicht näher bestimmte Gene durch die Verwendung beider Methoden erstellt werden.

Für die Erzeugung eines solchen Profils für das humane und murine *Nicolin1*-Gen wurden kommerziell erwerbliche *Northern-Blots* der Firma Clontech verwendet, auf denen pro Spur jeweils 2 µg poly(A)-RNA verschiedener Gewebe geblottet waren. Die Herstellung der Sonden erfolgte über Restriktionsspaltung von IMAGE-Klonen (Abschnitt 3.3). Die RT-PCR, ebenfalls von der Firma Clontech, erfolgte auf cDNAs verschiedener Gewebe von Mensch und Maus mit Hilfe eines speziellen Primerpaars. Um die Stärke der Expression des *Nicolin1*-Gens genau bestimmen zu können, wurden für den *Northern-Blot* eine Kontrollhybridisierung mit dem ubiquitär exprimierten β -Aktin durchgeführt. Die Kontroll-PCR erfolgte über den Einsatz von Primern eines Haushaltsgens, der GAPDH.

Aus diesen Versuchen ließ sich folgendes Expressionsprofil erstellen: *Nicolin1* wird gewebespezifisch exprimiert. Eine starke Expression ist in den Geweben Hirn, Hoden, Leber und Niere zu erkennen. Ein etwas abgeschwächtes Signal findet sich in Herz, Skelettmuskel, Plazenta, Pankreas und Lunge. Die Gewebe Milz, Thymus, periphere Blutleukozyten, Dünndarm und Dickdarm weisen eine schwache Expression auf. Obwohl sich viele der Ergebnisse in dieses grobe Schema einordnen ließen, konnte auch Abweichungen entdeckt werden. Die Leber weist eine starke Expression auf, sowohl in beiden Mäuseexperimenten als auch in der humanen RT-PCR. Das Signal im humanen *Northern-Blot* ist

dagegen schwach. Ähnlich verhält es sich mit der Plazenta, die in den beiden humanen Versuchen eine unterschiedliche Signalstärke aufweist.

Möglicherweise sind diese Unstimmigkeiten auf den metabolischen Zustand des Organs zurückzuführen, der vermutlich mit der Expression des Gens korreliert. Es darf auch nicht vernachlässigt werden, dass zur Erzeugung der *Blots* und der cDNA-Transkripte unterschiedliche Individuen eingesetzt worden sind, die sich in Alter, Geschlecht, Gesundheitszustand und Rasse unterscheiden.

Neben der gewebespezifischen konnte auch die ubiquitäre Expression während der murinen Embryogenese sowohl durch RT-PCR, als auch durch *whole-mount-in-situ*-Hybridisierung bestätigt werden. Dies Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass Nicolin1 schon während der Embryonalentwicklung eine wichtige Funktion übernimmt. Untermuert werden kann diese Theorie durch die Ergebnisse, die während der Transfektion der ES- und MEF-Zellen gewonnen wurden. Hier hat vermutlich die Einführung des Konstruktes und die damit verbundene Überexpression des Gens verheerende Auswirkung auf den Zustand der Zellen ausgeübt. Es ist bekannt, dass embryonale Zellen sensibel auf Störungen der entwicklungspezifischen Prozesse reagieren. Demnach könnte es sich bei Nicolin1 um ein entwicklungspezifisches Protein handeln.

4.3 Rekombinante Proteinexpression in *E.coli*

Ein Wechsel des Stimulationsmetaboliten IPTG führt zur Anhäufung von *inclusion bodies*.

Für die gezielte Synthese größere Mengen eines gewünschten fremden Genproduktes in einer lebenden Zelle (rekombinante Proteinexpression) steht eine umfangreiche Auswahl von Expressionssystemen zur Verfügung. Diese schließen eine Reihe gut bekannter Organismen und Zell-Linien (Bakterienzellen, Insektenzellen, Hefen und Säugerzellen) ebenso ein wie verschiedene Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotoren, Selektionsmarkern und eventuell Fusionspartnern [Gassen und Schimpf, 1999]. Die Wahl des richtigen Systems hängt von verschiedenen Faktoren ab.

Darunter fallen Wachstumsbedingungen, Expressionsintensitäten, intrazelluläre oder extrazelluläre Expression, posttranskriptionelle Modifikationen und die biologische Aktivität des zu untersuchenden Proteins [Markides, 1996]. Viele der genannten Faktoren haben sich bei *E.coli* als Vorteile gegenüber anderen Expressionssystemen herausgestellt. Sie machen diesen Wirt zu einem wertvollen Organismus für die gesteigerte Expression von rekombinanten Proteinen [Shatzman, 1995]. Trotz des Wissens über die genomische und molekulare Biologie von *E.coli* können nicht alle Proteine mit hoher Effizienz in diesem Organismus exprimiert werden [Markides, 1996]. Dies wird beeinflusst von der Struktur der eingeführten Sequenz, von der Stabilität und Translations-Effizienz der mRNA und von der Möglichkeit zur Proteinfaltung. Zusätzlich spielen Faktoren wie die Degradation des Proteins durch Wirtszell-Proteasen, die Unterschiede in der Codon-Verwendung zwischen dem fremden Gen und den nativen von *E.coli* und die Toxizität des exprimierten Proteins für den Wirt eine große Rolle [Markides, 1996]. Auch die säugerspezifische Glykosylierung ist nicht gewährleistet.

Das Zusammenspiel einiger dieser Faktoren hat dazu geführt, dass das Fusionsprotein GST-NICN1 in dem Bakterienstamm BL21 unlöslich wurde (Abschnitt 3.4). Ursache hierfür war der Wechsel des Stimulationsmetaboliten IPTG (Abschnitt 3.4). Er gehört zu den Chemikalien, deren Qualität starken Schwankungen unterworfen sind. Die verwendete Charge sollte deshalb innerhalb einer Versuchsreihe nicht geändert werden. Der aus Kostengründen erfolgte Wechsel bewirkte trotz unveränderter Konzentration eine nicht mehr regulierbare Expression des Fusionproteins. Unterstützt wurde dieser negative Effekt durch den im Vektor verwendeten *Ptac*-Hybrid-Promotor. Dieser wurde 1983 aus dem *trp*-Promotor (*ptacI*) und dem *lacUV5*-Promotor/Operator (*ptacII*) aufgebaut. Er weist somit eine um das 2- bis 3-fach gesteigerte Expressionsrate eines *trp*-Promotors und eine 7- bis 11-fach erhöhte Expression eines *lacUV5*-Promotors auf [de Boer, 1993]. Er wird in der Literatur als kontrollierbar bezeichnet (über den durch IPTG inaktivierbaren LacI-Repressor) und eignet sich aufgrund dieser Eigenschaften besonders gut für verstärkte Expression [de Boer, 1993].

Ungeachtet dessen war eine Regulation dieses Promotors nach dem IPTG-Wechsel nicht mehr möglich gewesen. Er führte zu gleich bleibend hohen Proteinmengen, deren Sedimentation schon bei niedriger Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge beobachtet werden konnte. Diese sowie die Unempfindlichkeit gegenüber Lysozym, den unterschiedlichen Lysispuffern und gegenüber der Sonifikation bei verschiedenen Amplituden (Abschnitt 3.4) weisen darauf hin, dass es zur Ausbildung von *inclusion bodies* gekommen sein musste.

Normalerweise fördern größere Tags die Löslichkeit eines rekombinanten Proteins [Murby *et al.*, 1996]. Allein die Anwesenheit von GST als Fusionspartner reicht in vielen Fällen aus [Smith, 2000].

Aus diesem Grund müssen neben der hohen Expression des Proteins, ausgelöst durch den IPTG-Wechsel, noch andere Faktoren zu Unlöslichkeit beigetragen haben.

Die Ausbildung von *inclusion bodies* führt über verschiedene Zwischenprodukte und ist temperatur- und zeitabhängig [Speed *et al.*, 1995; Murby *et al.*, 1996]. Welche physiologischen Bedingungen genau für die Verpackung in *inclusion bodies* verantwortlich sind, ist noch unklar [Wetzel, 1992]. In erster Linie dienen sie dazu, für die Zelle toxisches Material durch Aggregation auszufällen und somit unschädlich zu machen. Man kann daher die Vermutung aufstellen, dass eine zu starke Überexpression des säugerspezifischen Nicotin1 toxisch wirkt und deshalb aggregiert. Hierfür konnten jedoch keine Beweise erbracht werden, da die Expression in einem prokaryontischen System nicht weiter untersucht wurde.

In Expressionsversuchen, in denen verschiedene Fremd-Proteine in *E.coli* exprimiert wurden, konnten sechs Voraussetzungen herausgearbeitet werden [Wilkinson und Harrison, 1991]:

1. durchschnittliche Ladung des Proteins
2. auftretende Aminosäurewiederholungen
3. das häufige Vorkommen von Cystein-Einheiten
4. das verstärkte Auftreten von Prolin-Einheiten
5. die Hydrophilie

6. die totale Anzahl von Wiederholungen

Dabei konnten die Punkte, die sich auf die durchschnittliche Ladung des Proteins und das Auftreten von Aminosäurenwiederholungen beziehen, am stärksten mit der Ausbildung von *inclusion bodies* in Verbindung gebracht werden [Wilkinson und Harrison, 1991].

Untersucht man nun die in Abbildung 4-1 dargestellte Sequenz des GST-NICN1-Fusionsproteins im Hinblick auf die genannten Punkte, so können folgende Aussagen gemacht werden:

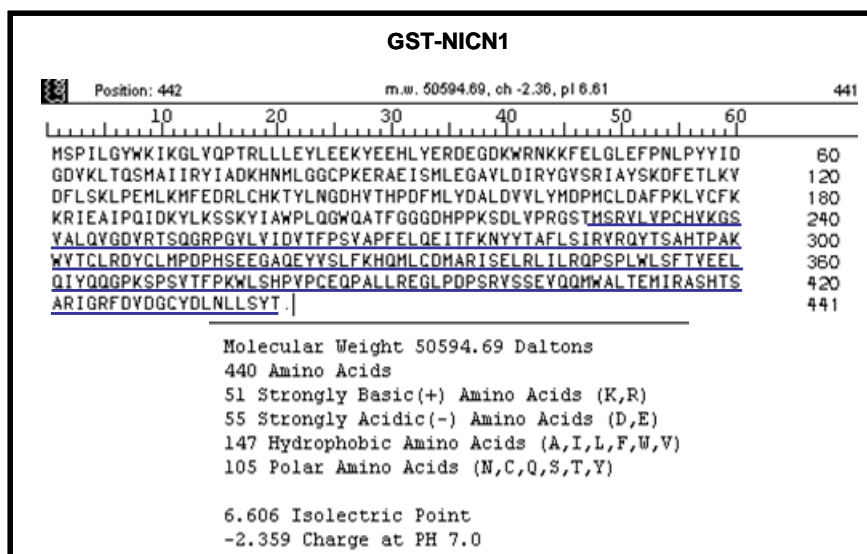


Abb. 4- 1: Aminosäuresequenz des GST-NICN1-Fusionskonstruktes

Die Abbildung zeigt neben der Aminosäuresequenz des GST-NICN1-Fusionsproteins die mittels des Programms DNASTAR berechneten Eigenschaften des Proteins. Bei der blau unterlegten Sequenz handelt es sich um die Aminosäureabfolge für das humane *Nicolin1*-Protein.

Wie aus der Abbildung 4-1 hervorgeht, weist das Fusionskonstrukt weder Aminosäurewiederholungen noch eine vermehrte Anhäufung von Cystein-Einheiten auf, die verantwortlich für die Aggregation sein könnten. In Betracht gezogen werden können nur die in der vierten Reihe vermehrte Anhäufung von Prolin und die Hydrophilität, die zu ca 33 % im Protein vorliegt. Da es sich aber diesen Beobachtungen um Punkte handelt, die nur schwach mit der Ausbildung von *inclusion bodies* korrelieren, müssen weitere Gründe für die Unlöslichkeit verantwortlich sein.

Neben den bereits genannten Gründen konnten noch weitere Faktoren ausgemacht werden, die die Ausbildung von *inclusion bodies* begünstigen. Darunter fällt die posttranslationale Modifikation von eukaryontischen Proteinen, die in einem prokaryontischen System wie *E.coli* nicht durchführbar sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass fehlende Modifikation zur Destabilisation von Proteinen beitragen [Braun *et al.*, 2001]. Um dem entgegenzuwirken, werden die degradierten und teilweise toxisch wirkenden Proteine durch Verpackung in *inclusion bodies* unschädlich gemacht.

Da für Nicolin1 noch keine posttranslationale Modifikationen bekannt ist, kann nur vermutet werden, dass eine zusätzlich auftretende Destabilisation des Proteins zur Unlöslichkeit beigetragen hat.

