

Physiologische Bedeutung der α -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Evanthia Mergia
aus Lamia/Griechenland

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 23.5.2003 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Susanne Klumpp

Zweitgutachter: Prof. Dr. Josef Krieglstein

Tag der mündlichen Prüfung: 23.5.2003

Inhaltsverzeichnis

	ABKÜRZUNGEN	8
1	EINLEITUNG	9
1.1	Guanylyl-Cyclasen	9
1.1.1	Cytosolische Guanylyl-Cyclasen	10
1.1.1.1	Untereinheiten der Guanylyl-Cyclasen	10
1.1.1.2	Vergleich der Primärstruktur	11
1.1.1.3	Isoformen und Gewebeverteilung	12
1.1.2	Die Biosynthese von NO, NO-Synthasen	13
1.1.3	Physiologische Effekte von NO als Signalmolekül	14
1.1.4	Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen	16
1.1.4.1	Aktivatoren der membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen	18
1.2	cGMP-Effektormoleküle	19
1.2.1	cGMP-abhängige Proteinkinasen	20
1.3	Transgene Mausmodelle	21
1.3.1	'Knock-out' Mausmodelle von NO-Synthasen	21
1.3.2	Transgene Tiemodelle für die membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen und die natriuretischen Peptide	22
1.3.3	'Knock-out' Mausmodelle für die cGMP-abhängigen Proteinkinasen	23
1.3.4	Übersicht der transgenen Mausmodelle	24
2	ZIELSETZUNG	25
3	MATERIALIEN	26
3.1	Chemikalien	26
3.2	Enzyme	26
3.3	Verwendete Oligonukleotide (Primer)	26
3.3.1	Oligonukleotide zum Nachweis der homologen Rekombination	26
3.3.2	Oligonukleotide zum Nachweis der ersten loxP-Sequenz	27
3.3.3	Oligonukleotide zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination	27

3.3.4	Oligonukleotide für die Amplifizierung genomischer DNA-Fragmente zur Herstellung von Sonden	27
3.3.5	Oligonukleotide zur Herstellung von Adaptoren	28
3.3.6	Sequenzier-Primer	29
3.4	Bakterienstämme	29
3.5	Klonierungsvektoren	29
3.6	Radioaktives Nukleotid	30
3.7	Puffer und Stammlösungen	30
3.8	Medien für die Bakterienkultur	30
3.9	Antibiotika	30
3.10	Filter und Membranen	30
4	METHODEN	31
4.1	Isolierung von Nukleinsäuren	31
4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	31
4.1.1.1	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparationen)	31
4.1.1.2	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparationen)	31
4.1.2	Isolierung von genomischer DNA	32
4.1.2.1	Isolierung aus kultivierten Zellen	32
4.1.2.2	Isolierung aus tierischen Geweben	32
4.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA	33
4.2	Organentnahme aus Mäusen	33
4.3	ES-Zellen und Generierung von chimären Mäusen	34
4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	34
4.4.1	Photometrische Bestimmung mittels Absorptionsspektrometrie	34
4.4.2.	Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel-Elektrophorese	34
4.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	34
4.5.1	Enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
4.5.2	Agarosegel-Elektrophorese	35

4.5.2.1	Auftrennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten	35
4.5.2.2	Gelelektrophorese von RNA	36
4.5.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und DNA-Lösungen	36
4.5.4	Ligation	37
4.5.5	Ligation von PCR-Produkten	37
4.5.6	Einführung neuer Schnittstellen in Klonierungsvektoren	37
4.5.7	Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA	38
4.5.8	Auffüllen von 5'-überhängenden Enden zu glatten Enden	38
4.5.9	Herstellung kompetenter Zellen	39
4.5.10	Transformation von E. coli-Zellen	39
4.6	Southern-Blot	40
4.6.1	Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen	40
4.6.2	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	41
4.6.3	Überprüfung der radioaktiven Markierung	42
4.6.4	Hybridisierung	42
4.6.5	Hybridisierung von Bakterienkolonien	42
4.6.6	Nachweis der markierten DNA	43
4.7	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
4.7.1	„Verschachtelte“ (nested) PCR	43
4.7.2	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	44
4.7.3	Reverse Transkription (RT-PCR)	45
4.7.4	Real-time quantitative PCR	46
4.7.4.1	Primer zur Durchführung der real-time quantitativen PCR	48
4.7.4.2	Gesamt-cDNA als Template in der real-time quantitativen PCR	50
4.7.4.3	Durchführung der real-time quantitativen PCR	50
4.7.4.4.	Auswertung der real-time quantitativen PCR	52

5	ERGEBNISSE	54
5.1	Generierung von ES-Zelllinien, in denen die Gene für die α_1- bzw. α_2-Untereinheit der Guanylyl-Cyclase modifiziert sind	54
5.1.1	Vorbemerkungen	54
5.1.2	Klonierung und Charakterisierung genomischer Sequenzabschnitte der α -Untereinheiten	56
5.1.2.1	Herstellung genspezifischer Nukleinsäuresonden für die Isolierung genomischer Klone	56
5.1.2.2	Isolierung von BAC-Klonen, die die genomischen Sequenzen der α_1 - und α_2 -Untereinheit enthalten	57
5.1.2.3	Identifizierung erster genspezifischer Abschnitte der BAC-Klone	58
5.1.2.4	Subklonierung und Restriktionskartierung der ersten ausgewählten genspezifischen Fragmente	61
5.1.2.5	Subklonierung und Restriktionskartierung weiterer genspezifischer Fragmente	63
5.1.3	Konstruktion der targeting-Vektoren	65
5.1.3.1	Allgemeine Anforderungen	65
5.1.4	targeting-Vektoren	66
5.1.4.1	Klonierung des α_1 -targeting-Vektors	70
5.1.4.2	Klonierung des α_2 -targeting-Vektors	73
5.1.5	Transfektion der targeting-Vektoren in die ES-Zellen	75
5.1.5.1	Nachweis homolog rekombinierter ES-Zellen für das α_1 -Gen	76
5.1.5.2	Nachweis homolog rekombinierter ES-Zellen für das α_2 -Gen	78
5.1.6	Transfektion der Cre-Rekombinase in die homolog rekombinierten ES-Zellen	81
5.1.6.1	Nachweis von ES-Zellen mit einem geflochtenen Allel für das α_1 -Gen	84
5.1.6.2	Nachweis von ES-Zellen mit einem geflochtenen Allel für das α_2 -Gen	87
5.2	Untersuchung der Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten in verschiedenen Geweben der Maus	89

6	DISKUSSION	95
6.1	Konditionelle Knock-out-Mäuse	95
6.1.1	Auswahl der zu deletierenden Exons	96
6.1.2	Homologe Rekombination	96
6.1.3	Cre-vermittelte Rekombination in ES-Zellen	97
6.1.4	Chimäre Mäuse und Keimbahntransmission des α_1 - bzw. α_2 -geflochten Allels	98
6.2	Gewebeverteilung und Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase	100
6.2.1	Bestimmung des relativen Vorkommens für die α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit in verschiedenen Geweben der Maus	101
6.2.2	Untersuchung zum Vorkommen der β_2 -Untereinheit	103
7	ZUSAMMENFASSUNG	104
8	LITERATUR	106
9	EIGENE PUBLIKATIONEN	119
10	DANKSAGUNG	120
11	LEBENS LAUF	121

Abkürzungen

BAC	künstliches Bakterienchromosom
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bp	Basenpaare
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DT	Diphtherietoxin
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Kb	Kilobase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NEO	Neomycinphosphotransferase
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion mit Reverser Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TK	Thymidinkinase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

1 Einleitung

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase ist das am besten charakterisierte Effektormolekül, das die Wirkungen des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt. Nach Bindung von NO an die prosthetische Häm-Gruppe der Guanylyl-Cyclase wird das Enzym aktiviert und es kommt zur vermehrten Bildung des Signalmoleküls cGMP. Somit besitzt die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase eine Schlüsselposition innerhalb der NO/cGMP-Signaltransduktionskaskade. Daneben wird die intrazelluläre Synthese von cGMP durch eine zweite Gruppe von Guanylyl-Cyclasen katalysiert. Hierbei handelt es sich um Zelloberflächen-Rezeptoren, die durch verschiedene Peptidhormone aktiviert werden. Unabhängig davon, ob die cGMP-Synthese auf dem NO-Signalweg oder durch Peptidhormone initiiert wurde, stehen dem synthetisierten cGMP die gleichen Effektorsysteme zur Verfügung, um zelluläre Funktionen zu beeinflussen. In vielen Geweben wurden beide cGMP-bildende Systeme nachgewiesen.

Mit der Entwicklung der Transgen-Technologie wurde es möglich, Mausmodelle zu generieren, in denen eine gezielte Inaktivierung von Genen im Gesamtorganismus erfolgen kann. Der veränderte Phänotyp dieser als 'knock-out' bezeichneten Mäuse lässt Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des fehlenden Proteins zu. Neuentwicklungen der Knock-out-Technologie, die sich spezifische Rekombinationssysteme zunutze gemacht haben, erlauben sogar eine zeitliche bzw. gewebspezifische Inaktivierung von ausgewählten Genen. Auf diese Weise kann gezielt die Beteiligung regulatorischer Proteine an zellulären Prozessen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Einleitung sollen beide cGMP-vermittelte Signaltransduktionswege vorgestellt werden und im Anschluss daran soll auf die Befunde transgener Mausmodelle zur Untersuchung dieser Signalwege eingegangen werden.

1.1 Guanylyl-Cyclasen

Der Nachweis enzymatischer cGMP-Bildung gelang erstmals 1969 (Hardman und Sutherland, 1969; Ishikawa et al., 1969; Schultz et al., 1969; White und Aurbach, 1969). Seitdem konnte Guanylyl-Cyclase-Aktivität in den verschiedensten Zelltypen und Geweben fast aller bisher untersuchter Organismen nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe Waldman und Murad, 1987). So wurde unter anderem in *Escherichia coli* (Macchia et al., 1975), den eukaryotischen Protozoen *Paramecium* (Schultz und Klumpp, 1980; Schultz und Klumpp, 1984; Schultz und Klumpp, 1991) und *Tetrahymena* (Kakiuchi et al., 1981), dem Schleimpilz *Dictyostelium* (Janssens et al., 1989) sowie dem zu den Invertebraten gehörenden Seeigel (Radany et al., 1983) cGMP-bildende Aktivität beschrieben. Da die Bildung von cGMP sowohl in membranfreien Überständen als auch an Membranen nachgewiesen werden konnte, wurde das Vorkommen verschiedener Enzymformen angenommen, und in der Tat gelang die Isolierung und Charakterisierung von Plasma-

membran-gebundenen und cytosolischen Guanylyl-Cyclasen. Entscheidend zur Untersuchung ihrer funktionellen Eigenschaften war die Identifizierung von NO und NO-freisetzenden Substanzen als Aktivatoren der cytosolischen Enzymform (Schultz et al., 1977; Murad et al., 1978; Böhme et al., 1978) sowie des atrialen natriuretischen Peptides ANP als Stimulator der membrangebundenen Enzymform (Flynn et al., 1983; Hamet et al., 1984; Waldman et al., 1984; Winqvist et al., 1984).

1.1.1 Cytosolische Guanylyl-Cyclasen

Ende der siebziger Jahre wurden mit NO-freisetzenden Substanzen erstmals wirksame Stimulatoren der cytosolischen cGMP-bildenden Aktivität beschrieben (Kimura et al., 1975; Arnold et al., 1977; Böhme et al., 1978). Als dann das cytosolische Enzym als Hämhaltiges Protein isoliert werden konnte, wurde die Interaktion von NO mit der prosthetischen Häm-Gruppe als Aktivierungsmechanismus postuliert (Gerzer et al., 1981). Die physiologische Bedeutung der NO-Stimulation wurde allerdings erst später, nach der Identifizierung von EDRF (endothelium-derived relaxing factor) als NO klar.

1.1.1.1 Untereinheiten der Guanylyl-Cyclasen

Die zuerst aus Rinderlunge gereinigte cytosolische Guanylyl-Cyclase konnte bis zu 200fach durch NO stimuliert werden und war aus zwei Untereinheiten mit Molekularmassen von ca. 70 kDa zusammengesetzt. Über längere Zeit war unklar, ob es sich dabei um identische oder unterschiedliche Polypeptidketten handelte. Erst 1986 konnte durch den Einsatz verschiedener Antikörper gezeigt werden, dass die cytosolische Guanylyl-Cyclase, im Unterschied zu den membrangebundenen Isoenzymen, als Heterodimer vorliegt (Kamisaki et al., 1986). Die ca. 82 kDa Untereinheit wurde als α_1 und die ca. 70 kDa Untereinheit als β_1 bezeichnet. Nach Proteinsequenzierung von Spaltprodukten des aus Rinder- bzw. Rattenlunge gereinigten Enzyms konnte 1988 zuerst die β_1 -Untereinheit und anschließend die α_1 -Untereinheit kloniert und sequenziert werden (Koesling et al., 1988; Nakane et al., 1988; Koesling et al., 1990; Nakane et al., 1990). Durch Homologiescreening wurden die cDNA-Sequenzen von zwei weiteren Untereinheiten, bezeichnet als α_2 und β_2 , identifiziert und kloniert. Die für die α_2 -Untereinheit kodierende cDNA wurde aus menschlichem Gehirn kloniert (Harteneck et al., 1991), die für die β_2 -Untereinheit aus der Niere von Ratten (Yuen et al., 1990). Die initial als α_3 und β_3 bezeichneten Untereinheiten (Giuli et al., 1992) wurden inzwischen als die humanen Varianten der α_1 - und β_1 -Untereinheiten identifiziert; die postulierten starken Abweichungen zu den bisher identifizierten α_1 - und β_1 -Untereinheiten aus anderen Spezies wurden durch Korrektur des Leserahmens aufgehoben (Zabel et al., 1998). Weitere Versuche, mit degenerierten PCR-Primern aus den konservierten Bereichen der Untereinheiten neue Mitglieder der cytosolischen Guanylyl-Cyclase aus humanen Geweben zu isolieren, blieben erfolglos (Budworth et al., 1999).

Mit Expressionsexperimenten in COS- und Sf9-Zellen konnte gezeigt werden, dass nur die Kombination einer α - mit der β_1 -Untereinheit zur Bildung katalytisch aktiver Enzyme führte. Es konnten sowohl $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimere (Harteneck et al., 1990; Buechler et al., 1991) wie auch $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere (Harteneck et al., 1991) als katalytisch aktive, NO-stimulierbare Guanylyl-Cyclasen exprimiert werden. In diesen Experimenten konnte die β_2 -Untereinheit mit keiner der anderen Untereinheiten ein katalytisch aktives Enzym formen. Bisher gibt es nur einen Bericht über die Expression eines katalytisch aktiven $\alpha_1\beta_2$ -Heterodimers (Gupta et al., 1997).

1.1.1.2 Vergleich der Primärstruktur

Ein Vergleich der Primärstruktur aller bekannten Untereinheiten erlaubt eine Unterteilung in drei Bereiche, nämlich in eine C-terminale katalytische Region, in eine zentrale und eine N-terminale Region. Die C-terminale Region weist die ausgeprägtesten Homologien unter den Untereinheiten auf und ist auch in den membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen und den Adenylyl-Cyclasen konserviert. Die Analyse von Deletionsmutanten zeigte, dass diese Bereiche für die cGMP-bildende Aktivität ausreichend sind (Wedel et al., 1995). Basierend auf der Strukturanalyse eines Adenylyl-Cyclase-Fragmentes (Zhang et al., 1997; Tesmer et al., 1997) konnten die für die Substratspezifität verantwortlichen Aminosäuren identifiziert werden. Der Austausch der Aminosäuren Glutamat-473 (E) und Cystein-541 (C) der β_1 -Untereinheit sowie Arginin-592 (R) der α_1 -Untereinheit durch die Aminosäuren, Lysin, Aspartat und Glutamin, die in der Adenylyl-Cyclase die Spezifität für ATP gewährleisten, bewirkte die Umwandlung einer NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in eine NO-sensitive Adenylyl-Cyclase (Sunahara et al., 1998).

An die katalytischen Regionen schließen sich direkt die ebenfalls sehr stark konservierten zentralen Abschnitte der Untereinheiten an. Höchstwahrscheinlich sind diese zentralen Abschnitte für die Dimerisierung der Untereinheiten verantwortlich, wie aus Studien mit den entsprechenden Abschnitten der membrangebundenen Guanylyl-Cyclase-A angenommen werden kann (Wilson und Chinkers, 1995). Jedoch fehlt ein direkter Beweis aus Experimenten mit den cytosolischen Guanylyl-Cyclasen immer noch. Lediglich ein Nachweis existiert, aus dem hervorgeht, dass auch gleiche Untereinheiten zur Dimerisierung fähig sind, die dann katalytisch inaktive Homodimere ($\alpha_1\alpha_1$ oder $\beta_1\beta_1$) bilden (Zabel et al., 1999).

Die N-terminalen Regionen der Untereinheiten besitzen den vergleichsweise geringsten Ähnlichkeitsgrad. Auffällig ist jedoch in diesen N-terminalen Bereichen ein Abschnitt von ca. 100 Aminosäuren, in dem mehr Aminosäuren zwischen den α_1 - und α_2 -Untereinheiten identisch sind als zwischen den α - und β -Untereinheiten. Möglicherweise ist dieser Bereich für die besonderen Eigenschaften einer α - bzw. β -Untereinheit verantwortlich. Übereinstimmend mit dieser Annahme wurde das Histidin-105 auf der β_1 -Untereinheit als der proximale Ligand der prosthetischen Häm-Gruppe identifiziert. Mit einer Mutante, in

der das Histidin-105 durch Phenylalanin ersetzt wurde, war eine Aktivierung des Enzyms durch NO, trotz erhaltener Basalaktivität, nicht mehr möglich (Wedel et al., 1994). Die als Häm-defizient gereinigte Mutante war jedoch in der Lage Häm zu binden, konnte aber trotz der Häm-Rekonstitution nicht durch NO stimuliert werden (Foerster et al., 1996). Entsprechend ließ sich folgern, dass das Histidin-105 für die Vermittlung der NO-induzierten Stimulation des Enzyms erforderlich ist. Es ist allerdings nicht an der katalytischen Reaktion beteiligt, da die Histidin-105-Mutante noch basale Enzymaktivität aufwies. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse mittels anderer experimenteller Methoden erfolgte durch Zhao et al. (1998). Den N-terminalen Regionen können also regulatorische Eigenschaften zugewiesen werden.

1.1.1.3 Isoformen und Gewebeverteilung

Aus den vier bisher klonierten Untereinheiten der cytosolischen Guanylyl-Cyclase (α_1 , α_2 , β_1 und β_2) wurden in Koexpressionsexperimenten nur zwei durch NO-stimulierbare, katalytisch aktive Isoformen ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) gebildet. Während die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform als das aus der Lunge gereinigte Protein schon lange bekannt war, blieb die physiologische Existenz der $\alpha_2\beta_1$ -Isoform vorerst unklar. Erst 1998, sieben Jahre nach der Klonierung der cDNA für die α_2 -Untereinheit (Harteneck et al., 1991) konnte ihr Vorkommen als Protein in humaner Plazenta nachgewiesen und gleichzeitig die β_1 -Untereinheit als in vivo-Dimerisierungspartner identifiziert werden (Russwurm et al., 1998). Weitere Untersuchungen galten den enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften der beiden Isoformen ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$). Da jedoch beide Isoformen nicht selektiv aus nativen Geweben isoliert werden konnten, wurden diese Untersuchungen mit in Sf9-Zellen exprimierten, gereinigten Proteinen durchgeführt. Hinsichtlich der katalytischen Aktivität, der Stimulierbarkeit durch NO und der Substrataffinität zeigte die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform keine Unterschiede im Vergleich zu der $\alpha_1\beta_1$ -Isoform. Trotz ausgeprägter Sequenzunterschiede in den N-terminalen putativ regulatorischen Bereichen der α -Untereinheiten, die auf die Möglichkeit einer unterschiedlichen Regulation hindeuten, waren sowohl die Koordination der Häm-Gruppe als auch der Häm-Gehalt vergleichbar (Russwurm et al., 1998).

Ein erster funktionell relevanter Unterschied dieser ansonsten sehr ähnlichen Isoformen ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) stellte sich heraus mit dem Befund, dass die C-terminale Sequenz (-R-E-T-S-L) der α_2 -Untereinheit in der Lage war, eine direkte Interaktion mit PDZ-Domänen der PSD-95-Familie zu vermitteln. Dementsprechend konnte eine besondere subzelluläre Lokalisation der $\alpha_2\beta_1$ -Isoform im Gehirn nachgewiesen werden (Russwurm et al., 2001).

Bei den PDZ-Domänen handelt es sich um Protein-Sequenzmotive, die aus etwa 100 Aminosäuren bestehen und Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln. Proteine, wie PSD-95 (postsynaptic density-95), die über PDZ-Domänen verfügen, fungieren dadurch als Adapterproteine und ermöglichen die räumliche Organisation verschiedener

Signaltransduktionskaskaden. Für den NO/cGMP-Signalweg war neben der Interaktion von PSD-95 mit der $\alpha_2\beta_1$ -Guanylyl-Cyclase auch noch die Interaktion zwischen PSD-95 und neuronaler NO-Synthase (Brenman et al., 1996) nachgewiesen worden. Darüber hinaus ist eine entsprechende Interaktion von PSD-95 mit dem NMDA-Rezeptor (Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996), dessen Aktivierung zu Ca^{2+} -Einstrom und nachfolgender Stimulation der Ca^{2+} -abhängigen, neuronalen NO-Synthase führt, von Bedeutung.

Hinweise zur Gewebeverteilung, die Aufschluss über die physiologische Relevanz der $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Isoformen geben konnten, fehlen bisher. In den meisten Studien zum Vorkommen der Guanylyl-Cyclase wurde nur die Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheit untersucht, während die der α_2 -Untereinheit lange unbeachtet blieb. Beispielsweise fand Furuyama et al. (1993) in 'in situ'-Hybridisierungsexperimenten im Gehirn der Ratte eine ubiquitäre Expression für die β_1 -Untereinheit, während die Expression der α_1 -Untereinheit in bestimmten Hirnregionen nur gering oder gar nicht nachweisbar war. Diese Differenzen in der Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheiten konnten später durch den Nachweis der Expression der α_2 -Untereinheit in diesen Regionen erklärt werden (Gibb und Garthwaite, 2001). In dieser Studie konnte eine nahezu ubiquitäre Expression der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheiten im Gehirn der Ratte gezeigt werden; die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform war hauptsächlich in Nucleus caudatus und Putamen nachweisbar, die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform vornehmlich in Hippokampus und Cerebellum.

1.1.2 Die Biosynthese von NO, NO-Synthasen

Stickstoffmonoxid (NO) wird in verschiedenen Zellen als Antwort auf eine Vielzahl physiologischer Signale synthetisiert. Die Umsetzung von L-Arginin zu Citrullin und NO wird durch eine Familie von Enzymen katalysiert, die als NO-Synthasen (NOS) bezeichnet werden. Bisher wurden drei Isoformen dieser Enzyme charakterisiert: die Ca^{2+} /Calmodulin-regulierten neuronalen und endothelialen Isoformen (nNOS und eNOS) und die Ca^{2+} -unabhängige, induzierbare NO-Synthase (iNOS). Alle drei NO-Synthasen existieren als Homodimere. Zwischen ihnen besteht eine hohe Sequenz-Homologie, sie besitzen nahezu identische katalytische Eigenschaften und einen gleichartigen Zweidomänen Aufbau (Marletta, 1993). Die N-terminale Domäne mit der Eigenschaft einer Oxygenase ist über eine Calmodulin-Bindungsstelle mit der C-terminalen Domäne verbunden, die in ihrer Aktivität einer Reduktase entspricht. Für ihre enzymatische Aktivität benötigen die NO-Synthasen als Substrate L-Arginin, O_2 , und NADPH und als Cofaktoren FAD, FMN, Calmodulin, Tetrahydrobiopterin (BH_4) und eine prosthetische Häm-Gruppe.

Hinsichtlich ihrer Expression liegen die beiden Ca^{2+} -abhängigen Isoformen (nNOS und eNOS) konstitutiv vor; sie sind aber in den ruhenden Zellen mit niedriger intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen inaktiv und weisen eine geringe Affinität für Calmodulin auf. Erst nach Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration binden sie den Ca^{2+} /Calmodulin-

Komplex mit höherer Affinität und werden katalytisch aktiv. Das von beiden Isoformen synthetisierte NO entfaltet seine Wirkung als Signalmolekül durch die Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (Abb. 1).

Für die konstitutiven NO-Synthasen sind neben ihrer Interaktion mit Calmodulin weitere Protein-Protein Interaktionen beschrieben worden, die in erster Linie ihre subzelluläre Lokalisation bestimmen und möglicherweise auch ihre Aktivität beeinflussen.

Im Gegensatz zu den konstitutiven Isoformen besitzt die Ca^{2+} -unabhängige, induzierbare Isoform (iNOS), eine hohe Bindungsaffinität für Calmodulin und ist somit daueraktiv. Insofern stellt bei ihr die Regulation der Expression den Aktivierungsmechanismus dar. Die induzierbare NO-Synthase wird hauptsächlich in Makrophagen exprimiert und produziert wesentlich höhere NO-Konzentrationen als die konstitutiven NO-Synthasen, die direkt toxisch wirken. So wird im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr aber auch bei einer Entzündungsreaktion die Transkription und nachfolgende Expression der iNOS durch bestimmte Faktoren induziert. Zu diesen Faktoren gehören bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxine) und Zytokine wie Interleukin-1(IL-1), $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ (Nathan und Xie, 1994). Andere Faktoren wie Glucocorticoide (Radomski et al., 1990; Di Rosa et al., 1990) und das ANP (Kierner und Vollmar, 1998) greifen hemmend in die Regulation der iNOS-Expression ein.

1.1.3 Physiologische Effekte von NO als Signalmolekül

Stickstoffmonoxid (NO) stellt ein außergewöhnliches Signalmolekül dar. Aufgrund seiner geringen Molekülgröße und seines lipophilen Charakters kann NO ungehindert durch die Zellmembranen diffundieren und damit sowohl als intra- wie auch als interzelluläres Signalmolekül fungieren. NO besitzt eine elektrisch neutrale Natur und ist zugleich ein hoch reaktives freies Radikal, das seine Wirkungen über die Reaktion mit verschiedenen Molekülen vermittelt. Als Reaktionspartner von NO können hämhaltige Proteine wie die cytosolische Guanylyl-Cyclase und das Hämoglobin, andere metallhaltige Proteine sowie Sauerstoff, Superoxidanionen und Thiolgruppen dienen. Von diesen ist bisher nur die cytosolische Guanylyl-Cyclase als Effektormolekül zur Vermittlung der physiologischen NO-Wirkungen eindeutig charakterisiert.

Die physiologische Relevanz von NO wurde erst mit der Identifizierung des sogenannten endothelium-derived relaxing factor (EDRF) als NO erkannt (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987).

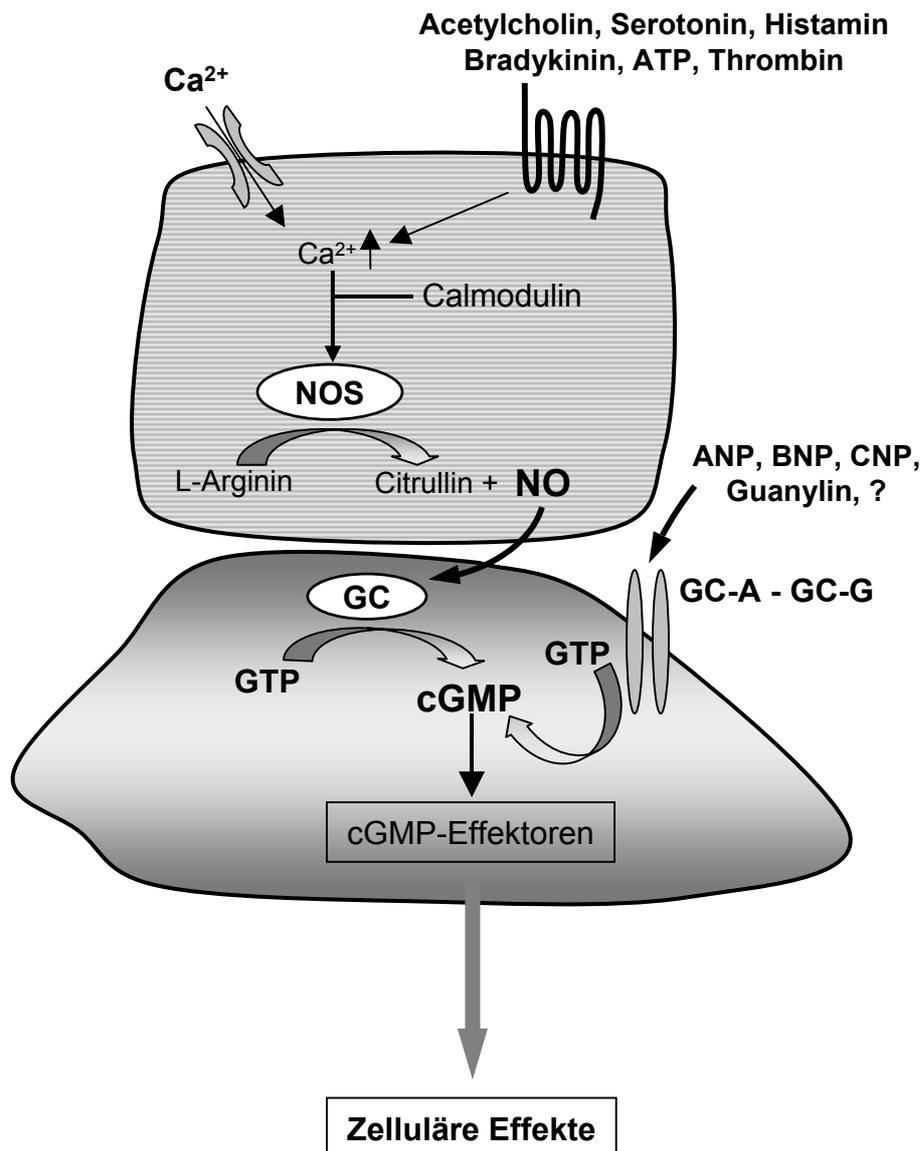


Abb. 1: cGMP-vermittelte Signaltransduktion

Die Bildung des intrazellulären Signalmoleküls cGMP wird sowohl durch die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase als auch durch membrangebundene Guanylyl-Cyclasen katalysiert. Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase wird durch NO stimuliert, das in angrenzenden oder in denselben (nicht abgebildet) Zellen aus Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen NO-Synthasen-Isoformen (NOS) produziert wird. Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen werden durch Peptidhormone zur Bildung von cGMP aktiviert. Die Weiterleitung der erwähnten Signalkaskaden erfolgt durch die Bindung von cGMP an verschiedene Effektormoleküle zu denen Proteinkinasen, Ionenkanäle und Phosphodiesterasen gehören.

Aus früheren Experimenten war klar, dass EDRF (Furchgott und Zawadski, 1980), welches nach Einwirkung von Acetylcholin, Histamin, oder Bradykinin im Gefäßendothel synthetisiert wird, die cytosolische Guanylyl-Cyclase in glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert und über einen Anstieg der cGMP-Konzentration zur Vasorelaxation führt (Förstermann et al., 1986; Ignarro et al., 1986). Mit der Gleichsetzung des EDRFs als NO wurde die Stellung von NO als Signalmolekül in der Vasorelaxation und die damit einhergehende Blutdruckregulation etabliert. In den Endothelzellen gebildetes NO diffundiert nicht nur in die Muskelzellen, sondern auch in das Gefäßlumen und wirkt in den Thrombozyten auch über die Stimulation der Guanylyl-Cyclase hemmend auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation.

Weiter wirkt NO als synaptischer Überträgerstoff im zentralen und peripheren Nervensystem. So wurde die Teilnahme von NO als retrograder Transmitter bei manchen Formen der Verstärkung der synaptischen Signalübertragung im Hippokampus (Bohme et al., 1991; O' Dell et al., 1991; Schuman und Madison, 1991) und als orthograde und/oder retrograder Neurotransmitter bei der Abschwächung der Signalübertragung (long-term Depression) im Cerebellum (Shibuki und Okada, 1991; Lev-Ram et al., 1997) postuliert.

Im peripheren Nervensystem wird NO als einer der Neurotransmitter sogenannter nicht-adrenerger nicht-cholinerger (NANC)-Neurone diskutiert. NANC-Neurone kommen verbreitet vor und innervieren die glatte Muskulatur des Gastrointestinal-, Respirations-, und Urogenitaltrakts sowie die bestimmter Blutgefäße. Durch die Bildung und Freisetzung von NO in den Synapsen der NANC-Neurone wird eine Relaxation der glatten Muskulatur hervorgerufen (Bult et al., 1990; Sanders und Ward, 1992). Inhibitorische NANC-Neurone des Darmnervensystems beeinflussen so über die Bildung und Freisetzung von NO den Muskeltonus des Gastrointestinaltraktes und den Rhythmus der Kontraktionen. Ebenso stellt die für die Erektion des Penis entscheidende arterioläre Dilatation am Eingang des Corpus cavernosum einen Vorgang dar, der überwiegend über NO kontrolliert wird.

1.1.4 Membrangebundene Guanylyl-Cyclasen

Die membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen gehören zur Gruppe der rezeptorgekoppelten Enzyme. Es sind Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 130 und 160 kDa (Garbers, 1992), die höchstwahrscheinlich als Homodimere vorliegen und durch Peptidhormone aktiviert werden. Strukturell handelt es sich dabei um Transmembranproteine mit einer einzigen Transmembrandomäne und einer N-terminalen, extrazellulären Domäne, die für die Bindung der Liganden verantwortlich ist. Der C-terminale, intrazelluläre Bereich lässt sich in zwei weitere charakteristische Domänen unterteilen, von denen die eine Guanylyl-Cyclase-Aktivität aufweist und die andere eine regulatorische Proteinkinase-Homologie-Region besitzt. Die katalytische Region der membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen weist Homologie zu der entsprechenden Region in den Untereinheiten der cyto-

solischen Guanylyl-Cyclasen und den G-Protein-regulierten Adenylyl-Cyclasen auf. Die regulatorische Proteinkinase-Homologie-Domäne zeigt Ähnlichkeit mit der katalytischen Region bekannter Proteinkinasen (Tyrosinkinasen), allerdings konnte bisher keine Proteinkinase-Aktivität nachgewiesen werden.

In Säugertiergeweben sind insgesamt sieben verschiedene Isoformen, bezeichnet als GC-A bis GC-G, identifiziert. Bisher konnte nur für die GC-A, GC-B und GC-C ein physiologischer Ligand identifiziert werden. Die übrigen vier Isoformen (GC-E bis GC-G) sind sogenannte Orphan-Rezeptoren (Waisen-Rezeptoren), für die bisher kein Ligand identifiziert werden konnte.

Der Vergleich der Primärstruktur zwischen den Isoformen zeigt, dass die N-terminalen, extrazellulären Domänen, die die Bindungsstelle des Liganden ausbilden, die geringsten Ähnlichkeiten aufweisen. Die GC-A und GC-B, die die größte Homologie zwischen den Liganden-bindenden Regionen aufweisen, werden beide durch natriuretische Peptide stimuliert. Die GC-A wird durch die natriuretischen Peptide von A-Typ (ANP) und B-Typ (BNP) stimuliert. Sie wird in der Niere, der glatten Gefäßmuskulatur, der Nebenniere und anderen Geweben exprimiert (Lowe et al., 1989). Die GC-B wird durch das aufgrund seiner Homologie zu ANP und BNP als CNP bezeichnete Peptid aktiviert. Die GC-B kommt in vielen Geweben vor und wird dort hauptsächlich in Fibroblasten exprimiert (Schulz et al., 1989).

Die GC-C bindet Peptidhormone der Guanylin-Familie und wurde zuerst als der Rezeptor für das hitzestabile Enterotoxin STa aus *E. coli* entdeckt (Schulz et al., 1990; de Sauvage et al., 1991). Die Säuglings- und Kleinkinddiarrhöe, die maßgeblich zu der hohen Kindersterblichkeit in Entwicklungsländern beiträgt und auch als Reisediarrhöe bei Erwachsenen bekannt ist, ist auf eine Aktivierung der GC-C zurückzuführen. Die GC-C wird hauptsächlich im Intestinaltrakt exprimiert aber auch in den Nieren, Hoden, Leber, und Plazenta.

Die nachfolgend identifizierten Isoformen, GC-D bis GC-F, sind ausschließlich in Sinneszellen lokalisiert. Die GC-D wird vorwiegend im Riechepithel exprimiert. Dort konnte sie in einer Subpopulation von Riechzellen nachgewiesen werden, von denen vermutet wird, dass sie an der Detektion von Pheromonen beteiligt sind (Fülle et al., 1995; Juilfs et al., 1997). Die GC-E wird in der Retina, in Zapfen und Stäbchen exprimiert, während eine Expression der GC-F nur in den Zapfen nachweisbar war (Yang et al., 1995). Bisher wurden keine extrazellulären Liganden für diese beiden Guanylyl-Cyclasen identifiziert. Es wird vermutet, dass ihre Regulation und Aktivierung durch intrazelluläre Proteine erfolgt, die mit der katalytischen Region oder der Proteinkinase-Homologie-Domäne interagieren.

Die als letzte klonierte Isoform, GC-G, wird in Lunge, Intestinum und Skelettmuskulatur exprimiert (Schulz et al., 1998). Über ihre Funktion oder mögliche Liganden ist zurzeit noch nichts bekannt.

1.1.4.1 Aktivatoren der membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen

Zwei unterschiedliche Gruppen endogener bioaktiver Peptide sind bisher identifiziert worden, die die Bildung von cGMP über eine Aktivierung membrangebundener Guanylyl-Cyclasen kontrollieren. Die eine Gruppe umfasst die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP, die andere die Familie der Guanylin-Peptide, der Guanylin, Uroguanylin und Lymphoguanylin angehören. Alle werden als inaktive Präprohormone gebildet und mittels geeigneter Stimuli in die Zirkulation freigesetzt, wo sie dann durch proteolytische Spaltung in die aktive Form überführt werden.

Als erster Vertreter der natriuretischen Peptide und physiologischer Aktivator der GC-A wurde das ANP (atriales natriuretisches Peptid) identifiziert. Das 28 Aminosäure lange, ringförmige Peptid wird als Vorläufermolekül (128 Aminosäuren lang) in hoher Konzentration in den Myozyten der Herzvorhöfe gebildet und auf Dehnungsreiz hin in die Zirkulation freigesetzt. Dort wird das ANP in die aktive Form überführt und verursacht eine Erweiterung der Gefäße. An der Nebenniere hemmt das Peptid die Aldosteron-Freisetzung. An der Niere vermindert es die Synthese und Sekretion von Renin und bewirkt eine Steigerung der Natriuresis und Diuresis durch Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate und Hemmung der tubulären Resorption von Natrium-Ionen. Alle diese Effekte wirken einem erhöhten Blutdruck und Blutvolumen entgegen. Vermittelt werden diese Wirkungen von ANP über die Bindung an die GC-A und die darauf folgende Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration (Garbers, 1992). Die Zielorgane (glatte Gefäßmuskulatur, Nebenniere und Niere) der bisher beobachteten ANP-Effekte, sind auch als die hauptsächlichen Gewebe identifiziert, die GC-A exprimieren.

Mit dem natriuretischen Peptid vom B-Typ (BNP) wurde ein zweites Mitglied der Gruppe der natriuretischen Peptide und ein zweiter physiologischer Aktivator der GC-A entdeckt. BNP (brain natriuretic peptide) wurde zuerst aus neuronalem Gewebe gereinigt, später aber in höherer Konzentration im Herz nachgewiesen. Strukturell weist es Ähnlichkeit zu ANP auf, und auch seine pharmakologischen Effekte scheinen sie sich nicht von denen des ANPs zu unterscheiden.

Das natriuretische Peptid vom C-Typ (CNP) wurde ebenso wie das BNP zunächst in Gehirn entdeckt (Sudoh et al., 1990). Mittlerweile wurden aber auch verschiedene andere Zelltypen nachgewiesen, in denen CNP synthetisiert wird, wie z.B. Endothelzellen (Suga et al., 1993) und Makrophagen (Vollmar und Schulz, 1995). CNP ist der spezifische Ligand des GC-B- Rezeptors (Koller et al., 1991). Neben den Guanylyl-Cyclasen A und B, die die biologischen Wirkungen der natriuretischen Peptide vermitteln, existiert ein zweiter membranständiger Rezeptor-Typ (C-Rezeptor), der natriuretische Peptide bindet (Maack et al., 1987). Der C-Rezeptor, besitzt keine Guanylyl-Cyclase-Aktivität und dient vermutlich als ein Clearance-Rezeptor, um die natriuretischen Peptide aus der Zirkulation zu entfernen.

