

Konditionale Mutagenese von Desmoglein 2 in der Maus

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Bastian Holthöfer

geboren in Esslingen am Neckar

Mainz, Juni 2007

Dekan: Prof. Dr. Harald Paulsen

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2007

1.	Einleitung.....	1
1.1	Interzellularkontakte.....	2
1.1.1	Allgemeine Morphologie von Desmosomen	3
1.1.2	Molekularer Aufbau von Desmosomen	6
1.1.2.1	Allgemeine Eigenschaften von Cadherinen	6
1.1.2.2	Desmosomale Cadherine – Genstruktur und Expression	10
1.1.2.3	Desmosomale Cadherine – Protein- und Domänenstruktur	13
1.1.2.4	Desmosomale Cadherine – Interaktionen mit PP, PG, DP.....	15
1.1.2.5	Desmosomale Cadherine – proteolytische Spaltstellen.....	16
1.1.2.6	Desmosomale Cadherine – Erkrankungen	16
1.1.2.7	Desmosomale Signaltransduktion	17
1.2	Generierung genetisch modifizierter Mäuse	19
1.2.1	Homologe Rekombination.....	20
1.2.2	Sequenzspezifische Rekombinationssysteme	21
1.2.2.1	Das Cre/lox-Rekombinationssystem	22
1.2.2.2	Das Flp/FRT-Rekombinationssystem	23
1.3	Konditionale Rekombinationssysteme in der Mausgenetik.....	25
1.3.1	Das Tet-on/Tet-off System	27
1.3.2	Die induzierbare Rekombinase Cre-ER ^{T2}	29
1.4	Zielsetzung der Arbeit	31
2.	Material und Methoden.....	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Geräte und Zubehör	33
2.1.2	Chemikalien	33
2.1.3	Nukleinsäuren	35
2.1.4	Enzyme	36
2.1.5	Antikörper	37
2.1.6	Bakterienstämme	37
2.1.7	Zelllinien	38
2.1.8	Puffer und Lösungen	38
2.2	Methoden	45
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	45
2.2.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	46
2.2.1.3	Kryokonservierung und Rekultivierung von Bakterien	47
2.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA	47
2.2.1.4.1	DNA-Präparation in kleinem und großem Maßstab	47
2.2.1.4.2	Maxi-Präparation von Plasmiden zur ES-Zell-Transfektion.....	48
2.2.1.5	Äthanolpräzipitation von DNA	48
2.2.1.6	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	49
2.2.1.7	Restriktion von DNA.....	49
2.2.1.8	Dephosphorylierung von DNA.....	51
2.2.1.9	Phosphorylierung von DNA	52
2.2.1.10	Ligation von DNA	53
2.2.1.11	Sequenzierung von DNA.....	53
2.2.1.12	Hybridisierung von Oligonukleotiden zur Klonierung.....	54
2.2.1.13	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	54
2.2.1.14	Konzentrationsbestimmung von DNA über serielle Verdünnung.....	55
2.2.1.15	Polymerase-Kettenreaktion (<i>PCR</i>)	56
2.2.1.16	PCR mit Fehlerkontrolle für Klonierungsexperimente	58
2.2.1.17	RT-PCR zur cDNA-Synthese.....	59

2.2.1.18	Präparation genomischer DNA.....	60
2.2.1.18.1	DNA-Präparation aus Schwanzbiopsien.....	60
2.2.1.18.2	DNA-Präparation aus ES-Zellen für Southern-Blot-Analysen... 61	61
2.2.1.18.3	DNA-Präparation aus Geweben (außer Schwanzbiopsien)	62
2.2.1.19	Southern-Blot-Hybridisierung.....	62
2.2.1.19.1	Präparativer Verdau von DNA.....	62
2.2.1.19.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	63
2.2.1.19.3	Transfer der DNA	64
2.2.1.19.4	radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	65
2.2.1.19.5	Hybridisierung der DNA-Sonden	66
2.2.1.19.6	Entfernen von hybridisierten DNA-Sonden (<i>Strippen</i>).....	67
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	67
2.2.2.1	Gesamtprotein-Isolierung aus Zellkulturzelllysaten.....	67
2.2.2.2	Gesamtprotein-Isolierung aus tierischen Geweben.....	68
2.2.2.3	Proteinquantifizierung nach Bradford	68
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	69
2.2.2.5	Detektion von Proteinen durch Anfärben.....	70
2.2.2.5.1	Coomassie-Brilliant-Blau G-250	70
2.2.2.5.2	Silbernitrat.....	70
2.2.2.5.3	Ponceau-S.....	71
2.2.2.6	Western-Blot-Analyse.....	71
2.2.2.6.1	Elektrotransfer (<i>semidry</i>) auf eine Nitrozellulosemembran.....	71
2.2.2.6.2	Unterdrucktransfer auf eine Nitrozellulosemembran (<i>Dot-Blot</i>) ..	72
2.2.2.6.3	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine.....	73
2.2.2.6.4	Entfernen der Antikörper von Nitrozellulosemembranen.....	73
2.2.2.7	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	74
2.2.2.7.1	Starterkulturen zur Bestimmung der geeigneten Parameter.....	75
2.2.2.7.2	Expressionskultur im präparativen Maßstab.....	77
2.2.2.8	Affinitätschromatographie von 6xHis-Proteinen	77
2.2.2.8.1	Denaturierende Bedingungen.....	77
2.2.2.8.2	Native Bedingungen.....	78
2.2.2.9	Umpuffern von Proteinen durch Dialyse oder Ultrafiltration	79
2.2.3	Zellkulturtechniken.....	80
2.2.3.1	Präparation und Kultur embryonaler Fibroblasten (<i>Feeder</i>).....	80
2.2.3.2	Expansion embryonaler Stammzellen.....	80
2.2.3.3	Elektroporation embryonaler Stammzellen.....	81
2.2.3.4	Isolierung erfolgreich transfizierter ES-Zellklone.....	81
2.2.3.5	Kultivierung von Zellkultur-Zellen	82
2.2.3.6	Einfrieren von Zellkultur-Zellen	83
2.2.3.7	Auftauen von Zellkultur-Zellen.....	83
2.2.3.8	Vorbereitung von Glasplättchen für die Zellkultur	84
2.2.3.9	Lipotransfektion von Zellkultur-Zellen.....	84
2.2.4	Histologische Methoden	85
2.2.4.1	Fixieren von Zellkultur-Zellen und Geweben.....	85
2.2.4.1.1	Methanol-Aceton-Fixierung.....	85
2.2.4.1.2	Paraformaldehyd-Fixierung	86
2.2.4.2	Immunfluoreszenz-Färbung	86
2.2.4.2.1	Zellkultur-Zellen	87
2.2.4.2.2	Gewebsschnitte	88
2.2.5	Mikroskopie.....	89
2.2.5.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	89

2.2.5.2	Laserscanning-Mikroskopie	89
2.2.6	Tierexperimentelle Techniken	89
2.2.6.1	Haltung und Zucht von Labormäusen	89
2.2.6.2	Blastozysteninjektion von embryonalen Stammzellen.....	91
2.2.6.3	Immunisierung von Kaninchen	91
2.2.6.4	Aufarbeitung von Antisera	92
2.2.6.5	Induktion der Cre-Rekombinase über externe Induktoren	92
2.2.6.5.1	Subkutane Injektion von Tamoxifen.....	92
2.2.6.5.2	Gabe von Doxzyklin über das Trinkwasser	93
3.	Ergebnisse.....	94
3.1	Herstellung Dsg2-spezifischer Antisera	94
3.1.1	Klonierung der Expressionskonstrukte.....	94
3.1.2	Überexpression der Antigene in <i>E. coli</i> und Affinitätsreinigung	97
3.1.3	Analyse der Testantisera	100
3.1.4	Analyse der Antisera.....	103
3.1.4.1	Immunfluoreszenz auf Eph4-Zellen	103
3.1.4.2	Immunfluoreszenz auf Gewebsschnitten.....	104
3.1.4.3	Western-Blot-Analysen von Zellkulturextrakten	108
3.1.4.4	Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus Geweben	109
3.2	Herstellung und Etablierung eines induzierbaren und gewebs-	
spezifischen DSG2-Transgens in der Maus	112	
3.2.1	Design und Klonierung des Targeting-Konstrukts	113
3.2.1.1	Strategie	113
3.2.1.2	5'-Arm des Targeting-Konstrukts	116
3.2.1.3	3'-Arm des Targeting-Konstrukts	118
3.2.2	<i>In vitro</i> Rekombination des Targeting-Konstrukts	121
3.2.3	Elektroporation von ES-Zellen	122
3.2.4	Southern-Blot Analysen von ES-Zellen	122
3.2.5	Herstellung der Chimären	125
3.2.6	Generierung von transgenen DSG2-Mauslinien.....	126
3.2.6.1	DSG2 ^{loxP-Neo} /DSG2 ^{loxP-Neo}	127
3.2.6.2	DSG2 ^{loxP} /DSG2 ^{loxP}	127
3.2.6.3	DSG2 ^{loxP} /DSG2 ^{delE7-E8} bzw. DSG2 ^{loxP-Neo} /DSG2 ^{delE7-E8}	129
3.2.7	Southern-Blot Analysen zur Genotypisierung der transgenen Mäuse....	130
3.2.8	Herstellung mehrfach transgener, induzierbarer Mäusstämme	132
3.2.9	PCR-Analysen zur Genotypisierung der transgenen Mäuse.....	132
3.2.10	PCR-Test auf Cre-vermittelte genomische Rekombination	134
3.2.11	Das Tet-On- System zur gewebsspezifischen Induktion	135
3.2.11.1	Induktion in der Leber: LAP-rtTA/ <i>tetO</i> -P _{hCMV} -Cre.....	135
3.2.11.2	Induktion im Herzmuskel: α -MHC-opt-rtTA/ <i>tetO</i> -P _{hCMV} -Cre.....	138
3.2.11.1	Induktion im Darm: FABP-rtTA/ <i>tetO</i> -P _{hCMV} -Cre.....	140
3.2.12	Das Cre-ER ^{T2} - System zur gewebsspezifischen Induktion	141
3.2.12.1	Induktion im Darm: vil-Cre-ER ^{T2}	141
3.2.12.2	Induktion im Herzmuskel: MerCreMer	143
3.2.12.1	Ubiquitäre Induktion: ROSA26-Cre-ER ^{T2}	145
3.2.13	Analyse der rekombinierten DSG2-mRNA per RT-PCR.....	147
3.2.14	Analyse des rekombinierten Dsg2-Proteins.....	149
3.2.14.1	Western Blot Analysen auf Gewebeextrakten.....	149
3.2.14.2	Immunfluoreszenz auf Gewebsschnitten.....	150
3.2.15	Untersuchungen an rekombinierter DSG2-cDNA in Eph4-Zellen.....	152

4.	Diskussion	156
4.1	Herstellung Dsg2-spezifischer Antisera	156
4.2	Induzierbare und gewebsspezifische Mutagenese von DSG2	160
4.2.1	Herstellung von induzierbaren und gewebsspezifischen DSG2-Mutanten in der Maus	160
4.2.2	Rekombination des DSG2-Lokus in der Leber.....	162
4.2.3	Rekombination des geflochtenen DSG2-Allels im Darm	164
4.2.4	Wirkung der Deletion extrazellulärer Dsg2-Domänen auf die Gewebshomöostase im Darm	165
4.2.5	Rekombinations-Induktion im Herzmuskel.....	166
4.2.6	Rekombination von DSG2 im ROSA26-CreER ^{T2} -Hintergrund.....	167
4.2.7	Inkorporation des mutierten Dsg2 in Desmosomen	168
4.2.8	Auswirkungen der Dsg2-Mutation auf die desmosomale Adhäsion	170
4.2.9	Auswirkungen der Dsg2-Mutation auf das „desmosomale <i>signalling</i> “ ..	171
5.	Zusammenfassung	173
6.	Literaturverzeichnis	175
7.	Anhang	192
7.1	Abkürzungsverzeichnis	192
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	194
7.3	Oligonukleotide	196
7.4	PCR-Programme	199
7.5	Eigenschaften der PCR-Reaktionsansätze	200
7.6	Aminosäuresequenzvergleich der murinen Desmogleine	202
7.7	Phylogenie der desmosomalen Cadherine	203
7.8	Identitäten/Similaritäten diverser Desmogleine	204
7.9	Expression desmosomaler Cadherine in unterschiedlichen Geweben... ..	205

1. Einleitung

Vor 600 bis mehr als 700 Millionen Jahren gaben einige Zellen ihr Einzelgänger-Dasein auf und schlossen sich zu ersten einfachen Metazoen zusammen ((paläontologische Arbeiten: (Valentine et al., 1999), molekulare Evolutionshypothesen: (Bromham und Hendy, 2000)). Auf diesem grundlegenden Schritt basiert die Artenvielfalt der Organismen, die wir heute auf der Erde vorfinden. Eine essentielle Eigenschaft von Vielzellern ist der Zusammenhalt der einzelnen Zellen, was letztendlich die hochkomplizierten Baupläne der höheren Tiere ermöglicht. Auch die interne Organisation eines höheren Lebewesens durch Kompartimentierung des Organismus in Organsysteme kann nur durch Zusammenlagerung unterschiedlicher Zelltypen etabliert werden. So entstanden im Laufe der Evolution durch Differenzierung zum Beispiel komplexe Epithelien, die in der Lage sind, das empfindliche körpereigene Milieu von der Umwelt abzuschotten.

Als ein Beispiel soll hier die Haut des Menschen mit ihren mannigfaltigen Funktionen dienen. Sie ist wesentlich an der Wärme- und Wasserregulation des Körpers beteiligt, schützt uns als Barriere zum einen vor dem Eindringen von Bakterien oder Viren und bietet uns zum anderen Schutz vor schädlicher UV-Strahlung. Jedoch wird auch die Festigkeit der Haut jeden Tag auf die Probe gestellt. Diese besonders wichtige Eigenschaft des Organs – seine mechanische Stabilität – beruht auf dem ausgeprägten Zytoskelett der Keratinozyten, sowie auf der kraftübertragenden Vernetzung der Zellen untereinander

Wie das Endoskelett der Wirbeltiere für die Aufrechterhaltung der Form und Beweglichkeit des gesamten Organismus sorgt, ist das Zytoskelett einer jeden Zelle für deren Stabilität und Funktion im Kleinen verantwortlich. Die drei Filament-Komponenten dieses Zytoskeletts – Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamente – tragen mit ihren verschiedenen mechanischen Eigenschaften zur Unterscheidung von Zelltypen bei. So steht bei den erwähnten Keratinozyten in der Haut das Keratin-Netzwerk der Intermediärfilamente im Vordergrund, das für die hohe Stabilität dieser Zellen und der Haut insgesamt sorgt.

Wichtig ist jedoch nicht nur die interne Festigkeit der einzelnen Zelle, sondern auch die Übertragung von mechanischem Stress auf das Gewebe als Ganzes, sodass sich die einwirkenden Kräfte verteilen können. Die Existenz von Zell-Zell-Adhäsionskontakten spielt deshalb eine besondere Rolle bei der Entstehung von Zellverbänden und Organen.

Unter den verschiedenen Zell-Zell-Kontakten spielen die Desmosomen bei der mechanischen Kopplung benachbarter Zellen eine Hauptrolle. In der Haut und im Herzen, also Geweben, die einer besonders hohen mechanischen Belastung ausgesetzt sind, wirken Desmosomen als kraftvermittelnde Brücken zwischen den einzelnen Zellen, indem sie die Netzwerke des Intermediärfilament-Zytoskeletts diese Zellen miteinander verbinden. Ungefähr 40% der Oberfläche des *Stratum granulosum* sind mit Desmosomen besetzt (Al-Amoudi et al., 2005).

1.1 Interzellularkontakte

Die meisten Zellen des Wirbeltier-Organismus bilden mannigfaltige Kontakte zu benachbarten Zellen aus. Diese können vorübergehend oder dauerhaft zwischen Zellen gleichen (homotypisch) oder anderen (heterotypisch) Typs ausgebildet werden. Je nach Funktion, Morphologie und molekularem Aufbau der Kontakte können Adhärenzkontakte (*Zonulae adhaerentes*), Desmosomen (*Maculae adhaerentes*), Kommunikationskontakte (*Nexus*) und Barrierekontakte (*Zonulae occludentes*) unterschieden werden. Adhäsionskontakte erfüllen überwiegend mechanische Funktionen, jedoch werden insbesondere den *Zonulae adhaerentes* auch Funktionen bei Signaltransduktionsvorgängen zugesprochen (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Jüngste Arbeiten beschreiben auch eine Beteiligung der *Maculae adhaerentes* an der zellulären Signalweiterleitung (Berkowitz et al., 2005; Berkowitz et al., 2006). Zelladhäsionsmoleküle sind meist integrale Membranproteine, deren extrazelluläre Domänen mit gleichen (homophil) oder andersartigen (heterophil) Zelladhäsionsmolekülen der Nachbarzelle in Kontakt treten. Desmosomen und Adhärenzkontakte unterscheiden sich in ihrer Verankerung an das Zytoskelett. Während die carboxyterminalen Domänen der Adhärenzkontakte über Adapterproteine der Cateninfamilie (α -, β -, γ -Catenin) an Aktinfilamente gebunden sind, werden die desmosomalen Cadherine (Desmogleine und Desmocolline) über Plakoglobin (γ -Catenin), Plakophilin und Desmoplakin an den Intermediärfilamenten der Zelle verankert (siehe Abbildung 1, Übersichtsartikel: (Nollet et al., 2000)). Desmosomen sind hauptsächlich in Epithelien und im Herzmuskel beschrieben worden, Adhärenzkontakte kommen dagegen zwischen Zellen aller Gewebe vor. Die Darmmucosa von Säugern dient als prominentes Beispiel, da sie die drei zellulären Verbindungen in unmittelbarer Nachbarschaft vereint. Die Schleimhautzellen sind lateral an ihren jeweiligen apikalen

Seiten miteinander verknüpft. Bereits im Jahre 1963 zeigten Farquhar und Pallade diesen dreiteiligen Haftkomplex, bestehend aus *Zonula occludens*, *Zonula adhaerens* und *Macula adhaerens* (Farquhar und Palade, 1963).

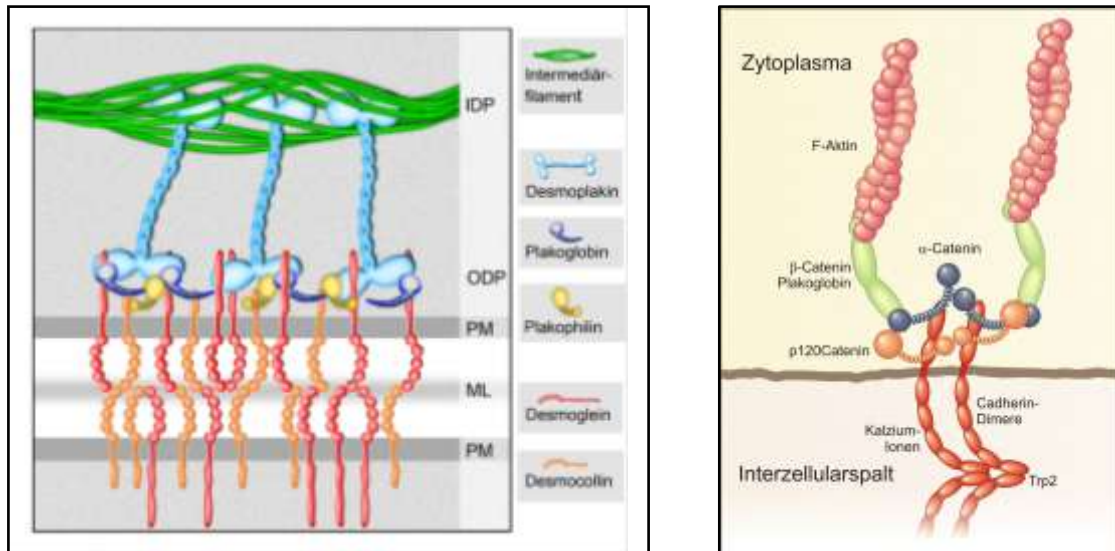


Abbildung 1: vergleichende Übersicht vom desmosomalen Haftkomplex und Adhärenzkontakten – Asymmetrisch vereinfachte schematische Darstellung der jeweiligen Hauptkomponenten.

Links – Desmosom: Die desmosomalen Cadherine Desmoglein (rot) und Desmocollin (orange) vermitteln die Kraftübertragung über den Interzellularspalt, ihre jeweiligen Interaktionsdomänen bilden die zentrale Mittellinie (hellgrau) aus. Die gebogenen Konformationen der extrazellulären Domänen und die Kombinationen der beteiligten desmosomalen Cadherine (Homo- gegenüber Heterodimeren) sind an die elektronenmikroskopischen Arbeiten von (He et al., 2003) angelehnt. An die carboxyterminalen Domänen der desmosomalen Cadherine binden intrazellulär die Armadilloproteine Plakoglobin (violett) und Plakophilin (gelb), die ihrerseits mit Homodimeren von Desmoplakin (blau) interagieren. Dieses Brückenprotein verbindet die unmittelbar membranständigen Proteine mit den lateral einstrahlenden entwundenen Intermediärfilamenten.

Rechts – Adhärenzkontakt: Im Interzellularspalt lagern sich klassische Cadherine (rot) benachbarter Zellen Kalzium-abhängig aneinander an, wobei die Aminosäure Tryptophan 2 (Trp2) eine wichtige Funktion übernimmt (siehe 1.1.2.1). Die carboxyterminalen Domänen der klassischen Cadherine tragen Bindestellen für die Armadilloproteine α-Catenin (blau) und p120Catenin (orange). An deren Kopfdomänen binden die Brückenproteine β-Catenin oder γ-Catenin/Plakoglobin (grün), welche ihrerseits die Verbindung zu den Aktinfilamenten (hellrot) herstellen.

1.1.1 Allgemeine Morphologie von Desmosomen

Desmosomen (ὁ δεσμός, altgriechisch Fessel; τὸ σῶμα, altgriechisch Körper) wurden erstmalig im 19. Jahrhundert vom italienischen Arzt Bizzozero als lichtmikroskopisch detektierbare „Knötchen“ beschrieben und nach ihm benannt (Bizzozero, 1864); später stellte Bizzozero auch den Brückencharakter dieser Organellen dar (Bizzozero, 1871), der zuvor von Schrön postuliert worden war (Schrön, 1865). Der Begriff „Desmosom“ selbst wurde erst im Jahre 1920 von Schaffer eingeführt (Schaffer, 1920). Die Ultra-

struktur der Desmosomen konnte in den späten 50er Jahren des 20. Jahrhunderts mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie näher untersucht werden (Horstmann und Knoop, 1958; Odland, 1958; Karrer, 1959; Kelly, 1966) (Abbildung 2).

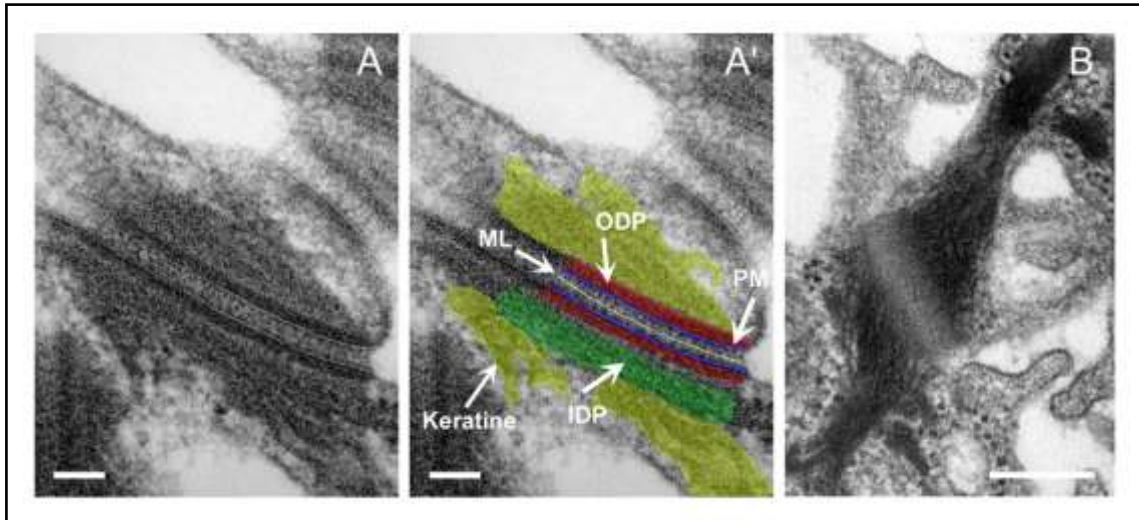


Abbildung 2: Ultrastruktur von Desmosomen der Rattenhaut

– **Elektronenmikroskopische Aufnahmen reifer Desmosomen mit den typischen Substrukturen.**

A: Schnitte durch den desmosomalen Haftkomplex; **A':** wie A, die desmosomalen Landmarken wurden farblich unterlegt; **B:** Schnitt Ebene oberhalb eines Desmosoms mit einstrahlenden Keratinfilamenten. IDP: innerer dichter Plaque (grün); ODP: äußerer dichter Plaque (rot); PM: Plasmamembran (blau); Keratine (gelb); ML: Mittellinie; Maßstab: A, A': 50 nm, B: 250 nm

Originalbildmaterial mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jastrow

Desmosomen sind von runder oder ovaler Form und haben einen Durchmesser von ca. 0,2 bis 0,3 μm (Farquhar und Palade, 1963). Die Größe von Desmosomen kann aber zwischen 0,1 und 1,4 μm stark variieren und erreicht in Ausnahmefällen sogar einen Durchmesser von 2,4 μm (Franke et al., 1981). Durch Verschmelzen von mehreren Desmosomen einer Zelle können sogar noch umfangreichere Strukturen entstehen (Orwin et al., 1973; Cowin et al., 1985). Mechanisch beanspruchte Hautregionen, wie beispielsweise die Fußsohlen oder die Handinnenflächen, bilden insbesondere in den weiter apikal gelegenen Schichten der Epidermis (*Stratum granulosum*) größere Desmosomen aus, als weniger belastete Hautregionen (Wan et al., 2003).

Eine markante, ca. 5 bis 9 nm breite, elektronendichte Mittellinie bildet die Symmetrieachse der desmosomalen Haftkomplexe (Odland, 1958; LeLoup et al., 1978). Bereits die ersten Arbeiten beschreiben eine regelmäßige Abfolge von extrazellulären Strukturen, die beide Zellmembranen miteinander zu verbinden scheinen. Der Interzellularspalt ist im Bereich der Desmosomen auf ca. 24 nm aufgeweitet (Farquhar und Palade, 1963), sodass die „Querverbindungen“ mit ihrer Länge von 10 bis 15 nm, einer Stärke von 4 bis 5 nm und einem lateralen Abstand von ca. 7 bis 10 nm Platz finden (Franke et

al., 1981). Der Interzellularspalt selbst ist mit einer filamentösen Substanz, der Desmoglea (Gorbsky und Steinberg, 1981) gefüllt, die hauptsächlich aus Kohlenhydraten besteht.

Neue Fixierungstechniken wie die Vitrifizierung, starke Vergrößerungen und hohe Auflösungen der Elektronenmikroskope liefern heutzutage genauere Erkenntnisse über die Mittellinie und die Eigenschaften des Interzellularspalts. Bei der terminalen Differenzierung von Keratinozyten und ihrer Transition vom *Stratum spinosum* zum *Stratum corneum* verändern sich die Eigenschaften der Desmosomen und der Interzellularspalt weitet sich temporär bis zu ca. 50 nm auf (Al-Amoudi et al., 2005). Mit Hilfe der Elektronentomographie konnte die Zusammensetzung der Mittellinie näher untersucht werden (He et al., 2003): die elektronendichten, zueinander versetzten, stabförmigen Strukturen können den extrazellulären desmosomalen Cadherin-Domänen zugeordnet werden, die sich an ihren Enden jeweils aneinander anlagern und so in diesem Bereich die Mittellinie ausbilden (vergleiche Abbildung 1).

Im elektronenmikroskopischen Bild fallen besonders die elektronendichten desmosomalen Plaques auf, die sich an den Innenseiten der jeweiligen benachbarten Plasmamembranen befinden (siehe Abbildung 2). Die Komponenten dieser 10 bis 40 nm dicken Strukturen wurden bereits aufgeklärt (Schwarz et al., 1990) und werden im Folgenden näher vorgestellt. Eine unterschiedliche Elektronendichte unterteilt den Plaque in zwei Bereiche, den zur Plasmamembran gelegenen äußeren und den zum Zytoplasma gelegenen inneren Plaque (Steinberg et al., 1987; Burdett, 1998). Der Bereich zwischen der zum Zellinneren gelegenen Grenze des äußeren Plaques und den Intermediärfilamenten (den inneren Plaque eingeschlossen) wird auch als Satellitenregion bezeichnet (Miller et al., 1987). Im inneren Plaque binden die Intermediärfilamente an Desmoplakin, der elektronendichtere, äußere Plaque entsteht durch die Interaktion der desmosomalen Brückenproteine Plakoglobin und Plakophilin mit Desmoplakin und den zytoplasmatischen Domänen der desmosomalen Cadherine. Beide Plaques sind ca. 15 bis 20 nm dick und werden von einem 10 bis 20 nm breiten elektronenlichten Bereich voneinander getrennt. Maligne Zellen weisen einen wesentlich kleineren Plaque auf, als nicht entartete Zellen (Oliveira Crema et al., 2005).

Terminal differenzierte Keratinozyten zeichnen sich durch eine spezialisierte Desmosomengattung – den Korneodesmosomen aus. Diese Haftkomplexe werden im *Stratum corneum* der Epidermis gebildet und zeigen eine vielfache Mittellinie, sowie einen auf

bis zu 44 nm aufgeweiteten Interzellularspalt (Al-Amoudi et al., 2005). Die desmosomalen Cadherine Desmoglein und Desmocollin spielen in Korneodesmosomen keine Rolle mehr, ihre Funktion wird von dem Glykoprotein Corneodesmosin übernommen, das analog zu den klassischen Cadherinen eine homophile, aber kaum Ca^{2+} -abhängige Adhäsion bewirkt (Jonca et al., 2002).

1.1.2 Molekularer Aufbau von Desmosomen

Skerrow und Matoltsy begannen Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts mit der Isolierung von Desmosomen aus boviner Epidermis (Skerrow und Matoltsy, 1974b, a). Die desmosomalen Proteine konnten im Anschluss gereinigt und zunächst als einfache „Banden-Proteine“ einer Gelelektrophorese beschrieben werden (z.B. (Drochmans et al., 1978; Gorbsky und Steinberg, 1981; Franke et al., 1983). Diese Protein-Fractionen wurden weiter untersucht, charakterisiert und benannt: Bande 1/2: Desmoplakin 1/2/3 (Müller und Franke, 1983; Cowin et al., 1985; Gorbsky et al., 1985), Bande 3: Desmoglein (Giudice et al., 1984), Bande 4a/b: Desmocollin (Cowin et al., 1984), Bande 5: Plakoglobin (Cowin et al., 1986), Bande 6: Plakophilin (Kapprell et al., 1988), Desmocollin (Tsukita, 1985).

Die desmosomalen Proteine können in drei Klassen eingeteilt werden: die glykosylierten desmosomalen Cadherine Desmoglein und Desmocollin, die nicht-glykosylierten Armadillo-Proteine Plakoglobin und Plakophilin, sowie das Plaque-Protein Desmoplakin.

1.1.2.1 Allgemeine Eigenschaften von Cadherinen

Die Cadherine bilden eine Großfamilie von Ca^{2+} -bindenden glykosylierten Zelladhäsionsmolekülen, die aufgrund von Genom- sowie Domänenstruktur, Sequenzhomologien und Proteinsequenzen in mindestens sechs Gruppen unterteilt werden kann. Sie spielen eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur und -integrität bei Vertebraten und Invertebraten. In der Literatur werden die klassischen Cadherine vom Typ-I (E-, N-, und P-Cadherine), die untypischen Typ-II Cadherine, die Desmog-

leine, die Desmocolline, die Protocadherine und die Flamingo-Cadherine beschrieben (Übersichtsartikel: (Nollet et al., 2000)).

Die fünf extrazellulären Domänen der Cadherine (EC1 bis EC5) umfassen jeweils ca. 110 Aminosäuren und sind hoch konserviert. Durch das Zusammenwirken mehrerer β -Faltblatt-Strukturen und zweier kurzer α -helikaler Bereiche entsteht jeweils eine fassartige Tertiärstruktur, die eine Koordination von Ca^{2+} -Ionen zwischen den einzelnen EC-Domänen ermöglicht. Durch diese Einlagerung von Kalzium wird das Cadherin-Molekül insgesamt versteift (Overduin et al., 1995; Shapiro et al., 1995; Nagar et al., 1996) und nimmt eine gebogene Konformation an (Boggon et al., 2002).

Die desmosomalen Cadherine unterscheiden sich von den übrigen Cadherinen vor allem auf Grund ihrer verlängerten zytoplasmatischen Domänen, die für die Bindung der Intermediärfilamente verantwortlich gemacht werden.

Die Interaktionen zwischen Cadherinen sind auf molekularem Niveau näher untersucht worden. Mutationsstudien an Cadherinen und Versuche mit Antikörpern bzw. Peptiden, welche die Adhäsion der Cadherine herabsetzten, deuten auf eine Beteiligung von hochkonservierten Bereichen in der EC1-Domäne an der Adhäsion hin. Der Tryptophan-Rest 2 (W2), sowie eine Region mit der konservierten HAV-Sequenz (Histidin-Alanin-Valin) scheinen dabei eine Rolle zu spielen (Blaschuk et al., 1990; Pertz et al., 1999; Chappuis-Flament et al., 2001). Strukturanalysen zeigten, dass vor allem die EC1-Domäne sowohl für die *cis*-, als auch die *trans*-Interaktion von Bedeutung ist; bei der *cis*-Interaktion interagieren Moleküle derselben Zelle, während bei der *trans*-Interaktion die Cadherine benachbarter Zellen miteinander in Kontakt treten. Basierend auf Daten von Röntgenstrukturanalysen an isolierten EC1-Domänen von N-Cadherin wurde diskutiert, dass die Bindung von W2 in eine hydrophobe Tasche in der EC1-Domäne des Partnermoleküls zur Ausbildung von *cis*-Dimeren (*strand dimer interface*) führt. Diese Cadherin-Dimere sollen durch *trans*-Interaktion mit Dimeren benachbarter Zellen eine gestreckte, Reißverschluss-artige Anordnung bilden (Shapiro et al., 1995). Später wurde diese Hypothese aufgrund von Untersuchungen an kompletten Extrazellulärdomänen von C-Cadherin modifiziert. Es zeigte sich, dass der symmetrische Austausch des W2 direkt zur Ausbildung von EC1-*trans*-Dimeren führt, für die eine *cis*-Interaktion nicht notwendig ist (Boggon et al., 2002). Aufgrund der Krümmung der extrazellulären Domänen kommt durch die Bindung der EC1 an die EC2 eines benachbarten Moleküls derselben Zelle zusätzlich eine *cis*-Interaktion zustande (vergleiche Abbildung 3).

Übereinstimmend mit diesem Modell wurde in einer elektronentomographischen Strukturanalyse nativer Desmosomen eine *cis*- und *trans*-Dimerisierung postuliert. Dabei können die desmosomalen Cadherine entweder eine S- oder W-förmige Anordnung (*trans*) eingehen, oder eine λ -förmige Konformation (*cis* und *trans*) bilden (He et al., 2003). Andere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass sowohl *cis*- als auch *trans*-Dimerisierungen über die EC1-Domäne vermittelt werden. Allerdings führten Mutationsanalysen zu der Hypothese, dass W2 nicht direkt mit dem Partnermolekül interagiert, sondern durch Bindung in die hydrophobe Tasche desselben Moleküls erst die Adhäsionsfläche für die *trans*-Interaktion freigelegt wird (Pertz et al., 1999).

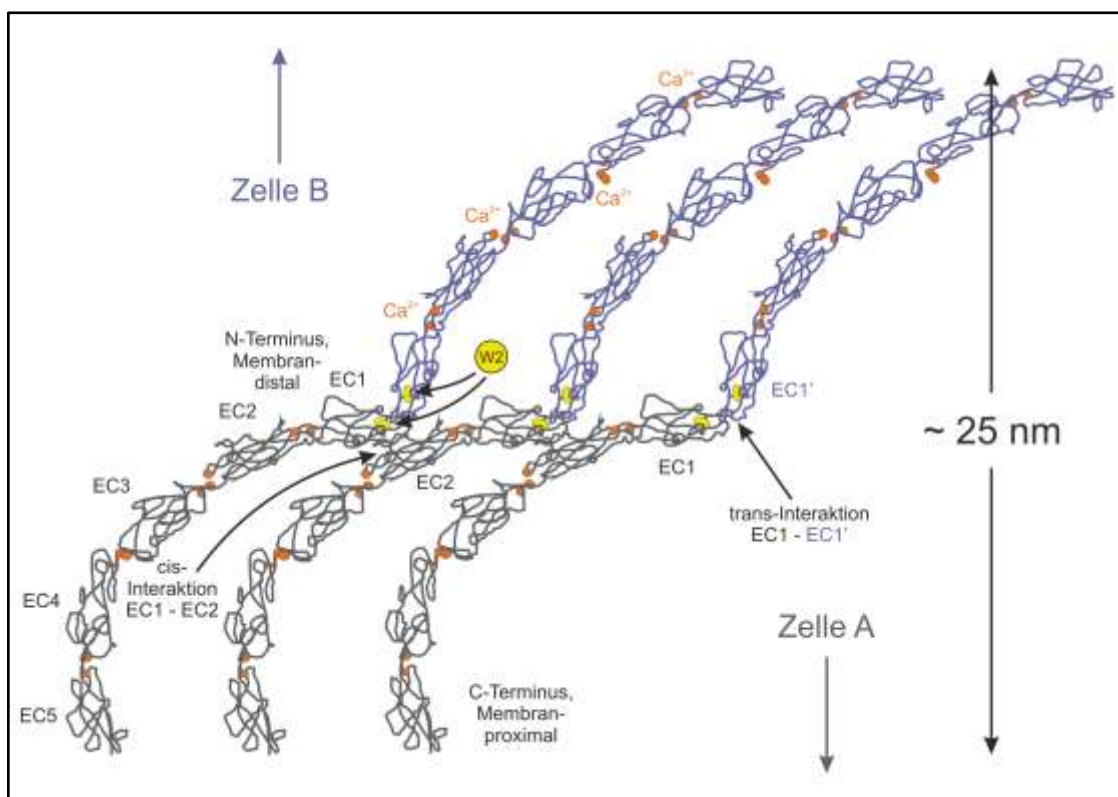


Abbildung 3: Interaktion der extrazellulären Domänen von C-Cadherinen im Interzellularrspalt
 Benachbarte Cadherinmoleküle einer Zelle bilden über ihre extrazellulären Domänen EC1 und EC2 *cis*-Interaktionen miteinander aus. Die EC1-Domäne eines Cadherins von Zelle A interagiert in *trans* mit einer EC1'-Cadherindomäne der Zelle B. Zwischen den einzelnen tonnenförmigen Cadherindomänen versteifen koordinierte Kalzium-Ionen die gebogene Konformation. Die Aminosäure Tryptophan an Position 2 begünstigt die *trans*-Dimerisierung der Moleküle durch Demaskieren der Interaktionsoberflächen in EC1. EC1 bis EC5: extrazelluläre Domänen (grau/violett); Kalzium-Ionen: orange; Tryptophan 2: gelb (verändert, nach (Boggon et al., 2002))

Im Gegensatz zu den Modellen, die auf Strukturanalysen basieren, lassen funktionelle Interaktionsstudien auf eine stärkere Überlappung zwischen Cadherin-Molekülen schließen, denn Kraftmessungen mit cadherinbeschichteten Oberflächen lieferten Hinweise auf *trans*-Interaktionen überlappender Cadherine. Es wird vermutet, dass eine

EC1-Domäne nicht nur an die EC1-Domäne des *trans*-interagierenden Cadherins, sondern auch an die EC3- bzw. EC5-Domäne des Interaktionspartners binden kann. Für eine kräftige Adhäsion könnte also eine stärkere Überlappung der Moleküle notwendig sein (Sivasankar et al., 2001; Zhu et al., 2003). Neuere Untersuchungen mit Antikörpern, welche speziell gegen unterschiedliche extrazelluläre Domänen gerichtet sind, deuten jedoch auf eine partielle Überlappung der beiden EC1 Domänen hin (Shimizu et al., 2005).

Die Adhäsion der *Zonulae adhaerentes* beruht auf der homophilen Interaktion (klassischer) Cadherine desselben Typs. Im Gegensatz dazu scheinen in Desmosomen auch unterschiedliche (desmosomale) Cadherine miteinander in Kontakt zu treten (Kowalczyk et al., 1996), es wurden beispielsweise sowohl Desmocollin 1, als auch Desmocollin 3 in ein und demselben Desmosom in Proben von Rinderepidermis nachgewiesen (North et al., 1996) und diese Erkenntnisse durch weitere experimentelle Untersuchungen bestätigt (Chitaeu und Troyanovsky, 1997; Marcozzi et al., 1998; Troyanovsky, 1999; Syed et al., 2002). Andererseits ist eine Isotypspezifität der desmosomalen Cadherine für den Aufbau von Desmosomen essentiell, wie Arbeiten von Dr. Green beweisen (Ishii et al., 2001).

Eine besonders kräftige Interaktion desmosomaler Cadherine und einen weiteren Aspekt desmosomaler Adhäsion beschreibt Dr. Garrod, er führte den Begriff der Hyperadhäsion ein (Garrod et al., 2005). Er postulierte, dass die überwiegende Mehrheit der Desmosomen in der Epidermis nicht von Ca^{2+} -Ionen abhängig sei, diese Situation ist auch bereits schon für andere Gewebe gezeigt worden (Wallis et al., 2000). Allerdings kann dieser hyperadhäsive Zustand der Desmosomen reversibel in einen Ca^{2+} -sensitiven Status überführt werden. Wundheilungs-Versuche an muriner Epidermis lieferten die Basis für diese Hypothese. Die Desmosomen im Bereich der verletzten Haut zeigten eine veränderte Morphologie, der Interzellularspalt war enger und die Mittellinie kaum detektierbar, da die normalerweise hochorganisierten Interaktionsstrukturen ihren parakristallinen Charakter verloren hatten. In diesem labilen Zustand reagierten die Desmosomen sehr sensitiv auf die Einwirkung von EGTA, die desmosomalen Cadherine waren danach nicht mehr in der Lage, die zelluläre Adhäsion aufrecht zu halten.

1.1.2.2 Desmosomale Cadherine – Genstruktur und Expression

Ein essentieller Bestandteil von Desmosomen sind die Proteine vom Desmoglein und Desmocollin Typ, die als zwei Untergruppen der Cadherine beschrieben worden sind. Zunächst galt der Name Desmoglein für alle desmosomalen Glykoproteine, bis Cowin et al. die Proteinfamilie der Desmogleine in zwei Klassen auftrennten und den Namen Desmocollin einführten (Cowin et al., 1984). Eine allgemein gültige Nomenklatur dieser neu entdeckten Gene und Proteine wurde 1993 festgelegt (Buxton et al., 1993), demnach werden die Gene als DSG bzw. DSC und die Proteine als Dsg bzw. Dsc annoziiert. 1990 beschrieb und klassifizierte die Arbeitsgruppe um Dr. Franke das Desmoglein als Mitglied der Cadherin-Familie (Koch et al., 1990). Für die desmosomalen Cadherine wurden weitere paraloge Gene beschrieben (z.B. DSG3: (Arnemann et al., 1992)) und bei Mensch und Maus auf Chromosom 18 lokalisiert (Arnemann et al., 1991). Bald darauf konnte ein Gencluster, das die drei Gene der Desmogleine in gerichteter Orientierung umfasst, identifiziert werden und der genaue chromosomale Locus wurde beim Menschen auf Chromosom 18q12.1 spezifiziert (Wang et al., 1994; Simrak et al., 1995). Ein ähnliches Cluster existiert für die drei Gene der Desmocolline, sie sind ebenfalls in einer gerichteten Orientierung tandemartig auf Chromosom 18q12.1 angeordnet. Die betreffende genomische Region konnte mit Hilfe von *YACs* untersucht werden, wobei sich herausstellte, dass die beiden desmosomalen Cadheringencluster benachbart sind (Cowley et al., 1997; Hunt et al., 1999) (vergl. Abbildung 4). Als letztes paraloges Gen wurde im Jahre 2003 Desmoglein 4 klassifiziert (Whittock und Bower, 2003).

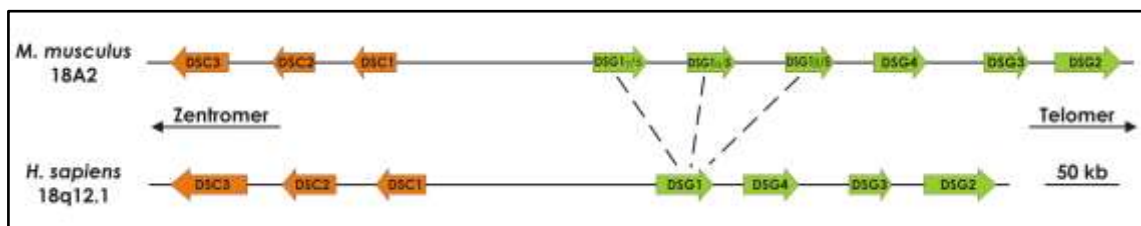


Abbildung 4: Genomstruktur des desmosomalen Cadheringen-Clusters von Maus und Mensch im Vergleich

Bei Mensch und Maus liegen die desmosomalen Cadheringene in syntänen Regionen auf Chromosom 18 als Tandem-repetitiv geclusterte Einheiten. Aufgrund der inversen Transkriptionsrichtung der beiden verwandten Gencluster ist davon auszugehen, dass die beiden Loci durch eine chromosomale Inversion aus einem gemeinsamen Vorläuferbereich entstanden sind. Durch eine Duplikation des DSG1-Lokus entstanden in der Maus die drei paraloge Gene DSG1- α , - β und - γ . Desmocolline: orange; Desmogleine: grün

Auch die desmosomalen Cadheringene der Maus sind zu ihren Orthologen im Menschen in einer syntänen Region als Cluster auf Chromosom 18 lokalisiert (Buxton et al.,

1994). Während der Evolution kam es zu einer Duplikation des murinen DSG1-Gens, die paraloge Gene wurde als DSG5 und DSG6 (Whitlock, 2003), bzw. aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit zu DSG1 als DSG1- β (Pulkkinen et al., 2003) und DSG1- γ bezeichnet (Kljuic und Christiano, 2003).