Ein weit aus bekannteres Problem bei der rekombinanten Proteinexpression in *E.coli* ist die vollständige Faltung von Proteinen. Das reduzierend wirkende Cytosol verhindert die Ausbildung von Disulfidbrücken, die in vielen Fällen zum Aufbau der Tertiärstruktur benötigt werden [Thornton, 1981]. Nicht immer führt der Verlust der Tertiärstruktur zur Unlöslichkeit des betreffenden Proteins. Es kommt erst dann zur Ausbildung von *inclusion bodies*, wenn freiliegende Aminosäuren aufgrund ihrer Ladung schädlich auf die Zelle wirken.

Nicolin1 weist wenige Cysteine auf, es ist aber nicht auszuschließen, dass diese dennoch an der Ausbildung der Tertiärstruktur maßgeblich beteiligt sind. Wird diese durch das reduzierend wirkende Umfeld in *E.coli* verhindert, könnte eine Aggregation in *inclusion bodies* die Folge sein und würde die erhaltenen Ergebnisse in Abschnitt erklären.

Die Unlöslichkeit des Fusionproteins kann auch auf die im Cytosol zahlreich vorhandenen Proteasen zurückzuführen sein [Goldberg und Swamy, 1981]. Diese bewirken eine Degradation des GST-NICN1 und damit der sauren und basischen Gruppen, die verantwortlich für die Löslichkeit eines Proteins sind.

Fazit der rekombinanten Proteinexpression in *E.coli* ist, dass der Wechsel des qualitätsinstabilen IPTGs die Ursache für das plötzliche Auftreten von *inclusion bodies* ist. Welche Faktoren genau die Aggregation gefördert haben, kann

aufgrund der unbekanntenen Proteinstruktur und biologischen Funktion des NICN1-Protein nur vermutet werden.

4.4 Erzeugung einer stabilen Zell-Linie

Die Einführung eines *Nicolin1*-myc-His Fusionskonstruktes führt zum Zelltod.

Etablierte Zell-Linien werden immer dann eingesetzt, wenn schnell wachsende Zellen benötigt werden. Zur Beantwortung von schwierigen Fragestellungen reichen oftmals die Eigenschaften der herkömmlichen Zell-Linien nicht aus (*Gene Silencing*). In diesen Fällen werden die Linien modifiziert und neu etabliert [Matherr und Roberts, 1998].

Die Beantwortung der Frage nach dem Zustandekommen der Kernlokalisierung von Nicolin1 war mit den vorhandenen Zell-Linien nicht möglich, da zum einen kein Antikörper zur Isolation des Proteins vorhanden war und zum anderen die Zellen *NICN1* nicht in ausreichenden Mengen exprimieren konnten.

Aus diesem Grund wurde die Erzeugung einer neuen Zell-Linie durch transgene Modifikation von MDCK-Zellen mit dem Konstrukt Nicolin1-myc-His angestrebt.

Der Vorteil dieser Methode liegt neben der konstanten Expression von *Nicolin1* in den angehängten Fusionsproteinen, die eine leichte Isolierung und Aufreinigung über einen myc-Antikörper oder paramagnetischen Nickelkügelchen ermöglicht.

Die Erzeugung dieser neuen Zellen war jedoch aufgrund des eintretenden Zelltodes nur bis zur Selektionsphase möglich (siehe Abschnitt 3.5).

Zunächst schien die Selektionsdroge Zeozin keine Beeinflussung auszuüben (Abschnitt 3.5), da die Konfluenz stetig zunahm. Erst die Verdünnung der Zellen führte zu Auffälligkeiten. Das Wachstum wurde eingestellt und eine vermehrte Ablösung vom Schalenboden trat ein. Eine Koloniebildung war ebenfalls nicht erkennbar. Lediglich kleine Ansammlungen von 2-4 Zellen konnten nachgewiesen werden, die aber nicht überlebensfähig waren.

Trotz unterschiedlicher Konstrukte erinnerte die Art und Weise des eintretenden Zelltodes dabei stark an die Selektionsphase der ES-Zellen. Die

Übereinstimmung zwischen den beiden Versuchen führten zu der Annahme, dass auch bei der Etablierung der Zell-Linie eine Überexpression des *Nicolin1*-Gens für den Zelltod verantwortlich war.

Diese Theorie musste zunächst jedoch angezweifelt werden, nachdem durch die MALDI-TOF-Untersuchung bekannt wurde, dass es sich bei dem exprimierten Protein möglicherweise nicht um das gewünschte Fusionskonstrukt handelt. Durch die Kontrollsequenzierung des Vektors, die eine Leserahmenverschiebung oder Punktmutation des Gens und damit die Exprimierung eines fehlerhaften oder „fremden“ Proteins ausschließt, rückte die Überexpression des Gens als Ursache für den Zelltod wieder in den Vordergrund.

Diese Vermutung könnte auch durch die Ergebnisse, die mit dem GST-NICN1 Konstrukt erzielt worden sind (siehe Abschnitt 3.4), untermauert werden. Hier förderte vermutlich die Überexpression des Gens die Ausbildung von *inclusion bodies*.

Bei diesem Vergleich darf nicht vernachlässigt werden, dass es sich bei dem Expressionswirt im Gegensatz zum Knockout-Versuch und der Etablierung einer Zell-Linie um ein prokaryontisches System handelt. Wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 1.1), ist *Nicolin1* ein säugerspezifisches Protein, dessen toxisch wirkende Überexpression in *E.coli* wahrscheinlich auf dessen Speziespezifität zurückzuführen ist. Trotz dieser Einschränkung zieht sich die Überexpression als Ursache für den Zelltod von ES-, MDCK und *E.coli*-Zellen wie ein roter Faden durch die Versuche, obwohl bis jetzt keine Beweise dafür gesammelt werden konnten.

4.5 Dichtegradientenzentrifugation

Die Auftrennung des *NICN1*-myc-His Proteins im Gradienten ist nicht möglich.

Die Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht die Trennung von Molekülen, die sich aufgrund der einwirkenden Zentrifugalkräfte in einem Medium bewegen [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Bei der hier angewendeten differentiellen Sedimentation führt die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der

Teilchen in dem Gradienten zur gewünschten Auftrennung [Winter und Noll, 1998]. Die Gradientenlösung minimiert die Konvektion und bremst schnellere Moleküle, die ansonsten zum Boden sinken würden, ab [Winter und Noll, 1998]. Mit Hilfe dieser Zentrifugationstechnik sollte bestimmt werden, ob Nicolin1 in der Zelle als Oligomer vorliegt. Dafür wurden Lysate von NICN1-myc-His-transfizierten COS-Zellen mittels des Gradienten aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen zur Gewinnung des Proteins immunpräzipitiert. Zum Einsatz kamen zwei Gradientenlösungen, die einen Konzentrationsbereich von 2-10% und 15-30 % umspannten. Hinweise auf eine bestehende Oligomerisierung konnten nicht erhalten werden, da die Pelletierung des Fusionproteins die Auswertung verhinderte. Lediglich ein Nachweis für den schon häufiger beobachteten Bandshift wurde mit dieser Technik erbracht.

Zunächst konnte keine Erklärung für das „Durchrauschen“ des Proteins gefunden werden. Erst die Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchung verhalfen zu der Annahme, dass eine posttranslationale Modifikation zu einer Änderung der Dichte des Proteins geführt haben könnte. Normalerweise ist die Dichte des Gradienten bei einer differentiellen Sedimentation geringer als die der untersuchten Moleküle [Winter und Noll, 1998]. Damit wird die Pelletierung der Teilchen verhindert. Daraus abgeleitet muss die Dichte des Proteins nach der Modifizierung höher sein als die der verwendeten Gradienten. Ein Beweis dafür konnte jedoch nicht erbracht werden, da das pelletierte Protein für nähere Untersuchung nicht zugänglich war.

Unterstützt wird die Theorie der posttranslationalen Modifikation zusätzlich durch die Ergebnisse der rekombinanten Expression in *E.coli*. Da in vielen Fällen weder die DNA- noch die Proteinstruktur Hinweise auf die Modifikationen liefern, verfügen prokaryontische Organismen über keine Mittel, Proteine nach ihrer Translation weiter zu prozessieren. Es ist jedoch bekannt, dass gerade das Fehlen der für die Aktivität notwendigen Veränderungen in *E.coli* zur Destabilisation der Proteine [Braun *et al.*, 2001] und damit zur Ausbildung von *inclusion bodies* führt. Damit untermauert die Betrachtung der Ergebnisse aus der Dichtegradientenzentrifugation und der rekombinanten Proteinexpression die Vermutung einer posttranslationalen Modifikation von Nicolin1.

4.6 Charakterisierung des Bandenverschiebung mittels MALDI-TOF

Die isolierten Proteine sind über MALDI-TOF nicht identifizierbar.

Aus den Ergebnissen der Immunpräzipitation und der Dichtegradientenzentrifugation geht eine Bandenverschiebung der Nicolin1-myc-His-Bande hervor. Das gewünschte Signal tritt bei einer Größe von ca 29-31 kDa auf und liegt damit höher als die errechnete Bande von 27,7 kDa.

Diese Bandenverschiebung ist möglicherweise auf eine Modifikation des Nicolin1 in der Zelle zurückzuführen und sollte deshalb durch eine MALDI-TOF-Analyse näher charakterisiert werden.

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ermöglicht neben der Sequenzierung von Peptiden auch deren Molekulargewichtsbestimmung. Die Massenanalyse der durch einen Laser erzeugten Ionen erfolgt bei MALDI-TOF-Untersuchungen mittels eines Flugzeitmassenspektrometers, auch TOF (*time-of-flight*)-Analysator genannt (Abschnitt 1.6). Die Auftrennung findet aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten und den daraus resultierenden Flugzeiten der einzelnen Ionen und ihren bestimmten m/z -(Masse/Ladungsverhältnis-)Werten statt.

Für die Analyse wurde das NICN1-myc-His-Konstrukt über eine Immunpräzipitation mittels myc-Antikörper aus einem COS-1-Zell-Lysat isoliert. Die Auftrennung des aufgereinigte Protein erfolgte über ein großes 12%iges SDS-Gel. Da eine Überladung der Geltaschen ebenfalls eine Bandenverschiebung auslösen kann, fand die Aufteilung der Proben auf mehrere Spuren statt.

Schwierigkeiten ergaben sich durch anzuwendende Färbung des Gels, denn die massenspektrometrische Untersuchung setzt Banden aus Coomassiegefärbten Gelen voraus, während die Vorversuche alle gezeigt haben, dass aufgrund der geringen Konzentration des exprimierten Fusionsproteins nur eine Silberfärbung die Isolation gestatten würde.

Aufgrund der besseren Auftrennung der Proben konnten insgesamt drei Banden ausgemacht werden, bei denen es sich um das gewünschte

Expressionskonstrukt handeln könnte. In Abbildung, 3-39, die eine Spur des erzeugten Gels zeigt, sind die mittels eines sterilen Skalpell isolierten Banden durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die einzelnen Gelstücke wurden in der Universität in Marburg untersucht und die Ergebnisse in Form einer Excel-Datei zugeschickt. Die Tabellen 3-21 bis 3-23 zeigen die für jedes Protein nach Spaltung mit bovinem Trypsin erzeugten Massen und ihre Intensitäten, mit denen sie detektiert worden sind. Ebenfalls dazu abgebildet sind die aus den Daten ermittelten Spektren.

In allen drei Abbildungen tritt ein Peak mit einem m/z-Verhältnis von 2225 auf. Vergleicht man die Spektren miteinander, so wird deutlich, dass die Verteilung der Peaks, aber auch die Intensitäten der einzelnen Masse/Ladungsverhältnis-Werten bei Nicolin1-Molekül #1 und #2 sich sehr ähnlich sind. Das deutet darauf hin, dass es sich in diesem Fall um ein und dasselbe Protein handelt, während das dritte Molekül deutlich erkennbare Abweichungen vom Muster aufweist.

Um nach Modifikation suchen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass es sich zumindest bei einem der drei isolierten Banden um das Fusionskonstrukt NICN1-myc-His handelte. Dafür wurden die drei erhaltenen Spektren auf störende *Peaks*, die auf einer möglichen Autoproteolyse des Trypsins zurückzuführen sind, untersucht. Unter Zuhilfenahme des Programms *ProteinProspector* konnten die Spaltprodukte erzeugt und die daraus resultierende Massen unter bestimmten vorgegebenen Bedingungen berechnet werden. Durch einen direkten Vergleich der Werte mit den erhaltenen MALDI-Daten war es möglich, eine Autoproteolyse des Trypsins für alle drei Nicolin1-Fusions-Moleküle auszuschließen.