1.2 cGMP-Effektormoleküle

Die Stimulation der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase durch NO wie auch die Aktivierung der membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen durch natriuretische Peptide oder Peptidhormone der Guanylin-Gruppe bewirken die vermehrte Bildung des intrazellulären Signalmoleküls cGMP. Die Weiterleitung der erwähnten Signalkaskaden erfolgt dann durch die Bindung von cGMP an verschiedene Effektormoleküle, zu denen Ionenkanäle, Proteinkinase und Phosphodiesterasen gehören (siehe Abb. 1). Die Effektormoleküle des cGMP-Signals weisen unterschiedliche cGMP-Bindungsstellen auf und werden strukturell in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe umfasst die cGMP-abhängigen Proteinkinase und die cGMP-gesteuerten Ionenkanäle. Beide Protein-Familien enthalten homologe regulatorische Domänen, auf denen das cNMP-Motiv als cGMP-bindendes Sequenzmotiv identifiziert und charakterisiert wurde (Weber et al., 1989; Shabb et al., 1990; Altenhofen et al., 1991). Die zweite Gruppe der cGMP-Effektoren bilden die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen. Sie weisen als cGMP-Bindungsstellen Sequenzmotive auf, die keine Sequenz-Homologie zu dem cNMP-Motiv besitzen und als GAF-Domänen bezeichnet werden (Ho et al., 2000).

Im Folgenden soll kurz auf die cGMP-gesteuerten Ionenkanäle und die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen eingegangen werden. Anschließend erfolgt eine detaillierte Beschreibung der cGMP-abhängigen Proteinkinase, die durch die Phosphorylierung einer Vielzahl unterschiedlicher Substrate die Mehrheit der bisher identifizierten NO/cGMP-Effekte vermitteln.

Mitglieder der cGMP-gesteuerten Ionenkanäle wurden zuerst in sensorischen Zellen, nämlich Photorezeptorzellen (Fesenko et al., 1985; Yaw und Nakatani, 1985) und olfaktorische Neuronen (Nakamura und Gold, 1987) nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um nicht selektive Kationenkanäle, die den Einstrom von Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen regulieren. Sie besitzen eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion des Seh- und des Riechprozesses.

Zu den cyclischen Nukleotid-abbauenden Phosphodiesterasen (PDE), deren Aktivität durch die allosterische Bindung von cGMP reguliert wird, gehören die Familien der PDE2, PDE5 und PDE6. Die Phosphodiesterasen dieser Familien weisen auf ihrer N-terminalen Region zwei GAF-Domänen auf, die in Tandem angeordnet sind und die Regulation durch cGMP vermitteln. So stellt die cGMP-Bindung an eine der zwei GAF-Domänen der PDE6-Isoformen, die beim Sehprozess beteiligt sind, einen wichtigen Zwischenschritt der Phototransduktion dar (Gillespie und Beavo, 1989). Über die Bindung von cGMP an GAF-Domänen wird auch die Aktivität der PDE5 reguliert. Die Bindung von cGMP führt zur Steigerung der katalytischen Aktivität der PDE5 (Corbin et al., 2000; Mullershausen et al., 2003) und ist erforderlich für die darauf folgende Phosphorylierung (Turko et al., 1998). Die PDE5 wurde als das Zielprotein des Arzneistoffs Sildenafil allgemein bekannt (Corbin

und Francis, 1999) und spielt außer bei der Peniserektion bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation eine entscheidende Rolle.

Die PDE6 und PDE5 werden nicht nur in ihrer Aktivität durch cGMP reguliert, sondern sie hydrolysieren auch cGMP, das als Substrat an ihre katalytische Domäne bindet. Damit greifen die cGMP-regulierten, cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen durch eine negative Rückkopplung in die sie aktivierende Signalvermittlung ein.

Im Unterschied dazu führt die Bindung von cGMP an eine der zwei GAF-Domänen der PDE2-Isoformen zu einer vermehrten Hydrolyse von cAMP (Martinez et al., 2002). Dadurch kann cGMP die Wirkdauer von cAMP-vermittelten Effekten terminieren. Am Beispiel der Produktion und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde wird die Funktion der PDE2 als Mediator bei der Steuerung von cAMP-Effekten durch den cGMP-Signalweg deutlich. So wirkt ANP über die intrazelluläre cGMP-Erhöhung und anschließende Aktivierung der PDE2 der cAMP-vermittelten Freisetzung von Aldosteron entgegen (MacFarland et al., 1991).

1.2.1 cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK) gehören zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnten zwei Gene identifiziert werden, die für die Isoenzyme cGKI und cGKII kodieren. Aus dem Gen für die cGKI entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA zwei unterschiedliche Proteinprodukte, die als cGKI α und cGKI β bezeichnet werden.

Die cGMP-Kinase I α kommt in der glatten Muskulatur, in Thrombozyten, Kleinhirn und Hippokampus vor, während Expression von cGMP-Kinase I β in den glatten Muskelgeweben des Uterus und des Gastrointestinaltrakts und nicht in den der Gefäße nachgewiesen wurde. Die cGMP-Kinase II wird dagegen in Epithelien mit sekretorischer Funktion wie dem Bürstensaumepithel des Dünndarms und dem Bronchialepithel, in den Nieren, und in den Chondrozyten exprimiert.

Bekannte physiologische Effekte, die durch die cGMP-Kinase I vermittelt werden, sind die Relaxation der glatten Muskulatur (Diamond, 1978; Axelsson et al., 1979; Schultz et al., 1979) und die Hemmung der Thrombozytenaggregation (Böhme et al., 1974; Haslam et al., 1978; Mellion et al., 1981). Weiterhin wird eine Beteiligung der cGMP-Kinase I an der Regulation der Proliferation von glatten Muskelzellen diskutiert.

Für die cGMP-Kinase I ist eine Reihe von potenziellen Substraten vorgeschlagen worden, die die cGMP-Effekte weiterleiten. Dazu zählen hauptsächlich Proteine, die primär an der Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beteiligt sind, wie der IP₃-Rezeptor (Komalavilas und Lincoln, 1996; Haug et al., 1999) und die Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanäle (Fukao et al., 1999). Für die Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-Leichtketten-Phosphatase konnte eine Phosphorylierung durch die cGMP-Kinase I α -Isoform nach-

gewiesen werden (Nakamura et al., 1999; Surks et al., 1999). VASP (Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein), ein zytoskeletales Protein, wurde als der Substrat der cGMP-Kinase I in Thrombozyten nachgewiesen (Walter et al., 1993), jedoch ist die postulierte funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von VASP bei der Hemmung der Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation noch unklar. Kürzlich wurde ein neues Substrat für die cGMP-Kinase I entdeckt, das Protein IRAG (Schlossmann et al., 2000), welches in den glatten Muskelzellen mit dem IP₃-Rezeptor assoziiert vorliegt, und spezifisch von der cGMP-Kinase I β phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von IRAG hemmt dann die IP₃-stimulierte Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Ammendola et al., 2001).

Darüber hinaus sind die genauen biologischen Mechanismen, die den cGMP-Kinase I-vermittelten Effekten zugrunde liegen, noch nicht bekannt und weitgehend Gegenstand aktueller Forschung.

Als einziges Substrat für die cGMP-Kinase II wurde bisher das CFTR-Protein (cystic fibrosis transmembrane conductor regulator) identifiziert. Das CFTR-Protein bildet an den Zellmembranen von Schleimdrüsenzellen einen Kanal durch den Chlorid-Ionen ein- und ausströmen können. Die Phosphorylierung dieses Kanals durch die cGMP-Kinase II führt zu einer verstärkten Sekretion von Chlorid-Ionen und Wasser in den Darm (Vaandrager et al., 1998).

1.3 Transgene Mausmodelle

1.3.1 'Knock-out' Mausmodelle von NO-Synthasen

Durch die gezielte Inaktivierung jeweils eines der Gene der NO-Synthasen wurden knock-out Mausmodelle generiert, aus deren Phänotypen wichtige Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung der jeweiligen Isoform gewonnen werden konnten. Die eNOS-defizienten Mäuse (eNOS^{-/-}) zeigten, wie erwartet, keine endothelabhängige Vasodilatation unter der Einwirkung von Acetylcholin und wiesen einen Bluthochdruck auf. Diese Befunde bestätigten, zum einen die Gleichsetzung von EDRF mit NO und zum anderen die Rolle der basalen eNOS-Aktivität bei der Blutdruckregulation (Huang et al., 1995). Weiter konnten Unterschiede beim Remodelling der Gefäße zwischen eNOS-defizienten und Wildtyp-Mäusen gezeigt werden, die eine antiproliferative Wirkung vom endothelialen NO auf die glatten Gefäßmuskelzellen unterstrichen (Moroi et al., 1998; Rudic et al., 1998).

Das auffälligste phänotypische Merkmal der Knock-out-Mäuse für die neuronale NOS war die Entwicklung eines stark vergrößerten Magens mit einer Hypertrophie des Pylorus-Sphinkters und der Ringmuskulatur (Huang et al., 1993). Dieser Befund bestätigte die Rolle von NO als Neurotransmitter von zumindest einem Teil der inhibitorischen NANC-Neurone, die bei der Regulation der gastrointestinalen Motilität und der Pylorusrelaxation

beteiligt sind. Durch das Fehlen der inhibitorischen Wirkung dieser NANC-Neurone wird die Magenmotilität gestört, und der Abfluss aus dem Magen wird behindert, was dann zu einer Magenvergrößerung führt.

Obwohl NO bei der Vermittlung der Peniserektion eine wichtige Rolle spielt, waren sowohl die Knock-out-Mäuse für die endotheliale NO-Synthase wie auch die für die neuronale Isoform reproduktionsfähig. Diese Befunde lieferten einen ersten Hinweis, dass mehr als einer Signalweg zur Produktion von NO für die Erektion im Penis verantwortlich ist. Nähere Untersuchungen der Erektion bei eNOS- bzw. nNOS-defizienten Mäusen zeigten, dass die Erektion durch Aktivierung der neuronalen NO-Synthase initiiert wird, während die nachfolgende Aktivierung der endothelialen NO-Synthase zu einer längerfristigen Aufrechterhaltung der Erektion beiträgt (Burnett et al., 2002; Hurt et al., 2002).

Mit Hilfe der Knock-out-Mäuse konnten auch einige scheinbar widersprüchliche Wirkungen von NO erklärt werden, wie einerseits neuroprotektive und andererseits neurotoxische Effekte. So wurde gezeigt, dass das von der endothelialen NO-Synthase produzierte NO über die Aufrechterhaltung der Gehirndurchblutung neuroprotektiv wirkt (Huang et al., 1994), während das von der neuronalen NO-Synthase produzierte NO in die Pathogenese der Gewebsschädigung involviert ist (Huang et al., 1996).

Die Beteiligung von NO bei manchen Formen der Langzeitpotenzierung (long-term potentiation) der synaptischen Signalübertragung konnte erst mit Hilfe von Knock-out-Mäusen demonstriert werden, in denen gleichzeitig die neuronale und endotheliale Isoform der NO-Synthase inaktiviert waren. Die doppel-defizienten Knock-out-Mäuse wiesen eine deutliche Reduktion der Langzeitpotenzierung im Stratum radiatum des Hippokampus auf, während weitere Formen der Langzeitpotenzierung beispielsweise im Stratum oriens von Hippokampus unbeeinflusst blieben (Son et al., 1996). Da auch die Zugabe von NO-Synthase-Inhibitoren die Langzeitpotenzierung in diesen Hirnregionen nicht beeinträchtigte, ließ sich folgern, dass bei der Verstärkung der Signalübertragung sowohl NO-abhängige wie NO-unabhängige Mechanismen beteiligt sind. Die Tatsache, dass die Knock-out-Mäuse für die endotheliale oder neuronale Isoform keine Beeinflussung der Langzeitpotenzierung zeigten, wies daraufhin, dass in den „Einzel-Knock-outs“ die erhaltene NO-Synthase-Isoform die Funktion der abwesenden Isoform kompensiert.

1.3.2 Transgene Tiemodelle für die membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen und die natriuretischen Peptide

Weitere Einblicke in die physiologische Funktion der membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen sowie der sie aktivierenden Peptidhormone wurden mit Hilfe transgener Tiemodelle, in denen das jeweilige Protein inaktiviert oder überexprimiert wurde, gewonnen. Für die Peptidhormone ANP und BNP, die beide in beträchtlichen Konzentrationen in der Zirkulation nachweisbar sind und ihre Wirkungen über die GC-A vermitteln, konnten auf diesem Weg unterschiedliche physiologische Funktionen dokumentiert werden. So be-

wirkte die Überexpression von ANP einen erniedrigten Blutdruck (Steinhilper et al., 1990) und die Deletion des ANP-Gens führte zu Salz-sensitivem Bluthochdruck (John et al., 1995); BNP-defiziente Mäuse hingegen wiesen unveränderte Blutdruckwerte auf und entwickelten eine Herzfibrose (Tamura et al., 2000). Die Deletion des GC-A-Gens führte zu Hypertonus, kardialer Hypertrophie und Herzmuskelfibrose (Lopez et al., 1995; Franco et al., 1998). Überraschenderweise waren die CNP-defizienten Mäuse kleinwüchsig und hatten als Folge des beeinträchtigten Knochenwachstums eine eingeschränkte (<3 Monate) Lebenserwartung (Chusho et al., 2001). Diese Befunde demonstrierten die funktionelle Bedeutung von CNP bei der Knochenbildung.

Die Inaktivierung des GC-C-Gens führte, wie erwartet, zu einer Resistenz gegenüber dem hitzestabilen Enterotoxin STa aus *E. coli*. Darüber hinaus konnten bei den Tieren keine zusätzlichen Veränderungen beobachtet werden (Schulz et al., 1997).

GC-E-defiziente Mäuse zeigten eine schwere Reduktion der Stäbchenfunktion zum Zeitpunkt der Geburt und einen kompletten Verlust der Stäbchenfunktion innerhalb der ersten zwei Monate (Yang et al., 1999).

1.3.3 'Knock-out' Mausmodelle für die cGMP-abhängigen Proteinkinasen

Um die physiologische Funktion der cGMP-Proteinkinasen aufzuklären, wurden Knock-out-Mäuse generiert, in denen das Gen für die cGMP-Kinase I (cGKI) bzw. cGMP-Kinase II (cGKII) ausgeschaltet wurde. Die Analyse der cGMP-Kinase-I-defizienten Mäuse zeigte pathologische Veränderungen der Tonusregulation der glatten Muskulatur. Die Mäuse litten unter einer schweren gastrointestinalen Dysmotilität und zeigten im Alter zwischen 4 und 6 Wochen erhöhten Blutdruck (Pfeifer et al., 1998). Obwohl die Blutdruckwerte sich mit zunehmender Alter normalisierten, war die Lebenserwartung der knock-out-Tiere sehr niedrig. Daneben konnte in den cGKI-defizienten Mäusen die biologische Funktion der cGMP-Kinase I bei der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten demonstriert werden; unter experimentell ausgelösten, ischämischen Bedingungen entwickelten die cGKI-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen viel häufiger Thrombosen (Massberg et al., 1999). Insgesamt unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass die cGMP-Kinase I der zentrale Mediator für die Wirkungen von NO in Thrombozyten und glatter Muskulatur ist. Weiter wiesen die männlichen cGKI-defizienten Mäuse eine stark verminderte Reproduktionsfähigkeit auf, die auf eine erektile Dysfunktion zurückzuführen war; sie zeigten keine Relaxation des Corpus cavernosum nach Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade (Hedlund et al., 2000).

Knock-out-Mäuse für die cGMP-Kinase II zeigten weniger pathologische Auffälligkeiten als Knock-out-Mäuse der cGMP-Kinase I. Die cGKII-defizienten Mäuse hatten eine normale Lebenserwartung und Reproduktionsfähigkeit, waren jedoch resistent gegen das Enterotoxin STa aus *Escherichia coli*, dem häufigsten Erreger von Durchfallserkrankungen. Unerwarteterweise waren die cGKII-defizienten Mäuse um etwa 30 % kleiner als

Wildtyp-Mäuse. Dieser Befund belegte eine funktionelle Bedeutung der cGMP-Kinase II beim linearen Skelettwachstum (Pfeifer et al., 1996).

1.3.4 Übersicht der transgenen Mausmodelle

Die bisher generierten transgenen Mausmodelle zur Untersuchung regulatorischer Proteine des cGMP-Signalweges lieferten entscheidende Beiträge, die die bereits vorhandenen Kenntnisse über die physiologische Funktion des betreffenden Proteins bestätigten und darüber hinaus umfassende Einsichten in den zugrunde liegenden biologischen Mechanismen erlaubten. Im Folgenden sind einige der wichtigsten Befunde zusammengefasst, die sich aus Untersuchungen verschiedener Knock-out-Mäuse herleiten lassen.

Knock-out-Mäuse, in denen das Gen für das ANP, die GC-A oder die eNOS ausgeschaltet wurde, entwickelten Bluthochdruck und obwohl dieser Befund zu erwarten war, überraschte die Tatsache, dass die beiden Signalwege (ANP/cGMP und NO/cGMP) bei der Gefäßerweiterung nicht für einander kompensierten.

Die nNOS- und cGKI-defizienten Mäuse, die beide eine Beeinträchtigung der gastrointestinalen Motilität aufwiesen, demonstrierten die Wichtigkeit der NO-freisetzenden NANC-Neurone und der cGMP-Kinase I bei der Regulation der Magen-Darm-Motorik.

Mit Hilfe der nNOS-, eNOS- und cGKI-defizienten Mäuse konnte ein komplexer Signalweg für die Peniserektion aufgeklärt werden, an den sowohl die neuronale wie auch die endotheliale NO-Synthase als NO-generierende Systeme beteiligt waren und die cGMP-Kinase I als das gemeinsame Effektormolekül nachgeschaltet war.

Bei den CNP-defizienten und cGKII-defizienten Mäusen war das lineare Skelettwachstum beeinträchtigt, was sich in einem Zwergwuchs der Tiere äußerte und auf die Beteiligung der CNP/GC-B/cGKII-Signalkaskade bei der Knochenbildung rückschließen ließ (Miyazawa et al., 2002). Die GC-C- und die cGKII-defizienten Tiere entwickelten beide eine Resistenz gegen das Enterotoxin STa aus *Escherichia coli*.

Wie in der vorliegenden Einleitung ausgeführt, existieren zur Untersuchung der cGMP-Signaltransduktion Knock-out-Mäuse sowohl für Proteine, die die Signalkaskade initiieren (NO-Synthasen, natriuretische Peptide) wie auch für Proteine, die die Signalkaskade weiterleiten (cGMP-Kinasen). Ebenfalls existieren zur Untersuchung der Peptidhormone/cGMP-vermittelten Signaltransduktion Knock-out-Mäuse der cGMP-produzierten Enzyme (membranegebundene Guanylyl-Cyclasen).

Für die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase, die eine zentrale Position innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade besitzt sind bisher keine Knock-out-Mäuse generiert worden (siehe Abb. 1). Die Guanylyl-Cyclase wird sowohl durch das von der nNOS wie auch der eNOS synthetisierte NO aktiviert und das daraufhin gebildete cGMP kann nachfolgend verschiedene cGMP-Effektoren aktivieren. Vorstellbar ist also, dass durch die Knock-out-Mäuse der Guanylyl-Cyclase noch weitere NO-vermittelte Funktionen und cGMP-abhängige Effektoren identifiziert werden können.

2 Zielsetzung

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase setzt das NO-Signal in eine intrazelluläre Erhöhung der cGMP-Konzentration um. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, α und β , und enthält eine prosthetische Häm-Gruppe, an der NO bindet. Bisher wurden vier verschiedene Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase kloniert, α_1 , α_2 , β_1 und β_2 , und auf Proteinebene konnte das Vorkommen von zwei Isoformen ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Regulation der $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Isoformen ergaben keine funktionell relevanten Unterschiede, obwohl die N-terminalen Regionen der α -Untereinheiten, denen regulatorischen Eigenschaften zugeschrieben werden, auffällige Unterschiede aufweisen. Um die physiologischen Funktionen der $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zu untersuchen, sollten Knock-out-Mäuse generiert werden, in denen das Gen für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit nicht nur im Gesamtorganismus, sondern auch in einzelnen Geweben der Maus zu ausgewählten Zeitpunkten inaktiviert werden kann.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, die notwendig sind, um konditionelle Knock-out-Mäuse für das α_1 - bzw. α_2 -Gen zu generieren und genetisch analysieren zu können. Dazu sollten:

1. Genomische Maus-Sequenzen für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit identifiziert werden.
2. Für die weiteren Arbeiten geeignete genomische Abschnitte in gängige Vektoren subkloniert und charakterisiert werden.
3. DNA-Konstrukte zusammengestellt werden, mit deren Hilfe die zur Herstellung konditioneller Knock-out-Mäuse erforderliche Modifikation des α_1 - bzw. α_2 -Gens in das Genom von embryonalen Stammzellen der Maus eingebracht werden kann.
4. Verschiedene Analysemethoden zum Nachweis der genomischen Veränderungen entwickelt und etabliert werden.

Neben der Untersuchung der physiologischen Bedeutung der α_1 - bzw. α_2 -haltigen Isoformen der Guanylyl-Cyclase im Gesamtorganismus, eröffnet die konditionelle Inaktivierung des α_1 - bzw. α_2 -Gens die Möglichkeit, die Funktion der zu untersuchenden Gene gezielt in einzelnen Geweben oder Zelltypen zu erforschen. Deshalb war es ein weiteres Vorhaben der vorliegenden Arbeit, das Vorkommen der Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in Mausgeweben systematisch zu untersuchen. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

5. Das relative Vorkommen der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase sollte mittels sogenannter real-time quantitativer PCR bestimmt werden, um Gewebe zu identifizieren, in denen die jeweilige α -Untereinheit von physiologischer Relevanz sein kann.
6. In einem getrennten experimentellen Ansatz sollte das Vorkommen und damit die mögliche physiologische Relevanz der β_2 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase untersucht werden.

3 MATERIALIEN

In diesem Kapitel sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt, die nicht in den entsprechenden Kapiteln der Methoden bzw. Ergebnisse beschrieben wurden.

3.1 Chemikalien

In der Regel p.a. Substanzen folgender Firmen: Amersham Biosciences (Freiburg), Applichem (Darmstadt), Applied Biosystems (Weiterstadt), Baker Chemikalien (Gross-Gerau), Biozym (Hess. Oldendorf), Carl-Roth (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Stratagene (Heidelberg).

3.2 Enzyme

Sämtliche Enzyme wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von New England Biolabs oder MBI Fermentas bezogen.

3.3 Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form aus der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen und auf eine Konzentration von 50 μ M mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eingestellt. Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte mit dem Programm DNASTAR™.

Der Buchstabe U (Upper) als tiefgestellter Index kennzeichnet Primer-Sequenzen der Vorwärtsrichtung, der Buchstabe L (Lower) Primer-Sequenzen der Rückwärtsrichtung.

3.3.1 Oligonukleotide zum Nachweis der homologen Rekombination

Folgende Oligonukleotide (Primer) wurden zum Nachweis der homologen Rekombination mittels PCR-Analyse verwendet (siehe Abb. 14 sowie 5.1.5.1 und 5.1.5.2).

Zur Analyse beider α -Untereinheiten wurden folgende Oligonukleotide als Upper-Primer eingesetzt:

A_U: PGK200 5' -AAC TTC CTG ACT AGG GGA GGA-3'

B_U: CLM6 5' -ACC AAA GAA CGG AGC CGG TTG GCG-3'

Zur Analyse der α_1 -Untereinheit wurden folgende Primer als Lower-Primer eingesetzt:

A_L: Hom- α_1 L₅ 5' -AAC TGG GAG GAC TGG AGA TTG TAG-3'

B_L: Hom- α_1 L₆ 5' -AGA TTG TAG TTG TTT CCC TTT TAT-3'

Zur Analyse der α_2 -Untereinheit wurden folgende Primer als Lower-Primer eingesetzt:

A_L: Hom- α_2 L₄ 5' -GAC TTT GAA ATT GGC TCT GC-3'

B_L: Hom- α_2 L₃ 5' -AGA TTT TGT TTT GGG TCA CTA-3'

3.3.2 Oligonukleotide zum Nachweis der ersten loxP-Sequenz

Zur Analyse der α_1 -Untereinheit wurden folgende Primer verwendet (siehe Abb. 14 und 5.1.5.1):

C_U: loxP- α_1 U₁ 5' -TGT AGA AGA GGG GAT AGA AAG ACC-3'

C_L: loxP- α_1 L₁ 5' -GAA TGC GTA GTT AAG TGG AAT GTG-3'

D_U: loxP- α_1 U₂ 5' -TGC CCA TAA TGT CTC ACC AA-3'

D_L: loxP- α_1 L₂ 5' -TAT CAT TCA CCT TCA GCA TCT TCT-3'

Zur Analyse der α_2 -Untereinheit wurden die unten aufgeführten Primer eingesetzt (siehe Abb. 14 und 5.1.5.2):

C_U: P α_2 U₅ 5' -AGG TGG GGC TGT CTC TGA A-3'

C_L: P α_2 L₁ 5' -TAA AGA GGC AGC AAT AAT GAG ATG-3'

D_U: P α_2 U₃ 5' -CCC TGC TTA GAA GTA AGC AGG-3'

D_L: P α_2 L₃ 5' -CAA AGA GGA AGT GAC CAT AGG-3'

E_U: loxP 5' -ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC-3'

3.3.3 Oligonukleotide zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination

Zur Analyse der α_1 -Untereinheit verwendetes Primer-Paar (siehe 5.1.6.1 und Abb. 19):

F₁U₁ 5' -ATG ACA AAT GAG CAG ACG-3'

F₁L₁ 5' -TCC CGA GAT GAA GTA GTT AGT A-3'

Zur Analyse der α_2 -Untereinheit verwendetes Primer-Paar (siehe 5.1.6.2 und Abb. 21):

F₂U₁ 5' -TTT GAA ATT ACT TGG AGA TAG A-3'

F₂L₂ 5' -AAC TAT GTA ATT ATC AAC TGG-3'

3.3.4 Oligonukleotide für die Amplifizierung genomischer DNA-Fragmente zur Herstellung von Sonden

Zur Amplifizierung der 5' -Sonde der α_1 -Untereinheit verwendetes Primer-Paar (s. Abb. 15)

5S α_1 U₂ 5' -ATA GCA ATG GAA TAA AAC AAT ACA-3'

5S α_1 L₂ 5' -GGA AAC ACT GCC TAG AAA AAC C-3'

Zur Amplifizierung der 3' -Sonde der α_1 -Untereinheit verwendetes Primer-Paar (s. Abb. 15)

3S α_1 U₁ 5' -TGT GCC CTC ATC TTC TTG GTT-3'

3S α_1 L₁ 5' -AGG CCG TGA CTT GTT GC-3'

3.3.6 Sequenzier-Primer

Vektorspezifische Sequenzier-Primer

T7-Primer 5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

T3-Primer 5' -ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'

Sequenzier-Primer für die α_1 -Untereinheit

α_1 U₃ 5' -GTT GGC GGC ACC CTG AA-3'

A1U-63 5' -GGC GTA TAC TCT GAC CTT TCT G-3'

A1rev.182 5' -AGA GGC GGG GAC GAC TGG AAG A-3'

13U1- α_1 5' -GAA GAA ATC GTC AAG GGT AAG GAA-3'

α_1 L-1370 5' -GTC CCC CAA ATA CCC ACT G-3'

α_1 U-1338 5' -CCT CTT TAA AAT TGC AGT GGG TAT-3'

Sequenzier-Primer für die α_2 -Untereinheit

A2-1 5' -CTC CAT TAC TTC CAC CCT CAC CA-3'

A2-2 5' -ATT GCA AAG CCC ACC GTA TG-3'

A2-3 5' -GTC TTG CTA CGA TTG TCC ACT CC-3'

A2-4 5' -AGA TAT GCT TTG ATG AGA ATG AA-3'

A2-5 5' -CTG AGT TTT CCA TGA GTT CCA GC-3'

A2-6 5' -GCT GGA ACT CAT GGA AAA CTC AG-3'

3.4 Bakterienstämme

Es wurden folgende E. coli K12-Stämme verwendet:

XL1-Blue Stratagene (Heidelberg)

Rec A1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB
lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c

DH10B Incyte Genomics Inc., USA

F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d lacZΔM15 ΔlacX74 deoR
recA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

3.5 Klonierungsvektoren

pUC18 (GenBank-Nr.: L08752) Amersham Biosciences, Freiburg

pBluescript II SK(+) (GenBank-Nr.: X52328) Stratagene, Heidelberg

pCR[®]2.1 Invitrogen, Karlsruhe

pBeloBAC 11 Incyte Genomics Inc., USA

Triple-lox[™] construction kit
(loxL; loxC; loxR) freundlicherweise von R.T. Premont
zur Verfügung gestellt.

3.6 Radioaktives Nukleotid

[α -³²P] dATP (6000 Ci/mmol; 20 mCi/ml; 3,3 μ M) New England Nuclear, Boston, MA/USA

3.7 Puffer und Stammlösungen

10 x TAE-Puffer	0,4 M Tris, 0,2 M Essigsäure, 10mM EDTA (pH 8,0).
10 x TBE-Puffer	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8,0).
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0).
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat.
IPTG-Stammlösung	100 mM in H ₂ O (steril filtriert; Aufbewahrung –20 °C).
X-Gal-Stammlösung	40 mg/ml in Dimethylsulfoxid (Aufbewahrung –20 °C).
DEPC-Wasser	Demineralisiertes Wasser mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzen und 30 min bei RT rühren. Autoklavieren.

3.8 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 bzw. 10 g NaCl, auf 1l H ₂ O, pH 7,2 (autoklavieren).
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agar, auf 1l H ₂ O, pH 7,2 (autoklavieren).
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl, auf 1l H ₂ O, pH 7,2 (autoklavieren). Vor Gebrauch 5 ml sterile 2M MgCl ₂ -Lösung zugeben.
SOC-Medium	SOC-Medium mit 10 mM Glucose-Lösung (steril filtriert)

3.9 Antibiotika

Es wurden Stammlösungen der Antibiotika angesetzt, die steril filtriert und bei –20 °C gelagert wurden. Die jeweils benötigten Lösungen wurden den Wachstumsmedien erst nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf ca. 50 °C zugegeben.

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml H₂O

Chloramphenicol-Stammlösung: 30 mg/ml Ethanol

3.10 Filter und Membranen

Nitrocellulose-Filter

Protran BA 85/20 (5 mm grid) 0,45 μ m Schleicher und Schüll, Dassel

Nylonmembran

GeneScreen Plus New England Nuclear, Boston, MA/USA

4 METHODEN

4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

4.1.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparationen)

Zur Gewinnung analytischer Mengen (4-20 µg) von Plasmid-DNA wurde das Bakterienpellet (10 min, 6.000 x g, RT) einer 3 ml Übernachtskultur in 250 µl Lösung I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 250 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS) während einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wurde anschließend durch Zugabe von Lösung III (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert und auf eine hohe Salzkonzentration eingestellt. Dadurch wurden denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer und Kaliumdodecylsulfat wie auch Natriumdodecylsulfat (SDS) gefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung blieb. Nach Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, RT) wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt, und die Plasmid-DNA durch Zugabe von reinem Ethanol (ca. das 2fache Volumen der zu fällenden DNA-Lösung) gefällt. Alternativ dazu wurde, um den Reinheitsgrad der zu erhaltenden Plasmid-DNA zu erhöhen, eine Affinitätsäule verwendet, bei der das Plasmid an eine Kieselgelmatrix bindet und dadurch andere im Überstand enthaltenden störenden Komponenten abgetrennt werden können. Die Säulen aus dem Plasmid-DNA Reinigungskit (QIAprep 8 Miniprep, Qiagen) wurden zu diesem Zweck gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die anschließende Elution erfolgte durch Zugabe von 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

4.1.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparationen)

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA und von „Plasmiden“ mit großem Insert (BAC) wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Hierbei wurden die Bakterien wie bei der Minipräparation mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, die anschließende DNA-Extraktion erfolgte aber über die Bindung der extrachromosomalen DNA an Anionenaustauschersäulen.

Soweit es sich um Plasmide mit hohen Kopienzahlen handelte, wurden 100 ml LB-Medium mit 30 µl einer möglichst frischen Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Um größere Mengen von BAC-DNA zu gewinnen, die nur als Einzelkopien in E. coli-Zellen vorliegen, wurden 500 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer am Morgen des gleichen Tages angesetzten Vorkultur angeimpft. In Gegenwart von 12,5 µg/ml Chloramphenicol wurde dann die Bakterienkultur über Nacht, aber nicht länger als 12 h, bei 37 °C inkubiert. Das Bakterienpellet (20 min, 4.500 x g, 16 °C) wurde in 20 ml Resuspensionspuffer P1 (10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0)

aufgenommen. Nach der Zugabe von 20 ml Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) und einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur waren die Zellen lysiert; es wurden 20 ml eiskalten Neutralisationspuffers P3 (3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugefügt und vorsichtig untergemischt. Zum Fällern der genomischen DNA und der Proteine wurde das Gemisch auf Eis inkubiert (30 min) und anschließend zentrifugiert (30 min, 20.000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde durch einen Trichter mit Faltenfilter (Papierfilter) filtriert und auf die zuvor mit 15 ml QBT-Puffer (750 mM NaCl, 15 % Isopropanol, 0,15 % Triton[®] X-100, 50 mM MOPS, pH 7,0) äquilibrierte Säule (QIAGEN-tip 500, Qiagen) gegeben. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 30 ml QC-Puffer (1,0 M NaCl, 15 % Isopropanol, 50 mM MOPS, pH 7,0), und anschließend wurde die DNA mit 10 ml auf 65 °C vorgewärmten QF-Puffers (1,25 M NaCl, 15 % Isopropanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert; dazu wurde jeweils 1 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Eluat in einem frischen Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Durch Zugabe von Isopropanol (0,7faches Volumen), Mischen und Zentrifugation (30 min, 15.000 x g, 4 °C) wurde die DNA präzipitiert. Das Präzipitat wurde nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 15.000 x g, 4 °C). Nach Entfernung des Überstandes wurde das DNA-Präzipitat an der Luft getrocknet und in Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst.

4.1.2 Isolierung von genomischer DNA

4.1.2.1 Isolierung aus kultivierten Zellen

Embryonale Stammzellen der Maus wurden mit Proteinase K im nachfolgenden Lysis-puffer (5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 100 µg/ml Proteinase K) lysiert. Das Lysat wurde mit dem äquivalenten Volumen an Isopropanol versetzt und vorsichtig gemischt. Die dabei ausfallende DNA wurde nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C präzipitiert und nach einem Waschschriff mit 70 %igem Ethanol in modifiziertem TE Puffer (0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) bei 56 °C gelöst. Anschließend wurde die DNA bei 4 °C gelagert.

4.1.2.2 Isolierung aus tierischen Geweben

Abgeschnittene Schwanzspitzen (ca. 1 cm lang) von Mäusen wurden mit 500 µl des Lysis-puffers (0,1 M EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 700 µg/ml Proteinase K) versetzt und unter ständigem Schütteln über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Gewebelösung abzentrifugiert (15 min, 6.000 x g, RT). Der klare Überstand wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol (pH 8,0), einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1 (v/v)) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils zentrifugiert (3 min, 14.000 x g, RT) und die obere, wässrige Phase unter Vermeidung der proteinhaltigen Interphase in ein neues Gefäß überführt. Die extrahierte DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt. Hierzu wurde ein Volumen der wässrigen Phase mit 1/10 Volumen an 3 M Na-Acetat, pH 5,2, und 2 Volu-

men Ethanol versetzt und vorsichtig durchmischt. Die ausgefallene DNA wurde dabei als weißer Faden sichtbar. Dieser klebrige DNA-Faden wurde dann mit einer Pipettenspitze herausgenommen und in 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Entfernung der Ethanol-lösung wurde die DNA an der Luft getrocknet, in TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 56 °C gelöst.

4.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des TRIZOL[®] Reagenzes (Invitrogen), eines einphasigen, aus Phenol und Guanidinisothiocyanat bestehenden Gemisches.

Frisch isolierte Mausgewebe (bis 100 mg) wurden in 1 ml dieser Denaturierungslösung mit Hilfe eines Ultraturrax Homogenisators (IKA) homogenisiert. Je 1 ml Homogenat wurden 200 µl Chloroform zugegeben. Das Gemisch wurde geschüttelt, 2-3 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 6 °C). Es erfolgte eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt mit 500 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, 6 °C) wurde das RNA-Präzipitat mit 75 %igem Ethanol gewaschen, nach Entfernung der Lösung an der Luft getrocknet und zum Lösen in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei 56 °C inkubiert (10 min). Anschließend wurde die Konzentration der RNA-Lösungen photometrisch bestimmt (siehe 4.4.1) und, wenn möglich, auf 1 µg/µl eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

4.2 Organentnahme aus Mäusen

Die Gewebe zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden Mäusen beider Geschlechter der Inzuchtstämme BALB/c und C57BL/6 entnommen. Dafür wurden die Mäuse mit CO₂ betäubt und durch cervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die zu untersuchenden Organe präpariert. Die verwendeten Gehirnregionen außer dem Hippokampus wurden entsprechend der Abbildung 2 isoliert.

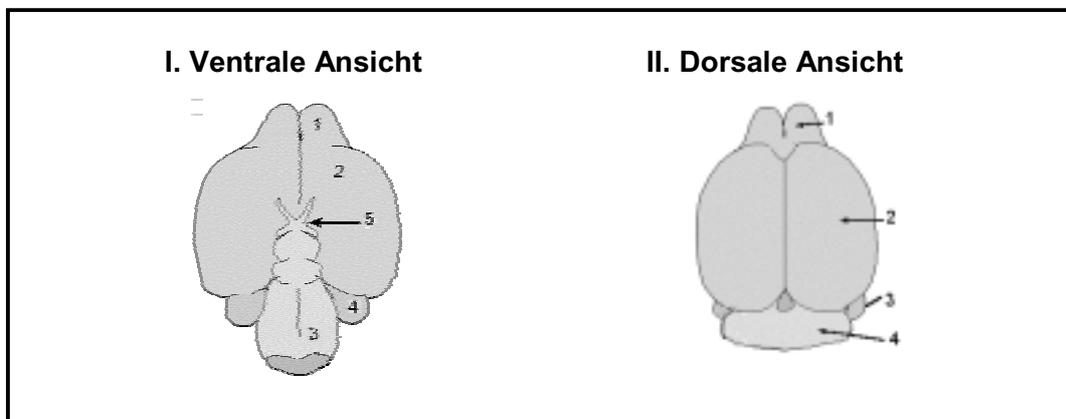


Abb. 2: Ansicht der isolierten Gehirnregionen

1. Bulbus olfactorius; 2. Cortex; 3. Medulla oblongata; 4. Cerebellum; 5. Nervus opticus.

4.3 ES-Zellen und Generierung von chimären Mäusen

Die Kultivierung der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus und die Generierung der chimären Mäusen wurden von Dr. Stephan Teglund in Karolinska Institut (Schweden) durchgeführt.

4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

4.4.1 Photometrische Bestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Messungen wurden in Quarzküvetten oder speziellen Kunststoffküvetten (UVette®), die für das UV-Licht durchlässig sind, mit dem Biophotometer der Firma Eppendorf durchgeführt.

4.4.2. Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel-Elektrophorese

Geringe Mengen an DNA wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 4.5.2.1) quantifiziert. Auf ein 0,8 %iges Agarosegel in TAE-Puffer wurde ein Teilvolumen der zu bestimmenden DNA-Lösung und ein Mengenmarker (High DNA MASS Ladder, Invitrogen), der aus verschiedenen DNA-Fragmente bekannter Länge und Konzentration besteht, aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde durch Vergleich der Bandenintensitäten unter UV-Licht die Menge des zur Bestimmung eingesetzten DNA-Fragmentes abgeschätzt. Das Ergebnis ist somit mit einiger Ungenauigkeit behaftet, aber die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande, und gleichzeitig wird auch die Länge des DNA-Fragmentes mitbestimmt und erlaubt Rückschlüsse auf die Unversehrtheit sowie auf Kontaminationen mit anderen DNA-Fragmenten.

4.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.5.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Typ-II-Restriktionsendonukleasen hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen eines DNA-Moleküls, die innerhalb einer kleinen, in der Regel vier bis sechs Basenpaare (bp) langen, spezifischen Erkennungssequenz liegen. Die hydrolytische Spaltung der beiden DNA-Stränge wird auch als Restriktionsenzymverdau oder einfach als Verdau der DNA bezeichnet. Unter optimalen Reaktionsbedingungen schneidet ein Restriktionsenzym die DNA an sämtlichen vorhandenen Erkennungsstellen. Die dabei entstehenden DNA-Fragmente stehen sowohl untereinander als auch zum Ausgangs-DNA-Molekül im äquimolaren Verhältnis. Unter suboptimalen Reaktionsbedingungen werden dagegen nicht alle vorhandenen Erkennungsstellen eines Enzyms gespalten und es besteht kein äquimolares Verhältnis zwischen Ausgangs-DNA und daraus entstehende DNA-Fragmente. Der als Partialverdau bezeichnete Vorgang wurde oft bei Klonierungsarbeiten zur Erhaltung des gewünschten DNA-Fragmentes angewendet. Dabei wurden gezielt

suboptimale Reaktionsbedingungen, wie z.B. geringere Enzymmenge und verkürzte Reaktionszeiten, eingesetzt.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen NEB und MBI-Fermentas bezogen; mit den Enzymen wurden die entsprechenden optimierten Reaktionspuffer geliefert. Bei einem analytischen Verdau wurde 1 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 10 U des entsprechenden Enzyms 1 h lang bei seiner optimalen Arbeitstemperatur (meist 37 °C) geschnitten. Bei einem präparativen Ansatz wurden 10-15 µg DNA in 50-100 µl Pufferlösung mit 20 U des entsprechenden Enzyms über Nacht verdaut. Genomische DNA (10 µg) wurde in einem Reaktionsvolumen von 30-µl mit 15 U des ausgewählten Enzyms über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurden weitere 10 U des Enzyms zugegeben und die Reaktion für 4-5 h fortgesetzt.