In Vertebraten werden die desmosomalen Cadherine in verschiedenen Geweben differenziell exprimiert. Desmocolline werden des Weiteren noch zusätzlich differentiell gespleißt, es existieren also von jedem DSC-Paralog zwei verschiedene Transkripte, die sich an ihrem 3'-Ende voneinander unterscheiden und in ein längeres Protein (a-Form) bzw. in die kürzere b-Form translatiert werden (Collins et al., 1991).

Im Anhang 7.9 sind die Expressionsdaten der desmosomalen Cadherine nach heutigem Wissensstand tabellarisch zusammengefasst. Bei der Embryonalentwicklung der Maus kommt es bereits während der ersten Teilungsrunden zur Expression von desmosomalen Komponenten, wie z.B. Plakoglobin und Desmoplakin, die aber nicht in reife Desmosomen eingebaut werden (Fleming und Hay, 1991; Fleming et al., 1994). Zu Beginn der Blastozysten-Entwicklung und dem zunehmenden Druck der Flüssigkeit im Blastozell werden auch DSG2 bzw. DSC2 exprimiert (Fleming und Hay, 1991) und in erste reife Desmosomen im Trophektoderm des Keims integriert. Jüngste Untersuchungen zeigen, dass Desmocollin 3 sogar bereits als Protein im Ovar, den Blastomeren, der Zygote und während der ersten Teilungsschritte vorliegt (Den et al., 2006). Ebenso werden Transkripte von DSC3 in der Oozyte detektiert (Den et al., 2006), die Funktion dieser maternalen Anlagen ist allerdings bisher völlig unklar. Die Expression der anderen desmosomalen Cadherine setzt später ein und ab E15,5 wird beinahe das vollständige Gen-Cluster transkribiert.

DSG2 und DSC2 können als die „universalen“ desmosomalen Cadherine bezeichnet werden, da ihre Transkripte und Proteine in den allermeisten Geweben nachgewiesen wurden (Schafer et al., 1994; Nuber et al., 1995). In den einschichtigen Epithelien wie Endothelien, Leber, Nierenmark und Darmmucosa wird das Proteinpaar aus Dsg2 und Dsc2 bis auf wenige Ausnahmen exklusiv produziert. In mehrschichtigen Epithelien – der Epidermis beispielsweise – werden dagegen sämtliche desmosomalen Cadherine differenziell exprimiert (Arnemann et al., 1993; Legan et al., 1994; North et al., 1996); Übersichtsartikel: (Getsios et al., 2004; Yin und Green, 2004). DSG2 wird dabei ausschließlich im *Stratum basale*, also den basalen Schichten der Epidermis exprimiert, ebenso werden dort die meisten DSC3- und DSG3-Transkripte nachgewiesen. Auf ih-

rem Weg in apikaler Richtung differenzieren die Keratinozyten und die Expression von DSG3 und DSC3 kommt im *Stratum spinosum* zum Erliegen (siehe Abbildung 5).

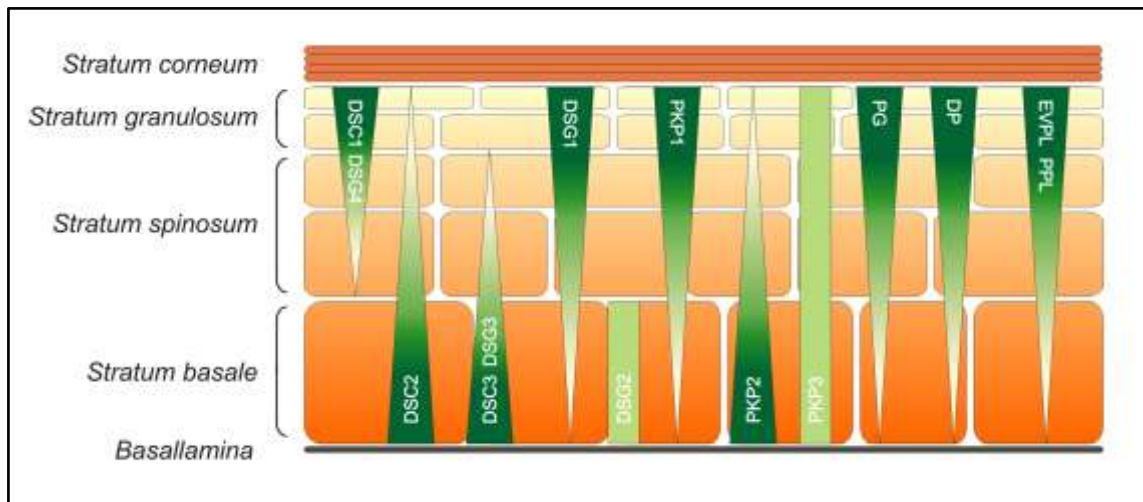


Abbildung 5: Differentielle Expression der desmosomalen Proteine in der Epidermis

Die unterschiedlichen desmosomalen Cadherine, Armadilloproteine und Plakine werden in den unterschiedlichen Schichten der Epidermis differenziell exprimiert. Auf ihrer Wanderung vom *Stratum basale* zum apikalen *Stratum corneum* differenzieren die Keratinozyten terminal. Die Morphologie und Proteinzusammensetzung der Desmosomen verändern sich in den apikalen Schichten der Epidermis, die desmosomalen Haftkomplexe wandeln sich in Korneodesmosomen um.

DSG: Desmoglein; DSC: Desmocollin; PKP: Plakophilin; PG: Plakoglobin; DP: Desmoplakin; EVPL: Envoplakin; PPL: Periplakin (Abbildung nach (Getsios et al., 2004))

DSC2 wird wie DSG2 in basalen Schichten stark exprimiert, allerdings können noch vereinzelt DSC2-Transkripte im apikalen *Stratum granulosum* nachgewiesen werden. Reziprok verhält sich dagegen die Verteilung der DSG1-mRNA, im *Stratum basale* wird eine geringe, im *Stratum granulosum* dagegen eine hohe Expression beschrieben. DSC1- und DSG4-mRNAs werden in einem abnehmenden Gradienten vom apikalen *Stratum granulosum* bis in das basale *Stratum spinosum* detektiert (siehe Abbildung 5).

Unter den mehrschichtigen Epithelien nimmt die Cornea hinsichtlich der Ausstattung an desmosomalen Cadherinen eine Ausnahmestellung ein, es wurde bisher ausschließlich das Paar aus Dsg 2 und Dsc 2 beschrieben (Messent et al., 2000). Der Haarfollikel zeichnet sich durch eine besonders differenzierte Expression der desmosomalen Cadherine in den unterschiedlichen Zellschichten aus (Kurzen et al., 1998; Wu et al., 2003).

Wie wichtig eine gesteuerte Expression der desmosomalen Cadherine für die Differenzierung von Geweben ist, haben zahlreiche Arbeiten am Beispiel der Epidermis bewiesen (Chidgey et al., 1997; King et al., 1997). Mutationsanalysen der extrazellulären Domänen von Dsg3 führten in transgenen Mausmodellen zu einer Verdickung der api-

kalen Epidermis, insbesondere des *Stratum corneum*, sowie einer Veränderung der Desmosomenzahl und -morphologie (Allen et al., 1996). Ähnlich dramatische Ergebnisse lieferten später Experimente mit ektopischer Expression von DSG3 in suprabasalen Schichten der Maus-Epidermis (Elias et al., 2001; Merritt et al., 2002). Eine ektopische Expression von DSC3 bzw. DSG3 führte im Mausmodell zu verkümmerten Haarfollikeln und ventralem Haarausfall der Tiere, sowie zu Hyperkeratosen (Hardman et al., 2005). Nur die ektopische Expression von DSC1a (Henkler et al., 2001), sowie Deletionen an den zytoplasmatischen Domänen des Proteins (Cheng et al., 2004) zeigten keinen Phänotyp.

Null-Mutationen von desmosomalen Cadherinen lösten bei Mäusen in der Regel noch auffälligere Phänotypen aus. Ein klassischer *Knockout* von DSG2 führte zu einer defizienten Stammzellproliferation und zu Periimplantations-Aborten von homozygoten Embryonen (Eshkind et al., 2002), auch der Verlust von DSC3 hat derartige Ausfälle zur Folge (Den et al., 2006). *Knockout* Experimente mit Null-Allelen von DSC1 und DSG3 führten in den Mausmodellen zu Acantholyse, Hyperproliferation (Hyperkeratosen), Haarverlust und zu Traumata in der Epidermis (Koch et al., 1997; Koch et al., 1998; Chidgey et al., 2001; Hanakawa et al., 2004).

1.1.2.3 Desmosomale Cadherine – Protein- und Domänenstruktur

Die ersten Protein-Charakterisierungen verschiedener desmosomaler Cadherine wurden an Extrakten aus tierischen Geweben durchgeführt (z.B. Dsg2: (Blaschuk et al., 1986)). Nachdem die cDNA von Desmoglein (1) kloniert worden war, konnte die resultierende Proteinsequenz abgeleitet werden (Koch et al., 1990). Abbildung 6 verdeutlicht die Domänenstruktur der desmosomalen Cadherine. Aufgrund ihrer Verwandtschaft zu den klassischen Cadherinen wurden die aminoterminalen, jeweils ca. 110 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Domänen als EC1 bis EC5 benannt. Die EC5-Domäne wird bei den desmosomalen Cadherinen auch als extrazelluläre Ankerdomäne (EA) bezeichnet, da sie wesentlich kürzer und ihre Homologie zu den Cadherin-Domänen nicht besonders ausgeprägt ist. Wie bereits oben beschrieben, befinden sich zwischen den einzelnen EC-Domänen Ca^{2+} -koordinierende Sequenzabschnitte, die für die Gesamtkonformation des extrazellulären Molekülteils verantwortlich sind. Die erste extrazelluläre Domäne (EC1) der Desmocolline und Desmogleine weist die Zell-Adhäsions-

Sequenz (CAR = *cell adhesion recognition*) mit dem Tryptophan-Rest 2 und einem zentralen Alanin-Rest auf. Während bei den meisten klassischen Cadherinen in diesem Sequenzabschnitt das Tripeptid HAV (Histidin/Alanin/Valin) zu finden ist, sind hier bei Dsg1 und Dsc1 die Tripeptidsequenzen YAT (Tyrosin/Alanin/Threonin) und RAL (Arginin/Alanin/Leucin) lokalisiert (Buxton und Magee, 1992). Als membranständige Proteine weisen die desmosomalen Cadherine einen einzigen Membrandurchgang mit 24 hydrophoben Aminosäuren auf (Membrandomäne TM). Der zytoplasmatische Teil beginnt mit der intrazellulären Ankerdomäne (IA), die ebenfalls keine hohe Homologie zu den vergleichbaren, aber viel kürzeren Domänen der klassischen Cadherine innehat.

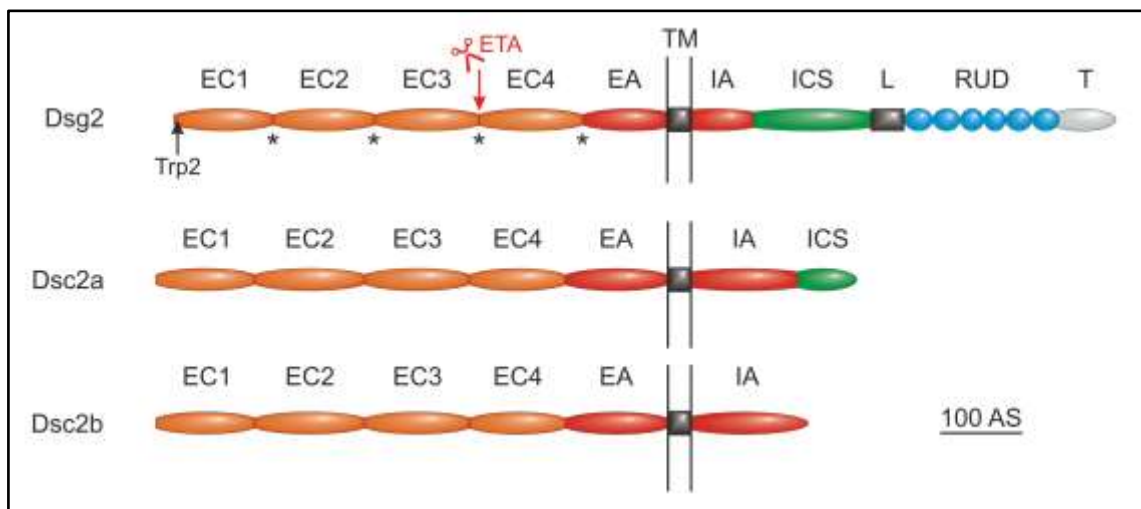


Abbildung 6: Domänenstruktur der reifen desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 (Spleißformen a und b)

Die extrazellulären Domänen der desmosomalen Cadherine weisen eine hohe Konservierung sowohl untereinander, als auch zu den klassischen Cadherinen auf und besitzen eine Transmembrandomäne mit einem einzigen Membrandurchgang. Konservierte Bindetaschen zwischen den einzelnen extrazellulären Domänen (EC) komplexieren Kalziumionen. Die Interaktion der Cadherine beruht auf der maskierenden bzw. demaskierenden Wirkung der Aminosäure Trp2 in der EC1 am N-Terminus der Cadherine. Der intrazelluläre Abschnitt von Dsg2 ist wegen der sich wiederholenden RUD-Sequenzmotive wesentlich länger als die intrazellulären Domänen von Dsc2; die beiden Spleißvarianten Dsc2a und Dsc2b unterscheiden sich im carboxyterminalen Abschnitt des Proteins. An die intrazellulären Domänen beider Cadherine binden die desmosomalen Brückenproteine, welche die Intermediärfilamente an die desmosomale Haftstruktur anbinden (vergleiche Abbildung 1).

Die Länge der jeweiligen Domänen korrespondiert mit der Anzahl der Aminosäuren. EC: extrazelluläre Cadherindomäne; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; IA: intrazelluläre Ankerdomäne; ICS: intrazelluläres cadherinartiges Segment; L: Linkerdomäne; RUD: „repeated unit domain“; T: terminale Domäne; *: Kalzium-Bindetasche; Pfeilmarkierung: (schwarz) Position Trp2; (roter Pfeil und Schere) proteolytische Spaltung von Dsg1 durch die Proteaseaktivität des ETA (*exfoliative toxin A*)

Der darauf folgende Proteinabschnitt weist zu vielen Cadherinen eine hohe Sequenzhomologie auf, weshalb dieser Bereich auch als intrazelluläres cadherinartiges Segment (ICS) bezeichnet wird. An die ICS schließt sich eine Verbindungssequenz an, die zu ca. 20% aus Prolin-Aminosäureresten gebildet wird, und deshalb als Prolin-Linker be-

zeichnet wird. Weiter carboxyterminal liegt eine Domäne mit „sich wiederholenden Sequenzabschnitten“ (*repeated unit domain* = RUD). Sie bestehen aus sechs ca. 29 Aminosäurereste langen Peptiden, die jeweils zueinander eine hohe Homologie aufweisen. Am Carboxyterminus des Proteins befindet sich die „Desmoglein spezifische terminale Domäne“ (T), die bis auf sehr wenige kurze Sequenzmotive keine nennenswerte Homologie zu weiteren Proteinen aufweist.

1.1.2.4 Desmosomale Cadherine – Interaktionen mit PP, PG, DP

Die molekularen Interaktionen der Adhärenz-Junktionen und Desmosomen ähneln einander. Zwischen den membranständigen Cadherinen und den Molekülen des Zytoskeletts vermitteln in beiden Fällen Mitglieder der Armadillo-Proteinfamilie (β -Catenin bzw. γ -Catenin/Plakoglobin in Adhärenz-Junktionen (Übersichtsartikel: (Gumbiner, 1996) und Plakoglobin in Desmosomen (Peifer et al., 1992; Troyanovsky et al., 1993; Mathur et al., 1994; Peifer et al., 1994; Troyanovsky et al., 1994a; Troyanovsky et al., 1994b)). An diese Armadillo-Proteine binden wiederum Linkerproteine wie α -Catenin im Falle der Adhärenz-Junktionen (Gumbiner, 1996) und Desmoplakin bei desmosomalen Haftkomplexen (Buxton und Magee, 1992). Allerdings ist die molekulare Interaktion der Desmosomen weitaus differenzierter, als die der Adhärenz-Junktionen: die Desmosomen werden im Gegensatz zur linearen Interaktion der Adhärenz-Junktionen noch zusätzlich durch einen weiteren Mitspieler diversifiziert, das Plakophilin. Dieses Armadillo-Protein ist in der Lage, sowohl an den Carboxyterminus der desmosomalen Cadherine, an den Aminoterminus von Desmoplakin als auch im Falle von Plakophilin 2 an Plakoglobin zu binden (Kowalczyk et al., 1999; Chen et al., 2002; Bonne et al., 2003). Weitere Interaktionen von Plakophilin 2 und 3 (zumindest mit isolierten Kopfdomänen) wurden auch mit Intermediärfilamenten diskutiert (Vasioukhin et al., 2001). Aufgrund der multiplen Bindungseigenschaften von Plakophilin wird diskutiert, ob dieses Molekül für die laterale Vernetzung des desmosomalen Proteine verantwortlich gemacht werden kann, sodass ein dichtgepackter Plaque entsteht (Smith und Fuchs, 1998; Kowalczyk et al., 1999; Hatzfeld et al., 2000; Hofmann et al., 2000). Auch die Möglichkeit der direkten Bindung von desmosomalen Cadherinen an Desmoplakin ohne die Zuhilfenahme von Plakoglobin (Troyanovsky et al., 1994b; Smith und Fuchs, 1998; Bornslaeger et al., 2001) unterstreicht die mannigfaltigen Bindungsmöglichkeiten der des-

mosomalen Proteine untereinander.

Die intrazelluläre cadherinartige Sequenz der desmosomalen Cadherine und ihre Bindungseigenschaften mit Plakoglobin wurden in der Vergangenheit intensiv untersucht (Trojanovsky et al., 1994b; Chitaev et al., 1996; Wahl et al., 1996; Witcher et al., 1996). Interessanterweise scheint Desmoglein sechs Mal mehr Plakoglobin binden zu können, als dies Desmocollin unter normalen Umständen zu tun vermag (Kowalczyk et al., 1996), wobei die kürzere b-Speißvariante von Desmocollin kein Plakoglobin oder Desmoplakin bindet (Trojanovsky et al., 1993). Die Interaktion von Desmoglein (1) und Plakoglobin beruht vermutlich auf wenigen hydrophoben Aminosäuren, die auch für die Bindung von Plakoglobin mit α -Catenin notwendig sind (Chitaev et al., 1998).

Diese multiplen Interaktionsmöglichkeiten der desmosomalen Proteine untereinander könnte einerseits eine feinere Regulation der desmosomalen Kraftübertragung ermöglichen, andererseits aber auch durch die stärkere Vernetzung der desmosomalen Strukturen für eine höhere Stabilität dieser Haftkomplexe sorgen.

1.1.2.5 Desmosomale Cadherine – proteolytische Spaltstellen

Die extrazellulären Domänen der desmosomalen Cadherine sind verschiedenen Agenzien ausgesetzt, welche die desmosomale Interaktion behindern oder sogar unterdrücken können. Der Erreger *Staphylococcus aureus* generiert ein Toxin (*exfoliative toxin A* = ETA), das als Serin-Protease spezifisch Dsg1 zwischen den Domänen EC3 und EC4 schneidet (vergleiche Abbildung 6). Die resultierende Erkrankung wird als „*Staphylococcal scalded skin syndrome*“ bezeichnet, welche durch die Anwesenheit des Zielproteins Dsg1 in suprabasalen Schichten der Epidermis dort zur Blasenbildung führt (Amagai et al., 2000; Payne et al., 2004).

1.1.2.6 Desmosomale Cadherine – Erkrankungen

Der Pemphigus ist die am umfassendsten beschriebene Erkrankung, bei der desmosomale Cadherine eine Rolle spielen. Alle Pemphiguserkrankungen haben gemein, dass Autoantikörper gebildet werden, die gegen Isoformen des desmosomalen Strukturpro-

teins Desmoglein gerichtet sind. Auf Grund der sterischen Behinderung durch diese Antikörper ist die desmosomale Adhäsion in der Epidermis gestört und es bilden sich Blasen aus, wobei die Ablationen hauptsächlich in den Hautschichten auftreten, in der das jeweilige Zielantigen lokalisiert ist (Payne et al., 2004). Im Falle des *Pemphigus vulgaris* sind die extrazellulären Domänen von Dsg3 betroffen und es kommt zu einer basalen Acantholyse (Amagai et al., 1991). Sind die Antikörper gegen Dsg1 gerichtet, so entstehen Blasen in suprabasalen Schichten der Epidermis (*Stratum granulosum*) und es kommt zum Ausbruch des *Pemphigus foliaceus* (Beutner und Jordon, 1964).

Dsg2 scheint eine wichtige Rolle bei der Integrität und der Funktion von Herzmuskelzellen zu spielen, wie Publikationen der letzten Monate belegen. Zahlreiche Patienten, die an einer arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVD) leiden, tragen „Missense-“, bzw. „Nonsense-Mutationen“ in ihrem DSG2-Genlocus (Awad et al., 2006; Basso et al., 2006; Pilichou et al., 2006; Syrris et al., 2007). Viele dieser Mutationen liegen im Bereich der extrazellulären EC-Domänen, die für die adhäsiven Eigenschaften der desmosomalen Cadherine zuständig sind. Bei einigen ARVD-Patienten wurden auch Mutationen im DSC2-Gen nachgewiesen (Syrris et al., 2006).

Diese Störungen der adhäsiven Eigenschaften haben umfangreiche Folgen für die Gewebemöostase im Herzmuskel, da die betroffenen Gene DSG2 und DSC2 als alleinige desmosomale Cadherine im Herzen exprimiert werden (siehe Anhang 7.9). Kompensationseffekte durch andere Desmoglein-Isoformen (wie bei Pemphigus-Erkrankungen) kommen hier nicht zum Tragen.

1.1.2.7 Desmosomale Signaltransduktion

Untersuchungen an Mauslinien mit veränderten desmosomalen Proteinen deuten auf zwei unterschiedliche Funktionen hin. *i.* Zum einen wirkten sich Veränderungen an der verfügbaren Proteinmenge direkt auf die Funktion des betroffenen Proteins im desmosomalen Kontext aus (beispielsweise der Verlust von desmosomaler Adhäsion). *ii.* Zum anderen wurden häufig auch Proliferations- und Wachstumsveränderungen beschrieben, was eine – direkte oder indirekte – Beteiligung der Proteine an Signaltransduktionsvorgängen nahe legt. Homozygote *Knockout*-Mäuse, bei denen die desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc3 ausgeschaltet sind, sterben zu einem Zeitpunkt, bei dem im Emb-

ryoblast keine desmosomalen Strukturen nachweisbar sind (Eshkind et al., 2002; Den et al., 2006).

Die Armadilloproteine Plakoglobin und Plakophilin sind mit β -Catenin verwandt, dem eine duale Funktion bei der Zelladhäsion in Adhärenzverbindungen (Übersichtsartikel: (Peifer et al., 1992)) und beim wnt-Signalwegs als Signalmolekül zugordnet wird (Übersichtsartikel: (Huelsken und Birchmeier, 2001; Moon et al., 2002)). Wie Mutationsexperimente zeigten, sind Plakoglobin und β -Catenin in geringem Maße austauschbar: bei Abwesenheit von Plakoglobin konnte β -Catenin dessen Funktion teilweise übernehmen (Bierkamp et al., 1999) jedoch nicht *vice versa* (Haegel et al., 1995). Plakoglobin wird eine Vermittlerrolle zwischen Desmosomen und Adhärenz-Junktionen zugesprochen, da es auch an die zytoplasmatischen Domänen der klassischen Cadherine binden kann (Cowin et al., 1986) und die Koordinierung dieser beiden Adhäsionsverbindungen reguliert (Lewis et al., 1997).

Kürzlich wurde eine gänzlich neue Rolle von Plakoglobin als Repressor des proto-Onkogens c-Myc beschrieben (Williamson et al., 2006): bei nachlassender Repression von c-Myc werden epidermale Stammzellen zur Proliferation angeregt. Diese Ergebnisse werden durch Plakoglobin-Überexpressions-Experimente unterstützt: wurde die Menge von Plakoglobin erhöht, so konnte eine verringerte Proliferation der Epidermiszellen festgestellt werden (Charpentier et al., 2000). Auch Versuche, die indirekt die Plakoglobin-Verfügbarkeit verringerten, zeigen vergleichbare Ergebnisse: wird beispielsweise DSG2 in der Epidermis überexprimiert (Brennan et al., 2007), so ist Plakoglobin nicht mehr in der Lage, die c-Myc-Signaltransduktion zu reprimieren und es kommt zu einer massiven Hyperproliferation der betreffenden Hautschichten. Die Verfügbarkeit von Bindungsstellen am Carboxyterminus der desmosomalen Cadherine für das Armadilloprotein Plakoglobin hält also das Gleichgewicht zwischen der Plakoglobin-vermittelten Repression und Aktivierung von c-Myc aufrecht.

Die desmosomale Adhäsion wird auch bei physiologischen Mechanismen wie der Wundheilung reguliert. Es konnte dafür eine Beteiligung der Proteinkinase C α (PKC α) experimentell bestätigt werden (Wallis et al., 2000), die nach einer extern zugefügten Störung der desmosomalen Adhäsion von Desmosomen (Verwundung) rekrutiert wird und vermutlich über Phosphorylierungsvorgänge eine Konformationsänderung der desmosomalen Cadherine herbeiführt. Darüber hinaus wurden verschiedene PKC α -regulierte Zustände von Desmosomen beschrieben, die eine unterschiedliche Sensitivität

zu extrazellulärem Kalzium-Verlust aufweisen (Garrod et al., 2005).

Proteinkinasen scheinen aber auch an einer Signaltransduktion vom Zelläußeren ins Zellinnere beteiligt zu sein, da PV-Seren eine temporäre Phosphorylierung von Dsg3 über PKC α bewirkten (Aoyama et al., 1999).

In letzter Zeit wurde der Zusammenhang der desmosomalen Adhäsion mit p38-Signaltransduktionswegen (Berkowitz et al., 2006) und der vermutlich nachgeschalteten GTPase Rho A beschrieben (Waschke et al., 2006). Dieses „desmosomale *signalling*“ (Berkowitz et al., 2005) kann eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts bewirken und spielt bei der PV-induzierten Acantholyse der Epidermis eine Rolle (Waschke et al., 2006).

Es mehren sich also die Hinweise, dass die desmosomalen Cadherine neben den gut charakterisierten adhäsiven Eigenschaften eine Wirkung auf mehrere zelluläre Signaltransduktionsvorgänge haben.

1.2 Generierung genetisch modifizierter Mäuse

Die Genome des Menschen (Lander et al., 2001), der Maus (Waterston et al., 2002), von *Drosophila* (Adams et al., 2000) und vielen weiteren Organismen sind in den letzten Jahren vollständig sequenziert worden. Die Frage nach der *in vivo*-Funktion bestimmter Gene (*Functional Genomics*) hat deshalb stark an Interesse gewonnen. Durch den großen Fortschritt der zahlreichen Genom- und EST-Sequenzierungsprojekte wurde einerseits der chromosomale Kontext vieler Gene erstmals beschrieben, andererseits wurden durch diese Projekte eine Vielzahl neuer Gene gefunden, deren biologische Funktion noch unbekannt ist. Eine Möglichkeit, die *in vivo*-Funktion eines Gens zu untersuchen, ist die Herstellung von transgenen Mauslinien, die definierte Veränderungen des zu untersuchenden Gens aufweisen. Der möglicherweise resultierende Phänotyp lässt anschließend eine Aussage über die Funktion des mutierten Gens zu. Heterologe DNA kann in eines von zwei definierten Entwicklungsstadien der Maus in das Genom eingebracht werden. Dazu werden die wichtigsten Schritte der frühen Mausembryogenese grob dargestellt. Nach der Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium kommt es zu mehreren symmetrischen Teilungen (2-, 4-, 8-Zellstadien) bis das Morulastadium (8- bis 16-Zellstadium) erreicht ist. Diesem folgen größere morphologische Veränderungen: es

bildet sich die Blastozyste (E3,5) mit dem außen liegenden Trophektoderm, dem innen liegenden Embryoblast und dem Blastozoel. Aus dem Trophektoderm entsteht später die Plazenta, während sich der Embryoblast zum Embryo selbst weiterentwickelt. Zellen des Embryoblasten können in Kultur genommen und so embryonale Stammzellen (ES-Zellen) gewonnen werden. Diese können sich – bis auf Plazentagewebe – in alle Zelltypen des Embryos differenzieren. Die Blastozyste verliert anschließend die sie umgebende Hülle (*Zona pellucida*) und implantiert in das Uterusgewebe, wo die weitere Entwicklung abläuft.

1.2.1 Homologe Rekombination

Im Gegensatz zur Pronukleusinjektion, bei der DNA in den männlichen Vorkern injiziert und diese DNA daraufhin ungerichtet in das Genom integriert wird, ist bei der homologen Rekombination der Genlokus festgelegt. ES-Zellen bieten die Möglichkeit, durch homologe Rekombination (*Gene Targeting*) gezielt bestimmte Genorte zu verändern (Thomas und Capecchi, 1987; Doetschman et al., 1988; Capecchi, 1989). Methodisch wird dies durch Elektroporation von ES-Zellen mit einem linearen Targeting-Konstrukt durchgeführt, welches auf beiden Seiten der einzuführenden Mutation umfangreiche homologe DNA-Flanken trägt. Zelleigene Mechanismen bewirken eine Rekombination dieser homologen Bereiche. Da dieser Prozess sehr selten ist und Zufallsintegrationen weit häufiger auftreten, müssen einzelne Zellkolonien auf das gewünschte Ereignis hin selektiert werden. Erfolgreich modifizierte ES-Zellklone werden anschließend zurück in Blastozysten injiziert und diese in den Uterus scheinchwangerer Empfängerweibchen implantiert. Zur Gewinnung der Blastozysten werden Tiere mit einer Fellfarbe verwendet (z.B. „Schwarz“), die sich von Fellfarbe der ES-Zell-Spendertiere (z.B. „Agouti“) unterscheidet. Dies hat den Vorteil, dass sich aus den injizierten Blastozysten Mäuse entwickeln, die sich durch zwei verschiedene Fellfarben auszeichnen. Der Grad dieses Chimärismus korreliert meist mit dem Anteil, den die injizierten ES-Zellen zum Gesamttier beitragen. Entwickelt sich das Keimbahngewebe der chimären Maus aus den transgenen ES-Zellen (Keimbahntransmission), so kann das Transgen durch eine Verpaarung der Chimären an die Nachkommen weitervererbt und eine transgene Mauslinie etabliert werden.

Der große Vorteil bei der Verwendung von ES-Zellen zur Herstellung genetisch modifi-

zierter Mäuse liegt in der Möglichkeit, gezielt bestimmte Loci zu verändern. Dies ermöglicht z.B. die Herstellung von *Knockouts*. Des Weiteren lassen sich mit dieser Methodik alle denkbaren Modifikationen wie z.B. *Knockin*, Punktmutationen, kleinere Deletionen, Translokationen etc. erzeugen. Nachteilig ist bei einem solchen Ansatz der große Zeit- und Arbeitsaufwand, welcher primär durch die Ineffektivität der homologen Rekombination und die damit verbundene aufwendige ES-Zellkultur bedingt ist.

Im Gegensatz dazu müssen bei einem klassischen Pronukleusinjektions-Experiment (Gordon et al., 1980; Wagner et al., 1981; Palmiter et al., 1982) immer mehrere Gründertiere (mit unterschiedlichen Integrationsorten und Transgenstrukturen) erzeugt und untersucht werden, da das Transgen durch Imprinting- (Positions-)Effekte des umgebenden Genkontexts einer Fehlregulation unterliegen kann und meist kaum exprimiert wird. Zudem können endogene Gene durch die zufällige Integration des Transgens inaktiviert werden (Integrationsmutanten). Die Pronukleusinjektion ist die Methode der Wahl für Anwendungen, die keine lokusspezifische Modifikation benötigen, wie z.B. die Überexpression oder ektopische Expression heterologer Gene.

1.2.2 Sequenzspezifische Rekombinationssysteme

Im Gegensatz zu den oft mehrere kb umfassenden Homologiebereichen, die bei der homologen Rekombination essentiell sind, kommen bei der sequenzspezifischen DNA-Rekombination nur relativ kurze Sequenzbereiche als Erkennungsstellen zum Tragen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche sequenzspezifische DNA-Rekombinasen aus niederen Organismen kloniert und diese auch in Zellen höherer Organismen zur Anwendung gebracht (z.B. β -Rekombinase (Diaz et al., 1999); $\gamma\delta$ -Resolvase (Schwikardi und Droge, 2000); BLV-Integrase (Tanaka et al., 1998); R4-Integrase (Olivares et al., 2001); ϕ C31-Integrase (Andreas et al., 2002); λ -Integrase (Christ und Droge, 2002)). Die beiden am besten charakterisierten und am weitesten verbreiteten Rekombinationssysteme sind das Cre/lox (Hamilton und Abremski, 1984) und das Flp/FRT System (Sadowski, 1995). Beide Enzyme werden der Superfamilie der λ -Integrasen zugeordnet und erfolgreich in der Maus zur Transgenese eingesetzt (Übersichtsartikel: (van der Weyden et al., 2002; Branda und Dymecki, 2004)).

1.2.2.1 Das Cre/lox-Rekombinationssystem

Dieses aus dem Bakteriophagen P1 stammende Rekombinationssystem, bestehend aus der 38 kDa Cre-Rekombinase (Cre = *causes recombination*) und deren 34 bp umfassenden loxP-Erkennungsstellen ist dort für die Zirkularisierung des linearen Phagengenoms (Hochman et al., 1983) und die Auflösung postreplikativer zirkulärer Genomdimere in Monomere zuständig (Austin et al., 1981; Sternberg und Hamilton, 1981). Die loxP-Sequenz (*locus of crossover (x) in P1*) besteht aus zwei 13 bp langen, palindromischen DNA-Sequenzen (*inverted repeats*), welche einen 8 bp langen, nichtsymmetrischen Abstandhalter flankieren. Die Asymmetrie dieses Abstandhalters verleiht der gesamten DNA-Sequenz eine Direktionalität, die den Ausgang der Cre-vermittelten Reaktion bestimmt: befinden sich auf einem DNA-Molekül zwei loxP-Stellen in gleicher Orientierung, so wird dieser Bereich als „gefloxte“ DNA („*flanked by loxP sites*“) bezeichnet (Hoess et al., 1982). Durch Interaktion mit der Cre-Rekombinase wird die dazwischen liegende DNA-Sequenz herausgeschnitten (Exzision), wobei anschließend beide Produkte jeweils eine loxP-Stelle tragen. Der reverse Vorgang, die Insertion, steht mit der Exzisionsreaktion im Gleichgewicht (Moralli et al., 2001).

Befinden sich die beiden loxP-Stellen in gegensätzlicher Orientierung, kommt es zur Inversion der betroffenen DNA-Sequenzen; liegen beide beteiligten loxP-Stellen auf verschiedenen DNA-Molekülen, so kommt als dritter möglicher Reaktionstypus die intermolekulare Translokation in Frage. Alle Reaktionen benötigen weder Energiezufuhr noch zusätzliche Kofaktoren, sie sind unabhängig von Substrattopologie sowie Herkunft der DNA und können also auch auf eukaryotischen DNA-Spezies eingesetzt werden (Abremski et al., 1983; Sauer und Henderson, 1990).

Die beiden palindromischen DNA-Sequenzen der loxP-Stelle fungieren als Rekombinase-Bindestellen, das heißt es binden jeweils zwei Cre-Monomere an eine loxP-Sequenz (Mack et al., 1992). Durch Protein-Protein-Interaktion kommt es zur Ausbildung des aus zwei loxP-Stellen und vier Cre-Molekülen bestehenden Rekombinations-Komplexes, der Synapsis. Der 8 bp umfassende Abstandhalter wird in einem Abstand von 6 bp geschnitten. Dies geschieht durch nukleophilen Angriff des Tyrosinrests 324 auf eine Phosphodiesterbindung eines der DNA-Stränge, wobei Cre kovalent an das 3'-Phosphat gebunden wird und so ein freies 5'-OH entsteht. Durch Strangaustausch und Ligation des Tyr-3'-Phosphat an das freie 5'-OH des Empfängerstranges kommt es zur Bildung eines Holliday-Intermediats (Guo et al., 1997). Neueren Vorstellungen zufolge

unterläuft dieses Holliday-Intermediat keine klassische *branch migration*, sondern eine *strand swapping* Isomerisierung (Van Duyne, 2001). In diesem Modell erfolgt der Strangaustausch durch Aufschmelzen von 2 bis 3 bp im Abstandhalter nach Strangbruch und Anlagerung an den komplementären Strang des Rekombinations-Partnerstranges, wobei die Homologie der aufgetrennten DNA-Bereiche durch Watson-Crick-Basenpaarung erreicht wird. Dies scheint ein generelles Modell für den Rekombinationsablauf der Mitglieder der λ -Integrase Familie darzustellen (Nunes-Duby et al., 1995) darzustellen und deckt sich am besten mit den zur Verfügung stehenden Cre-DNA Strukturdaten. Eine erneute Runde mit Strangbruch und Ligation des zweiten Stranges vervollständigt die Rekombination und löst die Holliday-Junktion auf. Das entstandene zirkuläre DNA-Fragment wird von den Zellen schnell abgebaut (Van Duyne, 2001).

Damit eine Rekombination überhaupt stattfinden kann, müssen die beiden loxP-Sequenzen mindestens 82 bp voneinander entfernt liegen. Die DNA-Rekombination erfolgt bei Cre in *cis*, das heißt das Protein, welches das katalytische Tyrosin zur Verfügung stellt, ist direkt neben dem Strangbruch gebunden (Shaikh und Sadowski, 2000).

1.2.2.2 Das Flp/FRT-Rekombinationssystem

Seine ursprüngliche biologische Funktion erfüllt das Flp/FRT-Rekombinationssystem in *S. cerevisiae*. Es ist auf dem 2 μ m-Plasmid der Hefe lokalisiert und nutzt die DNA-Rekombinase Flp (MW: 46 kDa) und deren Erkennungsstellen FRT („*Flp recognition target*“), um die Kopienzahl dieses Plasmids durch Flp-vermittelte Inversion während der Replikation der Hefe zu erhöhen (Futcher, 1986). Die FRT-Sequenz besteht aus einem 8 bp langen Abstandshalter, flankiert von zwei 13 bp langen (nahezu perfekten) palindromischen Sequenzabschnitten (34 bp-FRT). In der Hefe existiert des Weiteren noch ein zusätzliches 14 bp Element, welches einem der Palindrome entspricht und der nativen FRT-Stelle eine Länge von insgesamt 48 bp verleiht (Kilby et al., 1993).

Die Verwendung dieser FRT-Sequenz ermöglicht die Ausführung der gleichen Rekombinationstypen wie mit dem Cre/lox-System (Integration/Exzision, Inversion, Translokation). Die kürzere, 34 bp lange und in der Molekulargenetik meist verwendete Variante, entspricht der Minimallänge einer FRT-Stelle. Mit ihr lassen sich intramolekulare,

aber nicht intermolekulare Rekombinationen durchführen. Das bedeutet, dass z.B. Exzisionsreaktionen mit beiden FRT-Varianten, Integrationen jedoch nur mit der nativen FRT-Sequenz möglich sind (Jayaram, 1985).

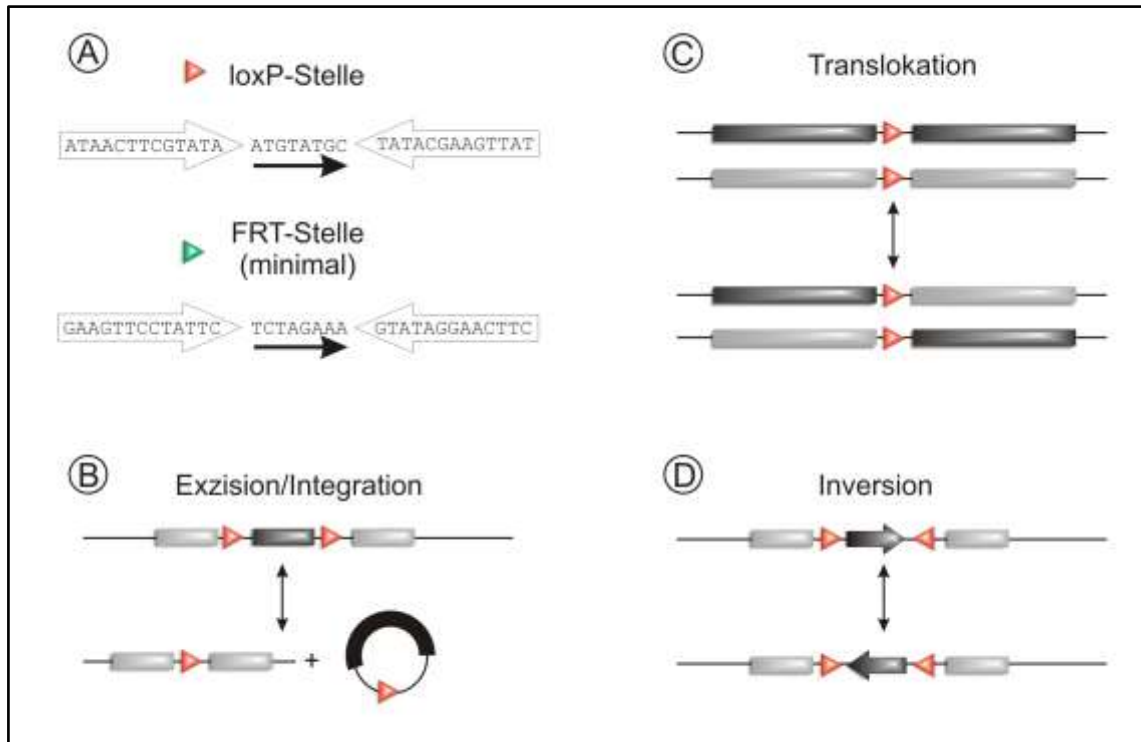


Abbildung 7: Reaktionstypen der sequenzspezifischen Rekombination.

A: Schema der Rekombinase-Erkennungssequenzen. Die palindromischen Sequenzen der loxP- und der minimalen FRT-Stelle (große Pfeile) und die jeweiligen gerichteten Abstandshalter (kleine Pfeile) verdeutlichen die Direktionalität der beiden Rekombinase-Erkennungssequenzen. Die Reaktionsprodukte stehen in einem Reaktionsgleichgewicht zueinander.

B, C, D: Produkte rekombinasevermittelter, sequenzspezifischer Rekombinationssysteme.

B: Bei gerichteter Orientierung der loxP-/FRT-Sequenzen erfolgt eine Exzision des *gefloxten* DNA-Bereichs, zurück bleibt die rekombinierte DNA und ein ringförmiges DNA-Fragment. **C:** Liegen die loxP-/FRT-Stellen auf unterschiedlichen DNA-Strängen (Chromosomen), so findet eine Translokation der entsprechenden Loci statt. **D:** Bei invertierten Rekombinase-Erkennungsstellen wird die *gefloxt* DNA invertiert.

Über die molekularen Vorgänge der Flp-vermittelten DNA-Rekombination ist im Detail nicht so viel bekannt wie über den Cre-Reaktionsmechanismus. Im Großen und Ganzen verläuft die Rekombination jedoch prinzipbedingt der Cre/lox-Reaktion nicht unähnlich. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass sich die Kristallstrukturen der katalytischen Domänen von Cre (Guo et al., 1997) und Flp (Chen et al., 2000) – im Gegensatz zu den restlichen Proteindomänen – sehr ähnlich sind. In Analogie zu Cre/lox beginnt auch im Flp/FRT-System die Rekombination mit der Anlagerung der Flp-Monomere an die beiden palindromischen FRT-Sequenzen (Ringrose et al., 1998). Anschließend kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Tyrosinrests 343, der dadurch einen Strangbruch

einleitet. Dieser findet im Gegensatz zu Cre/lox jedoch nicht im Abstand von 6, sondern von 8 bp statt. Als Resultat kommt es auch hier zu einem Holliday-Intermediat, welches durch Isomerisierung aufgelöst wird. Diese Isomerisierung erfordert bei Flp/FRT größere Konformationsänderungen als bei Cre/lox, worauf die langsamere Reaktionskinetik des Flp/FRT-Systems zurückgeführt wird. Der Angriff des nukleophilen Tyrosins findet bei Flp/FRT in *trans* (und nicht in *cis* wie bei Cre) statt, das heißt diejenigen Flp-Monomere, welche auf der jeweils anderen Seite der FRT-Stelle gebunden sind, stellen das reaktive Zentrum zur Verfügung (Shaikh und Sadowski, 2000).

1.3 Konditionale Rekombinationssysteme in der Mausgenetik

Das grundlegende Prinzip der Cre/lox-vermittelten, zelltypspezifischen Mutation beruht auf der Generierung mehrerer Mauslinien. Die Mäuse der ersten Linie (KO-Linie) tragen ein Gen, das durch zwei loxP-Sequenzen so flankiert wird, dass diese nicht mit der normalen Expression des Gens in der Maus interferieren. Um dies zu erreichen, werden loxP-Sequenzen zumeist in Intronen platziert, wobei aber auch Insertionen in 5'- oder 3'-flankierenden Bereichen beschrieben wurden, wobei die Wildtyp-Expression der Zielgene nicht beeinflusst wird (Guy et al., 2001; Sakai et al., 2001). In den Tieren der zweiten Linie wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors exprimiert.

Durch die Kreuzung der oben genannten Mäuse entstehen doppel- bzw. mehrfachtransgene Nachkommen. Im Allgemeinen werden nach weiteren Verpaarungen Tiere geboren, die für das mit loxP-Sequenzen flankierte Allel homozygot sind. In sämtlichen Zellen, welche die Cre-Rekombinase synthetisieren, findet nun die Cre-vermittelte Rekombination zwischen den beiden loxP-Sequenzen statt und die *gefloxte* DNA wird aus dem Genom entfernt. Dagegen bleibt in denjenigen Zellen, welche die Cre-Rekombinase nicht exprimieren, der flankierte Locus unverändert (Abremski et al., 1983). Durch diese räumlich beschränkte Deletion des betreffenden Gens in bestimmten Zelltypen gelingt es, eventuell letale Phänotypen des konventionellen *Knockouts* (Capecci, 1989) zu umgehen.