Unter Zuhilfenahme der Aminosäuresequenz für das Fusionskonstrukt wurde ein theoretisches Massenspektrum erzeugt, dessen Bedingungen in Tabelle 3-18 zusammengefasst sind. Die dabei erhaltenen Massen-Ladungsverhältnisse wurden mit den Analysewerten der drei Banden verglichen. Berücksichtigt man eine gewisse Ungenauigkeit des MALDI-Gerätes, so konnten nur folgende Massen in den erhaltenen Spektren wieder gefunden werden:

Tab. 4- 1: Übereinstimmungen zwischen theoretischen und gemessenen m/z-Verhältnissen

Nicolin 1 m/z Verhältnis		Nicolin 2 m/z Verhältnis		Nicolin 3 m/z Verhältnis	
errechnet	gemessen	errechnet	gemessen	errechnet	gemessen
2775	2777	3083	3086	1993	1940
1993	1940	2775	2777	1923	1923
1923	1925	2618	2621	1907	1910
1702	1706	1993	1940	1718	1718
		1923	1922	1702	1706
		1702	1706	1358	1354

Die rot markierten Zahlen weisen auf die Werte hin, die bei allen drei Spektren gefunden worden sind. Diese minimalen Übereinstimmungen zwischen theoretischem und gemessenem Spektrum reichen nicht aus um zu beweisen, dass es sich zumindest bei einer der isolierten Banden um das gewünschte Konstrukt handelt. Um bei dieser Aussage ganz sicher zu gehen, wurden die erhaltenen Werte der analysierten Banden, als auch 15 Werte des theoretisch berechneten Massenspektrums (Positiv-Kontrolle) in das *Peptide-Mass-Fingerprint*-Programm aus dem Internet eingegeben. Diese Suchmaschine spürt an Hand der eingegebenen Ladung/Massenverhältnisse dazu passende Proteine in bekannten Proteindatenbanken auf, in denen auch Nicolin1 hinterlegt ist. Die Ergebnisse dieser Datenbanksuche ist in den Abbildungen 3-40 dargestellt. Außer der Positiv-Kontrolle gibt keines der drei isolierten Proteine eine Übereinstimmung zu Nicolin. Damit kann die Aussage, dass es sich bei allen drei isolierten Banden in keinem Fall um das Fusionsprotein handelt, bestätigt werden.

Nicht auszuschließen ist, dass eine schon postulierte posttranslationale Modifikation des Proteins die Suche über die Massen/Ladungsverhältnisse behinderte. Wie bereits erwähnt, werden die meisten Proteine nach der Translation weiter prozessiert. Die Veränderungen, die ein Protein dabei durchläuft, lassen sich in zwei Gruppen einteilen: a) proteolytische Spaltung und b) kovalente Modifikation [Voet und Voet, 1998]. Allein für Punkt b sind insgesamt 150 Seitenketten-Modifikationen bekannt. Die proteolytische Spaltung von Proteinen ist eine der häufigsten Veränderungen. Kollagen und

Insulin sind die bekanntesten Fälle, in denen die Spaltung einer oder mehrerer Peptidketten zur aktiven Form des Proteins führt.

Viele der kovalenten Modifikationen sind in den Datenbanken der Peptidprogramme *Mascot* oder *ProteinProspector* hinterlegt. Durch spezielle Suchoperatoren lassen sich diese im Massenspektrum auch wieder finden. Für Nicolin1 konnte keine dieser Veränderungen nachgewiesen werden. Es ist demnach unwahrscheinlich, dass es sich bei der Prozessierung des Proteins um beispielsweise eine Seitenkettenmodifikation handelt. Somit liegt die Vermutung einer proteolytischen Spaltung des NICN1 nahe. Diese Veränderung lässt sich im Spektrum nicht analysieren und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.7 Fazit

Bei dem hier näher untersuchten säugerspezifischen *Nicolin1*-Gen handelt es sich möglicherweise um ein in einem definierten Konzentrationsgleichgewicht vorliegendes Kernprotein. Jede Störung dieses Gleichgewichtes führt abhängig vom betrachteten Zelltyp zu Wachstumseinschränkung oder zum Zelltod. Das Verhalten im Dichtegradienten und bei der Expression in *E.coli* weisen zusätzlich daraufhin, dass das gewebespezifisch exprimierte und in der Embryogenese ubiquitär vorhandene Nicolin1 eine posttranslationale Modifikation durchläuft, die vermutlich den Eintritt in den Kern unterstützt. Unter Berücksichtigung dieser neuen Erkenntnisse wird es möglich sein, die biologische Funktion des Proteins und den Ablauf des Kerntransportes durch weitere Versuche zu ermitteln.

Summary

The completion of the human genome project has led to the discovery of many new genes, but their function remains unknown. Gene function can be inferred in a variety of ways, this includes: inferring gene function in orthologous genes in different species, conserved functional domains and membership to a gene family. However, there are many genes for which the function cannot be inferred, so to determine their function, single genes must be analysed.

The *nicolin1* gene (*NICN1*) was first discovered in dogs (Leeb *et al*, 2000). It contains six exons and spans 6kb, encoding a 213 amino acid sequence (24 kDa) and does not belong to any known gene family. It was found to be localised in the nucleus. In a BLAST search of genetic databases, ESTs from other mammalian species were found, but the gene was found to be absent from any non-mammalian species. Within this project we have utilised a variety of different functional analysis methods in order to determine the function of this gene/protein. These methods included: the development of a knockout mouse, expression studies with Northern blotting, RT-PCR, and whole mount *in-situ* hybridisation, recombinant GST fusion protein expression in E coli,

development of a stable cell line, gradient centrifugation and MALDI-TOF analysis.

The development of a knockout mouse aimed to determine the gene function by noticing phenotypic differences in the mice. However, a knockout mouse for the gene could not be made. The development of the mouse may have been hindered by the over expression of the gene, early cell death was brought on by effects of the negative selection markers within the two different constructs used, and the locus may not be suitable for homologous recombination. A test transfection with mouse embryonic fibroblasts (MEFs) was used to confirm these results; they showed that, in comparison to the control fibroblasts, the transfected cells had colonies small in size and did not show normal morphology.

The expression studies were used to assay if there was any difference in mice and human expression of the gene, the methods used were northern blotting, RT-PCR, and whole mount *in-situ* hybridisation. These methods revealed high expression in brain, testis, liver and kidney, intermediate in heart, skeletal muscle, placenta, pancreas, and lung, and low levels in peripheral blood leukocytes, spleen, thymus, small intestine and colon. Expression studies in foetal mouse development showed uniform expression of the gene throughout the foetus.

The GST fusion protein was used to determine how the gene gets into the nucleus. As Nicolin1 does not contain a known NLS, we had hypothesised that the protein had a binding partner which could allow the protein's entrance into the nucleus. The GST tag was utilised to isolate the binding complex under natural conditions. Initially, there were high levels of expression, and isolation was possible. But after changing the provider of a specific reagent (IPTG), there were still high levels of expression, but the protein could not be isolated. We believe that the protein may be toxic to *E. coli* and that the cells placed the protein within inclusion bodies making it unable to be isolated. In mammalian cells, the protein may undergo post-translation modifications, and without these modifications, the protein may be toxic in *E. coli*.

To overcome this problem, a stable cell line was to be established. A new construct was used (NICN1-myc-HIS) and was transfected into the MCDK cell line. Unfortunately, during selection all of the cells died. The morphology of the cells indicated that the protein expression was toxic.

We believe that the protein is an oligomer, so to determine whether this was true, we used gradient centrifugation of the fusion protein (using the same construct in the stable cell line). The protein did not fit into the density range of the centrifugation and a band shift was noticed. This band shift had been noted in previous studies.

To determine the cause of the band shift, MALDI-TOF was used. Three bands were isolated, unfortunately none of these bands turned out to be the predicted protein. The reason for this could have been that the open reading frame was changed resulting in a new protein, but the sequencing of the construct and the isolation of the protein by the myc antibody contradicted this assumption and showed that there must be another reason. From this we believe that the protein undergoes post-translational modifications, which does not allow the protein to be detected by MALDI-TOF.

The expression studies used have led us to believe that this protein undergoes some sort of post-transcriptional changes that make it difficult to analyse using these expression systems. Also high levels of expression of this protein may cause death of the cells.

The results presented within this thesis have furthered our understanding of the *nicolin1* gene. However, the biological function of the protein requires further study.

Literaturverzeichnis

Allgemein

Ausbuel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northop, J.P., Ringolds, G.M., Danilsen, M. (1987) *Lopofection: A highly efficient, lipid mediated DNA-trasnfecction procedure*. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 84, 7413-7417

Luthman, H., Magnusson, G. (1993)
High efficiency polyoam DNA transfection of chloroquin treated cells. Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308

Neumann, E., Schäfer-Ridder, M., Wang, Y, Hofschneider, P.H. (1982)
Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields
EMBO J.1, 841-845

Rehm, H. (2000)
Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Verlag, Heidelberg, 3. Auflage

Thomas PS. (1980)

Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci U S A. ;77:5201-5205.

Valeri, A., Pagano, J.S. (1965)

Infectious Polivirus RNA: A Sensitive Method of Assay. Virology 27, 434-436

Voet, D., und Voet, J.G. (1994)

Biochemie, VCH, Weinheim

Ware RE, Martin LG, Tyras DH, Kourias E, Symbas PN.1972

Coronary arterial injection of radioactive albumin microspheres in diagnosis of experimental myocardial contusion. Surg Forum. ;23(0):138-9.

Dichtegradientenzentrifugation

Pingoud, A., und Urbanke, C. (1997)

Arbeitsmethoden der Biochemie, de Gruyter Lehrbuch, Berlin, 131-145

Urbanke, C. (1998)

Vorlesungsskripte

Winter, R. und Noll, F. (1998)

Methoden der Biophysikalischen Chemie, Teubner Studienbücher, Stuttgart, 93-104

Lottspeich, F., und Zorbas, H. (1998)

Bioanalytik, Spektrum Verlag, Berlin, 1

Gassen, H.G., Schrimpf, G. (1999)

Genechnische Methoden, Spektrum Verlag, Auflage 2

Expression

Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J., and Georgiou, G. 1999.

Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 96:13703–13708

- Buell, G., Schulz, M. F., Selzer, G., Chollet, A., Movva, N. R., Semon, D., Escanez, S., and Kawashima, E. 1985. *Optimizing the expression in E. coli of a synthetic gene encoding somatomedin-C (ICF-I)*. Nucl. Acids Res. 13:1923–1938
- Fussenegger, M. (2001)
The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. Biotechnol Prog. 17(1):1-51.
- Gheysen, D., D. Iserentant, C. Derom, and W. Fiers. 1982.
Systematic alteration of the nucleotide sequence preceding the translation initiation codon and the effects on bacterial expression of the cloned SV40 small-tantigen gene. Gene 17:55–63.
- Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Singer, B. S., and Stormo, G. 1981
Translational initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 35:365–403.
- Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G., and Blanquet, S. 1989.
Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 86:8247–8251.
- Hostomsky, Z., Smrt, J., and Paces, V. 1985.
Cloning and expression in Escherichia coli of the synthetic proenkephalin analogue gene. Gene 39:269–274.
- Kavanaugh, J. S., P. H. Rogers, and A. Arnone. 1992
High-resolution X-ray study of deoxy recombinant human hemoglobins synthesized from b-globins having mutated amino termini. Biochemistry 31:8640–8647.
- Koshiba, T., Hayashi, T., Miwako, I., Kumagai, I., Ikura, T., Kawano, K., Nitta, K., and Kuwajima, K. 1999.
Expression of a synthetic gene encoding canine milk lysozyme in Escherichia coli and characterization of the expressed protein. Prot. Eng. 12:429–435
- Lathrop, B. K., Burack, W. R., Biltonen, R. L., and Rule, G. S. 1992.
Expression of a group II phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon piscivorus piscivorus in Escherichia coli: Recovery and renaturation from bacterial inclusion bodies. Prot. Expr. Purif. 3:512–517.