Sollte die DNA mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten werden, wurde der Restriktionsverdau gleichzeitig durchgeführt, sofern die gleiche Temperatur und Pufferbedingungen benötigt wurden. Ansonsten wurde die DNA zuerst mit demjenigen Enzym geschnitten, das bei niedrigen NaCl-Konzentrationen, aktiv war, und erst nach Anpassung der NaCl-Konzentration wurde das zweite Enzym hinzugefügt.

4.5.2 Agarosegel-Elektrophorese

4.5.2.1 Auftrennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente können aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge und negativen Ladung elektrophoretisch in horizontalen, nicht-denaturierenden Agarosegelen getrennt werden. Dabei ist die relative Wanderungstrecke eines DNA-Fragmentes umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus seiner Länge. Die Länge der Fragmente wird bestimmt durch den Vergleich mit Fragmenten bekannter Länge, die als Größenmarker auf demselben Gel aufgetragen werden. Je nach zu erwartender Länge der zu bestimmenden Fragmente wurden 0,5 µg folgender Größenmarker aufgetragen: zur Größenbestimmung zwischen 12 kb und 500 bp wurde die „1 kb DNA Ladder“ (Invitrogen) eingesetzt und für solche zwischen 1,5 kb und 100 bp die „100 bp DNA Ladder“ (NEB).

Die Qualität der Auftrennung hängt von der Agarose-Konzentration im Gel und von der angelegten elektrischen Feldstärke ab. Diese Bedingungen wurden hinsichtlich der Länge der Fragmente ausgewählt, wobei auch die Unterschiede in den Fragmentlängen berücksichtigt wurden. Bei der Gelelektrophorese von genomischer DNA wurden 0,5 %ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte über Nacht mit einer Feldstärke von 1,25 V/cm. Die Bestimmung der Anzahl und Größe von DNA-Fragmenten aus Restriktionsanalysen von Plasmiden erfolgte meist auf 0,8 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 5 V/cm. Sollten Fragmente mit einer Länge unter 1000 bp und Längenunterschiede von etwa 40 bp nachgewiesen werden,

wurden 1,2–2 %ige (w/v) Agarosegele in TBE-Puffer angewandt, und eine Feldstärke von 5 V/cm angelegt. Da die DNA-Lösungen annähernd die gleiche Dichte wie der Elektrophoresepuffer (TAE oder TBE) besitzen, wurden sie vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (60 mM EDTA, 60 % Glycerin, Bromphenolblau) versetzt.

Zum Nachweis der DNA-Fragmente enthielten die Agarosegele Ethidiumbromid-Lösung in der Konzentration von 1 µg/ml. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert so zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen, dass er verstärkt UV-Licht absorbiert und diese Energie im sichtbaren Bereich (560 nm) wiederabgibt. Dabei werden die DNA- und RNA-Fragmente als rot-orange-farbene Banden sichtbar. Zur Dokumentation der Banden wurden die Agarosegele auf dem UV-Transilluminator von unten mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt und mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

4.5.2.2 Gelelektrophorese von RNA

Da RNA wesentlich empfindlicher als DNA gegenüber Nukleasen und Hydrolyse durch Säuren oder Basen ist, wurde jeweils vor dem Weiterarbeiten die Qualität der RNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei einer intakten RNA-Präparation sollten die 28S- und 18S-Banden der ribosomalen RNA deutlich zu erkennen und kaum degradiert sein.

Angeichts der Verbreitung und Stabilität von RNasen wurden geeignete Vorsichtsmaßnahmen getroffen, unter anderem die Behandlung der Gelkammer und Elektrophoresekammer mit 1 %iger (v/v) Wasserstoffperoxidlösung und das Ansetzen der benötigten Puffer mit DEPC-behandeltem Wasser. Es wurde ein 2 %iges nicht-denaturierendes Agarosegel in TAE-Puffer ohne Zugabe von Ethidiumbromidlösung gegossen. Um die starken sekundären Strukturen der RNA aufzulösen, wurden 10 µl einer RNA-Lösung (1 µg/µl) mit 10 µl Formamid 10 min lang bei 55 °C inkubiert. Das Gemisch wurde auf Eis abgekühlt und dann wurden 0,5 µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) und 3 µl des Auftragspuffers (60 mM EDTA, 60 % Glycerin, Bromphenolblau) zugegeben. Die Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen und 30 min bei 5 V/cm aufgetrennt.

4.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und DNA-Lösungen

Um das gewünschte DNA-Fragment von weiteren Spaltprodukten eines Restriktionsverdau oder Nebenprodukten einer PCR-Reaktion zu trennen, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt und die entsprechende Bande wurde dann mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht (302 nm) aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Isolierung der DNA aus dem mit TAE gepufferten Agarosegelstück wie auch aus DNA-haltigen Lösungen erfolgte durch reversible Bindung der DNA an Glasmilch. Dazu wurden folgende kommerzielle Reagenziensysteme verwendet: das „QIAquick PCR Purification/Gel Extraction“ Kit, von Qiagen, das „High Pure PCR Product Purification“ Kit,

von Boehringer Mannheim, der „NucleoSpin Extract 2 in 1„ von Macherey-Nagel. In diesen Reagenziensystemen waren alle notwendigen Puffer sowie die Affinitätssäulen mit Kieselgelmembranen enthalten. Die Isolierung der DNA erfolgte jeweils gemäß den Angaben der Hersteller.

4.5.4 Ligation

Bei einer Ligationsreaktion katalysiert das Enzym T4 DNA-Ligase die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente. Dadurch werden die DNA-Fragmente (Vektor und Insert) unter Ausbildung eines zirkulären DNA-Moleküls miteinander verknüpft. Die Reaktion verläuft bevorzugt, wenn die DNA-Fragmente kompatible 5'- und 3'-Überhänge besitzen.

Die Ligationsreaktionen wurden 14 h bei 16 °C in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Der Ligationsansatz enthielt 5-50 ng der Vektor-DNA mit einem 3-5fachen molaren Überschuss zu klonierender DNA und 6000 Weiss Units der T4-DNA-Ligase (NEB) in einer Pufferlösung aus 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, 25 µg/ml Rinderserumalbumin und 5% (w/v) Polyethylenglycol 8000. Am Ende der Reaktionszeit wurde der Ligationsansatz sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

4.5.5 Ligation von PCR-Produkten

Zur Ligation von PCR-Produkten wurde die „TA-Cloning“-Methode verwendet. Dabei wurde die Eigenschaft der Taq-DNA-Polymerase ausgenutzt, DNA-Fragmente mit einem unspezifischen Überhang von einer Base zu produzieren (Clark et al., 1988). Da es sich in der Mehrzahl der Fälle um ein Adenosin handelte, ließen sich die PCR-Fragmente leichter mit einem Vektor ligieren, der an den 3'-Enden das komplementäre Thymidin besaß. Verwendet wurde der entsprechend behandelte Vektor pCR[®]2.1 aus dem TA-Cloning-Kit von Invitrogen.

Der Ligationsansatz enthielt 3 µl eines PCR-Ansatzes (nicht älter als 2 h), 2 µl des pCR[®]2.1-Vektors (25 ng/µl) und 1 µl des Enzyms T4-DNA-Ligase (NEB) in der dafür erforderlichen Pufferlösung. Der Reaktionsvolumen betrug insgesamt 10 µl. Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C durchgeführt.

4.5.6 Einführung neuer Schnittstellen in Klonierungsvektoren

Für die Klonierung ausgewählter DNA-Fragmente in bestimmte Vektoren war es notwendig, neue Schnittstellen in diese Vektoren einzubauen. Dies geschah mit Hilfe von Adaptoren, bei denen es sich um chemisch synthetisierte, bis auf wenige Basen komplementäre Oligonukleotide (etwa 25 Basen lang) handelte, die die Sequenz der neuen einzubauenden Schnittstellen enthielten. Die nicht-komplementären Sequenzen befanden sich am 5'-Ende jedes Oligonukleotids und waren Teil der Spaltungssequenz

von zwei anderen Restriktionsenzymen. Nach Anlagerung der Oligonukleotide aneinander kam es zur Bildung eines DNA-Fragmentes mit 5'-überhängenden Enden, die nicht zueinander komplementär waren. Dieses Fragment wurde dann direktional in den vorbestimmten Vektor ligiert, der zuvor mit den entsprechenden zwei Restriktionsenzymen geöffnet wurde. Die Sequenzen der verwendeten Adaptoren sind unter 3.3.5 aufgelistet.

Die Oligonukleotide wurden als Lyophilisate von der Firma Sigma-ARK bezogen und mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 50 µM eingestellt.

Zur Fertigstellung der Adaptoren wurden die partiell komplementären Oligonukleotide auf eine Konzentration von 5 µM eingestellt und in 100 µl Gesamtvolumen für 5 min bei 75 °C inkubiert. Nach der Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurde eine 1:5 Verdünnung mit TE-Puffer hergestellt, aus der 2 µl mit 20 ng des entsprechenden geöffneten Vektors in ein 10 µl Ligationsansatz (siehe 4.5.4) eingesetzt wurden.

4.5.7 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA

Verfügt die linearisierte Vektor-DNA über kompatible überhängende oder glatte Enden, kommt es bei einer Ligation sehr häufig zu einer Rezirkularisierung des Vektors. Das hat zur Folge, dass die Bildung des gewünschten Produktes aus Insert und Vektor nur wenig oder gar nicht stattfindet. Da die Ligationsreaktion gegenüberliegende 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden benötigt, wird durch eine Dephosphorylierung des linearisierten Vektors durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase erreicht, dass der Vektor keine inter- oder intramolekularen Bindungen mit sich selbst eingehen kann.

Die Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurde im Restriktionsverdauansatz direkt im Anschluss an dem Restriktionsverdau durchgeführt. Durch Vergrößerung des Reaktionsvolumens wurden die Pufferbedingungen für die alkalische Phosphatase eingestellt und 2 U des Enzyms CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase; Promega) je 10-15 µg Vektor-DNA zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde nacheinander 20 min bei 37 °C und 20 min bei 56 °C inkubiert. Dann wurde noch 1 U des Enzyms zugegeben und die Inkubation für jeweils weitere 20 min bei 37 °C und 56 °C wiederholt. Am Ende der Reaktionszeit wurde das Enzym für 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde die Vektor-DNA über eine Affinitätssäule gereinigt und mittels Gelelektrophorese die Linearisierung des Vektors überprüft und gleichzeitig die DNA-Konzentration des Eluates bestimmt. Die Effizienz der Dephosphorylierung wurde durch Ligation der Vektor-DNA ohne Zugabe von Insert und anschließende Transformation in *E. coli* überprüft. Im Idealfall wuchsen wenige bzw. keine Bakterienkolonien.

4.5.8 Auffüllen von 5'-überhängenden Enden zu glatten Enden

Sofern die DNA-Fragmente vom Vektor oder Insert 5'-überhängende Enden besaßen, die nicht miteinander kompatibel waren, konnte eine Ligation erst nach Überführung der 5'-

überhängenden Enden in glatte Enden erfolgen. Zum Auffüllen von 5'-überhängenden Enden wurde das lange Klenow-Fragment (NEB), welches DNA-Polymerase und 5'-3'-Exonuklease Aktivität besitzt, verwendet. Dazu wurde 1 µg DNA in einem Puffer mit 5 mM MgCl₂, 7,5 mM Dithiothreitol, 33 µM jedes dNTPs und 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, mit 1 U des Enzyms 15 min lang bei Raumtemperatur behandelt. Durch eine anschließende Reinigung des Ansatzes über eine Affinitätssäule wurde das Enzym von der DNA abgetrennt.

4.5.9 Herstellung kompetenter Zellen

Die Behandlung von *E. coli*-Zellen mit bestimmten Chemikalien kann diese in einen sogenannten kompetenten Zustand versetzen, in dem ihre Zellwand permeabel für fremde DNA gemacht wird. Handelt es sich bei der aufgenommenen DNA um zirkuläre doppelsträngige DNA-Moleküle, so können sie unabhängig vom bakteriellen Chromosom repliziert und vererbt werden.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 500 ml SOB-Medium in einem 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 5 ml einer Übernachtskultur des XL1-Blue Bakterienstammes angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C mit 200-300 Umdrehungen/min geschüttelt, bis sie nach etwa 3 h eine OD_{550nm} von 0,6 erreichte. Bei dieser optischen Dichte befinden sich die Bakterien in der exponentiellen Phase der Wachstumskurve und können besonders gut in kompetente Zellen umgewandelt werden. Alle folgende Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Es wurden sterile Gefäße und sterile Lösungen verwendet. Die Kultur wurde zuerst in Eiswasser gekühlt und dann zentrifugiert (10 min, 600 x g, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 200 ml Puffer I (10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 12 % (v/v) Glycerin, 30 mM Kaliumacetat pH 5,8) vorsichtig resuspendiert und für 2 Stunden auf Eis gestellt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 ml Puffer II (75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 12 % (v/v) Glycerin, 10 mM MOPS pH 7,0) resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Jeweils 50-100 µl dieser kompetenten Zellen wurden für eine Transformation eingesetzt.

Da nicht alle in einer Transformation eingesetzten Bakterien auch tatsächlich zur Aufnahme von Plasmid-DNA fähig sind, wurde nach der Präparation die Kompetenz der Bakterien, das heißt die Anzahl der transformierbaren Bakterien, bestimmt. Die Transformationskompetenz betrug durchschnittlich $2,5 \times 10^6$ Kolonien je µg Test-DNA.

4.5.10 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Vorbereitung der Transformation wurden die Zellsuspensionen auf Eis aufgetaut. 100-µl der kompetenten Zellen wurden mit 5 µl eines Ligationsansatzes bzw. 50 µl der Zellen mit 10 ng Plasmid vorsichtig durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Erhitzung des Ansatzes auf 42 °C für 45 s im Wasserbad und eine weitere Inkubation

für 2 min auf Eis. Dann wurde der Ansatz mit 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C mit etwa 250 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Je 250 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer antibiotikumhaltigen Agarplatte (meist 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur diejenigen Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, konnten auf der Agarplatten wachsen und bildeten Kolonien aus.

Bei einigen der Transformationen wurde zusätzlich zur Antibiotikumresistenz die sogenannte Blau-Weiß-Selektion angewandt, die auf einer Unterbrechung des lacZ-Gens beruht. Der verwendete Bakterienstamm XL1-blue enthält auf seinem Chromosom die sogenannte M15 Deletion des lac-Operons (LacZΔM15), wodurch nur ein inaktives C-terminales Polypeptid (ω -Fragment) der β -Galaktosidase exprimiert wird. Beim Einbringen eines Plasmides (z.B. pUC-18, pBluescript SK II) in diesen Bakterienstamm, das für ein N-terminales Polypeptid (α -Fragment) der β -Galaktosidase kodiert, bilden die für sich inaktiven Polypeptidketten Aggregate aus, die enzymatische Aktivität besitzen. Dadurch wird das als Indikator eingesetzte synthetische Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid) zu Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-3-indol gespalten, der die Kolonien blau anfärbt. Da die Klonierungsstellen der oben aufgeführten Plasmide innerhalb der N-terminalen lacZ-Region liegen, wird bei der Klonierung eines DNA-Fragmentes das Leseraster für das α -Fragment zerstört und es kann keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr gebildet werden. Dadurch bleiben die Kolonien, die einen mit Insert rekombinierten Vektor aufgenommen haben, in der Gegenwart von X-Gal weiß. Zur Durchführung dieser Selektion wurden den Agarplatten 300 µg/ml X-Gal-Lösung und 40 µg/ml IPTG-Lösung zugesetzt. Das IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid), das selbst durch die β -Galaktosidase nicht gespalten wird, ist notwendig zur Induktion der Transkription des ω -Fragmentes in den verwendeten XL1-blue Wirtsbakterien.

4.6 Southern-Blot

4.6.1 Transfer von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen

Um DNA-Fragmente spezifisch durch Hybridisierung mit radioaktiven Sonden nachweisen zu können, wurden sie nach ihrer Auftrennung in Agarosegelen auf Nylonmembranen übertragen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe von einseitig gerichteten Kapillarkräften.

Vor dem Blotten wurde das Gel für 15 min in 0,25 M HCl-Lösung gelegt, um die DNA partiell zu depurinieren und somit die Transfereffizienz von Fragmenten mit einer Länge von mehr als 10 kb zu erhöhen. Danach wurde das Gel für 30 min in etwa das 3fache Gel-Volumen 0,4 N NaOH-Lösung gelegt, um die DNA zu denaturieren.

Die verwendete Nylonmembran (GeneScreen Plus; NEN) wurde ebenfalls vorbehandelt. Zuerst wurde sie mit bidestilliertem Wasser benetzt und dann in 0,4 N NaOH-Lösung 15-min äquilibriert.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf einem Papiertücherstapel wurde mit 0,4 N NaOH getränktes Filterpapier (3 MM Chromatographie-Papier, Whatmann) darauf die Membran und dann das Gel mit den Geltaschen nach unten gelegt. Das Filterpapier und die Membran waren so zurechtgeschnitten, dass sie eine größere Fläche als das Gel aufwiesen. Auf das Gel wurden vier mit 0,4 N NaOH getränkte Lagen Filterpapierstreifen gelegt, die die Breite des Gels aufweisen und lang genug waren, um mit einem Ende in ein daneben stehendes Vorratsgefäß mit 0,4 N NaOH eingetaucht zu werden. Für einen gleichmäßigen Andruck wurde oben auf den Stapel ein Gewicht gelegt. Bei dem Aufbau wurde daraufgeachtet, dass keine Luftblasen zwischen den jeweiligen Schichten des Stapels eingeschlossen blieben, die zur Unterbrechung der Strömung der Transferlösung (0,4 N NaOH) hätten führen können.

Während des Blottens saugten die trockenen Papiertücher die Transferlösung nach unten, die, das Gel durchströmend, die DNA-Fragmente nach unten transportierte, wo sie dann auf der darunter liegenden Nylonmembran haften blieben. Die DNA-Fragmente wurden aufgrund des alkalischen Transfers kovalent an die positiv geladenen Gruppen der verwendeten Nylonmembran gebunden.

Der Transfer von genomischer DNA dauerte etwa fünf Stunden; der für Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurde nach zwei Stunden abgeschlossen. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2facher SSC-Lösung, pH 7,2, geschwenkt und an der Luft getrocknet oder mit der Hybridisierung fortgefahren.

4.6.2 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der „random priming“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983). Diese Methode ermöglicht die Synthese von DNA-Sonden mit hohen spezifischen Aktivitäten (5×10^8 - 4×10^9 cpm/ μ g DNA). Dazu wird die doppelsträngige Template-DNA denaturiert und mit zufälligen Hexanukleotiden („random primers“) hybridisiert, die dann als Primer für eine DNA-Polymerase I dienen.

100 ng der Template-DNA wurden nach Denaturierung im kochenden Wasserbad in einem Reaktionsansatz von 30 μ l mit je 20 μ M dCTP, dGTP, dTTP und 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 M Hepes, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 6 OD₂₆₀/ml Hexanukleotiden, 100 μ Ci [α -³²P] dATP (6000 Ci/mmol) und 5 U Klenow-Polymerase (langes Fragment) 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,5, 2 μ l Heringsspermien-DNA (10 mg/ml), 63 μ l H₂O, 50 μ l 7,5 M Ammoniumacetat, pH 7,2 und 250 μ l Ethanol abgestoppt.

Die Präzipitation der fertigen DNA-Sonde erfolgte nach Inkubation für 30 min auf Eis und Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 50 μ l Wasser aufgenommen, 10 min hitzedenaturiert, dann auf Eis abgekühlt und sofort in die Hybridisierung eingesetzt.

4.6.3 Überprüfung der radioaktiven Markierung

Um zu überprüfen, ob die Markierung der DNA erfolgreich verlaufen war, wurde das Ausmaß des Einbaus des radioaktiv markierten Nukleotides bestimmt. Hierfür wurde aus 2 µl des 1:100 verdünnten Reaktionsansatzes die markierte DNA durch Zugabe von 50 µl BSA (10 mg/ml) und 950 µl eiskalter, 10 %iger (w/v) Trichloressigsäure präzipitiert. Nach Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, RT) wurden Überstand (freie nicht eingebaute radioaktiv markierte Nukleotide) und Präzipitat (radioaktiv markierte DNA) getrennt. Die Zerfallsraten des ^{32}P wurden durch Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Zerfallsrate im Präzipitat mit der Summe der Zerfallsraten in Präzipitat und Überstand. Bei einem Einbau von mehr als 60 % radioaktiver Nukleotide wurde mit der DNA-Sonde weitergearbeitet.

4.6.4 Hybridisierung

Die Nylonmembran mit der gebundenen DNA wurde in einer Glasröhre mit der DNA-Seite nach innen zeigend zunächst mit 2facher SSC-Lösung, pH 7,2, 30 min bei 68 °C in einem Hybridisierungssofen gewaschen. Um verbleibende freie Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran anschließend weiter bei 68 °C für ca. 1-2 h prähybridisiert. Die Prähybridisierung erfolgte mit mindestens 0,5 ml pro cm² Membran Church-Puffer (7 % SDS, 0,5 M Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 1 % BSA). Die anschließende Hybridisierung erfolgte 16 h bei 68 °C durch Zugabe der denaturierten Sonde in 5 ml Church-Puffer. Im Anschluss wurde die Membran in einer Schale mit 2facher SSC pH 7,2, 0,2 % SDS, bei Raumtemperatur gewaschen. Ein zweiter Waschschrift erfolgte bei 65 °C mit der gleichen Waschlösung für 5-15 min. Der Waschvorgang wurde beendet, wenn die Gesamtstrahlung des Blots unter einen mit einem Handmonitor (Modell LB 122; Berthold) gemessenen Wert von etwa 80 Impulse/s pro 100 cm² Membranfläche fiel. Danach wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und zur Detektion der radioaktiven Signale auf einem Röntgenfilm oder auf einer speziell beschichteten Phosphorimager-Platte exponiert.

4.6.5 Hybridisierung von Bakterienkolonien

Bei der Koloniehybridisierung lässt man die Kolonien auf einer Membran wachsen, bevor man sie mit einer markierten DNA-Sonde hybridisiert.

Bakterienkolonien, die auf einer Agarplatte gewachsen waren, wurden gepickt und nacheinander zuerst auf einem runden Nitrocellulosefilter auf einer Agarplatte und dann auf einer weiteren Agarplatte ausgestrichen.

Durch eine Rastermarkierung auf dem Filter und eine ebensolche auf dem Boden der zweiten Agarplatte bekam jede Kolonie eine festgelegte Position. Beide Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Agarplatte mit den Bakterienkolonien bei 4 °C aufbewahrt und der Nitrocellulosefilter mit den darauf ge-

wachsenen Kolonien wurde wie folgend behandelt: Zuerst wurde er 2 Minuten in eine Denaturierungslösung (0,4 N NaOH, 1,5 M NaCl) gelegt, wodurch die Zellen aufgebrochen wurden und die DNA denaturiert wurde. Danach wurde der Filter auf eine Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4) für eine Minute gelegt. Nach der Neutralisierung wurde der Filter mit 2facher SSC-Lösung gewaschen und dann zwischen zwei Bögen von trockenem Whatman-3 MM-Filterpapier gelegt und 2 Stunden bei 80 °C getrocknet, wodurch die DNA semipermanent und nicht-kovalent auf den Nitrocellulosefilter gebunden wird. Nach der Durchführung der Hybridisierung wurde der Filter in Frischhaltefolie eingewickelt und auf einem Röntgenfilm exponiert. Nach der Entwicklung des Filmes wurden die Signale dem Filter zugeordnet, danach konnten anhand des Rastermusters die positiven Kolonien eindeutig identifiziert werden. Die entsprechenden Kolonien wurden aus der zweiten Agarplatten gepickt und zum Animpfen von 3 ml LB-Medium verwendet.

4.6.6 Nachweis der markierten DNA

Radioaktiv markierte DNA auf Nylonmembranen oder Nitrocellulosefilter wurde durch Exposition auf Röntgenfilmen oder speziell beschichteten Phosphorimager-Platten nachgewiesen.

Zur Autoradiographie wurden BioMax MS Filme und BioMax MS Verstärkerfolien von Kodak verwendet. Die Exposition erfolgte in Röntgenkassetten bei -70 °C, um die Stabilität der durch die ionisierende Strahlung aktivierten Silberbromidkristalle zu erhöhen. Bei der Entwicklung wurden dann die aktivierten Kristalle zur schwarzen Silberkörner reduziert, wodurch die mit der Sonde interagierten DNA-Banden sichtbar wurden. Die Expositionszeit variierte in Abhängigkeit von der zu erwartenden Signalstärke. So wurde ein Blot mit Plasmid-DNA eine Stunde lang exponiert, während die Exposition von genomischer DNA 1 bis 2 Tagen dauerte.

Dagegen lieferte bei der Verwendung einer Phosphorimager-Platte auch ein Blot mit genomischer DNA schon nach 4 Stunden Expositionszeit deutlich erkennbare Signale. Dazu wurde nach der Exposition die verwendete Platte (BAS-MS, FUJI) im Phosphorimager (Fujix BAS 1000) mittels Laserlicht ausgelesen und die Daten mit dem Programm TINA ausgewertet.

4.7 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.7.1 „Verschachtelte“ (nested) PCR

Zum Nachweis einer erzielten genomischen Modifikation wurde aufgrund der geringen Template-Mengen die „verschachtelte“ (nested) PCR angewendet. Dabei wird mit einem ersten ausgewählten Primerpaar eine PCR durchgeführt, deren Produkt als Template in einer zweiten PCR mit anderen Primern eingesetzt wird. Das in der zweiten PCR

verwendete Primerpaar wird so ausgewählt, dass es innerhalb des DNA-Abschnitts hybridisiert, der von dem ersten Primerpaar amplifiziert wird. Unspezifische Amplifikationsprodukte, die in der ersten PCR-Reaktion entstanden sind, stehen somit der zweiten PCR-Reaktion nicht mehr als Matrize zur Verfügung. Dieses Vorgehen steigert die Empfindlichkeit und Selektivität der DNA-Vervielfältigung erheblich und erlaubt den Nachweis extrem geringer Template-Mengen.

Für jedes eingesetztes Primerpaar wurde mit Hilfe eines Thermocyclers mit Temperaturgradient (Eppendorf) die optimale Annealing-Temperatur und Mg^{2+} -Ionen Konzentration bestimmt. Eine typische PCR wurde in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt und enthielt 1 μ l Template-DNA (ca. 200 ng genomische DNA), je 500 nM der Primer, je 200 μ M der Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 U Taq-Polymerase (Invitrogen), den von der Herstellerfirma des Enzyms mitgelieferten Puffer in 1facher Konzentration und 1,5 mM oder 2,5 mM $MgCl_2$. Anschließend wurde die PCR in einem Thermocycler nach einem initialen Denaturierungsschritt der doppelsträngigen Template-DNA (3 min bei 94 °C) bei folgendem Temperaturverlauf durchgeführt: **Schritt 1** Denaturierung: 94 °C / 30 s. **Schritt 2** Anlagerung der Primer: ermittelte Annealing-Temperatur (T_a) / 45 s. **Schritt 3** Verlängerung der Primer: 72 °C / 1-4 min je nach Länge des erwarteten Produktes. Diese drei Schritte wurden in der ersten PCR 25-mal und in der anschließenden zweiten PCR 30-mal wiederholt. In der letzten Runde wurde die Zeit für den Polymerisationsschritt auf 7 min verlängert, damit alle Stränge vollständig synthetisiert werden. In der zweiten PCR wurde als Template 1 μ l einer 1:50 Verdünnung der erfolgten ersten Amplifikation eingesetzt.

Bei allen Amplifikationen wurde eine Negativkontrolle in Form eines PCR-Ansatzes ohne Template-DNA mit angesetzt, um mögliche Kontaminationen nachweisen zu können.

4.7.2 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Sequenzierungen von DNA-Fragmenten wurden durchgeführt, um die Identität von subklonierten DNA-Fragmenten zu verifizieren sowie um Exon/Intron-Grenzen auf genomischen DNA-Fragmenten zu identifizieren.

Bei der Sequenzier-PCR entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Fragmente, die eine Verlängerung eines verwendeten Primers sind und sich in ihrer Länge nur in einem Nukleotid unterscheiden. Bei dem Endnukleotid von jedem DNA-Fragment handelt es sich um ein Didesoxynukleotid (ddNTP), dessen Einbau zufällig geschieht und zum Kettenabbruch führt. Da die vier ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können nach der Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese die endständigen Basen detektiert werden und somit die Nukleotidabfolge der zu sequenzierenden DNA ermittelt werden.

Ein Sequenzier-Reaktionsansatz (20 µl) enthielt 600 ng Plasmid-DNA, 8 pmol eines ausgewählten Primers und 4 µl einer vorgefertigten Reagenzien-Mischung (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) aus dNTPs (Desoxynukleotiden), ddNTPs (Didesoxynukleotiden) und der DNA-Polymerase. Die Sequenzier-PCR-Reaktionen wurden bei folgendem Temperaturverlauf durchgeführt: **Schritt 1** Denaturierung: 96 °C/ 30 s. **Schritt 2** Anlagerung der Primer: 52 °C/15 s. **Schritt 3** Verlängerung der Primer: 60 °C/4 min. Der Temperaturverlauf wurde insgesamt 25-mal wiederholt. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgte mit dem Sequenzier-Gerät ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

4.7.3 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die cDNA-Synthese erfolgte aus 2 µg Gesamt-RNA mit 250 ng zufälligen Hexanukleotiden („random hexamere“) als Primer und 50 U des Enzyms reverse Transkriptase SuperScript II RT (Invitrogen). Vor der Durchführung jeder Reaktion wurde die Qualität der RNA-Präparation (frisch hergestellt oder bei –80 °C gelagert) mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft (siehe 4.5.2.2). Anschließend wurde die umzuschreibende Gesamt-RNA (2 µg) mit 1 U des Enzyms DNase I (DNase I Amplification Grade, Invitrogen) in einem Gesamtvolumen von 10 µl behandelt (15 min, RT), um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen. Nach Inaktivierung der DNase I durch Zugabe von 1 µl 10 mM EDTA und 15-minütiger Inkubation bei 65 °C wurde die RNA umgeschrieben. Dazu wurde dem Reaktionsansatz zuerst ein Gemisch (6 µl) aus zufälligen Hexanukleotiden (250 ng) und dNTPs (je 10 nmol von dATP, dTTP, dGTP und dCTP) zugefügt, und 5 min lang bei 65 °C erwärmt, um Sekundärstrukturen der RNA und der zugesetzten Oligonukleotide aufzulösen. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes wurden 13 µl einer Mischung aus MgCl₂ (11,5 mM), DTT (23 mM) und Ribonuklease-Inhibitor (40 U RNaseOUT Recombinant Ribonuklease Inhibitor, Invitrogen) in dem benötigten Puffersystem (115 mM KCl, 46 mM Tris-HCl, pH 8,4) hinzugefügt. Nach 2-minütiger Erwärmung auf 25 °C folgte die Zugabe von 50 U der SuperScript II reversen Transkriptase (Invitrogen). Die Reaktion wurde weiter 10 min bei 25 °C gehalten, um die Anlagerung der Primer an die RNA-Sequenzen zu gestatten. Dann wurde das Reaktionsgemisch 50 min bei 42 °C inkubiert, wobei die cDNA-Synthese, also die Verlängerung der Primer durch die reverse Transkriptase erfolgte. Anschließend wurde das Enzym 15 min lang bei 70 °C hitzeinaktiviert.

Am Ende der Reaktion liegt die synthetisierte cDNA als Hybridmolekül mit der Matrix-RNA vor. Da die Sensitivität nachfolgender PCR-Reaktionen aufgrund der Stabilität dieser Heteroduplex beeinflusst werden kann, war eine abschließende Behandlung mit RNase H zur Freilegung der einzelsträngigen cDNA erforderlich. Dazu wurde das Reaktionsgemisch 20 min bei 37 °C mit 1 µl E. coli RNase H (2 U/µl) behandelt.

Jede cDNA-Präparation wurde auf 40 µl Endvolumen eingestellt und bei -20 °C aufbewahrt.

Bei bestimmten cDNA-Präparationen wurde die Qualität der cDNA in konventionellen PCR-Reaktionen geprüft. Das betraf insbesondere cDNA-Präparationen aus Geweben wie dem Hippocampus bzw. Nervus opticus, bei denen die zum Umschreiben eingesetzte Gesamt-RNA-Menge nicht vorher photometrisch bestimmt werden konnte.

4.7.4 Real-time quantitative PCR

Die real-time quantitative PCR ist eine aktuelle Weiterentwicklung der PCR. Hierbei wird fortlaufend während der PCR-Reaktion die Menge des gebildeten PCR-Produktes gemessen. Es gibt verschiedene Messprinzipien, die alle auf der Erfassung eines Fluoreszenzsignals basieren, dessen Intensität proportional zur gebildeten DNA-Menge ist. Zur Generierung des Fluoreszenzsignals wurde in folgendem experimentellen Ansatz der Farbstoff SYBR Green I verwendet. SYBR Green I ist ein Cyaninfluoreszenzfarbstoff, der in die sogenannte „kleine Furche“ von doppelsträngiger DNA interkaliert. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches erhöht. Mit dem Gerät GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) wurde diese emittierte Fluoreszenz nach jedem Amplifikationszyklus über eine CCD-Kamera aufgezeichnet. Am Ende der Reaktion wurde mittels der angeschlossenen Software (5700 SDS) derjenige Amplifikationszyklus ermittelt, bei dem sich das gemessene Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Diese Zykluszahl, an der die PCR-Reaktion in den gemessenen Proben die exponentielle Phase erreicht, wird als C_T -Wert bezeichnet und dient der Quantifizierung der Ausgangskopien der zu bestimmenden DNA (Abb. 3). Je weniger Template-Moleküle zu Beginn der Reaktion in einer Probe enthalten sind, desto mehr Amplifikationszyklen sind notwendig, bevor ein spezifisches Fluoreszenzsignal messbar ist, und dementsprechend ergeben sich höhere C_T -Werte. Die Differenz der C_T -Werte (ΔC_T) erlaubt die relative Quantifizierung von Template-Konzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die real-time quantitative PCR angewandt, um einerseits die relativen cDNA-Menge der α_1 -, α_2 -, und β_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in verschiedenen Geweben der Maus zu quantifizieren, andererseits um das Vorkommen von cDNA der β_2 -Untereinheit zu untersuchen. Zur Normierung der cDNA-Proben wurde die cDNA der GAPDH mitbestimmt (siehe 4.7.4.2).

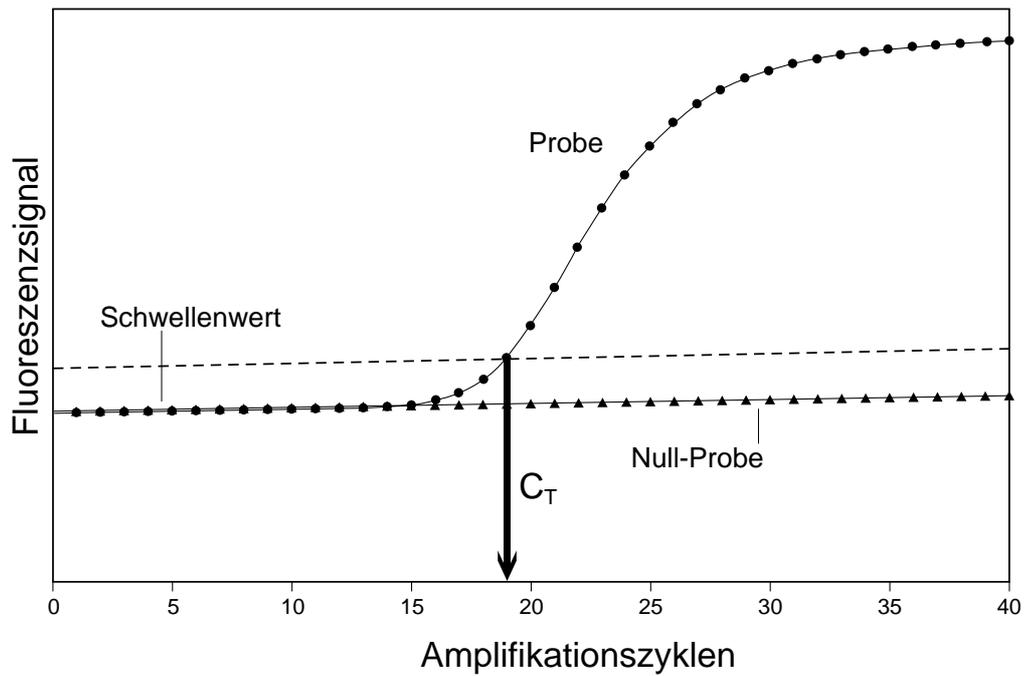


Abb. 3: Ermittlung des C_T -Wertes bei der real-time PCR

Graphisch dargestellt ist das gemessene Fluoreszenzsignal während einer real-time PCR-Reaktion und der ermittelte C_T -Wert, der zur Quantifizierung der Template-Moleküle in der gemessenen Probe herangezogen wird. Bei dem C_T -Wert (threshold cycle) handelt es sich, um den Amplifikationszyklus, bei dem sich das gemessene Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hindergrundstrahlung (Null-Probe) abhebt.

4.7.4.1 Primer zur Durchführung der real-time quantitativen PCR

Die in der real-time quantitativen PCR eingesetzten Primerpaare wurden unter Verwendung des Primer Express™ Programms (Applied Biosystems) ausgesucht. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie Produkte von 100 bp Länge amplifizieren. Die Primer-Sequenzen für die α_1 -, α_2 -, β_1 -, und β_2 -cDNA liegen über Exon/Intron-Grenzen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuelle Kontamination der cDNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen.

Die ausgesuchten Primerpaare wurden zuerst in konventionellen PCR-Reaktionen mit cDNA als Template hinsichtlich ihrer Spezifität zur Ziel-cDNA geprüft. Die Spezifität der Primerpaare war gewährleistet, wenn auf 2 %igen Agarosegelen nur die zu erwartende 100 bp Bande sichtbar war. Die Durchführung der real-time quantitativen PCR unter Verwendung des SYBR Green I Messprinzips wäre ohne spezifische Primer nicht möglich. Da der Farbstoff an allen doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet, verursachen auch Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, einen Fluoreszenzanstieg, der nicht von dem des spezifischen Produktes unterscheidbar ist.

Um das relative Vorkommen drei unterschiedlicher Ziel-cDNA Moleküle (cDNA der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit) in verschiedenen Geweben-Präparationen zu bestimmen, sollte gewährleistet sein, dass die jeweilige Kombinationen von Primerpaar und Ziel-Sequenz die gleiche Sensitivität aufweisen. Das wurde mit Hilfe von Plasmiden getestet, in denen die Ziel-Sequenz des jeweiligen Primerpaares subkloniert war. Die Menge jedes der drei Plasmide wurde photometrisch bestimmt und ein äquimolares Gemisch hergestellt. Eine Verdünnungsreihe dieses Gemisches wurde als Template in der real-time quantitativen PCR eingesetzt und gemessen. Es wurde überprüft, dass der C_T -Wert jeder Primerpaar/Template Kombination bei einer gegebenen Verdünnung annähernd gleich war.

Weiter wurde die optimale Primer-Konzentration bestimmt. Für jedes der drei Primerpaare wurden Kombinationen des Sense- und Antisense-Oligonukleotids in den Konzentrationen 125 nM, 300 nM und 600 nM hergestellt, in die real-time PCR eingesetzt und gemessen. Als optimale Primer-Konzentration wurde diejenige ausgewählt, bei der es zu geringer Bildung von Primer-Dimeren kam, während vergleichsweise niedrige C_T -Werte und ein hohes Fluoreszenzsignal erreicht wurden. Die Primer-Sequenzen und ihre Positionen auf der entsprechenden cDNAs sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Ausgewählte Primer zur Durchführung der real-time quantitativen PCR

Datenbank			Produkt		
Zugangs-Nr.	Gene	Primer-Sequenzen	Länge	Position	T _m
NM_008084.1	GAPDH	5' -ACC ATC TTC CAG GAG CGA GAC-3' 5' -GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA-3'	101 bp	263-363	82 °C
AF297082	α_1	5' -CGG AAA ATC AAT GTC AGC CC-3' 5' -AGG GAA GTT TGG TGG AAG CTC-3'	102 bp	2125-2226	80 °C
AF109963*	α_2	5' -ACT GCT AAT GTA CTC GGA CTG CAG-3' 5' -CAG CTC GAA GGA CTC TTT CAT TCT-3'	103 bp	886-988	75 °C
AF297083	β_1	5' -GCG GTA CTC TTG CCT GGA AG-3' 5' -GAC CAT AAT TGC GGA TCA CCA-3'	104 bp	63-166	84 °C
AF038500	β_2	5' -TTA AGC ATC CCT GTT TGC C-3' 5' -ACA GGC TGG AAG GTG TCC C-3'	101bp	158-258	82 °C

*Da die cDNA-Sequenz der Maus- α_2 -Untereinheit nicht publiziert ist, wurden für die α_2 -Primer die entsprechenden Positionen der publizierten cDNA-Sequenz der Ratte angegeben. Dadurch ist ein Vergleich mit den Primer-Positionen der anderen Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten möglich.