Allerdings reicht die räumliche Kontrolle der Cre-Aktivität bei vielen Anwendungen nicht aus, es muss zusätzlich noch der Zeitpunkt definiert werden, an dem die Rekombination stattfinden soll. Es werden nur zwei der zahlreichen Beispiele erwähnt, die im

Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen. Liegen die beiden konstitutiv inaktivierten Allele $DSG2^{\text{delE7-E8}}$ im homozygoten Zustand vor, so kommt es zu embryonaler Letalität zum Zeitpunkt der Implantation des Embryos in den Uterus (Eshkind et al., 2002). Ebenso kommt es bei DSC3-Nullallelen zu Aborten durch Periimplantations-Letalität (Den et al., 2006).

Um zusätzlich zur zelltypspezifischen auch eine zeitliche Kontrolle der Cre-Aktivität zu erreichen, wurden zum einen ligandenregulierte Formen der Cre-Rekombinase entwickelt. Damit wurde es möglich, die Cre-Aktivität erst im adulten Organismus oder zu definierten Zeitpunkten während der Embryogenese (Hayashi und McMahon, 2002) durch Induktion einzuschalten. Zum anderen wurden die regulatorischen Eigenschaften des Tet-on/Tet-off Systems genutzt, um Mauslinien zu generieren, bei welchen die Cre-Rekombinase nach Gabe eines Induktors aktiviert wird (Kistner et al., 1996).

Ein ideales induzierbares Cre-System sollte:

- keine Basalaktivität in Abwesenheit des Induktors (*leakiness*) aufweisen.
- eine effiziente Rekombination in allen Zielzellen gewährleisten (keine mosaikartige Expression).
- einen nichttoxischen, kostengünstigen und einfach administrierbaren Induktor haben, der keine weiteren Effekte im Organismus auslöst und schnell in gewünschter Konzentration im Zielgewebe verfügbar ist.

Das Cre/lox (und Flp/FRT)-System ist durch seine Grundeigenschaften sehr gut geeignet, als genetisches Werkzeug für die Modifikation des Säugergenoms eingesetzt zu werden: die Erkennungsstelle loxP (FRT) ist mit 34 bp lang genug, um kein zufälliges Vorkommen dieser Sequenz im Genom zu gewährleisten und ist kurz genug, dass ihre Einführung in das Genom keine negativen Einflüsse auf benachbarte Genbereiche hat. Es kann aber unter bestimmten Voraussetzungen möglicherweise zur Rekombination endogener „Pseudo-loxP-Sequenzen“ im Genom kommen, was negative Effekte zur Folge hat (Schmidt et al., 2000; Thyagarajan et al., 2000).

Die Cre-Rekombinase ist ein Phagenenzym mit einem Temperaturoptimum von 37°C, was bei der Anwendung in Säugerzellen von Vorteil ist. Als Enzym aus der Hefe hat die Flp-Rekombinase ein Temperaturoptimum von 30°C und ist bei höheren Temperaturen

labil. Um dies zu umgehen, wurde die kodierende Sequenz von Flp durch *in vitro*-Mutagenese dahingehend verändert, dass Flp auch bei 37°C ausreichend stabil und enzymatisch aktiv ist (Buchholz et al., 1998). Das entstandene „*Flpe*“ wurde in dieser Arbeit verwendet.

Zurzeit stehen mehrere Systeme zur Verfügung, die eine zeitliche und örtliche Kontrolle der Rekombinasen gewährleisten. Im Folgenden werden zunächst ein transkriptionell gesteuertes Cre-Rekombinationssystem (X-rtTA/*tetO*-Cre) und ein posttranslational geregelt System (X-Cre-ER^{T2}) vorgestellt, die beide im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

1.3.1 Das Tet-on/Tet-off System

Viele unterschiedliche tetrazyklingesteuerte Expressionssysteme werden heutzutage eingesetzt, um Genexpression in Zellsystemen (Resnitzky et al., 1994), Pflanzen (Weinmann et al., 1994), Hefe (Nagahashi et al., 1997), Drosophila (Bello et al., 1998), und Mäusen (Furth et al., 1994; Hasan et al., 2001; Schonig und Bujard, 2003) zu kontrollieren. Das Tet-off System nutzt einen synthetischen Transkriptionsfaktor tTA (*tetracycline controlled transcriptional activator*), der durch die Fusion des *E. coli* Repressors (*tetR*) und der Aktivierungsdomäne des viralen Transkriptionsfaktors VP16 entstanden ist. Ein Minimalpromotor (z.B. P_{hCMV}) steht unter der Kontrolle einer Reihe von Tetrazyklin-Operator-Sequenzen (*tetO*) mit der Konsensussequenz des tetrazyklinresponsiven Elements (Gossen und Bujard, 1992), an die *tetR* natürlicherweise bindet und so die Expression der nachgeschalteten Gene (z.B. Reportergene oder die Cre-Rekombinase) aktiviert. Durch die Zugabe des Induktors Tetrazyklin oder Doxyzyklin wird durch Konformationsänderungen die intrinsische Aktivierungsfunktion des tTA unterbunden, indem der Induktor mit tTA interagiert und dieser nicht mehr an den tetrazyklinresponsiven Promotor binden kann. Die pharmakologischen Eigenschaften von Doxyzyklin sind allgemein bekannt und werden als unkritisch für *in vivo*-Versuche angesehen.

Dieses System findet in der Wissenschaft breite Anwendung, obwohl es einige nachteilige Eigenschaften mit sich bringt: der Induktor Doxyzyklin muss dem System permanent zugeführt werden, um die Transkription des regulierten Transgens zu unterbinden

(Kistner et al., 1996). Erst mit dem Absetzen des Induktors wird das Zielgen aktiv exprimiert. Wird Doxyzyklin über einen längeren Zeitraum an Mäuse verfüttert, so wird das Antibiotikum in den Knochen und Knorpeln der Versuchstiere eingelagert (Bocker et al., 1984; Sande und Mandell, 1990). Diese Depots geben den Induktor über einen längeren Zeitraum weiterhin ab, sodass die Aktivierung des Zielgens nicht rasch erfolgt.

Um dies zu umgehen, wurde das komplementäre Tet-on System entwickelt, welches erst nach Zugabe des Induktors sein Zielgen exprimiert. Es basiert auf dem rtTA (*reverse tetracycline controlled transcriptional activator*), einem genetisch veränderten *tetR*. Eine Mutation von vier Aminosäuren bewirkt die Umkehr der Wirkweise des *tetR*, dieser bindet nun ausschließlich unter Anwesenheit von Doxyzyklin an den *tetO* (Gossen et al., 1995; Kistner et al., 1996). Allerdings ist die Affinität des rtTA im Vergleich zum tTA um drei Größenordnungen geringer. Um eine Aktivierung des Zielgene zu erreichen, muss dem System also wesentlich mehr Induktor zugeführt werden (Baron et al., 1999; Baron und Bujard, 2000).

Es existieren weitere rtTA Mutanten, beispielsweise rtTA-M2 und rtTA-S2, die eine höhere Sensitivität für Doxyzyklin aufweisen. In Zellkulturexperimenten konnte dieses System bereits mit 2 ng/ml Doxyzyklin aktiviert werden, was einer 50-fache höheren Affinität dieser rtTA-Varianten entspricht (Urlinger et al., 2000).

Wie bei allen transgenen Organismen ist auch hier der Integrationsort der *tetO*-Minimalpromotor-Zielgen-Kassette von großer Bedeutung. In heterochromatischen Regionen wird das System nicht aktiviert werden können. Insetiert der *tetO*-Komplex jedoch in die Nähe eines aktivierenden DNA-Segments (*enhancer*), so kann der ansonsten inaktive Minimalpromotor eine Basalaktivität entfalten und das System ist nicht mehr strikt reguliert (Furth et al., 1994; Gossen et al., 1995; Kistner et al., 1996).

Ein genereller Nachteil dieses Systems ist die Tatsache, dass zwei Transgene am Wirkmechanismus beteiligt sind. Bei Versuchen mit transgenen Mäusen, die geflochte DNA-Sequenzen tragen, bedeute dies umfangreiche Verpaarungen: sowohl die Transaktivatoren (tTA bzw. rtTA), als auch die Transkriptionskassette bestehend aus dem *tetO*-Komplex und der Cre-Rekombinase sowie die (beiden) geflochten Allele müssen in einer Maus vereint werden. Dieser Aufwand wurde von (Utomo et al., 1999) vereinfacht, indem der rtTA mit seinem eigenen Promotor und die *tetO*-Kassette inklusive dem Zielgen auf ein und demselben DNA-Fragment kombiniert wurden.

Um zur zeitlichen Regulation durch die Tet-On-/Tet-Off-Systeme eine gewebsspezifische Genexpression zu erzielen, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden gewebsspezifische Promotoren/Enhancer für die Expression des tTA/rtTA (Darm: (Saam und Gordon, 1999); Leber/Niere: (Kistner et al., 1996; Schonig und Bujard, 2003; Wilkinson et al., 2006); Herz: (Valencik und McDonald, 2001; Russell et al., 2004) eingesetzt, welche die Regulation des Transgens spezifisch in den jeweiligen Geweben der Tiere kontrollierten. Zum anderen wurden die *tetO*-Sequenzen in einen endogenen gewebsspezifischen Promotor integriert (Agha-Mohammadi und Lotze, 2000).

1.3.2 Die induzierbare Rekombinase Cre-ER^{T2}

Im Gegensatz zu den soeben beschriebenen Rekombinationssystemen, die auf dem Tet-On/Tet-Off System basieren, haben die nun vorzustellenden Methoden den Vorteil, dass nur ein Transgen benötigt wird. Es wurden verschiedene experimentelle Ansätze verwendet, bei denen Fusionsproteine der Cre-Rekombinase mit den Ligandenbinde-Domänen mehrerer unterschiedlicher zytoplasmatischen Hormonrezeptoren entwickelt wurden (Glukokortikoidrezeptor: (Brocard et al., 1998); Östrogenrezeptor: (Metzger et al., 1995); Progesteronrezeptor: (Tsujita et al., 1999)). Dabei wurden Cre-Varianten ohne eine Kernimport-Signalsequenz verwendet, da die intrinsische Funktion der nukleären Rezeptoren ausreicht, um das chimäre Protein in den Nukleus zu translozieren. Die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbinde-Domäne des Östrogenrezeptors (ER) am Carboxyterminus der Cre-Rekombinase war erfolgreich (Metzger et al., 1995; Feil et al., 1996; Brocard et al., 1997; Schwenk et al., 1998). Im zellulären Kontext wird dabei das Fusionsprotein im Zytoplasma an zwei Moleküle des Hitzeschockproteins HSP90 gebunden und somit der Transport in den Zellkern blockiert. Erst nach Applikation und Bindung des spezifischen Liganden Tamoxifen an die Ligandenbinde-Domäne des Fusionsproteins wird der Proteinkomplex aktiviert, HSP90 freigesetzt und das Fusionsprotein kann in den Zellkern translozieren.

Es existieren drei verschiedene Varianten der Cre-Rekombinase, die mit Tamoxifen induziert werden können:

- muriner ERTM mit einer G525R Mutation (Danielian et al., 1998; Guo et al., 2002; Hayashi und McMahon, 2002; Zirlinger et al., 2002)
- humaner ER^T mit einer G521R Mutation (Logie und Stewart, 1995; Metzger et al., 1995; Feil et al., 1996; Li et al., 2000; Vooijs et al., 2001)
- humaner ER^{T2} mit G400V/M543A/L544A Mutationen (Feil et al., 1997; Indra et al., 1999; Kimmel et al., 2000; Imai et al., 2001; Seibler et al., 2003; el Marjou et al., 2004)

Alle Varianten werden von endogenem 17 β -Östradiol nicht aktiviert, sprechen aber auf das synthetische Östrogenanalogon 4-Hydroxytamoxifen (OHT) an. Allerdings wird zur Induktion statt 4-Hydroxytamoxifen das sehr viel kostengünstigere Tamoxifen verabreicht, da in der Leber das Tamoxifen unter anderem auch in die wesentlich aktiveren Formen N-Desmethyltamoxifen und 4-Hydroxytamoxifen umgewandelt wird. Das Rekombinationsmaximum erfolgt dabei nach 48 h (Hayashi und McMahon, 2002). Cre-ER^{T2} ist sowohl bei der nukleären Translokation, als auch bei der Rekombinaseaktivität um das Zehnfache potenter und sensitiver für 4-Hydroxytamoxifen als die Cre-ER^T-Variante (Indra et al., 1999).

Der ligandenregulierte Schalter der Rekombinaseaktivität kann in zwei prototypischen Weisen verwendet werden: *i.* Bei der Expression der Rekombinase unter einem ubiquitären Promotor kann durch die Cre-ER-Fusionsproteine eine zeitliche Kontrolle erreicht werden (Guo et al., 2002; Hayashi und McMahon, 2002; Seibler et al., 2003). *ii.* Eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Rekombinaseaktivität wird durch die Expression der Cre-ER-Fusionsproteine unter einem zelltypspezifischen Promotor erreicht (z.B. Neurogenese: (Danielian et al., 1998); B-Lymphozyten: (Schwenk et al., 1998); Darm: (el Marjou et al., 2004)).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die desmosomale Adhäsion ist für die mechanische Stabilität von (epithelialen) Geweben von großer Bedeutung: die Intermediärfilamentnetzwerke benachbarter Zellen werden über die desmosomalen Cadherine des Desmoglein- und Desmocollin-Typs miteinander verknüpft. Bei der Maus spielt die Desmoglein-Isoform 2 (DSG2) bereits in frühen Stadien der Embryogenese eine entscheidende Rolle. Homozygote DSG2-*Knockout*-Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben vor der Implantation des Embryos ab. DSG2 ist die Haupt-Desmoglein-Isoform, denn auch im adulten Tier wird dieses Gen, im Gegensatz zu den weiteren fünf Desmoglein-Genen, in den meisten Geweben exprimiert.

Herstellung einer gewebsspezifischen, induzierbaren Mutation des DSG2-Gens in der Maus

Um die embryonale Letalität der existierenden DSG2-*Knockout*-Mäuse zu umgehen, sollte eine Mauslinie hergestellt werden, die nach Gabe eines externen Induktors ein mutiertes Dsg2-Protein synthetisiert. Da DSG2 zusammen mit seinem Partnergen Desmocollin 2 (DSC2) in den adulten Geweben des Darms, der Leber und in Herzmuskelzellen exklusiv exprimiert wird, sollte zur Möglichkeit der zeitlichen Rekombinationskontrolle noch eine gewebsspezifische Komponente hinzugefügt werden. Dazu sollte das bewährte induzierbare Cre/lox-System in Kombination mit gewebsspezifischen Promotoren zum Einsatz kommen.

Es sollten die folgenden Teilziele erreicht werden:

- Zunächst sollten *in vitro* die notwendigen loxP-Sequenzen und eine Resistenzgenkassette zur Positivselektion von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) in das DSG2-Gen inseriert werden.
- Die Rekombinationsfähigkeit dieses Targeting-Konstrukts sollte zunächst *in vitro* überprüft und dieses anschließend in ES-Zellen transferiert werden.
- ES-Zellklone mit dem korrekt rekombinierten DSG2-Gen sollten identifiziert und zur Herstellung von chimären Mäusen in Blastozysten injiziert werden. Mit diesen sollten im Anschluss Stämme mit induzierbarem DSG2-Allel etabliert werden.

- Im nächsten Schritt sollten mit Hilfe von „*FLPe-general-deleter*-Tieren“ die Neomycin-Resistenzgenkassette aus dem DSG2-Lokus entfernt werden.
- Verschiedene Cre-exprimierende Mausstämme, mit deren Hilfe die gewebespezifische Cre-Rekombinase induziert werden kann, sollten mit Mäusen mit gefloxtem DSG2-Gen verpaart werden. Dadurch sollte die Möglichkeit geschaffen werden, in der Leber, der Darmschleimhaut und dem Herzen eine extern gesteuerte DSG2-Rekombination zu induzieren.
- Die Rekombination von DSG2 sollte auf genomischer, mRNA- und Proteinebene mit Hilfe von PCR-, RT-PCR-, Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen analysiert werden.

Herstellung polyklonaler Antiseren gegen amino- bzw. carboxyterminale Proteinbereiche des murinen Dsg2

Da die verfügbaren Antiseren gegen das murine Dsg2 weder über eine Isotypspezifität verfügten, noch eine ausreichende Reaktion bei Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Untersuchungen zeigten, sollten neue Antikörper gegen Dsg2 hergestellt werden. Diese sollten auf Titer und Spezifität der generierten Antiseren untersucht und für die Analysen der Dsg2-Mutanten herangezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Bestrahlungsquelle - ^{137}Cs	Molsgaard Medical, DK
Blotkammer - Bio-Dot® (Dot-Blot)	BioRad, München
Blotkammer - Transblot SD (Semi-Dry)	BioRad, München
Elektroporationsgerät - Gene Pulser II	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop - Axiophot I	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop - IX-70	Olympus, Hamburg
Geldokumentation - Image Master VDS	GE Healthcare (Pharmacia), München
Homogenisator (Glas)	Hartenstein, Würzburg
Homogenisator (elektrisch) - Ultra-Turrax	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Kamera Axiophot - C4742-95	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee
Kamera Olympus - IMAGO	Till Photonics, München
Laser Punktscanning Mikroskop - SP5	Leica, Bensheim
Ohrmarken und Ohrmarkenzange	Hauptner & Herberholz, Solingen
PAGE System - Mini Protean II/III	BioRad, München
PCR Gerät - Primus 96	MWG Biotech, Ebersberg
PCR Gerät - Primus 96 advanced	Peqlab, Erlangen
Photometer - NanoDrop	Peqlab, Erlangen
Photometer - Ultraspec 2000 UV	GE Healthcare (Pharmacia), München
Szintillationscounter - TRI-CARB 1600TR	Canberra Packard, Dreieich
Ultraschallgerät - Branson Sonifier 250	Branson, Dietzenbach

Geräte der Standardlaborausstattung werden nicht aufgeführt. Auf spezielle Geräte, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung waren, wird im Methodenteil näher eingegangen.

2.1.2 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien entsprachen – sofern nicht anders vermerkt – dem Reinheitsgrad *p.A.* und wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Fluka bzw. Sigma-Aldrich (München), Gibco™ bzw. Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), BioRad (München) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

Tabelle 2: allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
AFA	VWR, Darmstadt
Agarose NuSieve GTG Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Agarose LE	Biozym, Hessisch Oldendorf
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma-Aldrich, München
Coomassie Brilliant Blau – G250	Serva, Heidelberg
Digitonin	Sigma-Aldrich, München
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich, München
DTT	Merck, Darmstadt
FCS	Sigma-Aldrich, München
Freund'sche Adjuvanzien	Sigma-Aldrich, München
Hepes	Invitrogen, Karlsruhe
HOPE®	DCS, Hamburg
Imidazol	Sigma-Aldrich, München
IPTG	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
LIF ESGRO	Invitrogen, Karlsruhe
LipofectAMINE 2000	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoäthanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München
nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
PMSF	Merck, Darmstadt
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München
Trockenmilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Tabelle 3: Antibiotika

Antibiotika	Hersteller	Stammlösung in H ₂ O	Arbeitslösung in H ₂ O
Ampizillin	Sigma-Aldrich	100 mg/ml	100 - 150 µg/ml
Kanamycin	Sigma-Aldrich	20 mg/ml	50 - 60 µg/ml
Neomycin (G-418)	Sigma-Aldrich	100 mg/ml	100 - 1000 µg/ml
Tetrazyklin/Doxyzyklin	Sigma-Aldrich	10 mg/ml	12,5 µg/ml
Penizillin/Streptomycin (100 x)	Gibco™	Penizillin: 10000 U Streptomycin: 10 mg/ml	1 x (1%)

Tabelle 4: Kits

Kits	Bezugsquelle
<i>QLAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QLAfilter Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QLAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QLAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QLAquick Nucleotide Removal Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>DNeasy™ Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Ni-NTA Agarose</i>	Qiagen, Hilden
<i>peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I</i>	PEQLAB, Erlangen
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent</i>	Perbio Science (Pierce), Bonn

Tabelle 5: Filmmaterial & Fotochemikalien

Filmmaterial & Fotochemikalien	Bezugsquellen
BioMax Light-1, 18 x 24	Kodak, Rochester, New York, USA
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Entwickler LX-24, Fixierer	Kodak, Rochester, New York, USA

Tabelle 6: Membranen & Filter

Membranen & Filter	Bezugsquellen
Hybond-N ⁺ Nylon-Membran	GE Healthcare, München
Nitrozellulose - Optitran BA-S83	Whatman (Schleicher & Schuell), UK
Whatman-Papier - CB002 Gel Blotting Papier	Whatman (Schleicher & Schuell), UK

2.1.3 Nukleinsäuren

Sämtliche Oligonukleotide sind dem Anhang zu entnehmen und wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) in der Qualitätsklasse „HPSF“ (hochrein, salzfrei) synthetisiert.

Tabelle 7: Nukleinsäuren

Nukleinsäuren, Vektoren und Nukleotide	Bezugsquelle
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
[α - ³² P]dATP	GE Healthcare, München
Lachssperma DNA	Stratagene, Amsterdam, NL
pBlueskriptII KS +	Stratagene, Heidelberg
pBlueskript SK +	Stratagene, Heidelberg
pET15b	Novagen, Madison, USA
pGem-Teasy	Promega, Mannheim
pJet1	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pEGFP-N3	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 8: Molekulargewichtsstandards

Molekulargewichtsstandards	Bezugsquelle
<i>Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler™ 1kb DNA Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>FastRuler™ DNA Ladder, Low Range</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Lambda DNA/EcoRI+HindIII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PageRuler™ Unstained Protein Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Precision Protein Standard</i>	Bio-Rad, München
<i>Precision Protein Standard prestained</i>	Bio-Rad, München

2.1.4 Enzyme

Die für die Experimente verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden wahlweise über die Firmen New England Biolabs (Frankfurt) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Tabelle 9: DNA/RNA modifizierende Enzyme, Proteinasen

DNA/RNA modifizierende Enzyme, Proteinasen	Bezugsquellen
<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>T4 DNA Ligase (1 U/μl) bzw. (5 U/μl)</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Benzonase	Merck, Darmstadt
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
<i>Taq-Polymerase (5 U/μl)</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase</i>	NEB, Frankfurt
<i>REVERSE-IT™ RTASE BLEND</i>	Abgene, Hamburg
<i>Prime-It® II Random Primer Labeling Kit</i>	Stratagene, Amsterdam, NL

2.1.5 Antikörper

Tabelle 10: Primär-Antikörper

Primär-Antikörper	Bezugsquelle	Spezies	IF	WB
α -Dsg1 (mc112)	BD, Heidelberg	Maus	1:100	1:1000
α -Keratin 8 TROMA1 (rt3)	(Kemler et al., 1981)	Ratte	1:10	1:100
α -alpha-Catenin (rb53)	Sigma-Aldrich, München	Kaninchen	1:100	1:1000
α -total K8/K18 (mc100)	M.B. Omary	Maus	1:75	1:1000
α -DP 2.15-2.17-2.20 (mc28)	(Cowin et al., 1985)	Maus	unverdünnt	-
„Normal Donkey Serum“	Jackson/Dianova	Esel	-	-

Tabelle 11: Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Bezugsquelle	Spezies	IF	WB
Cy3- α -Kaninchen-IgG F(ab') ₂	Jackson/Dianova	Esel	1:300 – 1:500	-
Cy3- α -Maus-IgG	Rockland/Biotrend	Ziege	1:250 – 1:500	-
Cy2- α -Kaninchen	Jackson/Dianova		1:50	-
Cy2- α -Maus-IgG	Rockland/Biotrend	Ziege	1:50	-
TxR- α -Maus-IgG F(ab') ₂	Jackson/Dianova	Ziege	1:100	-
TxR- α -Kaninchen-IgG	Jackson/Dianova	Ziege	1:50 – 1:200	-
HRP- α -Kaninchen-IgG	N. England Biolabs	Ziege	-	1:6000
HRP- α -Maus-IgG	Jackson/Dianova	Ziege	-	1:7000

2.1.6 Bakterienstämme

Tabelle 12: Bakterienstämme

Bakterienstämme, <i>E. coli</i>	Bezugsquellen
XL1-Blue [F' xTn10 proA+B+lacI ^q Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal ^r)thi hsdR17(rKmK+)supE44relA1 lac]	Stratagene, La Jolla, USA
DH5α [F ⁻ phi80dlacZ Δ (lacZYA-arg F) U169 deoR recA1 hsdR17 phoA Sup E44 λ thi-1 gyrA96 relA1]	(ehemals Gibco™ BRL), nun Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
BL21gold(DE3)pLysS [B F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte [pLysS Camr]]	Stratagene, La Jolla, USA
GM2163 [F ⁻ dam-13::Tn9 (Cam ^r) dcm-6 hsdR2 (r _k ⁻ m _k ⁺) leuB6 hisG4 thi-1 araC14 lacY1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 (Str ^r) fhuA31 tsx-78 gln/44 mcrA mcrB1]	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
294-Cre [F ⁻ , I ⁻ , supE44, endA1, thi-1, hsdR17, lacZ::cI857-Cre]	A. Francis Stewart

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 13: Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Referenz
Eph4	<i>M. musculus</i> , Brustdrüsenkarzinom	(Fialka et al., 1996)
A-431	<i>H. sapiens</i> , Vulva-Plattenepithelkarzinom	(Giard et al., 1973)
PLC	<i>H. sapiens</i> , hepatozelluläres Karzinom	(Alexander et al., 1976)
MDCK	<i>C. familiaris</i> , Nierenepithel	(Madin et al., 1957)
MDBK	<i>B. taurus</i> , Nierenepithel	(Madin und Darby, 1958)
MH ₁ C ₁	<i>R. norvegicus</i> , hepatozelluläres Karzinom	(Richardson et al., 1969)
CaCo	<i>H. sapiens</i> , kolorektales Adenokarzinom	(Fogh et al., 1977)
W9.5	<i>M. musculus</i> (129S1/Sv), ES-Zellen	(Szabo und Mann, 1994)
STO	<i>M. musculus</i> , embryonale Fibroblasten	(Martin und Evans, 1975)

2.1.8 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anderslautend erwähnt, wurden Puffer und Lösungen für gebräuchliche molekularbiologische Techniken nach (Sambrook, 2002) hergestellt. Hierfür wurde ausnahmslos gereinigtes Wasser (Millipore) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen bei RT hergestellt und gelagert.

Puffer für Arbeiten mit Bakterien:

Tabelle 14: LB-Medium/LB-Agar

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Bacto-Trypton	1% (w/v)	10 g Bacto-Trypton
Bacto-Hefeextrakt	0,5% (w/v)	5 g Bacto-Hefeextrakt
NaCl	0,5% (w/v)	5 g NaCl
(Agar)	1,4% (w/v)	14 g (Agar)
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 15: TFB1

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
RbCl ₂	10 mM	1,21 g RbCl ₂
MnCl ₂	6 mM	0,81 g MnCl ₂
K-Azetat	3 mM	0,29 g K-Azetat
CaCl ₂	10 mM	1 ml CaCl ₂ (1M)
Glyzerin	15% (v/v)	15 ml Glyzerin
H ₂ O	pH 5,8	ad 100 ml

Tabelle 16: TFB2

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
CaCl ₂	75 mM	7,5 ml CaCl ₂ (1M)
RbCl ₂	1 mM	0,12 g RbCl ₂
MOPS	1 mM	0,29 g MOPS
Glyzerin	15% (v/v)	15 ml Glyzerin
H ₂ O	pH 7,0	ad 100 ml

Puffer für Nukleinsäurearbeiten:

Tabelle 17: 10x TE-Puffer

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-HCl	100 mM	12,1 g Tris-HCl
EDTA	10 mM	3,7 g EDTA
H ₂ O	pH 8,0	ad 1 Liter

Tabelle 18: 5x TBE

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-Base	0,45 M	54 g Tris-Base
Borsäure	0,45 M	27,5 g Borsäure
EDTA	10 mM	4,65 g EDTA
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 19: 10x DNA-Probenpuffer

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Glyzerin	30% (v/v)	30 ml Glyzerin
SDS	1% (w/v)	10 ml SDS (10%)
EDTA	50 mM	10 ml EDTA (0,5 M)
Tris-HCl	10 mM	1 ml Tris-HCl (1 M)
Bromphenolblau		Spatelspitze
Xylencyanol		Spatelspitze
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 20: Oligo-Hybridisierungs-Puffer

Stoff	Konzentration	Menge für 10 ml
K-Azetat	100 mM	1 ml K-Azetat (1 M)
HEPES-KOH	30 mM	0,3 ml HEPES-KOH (1 M, pH 7,4)
Mg ²⁺ -Azetat	2 mM	20 µl Mg ²⁺ -Azetat (1 M)
H ₂ O		ad 10 ml

Tabelle 21: Lysepuffer Schwänze

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Tris-HCl	50 mM	5 ml Tris-HCl (1 M)
EDTA	100 mM	20 ml EDTA (0,5 M)
NaCl	100 mM	2 ml NaCl (5 M)
SDS	1% (w/v)	10 ml SDS (10% w/v)
H ₂ O		ad 100 ml

Vor der Anwendung wurden 0,5 mg/ml Proteinase K hinzugefügt.

Tabelle 22: Lysepuffer ES-Zellen

Stoff	Konzentration	Menge für 50 ml
Sarcosyl	0,5% (v/v)	1 g Sarcosyl in 20 ml H ₂ O steril filtrieren
Tris-HCl	10 mM	0,5 ml Tris (1 M)
EDTA	10 mM	1 ml EDTA (0,5 M)
NaCl	10 mM	0,5 ml NaCl (1 M)
H ₂ O		ad 45 ml
Proteinase K	1 mg/ml	5 ml Proteinase K (10 mg/ml)

Tabelle 23: Hybridisierungs-Puffer

Stoff	Konzentration	Menge für 200 ml
Na ₂ HPO ₄	0,5 M	100 ml Na ₂ HPO ₄ (1 M) pH 7,2
SDS	7% (w/v)	70 ml SDS (20% w/v)
EDTA	1 mM	4 ml EDTA (0,5 M) pH 8,0
H ₂ O	pH 7,2	ad 200 ml

Tabelle 24: 20x SSC

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
NaCl	3 M	175,3 g NaCl
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,3 M	88,2 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat
H ₂ O	pH 7,0	ad 1 Liter

Tabelle 25: Waschlösung 1

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
SSC	2x	10 ml SSC (20x)
SDS	0,1% (w/v)	0,5 ml SDS (20% w/v)
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 26: Waschlösung 2

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
SSC	1x	5 ml SSC (20x)
SDS	0,1% (w/v)	0,5 ml SDS (20% w/v)
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 27: Waschlösung 3

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
SSC	0,1x	0,5 ml SSC (20x)
SDS	0,1% (w/v)	0,5 ml SDS (20% w/v)
H ₂ O		ad 100 ml

Puffer für die Proteinbiochemie:

Tabelle 28: 10x PBS

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
NaCl	137 mM	8 g NaCl
KCl	3 mM	0,22 g KCl
Na ₂ HPO ₄	8 mM	1,14 g Na ₂ HPO ₄
K ₂ HPO ₄	2 mM	0,35 g K ₂ HPO ₄
H ₂ O	pH 7,5	ad 1 Liter

Tabelle 29: 2x Protein-Probenpuffer (nach Lämml)

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Glyzerin	20% (w/v)	20 ml Glyzerin
SDS	2% (w/v)	20 ml SDS (10% w/v)
Tris-HCl	42 mM	4,2 ml Tris-HCl (1 M)
DTT	150 mM	15 ml DTT (1 M)
Bromphenolblau		Spatelspitze
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 30: Protein-Lysepuffer 1 (Gewebe)

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Tris-HCl	50 mM	5 ml Tris-HCl (1 M)
NaCl	150 mM	3 ml NaCl (5 M)
EDTA	5 mM	1 ml EDTA (0,5 M)
Triton X-100	1% (v/v)	1 ml Triton X-100
PMSF	0,5%	50 mg PMSF
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 31: Protein-Lysepuffer 2 (Gewebe)

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
SDS	2% (w/v)	20 ml SDS (10% w/v)
Tris-HCl	50 mM	5 ml Tris-HCl (1 M)
PMSF	0,5%	50 mg PMSF
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 32: 10x Elektrodenpuffer

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-Base	250 mM	30 g Tris-Base
Glyzin	520 mM	144 g Glyzin
SDS	1% (w/v)	10 g SDS (w/v)
H ₂ O	pH 8,9	ad 1 Liter

Tabelle 33: SDS-Sammelgelpuffer (5% v/v)

Stoff	Konzentration	Menge für 6 ml (zwei Gele)
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30% (29:1)	5% (v/v)	1 ml Rotiphorese-Lösung
Tris-Base	120 mM	0,75 ml Tris-Base (1,5 M, pH 8,8)
SDS	1% (w/v)	60 µl SDS (10% w/v)
APS	1% (w/v)	60 µl APS (10% w/v)
TEMED	1‰ (w/v)	6 µl
H ₂ O		ad 6 ml

Tabelle 34: SDS-Trenngelpuffer (10% v/v)

Stoff	Konzentration	Menge für 15 ml (zwei Gele)
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30% (29:1)	10% (v/v)	5 ml Rotiphorese
Tris-Base	250 mM	3,8 ml Tris-Base (1,5 M, pH 8,8)
SDS	1% (w/v)	150 µl SDS (10% w/v)
APS	1% (w/v)	150 µl APS (10% w/v)
TEMED		6 µl
H ₂ O		ad 15 ml

Tabelle 35: Coomassie-Färbelösung

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Coomassie-Brilliant-Blau G250	2,5‰ (w/v)	250 mg C-B-B G250
Äthanol	50% (v/v)	50 ml Äthanol
Essigsäure	10% (v/v)	10 ml Eisessig
H ₂ O		ad 100 ml

Tabelle 36: Coomassie-Entfärbelösung

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Äthanol	30% (v/v)	300 ml Äthanol
Essigsäure	10% (v/v)	100 ml Eisessig
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 37: Silber-Färbelösung

Herstellung der Färbelösung (100 ml)	
Lösung A: 0,8 g AgNO ₃ in 4 ml H ₂ O lösen	
Lösung B: 2,1 ml NaOH (1 M) + 1,6 ml NH ₃	
Lösung A unter Schwenken zu Lösung B geben und auf mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen	

Tabelle 38: Silber-Entwicklerlösung

Herstellung der Entwicklerlösung (250 ml)
250 mg Zitronensäure in 250 ml H ₂ O lösen
+ 0,8 ml Formaldehydlösung (37% w/v)

Tabelle 39: Silber-Stopperlösung

Herstellung der Stopperlösung (100 ml)
50 ml Äthanol + 5 ml Eisessig + H ₂ O ad 100 ml

Tabelle 40: 10x Ponceau-S-Färbelösung

Stoff	Konzentration	Menge für 500 ml
Ponceau-S	2% (w/v)	10 g Ponceau-S
Trichloressigsäure	30% (w/v)	150 g Trichloressigsäure
Sulfosalizylsäure	30% (w/v)	150 g Sulfosalizylsäure
H ₂ O		ad 500 ml

Tabelle 41: 10x TBS

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-Base	0,2 M	24,2 g
NaCl	1,3 M	80 g
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 42: TBST

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
TBS	1x	100 ml TBS (10x)
Tween-20	0,1% (v/v)	1 ml Tween-20
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 43: Transferpuffer

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
Tris-Base	25 mM	3 g Tris-Base
Glyzin	192 mM	14,4 g Glyzin
Methanol	10% (v/v)	100 ml Methanol
H ₂ O		ad 1 Liter

Tabelle 44: Stripping-Puffer

Stoff	Konzentration	Menge für 1 Liter
SDS	2% (w/v)	20 g SDS
Tris-Base	62,5 mM	7,6 g Tris-Base
H ₂ O	pH 6,7	ad 1 Liter
Unmittelbar vor der Anwendung wurden zu 50 ml Puffer 350 µl β-Mercaptoäthanol hinzugefügt.		

Puffer für die Affinitätschromatographie:

Tabelle 45: Bakterien-Lysepuffer

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
Tris-HCl	50 mM	3,3 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 7,5)
EDTA	1 mM	200 µl EDTA (0,5 M, pH 8)
KCl	100 mM	10 ml KCl (1 M)
DTT	1 mM	1 ml DTT (100 mM)
H ₂ O		ad 100 ml

Vor der Verwendung werden 10 mg Lysozym, 1 Tablette „Roche Complete™ Protease Inhibitor Cocktail“ und 100 µl PMSF (0,1 M) zu 50 ml Lysis-Puffer gegeben.

Tabelle 46: Puffer für die denaturierende Affinitäts-Chromatographie: B bis E

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
NaH ₂ PO ₄	100 mM	1,38 g NaH ₂ PO ₄
Tris-Cl	10 mM	660 µl Tris-Cl (1,5 M)
Harnstoff	8 M	48 g
H ₂ O		ad 100 ml

Vor der Verwendung wurde der pH-Wert der Puffer eingestellt:
 Puffer B: pH 8,0 Puffer C: pH 6,3 Puffer D: pH 5,9 Puffer E: pH 4,5

Tabelle 47: Waschpuffer für die native Affinitäts-Chromatographie

Stoff	Konzentration	Menge für 100 ml
NaH ₂ PO ₄	50 mM	0,69 g NaH ₂ PO ₄
NaCl	300 mM	1,75 g NaCl
H ₂ O	pH 8,0	ad 100 ml

Vor der Verwendung wurde die Imidazol-Konzentration der Puffer eingestellt:
 Waschpuffer: 20 mM 0,136 g Imidazol
 Elutionspuffer: 250 mM 1,7 g Imidazol

Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz:

Tabelle 48: Elvanol

Herstellung des Elvanols
1 g Mowiol 4-88 in 4 ml 1x PBS (pH 8,0) unter Rühren (16 Stunden) lösen
2 ml Glycerin hinzugeben
15 Minuten zentrifugieren, den Überstand abnehmen und Lösung aliquotieren

Tabelle 49: Zitratpuffer

Herstellung des Zitratpuffers für die Antigendemaskierung
Lösung A: 0,1 M Zitronensäure (21,01 g Zitronensäure x H ₂ O + H ₂ O ad 1 Liter)
Lösung B: 0,1 M Natriumzitat (29,41 g Trinatriumzitat x 2 H ₂ O + H ₂ O ad 1 Liter)
1,4 ml Lösung A + 8,6 ml Lösung B, H ₂ O ad 1 Liter, pH einstellen auf 6,0

2.2 Methoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die hier aufgeführten Methoden den Lehrbüchern „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ von (Sambrook, 2002) und „Antibodies: A Laboratory Manual“ von (Harlow, 1988) entnommen und bei RT durchgeführt.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Benötigte Lösungen: Puffer für Arbeiten mit Bakterien (Seite 38 f.)

Zentraler Punkt eines jeden Klonierungsexperiments ist die Einführung von rekombinanter Plasmid-DNA in Bakterienzellen durch die sogenannte Transformation. Der gramnegative Sicherheitsstamm *E. coli* K12 besitzt keine natürliche Transformationskompetenz und muss durch chemische oder physikalische Methoden künstlich für die Aufnahme fremder DNA vorbereitet werden. Die chemische Methode nach (Hanahan, 1983) und (Hanahan et al., 1991) ist ein Standardverfahren, bei dem osmotisch stabilisierte Suspensionen von *E. coli* K12 bei 4°C mit Kalziumchlorid- und Rubidiumchlorid-Lösungen behandelt werden, sodass durch einem Hitzeschock bei 42°C die Plasmid-DNA in die Zelle aufgenommen werden kann und eine Transformationseffizienz von 10^7 bis 10^8 Transformanden pro mg DNA erreicht wird. Es wird angenommen, dass die Salze die Integrität der Zellwandstruktur beeinträchtigen und zusätzlich die DNA als schwerlösliches Salz auf der Zelloberfläche ausfällen, sodass die direkte Aufnahme der Plasmide leichter vonstatten geht.

Die Bakterienstämme XL1blue bzw. BL21gold tragen ein endogenes Antibiotikaresistenzgen (Tetrazyklin bzw. Chloramphenicol), welches es ihnen ermöglicht, unter Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums zu wachsen. Mit Hilfe dieser Eigenschaft kann verhindert werden, dass beim Expandieren der Bakterienkulturen andere, eventuell eingeschleppte Stämme die Kultur kontaminieren. Deshalb wurden bei der Anzucht von Bakterien des Typs XL1blue 12,5 µg Tetrazyklin pro ml LB-Medium zugesetzt. Die Inkubationen erfolgten bei 37°C auf einem Schüttler mit 250 U/Min.

Ein Klon des entsprechenden Bakterienstamms wurde mit einer sterilen Impföse von einer Kulturplatte gepickt oder aus einer Glyzerindauerkultur entnommen und in 3 ml LB-Medium bei 37°C unter Schütteln über Nacht kultiviert. 7 ml LB-Medium wurden mit 500 µl dieser Übernacht-Kultur inokuliert. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600})

wurde in einem Spektrophotometer (Pharmacia) bestimmt und die Vorkultur solange kultiviert, bis die OD_{600} einen Wert von 0,3 erreicht hatte. 5 ml dieser Vorkultur wurden verwendet, um – je nach Bedarf – mindestens 100 ml vorgewärmtes LB-Medium zu inokulieren. Diese Hauptkultur wurde dann wiederum bei 37°C auf einem Schüttler bei 180 U/Min solange inkubiert, bis die OD_{600} einen Wert von 0,48 erreicht hatte und im Anschluss auf Eis gehalten. Nun wurde die Bakteriensuspension bei 4.000 U/Min und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, das Sediment von 100 ml Bakterienkultur in 30 ml Puffer TFB1 resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis gekühlt. Nach einer erneuten Zentrifugierung (wie oben), wurden die sedimentierten Bakterien in 4 ml Puffer TFB2 resuspendiert und 200 µl Aliquots der nun chemokompetenten Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren, sowie auf Dauer bei -80°C gelagert. Die Kompetenz der Zellen für die Plasmidaufnahme wurde durch Transformation der Bakterien mit einem prokaryotischen Vektor (pBlueskript, Stratagene) bestimmt.

2.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Benötigte Lösungen: Puffer für Arbeiten mit Bakterien (Seite 38 f.)

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Maximal 10 µl der in Wasser gelösten Plasmide wurden zu einem Aliquot von 200 µl der kompetenter Zellen gegeben und die Bakterien für 30 Minuten auf Eis belassen. Unterstützt wurde die Aufnahme der DNA durch einen Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden. Im Anschluss wurden die Bakterien mindestens für weitere 10 Minuten auf Eis gekühlt. Zu den transformierten Zellen wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und diese für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dieser Schritt sorgt für die Etablierung und Expression der Plasmide (insbesondere der Antibiotikaresistenzgene), welche die Selektion der transformierten Bakterien ermöglichen. Durch kurzes Zentrifugieren bei 2.000 U/Min in einer Tischzentrifuge wurden die Zellen sedimentiert, danach der Überstand verworfen und die verbleibenden Zellen im Restmedium (200 µl) resuspendiert. Es wurden typischerweise 20 µl bzw. 100 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten mit der entsprechenden Antibiotika-Ausstattung ausgestrichen und für 18 h bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Agarplatten in Augenschein genommen und entweder sämtliche Kolonien ausgezählt oder – wenn die Anzahl von 100 Kolonien deutlich überschritten worden war – die Bakterienanzahl eines Sektors der Platte bestimmt und

dann die Gesamtanzahl extrapoliert.

Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurde die Anzahl der Kolonien pro 1 µg eingesetzter Vektor-DNA bestimmt.

Bestimmung der Transformationseffizienz

$$E = \frac{\frac{1 \mu\text{g DNA}}{x \mu\text{g eingesetzter Vektor-DNA}}}{\frac{200 \mu\text{l transformierte Bakteriensuspension}}{y \mu\text{l ausgestrichene Bakteriensuspension}}}$$

2.2.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Bakterien

Benötigte Lösungen: Puffer für Arbeiten mit Bakterien (Seite 38 f.)

1 ml einer *E. coli*-Suspension, die von einer Einzelkultur stammte, wurde mit 300 µl einer 87%-igen (v/v) Glycerinlösung versetzt, in Kryoröhrchen überführt, danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Rekultivierung der Bakterien werden einige Kristalle des gefrorenen Bakteriensuspension-Glycerin-Gemischs in LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.1.4.1 DNA-Präparation in kleinem und großem Maßstab

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die jeweiligen Systeme der Firmen Qiagen, Hilden bzw. Peqlab, Erlangen eingesetzt. Diese „Kits“ bedienen sich der Tatsache, dass nach alkalischer Lyse der Bakterien die chromosomale DNA denaturiert (Birnboim und Doly, 1979), die zu isolierenden Plasmide hingegen als ringförmiger DNA-Doppelstrang frei im Zytoplasma vorliegen und unter den gegebenen Pufferbedingungen an eine Silikamembran der Aufarbeitungssysteme adhären können. Die DNA-Isolierungen wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt. Von den

vorgeschlagenen Bakterienkulturvolumina wurde jedoch meist abgewichen und 200 ml bis 500 ml Hauptkultur verwendet. Bei analytischen Präparationen wurde im Allgemeinen mit 50 µl Puffer, bei präparativen Ansätzen meist mit 500 µl Puffer eluiert.

2.2.1.4.2 Maxi-Präparation von Plasmiden zur ES-Zell-Transfektion

Die äußere Zellwand gramnegativer Bakterien (z.B. *E. Coli*) besteht zum Großteil aus Lipopolysacchariden, die beim Wachstum der Bakterien, verstärkt aber bei alkalischer Lyse derselben in das Umgebungsmedium abgegeben werden. Ist DNA mit diesen auch als Endotoxine bezeichneten Molekülen verunreinigt, so wird bei Transfektionsexperimenten von eukaryotischen Zellen eine dramatische Reduktion der Transfektionseffizienz festgestellt. Insbesondere bei ES-Zell-Experimenten wurden deshalb die verwendeten Plasmide mit dem *EndoFree® Plasmid Purification Kit* der Firma Qiagen, Hilden isoliert. Ein spezielles Puffersystem verhindert eine Bindung der Lipopolysaccharide an die Silikamembran des Aufreinigungssystems und sorgt somit eine weitestgehend Endotoxin-freie DNA-Lösung.

2.2.1.5 Äthanolpräzipitation von DNA

Sämtliche Zentrifugierungsschritte wurden bei RT in einer Zischzentrifuge durchgeführt.

Zu einer wässrigen DNA-Lösung wurden 2 VT eiskaltes absolutes Äthanol, sowie 0,1 VT kaltes 3 M Natriumacetat (pH 4,8) gegeben, gemischt und die Lösung für 30 Minuten bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurde das Plasmidpräzipitat für 10 Minuten bei 13.000 U/Min sedimentiert, der äthanolische Überstand vorsichtig verworfen und das Nukleinsäuresediment mit 1 VT eiskaltem 70% (v/v) Äthanol gewaschen, wobei erneut für 10 Minuten bei 13.000 U/Min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und das DNA-Sediment bei RT getrocknet. Zum Abschluss wurde die Plasmid-DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst.