- Lee, N., Zhang, S. Q., Cozzitorto, J., Yang, J. S., and Testa, D. 1987.
Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression interferon alpha 1 in Escherichia coli. Gene 58:77–86.
- Looman, A. C., Bodlaender, J., de Gruyter, M., Vogelaar, A., and van Knippenberg, P. H. 1986
Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in Escherichia coli. Nucl. Acids Res. 14:5481–5496
- Murby, M., Uhlen, M. & Stahl, S. (1996) Protein Expr. Purif. 7, 129–136
- O'Connor, C. D., and K. N. Timmis. 1987.
Highly repressible expression system for cloning genes that specify potentially toxic proteins. J. Bacteriol. 169:4457–4462.
- Shatzman, A. R. 1995.
Expression systems. Curr. Opin. Biotechnol. 6:491–493.
- Smith, D. B. (2000) Methods Enzymol. 326, 254–270
- Sorensen, M. A., Kurland, C. G., and Pedersen, S. 1989.*
Codon usage determines translation rate in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 207:365–377
- Speed, M. A., Wang, D. I. & King, J. (1995) Protein Sci. 4, 900–908.
Swamy, K. H. S., and A. L. Goldberg. 1982. Subcellular distribution of various proteases in Escherichia coli. J. Bacteriol. 149:1027–1033.
- Tessier, L. H., Sondermeyer, P., Faure, T., Dreyer, D., Benavente, A., Villeval, D., Courtney, M., and Lecocq, J. P. 1984
The influence of mRNA primary and secondary structure on human IFN-gamma gene expression in E. coli. Nucl. Acids Res. 12:7663–7675
- Thornton, J. M. 1981
Disulfide bridges in globular proteins. J. Mol. Biol. 151:261–287.
- Tobias, J.W., Shrader, T. E., Rocap, G., and Varshavsky, A. 1991.
The N-end rule in bacteria. Science 254:1374–1377

Wetzel, R. 1992.

Protein aggregation in vivo. Bacterial inclusion bodies and mammalian amyloid, p. 43–48. In T. J. Ahern and M. C. Manning (ed.), Stability of protein pharmaceuticals. B. In vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization. Plenum Press, New York.

Wilkinson, D. L., and Harrison, R. G. 1991.

Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. Biotechnol. 9:443–448.

Wilkinson, D. L., and R. G. Harrison. 1991.

Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. Bio/Technology 9:443–448.

Yang, Z., Woodahl, E.L., Wang, X.-Y., Bui, T., Shen, D.D., and Ho, R.J.Y. (2002)

Semi-Quantitative RT-PCR Method to Estimate Full-Length mRNA Levels of the Multidrug Resistance Gene, BioTechniques 33:196-203 (July 2002)

Zhang, S. P., Zubay, G., and Goldman, E. 1991.

Low-usage codons in Escherichia coli, yeast, fruit fly and primates. Gene 105:61–72.

Kerntransport

Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E. und Goldberg, M.W. (2000)

The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus und cytoplasm. Journal of Cell Science 113 1651-1659

Akey, C.W. (1990)

Visualization of transport-related configurations of the nuclear pore transporter. Biophys J 58 341-55

Akey, C.W. und Radermacher, M. (1993)

Architecture of the Xenopus nuclear pore complex revealed by three- dimensional cryo-electron microscopy. J Cell Biol 122 1-19

Delphin, C., Guan, T., Melchior, F. und Gerace, L. (1997)

RanGTP targets p97 to RanBP2, a filamentous protein localized at the cytoplasmic periphery of the nuclear pore complex. Mol Biol Cell 8, 2379-90

- Dingwall, C., Sharnick, S.V. und Laskey, R.A. (1982)
A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. Cell 30 449-58
- Englmeier, L., Olivo, J.C. und Mattaj, I.W. (1999)
Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. Curr Biol 9 30-41
- Feldherr, C.M. und Akin, D. (1997)
The location of the transport gate in the nuclear pore complex. J Cell Sci 110 3065-70
- Feldherr, C.M. und Akin, D. (1993)
Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. Exp Cell Res 205 179-86
- Finlay, D.R., Newmeyer, D.D., Price, T.M. und Forbes, D.J. (1987)
Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. J Cell Biol 104 189-200
- Fontoura, B.M., Blobel, G. und Matunis, M.J. (1999)
A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. J Cell Biol 144 1097-112
- Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U., Albright, A.V., Gonzalez-Scarano, F. und Malim, M.H. (1998)
Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. J Virol 72 6004-13
- Gerace, L. und Burke, B. (1988)
Functional organization of the nuclear envelope. Annu Rev Cell Biol 4 335-74
- Goldberg, W.M., Cronshaw, J.M., Kiseleva, E. und Allen, T.D. (1999)
Nuclear pore complex dynamics and transport in higher eukaryotes. Protoplasma 209 144-156

- Gorlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. und Izaurralde, E. (1997)
A novel class of RanGTP binding proteins. J Cell Biol 138 65-80
- Gorlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E., Laskey, R.A., Mattaj, I.W. und Izaurraide, E. (1996)
Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export. Cell 87 21-32
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. und Bischoff, F.R. (1996)
Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. Embo J 15 5584-94
- Gorlich, D. und Kutay, U. (1999)
Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu Rev Cell Dev Biol 15 607-60
- Jarnik, M. und Aebi, U. (1991)
Toward a more complete 3-D structure of the nuclear pore complex. J Struct Biol 107 291-308
- Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K. und Greene, W.C. (1998)
Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. J Cell Biol 143 875-85
- Johnson, B.D., Scheuer, T. und Catterall, W.A. (1994)
Voltage-dependent potentiation of L-type Ca²⁺ channels in skeletal muscle cells requires anchored cAMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 91 11492-6
- Johnson, D.A., Leathers, V.L., Martinez, A.M., Walsh, D.A. und Fletcher, W.H. (1993)
Fluorescence Resonance Energy Transfer Within a Heterochromatic cAMP-Dependent Protein Kinase Holoenzyme Under Equilibrium Conditions - New Insights into the Conformational Changes That Result in cAMP-Dependent Activation. Biochemistry 32 6402-6410
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F. und Smith, A.E. (1984)
Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. Nature 311 33-8

- Kiseleva, E., Goldberg, M.W., Allen, T.D. und Akey, C.W. (1998)
Active nuclear pore complexes in Chironomus: visualization of transporter configurations related to mRNP export. J Cell Sci 111 223-36
- Kiseleva, E., Goldberg, M.W., Allen, T.D. und Akey, C.W. (1998)
Active nuclear pore complexes in Chironomus: visualization of transporter configurations related to mRNP export. J Cell Sci 111 223-36
- Lanford, R.E. und Butel, J.S. (1984)
Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. Cell 37 801-13
- Moroianu, J. (1999)
Nuclear import and export: transport factors, mechanisms and regulation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 9 89-106
- Nakielnny, S., Siomi, M.C., Siomi, H., Michael, W.M., Pollard, V. und Dreyfuss, G. (1996)
Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway. Exp Cell Res 229, 261-6
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. und Aebi, U. (1990)
Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. J Cell Biol 110 883-94
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. und Gorlich, D. (1999)
The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. Curr Biol 9 47-50
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. und Dingwall, C. (1991)
Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. Cell 64 615-23
- Talcott, B. und Moore, M.S. (1999)
Getting across the nuclear pore complex. Trends Cell Biol 9 312-8
- Wang, H. und Clapham, D.E. (1999)
Conformational changes of the in situ nuclear pore complex. Biophys J 77 241-7
- Yaseen, N.R. und Blobel, G. (1999)
Two distinct classes of Ran-binding sites on the nucleoporin Nup-358. Proc Natl Acad Sci U S A 96 5516-21

Knockout

Bogue, C.W. (2003)

Genetic Models in Applied Physiology. Functional genomics in the mouse: powerful techniques for unraveling the basis of human development and disease. J. Appl. Physiol. 94, 2502-2509

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R. (2002)

A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science. 5567, 550-553.

Bucholz, F., Angrand, P.O. und Stewart, A.F. (1998)

Improved properties of FLP recombinase by cycling mutagenesis. Nature Biotechnology, 16, 657-662

Buer, J., Balling, R. (2003).

Mice, microbes and models of infection. Nat. Rev. Genet. 3, 195-205.

Burset, M., Seledtsov, I.A. und Solovyev, V.V. (2001)

SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. Nucleic. Acids. Res., 1, 255-259

Chen, C. und Okayama, H. (1987)

High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol Cell Biol., 8, 2745-52.

De Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radmann, M. und te Riele, H. (1995)

Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. Cell, 28;321-330

Deng, C., Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1993)

Location of Crossovers during Gene Targeting with Insertion and Replacement Vectors. Mol.Cell. Bio., 13, 2134-2140

Deng, I and Capecchi, M.R. (1992). Mol. Cell Biol., 12, 3365

Targeting in Embryonic Stem Cells. Cell, 56, 313-321

Felgner, P.L. und Ringold, G.M. (1989)

Cationic liposome-mediated transfection. Nature, 26; 387-388

- Feng, L.-X., Chen, Y., Dettin, L., Pera, R.A.R., Herr, J.C., Goldberg, E., Dym, M. (2002).
Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. Science. 297,
392-395.
- Gu, H., Zou, Y.R. und Rajewski, K. (1993)
*Independent control of immunoglobulin switch rekombination at individual switch
regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting.* Cell, 73, 1155-1164
- Hicks, G.R. und Raikhel, N.V. (1995)
Protein import into the nucleus: an integrated view. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 11,
155-188
- Joyner, A.L. (2000)
*Gene Targeting, A practical Approach. The practical approach series, Oxford
university Press, Second Edition*
- Kim, J.H., Jung-Ha, H.S. und Chung, K.S. (1997)
*Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in
mouse and pig.* Mol. Reprod Dev., 46, 515-526.
- Lee, Y., Gagneten, S., Tombaccini, D., Bethke, B. und Sauer, B. (1999)
Nuclear Targeting determinants of phage P1 cre DNA Rekombinase. Nucl. Acids
Res., 27, 4703-4709
- Lewandoski, M., Meyers, E.N. und Martin, G.R. (1997)
Analysis of Fgf8 Gene function in vertebrate development. Cold Spring Harb. Symp.
Quant.Biol., 62, 159-168
- Lewandoski, M., Wassarman, K.M. und Martin, G.R. (1997)
*Zp3-cre, a transgenic mouse line für the activation or inactivation of loxP-flanked
target genes specifically in the female germ line.* Curr. Biol., 7, 148-151
- Loonstra (2001)
*Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian
cells.* Proc. Natl. Acad. Sci USA, 98, 9209-9214
- MGI
(mouse Genome Informatics) web site <http://www.informatics.jax.org/>
- Mount, D.W. (2001).
Bioinformatics. Cold Spring Harbor Lab. Press.

- Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Ivanyi, E., Markkula, M., Rossant, J. (1990).
Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse.
Development. 110, 815-821.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C. (1993).
Derivation of completely cell cultured derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 90, 8424-8428.
- Neumann, E., Schäfer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P.H. (1982)
Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.
EMBO, 7, 841-845
- O`Gorman, S., Dagenais, N.A., Qian, M. und Marchuk, Y. (1997)
Protamine-Cre recombinase transgen efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice but not in embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 97, 14602-14607
- O`Gorman, S., Fox, D.T. und Wahl, G.M. (1991)
Recombinase mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. Science, 251, 1351-1355
- Olson, M.F. (1996)
Guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTPases: a role in human disease? J. Mol. Med., 74, 563-571
- Reed, K.C. und Mann, D.A. (1985)
Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucleic. Acids. Res. 20, 7207-7221
- Robertson, E.J., Kaufmann, M.H., Bradley, A. und Evans, M.J. (1983)
In Teratocarcinoma stem cells (ed. L.M. Silver, G.R. Martin und S.Strickland), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 10, p647, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H. und Erlich, H.H. (1989)
Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc. Nat. l Acad. Sc. i U S A., 16, 6230-6234
- Sauer, B. und Hendson, N. (1989)
Cre stimulated recombination at loxP-containing DNA sequencees placed into the mammalian genome. Nucl. Acids Res., 17, 147-161

- Schmidt, E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S. und Capecchi, M.R. (2000)
Illegitimate Cre-dependant chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 97, 13702-13707
- Schmitteckert, E.M., Prokop, C.M. und Hedrich, H.J (1999)
DNA detection in hair of transgenic mice--a simple technique minimizing the distress on the animals. Lab. Anim., 33, 385-9
- Schramke, V., Allshire, R. (2003).
Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. Science. 5636, 1069-1074.
- Simard, R., Kessous, A., Mansour, M., Camonis, J. und Rawls, W.E. (1983)
Herpes simplex type 2 and cervical cancer: immunological and in situ hybridization studies. Prog Clin Biol Res., 132, 461-469
- Simpson, E.M., Linder, C.C., Sargent, E.E., Davisson, M.T., Mobraaten, L.E., und Sharp, J.J. (1997) Nature Genet., 16, 19
In Teratocarcinoma stem cells (ed. L.M. Silver, G.R. Martin und S.Strickland), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 10, p23, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Stevens, L.C. (1983)
Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. Nature, 12, 34-38
- te Riele, H., Maandag, E.R. and Berns, A. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 89,5128
- Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1986)
Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell, 51, 503-512
- Thomas, S. und Capecchi, M.R. (1987) G
erm Line Trasmission and Expression of a Corrected HPRT Gene Product by Gene
- Thomson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.R. und Melton, D.W. (1989)
Mammalian genom contain active recombinase recognition sites. Gene, 244, 47-54
- Thyagarajan, B., Guimraes, M.J., Groth, A.C., Calos, M.P. (2000)
Genetically altered mouse models: the good, the bad, and the ugly. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 14, 154-174