4.7.4.2 Gesamt-cDNA als Template in der real-time quantitativen PCR

Die bei der reversen Transkription hergestellte Gesamt-cDNA verschiedener Gewebe sollte als Template in die real-time quantitative PCR eingesetzt werden. Allerdings kann die Menge der Gesamt-cDNA nicht quantifiziert werden und auch die cDNA-Synthese ist nicht so reproduzierbar, als dass sie als konstant angesehen werden kann. Um die Messwerte (C_T -Werte) für jede Ziel-cDNA unterschiedlicher cDNA-Präparationen zu vergleichen, war es erforderlich, die cDNA-Präparationen zu normieren. Darum wurde bei jedem Messvorgang parallel zu den untersuchten Genen auch das GAPDH-Gen gemessen. Das GAPDH-Gen (Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) ist ein sogenanntes Haushaltsgen, das vergleichsweise konstant in allen Geweben exprimiert und häufig als Standard zur Quantifizierung von mRNA bzw. cDNA verwendet wird.

Die als Template einzusetzende Gesamt-cDNA enthält neben der cDNA selbst noch weitere Bestandteile der vorangegangenen RT-PCR (siehe 4.7.3), die einen inhibitorischen Einfluss auf die anschließende PCR-Reaktion ausüben können. Deshalb wurde in Vor-experimenten der Anteil einer cDNA-Präparation bestimmt, mit dem als Template die Messungen durchgeführt wurden. Es wurde ermittelt, dass 1 μ l von der 40 μ l der cDNA-Präparation als Template in 20 μ l Reaktionsvolumen der real-time PCR einzusetzen war.

4.7.4.3 Durchführung der real-time quantitativen PCR

Bei einem Messvorgang wurden in der untersuchten cDNA-Probe parallel die cDNA für die GAPDH und die α_1 -, α_2 -, und β_1 -Untereinheiten gemessen. Jede cDNA-Probe wurde in drei Verdünnungen (1:1, 1:4 und 1:16) gemessen. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. Parallel wurden Negativkontrollen mit jedem Primerpaar ohne Template-Zugabe mitgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 20 μ l wurde 1 μ l einer Verdünnung der Gesamt-cDNA als Template mit einem spezifischen Primerpaar (für die α_1 -, α_2 - β_1 -, oder GAPDH-cDNA) amplifiziert. Die Primer für die α_1 - und β_1 -cDNA wurden in der Konzentration von 300 nM und die für die α_2 - und GAPDH-cDNA in der Konzentration von 125 nM eingesetzt. Dann wurde dem Reaktionsgemisch eine der beiden kommerziell erhältlichen Reagenzien-Mischungen SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) oder QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) zugefügt. Darin waren die Fluoreszenzfarbstoffe (SYBR Green I und ROX), dNTPs, $MgCl_2$ und die DNA-Polymerase enthalten. Die real-time quantitativen PCR-Reaktionen wurden mit folgendem Temperaturverlauf durchgeführt: **1.** 95 °C / 15 min, **2.** 95 °C / 15 s, **3.** 60 °C / 30 s, **4.** 72 °C / 30 s. Die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 40-mal wiederholt.

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurde die Spezifität der PCR-Produkte mittels einer Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Bei dieser wurden die PCR-Produkte kontinuierlich von 60 °C bis 95 °C aufgeheizt (0,03 °C /s), bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur

noch einzelsträngig vorlagen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wurde aufgezeichnet (Abb. 4).

In getrennten Messvorgängen, jedoch mit der gleichen Vorgehensweise, wurde das Vorkommen der β_2 -cDNA untersucht.

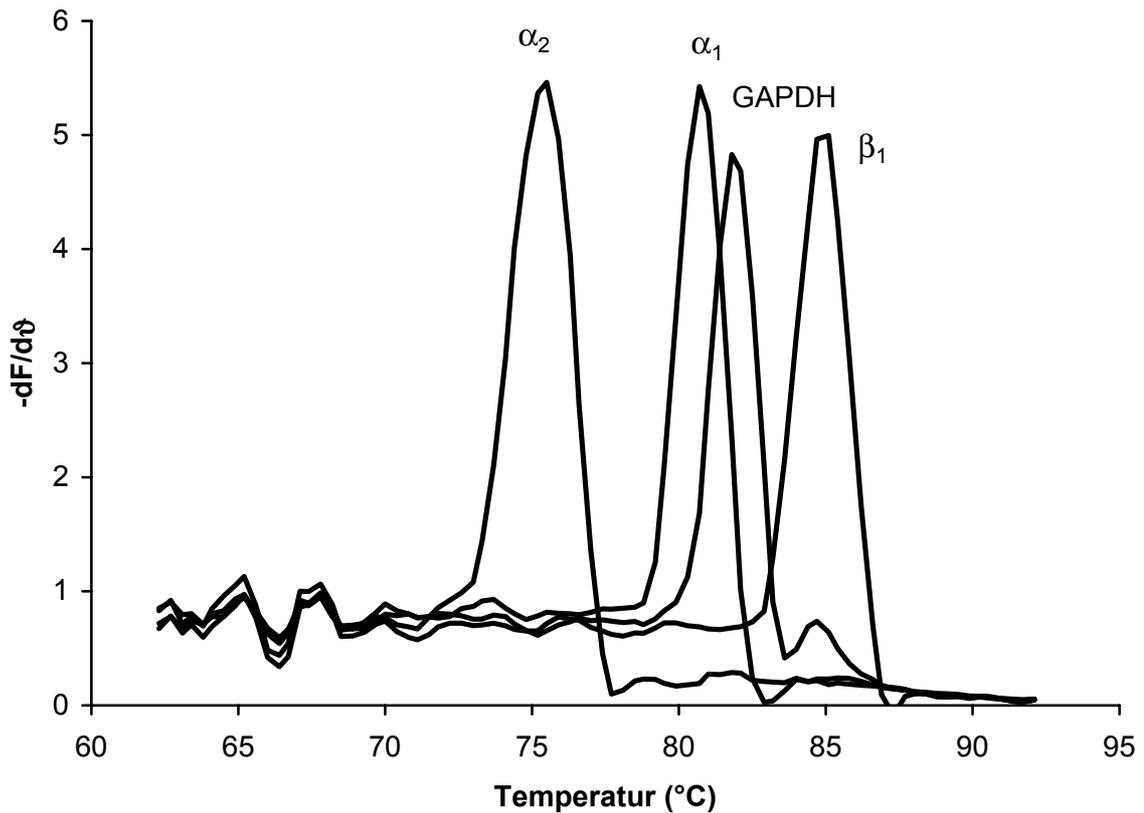


Abb. 4: Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an jedem Messvorgang (siehe 4.7.4.3) wurde in jeder Probe die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte mittels einer Schmelzkurvenanalyse untersucht. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen ist eine Unterscheidung zwischen spezifischen PCR-Produkten und Nebenprodukten bzw. Primer-Dimeren möglich.

Abgebildet sind die Schmelzkurven der spezifischen α_1 -, α_2 -, β_1 - und GAPDH-PCR-Produkte.

(Schmelzpunkte der PCR-Produkte: α_1 : 80 °C, α_2 : 75 °C, β_1 : 84 °C, GAPDH: 82 °C)

4.7.4.4. Auswertung der real-time quantitativen PCR

Zur Berechnung der relativen Mengen der gemessenen cDNA-Spezies in den verschiedenen Geweben wurde die komparative $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Applied Biosystems User Bulletin #2) verwendet. Dabei wurden zuerst die Differenzen (ΔC_T) zwischen den C_T -Werten (Mittelwerte von Triplikaten) für die α_1 -, α_2 -, β_1 -, oder β_2 -cDNA und den entsprechenden C_T -Werten für die GAPDH-cDNA (Mittelwerte von Duplikaten) gebildet:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Ziel-cDNA}) - C_T (\text{GAPDH})$$

Jede cDNA-Probe wurde in drei Verdünnungen gemessen und jedes zu untersuchenden Gewebe war mit mindestens zwei cDNA-Proben aus verschiedenen Mäusen in den Messergebnissen repräsentiert. Aus allen ΔC_T -Werten wurden Mittelwerte ($\overline{\Delta C_T}$) für jedes Gewebe berechnet. In der Tabelle 2 sind diese Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen aufgelistet.

Um die $\overline{\Delta C_T}$ -Werte untereinander vergleichen zu können, wurde der $\overline{\Delta C_T}$ -Wert für die β_1 -cDNA im Gehirn (3,94 siehe Tabelle 2) als Referenz-Wert ausgewählt und von allen $\overline{\Delta C_T}$ -Werte zur Bildung der sogenannten $\Delta\Delta C_T$ -Werte abgezogen. Beispielsweise:

$$\Delta\Delta C_T = \overline{\Delta C_T} (\alpha_1\text{-cDNA Lunge}) - 3,94 (\beta_1\text{-cDNA Gehirn})$$

Die Menge der zu untersuchenden cDNAs für die Untereinheiten der Guanylyl-Cyclase, normiert bezüglich der Menge an GAPDH, wurde dann relativ zu der Menge eines Kalibrators (Vorkommen der β_1 im Gehirn) mit dem nachstehenden Term berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Der Verwendung dieses Terms liegt die Annahme zugrunde, dass die Effizienz der PCR-Reaktionen 100 % beträgt. Das bedeutet, dass bei jedem Amplifikationszyklus eine Verdoppelung der Anzahl der Ausgangsmoleküle stattfindet.

Indem jede cDNA-Probe in drei Verdünnungen (1:1, 1:4, und 1:16) gemessen wurde, war es möglich anhand der Differenzen der ermittelten C_T -Werte über die drei Verdünnungsstufen die Effizienz jeder PCR-Reaktion zu kontrollieren. Nur Messungen aus PCR-Reaktionen mit vergleichbarer Effizienz wurden für die Auswertung verwendet.

Tab. 2: Die errechneten $\overline{\Delta C_T}$ -Werte, die zur relativen Quantifizierung der Ziel-cDNAs verwendet wurden*

Gewebe	α_2	α_1	β_1	β_2
Gehirn	5,17 ±0,42	5,17 ±0,30	3,94 ±0,23	14,59 ±1,34
Lunge	5,12 ±0,55	2,35 ±0,46	2,34 ±0,55	13,88 ±3,01
Aorta	8,32 ±1,08	5,71 ±1,14	5,37 ±1,02	15,63 ±2,88
Colon	8,73 ±1,22	6,11 ±0,98	5,85 ±0,55	nicht gemessen
Plazenta	9,12 ±0,52	6,25 ±0,15	6,30 ±0,15	10,56 ±0,18
Herz	8,46 ±0,44	6,78 ±0,47	6,46 ±0,57	15,21 ±3,28
Ileum	9,86 ±0,38	7,80 ±0,41	6,49 ±0,50	nicht gemessen
Milz	5,96 ±1,07	4,19 ±0,35	4,89 ±0,52	13,30 ±1,99
Hoden	7,65 ±0,70	4,41 ±1,13	6,10 ±1,36	8,77 ±0,50
Uterus	6,72 ±1,35	5,01 ±0,83	5,22 ±0,72	15,04 ±1,39
Niere	7,30 ±0,37	5,68 ±0,59	6,52 ±0,48	15,40 ±0,98
Leber	8,50 ±1,23	7,66 ±0,85	7,61 ±0,50	nicht gemessen
Skelettmuskel	10,72 ±0,68	9,78 ±0,67	9,83 ±0,58	nicht gemessen
Cortex	4,77 ±0,22	4,98 ±0,17	4,05 ±0,14	
Cerebellum	5,22 ±0,33	6,10 ±0,23	4,64 ±0,18	
Bulbus olfactorius	4,84 ±0,20	4,78 ±0,24	3,28 ±0,11	
Medulla oblongata	4,35 ±0,56	5,09 ±0,38	4,35 ±0,53	
Hippokampus	4,64 ±0,26	6,53 ±0,46	4,15 ±0,41	
Nervus opticus	5,71 ±0,76	5,37 ±0,10	4,99 ±0,64	

* die $\overline{\Delta C_T}$ -Werte sind die Differenzen der gemessenen Amplifikationszyklen (C_T -Werte) zwischen der zu untersuchenden cDNAs und der zur Normierung verwendeten GAPDH-cDNA.

5 Ergebnisse

5.1 Generierung von ES-Zelllinien, in denen die Gene für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase modifiziert sind

5.1.1 Vorbemerkungen

Das technische Verfahren zur Generierung von Knock-out-Mäusen basiert auf der erfolgreichen Etablierung der in vitro-Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus Anfang der achtziger Jahre (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Maus-ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste von Embryonen im Alter von 3,5 Tagen nach dem Koitus isoliert. Daraus werden dann permanente Zelllinien hergestellt, die, wie andere Zelllinien, einer Reihe von Manipulationen, wie z.B. Transfektion mit DNA-Konstrukten und darauf folgender Selektion, unterworfen werden können. Auf diese Weise ist es möglich, eine ausgewählte Stelle innerhalb des Mausgenoms zielgerichtet zu verändern.

Um die zu erzielende Veränderung in den ES-Zellen vornehmen zu können, wird ein Transfervektor (sogenannter targeting-Vektor) benötigt. Zusätzlich zu geeigneten Selektionsmarkern enthält dieser möglichst lange DNA-Fragmente, die homolog zu der chromosomalen Zielsequenz sind. Die zu erzielende Veränderung wird in die klonierte homologe Gensequenz eingeführt und kann nach dem Transfer des targeting-Vektors in die ES-Zellen mittels homologer Rekombination anstelle der endogenen Gensequenz in das Wirtsgenom eingebaut werden. Dieses Verfahren ist allgemein bekannt unter der Bezeichnung 'gene targeting'.

Mit dem Ziel das Gen für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase konditionell inaktivieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das 'gene targeting' verwendet, um sogenannte loxP-Sequenzen beidseitig eines ausgewählten Exons des α_1 - bzw. α_2 -Gens in das Genom von ES-Zellen einzufügen.

Bei den loxP-Sequenzen handelt es sich um die 34 bp langen Erkennungssequenzen des Enzyms Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 (Abb. 5A). Das 38 kDa große Enzym Cre-Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen.

Besitzen beide loxP-Sequenzen die gleiche Orientierung und befinden sich auf dem selben Chromosom kommt es dadurch zur Entfernung der dazwischen liegenden chromosomalen Sequenz (Abb. 5B). Handelt es sich dabei um ein Exon, wird die Bildung des betreffenden Proteins unterbunden oder es resultiert der Funktionsverlust des gebildeten Proteins.

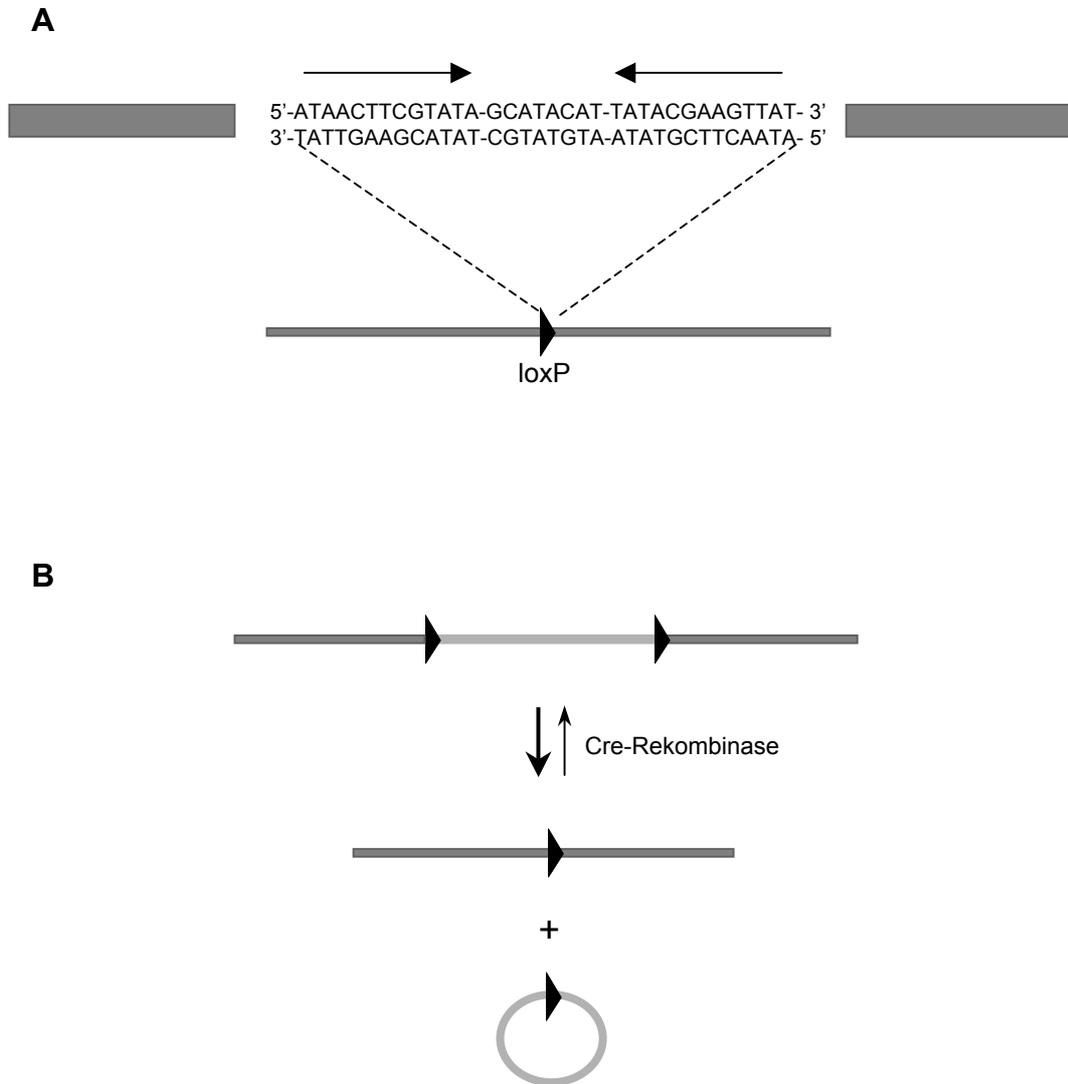


Abb. 5: Das Cre/loxP Rekombinationssystem (Austin et al., 1981)

(A) Die 34 bp lange loxP ([locus of crossing over [x] of P1 recombinase) Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase. Sie besteht aus zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen von je 13 bp und einem asymmetrischen, 8 bp langen Zwischenstück. Dieses Zwischenstück definiert die Orientierung der loxP-Sequenz.

(B) Die Cre-vermittelte Rekombination zwischen zwei gleich orientierten loxP-Sequenzen, die sich auf dem selben DNA-Molekül befinden, führt zur Entfernung der dazwischen liegenden Sequenz als zirkuläres DNA-Molekül. Auf jedem der beiden Rekombinationsprodukte bleibt eine loxP-Sequenz erhalten.

Die modifizierten ES-Zellen werden in die Blastozyste einer Pflegemaus injiziert, um schließlich eine Maus zu produzieren, die die erzielte Veränderung des ausgewählten Gens in allen ihren kernhaltigen Zellen enthält (Gossler et al., 1986; Thomas und Capecchi, 1987; Mansour et al., 1988). Mäuse mit einem von loxP-Sequenzen flankierten Exon des zu untersuchenden Gens können dann mit einer für die Cre-Rekombinase transgenen Maus verpaart werden. In den Nachkommen wird das Exon in Abhängigkeit von der Expression der Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt. Die Auswirkung des Fehlens des betreffenden Proteins kann dann anhand der phänotypischen Veränderungen dieser Tiere untersucht werden. Eine Vielzahl schon existierender transgener Cre-Mäusestämme, in denen die Expression des Enzyms unter unterschiedliche transkriptionelle und/oder posttranslationale Regulationsmechanismen gestellt ist, ermöglicht die Generierung von Mäusen, in denen eine zeitlich bzw. gewebespezifisch induzierte Inaktivierung des zu untersuchenden Gens erfolgen kann.

Der erste Schritt zur Generierung von ES-Zellen mit je einem von loxP-Sequenzen flankierten Exon des α_1 - bzw. α_2 -Gens basiert auf der Konstruktion geeigneter Transfervektoren. Dazu sollten zunächst genomische Sequenzabschnitte der α -Untereinheiten isoliert und charakterisiert werden.

5.1.2 Klonierung und Charakterisierung genomischer Sequenzabschnitte der α -Untereinheiten

5.1.2.1 Herstellung genspezifischer Nukleinsäuresonden für die Isolierung genomischer Klone

Um die genomische Maus-DNA der α -Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase zu erhalten, mussten zunächst geeignete Sonden hergestellt werden, mit denen dann eine genomische Maus-Genbank durchsucht werden konnte. Für die Herstellung der Sonden wurden mittels PCR spezifische cDNA-Fragmente aus einer Maus-cDNA-Genbank amplifiziert.

Die Maus-cDNA-Sequenzen beider α -Untereinheiten waren am Anfang des Projektes unbekannt. So wurde die Sequenz der Primer von bekannten Sequenzen der Untereinheiten von anderen Spezies abgeleitet. Bei der α_1 -Untereinheit wurde die entsprechende Sequenz der Ratte (NM_017090.1) und bei der α_2 -Untereinheit die humane Sequenz (X63282.1) verwendet. Da alle Untereinheiten der cytosolischen Guanylyl-Cyclase wie auch die membrangebundenen Isoformen und die Adenylyl-Cyclasen C-terminal stark konservierte katalytische Bereiche aufweisen, wurden die Primer aus den N-terminalen Bereichen ausgewählt. Es erwies sich als erforderlich, mehrere Primerpaare zu testen, bis aus der verwendeten Maus-cDNA-Genbank (Lambda ZAP II) spezifische PCR-Produkte für jede Untereinheit erhalten wurden (Tab. 3). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden kloniert und anschließend sequenziert, um die Richtigkeit der DNA-Sequenz zu verifizieren.

Tabelle 3: Ausgesuchte Primerpaare für die Amplifizierung der cDNA-Sonden

Name	Primer-Sequenz	Produkt (cDNA-Sonden)	
		Länge	Position
α_1 U ₆	5' -TCA CCC CCA AAG AAA GAC AAG-3'	487 bp	171-657
α_1 L ₆	5' -TTT AAT GAT ACC GGG GAG AAG C-3'		
α_2 U ₃	5' -GCA GAC CAC TCC AAC AAA GAA GAA-3'	613 bp	418-1030
α_2 L	5' -CCC CCA ACT GAA GGA CTG ACA T-3'		

Die Position der PCR-Produkte bezieht sich auf die kodierende Sequenz der publizierten α_1 - (NM_017090.1) bzw. α_2 - Untereinheit (X63282.1). U: Upper; Kennzeichnung von Primer-Sequenzen der Vorwärtsrichtung. L: Lower; Kennzeichnung von Primer-Sequenzen der Rückwärtsrichtung.

5.1.2.2 Isolierung von BAC-Klonen, die die genomischen Sequenzen der α_1 - und α_2 -Untereinheit enthalten

Mit cDNA-Fragmenten der α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit als Sonde wurde eine genomische Maus-DNA-Bank durchsucht (Incyte Genomics inc.). Die verwendete Genbank bestand aus genomischer DNA des Mausstammes 129/SvJ, die in BAC-Vektoren (bacterial artificial chromosome) kloniert worden war. Diese Vektoren können fremde DNA-Fragmente bis über 300 kb mit großer Stabilität aufnehmen (Shizuya et al., 1992).

Eine Genbank aus solchen BAC-Vektoren, die lange genomische DNA Insertionen beinhalten, benötigt eine relativ kleine Anzahl von Klonen, um das gesamte Genom zu repräsentieren. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, dass die erwünschte Sequenz tatsächlich in der Bank vorhanden ist, sehr groß.

Ein zweites Auswahlkriterium für diese Genbank war die Tatsache, dass sie die genomische DNA des Mausstammes 129/SvJ enthielt, und in der Regel werden embryonale Stammzelllinien dieses Mausstammes bei der Herstellung von Knock-out-Mäusen verwendet.

Mit Hilfe der cDNA-Sonden konnte aus der Genbank jeweils ein BAC-Klon mit einer Größe von ca. 150 kb für jede der beiden α -Untereinheiten isoliert werden (BAC- α_1 und BAC- α_2).

5.1.2.3 Identifizierung erster genspezifischer Abschnitte der BAC-Klone

Da es sich bei den verwendeten BAC-Vektoren um sogenannte „low copy“ Plasmide handelt und jede Wirtszelle nur über eine einzelne Kopie des Plasmids verfügt, konnten bei jeder Präparation nur geringe DNA-Ausbeuten, etwa 50 µg pro 500 ml Bakterienkultur, erreicht werden. Eine für die weiteren Arbeiten ausreichende Menge an Plasmid-DNA konnte erst durch wiederholte Plasmid-Präparationen gewonnen werden.

Die in den BAC-Vektoren enthaltenen genomischen Insertionen waren für eine direkte Charakterisierung zu groß. Um geeignete, die genomischen Sequenzen der Untereinheiten enthaltende Fragmente zu identifizieren, mussten Restriktionsanalysen der BAC-Klone durchgeführt werden. Die BAC-Klone (1 µg Plasmid) wurden dazu mit einer Vielzahl unterschiedlicher Restriktionsendonukleasen geschnitten. Ausgewählt wurden nur solche Enzyme, die eine Sequenz von 6 oder 8 Nukleotiden erkennen. Die entstandenen Fragmente wurden auf einem 0,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Mit Hilfe der Southern-Blot-Hybridisierung unter Verwendung der in der Tabelle 3 aufgeführten cDNA-Sonden konnten Fragmente identifiziert werden, die die entsprechenden kodierenden Sequenzen enthielten. Auf den Abbildungen 6 und 7 sind die Ergebnisse dieser Southern-Blot-Analysen zu sehen. Da die Agarosegele ohne Lineal fotografiert wurden, konnten die Signale auf dem Autoradiogramm erst durch Vergleich untereinander den entsprechenden Banden auf der Photographie zugeordnet werden.

Für das Auftreten mehrerer Signale auf einer Spur wurden zwei Erklärungen in Erwägung gezogen. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass die Sequenz der cDNA-Sonde sich über mehrere Exons erstreckte. Das traf bei der α_1 -cDNA-Sonde zu, deren Sequenz sich nach eigenen, sowie von anderen bestätigten (Sharina et al., 2000) Sequenzierungs-Analysen auf vier Exons verteilt. Dabei lagen die Erkennungssequenzen des verwendeten Enzyms mit hoher Wahrscheinlichkeit auf intronhaltigen Regionen und die durch die Sonde ermittelten DNA-Fragmente sollten daher die vollständige Sequenz mindestens eines Exons enthalten.

Zum anderen wurde angenommen, dass die verwendete cDNA-Sonde nur aus der Sequenz eines einzigen Exons besteht. Hierbei würden dann die ermittelten DNA-Fragmente jeweils nur ein Teil der identifizierten Exon-Sequenz enthalten.

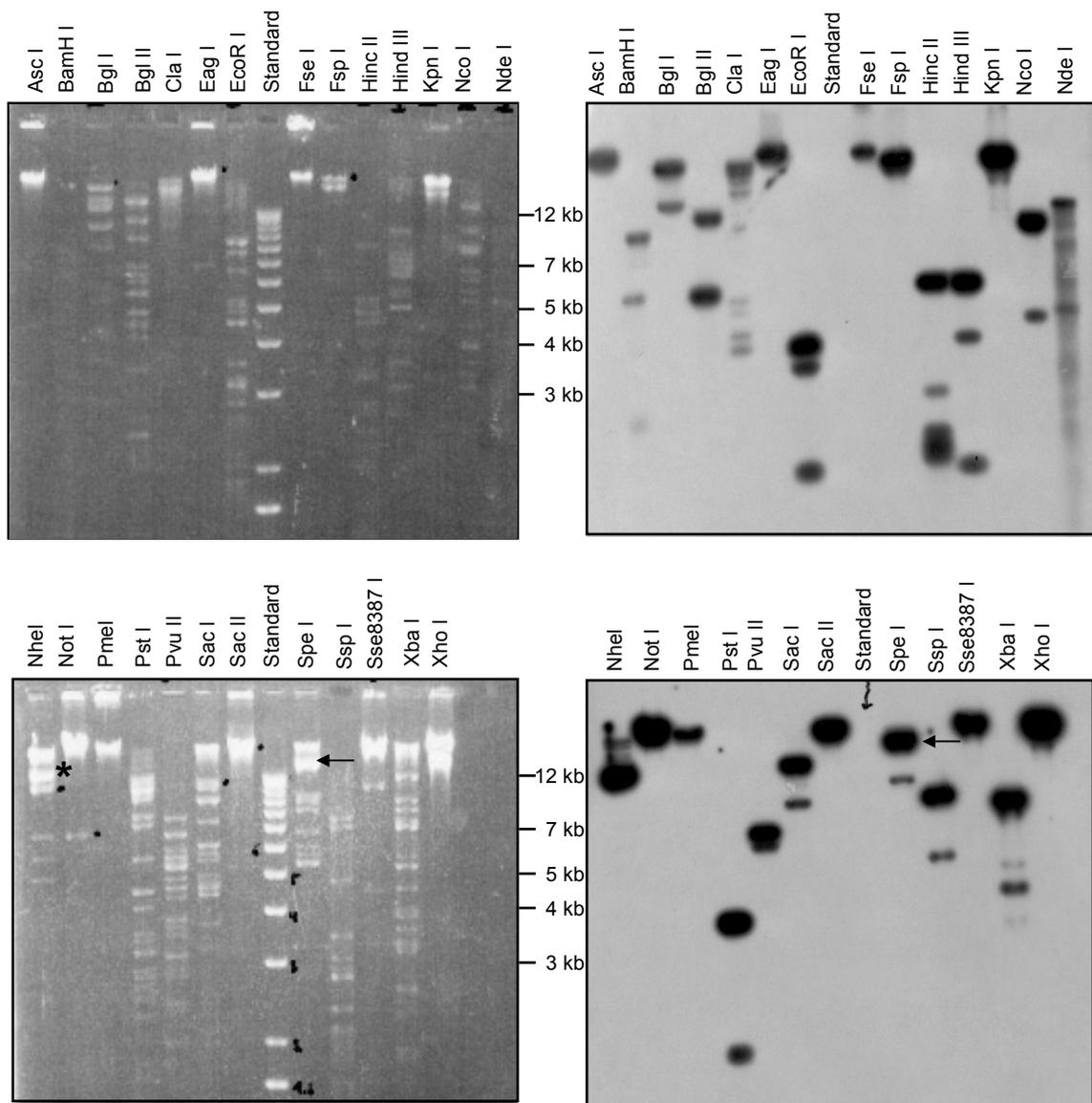


Abb. 6: Restriktionsverdau des BAC- α_1 Klon und Identifizierung genspezifischer Fragmente für die α_1 -Untereinheit

Jeweils 1 μ g des BAC- α_1 Klon wurde in einem Restriktionsvolumen von 20 μ l mit je 10 U der angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut (2 h, 37°C). Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden genspezifische Fragmente für die α_1 -Untereinheit mittels Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert. Bei Verwendung der cDNA-Sonde (α_1 U₆/ α_1 L₆ s. Tab. 3) wurde das mit dem Pfeil markierte Fragment bei dem SpeI-Verdau als erstes genspezifisches Fragment für die α_1 -Untereinheit isoliert und subkloniert. Als Verlängerung zu diesem Fragment wurde anschließend mit einer zweiten Sonde, das mit dem Stern markierte NheI-Fragment (Autoradiogramm nicht abgebildet) identifiziert und subkloniert.

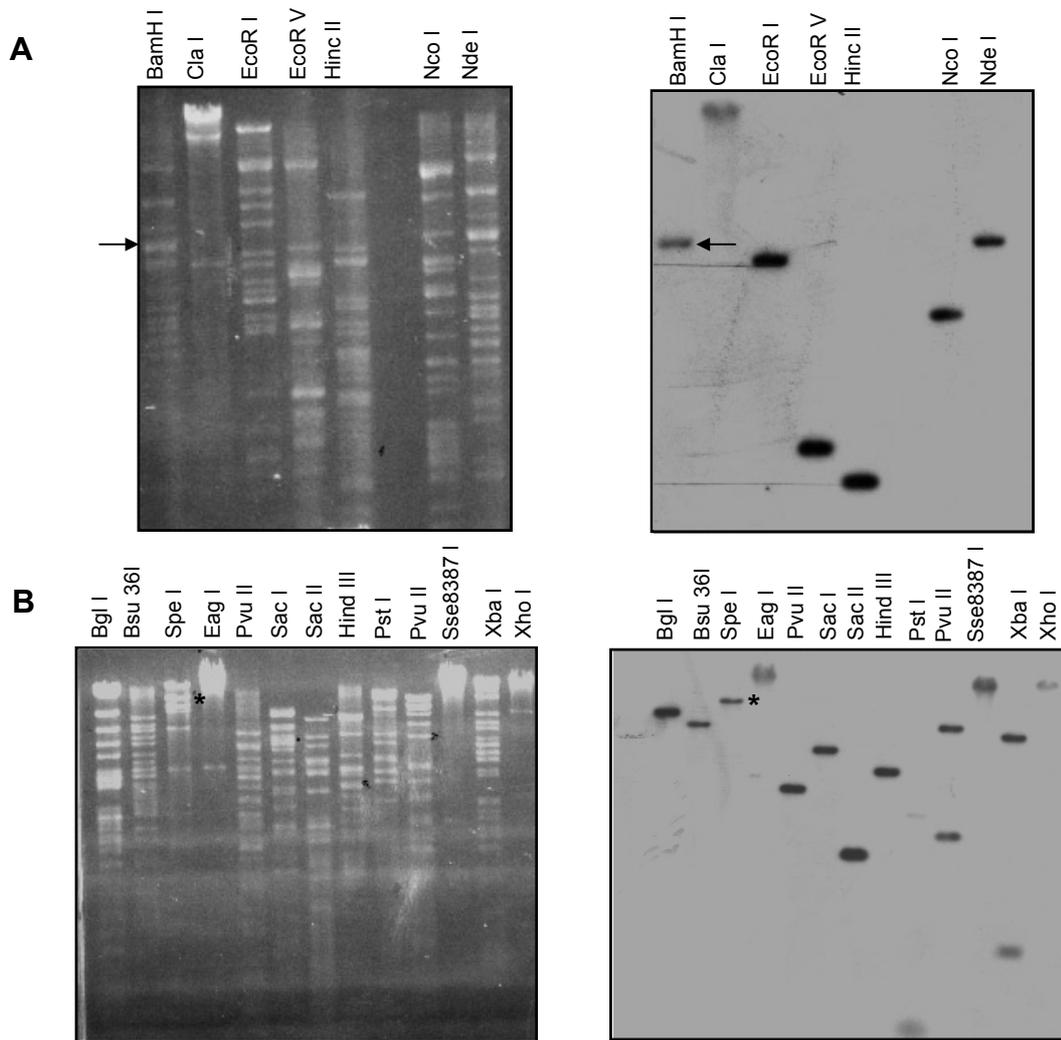


Abb. 7: Restriktionsverdauung des BAC- α_2 Klon und Identifizierung genspezifischer Fragmente für die α_2 -Untereinheit

(A) Nach Behandlung des BAC- α_2 Klon mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und erfolgter Southern-Blot-Hybridisierung mit Hilfe der cDNA-Sonde (α_2U_3/α_2L s. Tab. 3) wurden die ersten genspezifischen Fragmente für die α_2 -Untereinheit identifiziert. Das mit dem Pfeil markierte BamHI-Fragment wurde als erstes Fragment isoliert und subkloniert.

(B) Zur Verlängerung der subklonierten α_2 -genomischen Sequenz wurden weitere genspezifische Restriktionsfragmente aus dem BAC- α_2 Klon identifiziert. Dazu diente als Sonde ein DNA-Fragment, das sich endständig auf dem subklonierten BamHI-Fragment befand. Das mit dem Stern markierte SpeI-Fragment wurde als zweites Fragment isoliert und subkloniert.

5.1.2.4 Subklonierung und Restriktionskartierung der ersten ausgewählten genspezifischen Fragmente

Für den weiteren experimentellen Ansatz war es notwendig, ein Fragment bestehend aus einem vollständigen Exon mit genügend langen angrenzenden Intron-Sequenzen zu isolieren. Folglich wurde für das α_1 -Gen ein über 12 kb langes DNA-Fragment ausgewählt, das beim Verdau mit dem Enzym SpeI identifiziert wurde. Für das α_2 -Gen wurde ein entsprechendes, nach dem Verdau mit BamHI entstandenes, etwa 7 kb langes Fragment ausgesucht.

Um die ausgesuchten Fragmente weiter charakterisieren zu können, sollten sie in gängige Plasmidvektoren (pUC18, pBluescript II) subkloniert werden. Die Subklonierung war ausgesprochen schwierig, da die zu klonierenden DNA-Fragmente (ca. 10 kb) deutlich größer als der Vektor (ca. 3 kb) waren. Für eine erfolgreiche Ligationsreaktion mussten beide Reaktionspartner mindestens im äquimolaren Verhältnis eingesetzt werden, um die Verknüpfung identischer Moleküle zu linearen Konkaternen oder zirkulären Verbindungen soweit wie möglich zu verhindern.

Mit einer Größe von etwa 150 kb für jeden BAC-Klon entspricht die Masse eines aus 1 μ g Ausgangsmaterial isolierten 10 kb Fragmentes nur 67 ng. Um eine ausreichende Menge der Fragmente zu erhalten, wurden 20 μ g der BAC-Klone mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut. Für die anschließende Auftrennung der Fragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese durften jeweils nur 2 μ g der geschnittenen BAC-Klone pro Geltasche aufgetragen werden, um die Auflösungskapazität des Gels nicht zu überschreiten. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Ziel-Banden ausgeschnitten, und die DNA-Fragmente dann mittels reversibler Bindung an Glasmilch aus den Agarosegelstücken eluiert. Mit dem zu diesem Zeitpunkt verwendeten kommerziellen Kit (QIAquick Gel Extraktion Kit; Qiagen) konnten nur sehr niedrige Ausbeuten (etwa 40 %) erreicht werden, und die DNA-Fragmente nur mit einer geringen Konzentration isoliert werden. Um das benötigte äquimolare Verhältnis zwischen den zu klonierenden Fragmenten und der Vektor-DNA in der Ligationsreaktion einzustellen, wurde auch die Vektor-DNA in niedrigen Konzentrationen eingesetzt. Dadurch war der Anteil der zu erwünschten Ligationsprodukte, wie bei einer Reaktion zweiter Ordnung zu erwarten ist, sehr gering. Die das erwünschte Fragment enthaltenden Klone konnten durch Koloniehybridisierung ausfindig gemacht werden.

So wurde ein Klon für das α_1 -Gen isoliert (pBS-SpeI- α_1). Dieser bestand aus dem über SpeI-Schnittstellen isolierten genomischen Fragment, das in den SpeI-geöffneten pBluescript II SK (+)-Vektor subkloniert wurde. Zur Charakterisierung des genomischen Fragmentes wurde eine Restriktionskarte erstellt (Abb. 8A). Dazu wurde je 1 μ g des Plasmids (pBS-SpeI- α_1) mit je 10 U verschiedener Restriktionsendonukleasen, einzeln und auch paarweise verdaut. Die Länge der daraus resultierenden DNA-Fragmente wurde

nach ihrer Auftrennung in 0,8%igen TBE-Agarosegelen bestimmt. Aufgrund der Größenverteilung der Restriktionsfragmente im Doppelverdau wurden die relativen Positionen der Restriktionsschnittstellen ermittelt. Parallel dazu wurden Abschnitte dieses Klon sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe vektorspezifischer (T7- und T3-Primer) sowie fragmentspezifischer Primer (siehe 3.3.6). Dadurch wurden die 3'- und 5'-Exon/Intron-Grenzen von 5 Exons der α_1 -Untereinheit ermittelt und das Vorhandensein einiger Restriktionsstellen überprüft.

Für das α_2 -Gen wurde entsprechend ein erster Klon, pUC18-BamHI- α_2 , hergestellt, indem das über BamHI-Schnittstellen isolierte genomische Fragment in den pUC18-Vektor subkloniert wurde. Aus diesem Klon wurde ebenfalls eine Restriktionskarte angefertigt (Abb. 9A), und durch Sequenzierung mit fragmentspezifischen Primern (siehe 3.3.6) wurden die 3'- und 5'-Exon/Intron-Grenzen eines entsprechenden Exons der α_2 -Untereinheit ermittelt. Das identifizierte Exon war 720 bp lang und war in 2 kb Entfernung von der BamHI-Klonierungsstelle lokalisiert. Zwei Kilobasen Länge subklonierter genomischer Sequenz 5' strangaufwärts des ermittelten Exons war nicht ausreichend für die Konstruktion des targeting-Vektors. Für die homologe Rekombination wurde eine Länge von mindestens 5 kb als notwendig erachtet.

Die Kenntnis weiterer genomischer Sequenzen war auch unerlässlich, um die zur Zusammenstellung der targeting-Vektoren geeigneten Restriktionsstellen zu ermitteln, und um entsprechende Analysestrategien zum Nachweis der Integration dieser Vektoren in das Genom von ES-Zellen zu entwickeln.