2.2.1.6 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Um Proteinverunreinigungen (z.B. bakterielle Proteine bei DNA-Präparationen bzw. Restriktionsendonukleasen oder CIAP) und Lipide zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion von wässrigen DNA-Lösungen durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Volumen der Lösungen (sofern unter 200 µl) mit H₂O_{a.i.} auf 200 µl angehoben, mit 1 VT Phenol versetzt und gemischt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch für 5 Minuten bei RT mit 8.000 U/Min zentrifugiert und die wässrige (obere) Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden ½ VT Phenol und ½ VT Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, erneut gemischt, zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese wurde mit 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zuletzt quantitativ abgenommen und mit Äthanol gefällt (siehe 2.2.1.5).

2.2.1.7 Restriktion von DNA

Die in der Molekularbiologie eingesetzten Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen spezifische DNA-Sequenzen von typischerweise sechs, aber auch vier bis acht oder mehr palindromisch angeordneten Nukleotiden und spalten das DNA-Molekül spezifisch in der Regel innerhalb der jeweiligen Erkennungssequenz. Diese Enzyme werden in der Natur von Bakterien zur Abwehr von Fremd-DNA (beispielsweise der von Bakteriophagen) eingesetzt. Die eigene DNA wird mit Hilfe der sequenzspezifischen Methyltransferasen Dam und Dcm durch Methylierung von Adeninen bzw. Cytosinen markiert. Diese Modifikation dient zur Unterscheidung zwischen eigener und fremder Nukleinsäure (bakterielles Restriktions-Modifikationssystem) und schützt deshalb die bakterielle DNA vor der Spaltung (Marinus und Morris, 1973; May und Hattman, 1975).

Durch einen Restriktionsschnitt können generell drei verschiedene Arten von Strangenden erzeugt werden: bei versetzten Schnitten entstehen 5'- oder 3'-Überhänge (kohäsiven Enden), bei nicht versetzten Schnitten glatte Enden. Da beim Verdau eines DNA-Moleküls durch definierte Restriktionsenzyme ein spezifisches Bandenmuster im Agarosegel entsteht, werden Restriktionsenzyme bei der Analyse von Plasmid-DNA verwendet (analytische Restriktion). Des Weiteren werden Restriktionsendonukleasen bei

Klonierungsexperimenten eingesetzt, um durch einen präparativen Verdau definierte Plasmidfragmente zu generieren, die anschließend durch Ligation zu neuen rekombinanten DNA-Molekülen verbunden werden können.

Die Ansätze für die Restriktionen setzen sich dabei folgendermaßen zusammen:

analytischer Verdau	präparativer Verdau
200 ng DNA in wässriger Lösung	≥ 1 mg DNA in wässriger Lösung
2 µl 10x Restriktionspuffer	5 µl 10x Restriktionspuffer
0,5 U – 1 U Restriktionsenzym	10 U Restriktionsenzym
(ggf. Zusätze wie BSA)	(ggf. Zusätze wie BSA)
H ₂ O _{ai.} ad 20 µl	H ₂ O _{ai.} ad 50 µl
Inkubation bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 30 bis 60 Minuten	

Grundsätzlich ist beim Ansetzen der Restriktion zu beachten, dass die Enzyme zwar in 50%-igem (v/v) Glycerin gelagert werden, für optimale Reaktionsbedingungen jedoch eine Glycerinkonzentration von unter 5% (v/v) erforderlich ist. Daher darf der Anteil der Enzymlösung nicht mehr 10% (v/v) des Gesamtvolumens betragen. Der Verdau erfolgte bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 30 bis 60 Minuten oder über Nacht. Zum Einsatz kam auch das FastDigest™ System der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot, das einen kompletten analytischen Verdau durch einige ausgewählte Restriktionsendonukleasen in nur fünf Minuten ermöglicht. Im Anschluss wurden die Restriktionsansätze auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und die restringierte DNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (siehe 2.2.1.19.2). Zur Kontrolle wurden sowohl die ungeschnittenen Plasmide, als auch eine *MOC-Probe* (der finale Restriktionsansatz ohne Enzym) mit aufgetragen und analysiert.

Sollte ein DNA-Molekül mit mehreren Enzymen geschnitten werden, wurde – insbesondere bei Klonierungsexperimenten – unterschiedlich verfahren: hatten die Enzyme im gleichen Puffer ihr jeweiliges Reaktionsoptimum, so wurden beide Enzyme zu gleichen Teilen eingesetzt. Alternativ wurde bei Enzymen der Firma Fermentas das Programm DoubleDigest™ (<http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>) genutzt, um den optimalen Puffer für die Restriktion zu ermitteln. Konnte kein geeignetes gemeinsames Puffersystem eruiert werden, so wurde die DNA zunächst mit einem der beiden Enzyme restringiert, das Enzym sowie der Puffer im Anschluss entweder über eine Gelaufreinigung (*QIAquick® Gel Extraction Kit*), eine Phenol-Chlorophorm-Extraktion und DNA-Fällung (vergleiche 2.2.1.6 und 2.2.1.5) oder eine PCR-Aufreinigung

(*QIAquick® PCR Purification Kit*) entfernt und die gereinigte DNA danach mit dem zweiten Enzym restringiert. Auch die zweite Restriktionsendonuklease wurde mit einer der genannten Methoden von der DNA getrennt. Sollte Plasmid-DNA im Anschluss in einem Klonierungsexperiment eingesetzt werden, so wurde das Enzym – sofern möglich – für bis zu 20 Minuten bei 60°C bis 80°C hitzeinaktiviert und die DNA im selben Puffer mit alkalischer Phosphatase (CIAP) weiterbehandelt (sofern Enzyme des selben Herstellers eingesetzt werden konnten).

Einige Restriktionsendonukleasen weisen auf methylierter DNA eine verminderte Restriktionseffizienz auf, bzw. die Reaktion kommt vollständig zum Erliegen. Aufgrund des bereits erwähnten endogenen Restriktions-Modifikations-Systems ist die in Bakterien amplifizierte DNA immer methyliert, aber auch die DNA der Mammalia trägt teilweise diese Modifikation: sogenannte CpG-Inseln werden zur Expressionsregulation (*silencing*) methyliert und spielen beim epigenetischen Imprinting eine Rolle. Ließ sich der Einsatz eines solchen Restriktionsenzym nicht vermeiden, so wurde die DNA vor der Restriktion im Methyltransferasen-defizienten Bakterienstamm GM2163 amplifiziert, um die DNA von den Methylresten zu befreien.

2.2.1.8 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Rezirkularisierung linearisierter Vektoren mit kohäsiven oder glatten Enden nach dem Restriktionsverdau ohne Aufnahme von Donor-DNA zu minimieren, wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt. Bei diesem Schritt wird die endständige 5'-Phosphat-Gruppe linearer doppelsträngiger DNA mit Hilfe der *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIP, CIAP) entfernt. Dieses Enzym spaltet im alkalischen Milieu (pH 9,5 bis 10,0) unspezifisch die 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA ab, wobei die internen Phosphodiester-Brückenbindungen gegen das Enzym resistent sind.

Dephosphorylierung von DNA

1 – 20 pmol DNA-Enden in wässriger Lösung
5 µl 10x Reaktionspuffer
1 U CIAP
H ₂ O _{a.i.} ad 50 µl
Inkubation bei RT für 30 Minuten

Die *CIAP* der Firma Fermentas weist in den gängigen Puffern der Restriktionsenzyme eine hohe Effizienz auf, sodass in diesem Fall 1 µl alkalische Phosphatase (*CIAP*, 1 U/µl) direkt zu dem Restriktionsverdau (1 bis 20 pmol DNA-Enden) pipettiert wurde, nachdem die Restriktionsendonukleasen zuvor hitzeinaktiviert worden waren. Für beste Klonierungsergebnisse wurde die *CIAP* mit Hilfe der unter 2.2.1.6 beschriebenen Phenol-Chloroform Extraktion entfernt, bevor die DNA der Ligationsreaktion zugeführt wurde.

2.2.1.9 Phosphorylierung von DNA

Tragen die zu verknüpfenden DNA-Enden keine für die Ligationsreaktion notwendigen 5'-Phosphate (beispielsweise bei Klonierungsstrategien, bei denen PCR-Produkte reli-giert werden sollen), so können 5'-Phosphatgruppen an die DNA-Enden addiert werden. Das Enzym Polynukleotidkinase (PNK) aus dem Bakteriophagen T4 katalysiert wäh-rend der Vorwärtsreaktion den Transfer des γ -Phosphats von ATP an die 5'-Hydroxylgruppe der Desoxyribose (oder Ribose) eines endständigen Nukleotids, wobei ADP als weiteres Reaktionsprodukt gebildet wird. Des Weiteren können vorhan-dene 5'-Phosphate durch das Enzym mit der Austauschreaktion beispielsweise gegen markierte Phosphate ausgetauscht werden.

Phosphorylierung von DNA

1 – 20 pmol DNA-Enden in wässriger Lösung

2 µl ATP (10mM)

2 µl 10x Reaktionspuffer (Vorwärtsreaktion)

1 U T4 Polynukleotidkinase

H₂O_{a.i.} ad 20 µl

Inkubation bei 37°C für 20 Minuten

Für beste Klonierungsergebnisse wurde das Enzym durch eine Inkubation bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert, bevor die DNA von nicht inkorporierten ATP-Nukleotiden über eine Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung befreit wurde.

2.2.1.10 Ligation von DNA

Mit Hilfe des Enzyms Ligase werden die 3'-Hydroxyl- und die 5'-Phosphat-Enden einer Nukleinsäure während der ATP-abhängigen Ligationsreaktion zu einer Phosphodiesterbindung kovalent verknüpft. In der Molekularbiologie wird dieser Vorgang genutzt, um beispielsweise mit dem Enzym T4-DNA-Ligase ein bis zwei (oder mehrere) restringierte DNA-Fragmente, in einen zuvor mittels Restriktionsendonukleasen geöffneten Vektor einzusetzen. Da die Ligation sowohl intra- als auch intermolekular erfolgen kann, wurden die eingesetzten Vektormoleküle zuvor dephosphoryliert, um die Religation der Plasmide zu minimieren (siehe 2.2.1.8).

Ligation von DNA

50 ng linearisierte Vektor-DNA in wässriger Lösung

x µl Insertions-DNA (Verhältnis der molaren Menge V:I = 3:1)

1 µl 10x Ligasepuffer

1 U – 10 U T4-DNA-Ligase (kohäsive bzw. glatte Enden)

H₂O_{a.i.} ad 10 µl

Inkubation bei RT für 60 – 120 Minuten (Kohäsive Enden)

Für eine Ligationsreaktion wurden zu 50 ng Vektor- sowie Donor-DNA gegeben, bis das Verhältnis der molaren Menge an Enden von Insertions-DNA zu Vektor-DNA 2 bis 3 entsprach, als Kontrollansatz diente die restringierte Plasmid-DNA allein. Nach Zugabe von 1 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 U (kohäsiven Enden) bzw. bis zu 10 U (glatte Enden) T4-DNA-Ligase und H₂O_{a.i.} ad 10 µl wurde der Ansatz über Nacht bei 15°C oder alternativ (nur bei kohäsiven Enden) 1 bis 2 Stunden bei RT inkubiert.

2.2.1.11 Sequenzierung von DNA

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *GENterprise Genomics* (Mainz) nach dem Kettenabbruchverfahren von (Sanger et al., 1992) durchgeführt und die Chromatogramme mit den PC-Programmen Chromas (Technelysium Pty Ltd, Tewantin Qld, AU), bzw. Clone Manager Suite 7 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) ausgewertet.

2.2.1.12 Hybridisierung von Oligonukleotiden zur Klonierung

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Eine in der Molekularbiologie häufig genutzte Methode zur Einführung oder Deletion von Restriktionsschnittstellen in Plasmid-DNA ist die *linker*-Klonierung. Dazu wurden passende komplementäre Oligonukleotide entworfen, synthetisiert und miteinander verschmolzen, sodass entweder überhängende und kohäsive oder glatte Enden entstanden. Diese kurzen DNA-Fragmente wurden im Anschluss als Donor-DNA in einem Klonierungsexperiment eingesetzt, um in eine präparierte Ziel-DNA inseriert zu werden. Sollte die Restriktionsschnittstelle deletiert werden, so wurde mindestens ein Nukleotid der Erkennungssequenz innerhalb des *linkers* dahingehend verändert, dass die kohäsiven Enden zwar noch funktionsfähig waren, jedoch die Erkennungssequenz nach erfolgter Ligation nicht mehr von der entsprechenden Restriktionsendonuklease erkannt werden konnte.

Die Oligonukleotide wurden jeweils anhand der gewünschten DNA-Sequenz entworfen und je 10 µl der beiden Oligonukleotide (10 mM) zu 5 µl Oligo-Hybridisierungspuffer und 25 µl H₂O_{a.i.} gegeben. Dieses Gemisch wurde für 5 Minuten bei 95°C in einem Heizblock erhitzt und dieser im Anschluss solange bei 4°C gelagert, bis die Kerntemperatur ebenfalls 4° C erreicht hatte. Dabei wurden Sekundärstrukturen der jeweiligen Oligonukleotide, die auf den palindromischen Charakter der Restriktionsschnittstellen zurückzuführen sind, aufgetrennt. Während der Abkühlungsphase lagern sich die beiden Oligonukleotide aufgrund ihrer komplementären Eigenschaften aneinander an, und bilden so die gewünschten *linker*. Um die Anlagerung zu überprüfen, wurde jeweils ein Aliquot der *linker* auf einem 4%-igen Agarosegel (GTG-Agarose) gegen ein Aliquot eines einzelnen Oligonukleotids aufgetrennt. Da doppelsträngige DNA ihrer Konformation halber in einem Agarosegel langsamer migriert, kann ein erfolgreich hybridisierter *linker* von seinen einzelsträngigen Vorläufern diskriminiert werden.

2.2.1.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Zur Konzentrationsmessung von DNA wurde ein geeignetes Volumen der DNA-Lösung (5 µl bis 10 µl) in 245 µl bzw. 240 µl H₂O_{a.i.} verdünnt (VF = 50 bzw. 25) und die Ab-

sorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}), dem maximalen Absorptionsbereich aromatischen Ringsysteme von Purin- und Pyrimidinbasen, spektralphotometrisch in Quarzminiküvetten bestimmt (bei RNA-Messungen wurden die Nukleinsäuren für reproduzierbare Ergebnisse hingegen stets in TE-Puffer verdünnt). Bei sehr geringen Nukleinsäurekonzentrationen kam das NanoDrop-Photometer zum Einsatz, welches mir dankenswerter Weise im *Institut für Molekulargenetik und genetische Sicherheitsforschung* zur Verfügung stand. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ von doppelsträngiger DNA beträgt 50 $\mu\text{g/ml}$, von einzelsträngigen DNA-Molekülen wie Oligonukleotiden 33 $\mu\text{g/ml}$, sowie von RNA 40 $\mu\text{g/ml}$ (Sambrook, 2002). Die Konzentration berechnet sich daher nach folgenden Formeln:

DNA (doppelsträngig)	DNA (einzelsträngig)	RNA
$[c] = OD_{260} \times 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times VF$	$[c] = OD_{260} \times 33 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times VF$	$[c] = OD_{260} \times 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times VF$

Wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm ein weiteres Absorptionsmaximum gemessen, deutete dies auf eine Verunreinigung der Lösung durch Proteine hin. Der Quotient der optischen Dichten, die bei 260 nm und 280 nm gemessen wurden, gab Aufschluss über die Reinheit einer DNA-Präparation. Bei reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient bei ungefähr 1,8 bis 2. Niedrigere Werte geben einen Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte hingegen können ein Anzeichen für das Vorhandensein von RNA sein oder deuten auf eine Denaturierung der Nukleinsäure hin.

2.2.1.14 Konzentrationsbestimmung von DNA über serielle Verdünnung

Da das verwendete Spektralphotometer Ultraspec 2000 UV nicht optimal mit den verfügbaren Plastikmikroküvetten harmonierte und die Messergebnisse schwankten, wurde bei geringen DNA-Mengen die Konzentrationsbestimmung über eine serielle Verdünnung vorgenommen. Dazu wurde unterschiedliche Verdünnungen der DNA auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt: Meist wurden 3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{a.i.}}$ vorgelegt, 3 μl der zu messenden DNA-Lösung zugegeben und dieses Gemisch bis zu acht Mal seriell 1:2 verdünnt. Das Volumen aller seriell verdünnten Proben wurde auf 15 μl angehoben,

3 µl DNA-Ladepuffer zugegeben und die gesamten Proben auf einem 1,0 bis 1,2%-igen Agarosegel aufgetragen. Die letzte sichtbare Bande entspricht einer DNA-Menge von ca. 10 ng. Anhand der eingesetzten DNA-Menge, sowie des Verdünnungsfaktors VF ($VF = 2^n$; n = Nummer der Spur mit der letzten sichtbaren Bande) kann dann die DNA-Konzentration mit folgender Formel bestimmt werden:

**Konzentrationsbestimmung von DNA
über serielle Verdünnung**

$$c = \frac{VF \times 10 \text{ ng}}{\mu\text{l eingesetzt}}$$

2.2.1.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) erlaubt die Amplifikation eines DNA-Fragments (Matrize) über einen Bereich, der von zwei der Matrize komplementären Oligonukleotiden (*Primer*) flankiert wird. Durch Einsatz einer temperaturstabilen DNA-Polymerase wie z.B. der Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* YTI lassen sich in einer zyklischen Abfolge von Aufschmelzen (Denaturierung) der Matrize, Anlagerung (*annealing*) der Oligonukleotide und sukzessiver DNA-Polymerisierung (*extension*) auch sehr geringe DNA-Mengen hochspezifisch exponentiell vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Die Oligonukleotid-spezifische Anlagerungstemperatur wurde für Primer mit einer Länge kleiner gleich 20 Basen in der Regel mit folgender Formel berechnet:

Errechnung der Anlagerungstemperatur kurzer Oligonukleotide

$$T [^\circ\text{C}] = 2(A + T) + 4(C + G)$$

Bei komplexeren Oligonukleotiden erfolgte die Berechnung mit Hilfe des Programms „Clone Manager Suite 7“, die PCR-Reaktion selbst wurde in den nahezu baugleichen PCR-Geräten der Firmen MWG Biotech bzw. Peqlab durchgeführt. Das nachfolgende Standardprogramm soll als Beispiel dienen, die tatsächlich verwendeten Programme sind im Anhang aufgelistet.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	1
Denaturierung	94°C	45 Sekunden	30
Anlagerung	58°C	45 Sekunden	
Polymerisierung	72°C	45 Sekunden	
finale Polymerisierung	72°C	5 Minuten	1

Die Dauer der Denaturierung ist abhängig von der Komplexität der eingesetzten Matrize, wobei genomische DNA als hochkomplex angesehen wird und im Gegensatz zu beispielsweise weniger komplexen Plasmiden eine längere Denaturierungszeit eingehalten werden muss. Auch die Anlagerungs-Phase der Oligonukleotide ist von der Komplexität des Templates abhängig. Moderne Polymerasen sind in der Lage, mehrere kb in 30 Sekunden zu amplifizieren, sodass die Dauer der Polymerisierungsschritte direkt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments abhängt. Je nach der Ausgangsmenge an Matrizenmolekülen wird der Haupt-PCR-Zyklus 25 bis 35 Mal wiederholt und die Proben bis zur Entnahme im PCR-Gerät bei 10°C temperiert. Die in der Tabelle angegebenen Zeiten gelten als Maximalwerte, die in dem meisten Fällen drastisch verkürzt werden können.

Polymerase-Kettenreaktionen erfordern oft gänzlich unterschiedliche Reaktionsbedingungen. Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Komponentenkonzentrationen sind Richtwerte, die je nach Optimierungsbedarf verändert wurden. Beispielsweise variierten die Konzentrationen der dNTPs zwischen 20 und 250 µM, von MgCl₂ zwischen 1,5 und 3,5 mM und auch die Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration zwischen 10 µM und 1 µM eingesetzt. Die genauen Protokolle sind dem Anhang zu entnehmen. Dabei ist zu beachten, dass generell bei einer höheren Konzentration an Magnesiumionen zwar mehr PCR-Produkte generiert werden, jedoch die Spezifität der Reaktion dadurch gesenkt wird. Werden bei längeren Fragmenten, bzw. mehreren Fragmenten in einer einzigen PCR unter Umständen höhere Mengen an dNTPs benötigt, so muss auch die Konzentration an Mg²⁺ Ionen angehoben werden, da dNTPs und Magnesiumionen in Lösung miteinander einen Komplex bilden.

Standard-PCR-Ansatz (analytisch):

bis zu 10 ng Plasmid-DNA
bis zu 500 ng genomische DNA
2,5 µl 10x Reaktionspuffer (15 mM Mg ²⁺)
0,25 µl 10 mM dNTP-Mix
2,5 µl 1 µM vorwärts-Oligonukleotide
2,5 µl 1 µM rückwärts-Oligonukleotide
0,1 µl Taq-Polymerase (0,5 U)
H ₂ O _{a.i.} ad 25 µl

Nach Ablauf der Reaktion wurde der Reaktionsansatz von 25 µl mit je 5 µl 6x DNA-Ladepuffer versetzt und 10 µl davon auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

2.2.1.16 PCR mit Fehlerkontrolle für Klonierungsexperimente

Da die Taq-Polymerase nur eine unzureichend arbeitende intrinsische 3'- → 5'-Exo-nukleaseaktivität besitzt, müssen ihre Amplifikate als fehlerbehaftet gelten. Statistisch entsteht selbst bei einer unproblematischen Matrizen-DNA eine Fehlerrate von ca. 1 %. Andere Enzyme wie z.B. *Pfu*- oder *Pwo*-Polymerasen besitzen eine ausgeprägtere Fehlerkorrektur welche sie befähigt, DNA in einem sehr viel höheren Maße fehlerfrei zu amplifizieren. Die hohe Prozessivität der Taq- und die ausgeprägte Fehlerkorrektur der Pfu-Polymerasen sind in der Phusion-Polymerase vereint. Wurde die PCR bei Klonierungsexperimenten eingesetzt, so kam dabei die *Phusion*TM *High-Fidelity DNA Polymerase* nach den Angaben des Herstellers NEB zum Einsatz. Diese Polymerase hat ein Temperatur-Optimum bei 74°C, sodass die PCR-Protokolle entsprechend angepasst wurden.

Standard-PCR-Ansatz (Klonierung):

bis zu 10 ng Plasmid-DNA
bis zu 500 ng genomische DNA
10 µl 5x HF-Reaktionspuffer (7,5 mM Mg ²⁺)
0,5 µl 10 mM dNTP-Mix
5 µl 1 µM vorwärts-Oligonukleotide
5 µl 1 µM rückwärts-Oligonukleotide
0,5 µl Taq-Polymerase (1 U)
H ₂ O _{a.i.} ad 50 µl

Die Phusion-Polymerase wurde dem Reaktionsansatz stets als letzte Komponente hinzugefügt, sodass eine Degradierung von Matrizen-DNA und Oligonukleotiden durch die Wirkung der 3' → 5'-Exonukleaseaktivität des Phusion-Enzyms vermieden wurde.

Da die bei Klonierungsexperimenten verwendeten Oligonukleotide meist an ihrem 5'-Ende die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease trugen, konnten die generierten PCR-Produkte mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut werden, sodass meist kohäsive Enden entstanden. Zur Sicherheit wurden jeweils 5' der eigentlichen Restriktionsenzym-Erkennungsstelle sogenannte Abstandhalter-Sequenzen von drei bis sechs Nukleotiden angefügt, die für eine höhere Effizienz bei der Restriktion sorgen sollten. Dabei wurde drauf geachtet, dass keine zusätzlichen Palindrome in die Primersequenz eingeführt wurden, um die thermodynamischen Eigenschaften der Oligonukleotide nicht negativ zu beeinflussen.

Der gesamte PCR-Ansatz wurde mit dem entsprechenden Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt, in mehrere Taschen eines Agarosegels geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und die spezifischen Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde aus den Gelstücken mit Hilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kit* isoliert, mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen inkubiert und weiter verarbeitet. Die so generierten Fragmente konnten dann im Anschluss in einen vorbereiteten Vektor inseriert werden.

2.2.1.17 RT-PCR zur cDNA-Synthese

Um die Transkription von DNA in mRNA untersuchen zu können, wird das Enzym *Reverse Transkriptase* verwendet. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase produziert eine zur eingesetzten mRNA komplementäre cDNA, welche im Anschluss als Matrize für eine PCR eingesetzt wird. Zur cDNA-Synthese wurden einerseits oligo(dT)₂₃ Primer, andererseits sequenzspezifische Primer eingesetzt. Diese Lösungen wurden für 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Direkt im Anschluss wurden die restlichen Reagenzien zugegeben, der Reaktionsansatz bei 48°C für 1 Stunde inkubiert (cDNA-Synthese) und abschließend das Enzym durch Inkubation bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert.

Jeweils 1 bis 5 µl der gewonnenen cDNA wurde als Matrize in einer „konventionellen“ PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden eingesetzt und die Produkte über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

RT-PCR-Ansatz:
0,5 µg – 1 µg Gesamt-RNA
1,0 µl (10 µM) oligo(dT) ₂₃ -Oligonukleotide, bzw. 1,0 µl (10 µM) sequenzspezifische Oligonukleotide
H ₂ O _{a.i.} ad 11 µl
Denaturierung der RNA bei 70°C für 5 Minuten
4,0 µl Puffer (5x)
1,0 µl DTT (100 mM)
0,1 µl dNTP-Mix (10 mM)
1,0 µl Reverse Transkriptase (Blend)
20 µl H ₂ O _{a.i.}
Inkubation bei 48°C für 60 Minuten
Inaktivierung der reversen Transkriptasen bei 75°C für 10 Minuten

2.2.1.18 Präparation genomischer DNA

2.2.1.18.1 DNA-Präparation aus Schwanzbiopsien

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Die DNA-Extraktion aus Schwanzbiopsien wurde nach einem modifizierten Protokoll von (Laird et al., 1991) durchgeführt, wobei sämtliche Zentrifugierungs-, Fällungs- und Waschschrte bei RT stattfanden. Die frischen oder bei -20°C gelagerten Schwanzspitzen mit einer Länge von ca. 2 bis 4 mm (möglichst von jungen Tieren, drei bis vier Wochen *post partum*), wurden ü.N. bei 55°C in 750 µl Lysepuffer mit ca. 15 IE Proteinase K inkubiert. Der proteolytische Abbau der Zellproteine durch Proteinase K ist ein essenzieller Schritt bei der DNA-Isolierung. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Serinprotease, welche Peptidbindungen X-Y spaltet. Dabei kann X eine aromatische, aliphatische oder hydrophobe Aminosäure und Y jede beliebige Aminosäure sein. Die Zugabe von Proteinase K im Überschuss garantierte einen vollständigen Abbau der Zellproteine bis hin zu freien Aminosäuren. Die proteolysierten Proben wurden am

nächsten Tag mit 250 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt, zum Mischen mehrmals invertiert und daraufhin Haare sowie Zelltrümmer durch zehninütiges Zentrifugieren bei 15.000 g sedimentiert. 750 µl des klaren Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die darin enthaltene DNA mit 600 µl Isopropanol gefällt und die Nukleinsäuren erneut durch Zentrifugieren bei 15.000 g für 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat mit 150 µl 70%-igem (v/v) Äthanol versetzt und wiederum für 10 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun quantitativ entfernt und verworfen, das DNA-Präzipitat für ca. 1 Minute an der Luft getrocknet und in 50 µl H₂O_{a.i.} gelöst. Um das Lösen der DNA zu unterstützen, wurden die Proben mit geöffnetem Deckel für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Erste PCR-Untersuchungen konnten bereits wenige Stunden nach der DNA-Extraktion durchgeführt werden, gleichbleibend reproduzierbare Ergebnisse wurden jedoch erst nach einem Zeitraum von mehreren Tagen erreicht.

2.2.1.18.2 DNA-Präparation aus ES-Zellen für Southern-Blot-Analysen

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Die ES-Zellen wuchsen unter Selektionsdruck durch G418 auf gelatinisierten 96-Lochplatten bis zur Konfluenz. Das Medium wurde abgesaugt und die Platten zwei Mal mit PBS gewaschen. 50 µl ES-Zell-Lysepuffer wurden hinzu pipettiert und leiteten so die Lyse der Zellen ein, die durch Inkubation bei 55°C ü.N in einer feuchten Kammer erfolgte.

Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden unter strikter Vermeidung von Erschütterungen durchgeführt, da die Zellen leicht von ihrem Untergrund abschwimmen und verloren gehen können.

Um die DNA zu fällen, wurden pro Loch 100 µl eiskaltes absolutes Äthanol zugegeben und zwischen einer und drei Stunden bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte vorsichtig auf Saugpapier umgedreht und so die Flüssigkeit verworfen. Um die DNA zu waschen, wurden pro Loch 100 µl 75% (v/v) Äthanol zupipettiert und dieses sofort wieder durch Umdrehen der Platte auf Papier entfernt. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, um die Konzentration von Salzen oder anderer störender Substanzen zu minimieren. Die 96-Lochplatte wurde nun bei RT für ca. 30 Minuten gelagert, bis kein Alkohol mehr zu detektieren war (Geruchstest). Da jeweils die gesamte gewon-

nene DNA zu Southern-Blot Untersuchungen herangezogen wurde, konnte im Anschluss direkt der Puffer mit dem entsprechenden Restriktionsenzym hinzugegeben werden. Auf ein dediziertes Lösen der DNA wurde verzichtet.

2.2.1.18.3 DNA-Präparation aus Geweben (außer Schwanzbiopsien)

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Um DNA für Southern-Blot- und PCR-Analysen aus Gewebe zu isolieren, wurden diese Gewebeprobe mit Hilfe des *DNeasy® Tissue Kits* der Firma Qiagen, Hilden aufgeschlossen.

Die entsprechenden Proben waren direkt nach der Organentnahme in Fragmente von ca. 30 mg Gewicht (ca. 4 mm Seitenlänge) zerteilt, in Isopentan eingefroren und bei -80°C gelagert worden. Die DNA-Isolation erfolgte nun nach dem Protokoll des Herstellers (Stand März 2004) durch Zugabe von Proteinase K, Bindung von hochmolekularer DNA an die Silikamembran der Säulen unter Hochsalzbedingungen in hydrophobem Milieu und schließlich Elution der DNA unter Niedrigsalzbedingungen. Dazu wurden die entsprechenden Säulen je ein Mal mit 100 µl TE-Puffer, gefolgt von je einer Elution mit 50 µl TE-Puffer beschickt (die Eluate wurden nicht vereint). Auf eine Behandlung mit RNase wurde verzichtet, da koaufgereinigte RNA nachfolgende Applikationen nicht beeinflusst.

2.2.1.19 Southern-Blot-Hybridisierung

2.2.1.19.1 Präparativer Verdau von DNA

Um die isolierte genomische Proben-DNA spezifisch zu fragmentieren, wurde diese mit einer Endonuklease verdaut. Dadurch wurden die unterschiedlichen DSG2-Allele in verschieden große DNA-Fragmente geteilt, die sich durch anschließende Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde im Southern Blot als spezifische Banden nachweisen ließen.

Im Falle der ES-Zell-DNA wurden nach der Trocknung 50 µl Reaktionsmix (100 U der

Endonuklease) zugegeben und die 96-Lochplatte ü.N. bei 37°C inkubiert. War hingegen DNA aus Geweben extrahiert worden, so wurden 10 µg genomische DNA und unter gleichen Bedingungen restringiert.

2.2.1.19.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Die restringierten DNA-Proben wurden in einem horizontalen 0,8%-igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Siebstruktur der vernetzten Agarose wird eine Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren nach ihrer Größe und Konformation aufgrund der daraus resultierenden unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld möglich. Für die anzufertigenden Lösungen wurde ionengetauschtes Wasser verwendet. Zur Herstellung eines Gels für 20 Proben wurden 2 g Agarose in 250 ml 1x TBE-Puffer durch Erwärmen in einer Mikrowelle gelöst. Der Lösung wurden nach Abkühlen auf ca. 50°C 6 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) zugesetzt, ein 6 bis 8 mm starkes Horizontalgel (14,5 cm x 15,5 cm) gegossen und ein entsprechender Kamm für ein Probenvolumen von 65 µl eingesetzt. Durch die spätere Interkalierung von Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren wird der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex nach Anregung durch UV-Licht als rot-orange leuchtende Bande sichtbar und die Detektion von geringen DNA-Mengen wie ca. 5 bis 10 ng dsDNA ermöglicht. Nach Erstarren der Agarose wurde 1x TBE-Puffer in die Kammer gegossen, bis das Gel ca. 5 mm mit Laufpuffer überschichtet war. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig entfernt, zu den 50 µl der EcoRV-verdauten DNA-Proben je 10 µl 6x DNA-Ladepuffer gegeben und jeweils die gesamte Gelprobe aufgetragen. Passende Kontrollen, sowie DNA-Größenstandards wurden in die verbleibenden Taschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 15 Stunden bei konstanter Spannung von 50 V.

2.2.1.19.3 Transfer der DNA

Nach der elektrophoretischen Separation wurden die DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, GE-Healthcare) transferiert. Dieses sogenannte *Southern Blotting* wurde nach Edward M. Southern benannt, der diese Technik des Transfers und Fixierens auf einer Membran von zuvor elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmenten in den 1970er Jahren entwickelte, um einzelne transferierte DNA-Fragmente später durch Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden spezifisch nachweisen zu können.

Das Agarosegel wurde zunächst mit Salzsäure vorbehandelt, um einen effizienten Transfer zu gewährleisten. Im sauren Milieu wird die DNA im Gel teilweise depuriniert und zerbricht dann in kleinere Fragmente. Dieser Schritt ist insbesondere für den effizienten Transfer von DNA-Fragmenten über 5 kb notwendig. Dazu wurden das Gel mit 0,25 N HCl überschichtet und für genau 20 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert. Die komplette Durchdringung des Gels mit HCl kann durch einen Farbumschlag des im Gel befindlichen Bromphenolblaus von blau nach gelb überprüft werden. Danach wurde die HCl verworfen, das Gel kurz mit Leitungswasser abgespült und zur Neutralisation der Salzsäure, sowie Denaturierung der DNA zweimal für 20 Minuten in 0,4 M NaOH inkubiert. In der Zwischenzeit wurden insgesamt sechs Whatman 3MM Filterpapiere und die Nylonmembran genau auf die Größe des Gels zugeschnitten. Zwei Lagen des Filterpapiers wurden zu langen Bahnen zerteilt, die als Pufferbrücken später den Transferpuffer zum Gel transportieren sollten. Des Weiteren wurden mehrere Dutzend Papierhandtücher in geeignete Form und Größe gebracht, um später den Transferpuffer über den Kapillareffekt aufnehmen zu können. Die Blotapparatur wurde nach den Vorgaben von (Sambrook, 2002) aufgebaut: über zwei Glasschalen, die reichlich mit 0,4 M NaOH gefüllt waren, wurde eine Glasplatte gelegt. Über diese wiederum wurden die zwei in 0,4 M NaOH getränkten Filterpapier-Brücken aufeinander gebreitet und das Gel obenauf platziert. Die Nylonmembran und drei der zugeschnittenen Filterpapierlagen wurden in 0,4 M NaOH gut angefeuchtet und luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht. Abgeschlossen wurde der Blot-Aufbau von den verbleibenden drei trockenen Filterpapieren und den zugeschnittenen Papierhandtüchern. Obenauf wurde eine Glasplatte gelegt und mit einer gefüllten 2,5 l Flasche beschwert, um die Papierlagen für eine optimale Durchfeuchtung des Stapels zu komprimieren. Durch Kapillarkräfte wur-

de innerhalb von 2 bis 4 Stunden die DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran übertragen, das System danach abgebaut und die Membran an einem trockenen Ort verwahrt.

2.2.1.19.4 radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die DNA-Sonden wurden vor der Hybridisierung durch *Random Primed Oligo Labeling* radioaktiv markiert. Dabei lagern sich Oligonukleotide mit zufälliger Basenabfolge an die einzelsträngige Sonden-DNA an. Diese kurzen dsDNA-Abschnitte dienen im Anschluss dem Klenow-Enzym (große Untereinheit der DNA-Polymerase I) als Ansatzpunkt einer DNA-Polymerisation, bei der das Enzym aus einem Gemisch von drei nicht markierten Desoxynukleotiden und einem z.B. radioaktiv markierten Desoxynukleotid dsDNA generiert. Da das Klenow-Fragment keine 5'- → 3'-Exonukleaseaktivität aufweist, stoppt der Einbau weiterer Nukleotide am nächsten gebundenen Oligonukleotid, sodass ca. 500 bis 1.000 bp lange Fragmente entstehen.

Zum Einsatz kamen verschiedene externe und interne Sonden, die per PCR hergestellt (siehe 2.2.1.15), über ein Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe eines *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt worden waren. Im Anschluss fand eine Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte über eine serielle Verdünnung statt, um die DNA auf 25 ng/μl zu verdünnen zu können. 0,5 μl, 1 μl und 2 μl dieser verdünnten Sonden-DNA wurden mit Hilfe des *Prime-It® II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene, Amsterdam, NL) radioaktiv markiert. Dazu wurden in drei parallelen Ansätzen zunächst die verdünnte DNA mit 10 μl randomisierten Nona-mer-Oligonukleotiden und H₂O_{a.i.} ad 40 μl für 5 Minuten bei 100°C erhitzt. Dabei wird die Sonden-DNA durch die Hitze einwirkung aufgeschmolzen und die randomisierten Oligonukleotide können sich im Anschluss an die einzelsträngige DNA anlagern. Danach wurden 10 μl dATP-Mix und 10 U Klenow-Fragment sowie 5 μl (50 μCi) [α-³²P]ATP zugegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Da nicht inkorporierte [α-³²P]ATP Moleküle unter Umständen einen hohen Hintergrund auf der Membran hervorrufen können, wurden diese radioaktiven Nukleotide mit Hilfe des *QIAquick® Nucleotide Removal Kit* der Firma Qiagen, Hilden nach Herstellerangaben entfernt. Um die spezifische Aktivität der DNA-Sonden zu bestimmen, wurden 2 μl (1%) der DNA-Lösung in einem Szintillationscounter TRI-CARB 1600TR mit folgenden Parametern

gemessen. Für aussagekräftige Ergebnisse mit scharfen Banden sollte die hochgerechnete Aktivität der gesamten Sonde einen Wert von größer $1,2 \times 10^7$ cpm aufweisen. Dabei wurde auf die relative (spezifische) Aktivität geachtet und bei niedrigerer Aktivität die Markierungsreaktion wiederholt.

Parameter für die Detektion der β-Strahlung			
Region A: LL-UL = 5,0-1700	Lcr = 0	Bkg = 0.00	%2 Sigma = 0.00
Region B: LL-UL = 50,0-1700	Lcr = 0	Bkg = 0.00	%2 Sigma = 0.00
Region C: LL-UL = 5,0-1700	Lcr = 0	Bkg = 0.00	%2 Sigma = 0.00
Time = 1,00	QIP = SIS		

Zum Blocken unspezifischer DNA-Bindungsstellen wurde die Sonde mit der höchsten spezifischen Aktivität mit 1 mg geschallter Lachssperma-DNA versetzt und für 5 Minuten bei 100°C und direkt im Anschluss für weitere 5 Minuten bei -20°C inkubiert. Die so behandelte Sonde war nun bereit, um mit der immobilisierten genomischen DNA zu hybridisieren.

2.2.1.19.5 Hybridisierung der DNA-Sonden

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Zur Prähybridisierung wurde die Membran zuerst in einer Hybridisierungsröhre mit ca. 10 ml vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben und für 15 Minuten bei 64°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend verworfen und durch weitere 10 ml Hybridisierungspuffer ersetzt. Das Gemisch der ^{32}P -markierten DNA-Sonde und der fragmentierten Lachssperma-DNA wurde vorsichtig an den Rand der Röhre (nicht direkt auf die Membran) gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 64°C über Nacht in einem Hybridisierungsofen unter ständiger Rotation. Dabei lagern sich die einzelsträngigen, radioaktiv markierten DNA-Sondenfragmente komplementär an entsprechende membrangebundene DNA-Einzelfragmente der genomischen DNA an. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen und die Membran in der Hybridisierungsröhre kurz mit ca. 10 ml Waschlösung 1 geschwenkt, die Flüssigkeit entsorgt und 10 ml Waschlösung 2 zugegeben. Nach erneuter Inkubation im Hybridisierungsofen bei 64°C für 20 Minuten wurde die Waschlösung 2 verworfen und der Waschvorgang nochmals wiederholt. Abschließend wurde die Membran für 30 Minuten in ca. 10 ml Waschlösung 3 unter ständiger Rotation benetzt.

Zuletzt wurde die noch feuchte Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und bei -20°C gelagert. Der Nachweis der spezifisch ^{32}P -markierten DNA-Fragmente erfolgte durch Exposition zweier übereinandergelegter Röntgenfilme mit den entsprechenden Southern-Blot Membranen in einer Expositions-kassette und eingeklebter Intensivierungsfolie. Die Exposition geschah bei -80°C für meist zunächst 2 Tage. Nach diesem Zeitraum wurde der obere Film entwickelt und ausgewertet. Nun war abzuschätzen, ob und wie lange die Exposition des zweiten Filmes noch andauern musste.

2.2.1.19.6 Entfernen von hybridisierten DNA-Sonden (*Strippen*)

Benötigte Lösungen: Puffer für Nukleinsäurearbeiten (Seiten 39 ff.)

Sollte dieselbe Membran sequentiell mit mehreren radioaktiv markierten Sonden inkubiert werden, so mussten die immobilisierte genomische DNA von den alten Sonden befreit werden. Dazu wurde die Membran in einer 0,1%-igen (w/v) SDS-Lösung für 15 Minuten gekocht, anschließend in Folie verpackt und feucht gelagert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Gesamtprotein-Isolierung aus Zellkulturzelllysaten

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellkulturzellen wurden die Zellen zunächst in 10 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90% kultiviert. Dann wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen 2 bis 3 Mal vorsichtig mit 1 x PBS (4°C) gewaschen. Verbliebenes PBS wurde mit Pasteur-Pipetten quantitativ entfernt. Je nach gewünschtem Konzentrationsgrad der Lysate wurden 200 bis 500 μl reduzierender SDS-Auftragspuffer zu den Zellen pipettiert. Diese wurden dann zügig mit einem Gummispatel quantitativ abgelöst, in ein auf Eis vorgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Ggf. wurde das gewonnene Zelllysate mit 1 μl Benzonase bei 37°C für 60 Minuten inkubiert und abschließend bei -20°C gelagert. Dadurch wurde die in den Lysaten enthaltene DNA fragmentiert und die störende hohe Viskosität der Gelproben drastisch reduziert. Um die Proteine des Zelllysats mit Hilfe einer SDS-PAGE ana-

lysieren zu können, wurde das Lysat zunächst aufgetaut, resuspendiert und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Dabei entfalteten sich die enthaltenen Proteine und vorhandene Disulfidbrücken wurden durch DTT bzw. β -Mercaptoäthanol gespalten.

2.2.2.2 Gesamtprotein-Isolierung aus tierischen Geweben

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Proteinextrakte wurden direkt nach der Organentnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Fragmenten von Leber, Herz und Kolon gewonnen. Dazu wurde zu den Organproben jeweils 1 ml Protein-Lysepuffer 2 gegeben und die Gewebe in einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 94°C wurden die Proben auf Eis gekühlt, zur weiteren Homogenisierung bei 4°C mit Ultraschall behandelt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Abschluss wurden Zelltrümmer für 10 Minuten bei 13.000 U/Min und 4°C sedimentiert, der Überstand abgenommen und solange zentrifugiert, bis ein klares Lysat vorlag.

Alternativ wurde das Gewebsfragment mit 1 ml Protein-Lysepuffer 1 in einem Glashomogenisator zerrieben und für 10 Minuten bei 13.000 U/Min. und 4°C zentrifugiert, um ein klares Lysat zu gewinnen.

Als drittes Extraktionsmedium kam das Trizol®-Reagenz zum Einsatz, welches dem Herstellerprotokoll gemäß eingesetzt wurde.

Die Proteinkonzentration dieser Gesamtzell-Extrakte wurde abschließend nach der Bradford-Methode bestimmt.

2.2.2.3 Proteinquantifizierung nach Bradford

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Die Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach (Bradford, 1976) beruht auf der Bindung des Farbstoffmoleküls Coomassie-Brilliant Blau G-250 in saurem Milieu an die hydrophoben Seitenketten von Proteinen und der damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm. Der Bradford-Test zeichnet sich durch eine relativ hohe Empfindlichkeit aus, jedoch kann diese bei unterschiedlichen Proteinen weit streuen. Aus diesem Grund ist die Wahl eines geeigneten

Eichproteins entscheidend für die Aussagekraft der Messung.

Es wurde der Bradford-Mikrotest angewendet: dazu wurden verschiedene Verdünnungen der Proteinprobe in 20 µl PBS hergestellt. Zu diesen wurden zu je 1 ml von 1:5 verdünntem Bradford-Reagenz pipettiert, die Suspension kräftig gemischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte photometrisch bei 595 nm im Konzentrationsbereich 0,2 bis 1,2 mg/ml unter Zuhilfenahme einer Eichgeraden von BSA mit bekannter Konzentration.

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) unter Verwendung eines Tris/Glycin-Puffersystems nach (Laemmli, 1970) durchlaufen die Proteine zuerst ein großporiges Sammelgel (pH 6,8), werden an der Grenzschicht zum Trenngel durch die Klammerwirkung des Glycins konzentriert und laufen als scharfe Bande in das Trenngel (pH 8,8) ein, wo sie nun nach ihrem apparenten Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das anionische Detergenz SDS maskiert dabei die Eigenladungen der Proteine, die nun mit konstanter negativer Nettoladung pro Masseneinheit im angelegten elektrischen Feld durch die Acrylamid-Matrix zur Anode wandern. Als Trennmatrix wurde eine Mischung aus Acrylamid und Bis-Acrylamid verwendet, die durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) polymerisiert wurde. Für das Sammelgel wurde eine Acrylamid-Konzentration von 5% (v/v) und für das Trenngel eine Acrylamid-Konzentration von 6% bis 15% (v/v) verwendet.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten auf 94°C erhitzt, umgehend auf Eis gekühlt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V für etwa 1 Stunde. Zur Abschätzung des Proteingewichts der einzelnen Probenbanden wurden Eichproteine (Proteinmarker) parallel mit aufgetrennt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bzw. Silbernitrat gefärbt oder mittels Elektrotransfer auf eine Membran übertragen.