- Thyagarajan, T., Totey, S., Danton, M.J., Kulkarni, A.B. (2003).
Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford university press, Oxford.
- Torres, R.M. und Kuhn, R. (1997).
Infectious Poliovirus RNA: A sensitive method of assay. *Virology*, 27, 434-436
- Valerie, A., Pagano, J.S. (1965)
Glucosamine-sensitive and -insensitive deamination of [2-3H]glucose in isolated rat hepatocytes: a study of the contributions of glucokinase and glucose-6-phosphatase. *Biochem. J.*, 15, 23-29.
- Van Schaftinger, E. (1995)
Use of assisted fertilization. *Hum. Reprod.*, 11, 1784-1785.
- Van Steirteghem, A., Liu, J., Nagy, Z., Joris, H., Tournaye, H. und Liebärs, L. (1993)
Flp mediated tissue-specific inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor gene in the mouse. *Oncogene*, 17, 1-12
- Vooijs, M., van der Valk, M., te Riele, H. und Berns, A. (1998)
Adenovirus calcium phosphate coprecipitates enhance squamous cell carcinoma gene transfer. *Laryngoscope.*, 7, 1290-6
- Yi, S.M., Lee, J.H., Graham, S., Zabner, J. und Welsh, M.J. (2001)
Targeting Frequency for Deletion Vektors in Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 2404-2410
- Zhang, H., Hasty, P. und Bradley, A. (1993)
Fidelity of targeted recombination in human fibroblasts and murine embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 15, 8067-8071
- Zheng, H., Hasty, P., Brennemann, M.A., Grompe, M., Gibbs, R.A.; Wilson, J.H. and Bradley, A. (1991)

MALDI-TOF-MS

- Bantscheff, M., Weiss, V. und Glockner, M.O. (1999)
Biochemistry 38, 11012-20
- Bantscheff, M. und Glockner, M.O. (2001)
MALDI-Massenspektrometrie in der Proteomforschung, *Biospektrum* 3/2001, 250-251

Billeci, T.M., und Stults, J.T. (1993) Anal Chem 65, 1709-1716

Gassen, H.G., Schrimpf, G. (1999)

Gentechnische Methoden, Spektrum Verlag, Auflage 2

Karas, M. und Hillenkamp, F.(1988) Anal Chem 60, 2299-2301

Karas, M., Bachmann, D. und Hillenkamp, F. (1985) Anal Chem 57, 2935-2939

Lottspeich, F., und Zorbas, H. (1998)

Bioanalytik, Spektrum Verlag, Berlin, 1

Nicolin1

Brening, B. und Brem, G. (1992)

Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (ryr1). FEBS Lett., 24; 277-279.

Eisen, J.A. (1998)

Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. Genom Res. 8: 163-167

Goody, R. S. (1995)

Proteine, Spektrum der Wissenschaft, S 7-8, Oxford

Leeb, T., Breen, M. und Brenig, B. (2000b)

Genomic structures and sequences of two closely linked genes (AMT, TCTA) on dog chromosome 20q15.1-q15.2. Cytogenet Cell Genet, 89, 98-100

Leeb, T., Neumann, S., Deppe, A., Breen, M. und Brenig, B. (2000a)

Genomic Organization of the dog Dystroglycan Gene DAG1 Locus on Chromosome 20q15.1-q15.2. Genome Res., 10, 295-301

Mittenhuber, G. (2002)

Phylogenomics- ein neues Arbeitsfeld in der Postgenomära. BioSpekt 5: 616-618

Zell-Linie

Mather, J.P., and Roberts, P.R (1984)

Introduction to Cell and Tissue Culture, Theory and Technique, Plenum Press, New York, N.Y. 10013

Anhang

Die genomische Sequenz des murinen *Nicolin1* und *AMT*-Gens

AAATTCCTGA CCATACACCT CAGATTCTTT AATGTTCCCA AATGCCTCAA TATAAAATGT	60
AAAAGGAAAA CTTGGTAGGT TGGCATGATA ACACATACCT TTAATCCCAG AATTATGGAG	120
GCAGATGGAT CTCTCTGAAT TTGAGGTTTG CTTTCATCTAC ATCTGTAGTG AGATCTTGTC	180
TCAAAAAATA AACAAATCCC AAACCAAGTA TTTGCCTCTT CTCCGGTCAA TCAATTTATT	240
GACTGTTTTG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTAGCTAG GGCCTCACAT	300
AGCCCAAGCT AACCTGAAAC CTA CTACTACATT CATGAGATTA GCCTTGAACC TCTGATCTTA	360
CCGATTCTGC TTCTACCTTC CAAGTGCTGG GTTAACTAAA GTGTCACCAA TGCCTGGCAT	420
TTTATTTCTT AACTAAATTT TACAATTTTG GTGGGATTAC AGGAGTGAAT CAATACCTTG	480
TGACCCCACT TTGTTTGT TTGTTTGT TTTTGAGACA GGACTGGCTT GGAACCTCTCT	540
TTGTAATCA GATTGGTTTT AAACCTCTCAG TGATTCACCT GCTTCTGACT CTGCCTCTC	600
AATGTTGGGA TTAAAGGCTT GCACCAATAT ACCTGATCTG GTTGTAGTT TTAAAAATAC	660
CATAGTTCCG AGGTCAGGAA AAGGTGCCAT ATCCCTTAAG TTGCCATATA CCTCGGGTTG	720
TACCCAGATG GATCTTGTGG ATGCTATGGA GAAATAATTC CTTGTGTAA CATCCTTGGC	780
TGTCCTGGAA CTCTCTGTAG ACCAGACTGG CTTCGAACTC GGAGACCTGC CTGCCTTTGC	840
CTCCCAAGTG CCGGGATTGA AAGCGAGTGA CACTAAACGC CTGATTGTTT TATACATCTT	900
AACCTAATAA AGTAGCAGAA TTTAAGTGAG GGATAAGACA GCCCAAAGCA TTCTGGATCC	960
TTTGATAAAA GAACGGCTCG ACGGTTGCCG GGAGCAGCCC GGGAGGGACT TACAGACGCG	1020
AGGATGATTG GTTGAAGAAG AACTTCCGTT GACATTTCCG ACTCTTGACC CGCCCTGATC	1080
ATCGGTGATT GGCTGAAC TGCTGAAC TGCTGAAC TATGTGGCCT GGGAGTTGTA GTTCTTTTGG	1140
TTGATAAGGG ACGCCAATAA GAGCTAGTGG TTGGATGGAG ACTGTGAGCG GTGATTTTGC	1200
TTGGTTGTAA TCTCCCAAT CATGTCCCGT GTGTTGGTGC CCTGTGATGT GAAAAGCACT	1260
GTAGCCCTGC AAGTGGGCGA CATGAGGACC TCTCAAGTGC GGCCTGGCGT GCTGGTCGTC	1320
GATGTCACCT TTCCCAACAT CGCGCCTTTC GAGGTGAGCA ACCCCCCATA TAAGCGATCA	1380

Nicn1 Exon
1

AGGCTTCTGG	GCGGGGAATA	CCTAGTAACT	TGGGCGTTTC	CTAGGCATTT	ACACAGCTTC	1440
TACAGTGTCT	CTTGCTTTTG	CGAATTGGGC	CTATTGAGAA	GCATTTACAG	TCTTTATTAA	1500
TAAGCTTTAT	TAAATAGACT	AGAGTTTCCC	GTCCTATCCT	CTTCAGCATC	TCTTCCCAGT	1560
GCCCAGGATA	TCACTGGAAC	TACAATTTGA	ATCTCAGTAC	AAGTGAGAGG	ATATTTGATT	1620
TCGGCCGTAG	CTGCAATCGT	CAAACAATGA	TGCAAACGTA	CCATTCCAGT	GGCCCTGCCC	1680
ACAGGTCAGG	TGCAACCTAG	CCTTCATCTA	GGTCCTCCTG	GTGACTTGT	TCCAATCCCT	1740
AGTTGTCTTT	CCATTTCAAC	TGACAGTGAC	AGGGCGTTGC	ATGACCTCAA	CACAGGACAA	1800
AGGCTACCTC	TAATGGCATA	GCATCCTTCC	CTTACCACC	CTCTTGGCTC	TATGTGCTTT	1860
GTATTACAAT	ATGTCAATTCT	CTCGCAAGAT	GTTGCTTCCC	AACAATCTGG	GGAAACCTAG	1920
TTAATTGATC	CGACCTGGA	AAATCTGAGT	CAGTGTGTTT	GAGGTGGATC	TTTGACATCT	1980
ATATTTTAT	TTACTTATTT	AATATTTTTA	TTTTAAAAAA	GCTTTATTTT	AAATCTATGA	2040
GTGTTGTTTT	TGCATGTCTG	CATATATACC	TTGTGCATGG	CTGGTACTAG	TAGAGGCCAG	2100
AAAAAGGTTT	TGAATCCTCT	GGAACCTGGG	TTATGAACAG	CTGTGAGGTG	CCGTGTAGGT	2160
GCTGGGAACC	AAACCTGGTC	CTCTGCAAGA	GCACCAAGTA	CTCTTCATTG	CTGAGCCATC	2220
TCTCTAGTCC	TGATATCTGT	GCTTTTGTGT	GTTTTGTTTT	GTTTTGTTTA	AGTTCATAG	2280
GTGATGCTGG	TGTGCATCGA	GATGGAAACT	ACTGCTATGG	CAGTTGGTAC	TCTAGGCTCC	2340
CCAAACCCCT	CCAGTGCAGG	ATCCTACTAT	TCTTCTTTTT	TGCTGTTGCT	TTTTGTTTTT	2400
CGAGACAGGG	TTTCTCTGTG	TAGCCCTGGC	TGTCCTGGAA	CTCACTCTGT	AGACCAGGCT	2460
GGCCTCAAAC	TCAGAAATCT	GCCTGCCTTT	GCCTCCAAG	TGCTGGGATT	AAAGGCGTGG	2520
GCCACCACTG	CCCGGCCCTA	CTATTATTCT	TTTTTTTTTT	TTTAAAGATT	TATTTATTGT	2580
TATATGTAAG	TACATGGTAG	CTGTCTTCAG	ACACACCAGA	AGAGGGCGTC	AGATCTCATT	2640
ACAGATGGTT	GTGAGCCACC	ATGTGGTTGC	TGGGATTTGA	ACTCAGGACC	TTCAGAAGAG	2700
CAGTTAGTGC	TCTTAACAGC	TGAGCCATCT	CTCCAGCCCT	CTTTTGTGTT	TGTTGTTGTT	2760
GTTTGTTTGT	TTGTTTTACG	AGACAGGGTT	TCTCTGTGTA	GCCCTGGCTG	TCCTGGAAC	2820
CACTCTGTAG	ACCAGACTGA	CCTCGAACTC	AGAGATCTGC	CTGCCTCTGC	CTCCTGAGTA	2880
CTGGGATTAA	AGGTGTGCGC	CACCACGCCC	AGTTCCTACA	ATTATTCTTA	TTCTGGTCTA	2940
AATCTGCTAA	TTCTGAGAGA	GAGATGGAGA	GAACCTCTGC	TAGTACCAGG	CTAAAGGACA	3000
TACTCAGGTT	CTCTCACTCT	GGTACTTTTT	AAAATTTGCT	ACTTTTGGGA	GGGGTGGGGA	3060
TCTCAAAAAA	CCCAGAGTGG	CCAAGAATAG	GGGAAGCTTA	TCATGAACTT	CTGATCCTCC	3120
TGCCTCTACC	CCTCAAGCAC	TGGATTACAG	GTATACATCA	CAGGTGTACA	TCACAGGTGT	3180
ACATCACAGG	TGTACATCAC	AGGTGTACAT	CACAGGTGTA	CATCACAGGT	GTACATCACA	3240
GGTGTACATC	ACAGGTGTAC	ATCACAGGTG	TACATCACAG	GTGTACATCA	CAGGTGTACA	3300
TCACAGGTGT	ACATCACAGG	TGTACATCAC	AGGTGTACAT	CACAGGTGTA	CATCACAGGT	3360
GTACATCACA	GGTGTACATC	ACAGGTGTAC	ATCACAGGTG	TACATCACAG	GTATACATCA	3420
CAGGTATACA	TCACAGGTAT	ACATCACAGG	CCTGGTTTTAT	GTATTACTGG	GCATCTAGCG	3480
TAGAACTGCA	AACATGCTAA	CCAAGGCAAG	CACTGCACCA	GCTGAGCCAC	ATCCTCAGCC	3540
CAATACATTA	CCTTACCTAT	CTTCGTGTTG	CCACTTAGCA	AGCTCATCCA	GGTTTCACAT	3600
GTCCATTTTC	TGCTTTCTTC	GGGGTTAAGG	TTCTGACCTC	CGATGCCATC	TCAGATATGT	3660
TGGGATGGTT	TGTTTGAATG	ACTTACAGAT	CTGTGAGCAC	TTTTAGGAAA	GCAAAATTGC	3720
ATTTGGGCCA	CAGTAATTGT	TGAATTGTCT	AGCAAAAAGT	TGCATTCTAG	CCGGGCGGTG	3780
GTGGCGCACG	CCTTTAATCC	CAGCACAGGG	ATCCCACTTC	CACGGAGGCA	GAGGCAGGCG	3840
GATTTCTGAG	TTCGAAGCCA	GCCTGGTCTA	CAAAGTGAGT	TCCAGGACAG	CCAGGGCTAT	3900
ACAGAGAAAC	CCGGTCTCAA	AAAACCAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAAG	TGTGCATTCT	3960
AAAAAGAAGA	GACAATGTCA	CTGTGTCGTT	TGTATTCTAG	TTGCAGGAGA	TCATGTTTAA	4020
GAATTACTAC	ACAGCTTCT	TGAGCATCCG	TGTTCTGCAA	CAAAGCTCCA	TGCACACAGC	4080 <i>Nicn1 Exon</i>
AGCCAAGTGG	GTAACCTGTC	TTGCGGATTA	CTGTTTGTATG	CCTGACCCAC	ACAGTGAAGA	2
GGGAGCCAG	GACTATGTAT	CACTGTTCAA	GCACCAAGTTC	AGCTGGGCCT	CAGCATGGCC	4140
GGGAGCCAG	GACTATGTAT	CACTGTTCAA	GCACCAAGTTC	AGCTGGGCCT	CAGCATGGCC	4200
AGGGAATACT	GGATGGGGAC	TTCCTGCCTA	TGGATTGAGC	AGAAAAGCAG	GAGGAAAGAG	4260
TCGGGCAAAA	CTGGGCTGGA	CTATGGCTTT	CAGGCTGGTA	CTTTGGAGGG	GCCACTGTTT	4320