5.1.2.5 Subklonierung und Restriktionskartierung weiterer genspezifischer Fragmente

Genomische DNA-Fragmente der α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit, die überlappende Sequenzen 5' strangaufwärts zu den bereits subklonierten enthielten, sollten identifiziert und subkloniert werden.

Dazu wurde der BAC- α_1 Klon mit NheI und der BAC- α_2 Klon mit SpeI verdaut. Bei der Behandlung der BAC-Klone mit diesen Enzymen entstanden vergleichsweise wenige, und daher lange Fragmente. Somit war die Wahrscheinlichkeit, darunter das gewünschte Fragment aufzufinden, größer.

Zur Verlängerung der bereits subklonierten α_1 -genomischen Sequenz wurde ein überlappendes etwa 13 kb langes NheI DNA-Fragment identifiziert. Als radioaktiv markierte Sonde diente dabei ein 3,4 kb langes DNA-Fragment (SpeI-BglII), das aus dem pBS-SpeI- α_1 Klon isoliert wurde. Das NheI DNA-Fragment wurde dann in den SpeI-geöffneten pBluescript II SK (+)-Vektor ligiert. Bei diesem Klonierungsschritt wurde ausgenutzt, dass die beiden Restriktionsendonukleasen NheI und SpeI kompatible 5'-Überhänge produzieren. Es erfolgte eine Restriktionskartierung (siehe Abb. 8B) und die partielle Sequenzie-

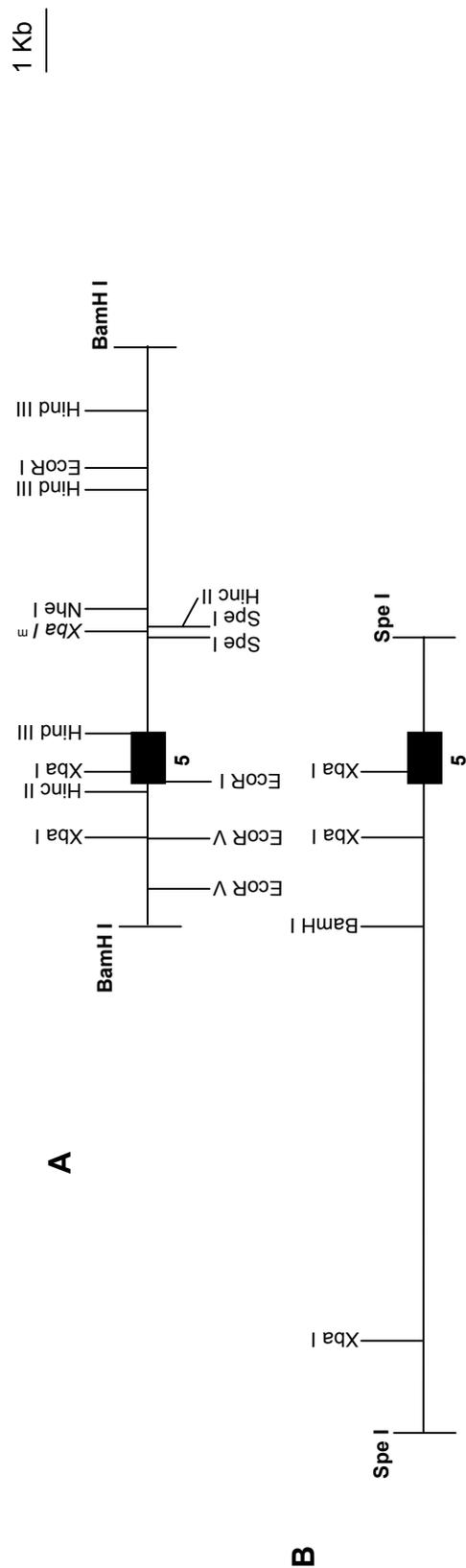


Abb. 9: Restriktionskarten der klonierten genomischen α_2 -Fragmente

Die durch die Restriktionsanalyse identifizierten Restriktionsstellen wurden als vertikale Striche eingezeichnet. Die horizontale Linie kennzeichnet die genomische Sequenz und die Rechtecke symbolisieren das identifizierte Exon. Die mit ‚m‘ gekennzeichnete XbaI-Schnittstelle wird bei der Vermehrung der DNA in den *E. coli* methyliert.

(A) pUC18-BamHI- α_2 : Das BamHI-Fragment (Abb. 7A) wurde als erstes Fragment der α_2 -Untereinheit isoliert und in den pUC18-Vektor subkloniert. Das BamHI-Fragment wurde mit der α_2 -cDNA-Sonde (siehe Tab. 3) detektiert.

(B) pBS-SpeI- α_2 : Überlappend zu dem BamHI-Fragment wurde das SpeI-Fragment (Abb. 7B) als das zweite genspezifische Fragment für die α_2 -Untereinheit isoliert und in den SpeI-geöffneten pBluescript II SK (+)-Vektor ligiert. Als Sonde zur Identifizierung des SpeI-Fragmentes wurde das 1,8 kb lange BamHI-HincII-Fragment aus dem pUC18-BamHI- α_2 -Klon verwendet.

rung des Klons, wodurch das zweite Exon mit dem Start-Codon (ATG) der α_1 -Untereinheit lokalisiert wurde. Der Klon wurde pBS-NheI- α_1 benannt (siehe Abb. 8B).

Die bereits subklonierte α_2 -genomische Sequenz wurde um 7 kb erweitert. Dafür wurde nach dem Verdau des BAC- α_2 Klons mit SpeI ein etwa 11 kb langes Fragment identifiziert, das ebenso in den SpeI-geöffneten pBluescript II SK (+)-Vektor ligiert wurde (siehe Abb. 9B). Die Southern-Blot-Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde, die dem 1,8 kb langen Fragment entsprach, welches sich durch den BamHI und HincII Verdau des pUC18-BamHI- α_2 Plasmids ergab.

5.1.3 Konstruktion der targeting-Vektoren

5.1.3.1 Allgemeine Anforderungen

Der targeting-Vektor dient dazu, eine genomische Modifikation, in der vorliegenden Arbeit ein von loxP-Sequenzen flankiertes Exon, in embryonale Stammzellen der Maus einzubringen. Dort wird es dann durch homologe Rekombination in einigen wenigen Zellen anstelle des nativen Exons in das Wirtsgenom eingebaut.

Das Ereignis der homologen Rekombination ist in Säugerzellen sehr selten. Um die Häufigkeit eines homologen Rekombinationsereignisses zu erhöhen, soll der targeting-Vektor neben den loxP-Sequenzen eine Länge von etwa 10 kb mit dem Ziel-Gen homologer Sequenzen enthalten. Da die Häufigkeit auch dann sehr gering bleibt und darüber hinaus die Transfektionseffizienz, d.h. das Ausmaß des Einschleusens der fremden DNA in die ES Zellen einen limitierten Faktor darstellt, soll der targeting-Vektor zusätzlich Selektionsmarkergene enthalten, die eine Anreicherung von homolog Rekombinanten erlauben. Mit Hilfe dieser Selektionsmarkergene wird positiv für die ES-Zellen selektioniert, die den Vektor stabil in ihr Genom eingebaut haben und negativ gegen die ES-Zellen, in denen der Vektor-Einbau nicht in das Zielgen erfolgte. Dazu wies der eingesetzte targeting-Vektor das bakterielle Neomycin-Resistenzgen (Neo-Gen) und das Diphtherie-Toxin-Gen (DT-Gen), beide unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK-Promotors), auf. Das Neo-Gen befand sich im targeting-Vektor innerhalb der homologen Sequenzen des Zielgens. ES-Zellen, die den Vektor, unabhängig ob durch homologe oder nicht-homologe Rekombination in ihr Genom integriert hatten, erwarben dadurch die Eigenschaft der Neomycin-Resistenz (positive Selektion). Dagegen befand sich das DT-Gen außerhalb der homologen Sequenzen, so dass es bei einer Integration durch homologe Rekombination verloren ging. In denjenigen ES-Zellen, die den targeting-Vektor durch nicht-homologe Rekombination in ihr Genom integriert hatten, blieb das Gen funktionstüchtig. Es kam zur Bildung von Diphtherie-Toxin, das durch eine NAD-abhängige ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 die Proteinbiosynthese hemmte, und den Zelltod herbeiführte (negative Selektion).

Durch den starken Promotor des PGK-Neo-Gens des targeting-Vektors im Genom kann die Expression benachbarter Gene beeinflusst werden (Fiering et al., 1993; Olson et al., 1996). Sogar von Störungen der Expression von Genen in mehr als 100 kb Entfernung zu dem integrierten Neo-Gen ist berichtet worden (Pham et al., 1996). Hierdurch können phänotypische Veränderungen der Maus verursacht werden, die fälschlicherweise der angestrebten genetischen Modifikation zugeordnet werden. Um das zu vermeiden, sollte das Neo-Gen nach Selektion und Identifizierung von ES-Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, entfernt werden. In dem verwendeten targeting-Vektor lag neben dem ausgewählten Exon der Guanylyl-Cyclase-Untereinheit auch das Neo-Gen von loxP-Sequenzen flankiert vor. Dadurch war gewährleistet, dass das Neo-Gen nach transienter Transfektion mit einem Cre-kodierenden Plasmid durch die exprimierte Rekombinase aus dem Zellgenom der homolog Rekombinanten herausgeschnitten werden konnte.

Zur Isolierung von ES-Zellen, die eine Deletion des Neo-Gens tragen, wies der targeting-Vektor ein drittes Selektionsmarkergen auf. Hierbei handelte es sich um das Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus (HSV-TK). Diese virale Thymidinkinase (TK) phosphoryliert Nukleosid-Analoga, wie z.B. Ganciclovir, im Gegensatz zum endogenen Enzym mit einer ca. 200fach höheren Substratspezifität. In neu synthetisierte DNA eingebautes Ganciclovir führt zum Kettenabbruch bei der DNA-Replikation, und dadurch zum Tod der Zellen, die das HSV-TK-Gen integriert haben. Der verwendete targeting-Vektor enthielt das HSV-TK-Gen neben dem Neo-Gen innerhalb der gleichen loxP-Sequenzen, so dass eine Deletion des Neo-Gens durch die gleichzeitige Entfernung des HSV-TK-Gens detektiert werden konnte. In Gegenwart von Ganciclovir kam es zur Anreicherung von homolog rekombinierten Zellen aus deren Genom die Selektionsmarkergene entfernt worden waren.

5.1.4 targeting-Vektoren

Zur Zusammenstellung der targeting-Vektoren wurde das „Drei-Vektoren-System“ (Triple-loxTM construction kit) von R. T. Premont und A. Macrae verwendet, das die erforderlichen Selektionsmarkergene und loxP-Sequenzen enthält (Abb. 10). Es besteht aus den Vektoren loxL, loxC und loxR, die aus dem pBluescript II Vektor entwickelt worden sind. Der loxL-Vektor enthält eine einzige loxP-Sequenz. Hier wird das Fragment mit dem ausgewählten Exon der Guanylyl-Cyclase-Untereinheit 3' von der loxP-Sequenz kloniert. Danach wird ein zweites Fragment, der sogenannte lange Rekombinationsarm, 5' der loxP-Sequenz eingebracht. Der lange Rekombinationsarm enthält die Sequenz, die auf dem Chromosom 5' an das bereits subklonierte exonhaltige Fragment der Guanylyl-Cyclase-Untereinheit angrenzt. Die Sequenz, die sich auf dem Chromosom 3' von dem exonhaltigen Fragment befindet, wird als sogenannter kurzer Rekombinationsarm in den loxR-Vektor kloniert. In dem folgenden Klonierungsschritt wird das Insert aus dem loxL-Vektor

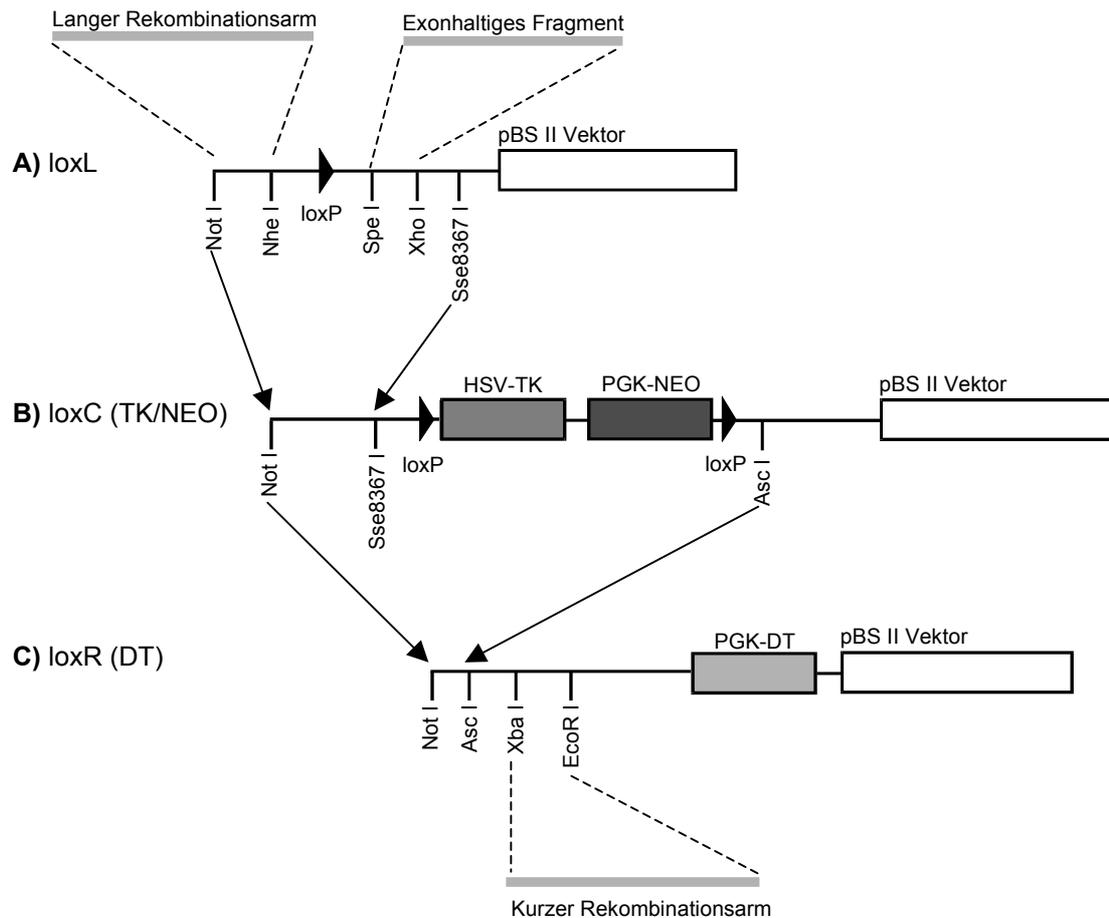


Abb. 10: Das „Drei-Vektoren-System“ für die Konstruktion der targeting-Vektoren

Jeder der drei Vektoren basiert auf dem pBluescript II Vektor (Stratagene) und enthält Elemente, die für das Zusammenstellen eines targeting-Vektors erforderlich sind.

(A) Der loxL (long arm) Vektor enthält eine einzige loxP-Sequenz. Hier wird das Fragment mit dem ausgewählten Exon 3' von der loxP-Sequenz, und ein mindestens 4 kb langes Fragment seiner 5' liegenden Sequenz, der sogenannte lange Rekombinationsarm, 5' von der loxP-Sequenz kloniert.

(B) Der loxC (TK/NEO) Vektor enthält die Selektionsmarker (HSV-Thymidinkinase und PGK-Neomycin-Phosphotransferase) umgeben von zwei loxP-Sequenzen. Vor diese Selektionskassette wird das loxL-Insert über die NotI- und Sse8367I-Schnittstellen kloniert.

(C) In den loxR-Vektor, der das PGK-Diphtherie-Toxin-Gen trägt, wird die 3' liegende Sequenz des ausgewählten Exons, der sogenannte kurze Rekombinationsarm, eingebracht. Dann wird als letzter Schritt das loxL/C-Insert über die NotI- und AscI-Schnittstellen in den nun fertigen targeting-Vektor kloniert.

in den loxC-Vektor subkloniert. Dadurch wird die zweite loxP-Sequenz und die Selektionskassette 3' des exonhaltigen Fragmentes eingebracht. Am Ende wird das loxC-Insert in den loxR-Vektor 5' des kurzen Rekombinationsarmes eingeführt.

Für die konditionelle Inaktivierung des α_1 - bzw. α_2 -Gens wurde jeweils das fünfte Exon ausgewählt. Beide Exons besitzen eine vergleichbare Länge von ca. 700 bp und sind damit die längsten Exons beider Gene. Außerdem kodieren sie für Aminosäure-Sequenzen, die vergleichbare aber nicht konservierte Protein-Abschnitte innerhalb der gesamt Proteidlängen beider Untereinheiten repräsentieren.

Die benötigten genomischen Fragmente mit den Exons und den homologen Sequenzen der α_1 - und α_2 -Untereinheit, die für die Konstruktion der targeting-Vektoren ausgesucht wurden, sind in der Abbildung 11 schematisch dargestellt.

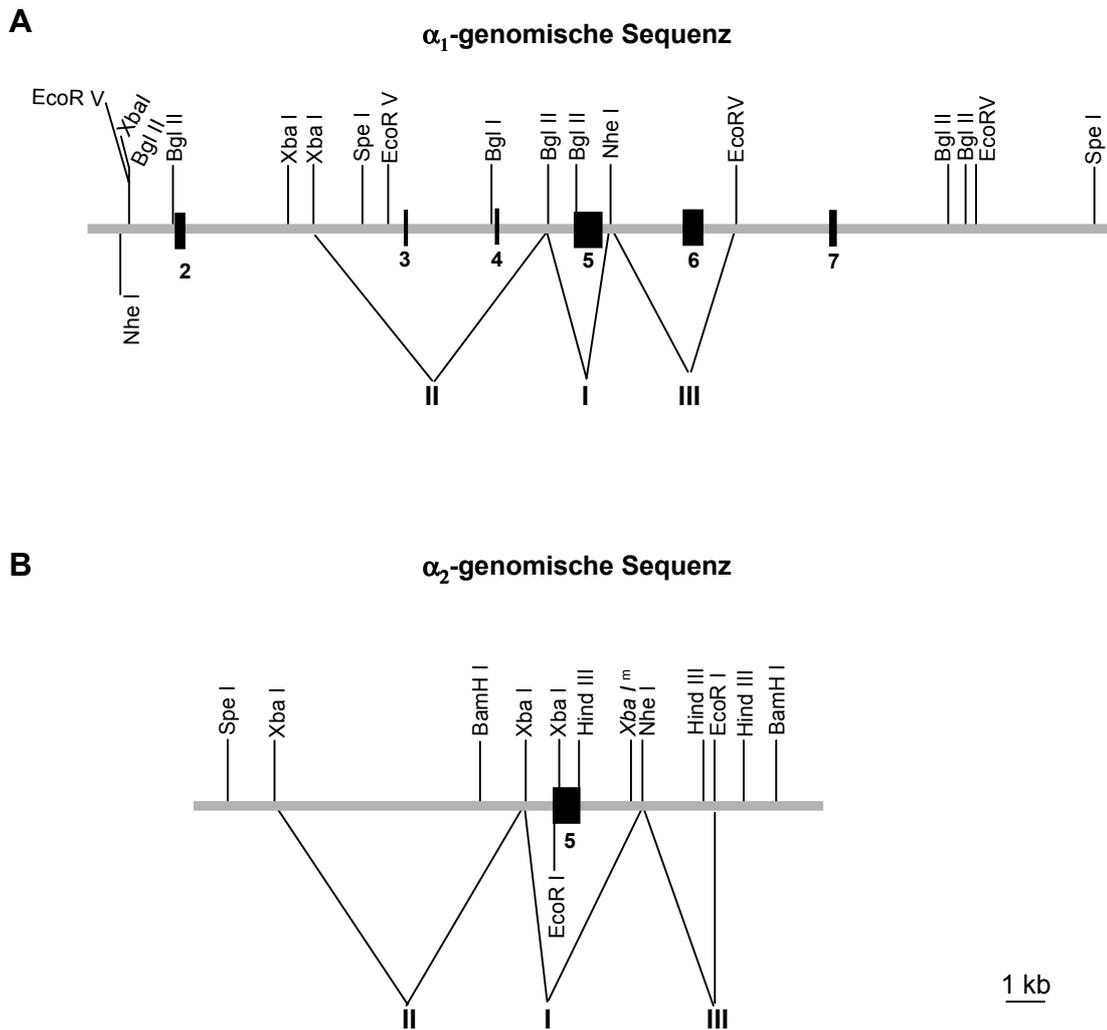


Abb. 11: Übersicht der verwendeten genomischen Sequenzen der α_1 - und α_2 -Gene zur Konstruktion der targeting-Vektoren

Gezeigt sind die genomischen Abschnitte der α_1 - und α_2 -Gene, die subkloniert und charakterisiert wurden. Auf diesen Abschnitten sind die Fragmente gekennzeichnet, die zur Konstruktion der targeting-Vektoren verwendet wurden. Die durch Rechtecke symbolisierten Exons sind nummeriert.

(A) α_1 -targeting-Vektor

- I. Exonhaltiges Fragment: 1,6 kb
- II. Langer Rekombinationsarm: 6 kb
- III. Kurzer Rekombinationsarm: 3 kb

(B) α_2 -targeting-Vektor

- I. Exonhaltiges Fragment: 3 kb
- II. Langer Rekombinationsarm: 6,5 kb
- III. Kurzer Rekombinationsarm: 1,9 kb

5.1.4.1 Klonierung des α_1 -targeting-Vektors

In dem ersten Klonierungsschritt sollte das exonhaltige Fragment der α_1 -Untereinheit (siehe Abb. 11A) 3' der loxP-Sequenz in den loxL-Vektor eingefügt werden. Dazu war es erforderlich, das Fragment mit geeigneten Schnittstellen zu versehen. Dies erfolgte über zwei aufeinanderfolgenden Subklonierungen.

Zuerst wurde aus dem pBS-Spel- α_1 Plasmid (siehe Abb. 8A) das längere SpeI-NheI Fragment isoliert und über die SpeI-Schnittstelle in den pBluescript II-Vektor eingebracht (Abb. 12-1). Dadurch wurde die NheI-Schnittstelle inaktiviert. Die Orientierung des subklonierten Fragmentes wurde bestimmt. Ein Subklon mit dem Fragment in der SpeI-NheI Orientierung 5' der XhoI-Schnittstelle wurde zuerst mit XhoI linearisiert und anschließend mit BglII partiell hydrolysiert. Dadurch wurde das exonhaltige Fragment (siehe Abb. 11A) BglII-BglII-NheI isoliert und besaß BglII und XhoI überhängenden Enden. In einem weiteren zuvor mit BamHI und XhoI geöffneten pBluescript II-Vektor wurde das 1,6 kb lange exonhaltige Fragment zum zweiten Mal subkloniert (Abb. 12-2). Bei diesem Klonierungsschritt wurde ausgenutzt, dass die beiden Restriktionsendonukleasen BglII und BamHI kompatible 5'-Überhänge produzieren. Aus diesem zweiten Subklon wurde das exonhaltige Fragment über die SpeI-XhoI-Schnittstellen herausgeschnitten und konnte so in den mit SpeI und XhoI geöffneten loxL-Vektor in der richtigen Orientierung kloniert werden (Abb. 12-3). Das resultierende Plasmid wurde loxL-Exon- α_1 benannt. In dieses Plasmid wurde dann der lange Rekombinationsarm 5' der loxP-Sequenz eingebracht. Dazu wurde das 10 kb lange BglII-BglII Fragment (siehe Abb. 11A), das 5' unmittelbar vor dem exonhaltigen Fragment liegt, aus dem pBS-NheI- α_1 Plasmid (siehe Abb. 8B) isoliert. Für die Ligation erwies sich als notwendig, eine geeignete Klonierungsstelle zwischen den existierenden NotI und NheI Klonierungssequenzen in das loxL-Exon- α_1 Plasmid einzubauen. Um das Plasmid nicht zu zerschneiden, sollte diese Erkennungssequenz nicht mehrfach auf dem Plasmid vorhanden sein. Da durch die Insertion des Exons eine BglII-Schnittstelle schon existierte, wurde die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI eingefügt. Der Einbau erfolgte mit Hilfe eines Adapters in das mit NotI und NheI geöffnete loxL-Exon- α_1 Plasmid (Abb. 12-4). Danach konnte das BglII-BglII Fragment in das Plasmid eingefügt werden (Abb. 12-5). Die richtige Orientierung des eingefügten Fragmentes wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Mit diesem Fragment als langem Rekombinationsarm wäre nur noch 1 kb Länge charakterisierter genomischer Sequenz des α_1 -Gens übrig. Für die spätere Entwicklung einer Southern-Blot-Analyse zum Nachweis von homolog rekombinierten ES-Zellen wäre dies eventuell nicht ausreichend. Demzufolge wurde der lange Rekombinationsarm von 10 kb auf 6 kb gekürzt. Hierzu wurde das loxL- α_1 „lang“ Plasmid (Abb. 12-6) mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI geschnitten.

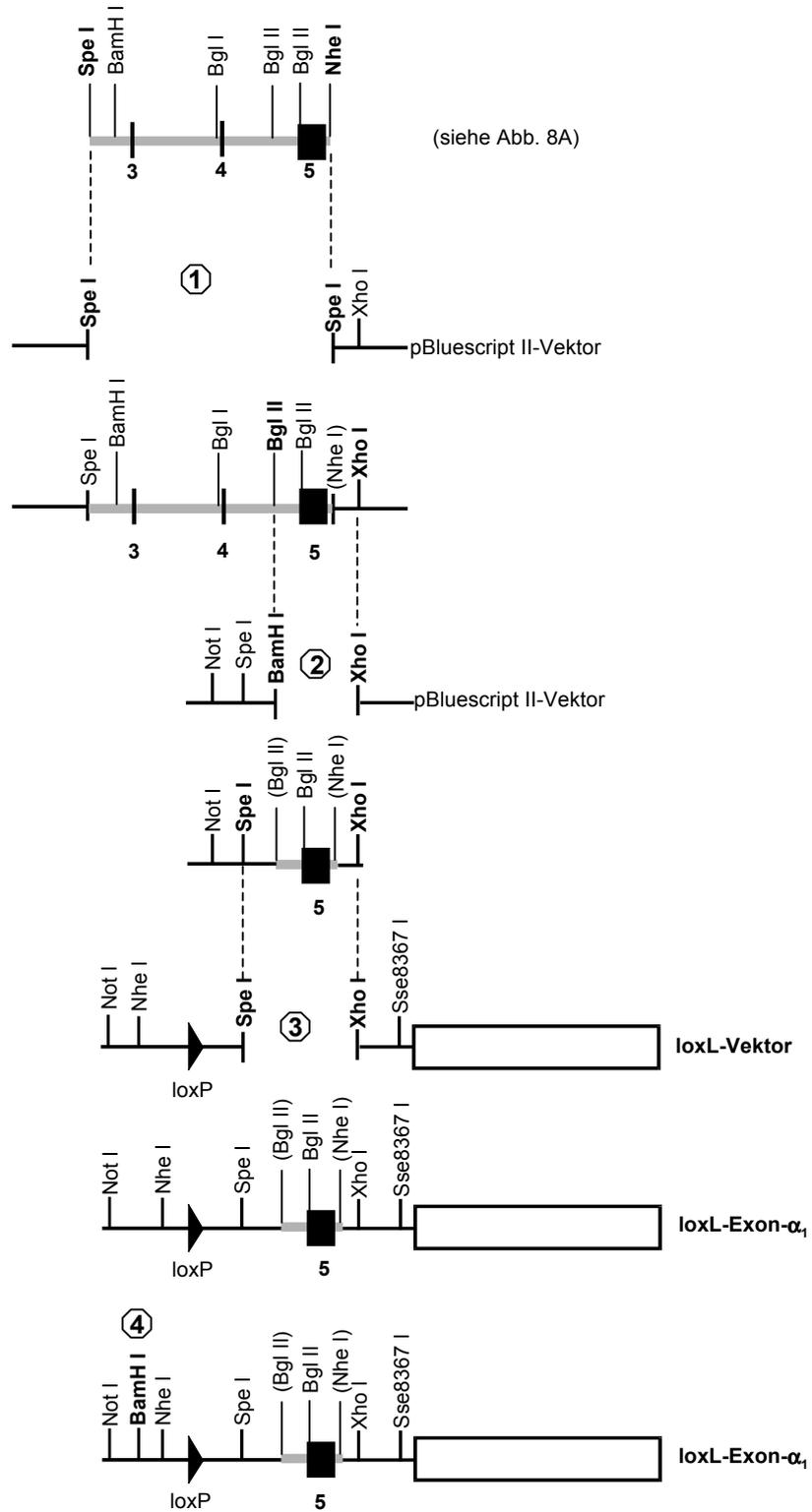


Abb. 12: (Fortsetzung siehe nächste Seite)

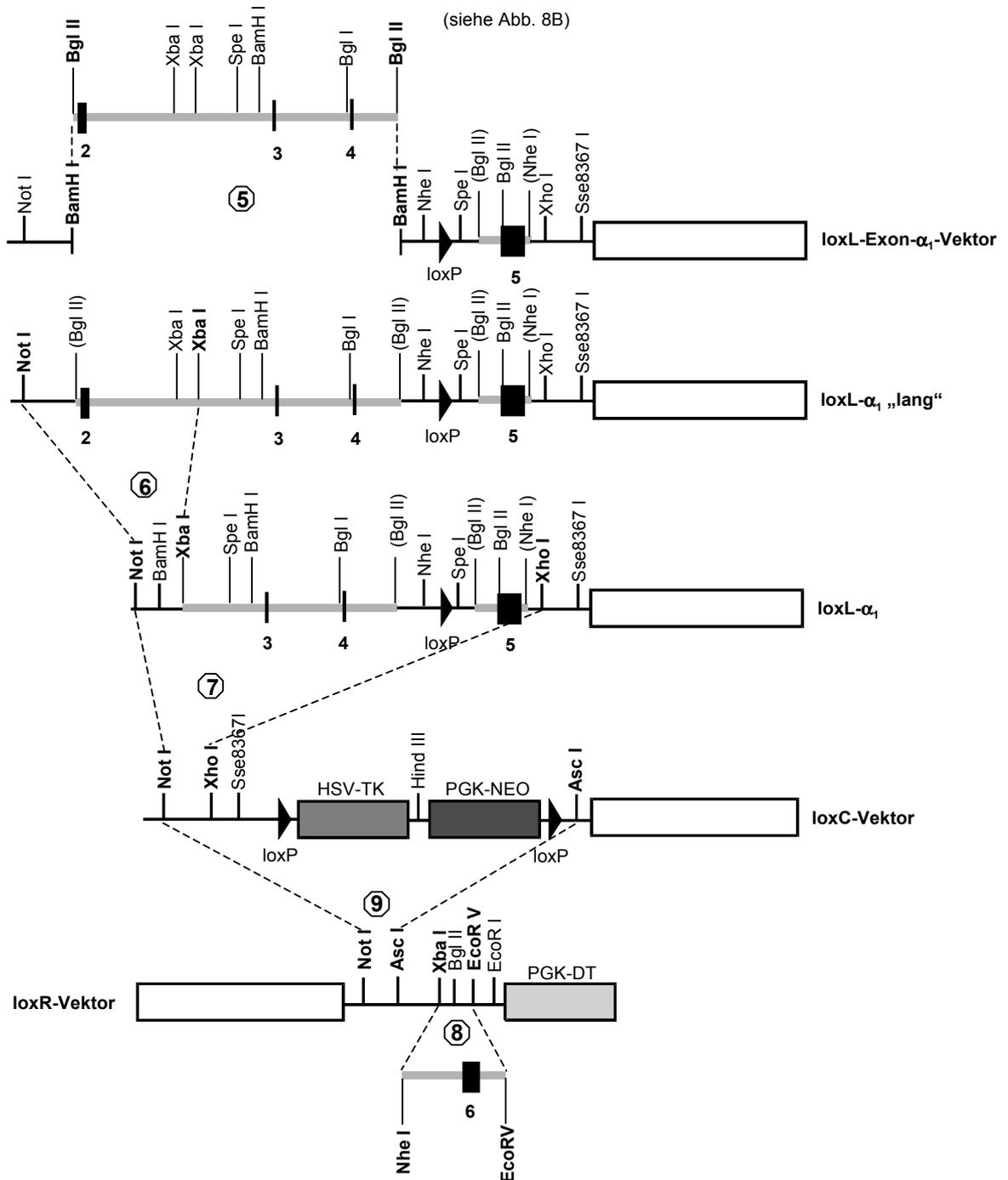


Abb. 12: Klonierungsschritte zur Zusammenstellung des α_1 -targeting-Vektors

Graphisch dargestellt sind die einzelnen Klonierungsschritte zur Zusammenstellung des α_1 -targeting-Vektors. Die α_1 -genomischen Fragmente sind grau abgebildet, die Vektor-Sequenzen schwarz. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind fett gezeichnet. Durch die Klonierung inaktivierte Restriktionsstellen sind in Klammer gesetzt.

Nach erfolgter Auftrennung der Fragmente im Agarosegel wurde die obere Bande, die das erwünschte Fragment darstellte, isoliert und unter Verwendung eines Adapters als Verbindungssequenz rezirkularisiert (Abb. 12-6). Anschließend wurde das gesamte Insert aus dem loxL-Vektor über die NotI und XhoI Restriktionsstellen isoliert und über die gleichen Restriktionsstellen in den loxC-Vektor kloniert (Abb. 12-7). Hierbei wurde 3' des exonhaltigen Fragmentes die zweite loxP-Sequenz und die Selektionsmarker (HSV-TK und PGK-Neo) eingebracht. Inzwischen war der über NheI und EcoRV isolierte kurze Rekombinationsarm (siehe Abb. 11A) in den loxR-Vektor kloniert worden (Abb. 12-8). Die Klonierung erfolgte, nachdem mit Hilfe eines Adapters eine EcoRV-Schnittstelle in den loxR-Vektor eingebaut wurde. Zuletzt wurde das Insert aus dem loxC-Vektor über die NotI- und AscI-Schnittstellen in den fertigen loxR-Vektor kloniert (Abb. 12-9).

5.1.4.2 Klonierung des α_2 -targeting-Vektors

Als Ausgangsmaterial stand hier das Plasmid pUC18-BamHI- α_2 (siehe Abb. 9A) zur Verfügung, aus dem das exonhaltige Fragment der α_2 -Untereinheit (siehe Abb. 11B) isoliert wurde. Dazu wurde zuerst das Plasmid mit dem Restriktionsenzym NheI linearisiert und anschließend mit dem Restriktionsenzym XbaI partiell verdaut. Das isolierte exonhaltige Fragment (XbaI-XbaI-NheI) konnte dann in den zuvor mit SpeI geöffneten, dephosphorylierten loxL-Vektor ligiert werden (Abb. 13-1). Dazu wurde die Eigenschaft der Restriktionsendonukleasen XbaI, NheI und SpeI ausgenutzt, kompatible Überhänge zu produzieren. Mit einer Restriktionsanalyse wurde überprüft, ob das einklonierte Fragment die richtige Orientierung besaß. Das resultierende loxL-Exon- α_2 Plasmid wurde bei dem nächsten Schritt mit dem Restriktionsenzym NheI linearisiert und dephosphoryliert. Hier wurde dann der lange, zuvor über XbaI-Schnittstellen aus dem pBS-SpeI- α_2 Plasmid (siehe Abb. 9B) isolierte Rekombinationsarm eingefügt (Abb. 13-2). Der kurze über die NheI- und EcoRI-Schnittstellen aus dem pUC18-BamHI- α_2 Plasmid (siehe Abb. 9A) isolierte Rekombinationsarm wurde über die gleichen Schnittstellen direktional in den loxR-Vektor kloniert (Abb. 13-3). Die NheI-Schnittstelle war in einem früheren Schritt mittels Adaptoren in den loxR-Vektor eingefügt worden. Weiter wurde das Insert aus dem loxL-Vektor über die NotI- und Sse8367I-Schnittstellen in den loxC-Vektor eingebracht (Abb. 13-4). Anschließend wurde durch die Einführung des loxC-Inserts über die NotI- und AscI-Schnittstellen in den fertigen loxR-Vektor der α_2 -targeting-Vektor zusammengestellt (Abb. 13-5).

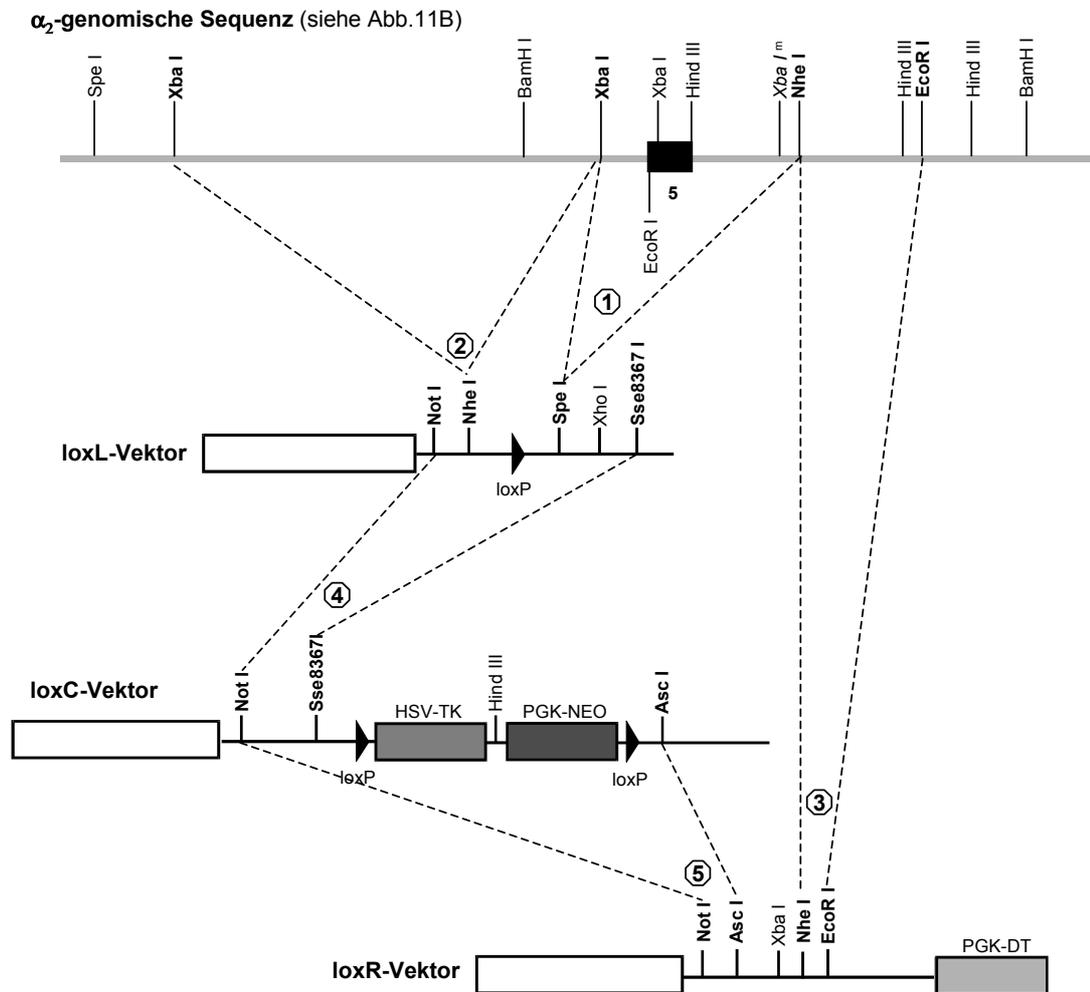


Abb. 13: Klonierungsschritte zur Zusammenstellung des α_2 -targeting-Vektors

Graphisch dargestellt sind die Klonierungsschritte zur Zusammenstellung des α_2 -targeting-Vektors. Die α_2 -genomische Sequenz ist grau abgebildet, die Vektor-Sequenzen schwarz. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind fett gekennzeichnet.

5.1.5 Transfektion der targeting-Vektoren in die ES-Zellen

Die mit NotI linearisierten targeting-Vektoren wurden in die ES-Zellen elektroporiert. Die Arbeiten mit den ES-Zellen wurden von Dr. Stephan Teglund in Karolinska Institut (Schweden) durchgeführt. Die Zellen wurden ausplattiert und unter Selektion mit G418, einem Neomycin-Analogon, gesetzt. Resistente Klone wurden isoliert und bis zur Konfluenz expandiert. Ein Teil der Zellen wurde eingefroren und aufbewahrt, während die übrigen für die Gewinnung genomischer DNA weiter kultiviert wurden. Die DNA wurde anschließend auf die Integration des eingebrachten targeting-Vektors an den dafür vorgesehenen chromosomalen Locus untersucht.