2.2.2.5 Detektion von Proteinen durch Anfärben

2.2.2.5.1 Coomassie-Brilliant-Blau G-250

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bindet unspezifisch an hydrophobe Reste, die sich an der Oberfläche von Proteinen befinden. Die Empfindlichkeit dieses Nachweisverfahrens liegt bei 0,5 µg Protein pro Bande. Das SDS-Gel wurde für 5 bis 10 Minuten bei RT in der Färbelösung inkubiert und anschließend kurz mit Leitungswasser abgespült. Der Entfärbevorgang erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler in Entfärbelösung, welche zur Fixierung der Proteine im Gel Essigsäure enthielt. Um den Vorgang zu beschleunigen, kann die Entfärbung des Gels auch in einer Mikrowelle durchgeführt werden. Dazu wird das Gel in ein Glasgefäß mit Wasser gegeben und für kurze Zeit unter Beobachtung in einer Mikrowelle erhitzt. Nach erfolgreichem Entfärben wurde das Gel unter Vakuumeinwirkung getrocknet oder in 5% (v/v) Glycerin eingeschweißt.

2.2.2.5.2 Silbernitrat

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Um selbst geringste Proteinmengen von etwa 5 ng pro Bande in einem Polyacrylamid-Gel nachweisen zu können, wurde dieses mit Silbernitrat gefärbt. Zu Beginn wurde das Gel für eine Dauer von 15 Minuten in 50% (v/v) Äthanol fixiert (entwässert) und anschließend kurz mit H₂O_{dd} abgespült. Im Anschluss wurde das Gel unter leichter Bewegung für 15 Minuten in frisch angefertigter Färbelösung inkubiert, kurz in H₂O_{dd} geschwenkt und für weitere 5 Minuten in H₂O_{dd} belassen. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel in die Entwicklerlösung gegeben und dort solange inkubiert, bis die gewünschten Banden zwar bereits deutlich sichtbar, jedoch noch nicht vollständig abgefärbt waren. Bevor das Gel in die Stopplösung überführt und dort für etwa 10 bis 15 Minuten inkubiert worden war, wurde das Gel kurz in einem Wasserbad von anhaftender Entwicklerlösung befreit. Im Anschluss daran konnte das Gel getrocknet oder in 5% (v/v) Glycerin eingeschweißt werden.

2.2.2.5.3 Ponceau-S

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Um die Effizienz eines Western-Blot-Transfers zu überprüfen, bzw. um Proteinbanden vor der Inkubation mit Antikörpern auf der Membran lokalisieren zu können, bietet sich eine Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S an. Dieser Farbstoff markiert die an die Membran gebundenen Proteine unspezifisch, die Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng Protein/mm². Die Nitrozellulosemembran wurde dazu zunächst für 5 bis 10 Minuten in der Ponceau-S Lösung inkubiert und anschließend vorsichtig mit 1x TBS gewaschen. Die so angefärbten Proteinbanden wurden nun mit einem Bleistift direkt auf der Membran markiert und konnten auf diese Weise während der nachfolgenden Manipulationen weiterhin lokalisiert werden.

2.2.2.6 Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden entweder nach einer SDS-PAGE elektrophoretisch aus dem Gel heraus oder mit Unterdruck (Dot-Blot) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und auf dieser dann mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Der erste Antikörper bindet nach Blocken unspezifischer Bindungsstellen nur an das zu detektierende Protein und wird anschließend durch einen enzymgekoppelten zweiten Antikörpers sichtbar gemacht. An den zweiten Antikörper, der den F_c-Teil des ersten Antikörpers erkennt, ist eine Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) gebunden, die unter alkalischen Bedingungen und in Gegenwart von H₂O₂ die Oxidation von Luminol katalysiert. Als direktes Reaktionsprodukt entstand eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das bei Relaxation in den elektronischen Grundzustand Strahlung abgab, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden konnte.

2.2.2.6.1 Elektrotransfer (*semidry*) auf eine Nitrozellulosemembran

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Nach der SDS-PAGE wurden eine Nitrozellulosemembran, sowie das Gel selbst kurz in Transfer-Puffer eingeweicht. Zwei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-3MM-

Papier wurden auf der Platinelektrode der Transfereinheit platziert, danach zuerst die Nitrozellulosemembran und im Anschluss das Gel luftblasenfrei auf die Papierlagen aufgebracht. Den Abschluss des Stapels bildeten zwei wiederum in Transferpuffer getränkte Whatman-3MM-Papierstücke. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 20 V für 15 Minuten pro Mini-Gel.

2.2.2.6.2 Unterdrucktransfer auf eine Nitrozellulosemembran (*Dot-Blot*)

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Der hochempfindliche Nachweis eines Proteins ist mit Hilfe der Immundetektion möglich. Dabei dient der Dot-Immunassay der schnellen Orientierung beim Test von Seren. Zum Einsatz kam eine Dot-Blot-Kammer der Firma BioRad. Der Aufbau der Kammer erfolgte wie im Produkthandbuch beschrieben, jedoch wurde unter die Gummidichtung ein exakt zugeschnittenes und in TBS eingeweichtes Whatman-3MM-Papierstück zur zusätzlichen Abdichtung eingesetzt. Als Vakuumquelle wurde eine Wasserstrahlpumpe eingesetzt. In den meisten Anwendungsfällen wurden nicht sämtliche 96 Vertiefungen benötigt und diese daher mit einer 3%-igen (w/v) Gelatine-Lösung verschlossen. Um die Membran feucht zu halten, wurden zu Beginn 100 µl TBS-Puffer in die Vertiefungen gegeben und durch das Vakuum abgesaugt. Nun konnten die Proteinproben in einem Puffer von maximal 500 µl (meist 100 µl) Volumen aufgebracht werden und flossen unter Einfluss der Schwerkraft durch die Apparatur. Wenn dieser Vorgang nach ca. 15 Minuten noch nicht deutlich vorangeschritten war, wurde ein *sehr* leichtes Vakuum angelegt, durch welches die Flüssigkeiten in etwa 30 Minuten durch die Kammer gesaugt wurde. Ein sich anschließender optionaler Waschschrift mit dem gleichen Volumen der aufgetragenen Proteinproben (meist 100 µl) an TBS unterstützte eine vollständige Bindung der Proteinproben an die Membran. Auch diese Flüssigkeit wurde entweder durch Einwirkung der Schwerkraft oder aber mit Hilfe eines *leichten* Vakuums durch die Kammer transferiert. Danach wurden nicht gebundene Proteine von (der Unterseite) der Membran und der Kammer entfernt, indem die Apparatur mit 400 µl TBST unter Zuhilfenahme des Vakuums gewaschen wurde. Die Membran war nun bereit zur weiteren Inkubation mit den Antikörperlösungen.

2.2.2.6.3 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Bevor die Nitrozellulosemembran mit den proteinspezifischen Antikörpern inkubiert werden konnte, mussten unspezifische Proteinbindungsstellen maskiert werden, indem die Membran in 2% (w/v) Milchpulverlösung für 1 Stunde bei RT gelagert wurde. Im Anschluss wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper in 2 ml Antikörperlösung pro Membran ü.N bei 4°C die unter ständiger Bewegung inkubiert. Dazu wurde der Erstantikörper (in variabler Verdünnung, siehe Tabelle 10) in 2%-iger (w/v) Milchpulverlösung verdünnt, die Membran in einer Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Überkopfschüttler fixiert. Die Erstantikörperlösung wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST für je 5 Minuten entfernt und die Membran mit dem Zweitantikörper inkubiert. Dazu wurde die Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten Antikörper, der im Verhältnis von 1:5000 bis 1:10000 mit Blockierungslösung (2% (w/v) Milchpulver) verdünnt worden war, erneut eingeschweißt und bei RT für 1 Stunde unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST wurden die Proteine abschließend durch Chemolumineszenz mit ECL-Lösung (Perbio Science, Bonn) detektiert und die resultierenden Signale auf einem Hyperfilm (GE Healthcare, München) sichtbar gemacht. Je nach transferierter Proteinmenge, sowie Spezifität, Titer und Verdünnung der Primärantikörper betrug die Exposition wenige Sekunden bis zu mehreren Minuten. Der belichtete Film wurde abschließend entwickelt, fixiert und getrocknet, sodass der fertige Film zur Dokumentation und Auswertung eingescannt werden konnte. Sollte die Membran mit weiteren Antikörpern inkubiert werden, so musste diese bis zum *Strippen* auf jeden Fall feucht gehalten werden (beispielsweise in TBST) um einen hohen Hintergrund bei den nachfolgenden Färbungen zu vermeiden.

2.2.2.6.4 Entfernen der Antikörper von Nitrozellulosemembranen

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.)

Wurden Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, so bleiben sie an die Membran gebunden, und können mehrmals nacheinander mit unterschiedlichen Antikörpern markiert werden. Bevor jedoch die Proteine mit einem zweiten Antikörper de-

tektiert werden konnten, musste zunächst der zuvor verwendete Antikörper entfernt werden, um eventuelle Kreuzreaktionen zu minimieren und die nachzuweisenden Proteine wieder frei zu geben. Bei diesem als „*Strippen*“ bezeichneten Vorgang, wurde die Nitrozellulosemembran für 30 Minuten in 50 ml Stripping-Puffer bei 55°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend solange mit H₂O gewaschen, bis kein β-Mercaptoäthanol mehr wahrnehmbar war (Geruchstest). Die Membranen konnten dann wieder geblockt und mit weiteren Primärantikörpern inkubiert werden.

2.2.2.7 Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Der Bakterienstamm BL21gold(DE3)pLysS bietet eine doppelte Kontrolle der Proteinexpression (Sambrook und Russel, 2001): diese Zellen tragen Teile des Genoms von λDE3, einem lysogenen Bakteriophagen. Dadurch wird das T7-RNA-Polymerase-Gen unter die Kontrolle des *lacUV5*-Promotors gestellt, welcher nur in Anwesenheit des Laktose-Analogons IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) aktiv ist. Die Expression der T7-Polymerase wird in Abwesenheit von IPTG dadurch minimiert, indem der Repressor des *lacUV5*-Promotors aktiv ist. Dieser Repressor, kodiert durch das *lacI*-Gen, wird also unter nicht-induzierten Bedingungen exprimiert und unterdrückt somit die Transkription der T7-RNA-Polymerase.

Die basale Transkription der T7-Polymerase wird durch einen zweiten Kontrollmechanismus minimiert: der Bakterienstamm trägt ein zweites Plasmid (pLYS), das für das T7-Lysozym kodiert und konstitutiv gering exprimiert wird. Dieses Enzym inhibiert die T7-RNA-Polymerase und verhindert so eine verfrühte Expression des eingebrachten rekombinanten Gens. Durch die Zugabe von IPTG wird einerseits der *lacUV5*-Promotor stark aktiviert, sodass die T7-RNA-Polymerase überexprimiert wird und deren Hemmung durch Lysozym faktisch aufgehoben wird. Die T7-RNA-Polymerase kann sich nun an den T7-Promotor des Expressionsvektors anlagern, und so das rekombinante Gen transkribieren.

Erfahrungsgemäß unterscheiden sich Expressionsrate und Güte von verschiedenen überexprimierten Proteinen deutlich voneinander. Deshalb wurden einige Tests bezüglich der Expressionsdauer, der Konzentration des Induktors IPTG, des individuellen Klons, sowie der Löslichkeit der exprimierten Proteine in kleinem Maßstab vorgenommen.

2.2.2.7.1 Starterkulturen zur Bestimmung der geeigneten Parameter

Benötigte Lösungen: Puffer für Arbeiten mit Bakterien (Seiten 38 f.), Puffer für die Proteinbiochemie (Seiten 41 ff.) und Puffer für die Affinitätschromatographie (Seite 44)

Von einer frisch ausgestrichenen Kulturschale wurden sechs unterschiedliche Kolonien gepickt und bei 37°C in 4 ml LB-Medium und Ampizillin (100 µg/ml) bei 250 U/Min auf einem Schüttler inkubiert. Sobald die Kulturen trübe zu werden begannen, wurden von repräsentativen Proben 100 µl entnommen und die OD bei 600 nm (OD_{600}) im Spektrophotometer bestimmt. Die Inkubation wurde solange fortgesetzt, bis die OD_{600} jeder Probe einen Wert zwischen 0,6 bis 0,7 erreicht hatte (ggf. wurden die dichten Proben mit LB-Medium/Ampizillin verdünnt). Nun wurden 250 µl der Bakteriensuspension als „minus IPTG-Kontrolle“ entnommen, für 2 Minuten bei 13.000 U/Min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl 1x PBS pro $OD_{600} = 1$ resuspendiert. Abschließend wurde das gleiche Volumen an 2x Lämmli-puffer zugegeben und die Proben bei -20°C aufbewahrt. Die Expression des Proteins wurde nun durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Bakterienkulturen weiter bei 37°C für 3 Stunden unter starkem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut die OD_{600} von 100 µl der jeweiligen Kulturen bestimmt, 250 µl als „plus IPTG-Probe“ entnommen und der Rest der Suspensionen bei 4°C gelagert. 20 µl sämtlicher „minus IPTG- bzw. „plus IPTG-Proben“ wurden nebeneinander auf einem reduzierenden SDS-Gel analysiert. Der Klon mit der besten Expressionsstärke und der geringsten Degradierung wurde für weitere Tests herangezogen.

Um die optimale Konzentration des Induktors IPTG zu ermitteln, wurden 25 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampizillin) mit 50 µl vom Rest des besten Starters angeimpft und wiederum solange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die OD_{600} 0,6 bis 0,7 erreicht hatte. 20 ml der Suspension wurden auf 5 Kulturröhrchen verteilt und die Expression mit unterschiedlichen Konzentrationen des Induktors eingeleitet (0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM und 5 mM IPTG Endkonzentration). Von den verbleibenden 5 ml wurden 500 µl als „minus IPTG-Probe“ herangezogen und wie oben beschrieben verarbeitet. Die Expression wurde nach 3 Stunden beendet und „plus IPTG-Proben“ hergestellt. Die einzelnen Proben wurden auf einem reduzierenden SDS-Gel analysiert.

Die Bestimmung der optimalen Expressionsdauer wurde analog zum oben beschriebenen Test der geeigneten IPTG-Konzentration durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG für 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und über Nacht (18 Stunden). Auch hier wurden die jeweiligen „plus IPTG-“, und „minus IPTG-Proben“ einer reduzierenden SDS-Gelelektrophorese unterzogen.

Um die Löslichkeit der beiden Proteine zu eruieren, wurde wiederum vom optimalen Starterklon unter optimierten Bedingungen (1 mM IPTG und 4 Stunden Expression) 10 ml Kultur angeimpft und das Protein exprimiert. Nach Abschluss der Expression wurden die Bakterienzellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach jedem Schritt der Zellyse bzw. Aufreinigung wurden 2 µl der jeweiligen Suspension entnommen und als Protein-Probe in 60 µl 1x Lämmli-Puffer aufgenommen.

Um die Bakterienzellwand zu zerstören, wurde das Sediment in 1 ml Bakterien-Lysepuffer (mit 200 µg/ml Lysozym) resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis und im Anschluss für 5 Minuten bei 37°C inkubiert („*input*-Probe“).

Danach wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sofort unter leichter Bewegung in einem 37°C Wasserbad wieder erwärmt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt („*freeze/thaw*-Probe“).

Im Anschluss wurde die Suspension mehrmals in einem kühlenden Eisbad solange mit Ultraschall behandelt, bis die Suspension nicht mehr viskös war. Um einer Überhitzung der Lösung vorzubeugen, wurde jeweils nach 10 Sekunden Betrieb eine zehnssekündige Pause eingelegt („*sonication*-Probe“).

Zuletzt wurde die Suspension bei 100.000 g für 30 Minuten bei einer Temperatur von 4°C sedimentiert. Vom Überstand der zentrifugierten Suspension wurden ebenfalls 2 µl entnommen und mit 60 µl 1x Lämmli-Puffer versetzt („*supernatant*-Probe“). Mit einer Pipettenspitze wurde sehr wenig Material des Sediments in 60 µl 1x Lämmli-Puffer gelöst („*pellet*-Probe“).

Sämtliche Proben wurden einer 12%-igen SDS-PAGE unterzogen, die immobilisierten Proteine mit Coomassie-Brilliantblau G-250 gefärbt und analysiert. Die Lokalisierung des rekombinierten Proteins – entweder im Zentrifugierungsüberstand oder im Sediment – gibt Aufschluss über die Löslichkeit des Proteins unter nativen Bedingungen.

2.2.2.7.2 Expressionskultur im präparativen Maßstab

Benötigte Lösungen: Puffer für Arbeiten mit Bakterien (Seiten 38 f.)

Unter den erarbeiteten optimalen Expressionsbedingungen wurden große Proteinmengen hergestellt. Je 50 ml einer Übernachtskultur wurden mit 50 µl des jeweiligen Starters inokuliert. Am folgenden Tag wurden je 1 Liter LB-Medium (100 µg/ml Ampizillin) in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit je 2 ml der Übernachtskulturen angeimpft und bei 37°C und 180 U/Min inkubiert. Sobald die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 bis 0,7 erreicht hatte, wurde die Expression der beiden chimären Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Temperatur für die Inkubationsdauer von 4 Stunden auf 28°C gesenkt, um eine höhere Ausbeute bzw. Güte der exprimierten Proteine zu gewährleisten. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Bakterienkulturen bei 4°C und 4.000 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert. Das Gewicht der Sedimente wurde bestimmt und diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.2.8 Affinitätschromatographie von 6xHis-Proteinen

2.2.2.8.1 Denaturierende Bedingungen

Benötigte Lösungen: Puffer für die Affinitätschromatographie (Seite 44)

Proteine, die von den Bakterien als unlösliche, dicht gepackte Aggregate in zytoplasmatischen Inklusionskörpern abgeschieden werden, lassen sich meist nur unter denaturierenden Bedingungen wieder in Lösung bringen. Um diese zellulären Einschlüssen aufzubrechen und die Proteine zu lösen, bedient man sich chaotropen Salze wie z.B. Guanidinthiocyanat oder Harnstoff in hoher Konzentration.

Dazu wurden die Zellsedimente auf Eis aufgetaut, pro Gramm Sedimentgewicht 5 ml Puffer B (Lysepuffer: 8 M Harnstoff, pH: 8,0) zugegeben und die Suspension bei RT für 1 Stunde unter ständigem Rühren inkubiert. Abschließend wurden die Zelltrümmer durch eine Zentrifugierung bei RT und 10.000 g für 30 Minuten vom klaren Überstand abgetrennt und letzterer bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. 4 ml dieses Überstandes wurden mit 1 ml der resuspendierten äthanolischen Nickel-Agarose-Suspension versetzt und das Gemisch über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Diese Suspension wurde darauf in eine mehrmals mit PBS gewaschene und mit Puffer B äquilibrierte, verschlossene Tropfsäule gegeben.

Nach Entfernen des Verschlusses setzte sich die Agarose ab und der überschüssige Puffer wurde als austretendes Eluat („*Flow Trough*“) gesammelt. Im Anschluss wurden zwei Mal je 4 ml Puffer C (Waschpuffer: 8 M Harnstoff, pH: 6,3) auf die Säule gegeben und die jeweiligen Eluate aufgefangen. Durch Zugabe von je vier Mal 0,5 ml Puffer D (Elutionspuffer 1: 8 M Harnstoff, pH: 5,9), gefolgt von je vier Mal 0,5 ml Puffer E (Elutionspuffer 2: 8 M Harnstoff, pH: 4,5) wurden die gebundenen Proteine von der Säule gelöst und ausgewaschen. Die einzelnen Eluate wurden aufgefangen und bei -20°C verwahrt. Von sämtlichen Fraktionen wurden je 2 µl entnommen, mit 60 µl 1x Lämmli-puffer versetzt und auf einer 12%-igen SDS-PAGE untersucht. Die Fraktionen mit der stärksten Proteinkonzentration wurden vereinigt und die gewonnene Gesamtproteinmenge nach Bradford bestimmt.

2.2.2.8.2 Native Bedingungen

Benötigte Lösungen: Puffer für die Affinitätschromatographie (Seite 44)

In manchen Fällen bleiben überexprimierte Proteine in löslicher Form und können dementsprechend unter nativen Bedingungen gereinigt werden, da sie auch unter physiologischen Pufferbedingungen an die Affinitäts-Matrix binden können. Über ansteigende Konzentrationen des Histidin-Analogons Imidazol in den verwendeten Waschpuffern werden unerwünschte Proteine von der Matrix verdrängt, das überexprimierte Hexahistidin-Protein bleibt jedoch gebunden. Eine hohe Konzentration von Imidazol im Elutionspuffer bewirkt schließlich über eine Konkurrenz das Ablösen des rekombinanten Proteins.

Die Zellsedimente wurden auf Eis aufgetaut, pro Gramm Sedimentgewicht 5 ml Lysepuffer (10 mM Imidazol) und 1 mg/ml Lysozym zugegeben und die Suspension auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Um die Zelllyse zu unterstützen, wurde die Suspension danach mehrere Male auf Eis kurz mit Ultraschall behandelt. Abschließend wurden die Zelltrümmer durch eine Zentrifugierung bei 4°C und 10.000 g für 30 Minuten vom klaren Überstand abgetrennt und letzterer bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. 4 ml dieses Überstandes wurden mit 1 ml der resuspendierten äthanolischen Nickel-Agarose-Suspension versetzt und das Gemisch für eine Stunde bei 4°C unter ständiger Bewegung auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Diese Suspension wurde darauf in eine mehrmals mit PBS gewaschene und mit Lysepuffer äquilibrierte, verschlossene

Tropfsäule gegeben. Nach Entfernen des Verschlusses setzte sich die Agarose ab und der überschüssige Puffer wurde als austretendes Eluat („*flow trough*“) gesammelt. Im Anschluss wurden zwei Mal je 4 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol) auf die Säule pipettiert und die jeweiligen Eluate aufgefangen. Durch Zugabe von vier Mal je 0,5 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol) wurden die gebundenen Proteine von der Säule gelöst und ausgewaschen. Die einzelnen Eluate wurden aufgefangen und bei -20°C verwahrt. Von sämtlichen Fraktionen wurden je 2 µl entnommen, mit 60 µl 1x denaturierenden Protein-Probenpuffer versetzt und auf einer 12%-igen SDS-PAGE untersucht. Die Fraktionen mit der stärksten Proteinkonzentration wurden vereinigt und die gewonnene Gesamtproteinmenge nach Bradford bestimmt.

2.2.2.9 Umpuffern von Proteinen durch Dialyse oder Ultrafiltration

Benötigte Lösungen: Puffer für die Proteinbiochemie (Seite 41)

Da die hohe Harnstoffkonzentration, bzw. die hohe Konzentration von Imidazol im Elutionspuffer eine direkte Injektion der Proteinproben verbot, wurden diese Substanzen über Dialyse entfernt. Dazu wurden 2 ml vereinigt Eluat in einem Spectra/Por[®] Float-A-Lyzer[®] System (MWCO 8.000) der Firma Carl Roth für jeweils 3 Stunden bei 4°C und unter ständigem Rühren gegen 4 M Harnstoff in 1x PBS, 2 M Harnstoff in 1x PBS, 1 M Harnstoff in 1x PBS und über Nacht gegen 1x PBS dialysiert.

Als alternative Methode wurden die Eluate beider Aufreinigungsmethoden einer Ultrafiltration über das Amicon[®] Ultra-4 System der Firma Millipore unterzogen: nach Zentrifugieren von 2 ml Proteinlösung bei 4.000 U/Min und RT für ca. 5 Minuten hatte sich das Volumen des Retentats ungefähr halbiert, das Filtrat wurde zu analytischen Zwecken verwahrt. Nun wurde das Volumen des Retentats mit 1x PBS wieder auf 2 ml angehoben und die Amiconsäule erneut zentrifugiert. Insgesamt wurde der Vorgang drei Mal wiederholt. Nach Abschluss der Ultrafiltration ist die theoretische Harnstoffkonzentration auf 0,5 M gesenkt und die Lösung auf 0,5 ml eingengt worden.

Die Proteinkonzentration dieser injektionsfertigen Antigenlösungen wurde nach Bradford bestimmt, sowie Gelproben der gereinigten Antigene und Eluate über eine SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden 10 µl des Retentats mit 20 µl PBS und 30 µl 2x denatu-

rierendem Protein-Probenpuffer, sowie 20 µl des Eluats mit 20 µl 2x denaturierendem Protein-Probenpuffer versetzt. Je 10 µl dieser Proben wurden auf das SDS-Polyacrylamidgel geladen.

2.2.3 Zellkulturtechniken

2.2.3.1 Präparation und Kultur embryonaler Fibroblasten (*Feeder*)

Murine Embryonen vom Embryonaltag E12,5 wurden aus dem Uterus herauspräpariert und in PBS gewaschen. Sowohl das Abtrennen des Kopfs und der Extremitäten vom Rumpf, als auch das Entfernen von Leber, Herz und anderen bereits differenzierten inneren Organen dient dazu, die Primärzellkultur mit einem möglichst großen Anteil embryonaler Fibroblasten anzureichern und andere bereits differenzierte Zelltypen nach Möglichkeit auszuschließen. Die verbleibenden Gewebe wurden in 2 ml PBS mit Hilfe einer Schere zerkleinert, bis keine größeren Gewebestücke mehr zu erkennen waren. 20 ml DMEM + 10% (v/v) FCS sowie Penicillin/Streptomycin (1%) wurden hinzugefügt und die Zellsuspension in einer 10 cm Kulturschale ausgesät. Im Inkubator setzten sich die Zellen schnell am Boden ab und begannen sich zu teilen, sodass am dritten Tag nach der Isolation die Kulturschale konfluent bewachsen war. Die Kultur wurde weiter expandiert und die Zellen, sobald die gewünschte Zellzahl erreicht war (nach maximal drei bis fünf Passagen), abgelöst und mit einer Dosis von 3000 rad bestrahlt. Diese immortalisierten Zellen wurden im Anschluss in geeigneten Volumina mit Einfriermedium bei -80°C konserviert.

2.2.3.2 Expansion embryonaler Stammzellen

Die ES-Zellen der Linie W9.5 (Szabo und Mann, 1994) wurden in DMEM + 10% (v/v) FCS mit 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren, 5 ml β-Mercaptoäthanol und 107 Einheiten Lif ESGRO auf STO-Feeder-Zellen kultiviert und expandiert. Die STO-Feeder-Zellen waren jeweils vor dem Zufügen der ES-Zellen mittels γ-Strahlung (3000 rad) immortalisiert worden. Um die spontane Differenzierung der ES-Zellen zu vermeiden, wurde das Medium täglich gewechselt.

2.2.3.3 Elektroporation embryonaler Stammzellen

Das Medium von 10 cm Schalen mit nahezu konfluent gewachsenen ES-Zellen wurde abgesaugt und die abgeschwommenen Zellen durch Zentrifugieren bei 1.000 U/Min für 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit Trypsin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Zellrasen wurde drei Mal mit je 3 ml PBS (37°C) gewaschen, die so abgelösten Zellen pelletiert und ebenso mit Trypsin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Sämtliche Zellen wurden vereinigt und zum Stopp der Trypsinreaktion in 10 ml DMEM (37°C) aufgenommen. Diese Suspension wurde durch Zentrifugieren bei 1.000 U/Min für 10 Minuten sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml PBS (37°C) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugierung wurde das Sediment in einem geeigneten Volumen (800 µl) PBS aufgenommen, sodass eine Zellzahl von etwa 1×10^7 erreicht wurde. Zellverklumpungen wurden vorsichtig aufgelöst, 60 µg DNA in einem Volumen von 100 µl PBS zugegeben, mit den Zellen vermischt und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Die Transfektion selbst erfolgte in einer sterilen Elektroporationsküvette. Das Elektroporationsgerät wurde dazu auf „*high capacity*“, 240 V, 500 µF eingestellt und die Zeitkonstante des Elektroporationsvorgangs notiert. Hierbei deuten Werte von ca. 5 ms auf eine erfolgreiche Elektroporation hin. Nach der Transfektion ruhten die Zellen für ca. 5 Minuten und wurden danach auf vier 10 cm Schalen ausgesät. 24 Stunden nach der Elektroporation wurden die Zellen selektiert, indem das Antibiotikum G418 (Neomycin) in einer Konzentration von 300 ng/ml zugesetzt wurde. Diesen Selektionsdruck konnten allein diejenigen ES-Zellen tolerieren, die eine stabile Integration der DNA ins Genom aufwiesen. Das Medium wurde täglich erneuert, bis die embryonalen Stammzellklone für den Isolationsvorgang bereit waren.

2.2.3.4 Isolierung erfolgreich transfizierter ES-Zellklone

Die Vereinzelung der individuellen ES-Kolonien erfolgte jeweils auf fünf Replikplatten im 96-Loch-Format. Jeweils drei dieser 96-Loch-Platten wurden vor dem Transfer der ES-Zellkolonien mit Feeder-Zellen eingesät, zwei der Platten wurden mit Gelatine zum besseren Anheften der Kolonien beschichtet. Nachdem distinkte Einzelkolonien auf den vier 10 cm Zellkulturschalen gut zu erkennen waren, wurden diese Schalen mit

PBS gewaschen und etwa 1 ml PBS zupipettiert. Unter dem Binokular wurden nun Einzelkolonien in eine weitere 96-Loch-Platte transferiert, welche 10 μ l PBS pro Vertiefung enthielt. Wenn alle 96 Löcher dieser Platte Einzelkolonien enthielten, wurde in jede Vertiefung 10 μ l Trypsin pipettiert, die Kolonien vereinzelt und durch Zugabe von 80 μ l Zellkulturmedium die Wirkung des Trypsins inaktiviert. Die Zellklone wurden nun sieben Tage, unter täglichem Wechsel des Zellkulturmediums expandiert. Anschließend wurden die vereinzelt Klone auf die vorher beschriebenen fünf Replikplatten verteilt und dort jeweils unter täglichem Mediumwechsel propagiert. Bei adäquater Zellkonfluenz wurden jeweils zwei ES/Feeder-Kokulturplatten mit PBS gewaschen, mit 10% DMSO in FCS-Einfriermedium versetzt, mit Mineralöl überschichtet und bei -80°C gelagert. Die Platten, in denen die ES-Zellen auf Gelatine expandiert worden waren, wurden für die DNA-Gewinnung ebenfalls mit PBS gewaschen, dieses entfernt und die Platten bei -20°C bis zur DNA-Isolation (siehe 2.2.1.18.2) eingefroren. Waren einzelne Kandidatenklone per Southern-Blot Analysen (siehe 2.2.1.19) ermittelt worden, so wurden die entsprechenden 96-Loch-Platten aufgetaut und die passenden Klone expandiert.

2.2.3.5 Kultivierung von Zellkultur-Zellen

Die verwendeten epithelialen Zelllinien (siehe Tabelle 13) wurden für optimales Wachstum in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 in Zellkulturmedium (DMEM + 10% (v/v) FCS) kultiviert. Die hohe Teilungsrate dieser Zellen erforderte eine mehrmalige wöchentliche Passage, um eine optimale Konfluenz zu erzielen. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt, die Zellen in 37°C warmem EDTA (0,02% (w/v); in PBS) gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Trypsinlösung (0,25% (v/v); in PBS) von der Oberfläche der Zellkulturschalen abgelöst. Diese Zellsuspension wurde in 5 bis 10 ml auf 37°C temperiertes Zellkulturmedium aufgenommen, durch Auf- und Abpipetieren vereinzelt und nach einer dem Zelltyp entsprechenden Verdünnung in neue Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellkulturschalen wurden dabei leicht geschwenkt, wobei sich die Zellen gleichmäßig verteilten. Anschließend wurden die Schalen entsprechend ihres Durchmessers auf 10 ml (10 cm Schale bzw. 5 ml (3,3 cm Schale bzw. Glasbodenschälchen) mit Zellkulturmedium (37°C) aufgefüllt und bis zur nächsten Passage bzw. bis zur Verwendung der Zellen in einem Brutschrank inkubiert.

2.2.3.6 Einfrieren von Zellkultur-Zellen

Um eine Überalterung der Zelllinien zu verhindern und um etwaigen Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen vorzubeugen, wurden die Zellen regelmäßig eingefroren und in flüssigem Stickstoff (-196°C) konserviert. Sobald die entsprechende Kultur eine Dichte von ca. 90% erreicht hatte, wurden die Zellen mit einer EDTA-Lösung gewaschen und mit einer 0,25%-igen (v/v) Trypsinlösung von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst. Nach dem Abspülen der Zellen mit 4 ml 37°C warmem Zellkulturmedium wurden diese vorsichtig vereinzelt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1.000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 1,5 ml Einfriermedium (DMEM + 10% (v/v) FCS + 10% (v/v) DMSO) aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension sofort in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Kryocontainer (Nunc, Wiesbaden) bei einer Temperatur von -80°C eingefroren. Der Vorgang wurde am folgenden Tage abgeschossen, indem die Kryoröhrchen in einem Stickstofftank eingelagert wurden.

2.2.3.7 Auftauen von Zellkultur-Zellen

Je nach Bedarf wurden die kryokonservierten Zellen wieder aufgetaut und erneut in Kultur genommen. Dazu wurden die Kryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen, um einer Kontamination mit Keimen vorzubeugen mit 70%-igem (v/v) Äthanol gesäubert und unter leichtem Schwenken in einem auf 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut. Um eine Schädigung der Zellen durch das bei RT toxisch wirkende DMSO (ein Bestandteil des Einfriermediums) zu minimieren, wurden die weiteren Schritte zügig durchgeführt. Der Inhalt der Kryoröhrchen wurde in Zentrifugengefäße überführt, welche bereits mit 8 ml Wachstumsmedium (DMEM + 10% FCS) befüllt worden waren und die Zellen darin für 5 bis 10 Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in einer Zellkulturschale mit 5 ml Medium ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Kulturen auf eventuelle Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen überprüft.

2.2.3.8 Vorbereitung von Glasplättchen für die Zellkultur

Um die Handhabung bei mikroskopischen Untersuchungen zu erleichtern, wurden die Zellen entweder auf Glasbodenschälchen (MatTek) für die Lebendzellmikroskopie oder auf Glasplättchen kultiviert. Die verwendeten Glasplättchen wurden dazu über Nacht in absolutem Äthanol gelagert, mit faserfreien Papiertüchern getrocknet, für 2 Stunden bei 200°C im Trockenschrank sterilisiert und anschließend steril gelagert. Bei Bedarf wurden die Glasplättchen steril in die entsprechenden Zellkulturschalen überführt und die Versuchszellen, welche zuvor mit Hilfe von 0,25%-iger (v/v) Trypsinlösung vereinzelt und in Zellkulturmedium verdünnt worden waren, darauf ausgesät. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bis zur gewünschten Dichte kultiviert und die bewachsenen Glasplättchen für die entsprechenden Versuche einzeln entnommen und verarbeitet.

2.2.3.9 Lipotransfektion von Zellkultur-Zellen

Das Einbringen fremder (Plasmid-)DNA in eukaryotische Zellen wird im Allgemeinen als Transfektion bezeichnet. Es existieren verschiedene chemische (Kalziumphosphat, Lipofektion) und physikalische Methoden zur Transfektion (Mikroinjektion, Elektroporation von DNA), die je nach Verträglichkeit bei unterschiedlichen Zelltypen zum Einsatz kommen.

Bei der Lipofektion werden kationische Lipide verwendet, um die Plasmid-DNA zu binden und in die Zelle einzuschleusen, da die negativ geladene Plasmid-DNA über elektrostatische Wechselwirkungen an die kationischen Lipide bindet und ein DNA-Liposomen-Komplex gebildet wird. Dieser Komplex kann mit der Zellmembran fusionieren, wodurch letztendlich die gebundene DNA in die Zelle gelangt. In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen, Karlsruhe) für Lipotransfektionen verwendet. Die Zielzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70 bis 90% in 35 mm Zellkulturschalen kultiviert. Das Transfektionsreagenz wurde in zwei Reaktionsgefäßen vorbereitet. 4 µg der Plasmid-DNA in wässriger Lösung wurden bis zu einem Endvolumen von 250 µl mit OPTI-MEM (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) im ersten Reagenzgefäß aufgefüllt. Im zweiten Gefäß wurden 3 bis 4 µl Lipofectamine 2000 vorgelegt und ebenfalls soviel OPTI-MEM zugegeben, bis das Endvolumen

250 µl betrug. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde das DNA-OPTIMEM-Gemisch in das zweite Reaktionsgefäß überführt und die Suspension für 20 Minuten bei RT inkubiert, wobei sich die sich DNA-Liposomen-Komplexe bildeten. Abschließend wurde das fertige Transfektionsreagenz tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert, sodass sie am folgenden Tag für Versuche verwendet werden konnten.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Fixieren von Zellkultur-Zellen und Geweben

Vor der Inkubation mit Antikörpern ist eine Fixierung der entsprechenden Materialien erforderlich, um die Zellen einerseits für die Antikörper zugänglich zu machen und andererseits die Antigene über eine Vernetzung der Proteine zu konservieren. Dabei kam eine der beiden folgenden Methoden zum Einsatz.

2.2.4.1.1 Methanol-Aceton-Fixierung

Fixierungen mit Methanol oder kombinierten Lösungsmittelgemischen (Methanol, Äthanol, Aceton oder Eisessig) wirken nicht quervernetzend auf Proteine (wie die Formaldehyd und Glutaraldehyd-Fixierungsmethoden) sondern präzipitierend bzw. entwässernd. Generell wird eine z.T. starke Extraktion von Lipiden und Proteinen des Zytoplasmas beobachtet, weshalb die Methanol-Fixierung für die Darstellung von Membranständigen Proteinen zweckmäßig ist, bei zytoplasmatischen Epitopen jedoch unter Umständen weniger geeignet sein kann. Die Strukturhaltung der Zellen ist nicht immer optimal.

Hatten die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht, so wurden die bewachsenen Glasplättchen aus den Zellkulturschalen entnommen und senkrecht in einem Deckglasständer plaziert. Danach wurden sie kurz in auf 37°C temperiertes 1x PBS eingetaucht, sofort für 5 Minuten in eiskaltem absoluten Methanol (-20°C) inkubiert und abschließend für 10 Sekunden in eiskaltem (-20°C) Aceton fixiert. Die so präparierten Zellen wurden meist sofort nach vollständigem Verdampfen des Acetons zu Antikörpermarkierungs-

Reaktionen oder zur Fluoreszenzmikroskopie herangezogen, konnten aber auch bis zu 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.4.1.2 Paraformaldehyd-Fixierung

Die Formaldehyd-Fixierung sichert im Vergleich zur Methanol/Aceton-Fixierung meist eine bessere Strukturhaltung der Zellen, allerdings muss häufig ein Verlust an der Zugänglichkeit der Antigene (Antigenmaskierung durch starke Proteinvernetzung) in Kauf genommen werden. Je nach Anzahl der zu fixierenden Deckgläschen wurden diese in unterschiedlich große Zellkulturschalen überführt oder verblieben für die Dauer des Fixierungsvorgangs in ihrer angestammten Schale, bzw. wurden auf mit Parafilm überspannten Objektträgern in einer feuchten Kammer platziert. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Plättchen kurz mit auf 37°C temperiertes 1x PBS gewaschen, das sofort wieder abgesaugt wurde. Nun erfolgte die eigentliche Fixierung mit 4%-igem PFA für eine Dauer von 10 Minuten bei 4°C. Anschließend wurde das PFA entfernt und die Glasplättchen für 15 Minuten bei 4°C mit 1x PBS benetzt. Um die Zellmembran für die Antikörper durchlässiger zu machen, wurden die Zellen mit einer 0,01%-igen Triton-X-100 (v/v) oder 0,01%-igen (w/v) Digitonin-Lösung überschichtet. Nach dieser Detergenz-Behandlung wurden die Zellen erneut für 10 bis 15 Minuten mit 4°C kaltem 1x PBS gewaschen. Mit Hilfe der anschließenden BSA-Inkubation wurden unspezifische Antigene geblockt, um den Hintergrund der Immunfluoreszenz-Reaktion zu minimieren. Dazu wurden die Deckgläschen für 10 bis 15 Minuten mit 5%-igem (w/v) BSA bei RT inkubiert und letztendlich der Fixierungsvorgang mit einem PBS-Waschschritt (4°C) abgeschlossen. Die Zellen konnten nun mit dem Erstantikörper markiert werden.

2.2.4.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Detektion von Proteinen in Zellkulturzellen und Geweben wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung verwendet. Dabei wurde ein spezifischer Antikörper an das Antigen gebunden und mit einem farbstoffmarkierten Zweitantikörper visualisiert. Es kamen dabei verschiedene gängige Farbsysteme zum Einsatz:

Tabelle 50: Fluorochrome

Bezeichnung	Fluorochrom	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid	340 nm	461 nm (violett)
Cy2	Carbocyanin 2	492 nm	508 nm (grün)
Cy3	Indocarbocyanin/ Carbocyanin 3	553 nm	575 nm (rot)
TxR	Sulforhodamin 101	589 nm	615 nm (rot)
Cy5	Carbocyanin 5	650 nm	674 nm (rot)
eGFP	Tripeptid	496 nm	509 nm (grün)
mRFP	Tripeptid	584 nm	607 nm (rot)

2.2.4.2.1 Zellkultur-Zellen

Benötigte Lösungen: Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz (Seite 44)

Die auf Glasplättchen bis zur Konfluenz kultivierten Zellen wurden mit den in Kapitel 2.2.4.1 beschriebenen Methoden fixiert und in einer feuchten Kammer gelagert. Um eventuelle Präzipitate des Erstantikörpers zu entfernen, wurde dieser kurz in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und im Anschluss – je nach Antikörper unterschiedlich stark – mit 1x PBS verdünnt (siehe Tabelle 10). Mit dieser verdünnten Antikörperlösung wurden die fixierten Zellen vorsichtig überschichtet (30 bis 50 µl/Deckglas) und für 60 Minuten bei RT inkubiert. Zum Entfernen des Erst-Antikörpers wurden die Glasplättchen senkrecht in einen Deckglasständer gestellt und für 15 Minuten in 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Plättchen wieder in die feuchte Kammer überführt, mit der entsprechenden, in 1x PBS verdünnten Sekundär-Antikörperlösung (siehe Tabelle 11) bedeckt (30 bis 50 µl/Deckglas) und für eine Stunde bei RT an einem dunklen Ort inkubiert. Um nicht gebundene Zweit-Antikörper zu entfernen, wurde erneut für 15 Minuten in 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Glasplättchen kurz mit H₂O_{dd} gespült, um der Entstehung von Salzkristallen durch das trocknende PBS vorzubeugen und mit Elvanol auf Objektträgern fixiert. Dazu wurden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt, auf den zuvor ein Tropfen Elvanol aufgebracht worden war. Der Objektträger wurde zum Aushärten des Elvanols über Nacht bei 4°C gelagert. Diese Substanz dient als Elektronendonator zur Konservierung der Fluoreszenzmarkierung und zur Fixierung der Glasplättchen auf dem Objektträger. Wenn eine Markierung der Zellkerne erwünscht war, wurde dem Elvanol der Farbstoff DAPI bis zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt.

2.2.4.2.2 Gewebsschnitte

Benötigte Lösungen: Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz (Seite 44)

Die frisch entnommenen Gewebeproben von Herz, Leber, Jejunum, Ileum und Kolon wurden entweder perfusions- oder immersionsfixiert. Dabei kamen unterschiedliche Fixative zum Einsatz, die sich in ihrer Zusammensetzung und ihren fixierenden Eigenschaften unterscheiden: PLP (Poly-L-Lysin-Perjodat, 4%-iges (w/v) Paraformaldehyd und AFA (Äthanol, Essigsäure, 2%-iges (w/v) Paraformaldehyd). Die Gewebefragmente wurden für eine Dauer von 2 bis 4 Stunden im Fixativ belassen. Danach wurden 7 µm-Schnitte der Gewebe im Kryostat angefertigt und auf Super-Frost Ultra Plus Objektträgern abgelegt. Nach der Fixierung waren die Epitope in den Geweben nicht mehr für die entsprechenden Antikörper erreichbar, die Antigene mussten demaskiert werden. Nachdem die Schnitte für ca. 2 Stunden bei RT getrocknet worden waren, wurden die Objektträger zunächst für 10 Minuten in einer 0,1 M Tris-HCl Lösung (pH 7,5) inkubiert. Danach erfolgte die Antigendemaskierung bei einer vierzigminütigen Inkubation in Demaskierungspuffern bei 96°C im Wasserbad. Im Falle der Darm- bzw. Herzschnitte kam dazu ein Zitratpuffer (pH 6,0), bei Leberschnitten ein Tris-Base-Puffer (pH 10,5) zum Einsatz. Die Schnitte wurden nun auf 35°C abgekühlt und drei Mal für je 10 Minuten in einer 0,1 M Tris-HCl Lösung (pH 7,5) inkubiert. Nun waren die Gewebeschnitte für die Antikörperfärbung bereit.

Die Erstantikörper wurden in einer Lösung aus 0,3% (v/v) Triton-X100 und 5% (v/v) Eselserum auf die End-Konzentrationen verdünnt und die Schnitte über Nacht bei 4°C mit den Antikörperlösungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Inkubation um eine weitere Stunde bei RT verlängert und danach die Erstantikörper durch dreimaliges je zehnminütiges Waschen mit einer 0,1 M Tris-HCl Lösung (pH 7,5) entfernt. Als Zweitantikörper kamen entsprechend verdünnte Farbstoff-Konjugate zum Einsatz (Tabelle 11). Um die Hintergrundfluoreszenz durch die Zweitantikörper auf den Schnitten zu minimieren, wurden die Objektträger wiederum drei Mal in einer Lösung aus 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und zum Abschluss mit einem Deckglas und einer Elvanol-Lösung abgedeckt.

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Sowohl die zuvor mit spezifischen Antikörpern inkubierten Präparate, als auch Zellkulturzellen, die transient fluoreszierende Proteine exprimierten, wurden mit Hilfe eines inversen Olympus IX 70 Mikroskops analysiert. Die erforderlichen Exzitationswellenlängen (vergleiche Tabelle 50) wurden durch einen „Polychrome IV“ Monochromator (TILL-Photonics, Gräfelfing) erzeugt. Die generierten Fluoreszenzbilder wurden durch eine „*Slow-Scan CCD*“ Kamera (IMAGO, TILL-Photonics, Gräfelfing) aufgenommen und dokumentiert. Das Mikroskop und die Kamera wurden durch die Software TILLVISION (TILL-Photonics) angesteuert.