TGTCCTTCAT	TTAGACTTGG	AGAAGCATT	GGTTTTACTG	TAGATTGGGA	GGTTTTTGGT	4380	
AAACGAGCTA	GGTCTTCAGT	GGGTCTTTTA	TGTATTTGTT	TTGTGAGAAA	GGGTTTCTCT	4440	
GTGTAGCCCT	GGCTATCCTG	GAACCTGCTT	TGTAGACCAG	GCTGGCCTTG	AACTCAGAGA	4500	
AAGGAGCTTC	CTGCCTCTGC	CTCTGCCTCC	CCAGTGCTAG	GATTAAGTGT	GCACCACTAC	4560	
GCCCTGCTCA	GTGGGTCCCT	TGGTATGTGT	GTCAGATGCT	GTGTGACATG	AACAGAGTGC	4620	
TGGAGCTGCG	TCTGATTCTG	CGGCAGCCAT	CACCACTGTG	GCTGTCTTTC	ACAGTGGAGG	4680	<i>Nicn1</i> Exon 3
AACTGCAGAT	CTACCAACAG	GGACCAAAGG	CAAGTGACTT	TGCAAAACCT	ACTGACTAAC	4740	
CCTTTACTGT	AAAAGCTTCT	GGCTCTGACG	AGGAGAGATG	GGGCACTGGG	GTGGGTCACA	4800	
AGCAAGGATA	GTGAGACTCT	GAAGGAAGCC	CTCATGGAAG	CTGGAGTATG	AATGCAGGAG	4860	
TCCATGATCA	GATGTGACTG	ACGTTCTGTG	TCAGAATCCC	CTGGCCTTTG	AGACCGCTCA	4920	
CTACTTTTGT	TGCTTATGTT	CCTGGGTTC	CCTTCTGCAT	AAAAGGAGAG	TTTATGAGG	4980	
GTCCCTTTGA	TGTTATGGTT	CTGAACATGG	ATTTCCAGT	GTCTTAGGCT	CAAGGGTCT	5040	
TTTCTTTGCT	CCCAGGTGCC	AGAGCTCTTA	GATTCTGCCT	CATTGAGGTC	ATTATGCCTT	5100	
TGCTTTGCAG	AGCCCTCCT	TGGCGTTCCC	CAAGTGGCTT	TCCCACCCAG	TGTCCAATGA	5160	<i>Nicn1</i> Exon 4
GCAGCTGCT	CCCCGCTTG	AGGTAAGCTC	TCTAACACTG	GGTATTAACC	ACATATACAT	5220	
GGTTCTAATG	TCTAGAGCAC	AAAAAAGTG	GGCCTCTGGC	TATCCTGGGG	CTACCTGGAA	5280	
ATGTAGCTCA	GTGGTAGAAT	ACTTACTACC	CAACACCACA	GACATTTGGG	TCTGGACCTA	5340	
GGGCCTATGG	TTCAATGTCT	TCTTGGGAGC	TCTGTGGGCT	TTGAGTCATC	CCTGGTTTAA	5400	
GCATGGGTCT	TGCTTAATGA	CCATCAGGCT	ATAACTGTTC	TTCAAGTTAT	CTGGGAATGT	5460	
TACTGGTTTC	ATCTGCAGTG	CTCCATAGCT	TATATATATC	TAAGGGCATT	TCTGGGGAAA	5520	
GATTTCATGAC	CATGTTCCCT	CCTTCTGGAG	CAGGGTCTCC	CAGATCCCAG	CAGAGTGTCC	5580	
TCTGAGGTGC	AGCAGATGTG	GGCACTGACA	GAGATGATTC	GGCTAGTCA	CACTTCCACG	5640	<i>Nicn1</i> Exon 5
AGGATCGGCC	GCTTCGACGT	GAGTAACAGT	GTCCTCCCC	CTTGCTTCCA	TCACTTTGAG	5700	
CGGCTCAACA	CTGATCGTTT	CCTGTGTTGC	AGGTGGATGG	CTGTTATGAT	CTGAATTTAC	5760	
TCTCCTACAC	ATGACAGCA	GCTTCTACGT	GAGATGTTGG	CTTCTGTGC	CCATCTAGAT	5820	
GGGGTTTGGC	CACCAGAGGC	CGTTCCTGT	GCATCCAAGT	TCTATCTGGG	CAAAAATCTG	5880	
CAGATTGGGA	ATTCTTGATA	CCCATCCAGT	TGTTTTAGCA	TGAATTCCTA	GTGGGGGCAC	5940	
TTCTGTCTCT	GACTGTCTGA	CATGTAAATT	CAGTCTCTTC	CTCTCAGAA	TCACCGTTTC	6000	
TAATTAGAAT	CCTTGAGCTC	CTCTTGCTTG	TCCTGCCAAC	ACGAACACCC	CAGTCTGCTA	6060	<i>Nicn1</i> Exon 6
CCATTTCCCC	CCATTGCTGA	GATAAACCTG	TCACTTGTAG	CAAGGAAGCC	ACTGTTGTTT	6120	
TGACACTCAT	GACCTGGGAA	GCTTGAGGAA	GACATACCCT	CTATTCATT	CTCTGCTTCT	6180	
GCTAGTAGCC	CTTGCTCTT	TGTATTGTAT	CCATGAAAAG	AAAATGTCTT	AGAGCCAGGC	6240	
ATGGCACACA	CCTTTCATCT	TAGCATTCTG	TGAGTTCAAG	ATCAGCCAGG	TCTACACACT	6300	
GAATCCCAAG	GCCAATCAGG	GCTACATAGT	GAAACTCCAT	ACTAAGAAAAG	GAAGGAAGAA	6360	
AGAAAAGAAA	GAAAAAGGA	AGAAAAGAGGA	GGAAGGAAGG	AGAGAAAAGAA	AATAGCTCTC	6420	
TTTGAAATTG	TCTGCTTCCA	GCCTGGGAGG	CGAAGATGAG	ACTTCTGGGA	GCTTGAGTGC	6480	
TTAAGTCCCT	ACAATTGCTC	CTGAAAAGTG	TTCTGTGTCA	GTCTGGGTA	GGTGCTGTTG	6540	
GCACAGCTGG	GGCCAGAGCA	CGAGTCCTCC	CTTCGGACTA	TTTGTATCA	GATTCAGCAT	6600	
GAAGTACATC	CAACGATCCC	TGTCCTTCT	CTCAGTTGCT	TCTGCCCGTC	ATGCTCAGGG	6660	
TGCTGAGAGA	GCCCTGGGGG	AGTGCCTCCA	AGCCAACGTC	TCACTGACAC	TCATTGAGGC	6720	
TGAGGCCCTC	CATTACCCCA	GAGCAACCAC	TAAATGAGGA	AGACTACTGC	TCTTTCCTGT	6780	
GATCAGATTG	TTTCCCTCTA	GTCCTTCTCTG	GCTTCGTCCC	CGGGCAGTAT	TATTAAGCCG	6840	
TGCTGCAAGG	TGTCTCAGAT	CTGGAAAATT	GGACACGAGT	ATATGCAACA	GTTTTCTGGG	6900	
AAAGTCTGGC	CACCTTGGT	AGCTACCTTG	CATCTCTGCA	GTCAGCCCTC	TTGAAGGTCC	6960	
TGTCTTCACC	TACAGGATCA	TAGTTAAGCC	CCACTGACAG	GGTAATTACC	ATAGTCCAGT	7020	
GTTTCAGGGAA	CAATGGTCCCT	CAGTACACTT	GGGCAAAGAG	GATCCTGAAG	TGGCAGGGGC	7080	
TATGCATAAT	TCACAGCTGT	GTTCCCTAAGT	TCCAGAGCT	GGAGCTAGTG	TACGGCAAGA	7140	
TCAATAAATA	CTTGTGGAAT	ATGTGACTGT	GTCAGCTGCT	TGTGCCTAGA	GGGAGAGCTA	7200	
AGATAAAAGG	CTGGGCCAGC	CAGGGTACAG	TGCTGGCCTG	GAGGGCTTCA	CTCTCCAGTG	7260	