Der linearisierte targeting-Vektor enthält mit dem langen und kurzen Rekombinationsarm, die jeweils 5' und 3' von der Selektionskassette kloniert sind, zwei Enden, die identisch mit den auszuwechselnden endogenen Sequenzen sind. Diese lagern sich im Idealfall an die auszuwechselnden Sequenzen an und ersetzen sie durch zwei unabhängige, aufeinander folgende homologe Rekombinationen. Für einen vollständigen Einbau des targeting-Vektors, durch den die loxP-Sequenzen und die Selektionskassette in den chromosomalen Locus eingeführt werden, sollte je eine homologe Rekombination innerhalb des langen und kurzen Rekombinationsarmes stattfinden. Der Nachweis der Rekombinationsereignisse erfolgte mittels nested-PCR-Analyse, einer „verschachtelten“ PCR-Methode geeignet zur Detektion geringer Templatemengen, und Southern-Blot-Hybridisierung. Daneben wurde in einer weiteren nested-PCR-Analyse die Anwesenheit der ersten loxP-Sequenz überprüft. Eine Übersicht über beide PCR-Analysen mit den Positionen der Primer ist in Abbildung 14 dargestellt.

In der ersten nested-PCR-Analyse wurden zunächst diejenigen Klone identifiziert, in denen ein homologes Rekombinationsereignis stattgefunden hatte. Hierzu wurden die Primer so gewählt, dass ein PCR-Produkt nur bei dem Einbau des kurzen Rekombinationsarmes am richtigen chromosomalen Locus entstehen sollte. Dazu wurden die Vorwärtsprimer (A_U , B_U) komplementär zu Sequenzen der Selektionskassette ausgewählt und die Rückwärtsprimer (A_L , B_L) komplementär zu Sequenzen, die 3' des kurzen Rekombinationsarmes auf dem chromosomalen Locus liegen. Bei den identifizierten homolog Rekombinanten wurde mittels einer zweiten nested-PCR-Analyse die Anwesenheit der ersten loxP-Sequenz überprüft. Hierbei bestand das erste Primerpaar (C_U/C_L) aus genspezifischen Sequenzen, die den Locus umgaben, in den die loxP-Sequenz eingefügt wurde. Das zweite Primerpaar wurde ausgewählt, entweder als Kombination von Primern aus genspezifischen Sequenzen (D_U/D_L) oder aus einem loxP-spezifischen Primer (E_U) und einem genspezifischen Primer (D_L oder C_L). Bei Verwendung von genspezifischen Primern entstand unabhängig von der Anwesenheit der loxP-Sequenz ein PCR-Produkt, das die native chromosomale Sequenz repräsentierte und zusätzlich ein zweites etwa 50 bp längeres PCR-Produkt, wenn es zur Integration der loxP-Sequenz gekommen war.

Dagegen amplifizierten die Primerpaare (E_U/C_L oder E_U/D_L) nur bei Anwesenheit der loxP-Sequenz ein spezifisches Produkt.

Mittels Southern-Blot-Hybridisierung wurde anschließend die genomische DNA auf die Vollständigkeit der homologen Rekombination des targeting-Vektors hin untersucht. Dabei entstanden bei einem homolog rekombinierten targeting-Vektor durch das Wegfallen oder Hinzukommen bestimmter Restriktionsschnittstellen Fragmente unterschiedlicher Länge, die mit radioaktiv markierten Sonden detektiert wurden. Zu diesem Zweck enthielten die Sonden Sequenzen, die im targeting-Vektor selbst nicht vorkamen. Für jeden targeting-Vektor wurden zwei Southern-Blot-Analysen entwickelt, die jeweils auf den Nachweis der Rekombination innerhalb des langen Rekombinationsarmes (5'-homologe Rekombination) und des kurzen Rekombinationsarmes (3'-homologe Rekombination) abzielten.

5.1.5.1 Nachweis homolog rekombinierter ES-Zellen für das α_1 -Gen

Nach der Elektroporation des α_1 -targeting-Vektors wurden 108 Klone isoliert und wie oben beschrieben analysiert.

Die nested-PCR-Analyse zur Identifizierung von homolog Rekombinanten wurde mit den Primern (PGK200/Hom- α_1L_5) als erstes Primerpaar (A_U/A_L s. Abb. 14) und den Primern (CLM6/Hom- α_1L_6) als zweites Primerpaar (B_U/B_L s. Abb. 14) durchgeführt. Bei positiven Klonen wurde ein ca. 3,2 kb langes Fragment amplifiziert. Von den getesteten 108 Klonen zeigten vier Klone eine entsprechende Bande auf dem Agarosegel, die auf eine erfolgte homologe Rekombination hindeutete. Bei diesen Klonen wurde mit der zweiten nested-PCR-Analyse, die Integration der ersten loxP-Sequenz untersucht. Dabei wurde mit dem ersten Primerpaar (loxP- α_1U_1 /loxP- α_1L_1 ; C_U/C_L s. Abb. 14) ein 921 bp langer Abschnitt amplifiziert. Innerhalb dieses Abschnittes hybridisierte in einer anschließenden Reaktion das zweite Primerpaar (loxP- α_1U_2 /loxP- α_1L_2 ; D_U/D_L s. Abb. 14) und amplifizierte einen 493 bp langen Abschnitt. Bei Vorhandensein der loxP-Sequenz zeigte sich ein zusätzliches 40 bp längeres Produkt.

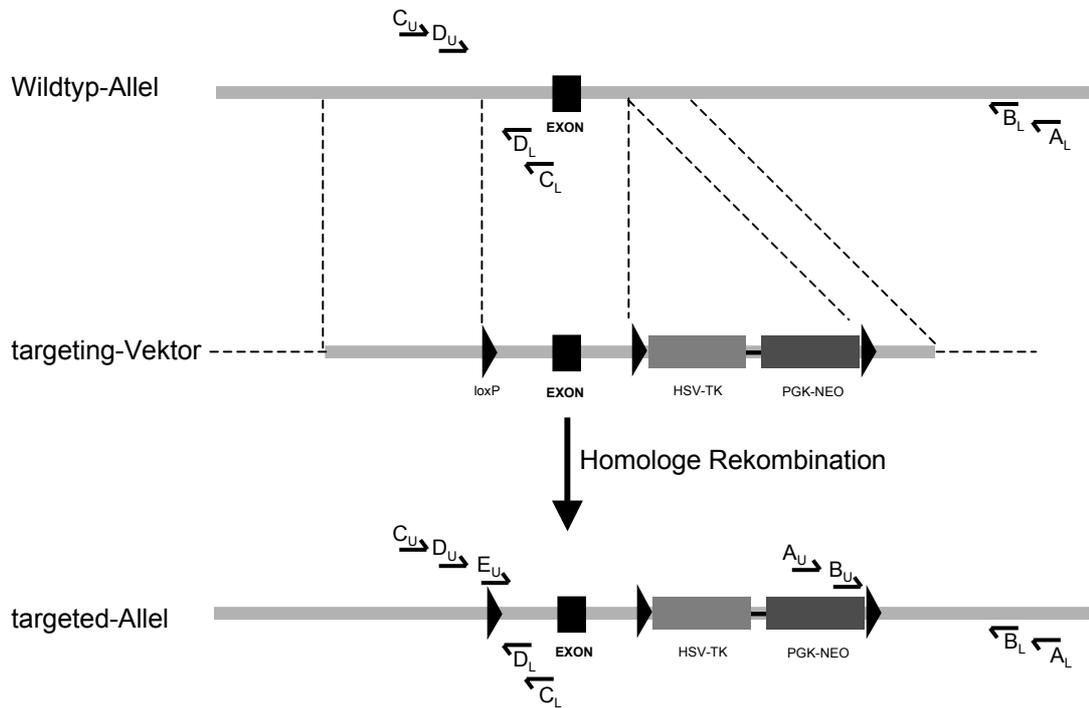


Abb. 14: Positionen der Primer für die nested-PCR-Analysen zum Nachweis der homologen Rekombination und der ersten loxP-Sequenz

Der Übersichtlichkeit wegen werden die Primer hier nur alphabetisch aufgeführt. Die Zuordnung der allgemeinen Bezeichnungen zu den verwendeten Primern und die Primer-Sequenzen sind in Materialienkapiteln 3.3.1 und 3.3.2 zu finden. Die genomischen Sequenzen sind als graue Balken dargestellt, die Vektorbereiche sind gestrichelt. Die Rechtecke sind kodierende Sequenzen (Exon und Selektionsmarkergene). Die Dreiecke symbolisieren die loxP-Sequenzen. Die gestrichelten Linien zwischen Vektor und Wildtyp-Allel repräsentieren die Insertionsstellen für die Selektionsmarkergene und die loxP-Sequenzen sowie die genspezifischen Fragmente, die in dem targeting-Vektor enthalten sind.

Zum Nachweis der homologen Rekombination wurden die Primer A_U/A_L als erstes Primerpaar und die B_U/B_L als zweites verwendet. Dabei entsteht nur bei homolog Rekombinanten ein PCR-Produkt, da die beiden Upper-Primer an das Neo-Gen hybridisieren.

Zum Nachweis der ersten loxP-Sequenz wurden die Primer C_U/C_L als erstes Primerpaar und die D_U/D_L bzw. E_U/D_L als zweites verwendet. Mit den Primerpaaren C und D entstehen jeweils zwei Produkte. Das ein Produkt enthält die Wildtyp-Sequenz und das zweite, längere enthält die homologe Sequenz mit der loxP aus dem targeting-Vektor. Dagegen entsteht ein PCR-Produkt mit dem Primerpaar E_U/D_L nur bei Anwesenheit der loxP-Sequenz im Genom der ES-Zellen.

Nur bei einem der vier homolog Rekombinanten konnte die loxP-Sequenz nachgewiesen werden. Dieser Klon (1A8) wurde aus der Replikaplatte aufgetaut und weiter kultiviert, um die für die anschließenden Southern-Blot-Analysen notwendige größere Menge an genomischer DNA zu gewinnen. Nach der Lysis der Zellen wurde die isolierte genomische DNA mit je einer der Restriktionsendonukleasen NheI und BamHI verdaut. Eine graphische Darstellung der Southern-Blot-Strategien mit den erwarteten Fragmenten und die Positionen der Sonden ist in Abbildung 15 zu sehen. Zum Nachweis der 5'-homologen Rekombination wurde die genomische DNA mit der Restriktionsendonuklease NheI verdaut. Dabei entstand aus dem Wildtyp-Allel ein 13 kb langes Fragment und aus dem veränderten Allel (targeted-Allel) ein 11 kb langes Fragment (Abb. 16A). Als 5'-Sonde diente ein 491 bp langes Fragment. Zum Nachweis der 3'-homologen Rekombination wurde die genomische DNA mit dem Enzym BamHI verdaut.

Hierbei wurden ein 12 kb langes Wildtyp-Fragment und zusätzlich ein 8 kb langes Fragment bei erfolgter Veränderung des einen Allels detektiert (siehe Abb. 16A). Die hierbei verwendete 3'-Sonde (450 bp) hybridisierte ebenfalls wie die 5'-Sonde mit Sequenzen außerhalb des targeting-Vektors.

5.1.5.2 Nachweis homolog rekombinierter ES-Zellen für das α_2 -Gen

Die nach der Elektroporation des α_2 -targeting-Vektors isolierten ES-Zellen, die die Selektion mit G418 überlebten, wurden in einer nested-PCR-Analyse auf homologer Rekombination des kurzen Rekombinationsarmes hin untersucht. Die Analyse wurde nacheinander mit den Primern (PGK200/Hom α_2 L₄) als erstes Primerpaar (A_U/A_L s. Abb. 14) und den Primern (CLM6/Hom α_2 L₃) als zweites Primerpaar (B_U/B_L s. Abb. 14) durchgeführt. Bei homolog Rekombinanten wurde ein ca. 2,1 kb langes Fragment amplifiziert. Bei diesen Klonen wurde mit der zweiten nested-PCR-Analyse die Integration der ersten loxP-Sequenz untersucht. Dabei wurde mit dem ersten Primerpaar (P α_2 U₅/P α_2 L₁; s. C_U/C_L Abb.14) ein 915 bp langes Fragment amplifiziert und zusätzlich ein 955 bp langes Fragment, wenn es zur Integration der loxP-Sequenz gekommen war. Innerhalb dieser Abschnitte hybridisierte in einer anschließenden Reaktion das zweite Primerpaar (P α_2 U₃/P α_2 L₃; D_U/D_L s. Abb. 14) und amplifizierte ein 505 bp langes PCR-Produkt und bei Anwesenheit der loxP-Sequenz ein zusätzliches 545 bp langes Produkt. Bei Verwendung der Primer (loxP/P α_2 L₃) als zweites Primerpaar (E_U/D_L s. Abb. 14) entstand nur ein 323 bp langes Fragment, das die Integration der loxP-Sequenz anzeigte. Von den als homolog rekombiniert identifizierten Klonen enthielten nur 20 % die erste loxP-Sequenz. Bei diesen positiven Klonen wurde die homologe Rekombination zusätzlich mittels Southern-Blot-Hybridisierung verifiziert.

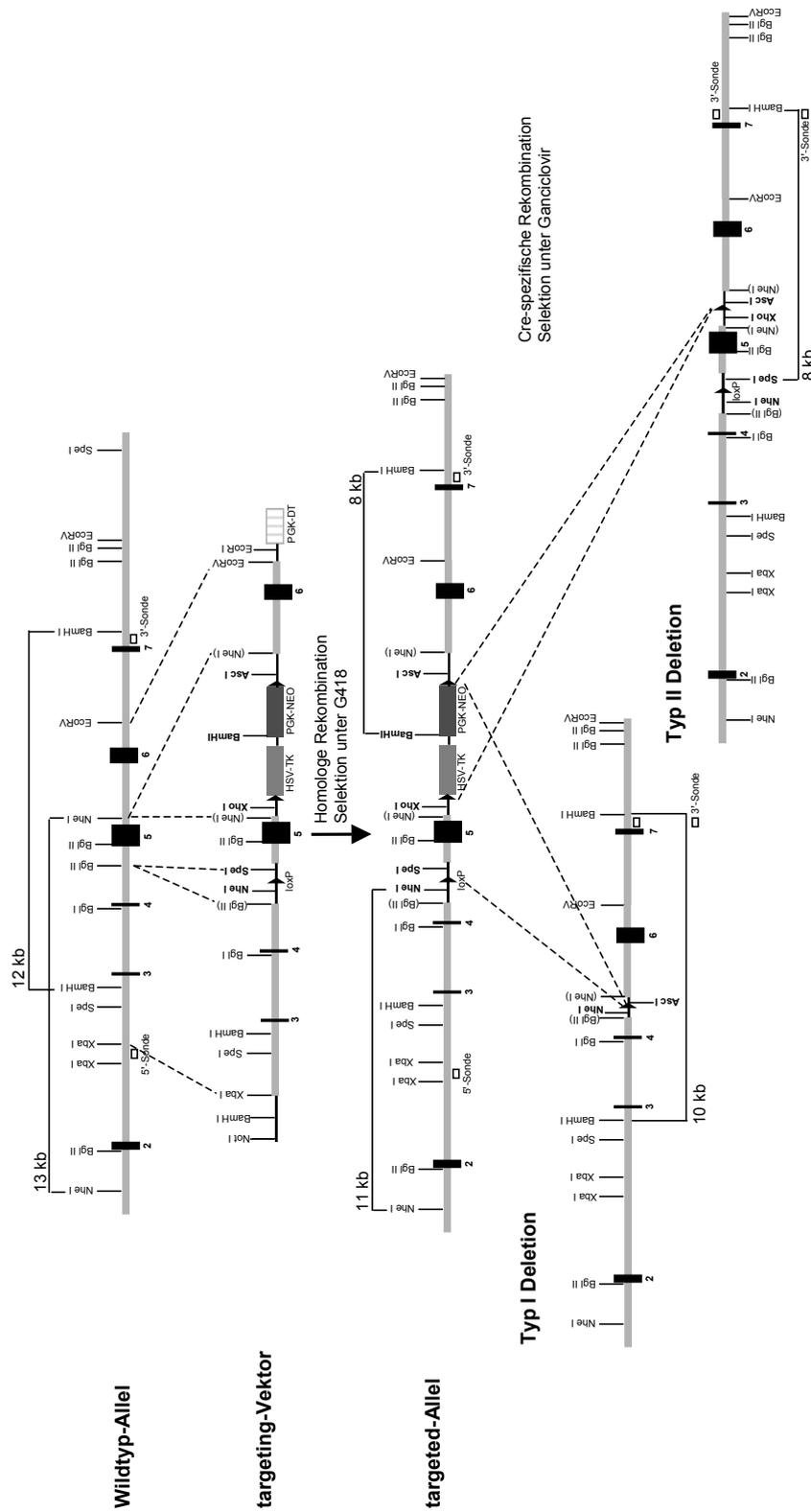


Abb. 15: Schematische Darstellung der Southern-Blot-Analyse für das α_1 -Gen

Gezeigt sind die Sequenz des Wildtyp-Allels für das α_1 -Gen im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz des targeted-Allels nach der Veränderung durch den Einbau des targeting-Vektors sowie nach der Cre-vermittelten Rekombination. Die genomischen α_1 -Sequenzen sind grau, die Vektor-Sequenz ist schwarz dargestellt. Nicht auf der Wildtyp-Sequenz vorhandene Restriktionsstellen sind fett gekennzeichnet, inaktivierte Restriktionsstellen sind in Klammern gesetzt. Die vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen die Positionen von neu eingeführten Sequenzabschnitten bzw. deletierten Bereichen. Die bei der Southern-Blot-Analyse detektierten Fragmente sind mit der jeweiligen Größe in Basenpaaren gezeichnet, an ihren Enden sind die verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. Die als 5' und 3' Sonden verwendeten DNA-Fragmente wurden mit PCR amplifiziert (Primer-Sequenzen siehe 3.3.4), subkloniert (siehe 4.5.5), aufgereinigt (siehe 4.5.3) und anschließend radiokativ markiert (siehe 4.6.2).

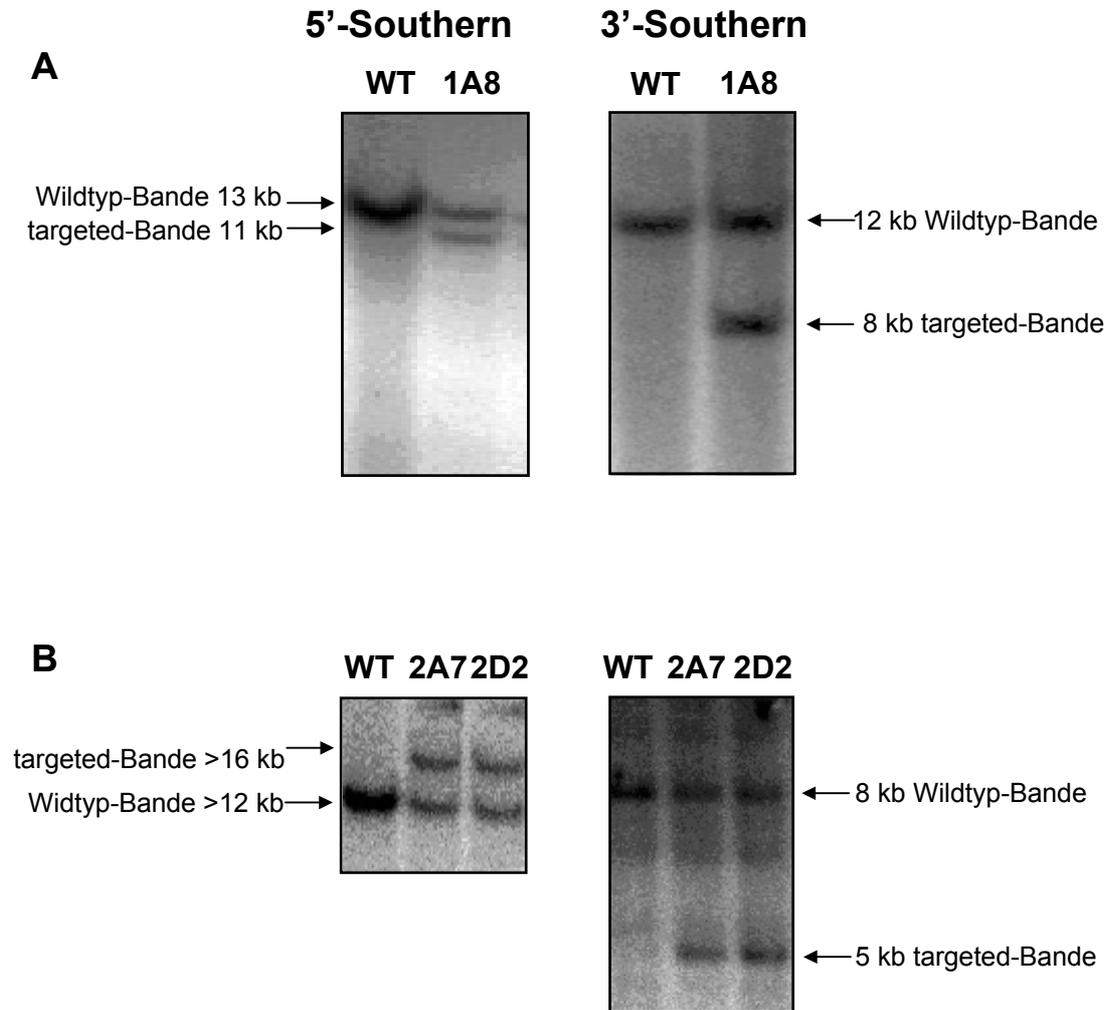


Abb. 16: Identifizierung homolog rekombinierter Klone mittels Southern-Blot Hybridisierung

(A) Nachweis der 5'-homologen Rekombination (links) und 3'-homologen Rekombination (rechts) für die α_1 -Untereinheit (siehe Abb. 15) am Beispiel des positiv identifizierten 1A8-Klons.

(B) Nachweis der 5'-homologen Rekombination (links) und 3'-homologen Rekombination (rechts) für die α_2 -Untereinheit (Abb. 17) am Beispiel der positiv identifizierten Klone 2A7 und 2D2.

Gleichzeitig mit der genomischen DNA der zu untersuchenden Klone wurde unbehandelte genomische DNA der Maus (WT) als Kontrolle analysiert.

Zum Nachweis der 3'-homologen Rekombination wurde die genomische DNA mit BamHI verdaut und mit einem 419 bp radioaktiv markierten Fragment detektiert. Dabei entstand aus dem Wildtyp-Allel ein 8 kb langes Fragment und aus dem targeted-Allel ein entsprechendes 5 kb langes Fragment. Die 5'-homologe Rekombination wurde nach einem Verdau mit NheI und Hybridisierung mit einer 453 bp langen Sonde überprüft. Hierbei entstand neben dem Wildtyp-Fragment (>12 kb) nach erfolgter Rekombination das um 3 kb verlängerte entsprechende Fragment aus dem targeted-Allel. Die Southern-Blot-Analyse mit den entsprechenden Fragmenten und der Position der Sonden ist schematisch in der Abbildung 17 dargestellt. Eine exemplarische Darstellung der Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung ist in der Abbildung 16B zu sehen. Am Ende standen zwei der positiven Klone (2A7 und 2D2) den weiteren Experimenten zur Verfügung.

5.1.6 Transfektion der Cre-Rekombinase in die homolog rekombinierten ES-Zellen

In einem zweiten Schritt sollte die Selektionskassette aus dem Genom der homolog rekombinierten ES-Zellen entfernt werden. Dazu wurden die ES-Zellen mit einem für die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid elektroporiert. Der transient exprimierten Cre-Rekombinase standen drei loxP-Sequenzen als Substrate zur Verfügung. Daraus resultierten drei unterschiedliche Cre-vermittelte Modifikationen des targeted-Allels (Abb. 18). Bei einer Rekombination zwischen den beiden äußeren loxP-Sequenzen erfolgte eine Deletion des markierten Exons und der Selektionskassette, wodurch das Typ I Deletionsprodukt entstand. Die Rekombination zwischen der zweiten und der dritten loxP-Sequenz führte zum Ausschneiden der Selektionskassette und lieferte das gewünschte Produkt der Typ II Deletion. Gegen das dritte mögliche Produkt (Typ III), bei dem die Selektionskassette erhalten blieb, wurde während der Kultivierung in Gegenwart von Ganciclovir negativ selektioniert. Im weiteren Text werden die ES-Klone mit einer Typ I Deletion als del und die mit einer Typ II Deletion als flox (flanked by loxP-sites) bezeichnet.

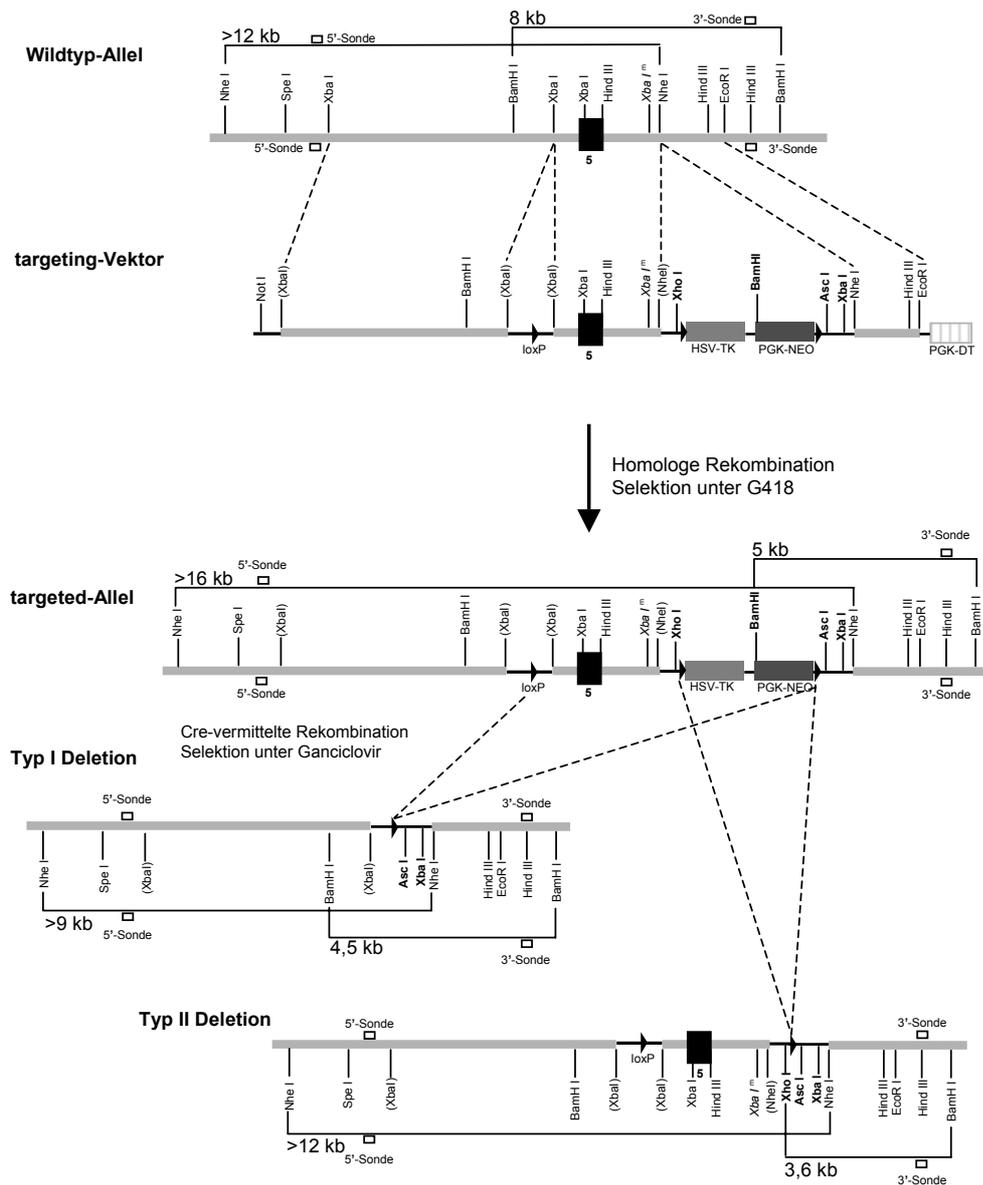
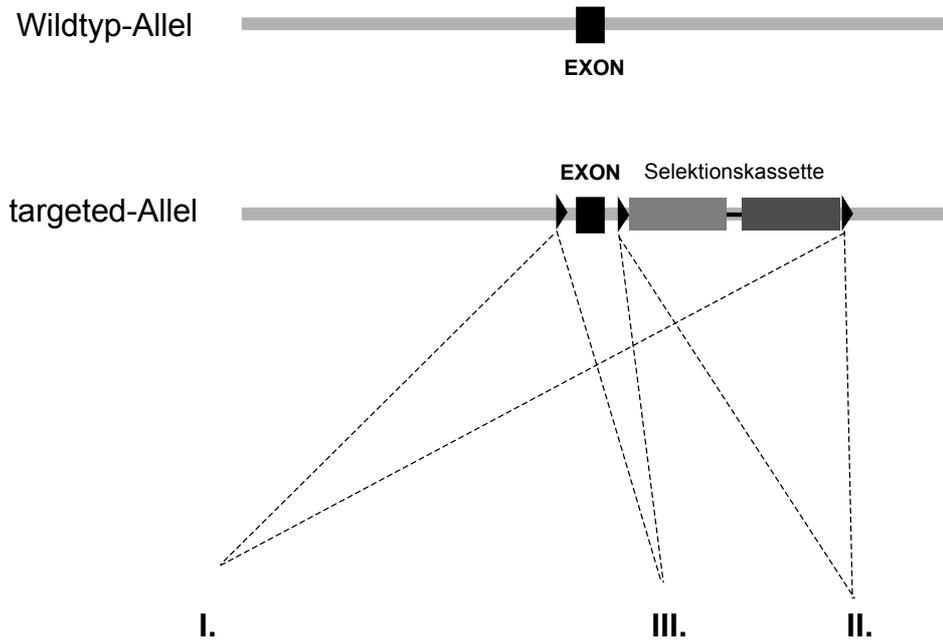


Abb. 17: Schematische Darstellung der Southern-Blot-Analyse für das α_2 -Gen

Gezeigt sind die Sequenz des Wildtyp-Allels für das α_2 -Gen im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz des targeted-Allels nach der Veränderung durch den Einbau des targeting-Vektors sowie nach der Cre-vermittelten Rekombination. Die genomische α_1 -Sequenz ist grau, die Vektor-Sequenz schwarz dargestellt. Nicht auf der Wildtyp-Sequenz vorhandene Restriktionsstellen sind fett gezeichnet, inaktivierte Restriktionsstellen sind in Klammern gesetzt. Die vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen die Positionen von neu eingeführten Sequenzabschnitten bzw. deletierten Bereichen. Die bei der Southern-Blot-Analyse detektierten Fragmente sind mit der jeweiligen Größe in Basenpaaren gezeichnet, an ihren Enden sind die verwendeten Restriktionsenzyme angegeben. Die als 5' und 3' Sonden verwendeten DNA-Fragmente wurden mit PCR amplifiziert (Primer-Sequenzen siehe 3.3.4), subkloniert (siehe 4.5.5), aufgereinigt (siehe 4.5.3) und anschließend radiokativ markiert (siehe 4.6.2).



Cre-vermittelte Rekombination

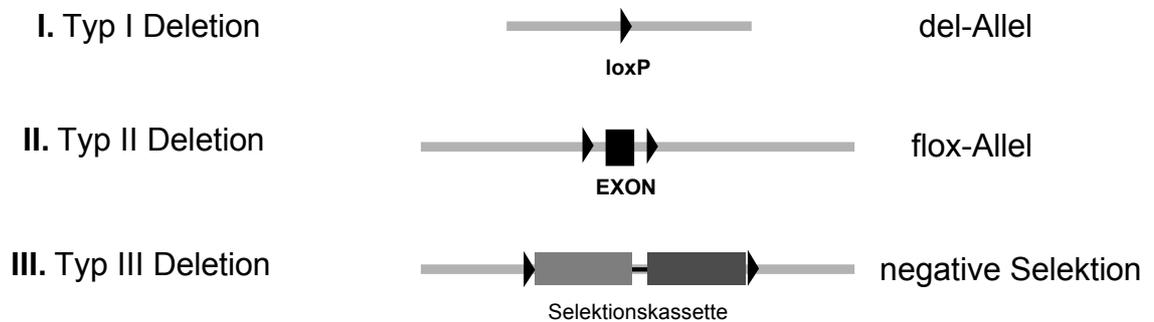


Abb. 18: Schematische Darstellung der Cre-vermittelten Rekombinationsereignisse

Das veränderte Allel (targeted-Allel) bei homolog rekombinanten ES-Zellen enthält drei loxP-Sequenzen. Nach transienter Expression der Cre-Rekombinase kommt es zu drei unterschiedlichen Cre-vermittelten Modifikationen des targeted-Allels (del, flox und Typ III Deletion). Die Cre-vermittelte Rekombination erfolgt jeweils zwischen zwei loxP-Sequenzen (schwarzes Dreieck) und führt zur Entfernung der dazwischen liegenden Sequenz.

5.1.6.1 Nachweis von ES-Zellen mit einem geflochten Allel für das α_1 -Gen

Der homolog rekombinierte 1A8-Klon wurde mit einem für die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid transient transfiziert. 216 Klone, die die Selektion mit Ganciclovir überlebten, wurden isoliert und analysiert. Mittels einer PCR-Analyse mit dem Primerpaar loxP- α_1 U₁/F₁L₁ (Abb.19) wurde zwischen den Klonen unterschieden, in denen eine del- oder möglicherweise eine flox-Modifikation des targeted-Allels vorkam. Bei del-Klonen wurde ein ca. 1 kb langes Fragment amplifiziert, während die gleichzeitige konkurrierende Amplifikation des 2,8 kb langen Fragmentes aus dem Wildtyp-Allel nur mäßig stattfand (Abb. 19A). Bei den flox-Klonen wurde ein 2,9 kb langes Fragment amplifiziert, das von der 2,8 kb langen Wildtyp-Bande nicht zu unterscheiden war (Abb. 19A). In einer darauf folgenden PCR mit dem Primerpaar F₁U₁/F₁L₁ wurden die flox-Klone von Wildtyp-Klonen oder solchen, in denen keine Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hatte, unterschieden. Dabei entstand bei den flox-Klonen, eine Doppelbande von 880 bp und 920 bp (Abb. 19B). Dagegen wurde bei nicht flox-Klonen nur die 880 bp Wildtyp-Bande sichtbar. Von den 216 getesteten Klonen ließen sich 19 als flox und 78 als del identifizieren.

Bei den flox-Klonen wurde mittels Southern-Blot-Hybridisierung die 5'- und 3'-homologe Rekombination verifiziert. Dazu wurden die gleichen Sonden verwendet, wie bei dem Nachweis von homolog Rekombinanten (siehe Abb. 15). Zum Nachweis der 5'-homologen Rekombination wurde die genomische DNA mit NheI verdaut, und die gleichen Fragmente wie bei der Identifizierung der homolog Rekombinanten detektiert. Es entstand also ein 13 kb langes Fragment aus dem Wildtyp-Allel und daneben ein 11 kb langes Fragment aus dem veränderten Allel des α_1 -Gens. Zum Nachweis der 3'-homologen Rekombination wurde die genomische DNA mit BamHI und SpeI verdaut. Hierbei entstand neben dem 12 kb langen Fragment aus dem Wildtyp-Allel ein entsprechendes 8 kb langes Fragment aus dem geflochten Allel des α_1 -Gens. Die Southern-Blot-Analyse ist in der Abbildung 15 schematisch dargestellt und die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 20A zu sehen.

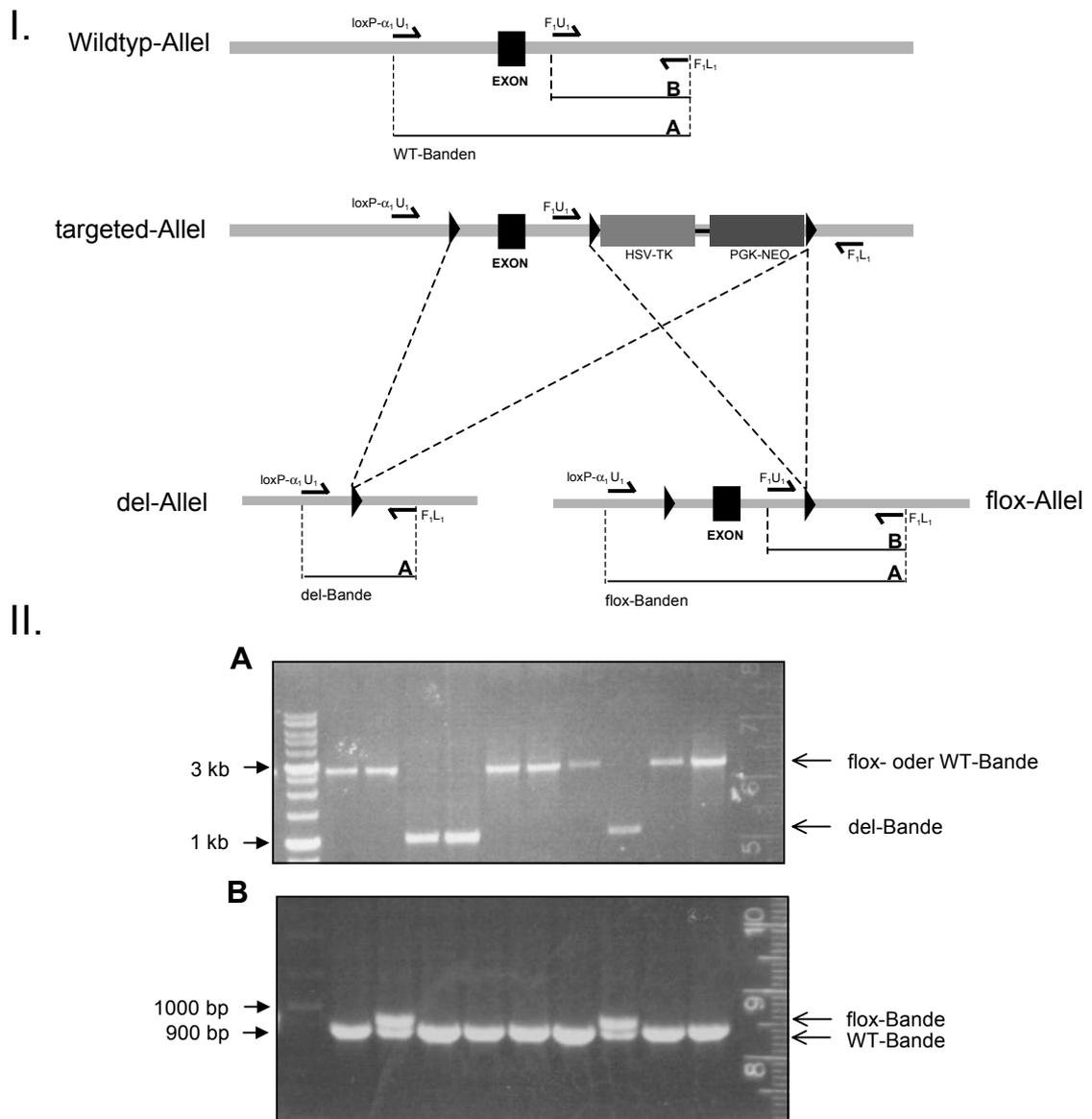


Abb. 19: PCR-Analyse zur Identifizierung von flox-Klonen für das α_1 -Gen

I. Schematische Darstellung der Primer-Positionen und der daraus amplifizierten Fragmente. Die Primer-Sequenzen sind unter Materialien 3.3.2 und 3.3.3 enthalten.

II. Exemplarische Ergebnisse der PCR-Analyse. Ca. 200 ng genomische DNA der zu untersuchenden ES-Klone wurden in einer nested-PCR-Analyse zuerst mit dem Primerpaar ($\text{loxP-}\alpha_1\text{U}_1/\text{F}_1\text{L}_1$) und anschließend mit dem Primerpaar ($\text{F}_1\text{U}_1/\text{F}_1\text{L}_1$) untersucht.

(A) PCR-Produkte der Primerkombination ($\text{loxP-}\alpha_1\text{U}_1/\text{F}_1\text{L}_1$). Hierbei wurden unter der untersuchten Klone solche mit einer del-Modifikation identifiziert und aussortiert.

(B) PCR-Produkte der Primerkombination ($\text{F}_1\text{U}_1/\text{F}_1\text{L}_1$). Das hierbei verwendete Primerpaar hybridisierte innerhalb der erst amplifizierten flox- bzw. WT-Bande. Bei flox-Klonen wurde neben der WT-Bande (880 bp) zusätzlich eine zweite Bande (920 bp) amplifiziert.