2.2.5.2 Laserscanning-Mikroskopie

Um besonders hochauflösende Aufnahmen fluoreszenzmarkierter Proteine zu erhalten, bzw. eine besonders scharfe Ebenenabbildung zu erreichen, wurden die Präparate zum Teil mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Leica Microsystems analysiert. Dieses inverse DMI 6000 CS Trino Mikroskop ist mit einem SP5 Punkt-Scanning-System ausgerüstet. Zur Anregung der Chromophore in den Präparaten standen vier Laser zur Verfügung: ein 405 Diodenlaser, ein Argonlaser, ein DPSS 561 Laser und ein HeNe633 Laser, wobei in dieser Arbeit ausschließlich der 405 Diodenlaser und der Argonlaser zum Einsatz kamen. Die Fluoreszenzbilder wurden schließlich durch drei Konfokal-Detektoren aufgezeichnet und wurden durch die Software LAS-AF dokumentiert sowie analysiert. Sämtliche Funktionen des Mikroskops sind automatisiert und können ebenfalls über das Leica LAS-AF Programm gesteuert werden.

2.2.6 Tierexperimentelle Techniken

2.2.6.1 Haltung und Zucht von Labormäusen

Dem Futter der Tiere wurde Fenbendazol (100 mg/kg) zugesetzt, um einen akuten Oxyuren-Befall zu therapieren. Sämtliche Verpaarungen, die zur Etablierung der transgenen Mauslinien notwendig waren, wurden im Tierstall des Instituts für Anatomie und

Zellbiologie durchgeführt. Um die Zahl der Nachkommen zu maximieren, erfolgten die Verpaarungen der Tiere in den meisten Fällen polygam, wobei ein männliches Tier mit maximal drei Weibchen gleichzeitig gehalten wurde. Eine Überprüfung auf Vaginalplaques erfolgte in der Regel nicht, insofern die Verpaarung in einer Zeit von drei Wochen erfolgreich war. Dieser Zeitraum entspricht in etwa zwei Zyklen der weiblichen Maus und dem Beginn der sich anschließenden Tragezeit. Die Verpaarungskäfige wurden mindestens zweimal in der Woche kontrolliert und eventuell schwangere Weibchen (ab E12 anhand der spezifischen Wölbung des Bauches sichtbar) vereinzelt, um den Stress der betroffenen Tiere zu senken, aber auch um die hormonelle Unterdrückung der nicht schwangeren Tiere durch schwangere Mäuse innerhalb desselben Käfigs zu vermeiden. Die Jungtiere wurden nach ca. 20 bis 30 Tagen abgesetzt und entweder sofort oder nach weiteren 10 bis 14 Tagen mit einer durchnummerierten Ohrmarkierung aus Messing (Hauptner & Herberholz) nummeriert und nach der Entnahme einer ca. 3 mm langen Schwanzbiopsie per PCR genotypisiert. Die Muttertiere wurden für mindestens 14 Tage keiner weiteren Verpaarung zugeführt, um eine möglichst vollständige Regeneration des Uterus zu gewährleisten. Dieses Prozedere erhöhte nachweislich die Nachkommenzahl und sorgte insofern für eine schnelle Etablierung der Mauslinien.

Eine besondere Verpaarungsstrategie wurde bei den Kreuzungen der männlichen Chimären mit wildtypischen Weibchen verfolgt: um die Anzahl der Nachkommen zu maximieren, wurden hierbei jeweils zwei weibliche Tiere des Stammes C57Bl/6 mit einer Chimäre gehalten und über einen Zeitraum von vier Monaten täglich um 9:00 Uhr auf Vaginalplaques überprüft. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde das weibliche Tier in einen Sammelkäfig mit bis zu zehn Weibchen derselben Chimäre überführt und dort bis zur tatsächlichen Schwangerschaft gehalten. Auch hierbei wurde auf eine Abkuglung des Bauchraumes der weiblichen Mäuse geachtet und diese positiven Kandidaten einzeln gehalten. Waren Vaginalplaque-positive Weibchen nach Ablauf von zwei Wochen im Sammelkäfig noch nicht schwanger, so wurden diese wieder der Verpaarung zugeführt. Die maximale Verweildauer eines Weibchens bei einer Chimäre betrug 14 Tage. Wenn es innerhalb dieses Zeitraumes weder einen Vaginalplaque trug noch nach Ablauf dieses Zeitraumes schwanger war, so wurde es gegen ein anderes Tier ausgetauscht und für weitere 14 Tage in einem Sammelkäfig beobachtet. War ein solches Tier tatsächlich nicht schwanger geworden, so wurde es wieder der Verpaarung zugeführt. Nach einer Dauer von 4 Monaten wurde die Mauskolonie verjüngt, um der sich

abzeichnenden schlechter werdenden Befruchtungsrate und Nachkommenzahl entgegen zu wirken.

Sollte eine größere Anzahl an Tieren getötet werden, so wurden die Mäuse durch sehr langsames Einströmen von CO₂ in den entsprechenden Käfig zunächst betäubt. Sie verblieben für mindesten fünf Minuten im CO₂-Bad, jedoch trat der Tod mit dem Aussetzen von Atmung und Herzschlag in der Regel bereits wenige Sekunden nach Beginn der Betäubungsphase ein. Die Euthanasierung einzelner Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation.

2.2.6.2 Blastozysteninjektion von embryonalen Stammzellen

Die Vorbereitung von Mäusen und Gewinnung von Blastozysten sowie die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten von Donor-Tieren und Implantation von 15 Blastozysten in scheinchwangere Leihmütter wurde im Labor für Molekulare Mausgenetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz freundlicherweise von Herrn Dr. Eshkind durchgeführt.

2.2.6.3 Immunisierung von Kaninchen

Für jede Immunisierung wurden 200 µg der jeweiligen Antigene mit 1x PBS auf ein Volumen von 1,2 ml verdünnt und 1,2 ml VFA (Grundimmunisierung), bzw. 1,2 ml UFA (Auffrischen der Immunisierung) zugegeben. Um das Protein-, PBS- und Adjuvanz-Gemisch zu homogenisieren, wurde die Flüssigkeit mit einem elektrischen Homogenisator für ca. 3 bis 5 Minuten auf Eis solange gemischt, bis die Flüssigkeit eine mayonnaiseartige Konsistenz erreicht hatte und anschließend je 1 ml des Gemischs unter Vermeidung von Lufteinschlüssen in zwei 1 ml Spritzen aufgezogen.

Vor der Grundimmunisierung hatten die Tierpfleger 4 ml Blut aus der Ohrtrandvene eines jeden Tieres gewonnen, um das Präimmunserum zu gewinnen. Ein annähernd quadratisches, ca. 50 cm² messendes Areal auf dem Rücken der Tiere war von den Tierpflegern bereits rasiert worden, sodass ca. je 200 µl des Antigen-Adjuvanz-Gemisches an fünf Stellen subkutan injiziert werden konnte. 28 Tage nach der Grundimmunisierung wurde die Immunantwort der Tiere mit einem Gemisch aus Antigen und UFA ana-

log zur Grundimmunisierung aufgefrischt und 14 Tage später wiederum 4 ml Blut gewonnen um die gewonnenen Seren per Dot-Blot Analyse (siehe 2.2.2.6.2) auf erste Dsg2-Antikörper zu testen. Im Abstand von je 28 Tagen wurde noch zwei Mal Blut zur Titerbestimmung entnommen und jeweils 14 Tage darauf mit Antigen und UFA immunisiert. Das terminale Entbluten wurde von den Mitarbeitern der Zentralen Versuchstiereinrichtung 14 Tage nach der dritten Auffrischung durchgeführt. Dazu wurden zunächst wiederum 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und die Tiere im Anschluss unter Betäubung entblutet. Insgesamt konnten auf diese Weise insgesamt ca. 80 ml Blut pro Tier gewonnen werden.

2.2.6.4 Aufarbeitung von Antiseren

Sämtliche Blutproben für die Titerbestimmung der Seren wurden für 2 Stunden bei RT gelagert, um das Blut koagulieren zu lassen. Daraufhin wurde das Serum zunächst möglichst quantitativ abgenommen und der Blutkuchen in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 3.000 U/Min und RT schonend sedimentiert. Der Serumüberstand wurde mit dem bereits gewonnenen Serum vereinigt und der Vorgang solange wiederholt, bis keine weitere Flüssigkeit mehr aus dem Blutkuchen gepresst werden konnte. Eine leichte Rotfärbung der Flüssigkeit durch geplatze Erythrozyten beeinträchtigt die Wirkung des Serums nicht. Die Seren wurden mit 0,05% Natriumacid (Endkonzentration (w/v)) versetzt, um einer Kontamination durch Mikroorganismen vorzubeugen. 200 µl Aliquots der jeweiligen Präimmun- bzw. Testseren und 2 ml Aliquots der finalen Seren wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.6.5 Induktion der Cre-Rekombinase über externe Induktoren

2.2.6.5.1 Subkutane Injektion von Tamoxifen

Tamoxifen wird als lipophile Substanz mit Fetten versetzt, um vom Empfängertier möglichst quantitativ aufgenommen zu werden. Zur Herstellung der Injektionslösung für ein Tier und einen Induktionsversuch von insgesamt fünf Injektionen wurden 6 mg Tamoxifen in 120 µl steril filtriertem Äthanol unter leichter Erwärmung auf 37°C in Lösung

gebracht (50 mg/ml) und dieses Gemisch mit 480 µl steril filtriertem (Speise-) Sonnenblumenöl versetzt. Unmittelbar vor der Injektion wurden die zwei Phasen der Emulsion mit Hilfe eines Ultraschallgerätes vermischt und 100 µl der fertigen Emulsion (1 mg Tamoxifen) in den dritten oder vierten Quadranten der Bauchhöhle subkutan injiziert. Aufgrund der hohen Viskosität der Flüssigkeit wurde auf eine Aspiration der Spritze zur Kontrolle des Injektionsortes bewusst verzichtet. Die Tiere wurden in separaten Käfigen einzeln gehalten, um eine gegenseitige Kontamination – insbesondere zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren – zu vermeiden. Nach erfolgter Injektion standen die Mäuse für eine kurze Zeit unter Beobachtung, sodass etwaige Schädigungen der Organe durch den Injektionsvorgang erkannt werden konnten.

2.2.6.5.2 Gabe von Doxzyklin über das Trinkwasser

Zur Induktion des Tet-On-Systems wurde das Tetrazyklin-Analogon Doxzyklin verwendet, welches sich durch eine günstigere Pharmakokinetik auszeichnet. Die zur Induktion eingesetzten Substanzmengen entsprachen nicht denen der Primärpublikationen, es wurde vielmehr die von der AG Bockamp optimierte Konzentration von 7,5 mg/ml in einer 10%-igen (w/v) Saccharoselösung verwendet. Da die Wirkung von Doxzyklin durch Photolyse beeinträchtigt werden kann, wurden entweder dunkle Flaschen eingesetzt oder lichtdurchlässige Flaschen mit Alufolie umwickelt. Die ca. 300 ml Flüssigkeit fassenden Trinkflaschen wurden mit jeweils 100 ml der frisch angesetzten Doxzyklinlösung gefüllt und der Trinkkonsum, sowie das Wohlbefinden der Tiere täglich überprüft. Durch den relativ hohen Zuckeranteil neigten die Verschlüsse der Trinkflaschen zu Verstopfen. Aus diesem Grund wurde ein besonderes Augenmerk auf die Sauberkeit dieser Verschlüsse gelegt, um das Dehydrieren der Tiere zu verhindern. Spätestens nach drei Tagen wurde die restliche Flüssigkeit verworfen und durch frische Lösung ersetzt. Es wurde des Weiteren darauf geachtet, dass unter keinen Umständen weder die Flaschen und Verschlüsse der Versuchstiergruppe noch die der Kontrolltiergruppe miteinander vertauscht oder in den allgemeinen Pool des Tierstallmaterials überführt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung Dsg2-spezifischer Antiseren

Experimente mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern und polyklonalen Antiseren gegen das murine Dsg2 zeigten weder bei Immunfluoreszenz-Analysen auf Zellkulturzellen oder Gewebsschnitten noch bei Western Blot-Untersuchungen befriedigende Ergebnisse. Um die Veränderungen des Dsg2-Proteins eindeutig nachweisen zu können, wurden also funktionstüchtige Antikörper benötigt, die einerseits eine Isotypspezifität für Dsg2 besitzen und sich andererseits durch einen ausreichend hohen Titer und geringen Hintergrund bei den angestrebten Untersuchungen auszeichnen.

Aus diesem Grunde wurden polyklonale Kaninchenseren mit hohem Titer hergestellt, welche das murine Dsg2 spezifisch nachweisen. Dazu wurden zwei unterschiedliche Bereiche der DSG2-cDNA in den prokaryotischen 6xHis Expressionsvektor pET15b subkloniert und diese rekombinanten Proteine in *E. coli* überexprimiert. Nach einer Affinitätsreinigung über das aminotermin His-Hexapeptid wurden die so gewonnenen Antigene zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Nach der Analyse mehrerer Testseren wurden die Tiere schließlich getötet und die fertigen Seren zur Detektion von Dsg2 verwendet.

3.1.1 Klonierung der Expressionskonstrukte

Um die gewünschte Isotypspezifität zu erreichen, wurden die Proteinsequenzen der murinen Desmogleine miteinander verglichen und zwei Bereiche der Dsg2-Aminosäuresequenz gesucht, die mit anderen Dsg-Isotypen eine geringe Übereinstimmung aufweisen. Es sollten ein extra- und ein intrazelluläres Antigen synthetisiert werden, um die funktionell unterschiedlichen Proteinbereiche von Dsg2 detektieren zu können. Abbildung 8 zeigt einen Vergleich von murinen Dsg-Proteinsequenzen, aus denen die (rot markierten) Bereiche der Dsg2-Primärsequenz als Antigene verwendet wurden.

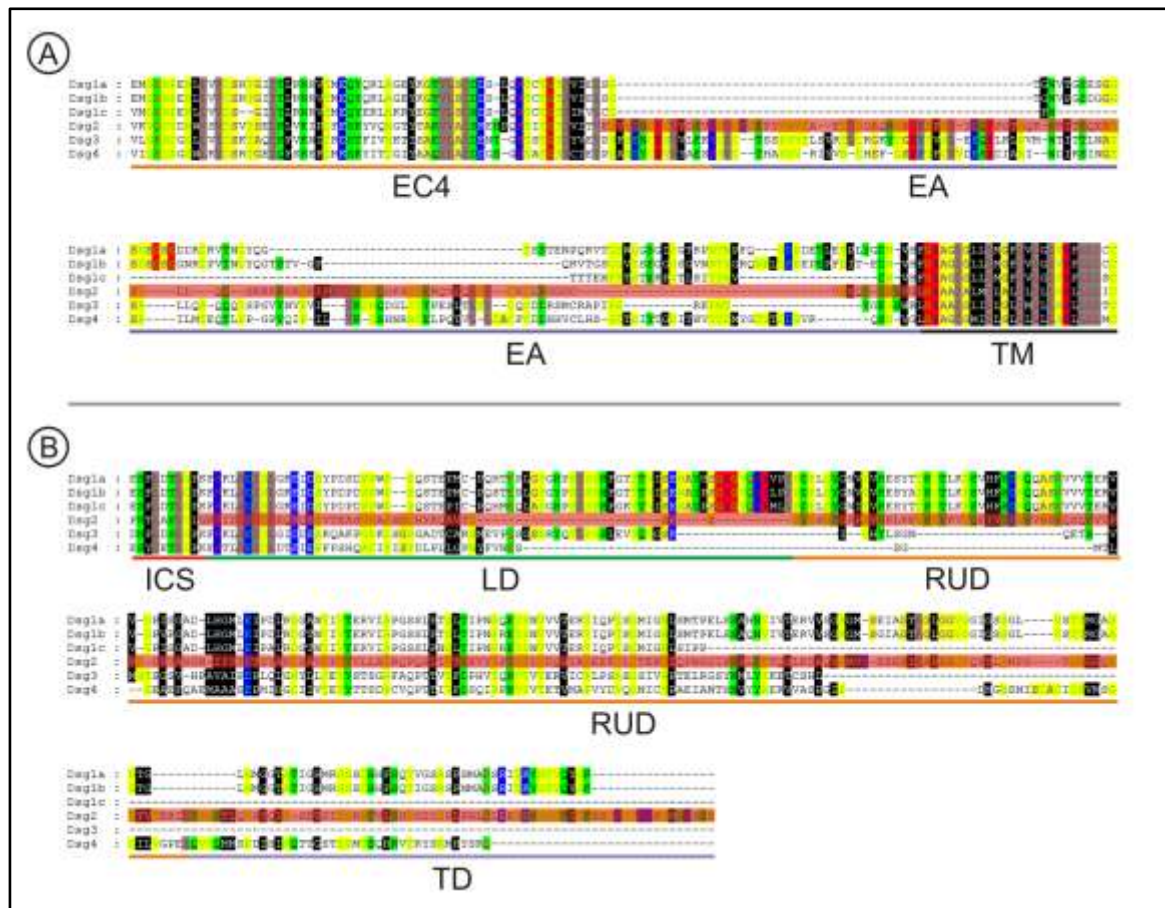


Abbildung 8: Ermittlung der Dsg2-Antigensequenzen zur Generierung von Antisera

– **Aminosäuresequenzvergleich von Fragmenten muriner Dsg-Proteine:** Die Aminosäuresequenzen der murinen Dsg-Isoformen wurden mit Hilfe des PC-Programms „AlignX“ verglichen und das Primärergebnis manuell optimiert. Um einen Dsg2-spezifischen Antikörper generieren zu können, wurden Proteinbereiche mit niedriger Übereinstimmung ausgewählt und zur Antigenproduktion herangezogen. Die verwendeten Primärsequenzen der beiden Antigene sind mit einer roten Markierung hervorgehoben und umfassen im Falle des extrazellulären Antigens (A) Abschnitte der EC4 und EA, sowie im Falle des intrazellulären Antigens (B) Bereiche der LD, RUD und der TD. Vergleiche auch Anhang 7.6.

EC4: extrazelluläre Cadherindomäne 4; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; ICS: intrazelluläres cadherinartiges Segment; LD: Linkerdomäne; RUD: „repeated unit domain“; TD: terminale Domäne

Eine DSG2-cDNA wurde freundlicherweise von David Garrod (Manchester, England) zur Verfügung gestellt und diente als Matrize für eine PCR-Amplifikation mit den beiden Primerpaaren DSG2-AK5-f/r und DSG2-AK3-f/r. Diese Oligonukleotide binden spezifisch an die zu den ausgewählten Proteinbereichen korrespondierenden cDNA-Sequenzen.

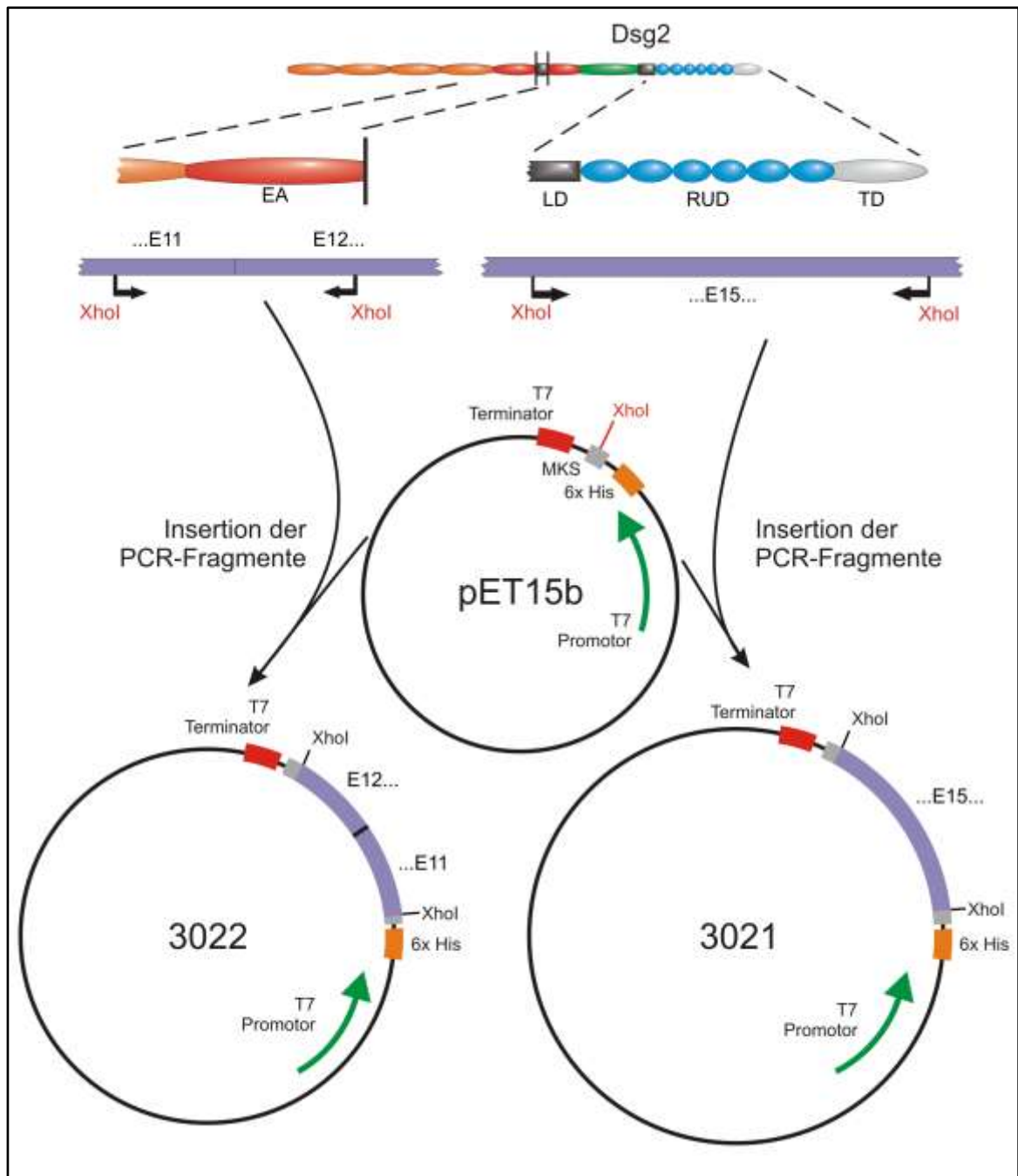


Abbildung 9: Klonierung der Expressionskonstrukte zur Antigenproduktion

PCR-Fragmente mit flankierenden XhoI-Schnittstellen wurden in die singuläre XhoI-Schnittstelle des prokaryotischen Expressionsvektors pET15b inseriert. Die resultierenden Konstrukte kodieren für chimäre Proteine, welche aus einem aminoterminalen His-Hexapolypeptid und einem extrazellulären (3022) oder intrazellulären (3021) Fragment des murinen Dsg2 bestehen. Das aminoterminalen Fragment umfasst Bereiche der EC4 und die EA, das carboxyterminale Antigen einen Großteil der LD, die RUD und die TD. Die ausführlichen Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.

EA: extrazelluläre Ankerdomäne, LD: Linkerdomäne; RUD: „repeated unit domain“; TD: terminale Domäne; E11, E12, E15: Exone; MKS multiple Klonierungsstelle

Des Weiteren tragen sie an ihrem jeweiligen 5'-Ende die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease XhoI, mit der die generierten PCR-Produkte hydrolysiert und in den Vektor pET15b inseriert wurden.

Die resultierenden Konstrukte 3021 und 3022 wurden über analytische Restriktionen veri-

fiziert und abschließend der kodierende Bereich mit den Primern T7 und T7-Terminator sequenziert, um eventuelle Punktmutationen bzw. verfrühte Stopp-Kodons ausschließen zu können.

Nachdem die Orientierung der inserierten DNAs sowie deren Integrität eindeutig festgestellt worden war, wurde der Stamm *E. coli* BL21gold(DE3)pLysS, der sich durch eine besonders strikte Expressionsregulation auszeichnet (siehe 2.2.2.7), mit diesen Expressionskonstrukten transformiert.

3.1.2 Überexpression der Antigene in *E. coli* und Affinitätsreinigung

Die Bedingungen für die Expression rekombinanter Proteine müssen meist optimiert werden, um das Zielprotein in einer löslichen Form exprimieren zu können. Dazu wurden *i.* unterschiedliche Einzelklone, *ii.* unterschiedliche Mengen des Induktors IPTG und *iii.* die Expressionsdauer getestet, um eine Synthese von Antigenen hoher Güte zu erreichen.

i. Da sich einzelne Bakterienklone in der Expression bzw. Degradierung der Zielproteine voneinander unterscheiden können, wurden zunächst vier Bakterienklone für jedes Antigen unter vergleichbaren Bedingungen kultiviert und die Expression der DSG2-Fragmente durch Zugabe von IPTG bis zu einer Konzentration von 0,5 mM induziert. Unmittelbar vor der Induktion und nach einer Expressionsdauer von zwei Stunden wurden je ein Aliquot der Bakterien mit Probenpuffer lysiert und dieser Gesamtproteinextrakt einer SDS-PAGE unterzogen. Aus Abbildung 10 wird ersichtlich, dass die Expressionsinduktion des carboxyterminalen Antigens erfolgreich war. Jeder der vier induzierten Klone exprimierte das rekombinante Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von ca. 34 kDa. Alle vier Klone synthetisierten das rekombinante Protein in vergleichbarem Maße, eine Degradierung war nicht nachweisbar. Auch die Expressionsgüte des aminoterminalen Antigens war bei allen vier getesteten Klonen einwandfrei und vergleichbar (nicht gezeigt).

ii. Auch die unterschiedliche Konzentration des Induktors IPTG hatte keinerlei Einfluss auf die Expressionsstärke und die Güte der Proteine, wie aus Abbildung 10 (B) hervorgeht. *iii.* Zuletzt wurde die optimale Expressionsdauer bestimmt. Dazu wurde Klon 1 mit 0,5 mM IPTG unterschiedlich lang (1 Stunde, 2, 4, 8 und 16 Stunden) induziert. Die exprimierte Proteinmenge unterschied sich jedoch nicht maßgeblich (nicht gezeigt). Zur Synthese großer Mengen der beiden Antigene wurde deshalb jeweils Klon 1 verwendet

und die Expression der rekombinanten Antigene durch die Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM für 2 Stunden induziert.

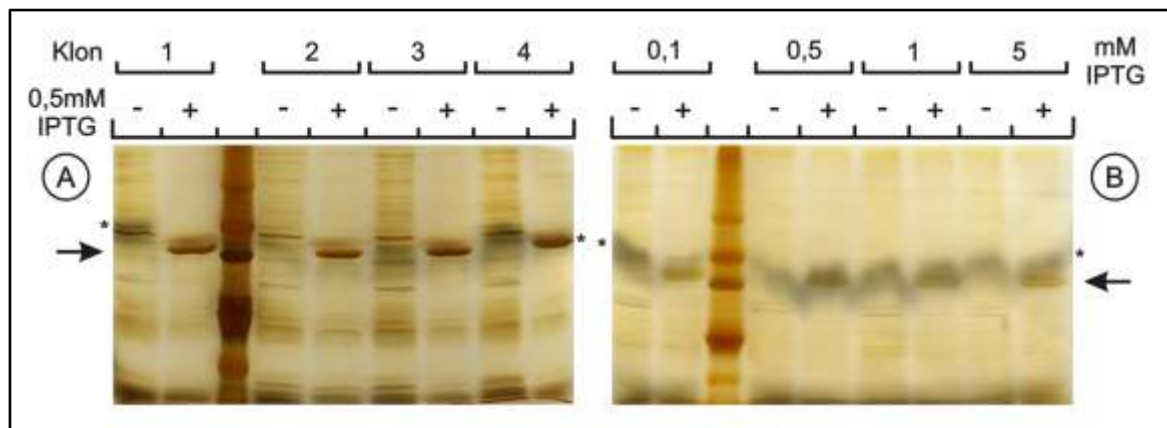


Abbildung 10: Optimierung der Expressionsbedingungen

– SDS-PAGE Analysen zur Wahl eines geeigneten Einzelklons (A) und Evaluierung der optimalen IPTG-Konzentration (B): Zum Testen der Expressionsbedingungen wurden die Bakterien lysiert, über eine SDS-PAGE analytisch aufgetrennt und die Proteine anschließend mittels Silbernitrat visualisiert. Die Expression wird generell strikt durch die Anwesenheit des Induktors IPTG reguliert, da keine überexprimierten Proteinbanden in den jeweiligen nicht-induzierten Proben nachzuweisen sind. Die untersuchten Einzelklone 1 bis 4 zeigen jedoch keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Güte der Expression, die Bande des überexprimierten Proteins (34 kDa) sind von vergleichbarer Stärke und es sind keine proteolytischen Abbauprodukte detektierbar (A). Auch die Konzentration des Induktors IPTG hat keinen Einfluss auf die Expression (B), da sich die Intensitäten der einzelnen Proteinbanden nicht unterscheiden. Pfeil: überexprimiertes Antigen; (-): nicht-induziert; (+): induziert, *: graue Verfärbungen durch β -Mercaptoäthanol

Um die erforderlichen großen Antigenmengen zu gewinnen, wurde jeweils ein Liter Bakterienkultur mit einer Kolonie der jeweiligen Klone 1 inokuliert und die Expression der Antigene mit den zuvor eruierten optimalen Bedingungen induziert. Danach wurden die Bakterien sedimentiert und das Gewicht des Zellsediments bestimmt. Im Anschluss wurde zunächst die Löslichkeit der exprimierten Proteine analysiert, indem von einem Teil der Bakteriensedimente ein Lysat hergestellt wurde. Befand sich dabei das rekombinante Protein nach finaler Ultrazentrifugierung im Überstand (*supernatant*), so wurde der restliche Teil des Sediments unter nativen Pufferbedingungen weiterbehandelt. War hingegen der Großteil des Proteins unlöslich und wurde deshalb im Sediment (*pellet*) nachgewiesen, so wurde das restliche Bakteriensediment unter denaturierenden Bedingungen mit 8M Harnstoff aufgeschlossen (siehe Abbildung 11 (A)). Bei jedem der Lyseschritte wurde ein Aliquot der Bakterien- bzw. Proteinsuspension auf einer SDS-PAGE untersucht. Abbildung 11 (A) zeigt das überexprimierte carboxyterminale Antigen während der verschiedenen Aufreinigungsschritte. Da der größte Anteil des Proteins in der Sedimentfraktion zu finden war (vergleiche Su und Pe), wurde dieses Protein unter denaturierenden Bedingungen affinitätsgereinigt. Das aminoterminalen Proteinfsegment war hingegen gut löslich und wurde unter nativen Bedingungen weiter verarbeitet (nicht gezeigt).

Die Aufreinigung selbst erfolgte im *Batch*-Verfahren über eine Nickel-Agarose, an welche die His-Hexapeptide der rekombinanten Proteine unter neutralem pH bzw. ohne Zusatz des His-Analogons Imidazol adhären. Nach mehreren Waschschriften wurden die überexprimierten Proteine durch Elutionspuffer in saurem Milieu (pH 4,5) im Falle der denaturierenden Behandlung bzw. hohen Imidazolkonzentrationen (250 mM) bei nativer Affinitätsaufreinigung von der Nickel-Matrix eluiert und konnten danach konzentriert werden. Abbildung 11 (B) zeigt die jeweiligen Elutionsfraktionen des carboxyterminalen Antigens, das über seine aminoterminalen His-Hexapeptid affinitätsgereinigt worden ist und sich in nun einem hochreinen Zustand ohne verunreinigende *E. coli*-Proteine befindet.

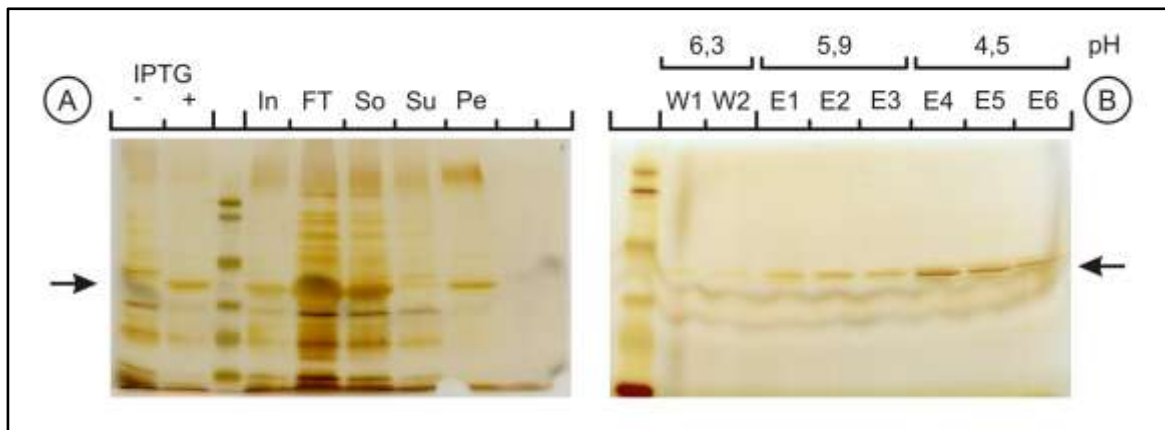


Abbildung 11: Lyse der Bakterien (A) und Affinitätsaufreinigung des überexprimierten carboxyterminalen Antigens über NTA-Agarose (B)

– SDS-PAGE Analysen von Proteinproben der einzelnen Aufarbeitungs- bzw. Reinigungsschritte:

Die Bakteriensedimente wurden aufgeschlossen, um die überexprimierten Proteine in Lösung zu bringen. Von den jeweiligen Lyseschriften wurden Aliquots entnommen und per SDS-PAGE analysiert (A). Das carboxyterminale Antigen ist kaum löslich, da es hauptsächlich in der Sediment-Fraktion (Pe) detektiert wird. Aus diesem Grunde wurden die Inklusions-Körper unter der Einwirkung von 8M Harnstoff lysiert und das Antigen durch Inkubation mit NTA-Agarose im *Batch*-Verfahren affinitätsgereinigt. Die Proben der verschiedenen Wasch- und Elutions-Schritte wurden analysiert und zeigen die Reinheit der Proteinfractionen (B). (-): nicht-induziert; (+): induziert; In: *input*; FT: *flow through*; So: Ultraschallbehandlung; Su: Überstand (*supernatant*); Pe: Sediment (*pellet*); W: Waschpuffer; E: Elutionspuffer

Da die so präparierten Proteine in ihren jeweiligen Elutionspuffern nicht direkt zur Injektion bereit waren, mussten die harnstoff- bzw. imidazolhaltigen Puffer gegen PBS ausgetauscht werden. Die Eluate E1 bis E6 (Abbildung 11 (B)) wurden dazu vereinigt und durch Ultrafiltration oder Dialyse mit Hilfe von Amicon-Säulen (Millipore, Eschborn) bzw. Floatalyzer (Roth, Karlsruhe) in ein neutrales 1x PBS-Milieu überführt. Abschließend wurde die Konzentration der fertigen Antigenlösungen nach Bradford bestimmt und die Integrität der Proteine über eine SDS-PAGE verifiziert (nicht gezeigt). Bis zum Abschluss der Immunisierungen wurden die Antigene bei 4° C gelagert und danach bei -80°C tiefgefroren.

3.1.3 Analyse der Testantisera

Je 100 µg der affinitätsgereinigten Antigene wurden zur Verstärkung der Immunantwort und zur Depotbildung des Antigens mit vollständigem Freund'schen Adjuvanz vermischt und die beiden Antigene je zwei Kaninchen der Rasse New Zealand white subkutan am Rücken injiziert. Zuvor war den Tieren etwas Blut zur Gewinnung des Präimmunsersums entnommen worden. Vier Wochen nach der Grundimmunisierung wurde die Immunantwort durch die Injektion von je 100 µg Antigen in unvollständigem Freund'schen Adjuvanz verstärkt.

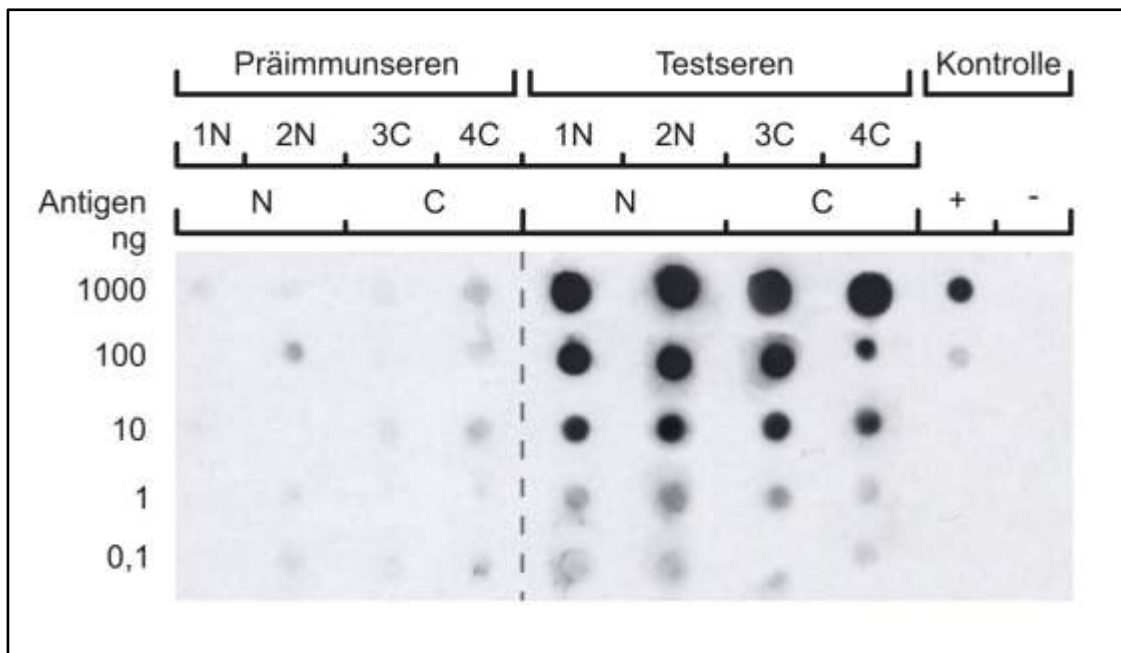


Abbildung 12: Test des Antikörpertiters – Dot-Blot-Analyse:

Die beiden Antigene wurden in einer Konzentration von 1000 ng bis 0,1 ng auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert und sowohl mit den entsprechenden Präimmunsere (1:100), als auch den jeweiligen Testseren (1:100) inkubiert. Die Bindungen der Erstantikörper an die Antigene wurden mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Zweitantikörpers visualisiert. Als Positivkontrolle wurde ein Synaptogyrin.CE.NT-Peptid verwendet und mit einem α -Synaptogyrin-Erstantikörper markiert, als Negativ-Kontrolle kam nur der Zweitantikörper zum Einsatz.

Sämtliche Testseren, nicht aber die korrespondierenden Präimmunsere zeigen eine graduelle Antikörperreaktion gegen die immobilisierten Antigene. Die Immunisierung der vier Kaninchen war erfolgreich, antigenspezifische Antikörper sind generiert worden.

N: aminoterminales Antigen, C: carboxyterminales Antigen, 1N, 2N, 3C, 4C: Seren der mit den jeweiligen Antigenen (N bzw. C) immunisierten Kaninchen

Zwei Wochen nach dieser ersten Auffrisch-Immunisierung wurden den vier Kaninchen jeweils 4 ml Blut entnommen, sodass je ca. 2 ml Testserum aufgearbeitet werden konnten. Die bereits vorbereiteten Präimmunsere, sowie die frischen Testseren wurden zur Bestimmung des Antikörpertiters per Dot-Blot-Verfahren untersucht. Dazu wurden fünf unterschiedliche Konzentrationen (1000 ng bis 0,1 ng) der beiden Antigene auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht und diese mit den jeweiligen Seren (1:100) inkubiert, als

Zweitantikörper kam ein Meerrettichperoxidase-Konjugat zum Einsatz (siehe Abbildung 12). Beide Antiseren zeigten eine Reaktion auf den spezifischen Antigenen, die korrespondierenden Präimmunseren haben keine Affinität zu den synthetisierten Proteinen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Immunantwort der Kaninchen Antiseren mit spezifischen Antikörpern generiert hat.

Da die maximale Immunantwort ca. 10 bis 14 Tage nach den Immunisierungen zu erwarten ist, wurde im Abstand eines Monats eine zweite Auffrischimmunisierung durchgeführt und die nach weiteren 10 Tagen gewonnenen Testseren mit einer Immunfluoreszenz-Analyse von Methanol-Aceton-fixierten konfluenten Eph4-Zellen getestet.

Die Antiseren wurden dazu in einer Verdünnung von 1:100 (Präimmunseren) und 1:500 (Testseren) eingesetzt und mit Texas-Rot-gekoppelten Zweitantikörpern, die gegen den Fc-Teil des Kaninchen-IgG gerichtet sind, visualisiert. Das intrazellulär gelegene Antigen hat eindeutig ein hochspezifisches Antiserum gegen Dsg2 mit geringem Hintergrund generiert, was durch die membranständige punktförmige Antikörperfärbung in Abbildung 13 (3C und 4C) visualisiert wurde. Der Titer der Antiseren ist hoch, sie können in Verdünnungen von 1:500 oder höher eingesetzt werden. Der Vergleich mit den korrespondierenden Präimmunseren verdeutlicht die hohe Spezifität der generierten Antiseren. Die Immunantwort des ersten Kaninchens gegen das extrazelluläre Antigen (1N) ist als schlecht zu bezeichnen: es wurden praktisch keine spezifischen Antikörper generiert, das Präimmun- und das Testserum unterschieden sich kaum (nicht gezeigt). Die Immunantwort des zweiten Tiers (2N) war stärker ausgefallen. Das Serum zeigte eine schwache Membranfärbung mit sehr hohem Hintergrund mit relativ geringem Titer und war in diesem Zustand nicht zu verwenden (Abbildung 13 - 2N).

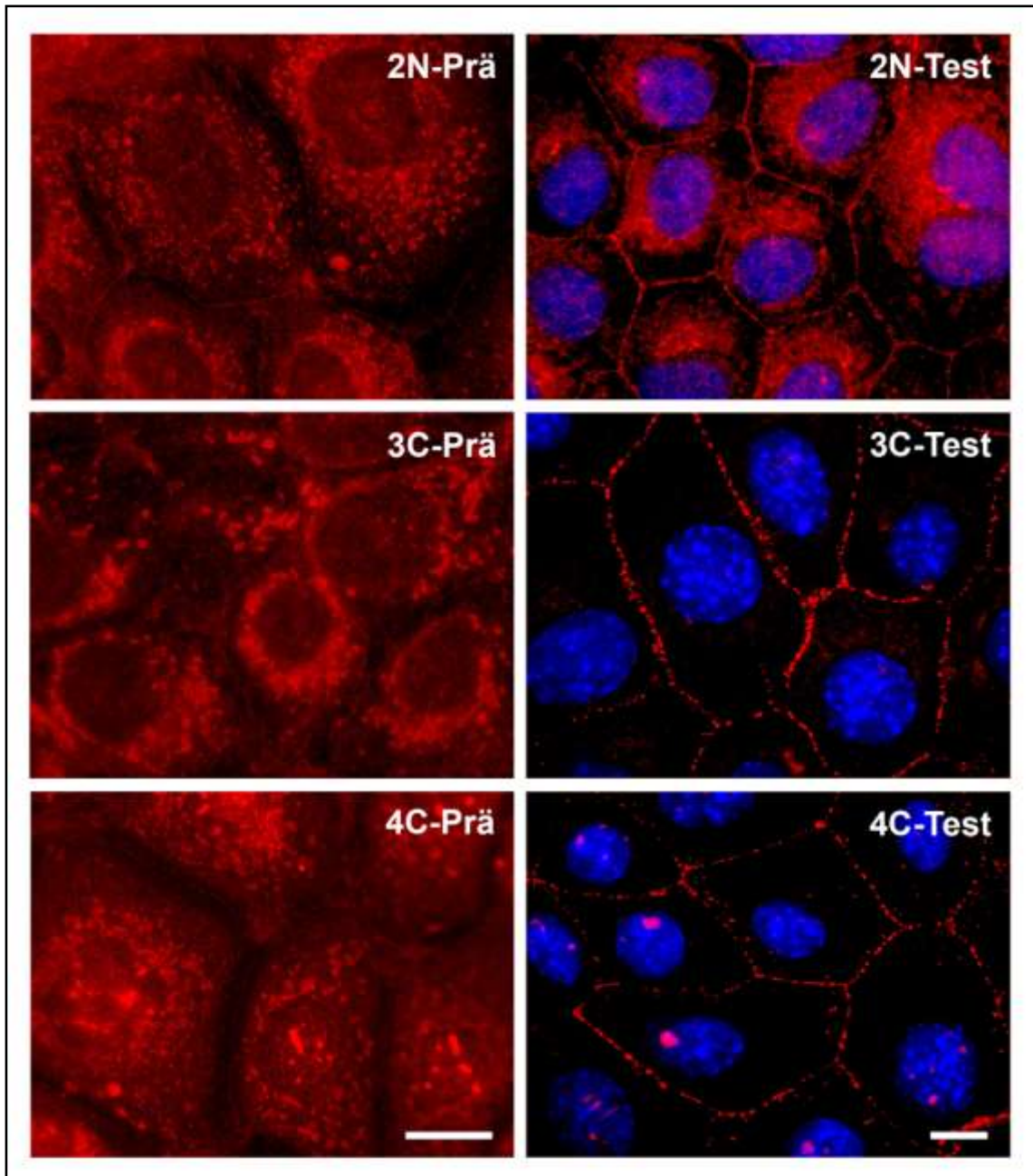


Abbildung 13: Test der Spezifität und des Titters der polyklonalen Seren gegen das murine Dsg2 – Epifluoreszenzaufnahmen von fixierten Eph4-Zellen: Fluoreszenzaufnahmen Methanol-Acetonfixierter Eph4-Zellen, die mit den acht gewonnenen Antiseren (Präimmunsere (Prä) 1:100, Testseren (Test) 1:500) inkubiert wurden; Zweitantikörper: TxR-gekoppeltes α -Kaninchen-Serum (1:50); Kernfärbung: DAPI.