ATTGCTCCGC	CTCCCACTGC	TATTTGACCT	GAATCTGTAA	TTCAGGCTTT	TCAAACATTT	7320	
GGAGAACTTT	GACCTTCTGG	AGGCTGGGAG	TTCTAACCCC	CAATTCTGGT	TCTAGGCAGC	7380	
CTATTCTGCT	CTGAACTTGT	TTTGATTAGC	TTGAGGAAGA	GCCTGAGGCC	TTCGGGAGTC	7440	
AGCCTCAATT	TAAATCCCAG	CCTGCCCCTAT	GGGCTTCCCG	CCCCCTGTGG	ACTAGAAAGA	7500	
CCTGTCCAGG	CTGGGTTTGG	ACTACATCTC	CCAGCGTGCC	TGGCAGAGTA	GTGGCTTCAG	7560	AMT Exon
TGTGACTTCA	GTGTGCCGGC	CGCACCAGTT	GCGGGTGACA	ATGCATCGGA	TAGTCAGTGT	7620	1
GGTAGCCCTT	CTGGGTTTTC	GCCTGCAGGC	ACAACCCTTG	GTCCAGAGTC	GCCCACTCAG	7680	
TTCTGTACAG	GTGGGATAAA	GGATGCTGGA	ATTTGTTATT	GGTCTTGAG	GGTGGGGAAG	7740	
GAAACTGATG	GTGACTGGGG	CCCTGGTGGC	ACTAAGTCTG	GCTGTCTACA	GGATGTGCTC	7800	
CGCAGGACTC	CACTCTATGA	CTTCCACCTA	GTCATGGAG	GAAAAATGGT	GGCGTTTGCA	7860	
GGGTGGAGTC	TGCCTGTACA	ATACCGTGAC	AGTCATGTTG	ATTACACCTT	GCACACACGC	7920	AMT Exon2
CGGCATTGCT	CTCTCTTTGA	TGTGTCCAC	ATGCTACAGG	TGAGTCAGGG	AGGATCGGGC	7980	
CTTGCTTCCA	CGTCTACAGA	ACTGAGCTCT	GCAGCTTGA	GGCTATCTTA	GAAGACTAAA	8040	
GTGTTAGGGA	CTCTAGAGGG	CTAACTCAGG	AGATCTGATG	ATGATGTATC	TTTGATCTCT	8100	
CCTGCCTGCT	CCTGTGGTGT	GTTTTAATGC	CCCGGGGCTT	GCTAGATAGA	AATTGGTTTG	8160	
GTATCTCAGT	AAGGTGTTAG	ATCGCCTTGA	ATTTTATAGT	GTTGCTTGGT	TGCACGGAGG	8220	
CTGGGAGGGA	TCCTGGAATT	GAGAAGGTAG	GACCTCTGCC	CTCTTCAGAA	CCAAAAGACT	8280	
AGTAGTCACT	TCTGGGCTGG	ACTGGAGGAT	GCTTGCCCTT	CAGCCTTTTA	GATTACAGAT	8340	
ATTGCAGTGG	CCTGGGGCTT	TCCCTATTTT	CCCTAGACCA	AGATATTTGG	CTGTGACCGA	8400	AMT Exon
GTGAAGCTGC	TGGAGAGTGT	AGTGGTTGGA	GACATTGCGG	AACTAAGGCC	TAACCAGGTG	8460	3
AGCCTACTTT	ACTTCTTCTC	AAAGTGTGTT	TTCAGTCACG	AGCCAGTAAA	CAGCTTACAC	8520	
CCTTGCTCCTA	AGTGTAAATCA	GCAGCCAACG	GCGCACGCCT	TTAATCCCAG	CAGTTGGGAG	8580	
GCAGAGGCAG	GCGGATTTCT	GAGTTTGAGG	CCAGCCTGGT	CTACAGAGTG	AGCCAGGGCT	8640	
ACACAAAGAA	ACCCTGTCTT	GAAAAACAAA	AACAAAAACA	AACAAACAGT	GTAAGAAGCA	8700	
CAAAGACAGG	TCAGATACAG	CTTTTCAGGG	CTTGCTATCT	TGATGGAGTC	TTTTGAGTCA	8760	
TTTCCAGATA	TTCAGCTTTG	GAGCAATATC	CCAGCCTTAC	TCCATTGGGT	TGGGAGGCCA	8820	
GAGACCACCA	TTTATATACC	CTGACCTCTC	ATGCTTCCCA	TATCTTTGCT	AATTAAAGTG	8880	
TGGTCCCTAA	ACCAGGAGCC	TCTCCATCTT	CTAGGAATAT	GCTAAGGCAC	TGCTCTGGAC	8940	
CTGCTAAGCC	ATAACCTTGG	TTTTACTAAG	ATCCCTAAGT	GTGATCTATC	AGTCTCAGGT	9000	
TTTGTCCCTC	CAGTGGCAAA	GGCTAACAAT	GTTTTTTTGT	TTGTTTGTTF	TAACACATTG	9060	
CTGAAGAACA	TAGTGGGAGC	CTGCGAGATC	ATGAAGATGG	TTTTTTGAAGC	TTTTAAGCCT	9120	
GGAGGTTTGC	ATATGGGTGG	AGTTACCTGG	GTGGAGTGAA	GCAGTAGTTC	CTAGGTCTCA	9180	
GAGTATGAAA	TGAGTTTCTA	AGAACTGAGT	AGTGAGGGAG	CTGAGTCTGG	GGAGACCCCC	9240	
TGAGATGGGA	GGAGTGAGGA	TGTACTTGAC	AGATGGAGAG	CAAAGGCCCT	GAGCCTTGAG	9300	
CCTTACCTTG	TACGTTTAC	CCAGTACTGT	GTTTCATGAGT	TTGCGGTAGC	TGAATGGACT	9360	
TAAGTATGTT	TCTGGCTCAT	ACTGCTTGGC	TTCCTGGATC	TGGAGACAAA	CGATGCTCTT	9420	
CTTTATTCAT	AGGGAACACT	CTCTTTGTTT	ACCAACGAAG	CTGGAGGCAT	CTTAGACGAC	9480	
TTGATTGTAA	GCAATACTTC	TGAGGGGCAC	CTGTATGTAG	TATCCAATGC	TGGCTGCCGG	9540	AMT Exon
GACAAGGACT	TGGCTCTCAT	GCAGTACTG	CTGCTGCACT	TTATTCTAGG	TACTTTGTGT	9600	4
TTATAAAGAA	GCTCTCAATG	CAGATAGGGG	CTCAGAGAAT	GACTCTGGAT	AACAGAACAG	9660	
TCAATAGACT	CAAGAGCAGG	CCTTCCCTGG	TACAAACCAG	TGTTTGAGGA	TAGGCACTAG	9720	
AGGAGTTGGA	TAAAGCTCAC	CCTGAAATGA	GCATCCTCAG	GTGAGGGGAA	GGATCTGCAA	9780	
TGTCCAGTCT	ATTGTAGGAG	CTCAATAATG	ATCATAGACA	CTGATGTGTT	TTTTTTTTAA	9840	
AGATTTATTT	ATTATTTATT	TTATATGTAA	GTACACTGTA	GCTGTCTTCA	GACACACCAG	9900	
GAGAGGGAGT	CAGATGTCAT	TAAGGATGGT	TGTAAGCCAT	CATGTGGTTG	CTGGGATTTG	9960	
AACTCAGAAC	CTTCGGAAGA	GCAGTCAGTG	CTCTTAACCA	CTGAGCCATC	TCTCCAGCCC	10020	
TGATGTGTTT	GTCTTATATT	TCAGGACAAG	GTCAAGGAGT	TCCAGAACAG	GGGCCTGGAT	10080	
GTAGGCCTGG	AGGTGGTAGA	GAATGCCCTG	TTAGCTCTGC	AAGGTGAGAT	GCCAGATTGG	10140	AMT Exon
AGTTAGAGCC	AGCCCTTGCC	TTCCTGGCTT	TATTTGCATG	GAGGCTATAT	GGGGAAGATG	10200	5

TGGATATGAT ATCTGCACAC CACAGTTCCA AAGTTAACCA TTGTTTCTCT CCTCTCACCT	10260	
ACTGCAAGGC TATCCATAGG CTAGGGACAA GGGCATTCTC TCTCCACTTG CAGAGTTGGG	10320	
CTTGCTGGG ACTTCTTCTG CTTTCTAAAT AAGGGCTGTA GTCCAGGGG TGTGGGTTT	10380	
AACTCCCTTG GTTATCTCT TTGATCTAGG ACCCACGGCA ACACAGGTGT TACAGGCTGG	10440	
GGTGACAGAT GATATGAAGA AACTACCCTT CATGACAAGT GCTGTGATGG AGGTGTTCCG	10500	AMT Exon 6
TGTGCTGGC TGTCTGTGA CCCGCTGTGG CTACACAGGA GAAGATGGTG TTGAGGTAAG	10560	
TCAAGAAGTA ATTACTCTAC ATGTTATCAC ATTTCTAGCA GGAAGATCTT AATTCAAGGT	10620	
GGCTAGGTTT CCATAGTGAA TTCCAGGCTA ACCAAGACTA TATAGTGAGA GCCTATCTCA	10680	
ATGAAAACAA AGCCAAAACC AAATCAAAAT CCTAAAAGAA GCCAGGCGTG GTGGCACACA	10740	
CCTTTAATCC CAGCACTTGG GAGGCAGAGG CAGGTGAATT TCTGAGTTCG AGGCCAGCCT	10800	
GGTCTACAAA GTGAGCTCCA GGACAGCCAG GGCTATACAG AGAAACCCTG TCTTGAAAAA	10860	
CCAAACCCAC CCCCCCCCC AAAAAAAAA AACCTGTCTC AAAAAACAA AAAATAAAAT	10920	
AAAATAAATA AAAATAAAT CCTAAGACAA AAAAGATCTA CTTGTAAAGC TTAGATCGGA	10980	
TAGCGCATGC CTATAATCCC AAAACCTGGG AAATAGAAAC AGTCCAATCA TAAATTACAG	11040	
ACCAACCTTG GCTAACTGTC TCAGACAGAG GAATAGGATT GGGAAAAGTG GGCAATACAC	11100	
TGTAGTGGTA GAGAGTTTTA CTCTGCATG ACCAATAGTA GTAAAAGTAG CTACAGCATT	11160	
CAAGACACTG CCTATCTGCT CTCTGTTCTT TTGTGCAGAT ATCCGTCCTCA GCAACAGGGG	11220	
CAGTCCACTT GGCAGCCCGA GATAGCCTGC GCCTGGAGGC AGGCCTCTGT CTGTATGGGA	11280	AMT Exon 7
ATGACATCGA TGAACATACT ACACCTGTGG AGGCAGCCT CAGCTGGACA CTGGGTGAGC	11340	
CGGGCTAGCA GTCAAGGGGG TCCTGAGAGC TAGAATACTC TTTAATGAAG CCAGCTAGCC	11400	
CAGGACTACT CCTAAAGATT GTGTAGTCTG GAACAAGTGA CTCAGCCTTG CTGTGCCTTC	11460	
ATTCCTAAA GGTGCTACTG TGGCTTTGTC TATATAAAC TGAGGTCTCT ACATATGGCT	11520	
TCCAGAGGGT AGGTGATGGT TGGTTGACTG ACTGTAATTC AGGGGAAGAA TAGTAGAGCT	11580	
CAAGAGGCCA AGTGTGTTT AATTGGTTGT CACTTGGAGT CTTAGTAGTA AAGACTTCTT	11640	
GTGCTTAGGG CTTTTGTGAA CTATGGCTTA CAGTCTGGTG TGTATGTTT CAGGTAAGCG	11700	
CCGCCGTTGC ATGGACTTCC CAGGAGCCAT TCATCTTTAC CCATCTGAAG GGCTAGGTTT	11760	
AGCGGAGACG TGTGGGGCTT ACATGTGATG GGGCTCCTGT GTGTGCACAC AGCCCCATCC	11820	
TGAACACTGA TGGCACCGTG ATTGGTAAGT GGATGGGGAT ACTGGCTGGC AGGTGTTTCT	11880	
GATAGGGATA CTGAGCTGGG CAGGGTGGTG CTAACCTATG GCCTATGCCT GGACAGGTAC	11940	
TGTGACCAGT GGCTGCCCTT CTCCCTGCCT GAAGAATAAT GTGGCAATGG GTTATGTGCC	12000	
TTCTTAGTAC AGTCGTCCAG GKACTCTTCT GCTTGGTTGA AGTGCGGCGG AAGCAGCAA	12060	
TGCTKTGGT CAGCTAGATG CCCTTGTGTA CCACAAATTA CTATACCCTC AAGTGAAAGT	12120	
GGCTTGGGGC AGGGGCTCTC CCATCCAGGA ACCTGGACCT GTAGGGCATA TAAGGGTTGG	12180	
TCAGGAAGCT GAGGCTGAAT AACTGGGGT GGCTAGGGTG GAGGTTGGTT CTGGTTGTCT	12240	
GGTCAAGGGG GGGCCCATAC CATCTATTCT CACTCCCACC CTCATACTAG GCCTCTTCAA	12300	
TTTCAAGACC CCATTTCTGA GCAAGAGAGC GGCTGCTGCA ATGTCAGCCT GGGCTCCCAC	12360	
TGACCCCTT CTGGTCTGTC TGCCAGAAGG CTATGGGCCA CTGTCGTTCT GGCATCTCTC	12420	
CCTTCCACTG TGCCAGTGCT GGCTGTGGAG TAGTAGCTCA CTTTGGGGG ATGGGGGAA	12480	
TAAAGCCTGC CCGACCTACC TCACCATGGT TTCTCACACT GCAAAGGAGT TATTACCGTG	12540	
GGTAGTGCCG GACGTCTCTT TAAGTTTACT TTGCACGAAT GCAAAGTCT GCCTCTCCCT	12600	
GGCAGGAAT GATTCCTGAC TCACTGAGGG TTGGCCCTGT CTGGCTGCTG TGCTATGTA	12660	
AACTTGGGGA CAGCTGAGGG GCACAGACTC ACTCTCCAC ATTCCCAAGT TAGCCCAGCC	12720	
TGCTGCCAG TAGCAACCAT GCCAGGCTCA CCACCTGTTC TGAGCCCCAG GGCTGTTGTA	12780	
GGACAGGCTG GGCCTCTGG ACTTGCCTTA CCCCTGGCTG ACCTTTGCC CTGGGGCCCA	12840	
TTACTGGACT CCACTCACTC CTAAAAAAAA AAAAAAAAAAT TAAA		

Allgemeine Bedingungen für die rekombinante Proteinexpression in *E.coli*

IPTG	BRL (nur Versuch1) und Roth
Inkubationsbedingungen	37 °C 330 Upm Wasserbad 10 °C, 100 Upm Wasserbad 42 °C, 100 Upm Raumtemperatur, 120 Upm
Kulturvolumen	25 ml
Verwendete Konzentrationen	Lysozym (10mg/ml) 0,2 mg/ml PI 20 µl/1000µl