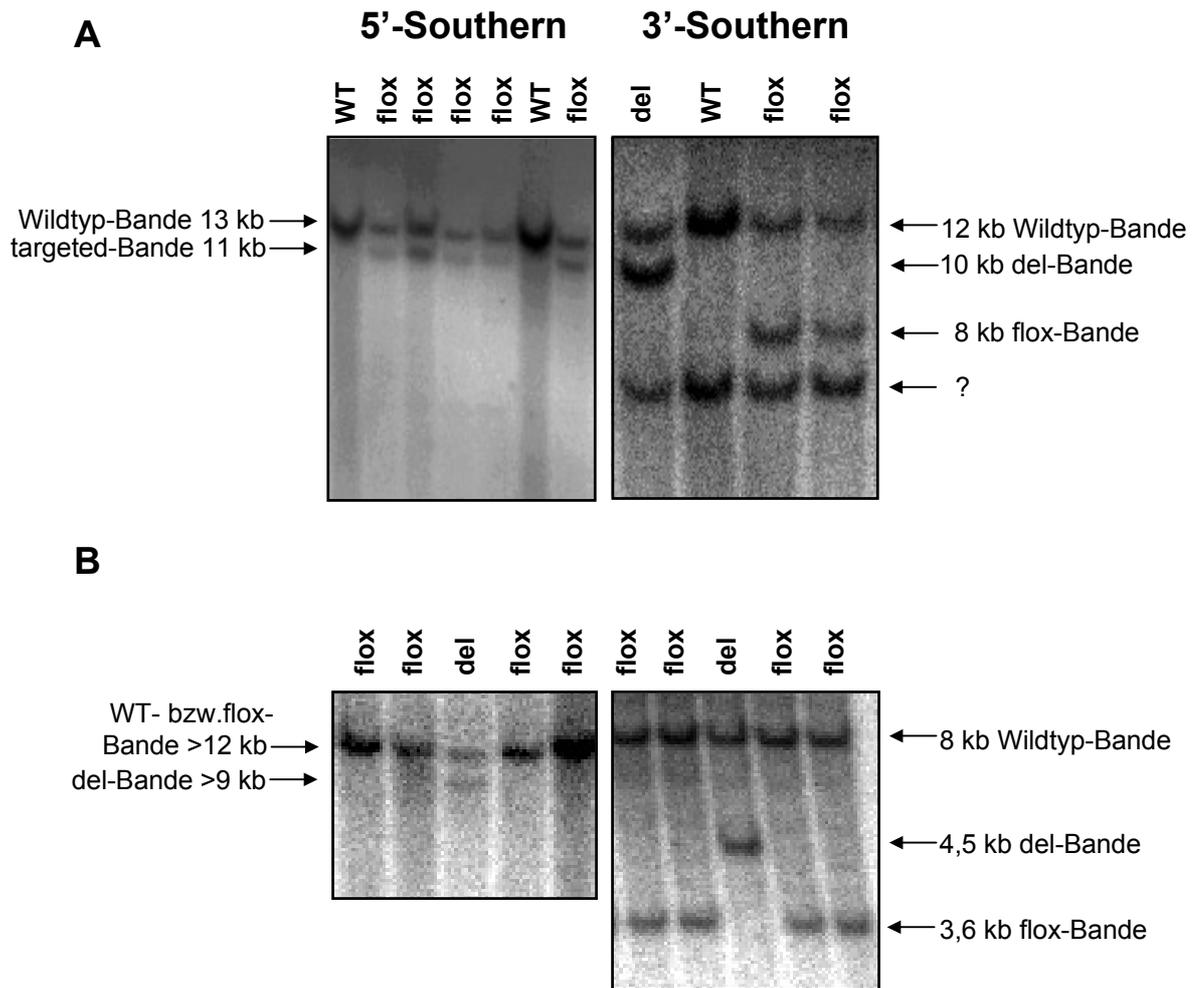


Abb. 20: Southern-Blot-Analyse zur Identifizierung von flox- und del-Klonen

(A) Identifizierung von Klonen, die entweder ein flox- oder del-Allel des α_1 -Gens enthalten.

Links: Nachweis der 5'-homologen Rekombination; die genomische DNA wurde mit NheI verdaut und der 5'-Sonde hybridisiert (siehe Abb. 15).

Rechts: Nachweis der 3'-homologen Rekombination; die genomische DNA wurde mit BamHI und SpeI verdaut und der 3'-Sonde hybridisiert (siehe Abb. 15).

(B) Identifizierung von Klonen, die entweder ein flox- oder del-Allel des α_2 -Gens enthalten.

Links: Nachweis der 5'-homologen Rekombination; die genomische DNA wurde mit NheI verdaut und der 5'-Sonde hybridisiert (siehe Abb. 17).

Rechts: Nachweis der 3'-homologen Rekombination; die genomische DNA wurde mit BamHI und XhoI verdaut und der 3'-Sonde hybridisiert (siehe Abb. 17).

Gleichzeitig mit der genomischen DNA der zu untersuchenden Klone wurde unbehandelte genomische DNA der Maus (WT: Wildtyp) als Kontrolle analysiert.

5.1.6.2 Nachweis von ES-Zellen mit einem geflochten Allel für das α_2 -Gen

Zur Entfernung der Selektionskassette wurde der homolog rekombinierte 2D2-Klon mit einem für die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid elektroporiert. Insgesamt wurden aus zwei unabhängigen Elektroporationen des 2D2-Klones mit dem Cre-Plasmid 433 Klone, die die Ganciclovir Selektion überlebten, isoliert und analysiert. Die Identifizierung von flox-Klonen erfolgte zuerst in einer PCR-Analyse (Primerpaar: F₂U₁/F₂L₂, Abb. 21). Dabei wurde bei den flox-Klonen ein ca. 760 bp langes PCR-Produkt aus dem Wildtyp-Allel und zusätzlich ein ca. 800 bp langes PCR-Produkt aus dem geflochten-Allel amplifiziert (siehe Abb. 21). Anschließend wurde bei den flox-Klonen, wie unter 5.1.5.2 aufgeführt, das Vorhandensein der ersten loxP-Sequenz gesichert. Ebenfalls wurde mittels Southern-Blot-Hybridisierung die 5'- und 3'-homologe Rekombination verifiziert, wodurch auch eine Bestätigung der flox-Modifikation erfolgte. Eine schematische Darstellung der Southern-Blot-Analyse ist in der Abbildung 17 gezeigt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 20B dargestellt.

Zum Nachweis der 5'-homologen Rekombination wurde die genomische DNA mit NheI verdaut. Dabei entstand bei einem flox-Klon im Unterschied zu einem homolog rekombinierten Klon nur ein Fragment, das dem Wildtyp-Fragment entsprach. Bei einem del-Klon entstand dagegen noch ein zweites um 3 kb kürzeres Fragment. Zum Nachweis der 3'-homologen Rekombination wurde die genomische DNA mit BamHI und XhoI verdaut. Die flox-Modifikation des zuvor homolog rekombinierten Allels wurde durch die Entstehung eines 3,6 kb langen Fragmentes zusätzlich zu dem 8 kb langen Wildtyp-Fragment angezeigt. Im Unterschied dazu entstand bei einer del-Modifikation des zuvor homolog rekombinierten Allels ein 4,5 kb langes Fragment zusätzlich zu dem 8 kb langen Fragment aus dem Wildtyp-Allel.

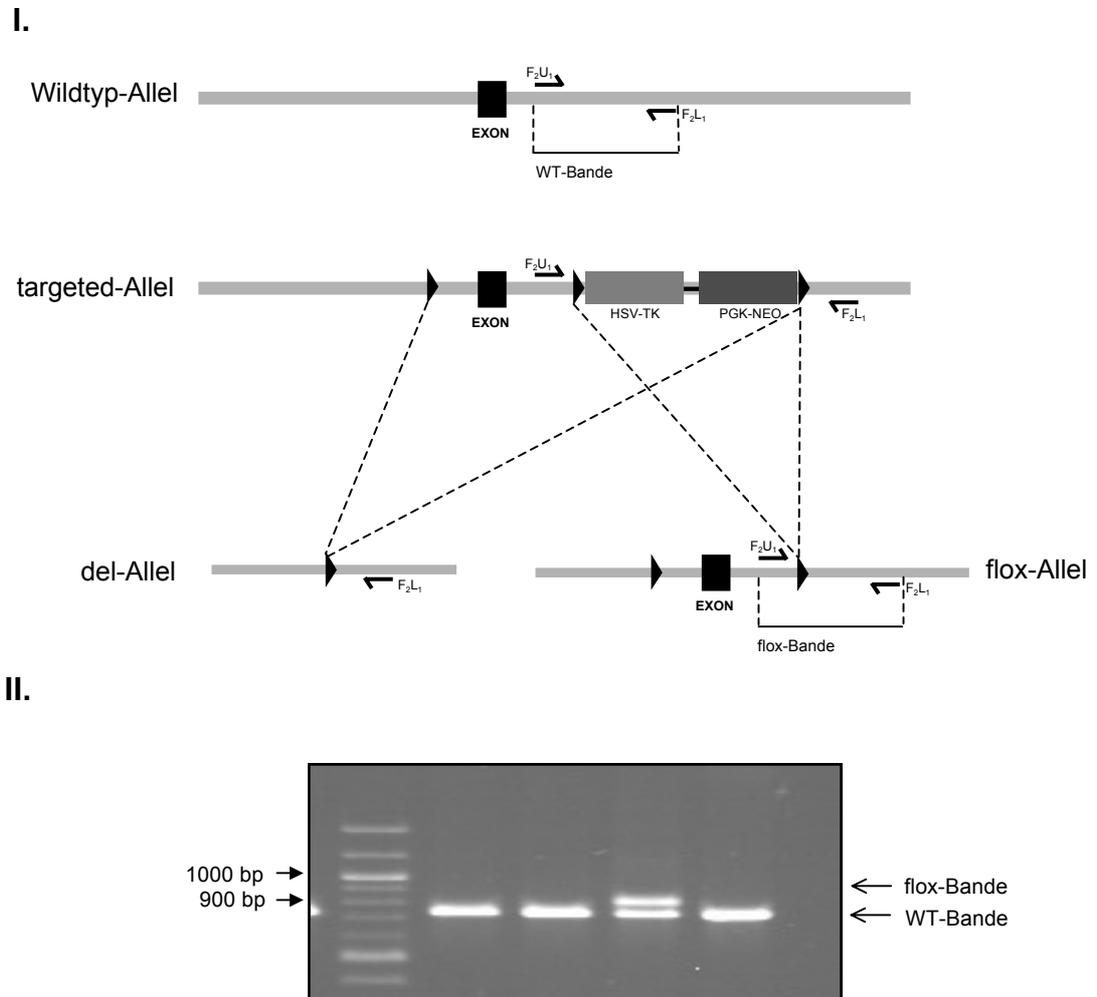


Abb. 21: PCR-Analyse zur Identifizierung von flox-Klonen für das α_2 -Gen

I. Schematische Darstellung der Primer-Positionen und der daraus amplifizierten Fragmenten. Die Primer-Sequenzen sind im Materialienkapitel 3.3.3 enthalten.

II. Exemplarische Ergebnisse der PCR-Analyse. Ca. 200 ng genomische DNA der zu untersuchenden ES-Klone wurden in einer PCR-Reaktion mit dem Primerpaar (F_2U_1/F_2L_1) analysiert. Die flox-Modifikation des einen Allels für das α_2 -Gen wurde durch die Amplifizierung einer Doppelbande (ca. 760 bp und 800 bp) angezeigt.

5.2 Untersuchung der Expression der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten in verschiedenen Geweben der Maus

In Hinblick auf die Generierung konditioneller Knock-out-Mäuse, in denen die Inaktivierung des α_1 - oder α_2 -Gens nicht nur im Gesamtorganismus, sondern auch in einzelnen Geweben oder Zelltypen zu bestimmten Zeitpunkten beabsichtigt wird, sind Kenntnisse über die Gewebeverteilung der α -Untereinheiten von großer Bedeutung. Dabei war es von Interesse nicht nur das Vorkommen der α -Untereinheiten in den verschiedenen Mausgeweben nachzuweisen, sondern vielmehr ihr relatives Verhältnis zu bestimmen. Eine vergleichende Untersuchung der α -Untereinheiten auf Proteinebene kam aufgrund der mangelnder Sensitivität der vorhandenen Antikörper nicht in Frage. Im Gehirn und in der Lunge konnten zwar in Western-Blot-Analysen beide Proteine nachgewiesen werden, weitere Gewebe zeigten dagegen nur marginale oder gar keine Proteinsignale. Im Unterschied zu diesen Befunden konnte aus qualitativen Untersuchungen zum Vorkommen der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten auf mRNA-Ebene, ein ubiquitäres Vorkommen postuliert werden. Durch die relative Quantifizierung der mRNA der α -Untereinheiten sollten die Gewebe identifiziert werden, in denen die jeweilige α -Untereinheit von physiologischer Relevanz sein kann. Neben den α -Untereinheiten sollte auch der relative mRNA-Gehalt der β_1 -Untereinheit mitbestimmt werden, da eine katalytisch aktive Guanylyl-Cyclase als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht, und die β_1 -Untereinheit als der *in vivo*-Dimerisierungspartner beider α -Untereinheiten nachgewiesen worden war.

Als Methode zur Durchführung dieser Analyse wurde die real-time quantitative PCR ausgewählt. Die real-time quantitative PCR ist eine aktuelle Weiterentwicklung der PCR. Hierbei wird fortlaufend während der Reaktion die Menge des gebildeten PCR-Produktes gemessen. Die Messung basiert auf der Erfassung eines Fluoreszenzsignals, dessen Intensität proportional zum gebildeten Produkt ist. Im Vergleich zu anderen Methoden der mRNA-Quantifizierung liegen die Vorteile der real-time quantitativen PCR in der Sensitivität der Messungen und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Auch ist die Durchführung des eigentlichen Experimentes vergleichsweise einfach und schnell.

Vor den eigentlichen Messungen wurden Vorexperimente durchgeführt, in denen die ausgewählten Primerpaare bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität zur Ziel-cDNA getestet, und die optimalen Primer-Konzentrationen bestimmt wurden. In weiteren Testmessungen wurde die Menge der Gesamt-cDNA bestimmt, die als Template in die real-time PCR eingesetzt werden konnte, ohne die Reaktion zu hemmen.

Allerdings konnte die Menge der als Template eingesetzten Gesamt-cDNA nicht direkt quantifiziert werden. Der Vergleich der Messwerte aus den verschiedenen cDNA-Proben erfolgte mit Hilfe eines Standards, der die Normierung der cDNA-Proben erlaubte. Als

Standard wurde das GAPDH-Gen verwendet, bei dem davon ausgegangen wurde, dass es gleichmäßig in den meisten Geweben exprimiert wird. Die Ergebnisse wurden anschließend als Prozentsatz vom β_1 -Messwert im Gehirn (100%) ausgedrückt. Die relative Quantifizierung der mRNA-Mengen, die für die Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase kodieren, sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt.

Die mRNA-Expression wurde zuerst im gesamten Gehirn der Maus untersucht (siehe Abb. 22). Die dort gemessenen Mengen für die α_1 - und α_2 -Untereinheit (je 43 %) waren annähernd identisch. Darüber hinaus entsprach der Gesamtgehalt beider α -Untereinheiten annähernd dem mRNA-Gehalt der β_1 -Untereinheit (100 %). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem Nachweis der β_1 -Untereinheit als der in vivo-Dimerisierungspartner beider α -Untereinheiten und deutet außerdem daraufhin, dass die mRNAs der Untereinheiten mit ähnlicher Effizienz translatiert werden.

Beide Heterodimere ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) der Guanylyl-Cyclase wurden also im gesamten Gehirn in gleichen Mengen nachgewiesen. Um das Expressionsmuster der Heterodimere zu analysieren, wurde das Vorkommen der Untereinheiten in verschiedenen Gehirnregionen bestimmt. In jeder der untersuchten Gehirnregionen wurden beide α -Untereinheiten nachgewiesen. Wie in der Abbildung 22 gezeigt wird, unterscheidet sich die Expression der α -Untereinheiten in den untersuchten Gehirnregionen nicht wesentlich voneinander; lediglich ihr relatives Gehalt variierte mäßig. So wurde für die α_2 -Untereinheit eine vergleichsweise höhere Expression im Hippokampus (62 % vs. 17 %), Kleinhirn (41 % vs. 22 %) und Medulla oblongata (75 % vs. 45 %) gemessen. In allen anderen untersuchten Regionen war der Gehalt beider α -Untereinheiten vergleichbar.

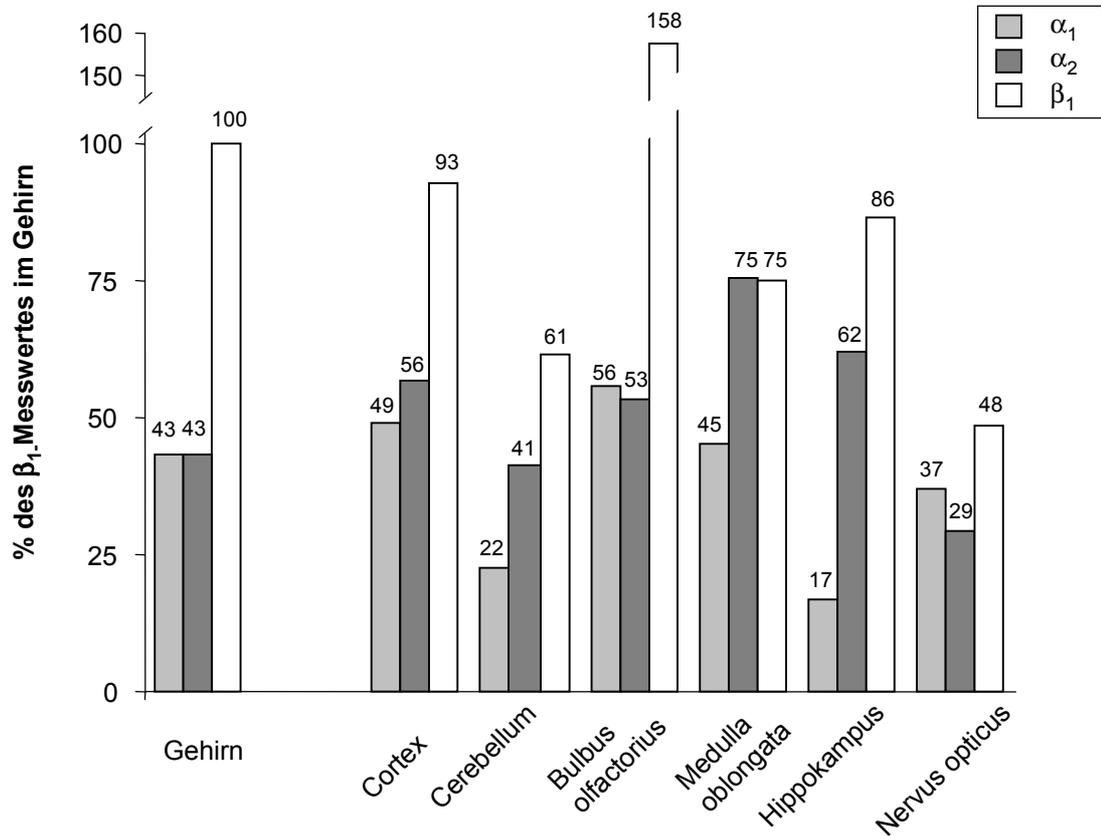


Abb. 22: Relatives Vorkommen der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in Gesamthirn und verschiedenen Gehirnregionen der Maus

Der Gehalt der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten (α_1 , α_2 , β_1) wurde mit Hilfe der real-time quantitativen PCR in den angegebenen Gehirnregionen der Maus bestimmt. Dabei wurde der Gehalt vom GAPDH mitbestimmt und als Standard verwendet, um die verschiedenen Messwerte untereinander vergleichen zu können (siehe 4.7.4.4). Die ermittelten $\overline{\Delta C_T}$ -Werte sind in der Tabelle 2 enthalten. Das Vorkommen jeder Guanylyl-Cyclase-Untereinheit wurde anschließend als Prozentsatz vom β_1 -Messwert im Gehirn (100 %) ausgedrückt.

Weiter wurde die Expression der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten in peripheren Geweben untersucht, in denen ein relativ hoher Guanylyl-Cyclase-Gehalt zu erwarten war. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 23 dargestellt. Beeindruckend ist hierbei die außergewöhnlich hohe Expression des Enzyms in der Lunge, die etwa 3-mal höher als die im Gehirn ist. Im Unterschied zum Gehirn, stellte aber die α_1 -Untereinheit die überwiegend exprimierte Untereinheit in der Lunge und den anderen Geweben dar, obwohl auch mRNA für die α_2 -Untereinheit identifiziert wurde. In der Lunge beträgt der Gehalt der α_2 -Untereinheit nur 15 % des der α_1 -Untereinheit, obwohl insgesamt ihr Gehalt mit dem im Gehirn vergleichbar ist. Wie schon vorher erwähnt, wurde der mRNA-Gehalt der Untereinheiten der Guanylyl-Cyclase mit Hilfe des mRNA-Gehaltes von GAPDH normiert, von dem eine vergleichsweise konstante Expression in den meisten Geweben vorausgesetzt wurde. Tatsächlich zeigte aber der vergleichende Nachweis vom GAPDH in einer Western-Blot-Analyse eine geringere Expression in der Lunge als im Gehirn. Die anschließende Quantifizierung der Signale ergab, dass die GAPDH-Expression in der Lunge nur 50 % der im Gehirn nachgewiesenen Expression beträgt. Dadurch ließ sich der tatsächliche Gehalt der Guanylyl-Cyclase in der Lunge auf die Hälfte des vorher ermittelten korrigieren. Auch nach der Korrektur bleibt die Lunge das Gewebe mit dem höchsten Gehalt an Guanylyl-Cyclase, und das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer wurde als die Hauptisoform nachgewiesen. Zusätzlich dazu ließ sich zeigen, dass das $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird. Western-Blot-Experimente aus unserer Arbeitsgruppe bestätigten die Ergebnisse, dass die α_2 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird, während vergleichsweise die α_1 -Untereinheit überwiegend in der Lunge vorkommt. Außerdem war es durch die anschließende Quantifizierung der Proteinbanden möglich die Translationseffizienz der α_1 - und α_2 -mRNA zu ermitteln. Dazu wurden die Messwerte aus der real-time quantitativen PCR für die α_1 - und α_2 -mRNA in Gehirn und Lunge mit den entsprechenden Proteinwerten aus den quantifizierten Western-Blots in Beziehung gesetzt. Es ließ sich eine vergleichbare Translationseffizienz für die α_1 - und α_2 -mRNA ermitteln.

Neben Lunge und Gehirn wurde ein relativ hoher mRNA-Gehalt der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten in der Aorta (β_1 37 %, α_1 29 %, α_2 4 %), Dickdarm (β_1 27 %, α_1 22%, α_2 4%), Plazenta (β_1 20 %, α_1 20 %, α_2 3 %) und Herz (β_1 18 %, α_1 14 %, α_2 4%) gemessen. Sehr wenig und fast keine mRNA der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten wurde jeweils in der Leber und der Skelettmuskulatur nachgewiesen. Eine relativ hohe mRNA-Menge der α_1 -Untereinheit und eine vergleichsweise geringere mRNA-Menge der β_1 -Untereinheit fand sich in Milz (α_1 84 %, β_1 52 %), Hoden (α_1 72 %, β_1 22 %), Uterus (α_1 48 %, β_1 41 %) und Niere (α_1 30 %, β_1 17 %). Der Grund der unterschiedlichen Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheit in diesen Geweben ist unklar. Dennoch erscheint wahrscheinlich, dass die NO-vermittelte cGMP-Bildung auch hier eine wichtige physiologische Funktion ausübt.

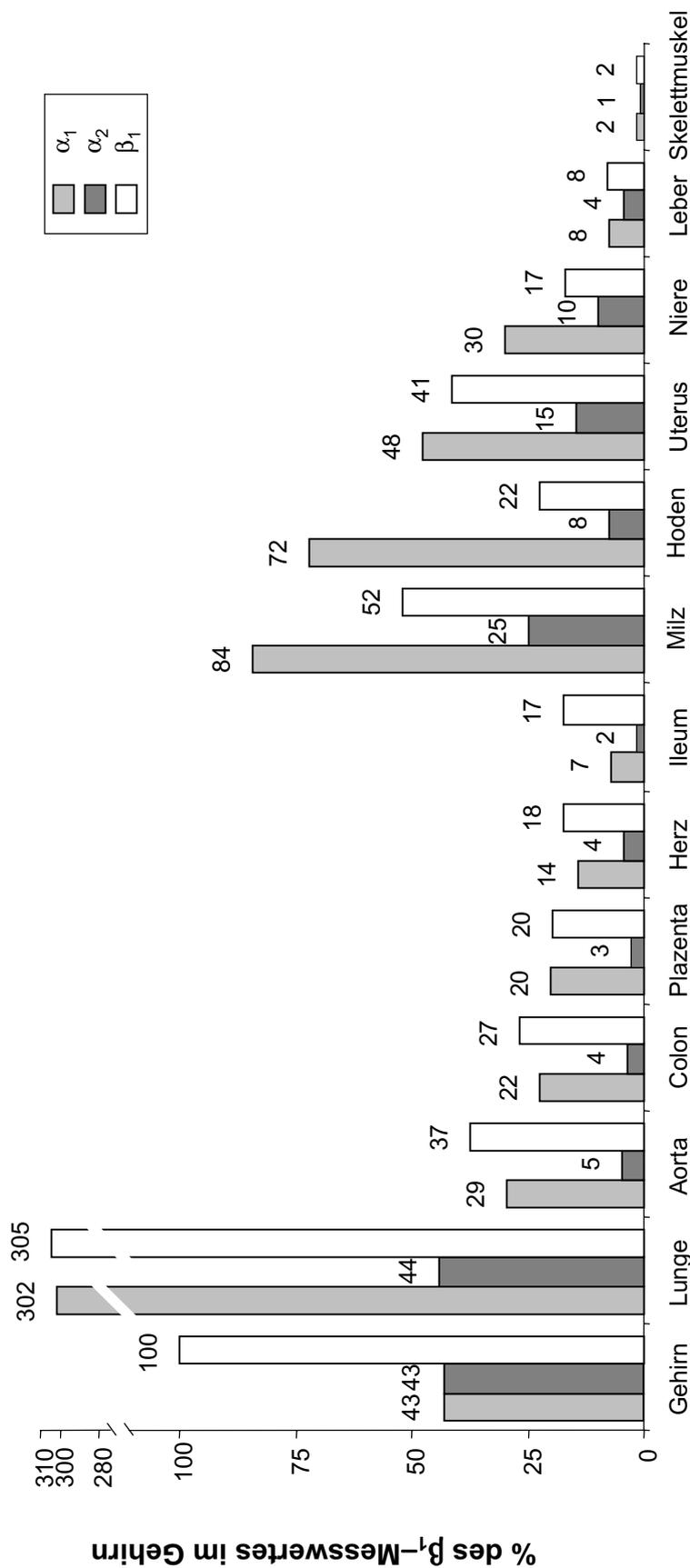


Abb. 23: Relatives Vorkommen der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in verschiedenen Geweben der Maus

Der Gehalt der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten (α_1 , α_2 , β_1) wurde mit Hilfe der real-time quantitativen PCR in den angegebenen Geweben der Maus bestimmt. Dabei wurde der Gehalt vom GAPDH mitbestimmt und als Standard verwendet, um die verschiedenen Messwerte untereinander vergleichen zu können (siehe 4.6.4.4). Die ermittelten $\overline{\Delta C_T}$ -Werte sind in der Tabelle 2 enthalten. Das Vorkommen jeder Guanylyl-Cyclase-Untereinheit wurde anschließend als Prozentsatz vom β_1 -Messwert im Gehirn (100 %) ausgedrückt.

Weiter stellte sich die Frage, ob die Expression einer zweiten β -Untereinheit, der β_2 -Untereinheit, in diesen Geweben die fehlende Menge an β_1 -mRNA kompensierte. Die Tatsache, dass cDNA für die β_2 -Untereinheit aus Niere und Leber kloniert wurde, unterstützte diese Annahme, obwohl ihr Vorkommen auf Proteinebene noch nicht nachgewiesen wurde. Gegen alle Erwartungen zeigte die relative Quantifizierung des β_2 -mRNA-Gehaltes, dass die β_2 -Untereinheit in den untersuchten Geweben in vernachlässigbar geringen Mengen vorkommt (siehe Tabelle 2). So beträgt der maximal gemessene Gehalt der β_2 -Untereinheit in den Hoden, gerade mal 3 % des Gehaltes der β_1 -Untereinheit. Daraus lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit folgern, dass die β_2 -Untereinheit nicht als Protein exprimiert wird und ihr somit keine physiologische Bedeutung zukommt.

6 Diskussion

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase ist der wichtigste Effektor für das ungewöhnliche Signalmolekül NO. Strukturell handelt es sich um ein heterodimeres Hämprotein aus einer α - und einer β -Untereinheit für die jeweils durch Homologie-Klonierung zwei cDNA-Sequenzen (α_1 , α_2 , und β_1 , β_2) isoliert werden konnten. Bisher wurde auf Proteinniveau das physiologische Vorkommen von nur zwei ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) der theoretisch zu erwartenden vier Heterodimere nachgewiesen. In Untersuchungen zur Regulation der aus Sf9-Zellen gereinigten $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Isoformen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden, obschon beachtliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den α -Untereinheiten daraufhin hindeuteten. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich die subzelluläre Lokalisation der $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Isoformen unterscheidet. Verantwortlich dafür war die spezifische Interaktion der α_2 -Untereinheit mit der dritten PDZ-Domäne des Proteins PSD-95. Durch diese Interaktion kam zu einer Membran-Assoziation des $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimers.

Insgesamt bieten diese Befunde Anhaltspunkte dafür, dass die beiden Heterodimere an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt sind.

6.1 Konditionelle Knock-out-Mäuse

Um die physiologischen Effekte, die die $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimere vermitteln, zu unterscheiden, sollten konditionelle Knock-out-Mäuse für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase generiert werden. Mit Hilfe der konditionellen Knock-out-Mäuse kann dann eine zeitliche bzw. gewebespezifische Inaktivierung des α_1 - bzw. α_2 -Gens erfolgen. Dadurch ergeben sich vielfältige Möglichkeiten, gezielt, d.h. in bestimmten Zell- bzw. Gewebetypen zu ausgewählten Zeitpunkten, die physiologische Funktion der zu untersuchenden Genprodukte aufzuklären. Allerdings ist die Etablierung von konditionellen Knock-out-Mäusen im Vergleich zu anderen transgenen Tiermodellen ein sehr zeitintensiver Prozess mit vielen nicht immer kontrollierbaren Einzelschritten.

Auf der anderen Seite hatte sich gezeigt, dass die konstitutive Inaktivierung von Genen in konventionellen Knock-out-Experimenten, die insgesamt weniger arbeitsaufwendig sind, nur bedingt einsetzbar ist. Konventionelle Knock-out-Experimente führen oft zum Tod im frühen Embryonalstadium, wenn das jeweilige Genprodukt entscheidend in bestimmten Entwicklungsschritten der Maus involviert ist. Fragestellungen, die eine Funktion des betreffenden Gens in späteren Entwicklungsstadien betreffen, können somit nicht mehr beantwortet werden. Auch die genetische Redundanz, bei der die Funktion des fehlenden Proteins durch die vermehrte Expression eines funktionell ähnlichen Proteins übernommen wird, stellt einen Nachteil der konventionellen Knock-out-Technik dar (Hanks et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Voraussetzungen geschaffen, um konditionelle Knock-out-Mäuse zu erzeugen. Es wurden genetisch modifizierte embryonale Stammzellen generiert, in denen jeweils ein Exon für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit von loxP-Sequenzen flankiert ist. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Entwicklung und Etablierung von Nachweismethoden zur Testung der erzielten genomischen Modifikation. Auf der Grundlage dieser embryonalen Stammzellen wird zurzeit versucht, die entsprechenden Mauslinien zu etablieren.

6.1.1 Auswahl der zu deletierenden Exons

Am Anfang des Projektes war die genomische Organisation der α -Untereinheiten unbekannt und die Maus-cDNA-Sequenzen beider α -Untereinheiten waren nicht kloniert. Zur Konstruktion der targeting-Vektoren, mit deren Hilfe das Genom der embryonalen Stammzellen der Maus modifiziert werden sollte, war es also zuerst erforderlich, genomische Maus-Sequenzen für die α_1 - und α_2 -Untereinheit zu isolieren und zu charakterisieren. Auf den identifizierten genomischen Sequenzen sollte ein für die Genfunktion wichtiges Exon enthalten sein. Die für die Katalyse verantwortlichen C-terminalen Bereiche sind bei allen Untereinheiten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase stark konserviert und besitzen ebenfalls eine große Ähnlichkeit mit den katalytischen Bereichen der membrangebundenen Isoenzyme und der Adenylyl-Cyclasen. Aus diesem Grund wurden genomische Sequenzen isoliert, die kodierende Sequenzen für die N-terminalen Bereiche der α -Untereinheiten enthielten. Die N-Termini der Untereinheiten sind eine Voraussetzung für die NO-Stimulierbarkeit der Guanylyl-Cyclase, wie bei der Analyse von Deletionsmutanten gezeigt werden konnte (Wedel et al., 1995). Auf den klonierten DNA-Fragmenten mit den genomischen Sequenzen für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit wurde die Position des jeweiligen Exons lokalisiert und die Exon/Intron-Grenzen identifiziert. Anschließend wurden die entsprechenden Bereiche, wie unter Ergebnissen ausgeführt, zur Zusammenstellung der targeting-Vektoren verwendet, was aufgrund der Länge der zu klonierenden DNA-Fragmente nicht ganz problemlos verlief.

6.1.2 Homologe Rekombination

In einem ersten Rekombinationsschritt wurde der targeting-Vektor für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit an Stelle der nativen chromosomalen Sequenz in das Genom von embryonalen Stammzellen eingebaut. Insgesamt wurden dabei drei loxP-Sequenzen und die Selektionskassette mit den Genen Neomycinphosphotransferase (NEO) und Thymidinkinase (TK) in das α_1 - bzw. α_2 -Gen im Genom von ES-Zellen integriert. Zur Initiierung der homologen Rekombination enthielt jeder der targeting-Vektoren beidseitig der äußeren loxP-Sequenzen mit dem Ziel-Gen homologe Sequenzen. Es war bekannt, dass die Rekombinationsfrequenz von der Länge der Homologiearme sowie dem Genlocus abhängig ist (Deng und Capecchi, 1992) und dass die Frequenz der homologen

Rekombination mit zunehmender Homologielänge des targeting-Vektors steigt (Hasty et al., 1991). Entsprechend diesen Anforderungen wurde ein erster targeting-Vektor für die α_1 -Untereinheit konstruiert, der insgesamt ca. 20 kb mit dem α_1 -Gen homologer Sequenz enthielt. Tatsächlich war die Rekombinationsfrequenz dieses targeting-Vektors mit etwa 10 % hoch, unter ca. 800 untersuchten Klonen konnte aber die erste loxP-Sequenz nicht identifiziert werden. Offensichtlich fand die homologe Rekombination nicht innerhalb des ca. 12 kb langen Rekombinationsarmes statt, sondern ereignete sich innerhalb des ca. 6 kb langen exonhaltigen Fragmentes, was den Verlust der loxP-Sequenz zur Folge hatte. Deshalb wurde ein neuer targeting-Vektor für das α_1 -Gen kloniert. Hierbei betrug die Homologielänge insgesamt ca. 11,5 kb, und es wurde eine Rekombinationshäufigkeit von 3,7 % erreicht. Erstaunlicherweise zeigte der α_2 -targeting-Vektor, der insgesamt die gleiche Homologielänge wie der zweite α_1 -targeting-Vektor aufwies, eine Rekombinationshäufigkeit von etwa 38 %. Eine Erklärung dafür konnte zum einen der unterschiedliche genomische Locus der homologen Rekombination und zum anderen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Wirkung der „Positiv-Negativ-Selektion“ sein. Wie in der Beschreibung der Konstruktion der targeting-Vektoren (siehe 5.1.3.1) ausführlich dargestellt, enthielten die targeting-Vektoren das Neo-Resistenzgen zur Selektion von ES-Zellen, die den targeting-Vektor in ihrem Genom integriert hatten, und das Diphtherietoxin-Gen, um ES-Zellen mit einer nicht-homologen Integration des targeting-Vektors zu vernichten. Nach einer Elektroporation des α_2 -targeting-Vektors konnten vergleichsweise etwa 1/3 weniger Klone isoliert werden als nach einer Elektroporation des α_1 -targeting-Vektors. Wahrscheinlich kam es in den mit dem α_2 -targeting-Vektor elektroporierten Zellen zu einer höheren Expression von Diphtherietoxin, woraufhin nicht-homolog rekombinierte ES-Zellen abgetötet wurden. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass für die Erhöhung der Rekombinationsfrequenz nicht nur die Länge der verwendeten homologen Sequenzen sondern auch die Auswahl geeigneter Selektionsmarker von entscheidender Bedeutung ist.

6.1.3 Cre-vermittelte Rekombination in ES-Zellen

Jeweils einer der homolog rekombinierten Klone für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit wurde mit einem für die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmid transient transfiziert. Durch die Expression und die Cre-vermittelte Rekombination wurden aus den homolog rekombinierten ES-Zellen drei unterschiedliche Genotypen generiert. Es entstanden flox-ES-Zellen, in denen die von loxP-Sequenzen flankierte Selektionskassette aus ihrem Genom entfernt wurde, und del-ES-Zellen, in denen die Selektionskassette und das exonhaltige Fragment ausgeschnitten wurden. Gegen die dritte mögliche genomische Modifikation der ES-Zellen wurde negativ selektioniert (siehe Abb. 18). Bei den homolog rekombinierten ES-Zellen für das α_1 -Gen wurden etwa 9 % der Klone als flox und 36 % als del identifiziert. Dagegen wurden 40 % der homolog rekombinierten ES-Zellen für das

α_2 -Gen als flox nachgewiesen. Bei Wiederholungen der Elektroporationen von α_1 - bzw. α_2 -homolog rekombinierten ES-Zellen mit dem Cre-kodierenden Plasmid erfolgten die Cre-vermittelten Rekombinationsereignisse mit ähnlicher Häufigkeit. Das zeigt, dass die Cre-Rekombinase nicht gleichermaßen alle drei loxP-Sequenzen als Substrate erkennt, sondern auch die chromosomale Position der loxP-Sequenz die Wahrscheinlichkeit einer sequenzspezifischen Rekombination beeinflusst.

6.1.4 Chimäre Mäuse und Keimbahntransmission des α_1 - bzw. α_2 -gefloxten Allels

ES-Zellen mit einem gefloxten Allel für das α_1 - bzw. α_2 -Gen wurden in Blastozysten injiziert und diese in scheinsschwangere Leihmütter reimplantiert (Abb. 24). Sofern die injizierten ES-Zellen einen vollständigen Chromosomensatz (Euploidie) aufweisen und ihre Fähigkeit zur Differenzierung (Pluripotenz) beibehalten haben, differenzieren sie sich in dem sich entwickelnden Embryo zu den verschiedenen Gewebetypen. Dabei ist für den weiteren Verlauf des Experimentes entscheidend, dass die modifizierten ES-Zellen sich auch an der Ausbildung der Keimbahn beteiligen, denn nur so kann die erzielte Modifikation in den folgenden Verpaarungen weitervererbt, und eine konditionelle Knock-out-Maus generiert werden.

Die aus den modifizierten ES-Zellen und den ES-Zellen der Blastozyste entstandene Maus enthält zwei Populationen von Zellen aus unterschiedlichen Zygoten und ist deswegen eine Chimäre. Um chimäre Mäuse leicht zu identifizieren, stammen die modifizierten ES-Zellen und die Blastozyste von Mäusestämmen mit unterschiedlicher Fellfarbe. Chimäre Mäuse sind somit an verschieden gefärbten Flecken im Fell erkennbar. Dabei bietet die Ausdehnung der Fellfarbe, die von den modifizierten ES-Zellen gebildet wird, ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Beteiligung von modifizierten ES-Zellen in der Keimbahn. Die Keimbahntransmission kann allerdings erst in den Nachkommen der verpaarten chimären Mäusen mit Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden.

Die anfänglich im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Chimären waren nicht in der Lage, das Genom der injizierten ES-Zellen (siehe Abb. 24) auf ihre Nachkommen weiterzuvererben (fehlende Keimbahntransmission). Im Vergleich zu konventionellen Knock-out-Experimenten werden zur Herstellung von konditionellen Knock-out-Mäusen die ES-Zellen zweimal elektroporiert; bei der ersten Elektroporation wird das DNA-Konstrukt in die Zellen eingebracht und bei der zweiten ein für die Cre-Rekombinase kodierendes Plasmid (siehe Abb. 24). Durch die zweite Selektionsrunde erhöht sich die Passagenzahl der manipulierten ES-Zellen und die Zellen werden insgesamt lange in Kultur gehalten. Die lange Kultivierung der ES-Zellen ist vermutlich auch der Grund, warum häufig bei der Herstellung von konditionellen Knock-out-Mäusen eine Keimbahntransmission nicht mehr erzielt werden kann (Liu et al., 1997; Longo et al., 1997).