Der Vergleich der Testseren mit den korrespondierenden Präimmunsere demonstriert den Anstieg des Titters von α -Dsg2-Antikörpern. Die punktförmige und membranöse Antikörperfärbung durch die Antiseren 3C- und 4C-Test, die gegen das carboxyterminale Antigen gerichtet sind, deutet auf einen spezifischen Nachweis von Desmosomen hin und zeichnet sich durch eine robuste und spezifische Fluoreszenz mit sehr geringem Hintergrund aus. Das Antiserum 2N-Test weist eine hohe und unspezifische Hintergrundfärbung auf. Das Serum des Tieres 1N zeigte keinen Titer spezifischer Dsg2-Antikörper und wurde deshalb nicht mit in die Abbildung aufgenommen. Größenbalken: 10 μ m

Aus organisatorischen Gründen konnten die Tiere nicht zeitnah entblutet werden, sodass eine dritte Auffrisch-Immunsierung vorgenommen werden musste. Weitere zwei Wochen danach konnten die Kaninchen euthanasiert werden und das gewonnene Blut wurde

zu jeweils ca. 30 ml bis 40 ml Antiserum verarbeitet. Um einer Verunreinigung mit Keimen vorzubeugen, wurden diese finalen Seren mit Natriumacid versetzt und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Analyse der Antiseren

Die endgültigen Antiseren wurden analysiert und charakterisiert. Dazu wurden sowohl Immunfluoreszenz- als auch Western-Blot-Untersuchungen auf fixierten Zellkulturzellen und Geweben durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden.

3.1.4.1 Immunfluoreszenz auf Eph4-Zellen

Wie bereits die zweiten Testseren (siehe Abbildung 13), zeigen auch die finalen Dsg2-Antiseren eine hochspezifische robuste Färbung, die durch ihre punktförmige membranständige Charakteristik eindeutig als Nachweis desmosomaler Proteine einzuordnen ist. Da die beiden Antiseren 3C und 4C in ihren Eigenschaften sehr gut miteinander vergleichbar sind, wurde in den weiteren Untersuchungen zunächst das Antiserum 3C weiterverwendet und wird seither als rb88 bezeichnet.

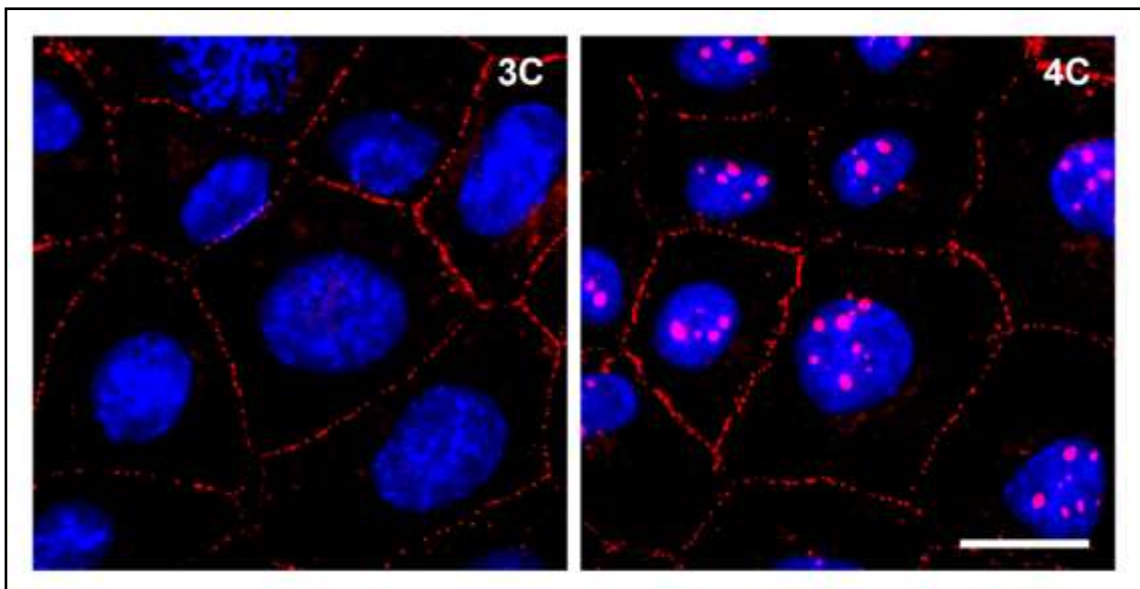


Abbildung 14: Test der endgültigen polyklonalen Seren gegen das murine Dsg2

– **Epifluoreszenzaufnahmen fixierter Eph4-Zellen:** Fluoreszenzaufnahmen Methanol-Aceton fixierter Eph4-Zellen, welche mit den zwei finalen Antiseren 3C und 4C (1:500) inkubiert wurden; Zweitantikörper: Texas-Rot-gekoppeltes α -Kaninchen-Serum (1:50); Kernfärbung: DAPI.

Beide Antiseren zeigen punktförmige und membranöse Antikörperfärbungen, die auf einen spezifischen Nachweis von Desmosomen hinweisen. Die beiden Antiseren zeichnen sich des Weiteren durch eine robuste und spezifische Fluoreszenz mit sehr geringem Hintergrund aus. Größenbalken: 10 μm

3.1.4.2 Immunfluoreszenz auf Gewebsschnitten

Die Reaktivität der Seren auf Gewebsschnitten war von besonderer Relevanz, da letztendlich die Veränderungen des Dsg2 auf Proteinebene in Geweben untersucht werden sollte. Um einen möglichst guten Gewebeerhalt zu erzielen, wurden die Tiere mit Fixativen perfundiert oder die Gewebe (Darm, Leber und Herz) sofort nach dem Töten der Tiere immersionsfixiert. Zum Einsatz kamen verschiedene fixierende Agenzien wie PLP (Poly-L-Lysin, Perjodat, 4%-iges Paraformaldehyd), AFA (Essigsäure, Alkohol, 2%-iges Paraformaldehyd, Hämatoxylin) und HOPE®, deren spezifische Eigenschaften und Zusammensetzungen für eine optimale Fixierung und Antikörperfärbung zunächst geprüft wurden. Durch die Quervernetzung der Proteine waren die Antigene maskiert worden, sodass die Gewebe zunächst wieder für die Antikörper zugänglich gemacht werden mussten (Antigendemaskierung) um den hohen Hintergrund der Antikörperfärbungen zu eliminieren. Es wurden dazu mehrere unterschiedliche Methoden getestet, wie z.B. die Inkubation der Schnitte in Detergenzien (Triton X-100) oder die proteolytische Spaltung der Proteine durch Proteinase-K mit jeweils unterschiedlichen Inkubationszeiten und Konzentrationen. Keine dieser Methoden führte zu einem befriedigenden Ergebnis. Zuletzt die Inkubation der fertigen Gewebsschnitte für 45 Minuten in kochendem Zitratpuffer (pH 6) konnte die Antigene des Darmes bzw. des Herzens freilegen, für die Leber wurde dazu ein Tris-Puffer (pH 10,5) verwendet.

Die fixierenden Eigenschaften des HOPE®-Reagenz reichten bei Weitem nicht aus, um einen akzeptablen Gewebeerhalt zu gewährleisten. Deshalb wurde dieses Fixativ bei den folgenden Untersuchungen nicht weiter eingesetzt.

Abbildung 15 zeigt einen Dünnschnitt von PLP-perfundiertem Kolongewebe, dessen Antigene durch Inkubation in Zitratpuffer zuvor demaskiert worden waren. Dsg2 wurde durch das polyklonale rb88-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1600 spezifisch markiert und mit einem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper (1:800) visualisiert. Insbesondere die für Desmosomen typische baso-laterale und punktförmige Membranmarkierung wird in den längsgeschnittenen Bereichen des Kolonepithels evident (Vergrößerung B). Auch die hexagonale Struktur der in ihrer Mitte quer getroffenen Enterozyten wird durch die laterale Desmosomenfärbung deutlich (Vergrößerung A). Die Bereiche des desmosomenfreien Bindegewebes in Mitten der fingerförmigen Ausstülpungen (*) werden nicht durch das rb88-Serum markiert. Das generierte Serum eignet sich also, um spezifisch Dsg2 in PLP-fixierten Darmpräparaten zu markieren.

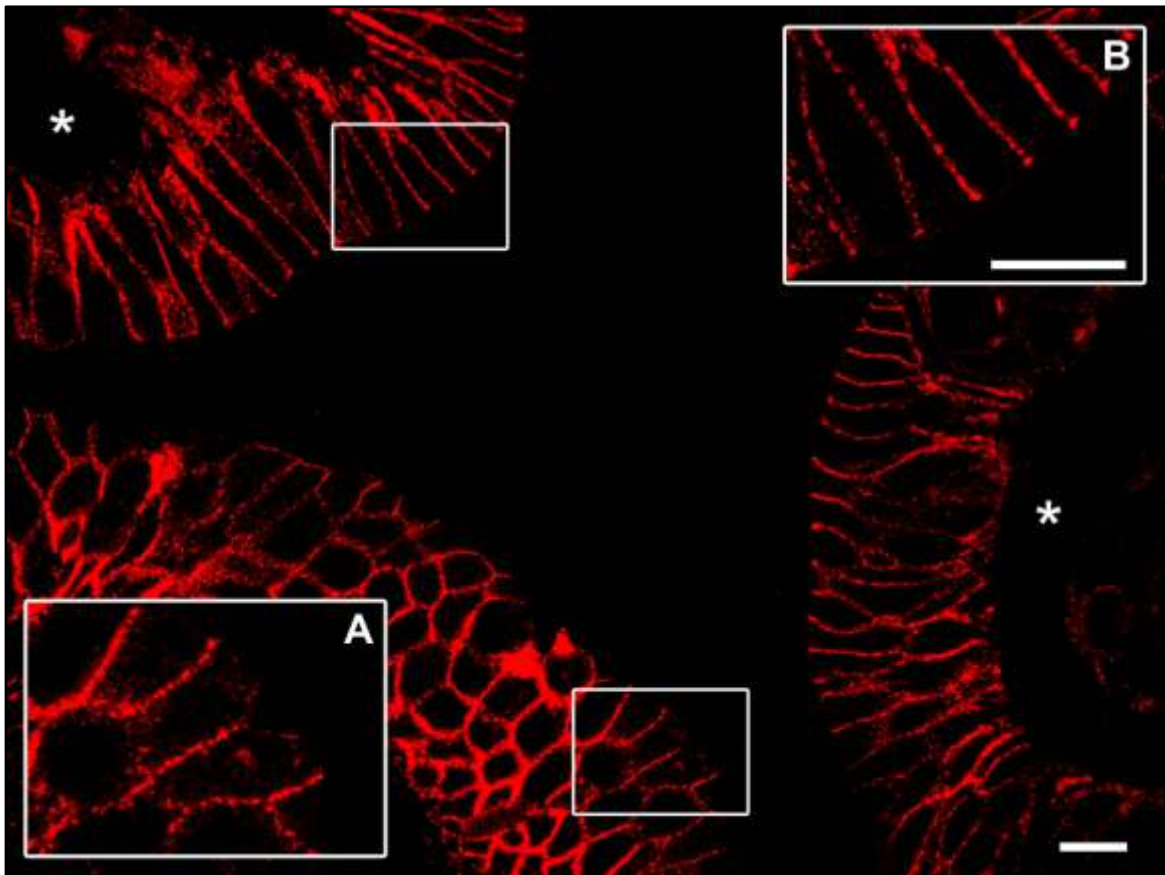


Abbildung 15: Dsg2-Markierung auf Schnitten von Kolonepithel

– **konfokale Fluoreszenzaufnahme:** Schnitte von PLP-fixiertem Kolongewebe wurden zur Antigendemas-
kierung vorbehandelt und mit rb88-Antiserum (1:1600) inkubiert; Zweitantikörper: Cy2-gekoppeltes α -
Kaninchen-Serum (1:800).

Die baso-laterale membranöse Lokalisierung deutet auf eine Markierung desmosomaler Strukturen hin, was
auch durch die punktförmige Anordnung der Färbung unterstrichen wird (Vergrößerungen A und B). des-
mosomenfreie Bereiche des Bindegewebes (*) sind erwartungsgemäß nicht markiert, das Signal-
Hintergrundverhältnis ist sehr gut. Größenbalken: 10 μ m

Die Leberschnitte zeigten in den meisten Fällen eine sehr hohe Autofluoreszenz, welche
erst nach der oben beschriebenen Behandlung mit basischen Puffern eingeschränkt wer-
den konnte. In der Leber sind Desmosomen bisher nahe den Gallenkanälchen beschrieben
worden. Ähnlich der klassischen Darstellung des dreiteiligen Junktionskomplexes in der
apikal-laterale Zellmembran von Enterozyten existiert auch in den polar aufgebauten Le-
berzellen eine funktionell ähnliche Struktur an der zu den Gallenkanälchen orientierten
Seite des jeweiligen Hepatozyt. Die Gallenkanälchen vereinen sich im Gallengang und
sammeln dort die von den Leberzellen sezernierte Galle. Der Gallengang selbst befindet
sich im sogenannten Periportalfeld, wo er in direkter Nachbarschaft mit den Blutgefäßen
A. und *V. interlobularis* verläuft.

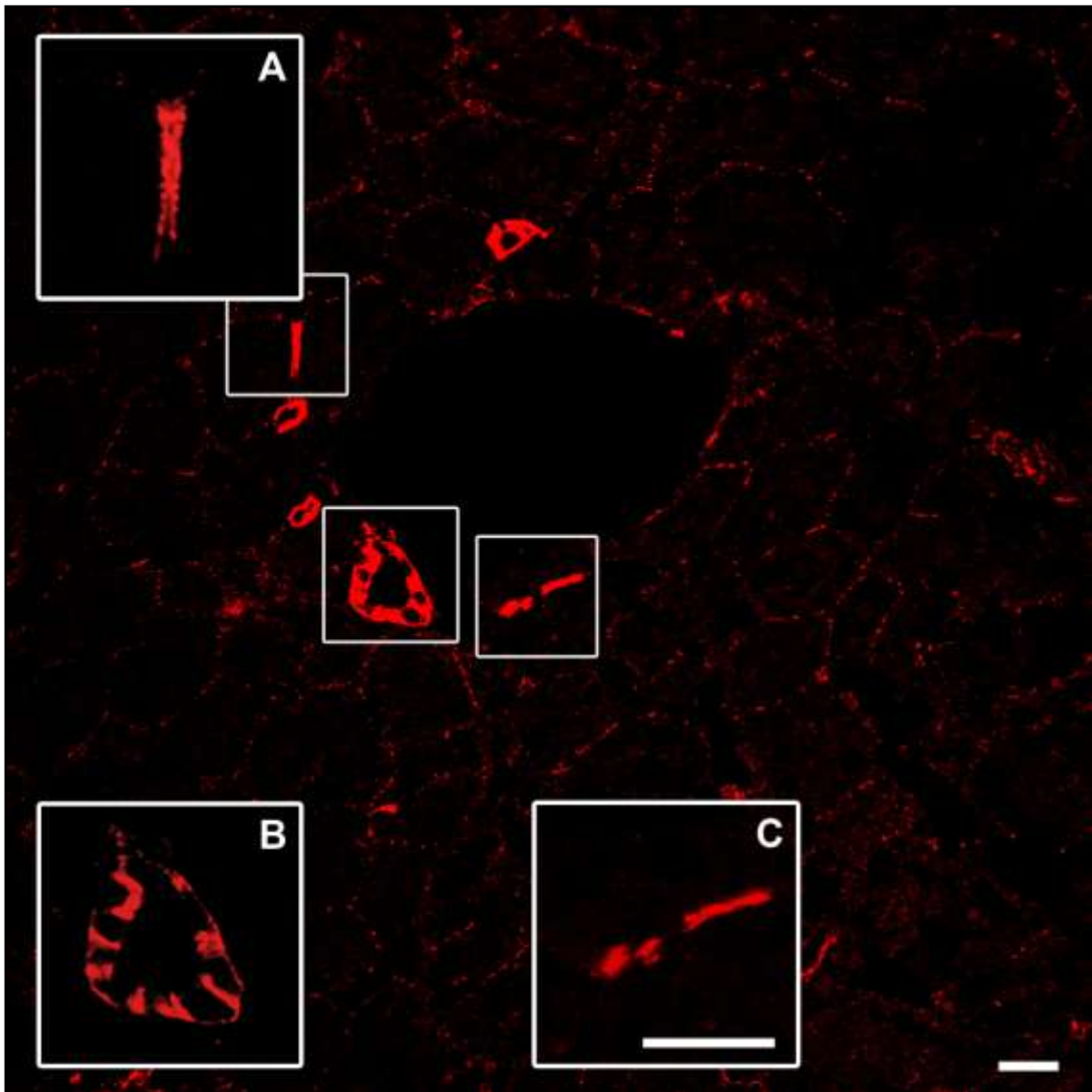


Abbildung 16: Dsg2-Markierung auf Schnitten der Leber

– **konfokale Fluoreszenzaufnahme (Ebene aus einem Bildstapel):** Schnitte von PLP-fixiertem Lebergewebe wurden zur Antigendemaskierung vorbehandelt und mit rb88-Antiserum (1:200) inkubiert; Zweitantikörper: Cy2-gekoppeltes α -Kaninchen-Serum (1:800).

Eine membranöse Desmosomenfärbung ist trotz des relativ hohen Hintergrunds klar erkennbar. Die Teilvergrößerungen A und C verdeutlichen die Markierung von Gallenkanälchen: die parallele Färbung der jeweils benachbarten Zellen dies- und jenseits eines großen Gallenkanälchens ist nachweisbar. In den weiteren Ebenen des Stapels lässt sich diese Markierung durchgehend als flächige Färbung zwischen den beiden Zellen verfolgen (nicht gezeigt). Die Teilvergrößerung B zeigt Fluoreszenzmarkierung der Zellmembranen eines Gallengangs selbst. Größenbalken: 10 μ m

Abbildung 16 zeigt eine Ebene aus einer konfokalen Stapelaufnahme. Ein Leberdünnschnitt, der zur Antigendemaskierung und Senkung der Autofluoreszenz zuvor in basischen Puffern präinkubiert worden war, wurde mit dem Serum rb88 und einem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Trotz des vorhandenen Hintergrunds lässt sich die hexagonale Anordnung der Hepatozyten deutlich erkennen. Besonders intensiv gefärbt sind die Gallenkanälchen in der Nähe des Periportalfelds (Vergrößerungen A und C), und der Gallengang selbst (Vergrößerung B). Das rb88 Antiserum färbt an Gewebeschnitten

PLP-fixierter Leber membranöse desmosomale Strukturen zwischen den einzelnen Hepatozyten und insbesondere den Gallenkanälchen bzw. Gallengängen an.

Auch im Herzen mussten die Dsg2-Antigene nach der Immersionsfixierung mit AFA wieder für die Antikörper zugänglich gemacht werden. Dazu wurden die Kryostatschnitte einer Antigendemaskierung in einem sauren Puffer bei 95°C unterzogen und Dsg2 im Anschluss mit dem rb88 Antiserum (1:1000) markiert. Als Zweitantikörper wurde ein Cy2-gekoppeltes α -Kaninchenserum (1:800) eingesetzt und die Antikörperfärbungen unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop betrachtet und dokumentiert.

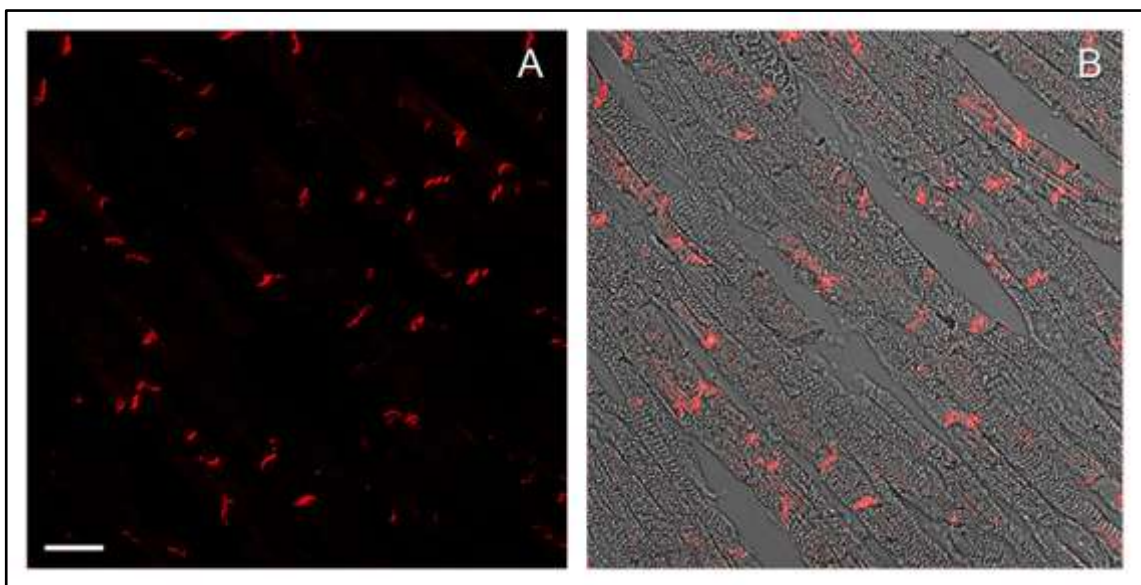


Abbildung 17: Dsg2-Nachweis im Herzmuskel

– **konfokale Fluoreszenzaufnahmen: Fluoreszenz- (A) und Phasenbildüberlagerung (B):** Schnitte von AFA-fixiertem Herzmuskelgewebe wurden zur Antigendemaskierung vorbehandelt und mit rb88-Antiserum (1:1000) inkubiert; Zweitantikörper: Cy2-gekoppeltes α -Kaninchen-Serum (1:800).

(A) Das rb88-Antiserum detektiert spezifisch desmosomale Proteine innerhalb der Glanzstreifen. (B) Zur genauen Bestimmung der Fluoreszenzmarkierung wurde das Fluoreszenzbild mit dem Phasenbild überlagert. Durch die basische Vorbehandlung ist die Integrität des Herzmuskelgewebes gemindert worden und der Gewebeverband weist Lücken auf. Größenbalken: 20 μ m

Abbildung 17 zeigt eine spezifische Antikörperfärbung der Glanzstreifen, in denen die Desmosomen lokalisiert sind. Die Gewebeerhaltung ist durch die Inkubation der Schnitte in den Antigendemaskierungs-Puffern mit niedrigem pH-Wert eher mäßig, die Herzmuskelzellen sind häufig zerrissen und das Gewebe weist Lücken auf. Aus diesem Grunde wurde die Inkubationsdauer im Antigendemaskierungs-Puffer schrittweise verkürzt, um einen Kompromiss zwischen der Antigendemaskierung und der Erhaltung des Herzgewebes zu finden.

3.1.4.3 Western-Blot-Analysen von Zellkulturextrakten

Das rb88-Antiserum ist gegen ein Antigen gerichtet, das auf murinem Dsg2 basiert. Da das Dsg2-Protein zwischen unterschiedlichen Spezies höher konserviert ist, als die verschiedenen Mitglieder der Proteinfamilie innerhalb einer Art (siehe Anhang 7.6 bis 7.8), wurde die Affinität des Antiserums zu Dsg2 nicht muriner Herkunft untersucht. Epitheliale Zelllinien unterschiedlicher Tierarten und des Menschen (Eph4, MDBK, CaCo, MH₁C₁, A431, MDCK – siehe Tabelle 13) wurden dazu in 10 cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz expandiert und die Zellen im Anschluss mit Protein-Probenpuffer von den Schalen abgelöst. Nachdem die DNA durch einen Benzonaseverdau fragmentiert worden war, wurden diese Gesamtproteinextrakte über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

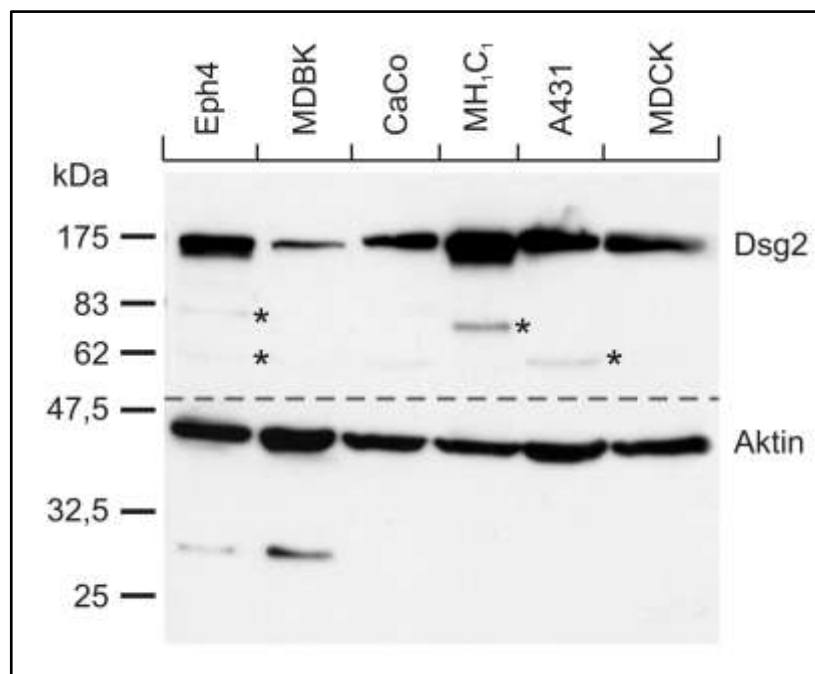


Abbildung 18: Nachweis von Dsg2 in kultivierten Zellen

– **Western Blot Analyse von Gesamtproteinextrakten:** Die untersuchten Zelllinien wurden in 10 cm Zellkulturschalen expandiert und nach Erreichen einer konfluenten Zelldichte mit denaturierendem Lämmli-puffer von den Schalen abgelöst. Nach einer Behandlung mit Benzonase wurde dieser Gesamtproteinextrakt über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese wurde an der gestrichelten Linie mittig halbiert und mit rb88-Antiserum (1:1000 – obere Hälfte) bzw. einem α -Aktin-Antiserum als Ladekontrolle (1:500 – untere Hälfte) inkubiert. Als Zweitantikörper kamen HRP-Konjugate zum Einsatz, die mit einer ECL-Lösung visualisiert wurden.

Die jeweils aufgetragenen Proteinmengen wurden zuvor durch Vorversuche evaluiert und sind nun miteinander vergleichbar (siehe Aktinkontrolle). Das rb88-Antiserum weist eine Spezies übergreifende Reaktivität auf, da es in allen Gesamtzellextrakten eine Bande von ca. 165 kDa (dem apparenten Molekulargewicht von Dsg2) detektiert. Die wenigen schwachen Banden (*) niedrigeren Molekulargewichts stellen Abbauprodukte des Proteins dar und lassen auf einen geringen proteolytischen Abbau der Proben schließen.

Der sich anschließende Western-Blot-Transfer immobilisierte die Proteine auf einer Nitrozellulosemembran, die mit dem rb88-Antiserum inkubiert wurde. Um eine vergleichbare Proteinmenge von je 10 µg Gesamtprotein untersuchen zu können, wurden zum einen die Proteinkonzentrationen mit einem Bradford-Test analysiert, zum anderen wurde Aktin als interne Referenz der Gesamtproteinfraktionen verwendet. Da jedoch die Ergebnisse des Bradford-Tests starken Schwankungen unterlagen und auch die Aktinbanden der Western-Blot-Analysen dieser Gesamtproteinproben scheinbar definierter Menge auf eine unterschiedlichen Konzentration hinwiesen, wurde auf die Bradford-Analysen verzichtet und die aufzutragenden Proteinmengen anhand der Aktinbanden-Intensitäten abgeschätzt.

Das apparente Molekulargewicht von Dsg2 und Aktin unterscheidet sich um mehr als 100 kDa. Dsg2 und Aktin können also gleichzeitig auf einer Membran nachgewiesen werden, indem die fertigen Nitrozellulose-Membranen hälftig getrennt und die Membranteile in den jeweiligen Erstantikörperlösungen inkubiert wurden. Hierbei kamen zum einen das rb88- α -Dsg2-Antiserum (1:1000) und zum anderen ein α -Aktin-Antiserum (1:500) zum Einsatz. Des Weiteren wurde ein käuflich erworbenes α -Dsg1-Antiserum (1:1000) getestet, um auf einen weiteren Antikörper gegen ein desmosomales Cadherin zurückgreifen zu können. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Die aufgetragenen Proteinmengen sind bis auf den Proteinextrakt aus MDBK beinahe identisch, sodass die Intensität der Dsg2-Banden miteinander verglichen werden kann. Das apparente MW von Dsg2 beträgt bei SDS-PAGE-Untersuchungen ca. 165 kDa, sodass die generierten Banden diesem Protein zuzuordnen sind. Eine schwache proteolytische Degradierung ist bei einigen Proteinextrakten feststellbar, die sich durch das Vorhandensein von Proteinen niedrigeren Molekulargewichts manifestiert (*). Das generierte polyklonale rb88-Antiserum erkennt also nicht nur das murine Dsg2 der Eph4-Zellen, sondern auch Proteine, die aus Zellen des Menschen, des Hundes, der Rindes und der Ratten extrahiert worden sind.

3.1.4.4 Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus Geweben

Letztendlich sollte das rb88-Antiserum eingesetzt werden, um Dsg2 in Proteinextrakten aus unterschiedlichen Geweben der Maus über Western-Blot-Untersuchungen nachweisen zu können. Dazu wurden Gesamtproteinextrakte aus Kolon, Leber und Herzmuskel mit

drei verschiedenen Extraktionspuffern hergestellt und die Ausbeute, sowie die Güte der Extraktionsmethoden miteinander verglichen. Da in Protein-Lysepuffer 2 als Detergenz 2% (w/v) SDS enthalten waren, ließ sich zur Konzentrationsbestimmung der gewonnenen Proteine keine Bradford-Analyse anwenden. Deshalb wurden für diese Extrakte die gleichen Proteinkonzentrationen zugrunde gelegt, wie sie bei den mit Lysepuffer 1 extrahierten Protein-Proben gemessen werden konnten. Die resultierenden Proteinpellets der Trizol®-Extraktionen ließen sich abschließend kaum mit 1% (w/v) SDS lösen. Es wurde jeweils der klare Überstand 1:1 mit 2x Protein-Probenpuffer verdünnt und wie die anderen Proben behandelt. Von diesen wurden je 10 und 50 µg über eine SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

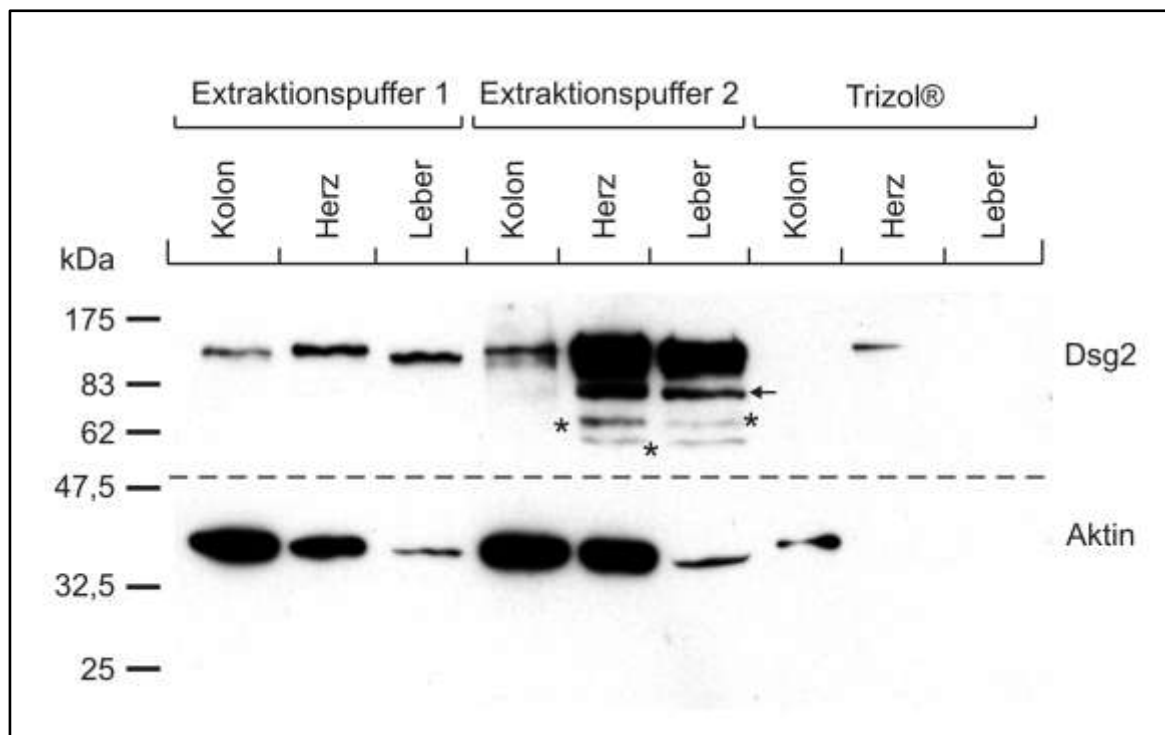


Abbildung 19: Nachweis von Dsg2 in Proteinextrakten aus Geweben der Maus

– **Western Blot Analyse von Gesamtproteinextrakten:** Gesamtprotein-Extrakte wurden aus gefrorenen Kolon-, Leber- und Herz- Gewebefragmenten mit drei unterschiedlichen Extraktionspuffern bzw. Extraktionsmethoden hergestellt. 10µg und 50 µg dieser Extrakte wurden einer SDS-PAGE (10%) unterzogen und im Anschluss per Western-Blot-Verfahren immobilisiert. Die Nitrozellulosemembran wurde an der gestrichelten Linie mittig halbiert und mit rb88-Antiserum (1:1000 – obere Hälfte) bzw. einem α-Aktin-Antiserum als Ladekontrolle (1:500 – untere Hälfte) inkubiert. Als Zweitantikörper kamen HRP-Konjugate zum Einsatz, die mit einer ECL-Lösung visualisiert wurden.

Sämtliche Proteinproben, die mit den Extraktionspuffern 1 oder 2 extrahiert worden waren, zeigten sowohl eine Aktin- als auch eine Dsg2-Markierung. In beiden Extrakten detektiert das rb88-Antiserum jeweils eine Proteinbande, deren Größe dem apparenten MW von Dsg2 um 165 kDa entspricht. Die Extraktionsmethode 2 scheint verhältnismäßig mehr Dsg2-Protein aus den Geweben herauslösen zu können, da die Dsg2-Banden insbesondere im Fall der Herz- und Leber-Proben stärker ausfallen und auch Produkte proteolytischen Abbaus nachgewiesen werden (Pfeil und *).

Die geladene Proteinmenge wurde über die Inkubation der hälftig quer geteilten Nitrozellulosemembranen mit einem α -Aktin-Antiserum (1:500) evaluiert. Die andere Hälfte wurde sowohl mit dem rb88 α -Dsg2-Antiserum, als auch mit dem mc112 α -Dsg1-Antiserum (jeweils 1:1000) inkubiert.

Die Ergebnisse dieser Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 19 dargestellt. Die Extraktionsmethoden mit den Puffern 1 und 2 erreichen bei den untersuchten Geweben eine gute Ausbeute an Proteinen, da in sämtlichen Proben sowohl Aktin, als auch eine dem Dsg2-Protein zuzuordnende Bande detektiert wurden. Im Gegensatz dazu konnten bei den Trizol®-extrahierten Proteinen nur nach einer sehr langen Exposition der Filme positive Antikörper-Signale detektiert werden (nicht gezeigt). Obwohl jeweils 50 μ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen worden waren, unterschied sich die Intensität der einzelnen Proteinbanden. Mit den verwendeten Extraktionsmethoden wurde anscheinend aus Kolon und Herz mehr Aktin extrahiert, als dies bei der Leber möglich war. Die hohe Intensität der Banden (Herz und Leber), sowie die Existenz proteolytischer Abbauprodukte (*) zeigen, dass der Extraktionspuffer 2 wesentlich mehr Dsg2-Protein aus diesen Geweben zu isolieren vermag, als dies bei Kolongewebe der Fall ist. Bei genauer Betrachtung fallen die geringen Unterschiede im MW der einzelnen Dsg2-Banden auf, die nicht auf Unregelmäßigkeiten der Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel zurückzuführen sind und sich über mehrere Wiederholungen der Analysen verfolgen ließen. Das Dsg2-Protein im Proteinextrakt aus dem Herzen zeigte dabei das größte apparente MW, gefolgt von Kolon und Leber.

Diese Western-Blot-Untersuchungen verdeutlichen die Reaktivität des rb88-Antiserums auf Proteinextrakten, die aus Kolon, Herz und Leber der Maus gewonnen wurden. Dieses Antiserum wurde verwendet, um das murine Dsg2-Protein über Western-Blot-Untersuchungen spezifisch nachzuweisen.

3.2 Herstellung und Etablierung eines induzierbaren und gewebespezifischen DSG2-Transgens in der Maus

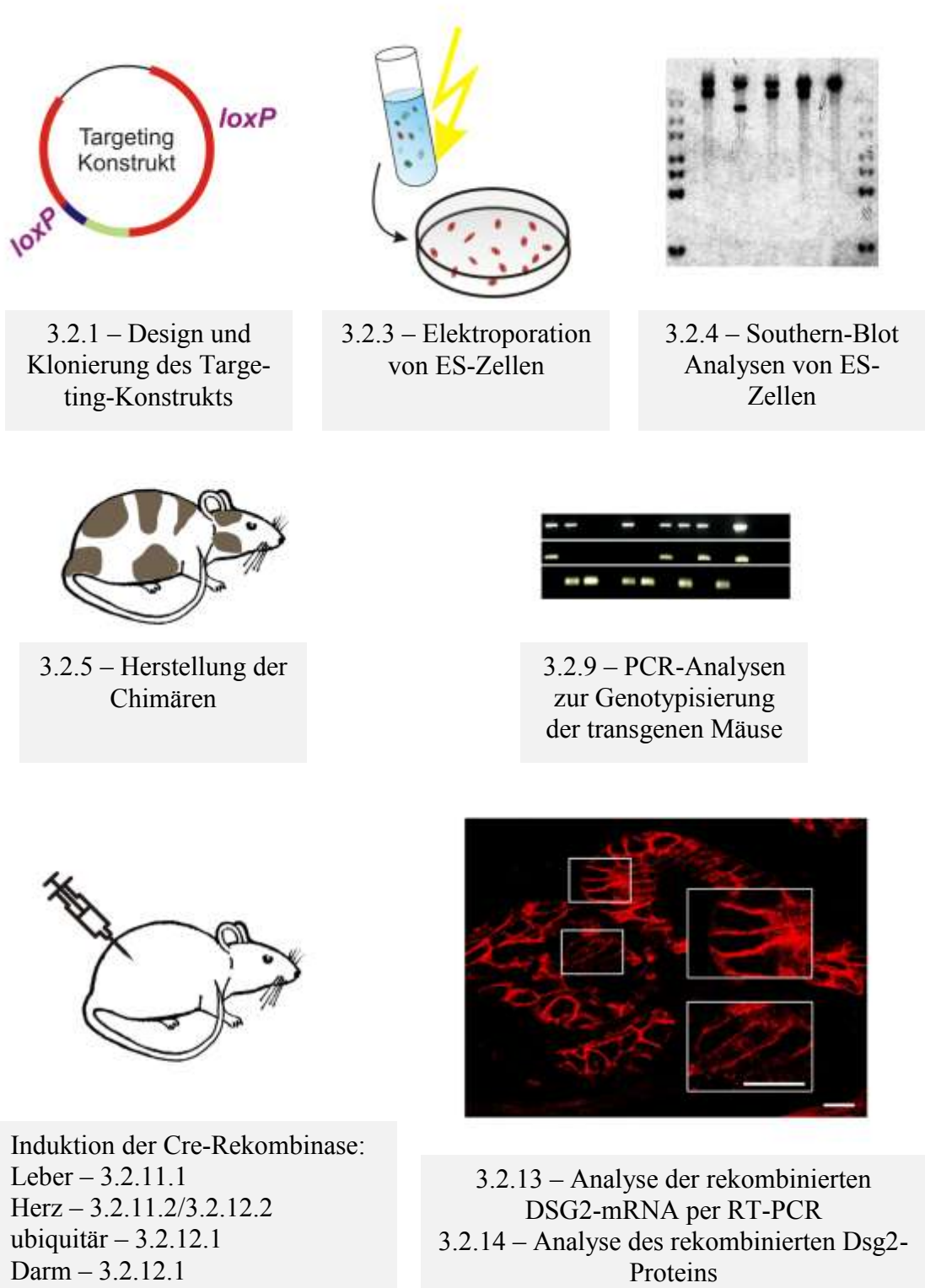


Abbildung 20: Generierung eines induzierbaren DSG2-Transgens in der Maus – Übersicht der einzelnen Projektabschnitte

3.2.1 Design und Klonierung des Targeting-Konstrukts

Die Generierung des induzierbaren DSG2-Allels sollte mit Hilfe des Cre-lox-Rekombinationssystems durchgeführt werden. Dazu wurden die zu rekombinierenden DNA-Abschnitte des DSG2-Gens mit flankierenden loxP-Sequenzen markiert, die von der Cre-Rekombinase spezifisch erkannt werden (siehe 1.2.2.1). Um die transfizierten ES-Zellen positiv selektieren zu können, wurden die ES-Zellen über das Targeting-Konstrukt mit einer Neomycin-Antibiotikaresistenz ausgestattet. Dieses Resistenzgen lag in Form einer DNA-Kassette mit integriertem PGK-Promotor und flankierenden FRT-Sequenzen vor, die es ermöglichten, diese Resistenzgenkassette mit Hilfe der FLP-Rekombinase später wieder aus dem Genom zu entfernen. ES-Zellen der Maus wurden mit dem generierten Targeting-Konstrukt transfiziert. Da dieser Vektor mehrere kb umfassende DNA-Abschnitte von absoluter Sequenzübereinstimmung zum endogenen DSG2-Lokus aufwies, wurden diese Bereiche durch den Vorgang der homologen Rekombination mit den endogenen Sequenzen ausgetauscht. Dabei wurde der mit loxP-Sequenzen flankierter Gen-Abschnitt dauerhaft in das Wirtsgenom integriert.

3.2.1.1 Strategie

Die verwendeten genomischen DNA-Sequenzen des DSG2-Gens lagen zu Beginn der Arbeit in Form der beiden Vektoren *i*.1051 und *ii*.1052 vor. Diese wurden von Qi Tian im Rahmen ihrer Dissertation (Tian, 2000) zur vollständigen Depletion von DSG2 (Eshkind et al., 2002) generiert und deren Herstellung bzw. Eigenschaften werden hier kurz dargestellt (siehe Abbildung 21).

Der Verständlichkeit halber werden nicht die Basenpaar-Positionen der jeweiligen Vektoren, sondern die absoluten Positionen (Start des DSG2-Exon1 = 1) in der DSG2-Sequenz angegeben. Diese Informationen könne anhand der Ensembl Gene ID ENSMUSG00000044393, die unter <http://www.informatics.jax.org> abgerufen werden kann, nachvollzogen werden.

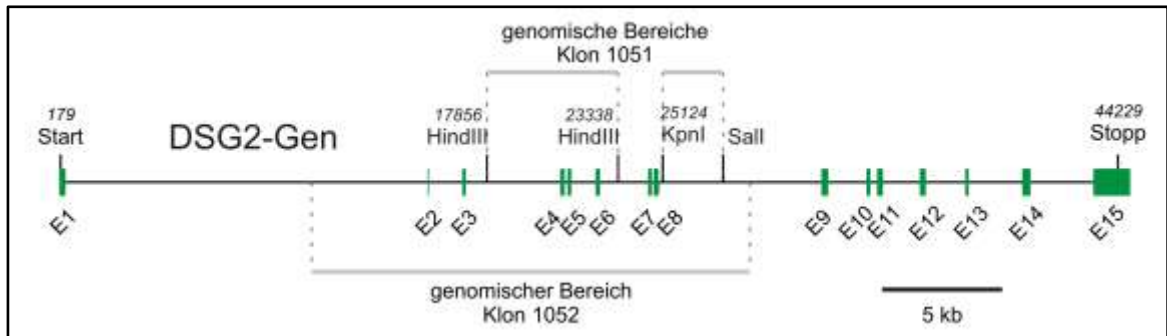


Abbildung 21: Das DSG2-Gen

– **maßstabgetreue Darstellung der Exon-Intron-Struktur und Übersicht der subklonierten DNA-Fragmente:** Die Exone (E1 bis E15) sind als grüne Rechtecke dargestellt und die subklonierten DNA-Fragmente nebst den resultierenden Klonbezeichnungen mit grauen Balken gekennzeichnet. Zur weiteren Information sind der Übersichtlichkeit halber nur die zwei für die Klonierung relevanten der insgesamt sieben HindIII-Schnittstellen eingezeichnet worden. Die Zahlen geben die Basenpaar-Positionen der entsprechenden Eigenschaften bezogen auf den Beginn des DSG2-Gens (Exon 1) an.

i. Aus dem λ Mg1-Klon HH1Nr1 ist durch Restriktion mit der Endonuklease HindIII der Nukleotidbereich 17856 bis 23338 herausgeschnitten und in den Vektor pBluescript-R3 subkloniert worden (Klon 1051). Dieses ca. 5,5 kb umfassende HindIII-Fragment des DSG2-Gens beginnt 5' mit einem Teil von Intron 3, enthält weiterhin die Exone und Introne 4 und 5, das Exon 6 und schließt 3' mit etwa der Hälfte von Intron 6 ab. Des Weiteren wurde ein Teil des 5'-Bereiches von Intron 8 über die Schnittstellen KpnI und SalI 3' hinter das HindIII-Fragment kloniert. Zwischen diesen beiden genomischen Sequenzbereichen ist später eine Neomycinresistenzkassette, sowie eine Spleißakzeptor-Sequenz und die Sequenz für eine interne Ribosomenbindestelle inseriert worden, um den Zielvektor für die konstitutive Deletion des DGS2-Gens zu generieren (Eshkind et al., 2002).

ii. Der Klon 1052 basiert ebenso auf dem Vektor pBluescript-R3. In diesen ist mit Hilfe der Restriktionsendonuklease NotI ein Bruchstück des Phagen-Klons λ Mg1 eingefügt worden. Das inserierte Fragment deckt den Bereich von Position 10540 bis 28781 des DSG2-Gens ab, umfasst also den 3'-Bereich des Intron 1 bis zur Mitte des Intron 8. Die Identität beider Klone wurde nun zunächst mit Hilfe analytischer Restriktionen und darüber hinaus durch teilweise Sequenzierung der DNA verifiziert. Dabei wurde das Primerpaar M13/M13-rev verwendet, um die genauen Positionen der genomischen Fragmente (siehe obige Angaben) zweifelsfrei bestimmen zu können.