Vektoren

Vektoren für die Knockout-Konstrukt-Herstellung

pKO Select TK

http://www.stratagene.com/vectors/sequences/pkotk_s.t

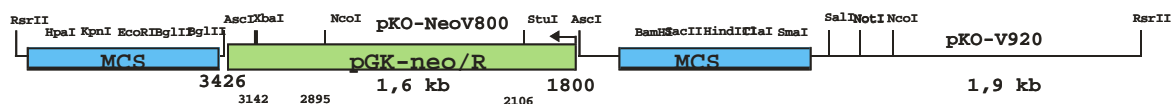
pKO Scrambler V920

http://www.stratagene.com/vectors/sequences/v921_s.txt

pEGFP C1

<http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/vectorsE/pEGFP-C1.shtml>

pKO+NeoR



Primer zur Herstellung der Knockout-Vektoren

Name	Sequenz (5' > 3')	Gen	Position	Besonderheit
Primer 1	TTT ATA GGT ACC TCA GAT TC	murines <i>Nicn1</i>	Sequenz vor dem 1. Exon	besitzt <i>Kpn I</i> Erkennungssequenz
Primer 2	ATG CTA TAC GAA GTT ATC ATC TGG GTA CAA CCC GA	murines <i>Nicn1</i>		enthalten jeweils die Hälfte einer <i>loxP</i> Sequenz
Primer 3	ACA TTA TAC GAA GTT ATG ATC TTG TGG ATG CTA TG	murines <i>Nicn1</i>		
Primer 4	AAT TTA TAC TCG AGA CAC TG	murines <i>Nicn1</i>	Sequenz nach dem 1. Exon	besitzen <i>Xho I</i> Erkennungssequenz
Primer 5	TTT ATA TAC TCG AGT GCG GTG GCG GCC GAA G	Plasmid pK 11	Sequenz aus Vektorrand und <i>loxP</i> bzw. <i>FRT</i> Sequenz	besitzen <i>SacII</i> Erkennungssequenz
Primer 6	AAT TTA TAC CGC GGC CGA ATT AGG TACC GGG CCC			
Primer 7	TTT ATA TAC CGC GGC TCT TGC TTT TGC GAA TTG GG	murines <i>Nicn1</i>	Sequenz nach dem 1. Exon	
KO_New_1_ <i>Xho I</i>	AAT TTA CTC GAG ACG TTT GTA ACA GTT CAG	murines <i>Nicn1</i>	Sequenz vor dem 1. Exon	besitzt <i>Xho I</i> Erkennungssequenz

Primer zur Herstellung der cDNA-Konstrukte

Name	Sequenz (5' > 3')	Gen	Position	Besonderheit
ZeoNicn1-F	AAT TTA GGA TCC CAA ATC ATG TCC CG	murines <i>Nicn1</i>	cDNA-Sequenz	besitzt <i>Bam HI</i> Erkennungssequenz
ZeoNicn1-R	AAT TTA CTC GAG CTG CTG TTC ATG TGT			besitzt <i>Xho I</i> Erkennungssequenz

pz12Nicn1_F	AAT TTA AAG CTT TCC CAA ATC ATG TCC CG			besitzt <i>Hind</i> III Erkennungssequenz
pz12Nicn1_R	AAT TTA AGA TCT AGC TGC TGT TCA TGT GT			besitzt <i>Bgl</i> II Erkennungssequenz
pEGFP_Nicn1_R	AAT TTA GTC GAC AGC TGC TGT TCA TGT GT			besitzt <i>Sal</i> I Erkennungssequenz

Primer Zur Herstellung der Expressionskonstrukte

Name	Sequenz (5' > 3')	Gen	Position	Besonderheit
myc_HisB_BamHI	TTT ATA GGA TCC CTG TCA CCA TGT CCC GCG	humanes <i>Nicolin1</i>	cDNA-Sequenz	besitzt <i>Bam</i> HI Erkennungssequenz
myc_HisB_XhoI	ATT TAT ACT CGA GCA AGT GTA GGA GAG CAA G			besitzt <i>Xho</i> I Erkennungssequenz
pGEX2T_NICN1_Bam	TTT ATA GGA TCC ACC ATG TCC CGC GTT TTG			besitzt <i>Bam</i> HI Erkennungssequenz
pGEX2T_NICN1_EcoRI	AAA TAT GAA TTC CCA TTC AAG TGT AGG AGA G			besitzt <i>Eco</i> RI Erkennungssequenz

Primer zur Sequenzierung (Kontrollsequenzierungen)

Name	Sequenz (5' > 3')	Gen	Position	Besonderheit	
ORF_V-1218	TTC TCT GGA AAA GTA GCA GG	murines <i>Nicolin1</i>	Sequenzen vor dem 1. Exon	IRD700, Sequenzprimer	
ORF_V-642	GAG ACA GGA CTG GCT TGG				
ORF_V602	TGG ATG GCT GTT ATG ATC TG				
ORF_V-60	AGG TAG TGG TTG GAT GGA G				
ORF_V_In1a	CCT GCC ACA GGT CAG GTG		Sequenzen aus dem 1. Intron		
ORF_V_In1b	TTC AAC TGA CAG TGA CAG GG				
ORF_V_In1c	TGG CAG TTG GTA CTC TAG G				
ORF_V_In1d	AGA GTG GCC AAG AAT AGG GG				
ORF_V_In2a	CTT TGG AGG GGC CAC TGT				Sequenzen aus dem 2. Introns
ORF_V3'_1	GGT CTA CAC ACT GAA TCC C				Sequenzen aus dem 6. Introns
ORF_V_In6a	GAA GTG GCA GGG GCT ATG				
ORF_V_In6b	GTC GCC CAC TCA GTT CTG				
ORF_V_In6c	ACG GAG GCT GGG AGG GAT				
ORF_V_In6d	TGT GAT CTA TCA GTC TCA GG		Sequenzen vor dem 1. Exon		IRD800, Sequenzprimer
ORF_R-500	GCA GGT GAA TCA CTG AGA G				
ORF_R123	CGC GAT GTT GGG AAA AGT G	Sequenzen aus dem 1. Intron			
ORF_R_In1a	GGT CGG ATC AAT TAA CTA GG				
ORF_R_In1b	CCC ACG CCT TTA ATC CCA				
ORF_R_Ex2a	TCA CTG TGT GGG TCA GGC	murines <i>Nicolin1</i>	Sequenz aus dem 2. Exon		
ORF_R3'_1	ATA GAA CTT GGA TGC ACA GG	Sequenzen aus dem 3. Intron			
ORF_R_In3a	CAG GGG GTT CTG ACA CAG				

ORF_R_In6a	CTT AAG CAC TCA AGC TCC C			
ORF_R_In6b	CAC ATC CTG TAG ACA GCC A		Sequenzen aus dem 6. Introns	
ORF_R_In6c	ATC CTC CAG TCC AGC CCA			
ORF_R_In6d	CTC GCA GGC TCC CAC TAT			

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2001 bis September 2004 auf Anregung von Herrn Prof. Tosso Leeb am Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Walter Müller. Seine unerschöpfliche Geduld, die unzähligen aufmunternden Worte, die Hilfe und Unterstützung in schwierigen Phasen meiner Doktorarbeit und die unbeschreibbare Betreuung während meiner gesamten Studienzeit haben ihn zu einen der wichtigsten Personen dieser Arbeit werden lassen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Otto für die Übernahme des Korreferates und für das angenehme Klima während der Prüfung bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Naim. Er hat mir in seinem Labor „Asyl“ gewährt und mir dort einen Arbeitsplatz mit hervorragenden Bedingungen zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus hatte er immer ein offenes Ohr für die Vor- und Rückschritte meiner Doktorarbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Ralf Jakob bedanken. Ich habe ihn als stets interessierten Zuhörer und wertvollen Kommentator diverser Probleme aber auch mancher Durchbrüche schätzen gelernt.

Herrn Prof. Mathias Müller vom Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien danke ich ebenfalls für die herzliche Aufnahme in seinem Labor, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die Möglichkeit, in die Welt der Knockout-Mäuse hineinzuschnuppern.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich auch bei ...

... Spötti. Unsere zahlreichen Gespräche über die vielen komplizierten Dinge dieser Welt haben den Laboralltag immer wieder abwechslungsreicher gemacht. Es war gut zu wissen, dass du da warst.

... Cord. Es gibt nur wenige Menschen, mit denen ich mich auch ohne viele Worte verstehe und bei denen ich das Gefühl habe, auf derselben Welle zu liegen. Du gehörst dazu, vielleicht liegt es daran, dass wir beide „Kinder vom Lande“ sind.

... Heike. Die netten Gespräche, das gemeinsame Mittagessen und deine unermüdliche Unterstützung haben mir aus so manchen „Löchern“ herausgeholfen.

... Herrn Neander. Ich habe sie immer bewundert, wie sie mit uns „Hühnern“ ausgekommen sind. Aber was ein richtiger Segler ist, der überlebt auch solche Stürme. Danke für die Kaffeepflanze und das „Seemannsgarn“.

... Bernd für die unermüdliche Durchsicht dieser Arbeit, die konstruktive Kritik und die Freundschaft.

... Catherine. Danke für deine Freundschaft. Sie wirft ein Lächeln auf jeden Tag.

... Kirsten. Fische machen –nicht nur manchmal- den Eindruck, als seien sie nicht ganz von dieser Welt.

- ... Steffi für die Durchsicht dieser Arbeit und für die vielen gemeinsamen Sneaks.
- ... Jaci. Mit deiner Anwesenheit machst du alles ein wenig australischer.
- ... Petra. Es gibt ein Leben nach der Zell-Kultur...
- ... Anne. Super Party und Danke für die Hilfe beim Sockenstricken!
- ... Bianca. Schön zu wissen, dass unsere Gemeinsamkeiten sich nicht nur auf den Namen beschränken.
- ... Claudia, Katharina, Heidi und alle diejenigen, die ich bis jetzt nicht namentlich aufgezählt habe. Ihr seid mir während der gesamten Zeit im Institut zu guten Freunden geworden, die immer ein offenes Ohr für mich haben.
- ... Jürgen. Ohne dich wäre die Proteinchemie nur halb so schön gewesen.
- ... Diane. Die Baronin dankt dir für diese besondere und wichtige Freundschaft und die wertvollen Gespräche, bei denen ich vieles gelernt habe.
- ... Marina, Marion, Birgit, Niki, Christian und Robert, die meinem Aufenthalt in Wien zu einem der aufregendsten Abschnitte dieser Doktorarbeit gemacht haben.
- ... Sven, der während der gesamten Zeit einfach „nur“ Sven war!
- ... meiner Familie: Ihr habt mit mir zusammen die Höhen und Tiefen des gesamten Studiums und der Doktorarbeit durchlebt, mir Mut gemacht und mich immer unterstützt. Dennis danke ich besonders auch für die Durchsicht dieser Arbeit, der konstruktiven Kritik und die manchmal notwendige Diskussionsbereitschaft.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Bianca Backofen
Geburtsdatum	26. Februar 1977
Geburtsort	Auteal
Familienstand	ledig

SCHULAU SBILDUNG

1983-1987	Grundschule Bakede
1987-1989	Orientierungsstufe Bad Münder
1989-1996	Viktoria-Luise-Gymnasium
22.05.1996	Abitur

HOCHSCHULSTUDIUM

Oktober 1996-April 2001	Biochemiestudium an der Universität Hannover
06.04.2001	Diplomprüfung
April 2001-Dezember 2001	Diplomarbeit am Institut für Tierzucht und Vererbungs-forschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter Anleitung von Prof. Tosso Leeb „Erstellung eines Knockout-Konstruktes zur funktionellen Charakterisierung eines bislang unbekanntem Gens“

TÄTIGKEITEN

Dezember 2001-z.Z.	Doktorandin am Institut für Tierzucht und Vererbungs-forschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover
August 2002-Oktober 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierzucht und Genetik an der Universität Sydney, Australien

Veröffentlichungen

Middleton R, Aldenhoven J, Chen Y, Backofen B, Moran C. (2003)

Improving the comparative map of porcine chromosome 9 with respect to human chromosomes 1, 7 and 11, Cytogenet Genome Res.;102(1-4):128-32

Aldenhoven J, Chen Y, Backofen B, Moran C. (2003)

Improving the comparative map of porcine chromosome 10 with respect to human chromosomes 1, 9 and 10. Cytogenet Genome Res.;102(1-4):121-7.

Backofen B, Leeb T. (2002)

Genomic organization of the murine aminomethyltransferase gene (Amt) DNA Seq.;13(4):179-83.

Backofen B, Jacob R, Serth K, Gossler A, Naim HY, Leeb T. (2002)

Cloning and characterization of the mammalian-specific nicolin 1 gene (NICN1) encoding a nuclear 24 kDa protein. Eur J Biochem.;269(21):5240-5.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung des humanen und des murinen Nicotin1-Proteins“ am Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Tierärztlichen Hochschule unter der Leitung von Prof. Tosso Leeb ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bislang an keinem anderen in- oder ausländischen Chemischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation eingereicht.

Lauenau, den 27.10.2004