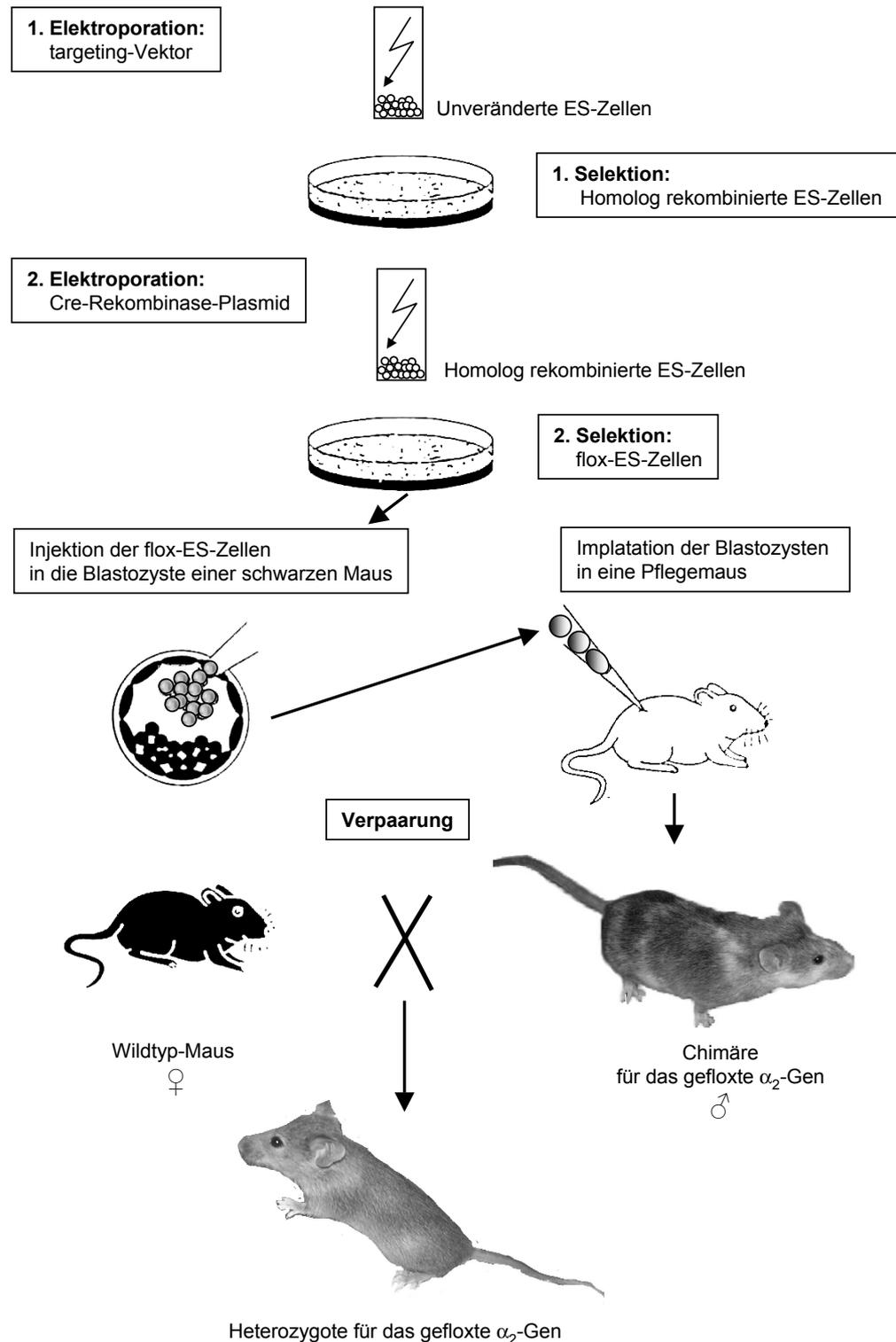


Abb. 24: Schematische Darstellung der Generierung von Knock-out-Mäusen

Graphisch dargestellt ist eine Übersicht der Generierung von Knock-out-Mäusen aus in-vitro modifizierten ES-Zellen. Die einzelnen Schritte sind im Text unter Ergebnisse (s. 5.1.1, 5.1.5 und 5.1.6) näher erläutert.

Drei weitere Versuche zur Generierung von neuen chimären Mäusen endeten mit der Tötung der Jungtiere durch das Muttertier, ein zeitraubender Vorfall, der allgemein bei der Züchtung von Mäusen auftritt, so dass erst durch erneut wiederholte Versuche neue chimäre Mäuse generiert werden konnten. Zurzeit stehen zur Verfügung 3 chimäre Mäuse aus den ES-Zellen (1A8:2F8) mit dem geflochten α_1 -Gen und 14 chimäre Mäuse aus den ES-Zellen (2D2:5A2) mit dem geflochten α_2 -Gen, die durch Verpaarung mit Wildtyp-Mäusen (Stamm: C57BL/6J) auf Keimbahntransmission getestet werden. Bisher konnte eine Keimbahntransmission bei 4 männlichen α_2 -chimären Mäusen festgestellt werden; anhand der Fellfärbung wurden Nachkommen identifiziert, von denen 50 % heterozygot für das α_2 -geflochte Gen sein sollten. Die Identifizierung von heterozygoten Mäusen für das α_1 -geflochte Gen ist noch abzuwarten.

6.2 Gewebeverteilung und Isoformen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Das Wissen über das Vorkommen der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase sowie die relative Verteilung der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten sind wichtige Beiträge zu einem besseren Verständnis der NO/cGMP-Signaltransduktion. Bisher wurden nur wenige Versuche unternommen, die Gewebeverteilung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase systematisch zu untersuchen. Dabei galten die meisten Untersuchungen nur dem Nachweis der Expression der α_1 - und β_1 -Untereinheit, während das Vorkommen der α_2 -Untereinheit lange unbeachtet blieb. Mittels Northern-Blot-Analyse wiesen Budworth und Kollegen (1999) die mRNA-Expression der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheiten in verschiedenen humanen Geweben nach. Ähnliche experimentelle Ansätze aus unserer Arbeitsgruppe zeigten dagegen, dass die Sensitivität von Northern-Blot-Analysen zu gering ist, um mRNA für die α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit spezifisch und reproduzierbar in den verschiedenen Geweben zu detektieren. Auch die Sensitivität der vorhandenen Antikörper war zu gering, um eine vergleichende Untersuchung der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten auf Proteinebene durchzuführen. Die Bestimmung des Guanylyl-Cyclase-Gehaltes durch Messung der enzymatischen Aktivität wäre zwar ausreichend sensitiv, kam aber für eine vergleichende Untersuchung aufgrund der unterschiedlichen inhibitorischen Einflüsse in den verschiedenen Geweben nicht in Frage. Außerdem bietet die Bestimmung der enzymatischen Aktivität keine Unterscheidungs-Möglichkeit zwischen den $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Isoformen. So wurde der relative mRNA-Gehalt für die α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase mit Hilfe der real-time quantitativen PCR bestimmt, und auch das Vorkommen der β_2 -Untereinheit untersucht. Da bei einer PCR-Reaktion eine exponentielle Vermehrung der Ziel-DNA-Moleküle stattfindet, können mit ihr ganz geringe Mengen von DNA-Molekülen detektiert werden. Somit besitzt die PCR-Analyse eine außerordentliche Sensitivität. Allerdings ändern sich während der Reaktionszeit die Reaktionsbedingungen derart, dass in den letzten Amplifikationszyklen keine exponentielle Vermehrung des Produktes mehr stattfindet und die Reaktion in eine Plateau-Phase übergeht. Aus diesem

Grund lässt die Analyse der Produktmenge am Ende der Reaktionszeit keine Rückschlüsse über die Anfangsmenge der Ziel-Moleküle zu. Im Gegensatz zur konventionellen PCR wird bei der real-time quantitativen PCR fortlaufend das gebildete PCR-Produkt gemessen. Die verwendeten Messwerte (siehe Abb.3) werden aus der Phase der PCR-Reaktion entnommen, in der die Amplifikation noch exponentiell verläuft. Somit erlaubt der Vergleich verschiedener Messwerte die relative Quantifizierung der Template-Konzentrationen unterschiedlicher Proben.

In Hinblick auf die Generierung konditioneller Knock-out-Mäuse, in denen eine gewebsspezifische Inaktivierung des α_1 - bzw. α_2 -Gens erfolgen soll, wurde entschieden, das relative Vorkommen der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten in Geweben der Maus zu untersuchen.

6.2.1 Bestimmung des relativen Vorkommens für die α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheit in verschiedenen Geweben der Maus

Der relative mRNA-Gehalt der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten wurde in verschiedenen Geweben der Maus bestimmt. Bekanntermaßen spiegelt der mRNA-Gehalt nicht notwendigerweise den Protein-Gehalt wieder. Die Stabilität der mRNA-Moleküle und die Effizienz, mit der ein mRNA-Molekül in das entsprechende Protein translatiert wird, sind Parameter, die das Verhältnis zwischen mRNA und dazugehörigem Protein beeinflussen. Der in dieser Arbeit erhaltene Befund, dass in einigen der untersuchten Geweben, der mRNA-Gehalt für die β_1 -Untereinheit dem mRNA-Gehalt der α_1 - plus α_2 -Untereinheit entsprach, deutete daraufhin, dass die mRNAs der Untereinheiten mit ähnlicher Effizienz translatiert werden. Western-Blot-Experimente aus unserer Arbeitsgruppe, in denen der Protein-Gehalt für die α_1 - und α_2 -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase in Gehirn und Lunge quantifiziert wurden, lieferten die fehlenden Informationen, um eine vergleichbare Translationseffizienz zwischen den α_1 - und α_2 -mRNAs zu belegen. Zusammenfassend lässt sich eine vergleichbare Translationseffizienz für die mRNAs der Guanylyl-Cyclase-Untereinheiten postulieren.

Die Lunge wurde als das Gewebe mit dem höchsten Gehalt an Guanylyl-Cyclase identifiziert, und das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer wurde als die überwiegend exprimierte Guanylyl-Cyclase-Isoform in der Lunge nachgewiesen. Im Vergleich zu Lunge wurde etwa die Hälfte des Guanylyl-Cyclase-Gehaltes im Gehirn gemessen, wo das Vorkommen beider Heterodimere ($\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$) gleichermaßen nachgewiesen werden konnte. Lunge und Gehirn wurden oft als Ausgangsmaterial zur Reinigung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase verwendet, ein empirischer experimenteller Ansatz, der sich nun mit den hier aufgeführten Ergebnissen begründen lässt.

Im Gehirn wurde der höchste Gehalt für die α_2 -Untereinheit gemessen und der Hippokampus und das Kleinhirn wurden als die Regionen identifiziert, in denen das $\alpha_2\beta_1$ -

Heterodimer überwiegend vorkommt. Der Befund, dass die $\alpha_2\beta_1$ -Guanylyl-Cyclase hauptsächlich im Gehirn vorkommt, deutet auf eine mögliche spezielle neuronale Funktion des $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimeres hin. Außerdem stellen Hippokampus und Kleinhirn, die Hirnregionen dar, bei denen eine Beteiligung der NO/cGMP-Signaltransduktion an einigen Formen der synaptischen Plastizität diskutiert wird (Son et al., 1998; Lu et al., 1999; Hartell et al. 2001). Möglicherweise handelt es sich bei der hierbei beteiligten NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase um das $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer. Diese Annahme wird auch unterstützt durch die nachgewiesene Interaktion der α_2 -Untereinheit mit dem Protein PSD-95, die eine Verankerung des $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimers an synaptischen Membranen vermittelt (Russwurm et al., 2001). Eine entsprechende Interaktion mit dem Protein PSD-95 war auch für die neuronale NO-Synthase nachgewiesen worden (Brenman et al., 1996). Es ist also eine synaptische Signaltransduktionskaskade vorstellbar, bei der die verschiedenen Mitglieder über die Interaktion mit dem Adapterprotein PSD-95 in räumliche Nähe gebracht werden. Eine z.B. durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors hervorgerufene Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration und die dadurch bewirkte Aktivierung der neuronalen NO-Synthase führt zur NO-Bildung und zur Stimulation der in diesem Signalweg nachgeschalteten $\alpha_2\beta_1$ -Guanylyl-Cyclase.

Wahrscheinlich ist das in den peripheren Organen nachgewiesene $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer auch an der synaptischen Transmission beteiligt und dient als das Zielmolekül für das NO, das als Neurotransmitter von bestimmten NANC-Neuronen freigesetzt wird. Wie mit Hilfe der Knock-out-Technik gezeigt werden konnte, wird das in den NANC-Neuronen produzierte NO von der neuronalen NO-Synthase gebildet (Huang et al., 1993).

Ausgehend von der Hypothese, dass das $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer aufgrund seiner Gewebeexpression und subzellulärer Lokalisation primär von der NO der neuronalen NO-Synthase stimuliert wird, lässt sich spekulieren, dass das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer wahrscheinlich so lokalisiert ist, um primär die Effekte des von der endothelialen NO-Synthase gebildeten NO weiterzuleiten. Beispielsweise stellt die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur eine der bekannten physiologischen Funktionen der NO/cGMP-Signaltransduktion dar. Das zur Vasodilatation benötigte NO wird von der endothelialen NO-Synthase bereit gestellt, die in den Endothelzellen lokalisiert ist. Das in Endothelzellen gebildete NO diffundiert in die glatten Muskelzellen und aktiviert dort die NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase, die über die Bildung von cGMP die Relaxation der glatten Muskulatur initiiert. In den untersuchten peripheren Organen wurde das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer als die überwiegend exprimierte Guanylyl-Cyclase-Isoform nachgewiesen. Dieser Befund lässt vermuten, dass das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer die Guanylyl-Cyclase-Isoform der glatten Muskelzellen ist und damit das Effektormolekül für das von der endothelialen NO-Synthase gebildete NO.

6.2.2 Untersuchung zum Vorkommen der β_2 -Untereinheit

Bisher wurde das Vorkommen der β_2 -mRNA nur qualitativ mittels PCR-Methoden untersucht und aufgrund der hohen Sensitivität der PCR wurde fast immer β_2 -mRNA nachgewiesen. Diese Befunde gaben Anlass zur Annahme, dass neben den $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimeren noch weitere Isoformen der Guanylyl-Cyclase existieren. Gibb et al. (2001) wiesen mittels RT-PCR β_2 -mRNA im Gehirn der Ratte nach, konnten aber in der in-situ Hybridisierung die β_2 -Untereinheit nicht detektieren. Diesen Befund begründeten sie zwar mit der Annahme, dass die β_2 -Untereinheit in geringer Menge vorkommt, sie spekulierten trotzdem über eine Beteiligung der β_2 -Untereinheit in der Ausbildung katalytisch aktiver Heterodimere. Mit Hilfe der real-time quantitativen PCR, die eine relative Quantifizierung der mRNA für die β_2 -Untereinheit ermöglichte, konnte gezeigt werden, dass die β_2 -Untereinheit in den untersuchten Geweben in vernachlässigbar geringer Menge vorkommt, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass ihr keine physiologische Bedeutung zukommt. Die Tatsache, dass das Vorkommen der β_2 -Untereinheit bislang nicht auf Proteinebene nachgewiesen wurde, und die β_2 -Untereinheit in Expressions-Experimenten kein katalytisch aktives Heterodimer mit der α_1 - oder α_2 -Untereinheit bildete, unterstreichen diese Annahme.

7 Zusammenfassung

Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase, die durch die Bildung von cGMP das NO-Signal in eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration umsetzt, besitzt eine zentrale Position innerhalb der NO/cGMP-vermittelten Signaltransduktionskaskade. Dabei kann das NO als Signalmolekül von zwei NO-Synthasen-Isoformen gebildet werden, der neuronalen und der endothelialen NO-Synthase.

Strukturell besteht die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase aus zwei verschiedenen Untereinheiten, α und β , und enthält eine prosthetische Häm-Gruppe, an der NO bindet. Für jede der Untereinheiten der Guanylyl-Cyclase wurden bisher durch Homologie-Klonierung zwei cDNA-Sequenzen (α_1 , α_2 und β_1 , β_2) isoliert, jedoch konnte auf Proteinniveau das physiologische Vorkommen von nur zwei ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) der theoretisch zu erwartenden vier Heterodimere gezeigt werden. Zwischen den $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Guanylyl-Cyclase-Heterodimeren konnten weder enzymatische noch regulatorische Unterschiede nachgewiesen werden, und so stellte sich bald die Frage nach der physiologischen Relevanz der beiden Guanylyl-Cyclasen-Isoformen. Eine funktionelle Differenzierung und Analyse dieser ansonsten sehr ähnlichen Isoformen ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) kann mit Hilfe von Knock-out-Mausmodellen erfolgen, in denen das α_1 - bzw. α_2 -Gen der Guanylyl-Cyclase inaktiviert ist bzw. induzierbar inaktiviert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden embryonale Stammzelllinien der Maus generiert, in denen das Gen der α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit modifiziert wurde. Dabei wurde gezielt jeweils ein wichtiges Exon mit spezifischen Erkennungssequenzen (loxP-Sequenzen) des Enzyms Cre-Rekombinase versehen. Die Erkennungssequenzen ermöglichen später in Abhängigkeit von der Expression der Cre-Rekombinase die induzierbare Deletion des Exons, so dass die Bildung einer funktionellen α -Untereinheit unterbunden wird. Die genomische Veränderung der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurde durch Transfervektoren (sogenannte targeting-Vektoren) erzielt, die lange genomische Sequenzen der jeweiligen α -Untereinheit enthielten, und sich deshalb an Stelle der endogenen Sequenzen in das Genom der ES-Zellen integrierten. Für die Konstruktion der targeting-Vektoren musste die genomische Organisation der α -Untereinheiten der Maus partiell analysiert, die entsprechenden genomischen Abschnitte isoliert, und diese dann mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen und subkloniert werden. Nach Einbringen der Transfervektoren in die ES-Zellen musste die richtige Integration an der Zielposition im Genom bzw. auch die Anwesenheit der Cre-Rekombinase-Erkennungssequenzen sichergestellt werden. Hierzu wurden genomische Southern-Blots und PCR-Analysen entwickelt, die auch im weiteren für die Etablierung der Mauslinien unerlässlich sind. Aus in der vorliegenden Arbeit generierten ES-Zellen sind Mäuse entstanden, sogenannte Chimären. Diese chimären Mäuse werden zurzeit verpaart, um Nachkommen zu erzeugen, in denen das Gen der α_1 - bzw. α_2 -Untereinheit in allen Zellen modifiziert vorliegt.

Durch die anschließende Verpaarung mit transgenen Cre-Rekombinase-Mäusen werden Mausmodelle generiert, in denen die jeweilige α -Untereinheit der Guanylyl-Cyclase zu ausgewählten Zeitpunkten bzw. gewebsspezifisch ausgeschaltet werden kann.

In Hinblick auf die Möglichkeit einer gewebsspezifischen Inaktivierung des α_1 - bzw. α_2 -Gens sind Kenntnisse über die Gewebeverteilung der α -Untereinheiten von großer Bedeutung. Deshalb wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die relative Gewebeverteilung der Untereinheiten (α_1 , α_2 , und β_1) der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase in Mausgewebe systematisch untersucht. Die relative Quantifizierung der mRNA der α_1 -, α_2 -, und β_1 -Untereinheit wurde mittels real-time quantitativer PCR durchgeführt. Die Lunge und das Gehirn wurden als die beiden Gewebe mit dem höchsten Guanylyl-Cyclase-Gehalt identifiziert. In der Lunge wie auch in den weiteren untersuchten peripheren Organen stellte das $\alpha_1\beta_1$ -Heterodimer die überwiegend exprimierte Guanylyl-Cyclase-Isoform dar, während das $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimer hauptsächlich im Gehirn nachgewiesen wurde. Insbesondere wurden der Hippokampus und das Kleinhirn als die Hirnregionen mit dem höchsten $\alpha_2\beta_1$ -Guanylyl-Cyclase-Gehalt identifiziert, für die eine Beteiligung der NO/cGMP-Signaltransduktion an einigen Formen der synaptischen Plastizität diskutiert wird. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die α_2 -Untereinheit spezifisch mit Adapterproteinen interagiert, die eine Verankerung des $\alpha_2\beta_1$ -Heterodimers an synaptischen Membranen vermitteln; die $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Guanylyl-Cyclasen weisen also unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf. Aufgrund der subzellulären Lokalisation und der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gewebeexpression der beiden Guanylyl-Cyclase-Isoformen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die $\alpha_2\beta_1$ -Guanylyl-Cyclase hauptsächlich durch das NO der neuronalen NO-Synthase stimuliert wird, während die $\alpha_1\beta_1$ -Guanylyl-Cyclase primär die Effekte des von der endothelialen NO-Synthase gebildeten NO weiterleitet.

8 Literatur

- Altenhofen W., Ludwig J., Eismann E., Kraus W., Bonigk W., Kaupp U.B.** (1991): Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9868-9872.
- Ammendola A., Geiselhoringer A., Hofmann F., Schlossmann J.** (2001): Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J. Biol. Chem.* 276, 24153-24159.
- Applied Biosystems** User Bulletin #2 (P/N 4303859)
- Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F.** (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3203-3207.
- Austin S., Ziese M., Sternberg N.** (1981): A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25, 729-736.
- Axelsson K.L., Wikberg J.E., Andersson R.G.** (1979): Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci.* 24, 1779-1786.
- Bohme E., Graf H., Schultz G.** (1978): Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 131-143.
- Bohme E., Jung R., Mechler I.** (1974): Guanylate cyclase in human platelets. *Methods Enzymol.* 38, 199-202.
- Bohme G.A., Bon C., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C.** (1991): Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 199, 379-381.
- Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A.W., Craven S.E., Santillano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F., Froehner S.C., Brecht D.S.** (1996): Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.
- Budworth J., Meillerais S., Charles I., Powell K.** (1999): Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 696-701.
- Buechler W.A., Nakane M., Murad F.** (1991): Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 351-357.

- Bult H., Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., Jordaens F.H., Van Maercke Y.M., Herman A.G.** (1990): Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345, 346-347.
- Burnett A.L., Chang A.G., Crone J.K., Huang P.L., Sezen S.E.** (2002): Noncholinergic penile erection in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *J. Androl.* 23, 92-97.
- Chusho H., Tamura N., Ogawa Y., Yasoda A., Suda M., Miyazawa T., Nakamura K., Nakao K., Kurihara T., Komatsu Y., Itoh H., Tanaka K., Saito Y., Katsuki M., Nakao K.** (2001): Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4016-4021.
- Clark J.M.** (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic. Acids Res.* 16, 9677-9686.
- Corbin J.D. und Francis S.H.** (1999): Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J. Biol. Chem.* 274, 13729-13732.
- Corbin J.D., Turko I.V., Beasley A., Francis S.H.** (2000): Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur. J. Biochem.* 267, 2760-2767.
- de Sauvage F.J., Camerato T.R., Goeddel D.V.** (1991): Primary structure and functional expression of the human receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 266, 17912-17918.
- Deng C. und Capecchi M.R.** (1992): Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell Biol.* 12, 3365-3371.
- Di Rosa M., Radomski M., Carnuccio R., Moncada S.** (1990): Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 1246-1252.
- Diamond J.** (1978): Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 327-340.
- Evans M.J. und Kaufman M.H.** (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B.** (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Fesenko E.E., Kolesnikov S.S., Lyubarsky A.L.** (1985): Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313, 310-313.

- Fiering S., Kim C.G., Epner E.M., Groudine M.** (1993): An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: analysis of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8469-8473.
- Flynn T.G., de Bold M.L., de Bold A.J.** (1983): The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 859-865.
- Foerster J., Harteneck C., Malkewitz J., Schultz G., Koesling D.** (1996): A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur. J. Biochem.* 240, 380-386.
- Forstermann U., Mulsch A., Bohme E., Busse R.** (1986): Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ. Res.* 58, 531-538.
- Franco F., Dubois S.K., Peshock R.M., Shohet R.V.** (1998): Magnetic resonance imaging accurately estimates LV mass in a transgenic mouse model of cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 274, H679-83.
- Fukao M., Mason H.S., Britton F.C., Kenyon J.L., Horowitz B., Keef K.D.** (1999): Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J. Biol. Chem.* 274, 10927-10935.
- Fulle H.J., Vassar R., Foster D.C., Yang R.B., Axel R., Garbers D.L.** (1995): A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3571-3575.
- Furchgott R.F. und Zawadzki J.V.** (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Furuyama T., Inagaki S., Takagi H.** (1993): Localizations of alpha 1 and beta 1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 20, 335-344.
- Garbers D.L.** (1992): Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71, 1-4.
- Gerzer R., Bohme E., Hofmann F., Schultz G.** (1981): Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.* 132, 71-74.
- Gibb B.J. und Garthwaite J.** (2001): Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 13, 539-544.
- Gillespie P.G. und Beavo J.A.** (1989): cGMP is tightly bound to bovine retinal rod phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4311-4315.

- Giuli G., Scholl U., Bulle F., Guellaen G.** (1992): Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett.* 304, 83-88.
- Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R.** (1986): Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 9065-9069.
- Gupta G., Azam M., Yang L., Danziger R.S.** (1997): The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. *J. Clin. Invest.* 100, 1488-1492.
- Hamet P., Tremblay J., Pang S.C., Garcia R., Thibault G., Gutkowska J., Cantin M., Genest J.** (1984): Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 515-527.
- Hanks M., Wurst W., Anson-Cartwright L., Auerbach A.B., Joyner A.L.** (1995): Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 269, 679-682.
- Hardman J.G., Sutherland E.W.** (1969): Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 244, 6363-6370.
- Hartell N.A., Furuya S., Jacoby S., Okada D.** (2001): Intercellular action of nitric oxide increases cGMP in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport* 12, 25-28.
- Harteneck C., Koesling D., Soling A., Schultz G., Bohme E.** (1990): Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.* 272, 221-223.
- Harteneck C., Wedel B., Koesling D., Malkewitz J., Bohme E., Schultz G.** (1991): Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 292, 217-222.
- Haslam R.J., Davidson M.M., Davies T., Lynham J.A., McClenaghan M.D.** (1978): Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 533-552.
- Hasty P., Rivera-Perez J., Bradley A.** (1991): The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 11, 5586-5591.
- Haug L.S., Jensen V., Hvalby O., Walaas S.I., Ostvold A.C.** (1999): Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J. Biol. Chem.* 274, 7467-7473.

- Hedlund P., Aszodi A., Pfeifer A., Alm P., Hofmann F., Ahmad M., Fassler R., Andersson KE.** (2000): Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2349-2354.
- Ho Y.S., Burden L.M., Hurley J.H.** (2000): Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.* 19, 5288-5299.
- Huang P.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Snyder S.H., Fishman M.C.** (1993): Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75, 1273-1286.
- Huang P.L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K.D., Moskowitz M.A., Bevan J.A., Fishman M.C.** (1995): Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242.
- Huang Z., Huang P.L., Ma J., Meng W., Ayata C., Fishman M.C., Moskowitz M.A.** (1996): Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 981-987.
- Huang Z., Huang P.L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M.C., Moskowitz M.A.** (1994): Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265, 1883-1885.
- Hurt K.J., Musicki B., Palese M.A., Crone J.K., Becker R.E., Moriarity J.L., Snyder S.H., Burnett A.L.** (2002): Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4061-4066.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.** (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9265-9269.
- Ignarro L.J., Harbison R.G., Wood K.S., Kadowitz P.J.** (1986): Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237, 893-900.
- Ishikawa E., Ishikawa S., Davis J.W., Sutherland E.W.** (1969): Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J. Biol. Chem.*, 244, 6371-6376.
- Janssens P.M., De Jong C.C., Vink A.A., Van Haastert P.J.** (1989): Regulatory properties of magnesium-dependent guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum* membranes. *J. Biol. Chem.* 264, 4329-4335.
- John S.W., Krege J.H., Oliver P.M., Hagan J.R., Hodgin J.B., Pang S.C., Flynn T.G., Smithies O.** (1995): Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science* 267, 679-681.

- Juilfs D.M., Fulle H.J., Zhao A.Z., Houslay M.D., Garbers D.L., Beavo J.A.** (1997): A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3388-3395.
- Kakiuchi S., Sobue K., Yamazaki R., Nagao S., Umeki S., Nozawa Y., Yazawa M., Yagi K.** (1981): Ca²⁺-dependent modulator proteins from *Tetrahymena pyriformis*, sea anemone, and scallop and guanylate cyclase activation. *J. Biol. Chem.* 256, 19-22.
- Kamisaki Y., Saheki S., Nakane M., Palmieri J.A., Kuno T., Chang B.Y., Waldman S.A., Murad F.** (1986): Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 261, 7236-7241.
- Kiemer A.K. und Vollmar A.M.** (1998): Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J. Biol. Chem.* 273, 13444-13451.
- Kimura H., Mittal C.K., Murad F.** (1975): Activation of guanylate cyclase from rat liver and other tissues by sodium azide. *J. Biol. Chem.* 250, 8016-8022.
- Klumpp S. und Schultz J.E.** (1982): Characterization of a Ca²⁺-dependent guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane from *Paramecium*. *Eur. J. Biochem.* 124, 317-324.
- Koesling D., Harteneck C., Humbert P., Bosserhoff A., Frank R., Schultz G., Bohme E.** (1990): The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 266, 128-132.
- Koesling D., Herz J., Gausepohl H., Niroomand F., Hinsch K.D., Mulsch A., Bohme E., Schultz G., Frank R.** (1988): The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* 239, 29-34.
- Koller K.J., Lowe D.G., Bennett G.L., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Goeddel D.V.** (1991) : Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252, 120-123.
- Komalavilas P. und Lincoln T.M.** (1996): Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.* 271, 21933-21938.
- Kornau H.C., Schenker L.T., Kennedy M.B., Seeburg P.H.** (1995): Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.
- Lev-Ram V., Jiang T., Wood J., Lawrence D.S., Tsien R.Y.** (1997): Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca²⁺ in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron* 18, 1025-1038.

- Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Disteché C.M., Bornstein P., Jaenisch R.** (1997): Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev. Dyn.* 209, 85-91.
- Longo L., Bygrave A., Grosveld F.G., Pandolfi P.P.** (1997): The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res.* 6, 321-328.
- Lopez M.J., Wong S.K., Kishimoto I., Dubois S., Mach V., Friesen J., Garbers D.L., Beuve A.** (1995): Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378, 65-68.
- Lowe D.G., Chang M.S., Hellmiss R., Chen E., Singh S., Garbers D.L., Goeddel D.V.** (1989): Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* 8, 1377-1384.
- Lu Y.F., Kandel E.R., Hawkins R.D.** (1999): Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J. Neuroscience* 19, 10250-10261.
- Maack T., Suzuki M., Almeida F.A., Nussenzveig D., Scarborough R.M., McEnroe G.A., Lewicki J.A.** (1987): Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 238, 675-678.
- Macchia V., Varrone S., Weissbach H., Miller D.L.** (1975): Guanylate cyclase in *Escherichia coli*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 250, 6214-6217.
- MacFarland R.T., Zelus B.D., Beavo J.A.** (1991): High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 266, 136-142.
- Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R.** (1988): Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
- Marletta M.A.** (1993): Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 12231-12234.
- Martin G.R.** (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634-7638.
- Martinez S.E., Wu A.Y., Glavas N.A., Tang X.B., Turley S., Hol W.G., Beavo J.A.** (2002): The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13260-13265.

- Massberg S., Sausbier M., Klatt P., Bauer M., Pfeifer A., Siess W., Fassler R., Ruth P., Krombach F., Hofmann F.** (1999): Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J. Exp. Med.* 189, 1255-1264.
- Mellion B.T., Ignarro L.J., Ohlstein E.H., Pontecorvo E.G., Hyman A.L., Kadowitz P.J.** (1981): Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57, 946-955.
- Miyazawa T., Ogawa Y., Chusho H., Yasoda A., Tamura N., Komatsu Y., Pfeifer A., Hofmann F., Nakao K.** (2002): Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology* 143, 3604-3610.
- Moroi M., Zhang L., Yasuda T., Virmani R., Gold H.K., Fishman M.C., Huang P.L.** (1998): Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J. Clin. Invest.* 101, 1225-1232.
- Mullershausen F., Friebe A., Feil R., Thompson W.J., Hofmann F. und Koesling D.** (2003): Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signalling. *J. Cell Biol.* 160, im Druck.
- Murad F., Mittal C.K., Arnold W.P., Katsuki S., Kimura H.** (1978): Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 145-158.
- Nakamura M., Ichikawa K., Ito M., Yamamori B., Okinaka T., Isaka N., Yoshida Y., Fujita S., Nakano T.** (1999): Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal.* 11, 671-676.
- Nakamura T. und Gold G.H.** (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325, 442-444.
- Nakane M., Arai K., Saheki S., Kuno T., Buechler W., Murad F.** (1990): Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* 265, 16841-16845.
- Nakane M., Saheki S., Kuno T., Ishii K., Murad F.** (1988): Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1139-1147.
- Nathan C. und Xie Q.W.** (1994): Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269, 13725-13728.

- Niethammer M., Kim E., Sheng M.** (1996): Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. Neurosci.* 16, 2157-2163.
- O'Dell T.J., Hawkins R.D., Kandel E.R., Arancio O.** (1991): Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11285-11289.
- Olson E.N., Arnold H.H., Rigby P.W., Wold B.J.** (1996): Know your neighbours: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 85, 1-4.
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S.** (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Pfeifer A., Aszodi A., Seidler U., Ruth P., Hofmann F., Fassler R.** (1996): Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274, 2082-2086.
- Pfeifer A., Klatt P., Massberg S., Ny L., Sausbier M., Hirneiss C., Wang G.X., Korth M., Aszodi A., Andersson K.E., Krombach F., Mayerhofer A., Ruth P., Fassler R., Hofmann F.** (1998): Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17, 3045-3051.
- Pham C.T., MacIvor D.M., Hug B.A., Heusel J.W., Ley T.J.** (1996): Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13090-13095.
- Radany E.W., Gerzer R., Garbers D.L.** (1983): Purification and characterization of particulate guanylate cyclase from sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 258, 8346-8351.
- Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S.** (1990): Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 10043-10047.
- Rudic R.D., Shesely E.G., Maeda N., Smithies O., Segal S.S., Sessa W.C.** (1998): Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* 101, 731-736.
- Russwurm M., Behrends S., Harteneck C., Koesling D.** (1998): Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. J.* 335, 125-130.
- Russwurm M., Wittau N., Koesling D.** (2001): Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 44647-44652.

- Sanders K.M. und Ward S.M.** (1992): Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am. J. Physiol.* 262, G379-392.
- Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong X., Huber A., Neubauer G., Wang G.X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., Hofmann F., Ruth P.** (2000): Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 404, 197-201.
- Schultz G., Bohme E., Munske K.** (1969): Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 8,1323-1332.
- Schultz J.E. und Klumpp S.** (1980): Guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane of Paramecium. *FEBS Lett.* 122, 64-66.
- Schultz J.E. und Klumpp S.** (1984): Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclases in the ciliary membranes from Paramecium and tetrahymena. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 17, 275-283.
- Schultz J.E. und Klumpp S.** (1991): Calcium-regulated guanylyl cyclases from Paramecium and Tetrahymena. *Methods Enzymol.* 195, 466-474.
- Schultz K., Schultz K., Schultz G.** (1977): Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265, 750-751.
- Schultz K.D., Bohme E., Kreye V.A., Schultz G.** (1979): Relaxation of hormonally stimulated smooth muscular tissues by the 8-bromo derivative of cyclic GMP. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 306, 1-9.
- Schulz S., Green C.K., Yuen P.S., Garbers D.L.** (1990): Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63, 941-948.
- Schulz S., Lopez M.J., Kuhn M., Garbers D.L.** (1997): Disruption of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 100, 1590-1595.
- Schulz S., Singh S. Bellet R.A., Singh G., Tubb D.J., Chin H., Garbers D.L.** (1989): The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 58, 1155-1162.
- Schulz S., Wedel B.J., Matthews A., Garbers D.L.** (1998): The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 1032-1037.
- Schuman E.M. und Madison D.V.** (1991): A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254, 1503-1506.
- Shabb J.B., Ng L., Corbin J.D.** (1990): One amino acid change produces a high affinity cGMP-binding site in cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 265, 16031-16034.

- Sharina I.G., Krumenacker J.S., Martin E., Murad F.** (2000): Genomic organization of alpha1 and beta1 subunits of the mammalian soluble guanylyl cyclase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10878-10883.
- Shibuki K. und Okada D.** (1991): Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349, 326-328.
- Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y., Simon M.** (1992): Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8794-8797.
- Son H., Hawkins R.D., Martin K., Kiebler M., Huang P.L., Fishman M.C., Kandel E.R.** (1996): Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87, 1015-1023.
- Son H., Lu Y.F., Zhuo M., Arancio O., Kandel E.R., Hawkins R.D.** (1998): The specific role of cGMP in hippocampal LTP. *Learn. Mem.* 5, 231-245.
- Steinhilper M.E., Cochrane K.L., Field L.J.** (1990): Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 16, 301-307.
- Sudoh T., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H.** (1990): C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 863-870.
- Suga S., Itoh H., Komatsu Y., Ogawa Y., Hama N., Yoshimasa T., Nakao K.** (1993): Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology* 133, 3038-3041.
- Sunahara R.K., Beuve A., Tesmer J.J., Sprang S.R., Garbers D.L., Gilman A.G.** (1998): Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 273, 16332-16338.
- Surks H.K., Mochizuki N., Kasai Y., Georgescu S.P., Tang K.M., Ito M., Lincoln T.M., Mendelsohn M.E.** (1999): Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science* 286, 1583-1587.
- Tamura N., Ogawa Y., Chusho H., Nakamura K., Nakao K., Suda M., Kasahara M., Hashimoto R., Katsuura G., Mukoyama M., Itoh H., Saito Y., Tanaka I., Otani H., Katsuki M.** (2000): Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4239-4244.
- Tesmer J.J., Sunahara R.K., Gilman A.G., Sprang S.R.** (1997): Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science* 278, 1907-1916.

- Thomas K.R., Capecchi M.R.** (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Turko I.V., Francis S.H., Corbin J.D.** (1998): Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem. J.* 329, 505-510.
- Vaandrager A.B., Smolenski A., Tilly B.C., Houtsmuller A.B., Ehlert E.M., Bot A.G., Edixhoven M., Boomaars W.E., Lohmann S.M., de Jonge H.R.** (1998): Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1466-1471.
- Vollmar A.M. und Schulz R.** (1995): Expression and differential regulation of natriuretic peptides in mouse macrophages. *J. Clin. Invest.* 95, 2442-2450.
- Waldman S.A., Rapoport R.M., Murad F.** (1984): Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J. Biol. Chem.* 259, 14332-14334.
- Waldman, S. A. und Murad, F.** (1987): Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 39, 163-196.
- Walter U., Eigenthaler M., Geiger J., Reinhard M.** (1993): Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv. Exp. Med. Biol.* 344, 237-249.
- Weber I.T., Shabb J.B., Corbin J.D.** (1989): Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. *Biochemistry* 28, 6122-6127.
- Wedel B., Harteneck C., Foerster J., Friebe A., Schultz G., Koesling D.** (1995): Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 270, 24871-24875.
- Wedel B., Humbert P., Harteneck C., Foerster J., Malkewitz J., Bohme E., Schultz G., Koesling D.** (1994): Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2592-2596.
- White A.A. und Aurbach G.D.** (1969): Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 191, 686-697.
- Wilson E.M. und Chinkers M.** (1995): Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34, 4696-4701.

- Winqvist R.J., Faison E.P., Waldman S.A., Schwartz K., Murad F., Rapoport R.M.** (1984): Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7661-7664.
- Yang R.B., Foster D.C., Garbers D.L., Fulle H.J.** (1995): Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 602-606.
- Yang R.B., Robinson S.W., Xiong W.H., Yau K.W., Birch D.G., Garbers D.L.** (1999): Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior. *J. Neurosci.* 19, 5889-5897.
- Yau K.W. und Nakatani K.** (1985): Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. *Nature* 317, 252-255.
- Yuen P.S., Potter L.R., Garbers D.L.** (1990): A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry* 29, 10872-10878.
- Zabel U., Hausler C., Weeger M., Schmidt H.H.** (1999): Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J. Biol. Chem.* 274, 149-152.
- Zabel U., Weeger M., La M., Schmidt H.H.** (1998): Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem. J.* 335, 51-57.
- Zhang G., Liu Y., Ruoho A.E., Hurley J.H.** (1997): Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* 386, 247-253.
- Zhao Y., Schelvis J.P., Babcock G.T., Marletta M.A.** (1998): Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry* 37, 4502-4509.

9 Eigene Publikationen

Friebe A., Russwurm M., Mergia E., Koesling D. (1999): A point-mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 38, 15253-15257.

Russwurm M., Mergia E., Mullershausen F., Koesling D. (2002): Inhibition of deactivation of NO-sensitive guanylyl cyclase accounts for the sensitizing effect of YC-1. *J Biol. Chem.* 277, 24883-24888.

Mergia E., Russwurm M., Zoidl G., Koesling D. (2003) Major occurrence of the new $\alpha_2\beta_1$ isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell. Signal.* 15, 189-195.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Doris Koesling, die das Thema der Dissertation initiiert hat, für ihre fachliche Unterstützung sowie für anregende Diskussionen, die wesentlich zum Fortgang der Arbeit beigesteuert haben.

Frau Prof. Susanne Klumpp danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Dr. Andreas Friebe, Herrn Florian Müllershausen und insbesondere bei Herrn Dr. Michael Rußwurm möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Problemstellungen herzlichst bedanken.

11 Lebenslauf

Vor- und Familienname: Evanthia Mergia
Geburtstag: 25. April 1969
Geburtsort: Lamia, Griechenland
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Griechisch

Schulbildung

1975 – 1981 Grundschole, in Kato Tithorea
1981 – 1984 Gymnasium, in Kato Tithorea
1984 – 1987 Lyzeum, in Athen
1988 – 1989 Besuch des Goethe-Instituts in Düsseldorf

Studium

1990 – 1995 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts
Universität zu Kiel
Jan. 1996 – Dez. 1996 Praktikum in der Insel-Apotheke auf Westerland/Sylt
Februar 1997 Approbation als Apothekerin

Promotion

1997 – 1999 Graduiertenkolleg 'Signalerkenennung und –umsetzung',
Berlin
Seit 2000 Pharmakologie und Toxikologie Bochum,
Ruhr-Universität Bochum