Um die gewünschten Eigenschaften – die Erkennungssequenzen der Cre- und FLP-Rekombinasen (loxP- bzw. FRT-Stellen), sowie die Neomycinresistenz-Kassette für die Selektion der ES-Zellklone – in die genomische DNA zu inserieren, wurden singuläre Enzymschnittstellen in den Intronen der vorhandenen genomischen DNA-Sequenzen gesucht. Mit Hilfe der veröffentlichten Genomsequenzen der Maus und der Kenntnis der

genauen DNA-Sequenz der vorhandenen Klone wurde der Bereich der (real existierenden) DNA von Plasmid 1051 und Plasmid 1052 auf die genomische DNA-Sequenz (*in silico*) abgebildet. Für die 5'-loxP-Sequenz bot sich die NheI Stelle (Position 20161) in mitten von Intron 3 an (in Klon 1051). Die Neomycinresistenz-Kassette inklusive flankierender FRT-Sequenzen und der 3'-liegenden loxP-Sequenz (siehe Abbildung 24) sollte in die endogene EcoRI-Stelle in Intron 6 an Position 24327 inseriert werden (in Klon 1052). Dem vollständig rekombinierten DSG2-Lokus fehlen also die Exone 4, 5 und 6, sodass letztendlich Exon 3 an Exon 7 gespleißt werden wird.

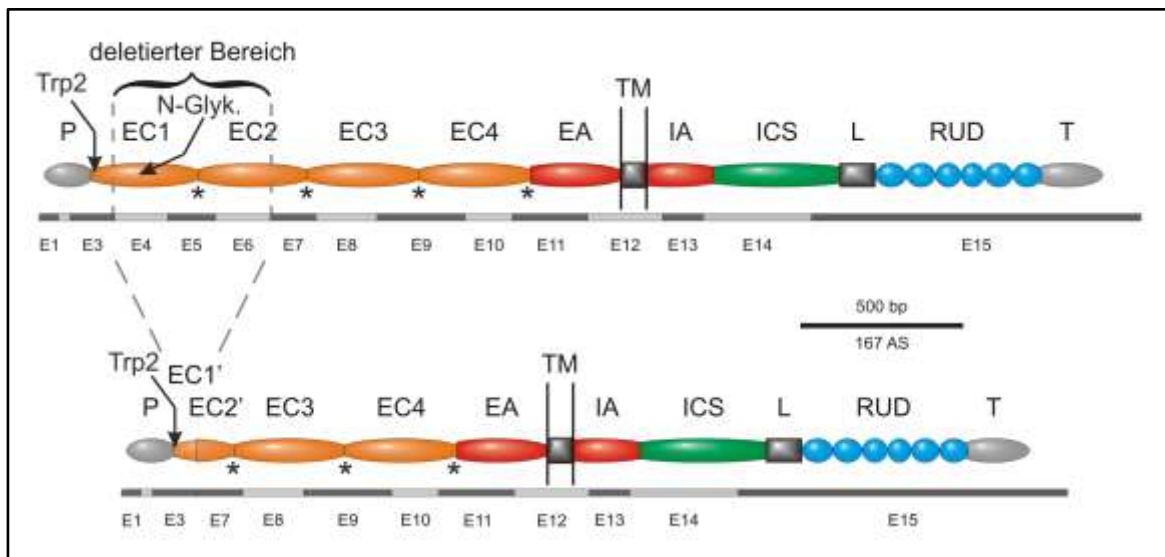


Abbildung 22: Deletion wichtiger Proteinbereiche von Dsg2

– **vergleichende schematische Darstellung der DSG2-mRNA und der resultierenden Dsg2-Domänenstruktur des wildtypischen und rekombinierten Moleküls:** Durch die Cre-vermittelte Induktion werden die Exone 4 bis 6 des DSG2-Gens deletiert, die für einen Großteil der extrazellulären Domänen EC1 und EC2 codieren. Zwar ist die konservierte Aminosäure Trp2 nicht von der Deletion betroffen, jedoch sind die Aminosäurereste ihrer hydrophoben Bindetasche vollständig entfernt worden. Des Weiteren wird eine der vier sich jeweils zwischen den extrazellulären Domänen befindenden Ca^{2+} -Bindestellen, sowie die Haupt-N-Glykosylierungsstelle deletiert, sodass wichtige Abschnitte des Dsg2-Proteins defizient und somit die Funktion des Proteins stark eingeschränkt ist.

P: Prodomäne; EC1 bis EC4: extrazelluläre Cadherindomänen; EC1' und EC2': Fragmente der betroffenen extrazellulären Domänen nach erfolgter Rekombination; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; IA: intrazelluläre Ankerdomäne; ICS: intrazelluläres cadherinartiges Segment; LD: Linkerdomäne; RUD: „repeated unit domain“; TD: terminale Domäne; Trp2: Aminosäure 2 des reifen Proteins (Tryptophan); *: Ca^{2+} -Bindestellen; N-Glyk.: N-Glykosylierungsstelle; E1 bis E15: Exone

Da es sich sowohl bei Exon 3, als auch Exon 7 um Phase-0 Exone handelt, wird keine Verschiebung des Leserasters erwartet. Die drei Exone kodieren für einen Teil der extrazellulären Domänen 1 und 2, sodass wichtige Bereiche des Dsg2-Proteins deletiert werden: *i*. Die Aminosäure 2, ein Tryptophan, ist unter den Cadherinen konserviert (vergleiche Anhang 7.6 und (Nollet et al., 2000)). Ihr wird eine druckknopfartige Funktion bei der *trans*-Interaktion von Cadherindomänen zugeschrieben, indem es mit einer hydrophoben Bindetasche am Partnermolekül adhärert (Shapiro et al., 1995; Boggon et al., 2002).

Das Trp2 ist zwar nicht von der Deletion betroffen, jedoch fehlen sämtliche Aminosäuren, die für die hydrophobe Bindetasche kodieren. Auch die Aminosäurereste, die für die *cis*-Interaktion der Cadherindomänen verantwortlich sind (Boggon et al., 2002), fehlen dem mutierten Dsg2. *ii.* Die Ca²⁺-Bindestellen zwischen den einzelnen extrazellulären Domänen sorgen für eine Stabilisierung der Dsg2-Konformation im Interzellularspalt (Overduin et al., 1995; Shapiro et al., 1995; Nagar et al., 1996). Durch den Verlust einer dieser wichtigen Bindestellen ist davon auszugehen, dass Struktur und Konformation des Dsg2-Proteins derart verändert sind, dass die verknüpfende Funktion nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. *iii.* Durch die Verkürzung des Proteins um die Länge einer extrazellulären Domäne wird seine kraftübertragende Funktion gemindert und die notwendige Flexibilität und damit auch seine Stärke eingeschränkt. *iv.* Die Haupt-N-Glykosylierungsstelle (vergleiche Anhang 7.6) ist unter den Desmogleinen der Mammalia konserviert. Nach der Rekombination des DSG2-Gen-Lokus wird dieser Proteinbereich nicht synthetisiert werden und Dsg2 nicht posttranslational N-glykosydisch im Golgi-Apparat modifiziert werden können (Pasdar und Nelson, 1989).

Diese Aspekte lassen bei einer vollständigen Rekombination des Allels auf eine Depletion der adhäsiven Eigenschaften von Dsg2 schließen.

Durch die verschiedenen Manipulationen, wie beispielsweise die mehrfache Einführung verschiedener Restriktionsenzym-Erkennungsstellen in die entsprechenden Plasmide, entstanden keine neuen Konsensus-Spleiß-Sequenzen (eine Arbeit über die statistische Verteilung der verschiedenen Spleiß-Sequenzen: (Thanaraj und Clark, 2001)). Die folgenden Klonierungen wurden parallel durchgeführt, werden hier der Übersichtlichkeit halber jedoch nacheinander für die beiden Homologiearme des Konstrukts beschrieben.

3.2.1.2 5'-Arm des Targeting-Konstrukts

Die DNA des Plasmids 1051 wurde mit der Restriktionsendonuklease HindIII hydrolysiert und das ca. 5,5 kb große HindIII-Fragment (17856 bis 23338 des DSG2-Gens) in den Vektor pBlueskript subkloniert (Klon 3001). Im Anschluss wurde das Plasmid 3001 mit dem Oligonukleotidpaar „M13“ sequenziert, um die Position der subklonierten Sequenz zweifelsfrei bestimmen zu können (Abbildung 23 – 1).

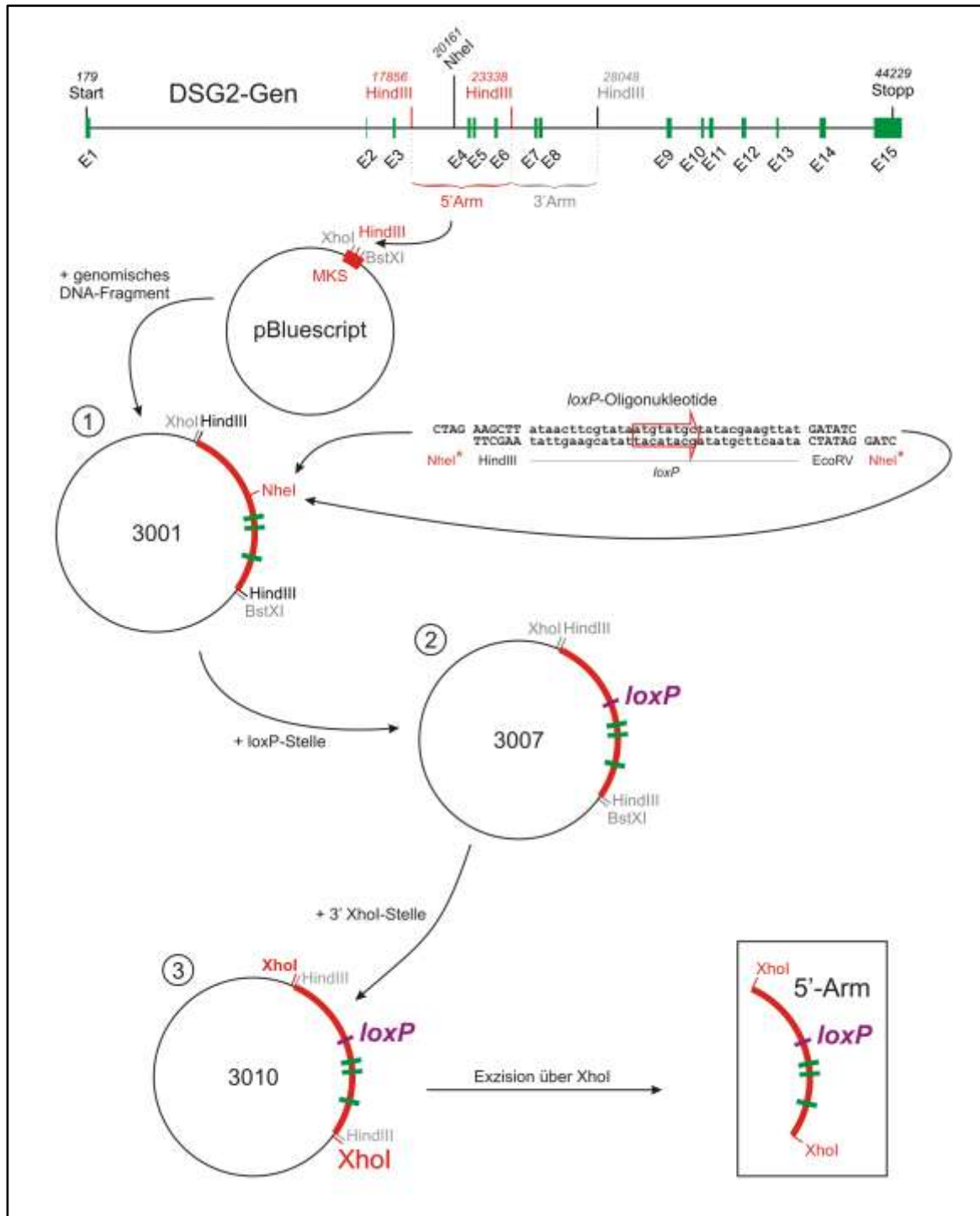


Abbildung 23: Klonierung des 5'-Arms

– **schematische Darstellung der Klonierungsstrategie:** Sämtliche für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben, wobei die für den aktuellen Klonierungsschritt verwendeten Schnittstellen in roter Farbe hervorgehoben wurden. Ein Stern (*) kennzeichnet Restriktionsschnittstellen, welche durch die Klonierung im Targeting-Konstrukt nicht mehr funktionell sind, der rote Pfeil verdeutlicht die Orientierung der loxP-Sequenz. Die ausführlichen Erklärungen zu den einzelnen Klonierungsschritten (1 bis 3) sind dem Text zu entnehmen.

In die endogene NheI-Restriktionsschnittstelle (20161 in Intron 3 des DSG2-Gens) wurden die zuvor aneinander angelagerten loxP-Oligonukleotide inseriert (Klon 3007) und dadurch die endogene NheI-Stelle deletiert, sowie eine HindIII- und eine EcoRV-

Erkennungsstelle eingeführt. Da durch die erfolgreiche Insertion der loxP-Sequenzen die Erkennungsstelle für NheI maskiert worden war, ermöglichte eine Inkubation des Ligationansatzes mit der Restriktionsendonuklease NheI eine dramatische Reduktion der religierten Plasmide. Um die Integrität und Orientierung der loxP-Sequenz zu überprüfen, wurde der Klon 3007 mit dem Oligonukleotid „Seq_F_V4_5'ins_loxP“ sequenziert (Abbildung 23 – 2).

Die beiden Fragmente des Targeting-Konstrukts sollten abschließend über eine XhoI-Restriktionsschnittstelle zusammengefügt werden. Dazu wurde in den Vektor 3007 eine zweite XhoI-Restriktionsschnittstelle mittels Adapter-Klonierung eingeführt. Die aneinander angelagerten Oligonukleotide „Eco_Xho_Bst_f“ und „Eco_Xho_Bst_r“ wurden als Adapter in die BstXI-/EcoRI-Restriktionsschnittstellen der multiplen Klonierungsstelle des Vektors 3007 inseriert, wobei die BstXI-Schnittstelle deletiert wurde (Klon 3010) (Abbildung 23 – 3). Auch dieser Schritt wurde über analytische Restriktionen überprüft.

3.2.1.3 3'-Arm des Targeting-Konstrukts

Die Neomycin-Resistenzkassette sollte in die endogene singuläre EcoRI-Restriktionsschnittstelle (24327 in Intron 6 des DSG2-Gens) inseriert werden. Da der ursprüngliche Vektor 1052 noch weitere EcoRI-Erkennungssequenzen besitzt, wurde das ca. 4,7 kb umfassende HindIII-Fragment (23338 bis 28048 des DSG2-Gens) aus dem Klon 1052 herausgeschnitten und subkloniert.

Zuvor war die EcoRI-Erkennungssequenz in der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pBlueskriptII-SK mit Hilfe einer Adapterklonierung deletiert worden. Dazu wurden die Oligonukleotide „03-51pBS2SK-EI+Spha“ und „03-51pBS2SK-EI+Sphb“ aneinander angelagert und diese „Adapter-DNA“ in die zuvor durch die Restriktionsendonukleasen HindIII und PstI hydrolysierte DNA des Vektors eingefügt. Der resultierende Klon 3000 weist nun keine endogene EcoRI-Schnittstelle mehr auf (Abbildung 24 – 1).

In diesen neu generierten Klon 3000 wurde das beschriebene HindIII-Fragment (23338 bis 28048 des DSG2-Gens) aus dem Klon 1052 inseriert. Der so generierte Klon 3004 trug nun eine einzige EcoRI Restriktionsschnittstelle im Intron 6, in welche die Neomycinresistenz-Kassette inseriert werden konnte (Abbildung 24 – 2).

Um die bereits erfolgreich getestete 3'-externe Sonde (Tian, 2000) weiterhin für genomische Southern-Blot-Untersuchungen verwenden zu können (siehe Abbildung 26), wurde

die am 3'-Ende der subklonierten genomischen DNA gelegene SphI Restriktionsschnittstelle (27622) über Restriktionen mit den Endonukleasen Bst1107I (27413) und SmaI (in MKS von Plasmid 3004) entfernt, es entstand Klon 3008 (Abbildung 24 – 3).

Im Anschluss wurde in dieses neu generierte Plasmid 3008 die Neomycinresistenzgen-Kassette des Targeting-Konstrukts von Dr. Reutzel, Mainz inseriert. Die zwingend notwendigen Eigenschaften dieser Resistenzgenkassette – die Sequenzen des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK), sowie das nachgeschaltete Neomycinresistenzgen, die beiden flankierenden FRT-Sequenzen und die 3' gelegene, abschließende loxP-Sequenz (siehe Abbildung 24) – wurden zunächst überprüft. Dazu wurde die Resistenzgenkassette mit den Oligonukleotiden Seq_1491_F und Seq_1491_R sequenziert und der Vektor im Anschluss als Matrize in einer PCR mit den Primern „05-251-Eco_PGK-Neo_f“ und „05-252-Eco_PGK-Neo_r“ verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide tragen an ihren jeweiligen 5'-Enden eine EcoRI-Erkennungssequenz, sodass das mit dem Restriktionsenzym EcoRI hydrolysierte PCR-Produkt in den Vektor 3008 inseriert wurde. Um eventuelle Synthesefehler der verwendeten DNA-Polymerase auszuschließen, wurde die Integrität der oben genannten essentiellen Eigenschaften des neu entstandenen Konstrukts 3009 überprüft. Der fragliche Bereich wurde deshalb erneut über eine „primer-walk Strategie“ mit den Primern 05-251-Eco_PGK-Neo_f, 05-252-Eco_PGK-Neo_r und 01-01 vollständig sequenziert (Abbildung 24 – 4).

Abschließend wurde der Vektor 3010 (5'Arm) mit der Restriktionsendonuklease XhoI hydrolysiert und der ca. 5,5 kb umfassende 5'-Arm des Targeting-Konstrukts in die XhoI-Erkennungsstelle der MKS des Vektors 3009 unmittelbar 5' vor den 3'-Arm inseriert (Klon 3011) (Abbildung 24 – 5).

Um die erforderliche Menge an DNA zu gewinnen, die zur Elektroporation von embryonalen Stammzellen erforderlich ist, wurde das fertig gestellte Targeting-Konstrukt (3011) in Bakterien vervielfältigt und die Plasmid-DNA isoliert. Hierbei kam eine spezielle „*Endo-free*“ Maxi-Präparation zum Einsatz, welche die von den Bakterien abgeschiedenen Endotoxine durch spezielle Puffersysteme neutralisiert. 60 µg Plasmid-DNA wurden durch die Restriktionsendonuklease NotI vollständig hydrolysiert. Die so gewonnenen linearen DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und gereinigt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, in 100 µl steril filtriertem Wasser gelöst und zur Elektroporation von ES-Zellen eingesetzt.

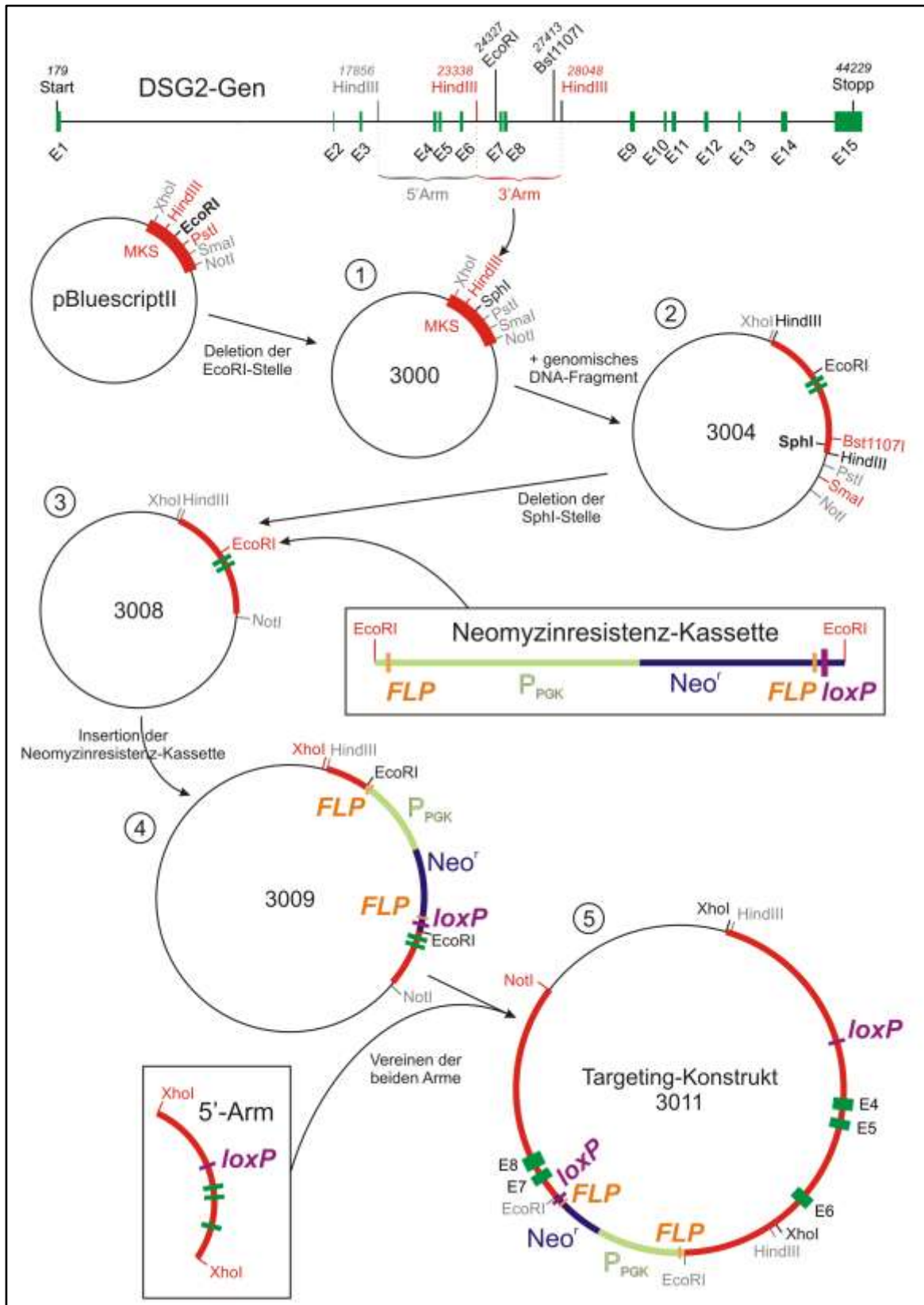


Abbildung 24: Klonierung des 3'-Arms

– schematische Darstellung der Klonierungsstrategie: Sämtliche für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben, wobei die für den aktuellen Klonierungsschritt verwendeten Schnittstellen in roter Farbe hervorgehoben wurden und zu entfernende Restriktionsschnittstellen in fetter Schrift markiert sind. Die ausführlichen Erklärungen zu den einzelnen Klonierungsschritten (1 bis 5) sind dem Text zu entnehmen.

3.2.2 *In vitro* Rekombination des Targeting-Konstrukts

Bevor der langwierige Prozess, beginnend mit der Transfektion von ES-Zellen mit dem Targeting-Konstrukt bis zur Etablierung der mehrfach transgenen Mauslinien, sowie die Induktion der Cre-Rekombinase in Angriff genommen wurde, sollte die Integrität der loxP-Stellen und somit die Funktion des Targeting-Konstrukts mit Hilfe eines *in vitro*-Rekombinationsversuchs überprüft werden. Der verwendete Bakterienstamm 294-Cre trägt ein Gen für die Cre-Rekombinase, welches durch den temperatursensitiven λP_R -Promotor kontrolliert wird. Bei einer Temperatur von über 23°C ist der Promotor aktiv, die Cre-Rekombinase wird synthetisiert und ist nun in der Lage, *gefloxte* DNA-Sequenzen in den Bakterien zu rekombinieren (Buchholz et al., 1996).

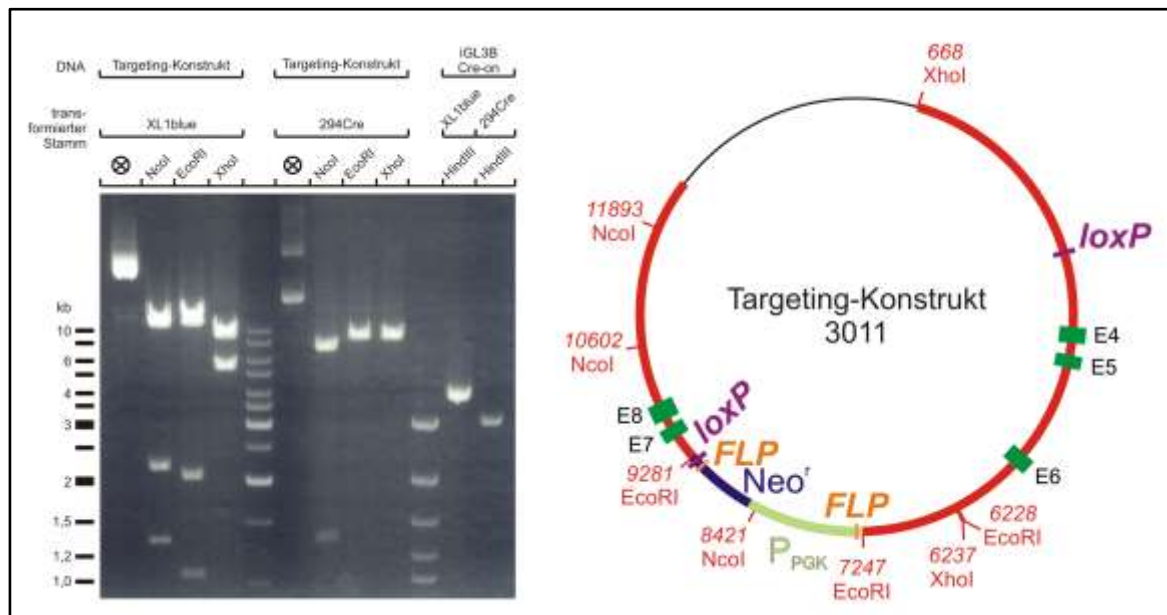


Abbildung 25: In vitro-Rekombination des Targeting-Konstrukts

– **Photografische Dokumentation der analytischen Restriktionen unterschiedlicher Konstrukte mit Restriktionsendonukleasen (links) und schematische Abbildung des Targeting-Konstrukts unter Angabe der jeweiligen Restriktionsenzym-Erkennungsstellen (rechts):** Die *E. coli* Stämme XL1blue und 294Cre wurden sowohl mit dem Targeting-Konstrukt, als auch mit dem Kontrollkonstrukt iGL3B Cre-on transformiert und die Bakterien bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Die alleine vom Stamm 294Cre synthetisierte Cre-Rekombinase bindet an die loxP-Sequenzen im Targeting- und Kontrollkonstrukt und rekombiniert die entsprechenden DNA-Bereiche unter Verkürzung der jeweiligen Vektoren. Die DNA wurde präpariert und mehreren analytischen Restriktionen unterzogen, um die Rekombination zu verifizieren. Die Restriktionsschnittstellen des Targeting-Konstrukts können dem rechten Abbildungsteil entnommen werden.

Der Vergleich der nicht-rekombinierten (XL1blue) mit der rekombinierten DNA (294Cre) zeigt eindeutig die erfolgreiche Rekombination des Targeting-Konstrukts. Die generierten Restriktionsfragmente stimmen mit den Erwartungen überein, Integrität und Orientierung der loxP-Sequenzen innerhalb des Targeting-Konstrukts sind intakt. Das Konstrukt ist demnach funktionstüchtig.

Als Negativ-Kontrolle kam der Bakterienstamm XL1blue zum Einsatz, der keine Cre-Rekombinase exprimieren kann, als Positiv-Kontrolle wurde das geflochte Plasmid iGL3b Cre-on verwendet. Diese Stämme wurden entweder mit dem Targeting-Konstrukt (Plas-

mid 3011) oder dem Kontrollvektor transformiert, bei einer Temperatur von 37°C über Nacht kultiviert und die DNAs im Anschluss isoliert. Die erfolgte Rekombination wurde über unterschiedliche analytische Restriktionen detektiert und verifiziert.

Abbildung 25 zeigt die generierten DNA-Fragmente der rekombinierten bzw. nicht rekombinierten Plasmide, die jeweils die erwarteten Größen aufweisen. Die Funktionalität der in den Vektor eingeführten loxP-Stellen konnte also zweifelsfrei nachgewiesen werden, sodass die ES-Zellen mit dem Targeting-Konstrukt transfiziert werden konnten.

3.2.3 Elektroporation von ES-Zellen

Insgesamt wurden drei Elektroporationen von embryonalen Stammzellen des Typs W9.5 (Szabo und Mann, 1994) mit jeweils 60 µg des linearisierten Targeting-Konstrukts erfolgreich durchgeführt. Nach dem Einsetzen des Neomycin-Selektionsdrucks konnten von der ersten ES-Charge 96 Klone und von den beiden folgenden ES-Chargen insgesamt 5x 96 Klone vereinzelt und kultiviert werden.

3.2.4 Southern-Blot Analysen von ES-Zellen

Um zu überprüfen, ob das Targeting-Konstrukt homolog mit dem DSG2-Lokus der ES-Zellen rekombiniert war, wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurde jeweils DNA aus den ES-Zellen isoliert und mit der Restriktionsendonuklease EcoRV hydrolysiert. Die DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und per Kapillarblot-Verfahren auf eine Nylonmembran transferiert.

Die 3'-externe Sonde, die bereits in Southern-Blot-Analysen genomischer DNA von Qi Tian verwendet worden war (Eshkind et al., 2002), zeigte mit der Methode des „*Random Primed Oligo Labeling*“ nur einen sehr geringen Einbau radioaktiv markierter Nukleotide. Die spezifische Aktivität der Sonde war zu gering, um deutliche Hybridisierungssignale detektieren zu können. Deshalb wurden eine weitere 3'-externe Sonde, sowie eine 5'-externe, eine interne und eine Neomycin-Sonde generiert und die Inkorporation von [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP getestet. Die verwendeten Sonden wurden per PCR hergestellt und umfassten jeweils eine Länge von ca. 1 kb. Dadurch wurde gewährleistet, dass bei den nachfolgenden Markierungsreaktionen eine möglichst große Anzahl an radioaktiv markierten Nuk-

leotiden inkorporiert werden konnte, um später ein starkes Signal detektieren zu können. Die jeweiligen Sequenzen wurden nach den Regeln der Primerwahl mit dem PC-Programm Clone-Manager evaluiert. Die Homologiebereiche mussten innerhalb des jeweiligen zu detektierenden EcoRV-Fragments und im Falle der externen Sonden zusätzlich außerhalb der Sequenzen des Targeting-Konstrukts liegen.

Sonde	Oligonukleotide
5'-extern	03-66_5ext_for 03-67_5ext_rev
3'-extern	03-54_3ext_for 03-72_3ext_rev2
Intern	03-68_int_for 03-69_int_rev
Neomycin	03-70_NeoProbe_for 03-71_NeoProbe_rev

Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, aufgereinigt und die Konzentration der DNA-Fragmente über eine serielle Verdünnung bestimmt. 25 ng des PCR-Produkts wurden per „*Random Primed Oligo Labeling*“ mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP radioaktiv markiert und zur Hybridisierung eingesetzt, wenn die Aktivität der Sonde $\geq 1,2 \times 10^7$ cpm war.

Die Nylonmembranen wurden zunächst mit der 5'-externen Sonde hybridisiert und die Signale auf einem Röntgenfilm visualisiert. Die Klone A12, B8, C7, C12 und E8 zeigten die erwarteten Signale mit einer Größe von ca. 7,4 kb (homolog rekombiniertes Allel) und ca. 15,7 kb (wildtypisches Allel) und wurden zur weiteren Überprüfung von einer der Sicherungsplatten in Kultur genommen. Diese fünf ausgewählten Klone wurden erneut einer Southern-Blot-Analyse unterzogen, wurden diesmal jedoch mit allen drei Sonden (5'-extern, 3'-extern, intern) in Folge hybridisiert. Auf eine Kontrolle mit der Neomycin-Sonde wurde verzichtet, da die ES-Zellklone eindeutig eine Neomycin-Resistenz aufwiesen und die Fragmente der übrigen Sonden die homologe Rekombination zweifelsfrei bestätigten hatten.

In Abbildung 26 sind die Autoradiografien der Southern-Blot-Analysen mit den drei unterschiedlichen Sonden dargestellt. Einzig Klon C12 zeigte bei allen der drei eingesetzten Sonden die erwarteten Signale, bei diesem hat also eine vollständige homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts mit einem der beiden DSG2-Allele stattgefunden.

Weitere Banden, die auf eine zusätzliche nicht homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in das Mausgenom schließen lassen, wurden bei Klon C12 nicht nachgewie-

sen. Die übrigen erneut getesteten Klone (E8, C7, B8) zeigten eine partiell homologe Rekombination und die Rekombination von Klon A12 konnte im zweiten Anlauf nicht verifiziert werden.

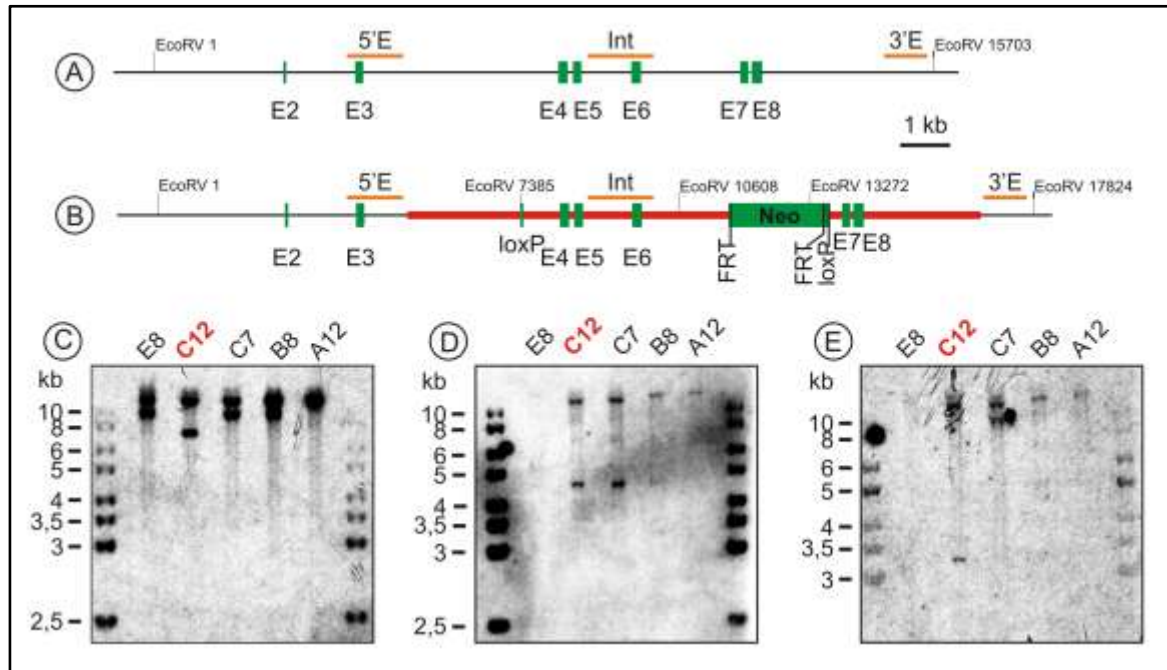


Abbildung 26: Southern Blot Analysen der homologen Rekombination in ES-Zellen

(A), (B): schematische Übersicht der jeweiligen DSG2-Loci unter Angabe der jeweiligen EcoRV-Erkennungsstellen und der genauen Lage der drei eingesetzten Sonden (5'-extern, Intern und 3'-extern), (C) – (E): Autoradiografien der sequenziellen Hybridisierungsreaktionen mit radioaktiv markierten Sonden. (A) wildtypischer und (B) homolog rekombinierter DSG2-Lokus. Die interne Sonde (Int) hybridisiert innerhalb, die beiden externen Sonden (5'E und 3'E) hybridisieren jeweils außerhalb des rekombinierten DSG2-Lokus, um eine teilweise (E8, C7, B8) bzw. nicht homologe Rekombination (A12) zu detektieren. Da mehrere EcoRV-Schnittstellen durch die homologe Rekombination des Targeting-Konstrukts in den DSG2-Lokus eingeführt wurden, ist eine eindeutige Differenzierung zwischen homolog rekombinierten und nicht homolog oder nicht vollständig rekombinierten Targeting-Konstrukten möglich.

Nach erfolgreicher Hybridisierung der 5'-externen (C), 3'-externen (D) sowie der Internen Sonde (E) und autoradiografischer Detektion wurden die jeweiligen radioaktiv markierten DNA-Fragmente durch Strippen entfernt und mit der jeweils nächsten Sonde hybridisiert.

Alle fünf Klone zeigen die wt-Bande (~ 15,7 kb) und im Fall von Klon C12 die unterschiedlichen Rekombinationsfragmente ((A) ~ 7,4 kb, (B) ~ 4,6 kb, (C) ~ 3,2 kb). Die übrigen Klone sind entweder nicht (A12) oder nur teilweise (E8, C7, B8) homolog rekombiniert, wie die generierten EcoRV-Restriktionsfragmente belegen. Klon C12 zeigt das erwartete Bandenmuster einer erfolgreichen homologen Rekombination.

Wegen der geringen Effizienz von nur einem homologen Rekombinationsereignis wurden zwei weitere Elektroporationsexperimente durchgeführt. Aus nicht nachvollziehbaren Gründen war die Rekombinationseffizienz der dritten Elektroporation wesentlich höher. Durch die Hybridisierung der ES-Zell DNA mit einer 5'-externen Sonde konnten 64 aus 288 Klonen positiv getestet werden.

3.2.5 Herstellung der Chimären

Für die weiteren Experimente wurden Zellen des Klons C12 in Kultur gehalten und freundlicherweise von Dr. Eshkind (Mainz) in Blastozysten injiziert, welche ihrerseits wiederum in scheinchwangere Maus-Weibchen transferiert wurden. Die daraufhin geborenen chimären Nachkommen (12 Männchen und 4 Weibchen) wiesen einen Chimärismus von 40% bis 60% auf.

Die männlichen Tiere wurden ab einem Lebensalter von sechs Wochen einzeln gehalten und fortwährend mit jeweils zwei Weibchen des Typs C57Bl/6 verpaart. Über einen Zeitraum von vier Monaten wurden die Weibchen täglich auf Vaginalplaques untersucht und bei positivem Befund vereinzelt. Die Pigmentierung bzw. die Fellfarbe der jeweiligen Nachkommen aus diesen Verpaarungen wurden nach einer Woche in Augenschein genommen. Ausschließlich Tiere mit der Fellfarbe Agouti wurden weiterhin gehalten, ihre Geschwister mit wildtypisch dunklem Haarkleid wurden euthanasiert.

Auch die vier weiblichen Tiere wurden mit männlichen C57Bl/6 Mäusen verpaart, jedoch war die Ausbeute an Nachkommen bei diesen Verpaarungen prinzipbedingt wesentlich geringer. Alle 16 Chimären waren fertil und zeigten keine äußeren Auffälligkeiten wie z.B. Haarverlust, Über- bzw. Untergewicht. Auch die allgemeine Lebenserwartung (1,5 bis 2 Jahre) wurde von den Tieren erreicht. Allerdings wurden aus Ressourcengründen die im zunehmenden Alter nicht mehr fertilen Tiere entfernt.

Insgesamt wurden über 1600 Nachkommen analysiert, jedoch hatte die Keimbahntransmission bei nur zwei der männlichen Chimären stattgefunden. Jeweils ein Nachkomme aus vielen Dutzend zeigte die erwünschte Agouti-Fellfarbe. Diese beiden Jungtiere – ein männliches und ein weibliches – erhielten eine Ohrmarkierung und ihre Schwanzspitzen wurden als Biopsie zur DNA-Gewinnung entnommen. Die isolierte DNA diente als Matrize für eine analytische PCR mit den Oligonukleotiden 03-86 und 03-87, mit deren Hilfe der transgene DSG2-Lokus im weiblichen Tier C12#9 (ein Nachkomme der männlichen Chimäre Nummer 9) nachgewiesen wurde. Dieses Weibchen wurde mehrere Male erfolgreich mit unterschiedlichen männlichen Mäusen verpaart, zeigte also hinsichtlich der Fertilität keinerlei Abweichungen von der Norm. Auch über die Menopause hinaus wurde dieses Tier gehalten, es erreicht ein Alter von überdurchschnittlichen 28 Monaten ohne erkennbare Beschwerden oder Ausfälle.

3.2.6 Generierung von transgenen DSG2-Mauslinien

Es wurden mehrere transgene Stämme generiert, die unterschiedliche Kombinationen von transgenen DSG2-Loci tragen. Da es sich bei diesen Mäusen um Träger homolog rekombinierter Allele handelt, kann ohne nennenswerte Probleme eine homozygote Linie gezüchtet werden. Im Gegensatz zu transgenen Mauslinien, welche mit Hilfe einer Pronukleusinjektion entstanden sind und der genaue Integrationsort des Transgens meist ungewiss bleibt, ist bei homolog rekombinierten Allelen mit geringen Veränderung des Locus keine Beeinträchtigung der Genfunktion zu erwarten. Im Falle der konditionalen Mutagenese des DSG2-Locus liefert die Generierung homozygoter Träger sogar noch Hinweise auf eventuell negative Einflüsse des veränderten Locus selbst (die loxP-Sequenzen bzw. die Neomycinresistenzgen-Kassette). Nach erfolgter FLP-Rekombination (siehe 3.2.6.2) verblieben ausschließlich die beiden loxP-Sequenzen in den Intronen 3 und 6 des DSG2-Gens zurück (DSG2^{loxP}). Sollten also homozygote Träger des Allels DSG2^{loxP-Neo} oder DSG2^{loxP} grobe Defekte aufweisen, so deutete dies auf einen negativen Einfluss der manipulierten Loci hin. Dies ist eindeutig nicht der Fall, beide transgene Mauslinien zeigten keinerlei auffälliges Verhalten, die Tiere waren fertil und erreichten ein durchschnittliches Alter von über 24 Monaten.

Generell entsprechen die genetischen Eigenschaften (Allele) sämtlicher Nachkommen den Mendelschen Gesetzen der Vererbung, was einen weiteren Hinweis auf eine homologe Rekombination allein in Chromosom 18 liefert.

Um homozygote Tiere zu erhalten, musste der Zygotiezustand der Elterntiere bestimmt werden, wobei einfache PCR-Analysen nicht zwischen homo- oder hetero- bzw. hemizygoten Allelen unterscheiden können. Es reicht des Weiteren nicht aus, generell gegen das wildtypische Allel zu selektieren:

Allelfrequenzen nach n Generationen bei Inzucht

$$q_n = q_0 / (1+n*q_0)$$

q_n = Frequenz des Wildtypallels nach n Selektionsgenerationen

q_0 = Frequenz des Wildtypallels zu Beginn der Selektion (0,5)

Liegt ein (transgenes) Allels in heterozygotem Zustand vor ($q_0 = 0,5$), so tragen die Nachkommen einer Inzucht über beispielsweise sechs Generationen das Wildtypallel mit einer Wahrscheinlichkeit von 12,5%. Selbst nach 20 Generationen beträgt die Frequenz des Wildtypallels immer noch 4,5%. Aus diesem Grunde wurde die Analyse des Zygotie-

zustands der Tiere generell über eine klassische Rückkreuzung der fraglichen Tiere mit Trägern wildtypischer Allele realisiert. Alle Nachkommen dieser Rückkreuzungen wurden genotypisiert: waren sämtliche Jungtiere positiv für das transgene Allel (also heterozygot), so ist davon auszugehen, dass der jeweilige transgene Elternteil homozygoter Träger des entsprechenden Allels war. Um eine ausreichend hohe Zahl an Nachkommen testen zu können, wurden Weibchen in der Regel mehrmals gegen männliche Wildtypen rückgekreuzt (sofern die Anzahl ihrer Nachkommen kleiner gleich acht war), sodass die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen genetischen Uniformität des zu testenden Locus möglichst minimiert wurde. Männliche Tiere wurden dagegen generell mit zwei wildtypischen weiblichen Tieren verpaart. Erfolgreich getestete Elterntiere konnten nun als Gründer miteinander gekreuzt werden, um die homozygot transgene Mauslinie zu etablieren.

3.2.6.1 $DSG2^{loxP-Neo}/DSG2^{loxP-Neo}$

Mäuse dieses (Ur-)Stamms wurden absichtlich nicht mit Trägern des Allels der FLP_e-Rekombinase verpaart, um die Neomycinresistenzgen-Kassette zu erhalten. Der Stamm sollte als Sicherung dienen, um ggf. auf die gänzlich unrekombinierte Form des DSG2-Lokus zurückgreifen zu können. Dazu wurde die Maus C12#9 mit C57Bl/6-Männchen rückgekreuzt (P-Generation) und die Nachkommen (F1-Generation) per PCR-Analyse genotypisiert. Heterozygote Träger des transgenen Allels $DSG2^{loxP-Neo}$ (heterozygotes, transgenes Allel : wildtypischem Allel – 1:1) wurden miteinander gekreuzt. Sämtliche Nachkommen dieser Geschwisterverpaarung (F2-Generation) wurden wiederum per PCR-Analyse genotypisiert und die Träger des Allels (homozygot transgen : heterozygot transgen : wildtypisch – 1:2:1) wiederum gegen wildtypische Mäuse rückgekreuzt, um eine homozygote, transgene Linie zu generieren (siehe 3.2.6).

Da sich mit den erfolgreichen Cre-Rekombinations-Experimenten später herausstellte, dass die loxP-Sequenzen intakt waren, wurde diese Linie nicht weitergeführt.

3.2.6.2 $DSG2^{loxP}/DSG2^{loxP}$

Die ca. 2 kb umfassende Neomycinresistenzgen-Kassette wurde aus dem DSG2-Lokus entfernt, um eventuell störende Eigenschaften wie beispielsweise Transspießen dieser DNA-Sequenzen zu eliminieren und einen DSG2-Lokus zu hinterlassen, der eine mög-

lichst geringe Manipulation aufweist. Dazu wurde das Weibchen C12#9 mit einem transgenen Männchen verpaart, welches ein Allel des „*FLPe general deleter*“-Gens trägt (Buchholz et al., 1998) (P-Generation). Die zehn Nachkommen dieser Verpaarung (Tiere 105 bis 114) wurden mittels PCR-Analysen genotypisiert und zeigten dabei für beide Transgene ($DSG2^{loxP-Neo}$ bzw. *FLPe*) eine fast perfekte Mendelsche Vererbung (siehe Abbildung 27). Mit Hilfe weiterer PCR-Analysen wurde festgestellt, dass bereits bei einigen Nachkommen dieser Kreuzung die Neomycinresistenz-Kassette durch die Wirkung der *FLPe*-Rekombinase aus dem Genom entfernt worden war (siehe Abbildung 27).

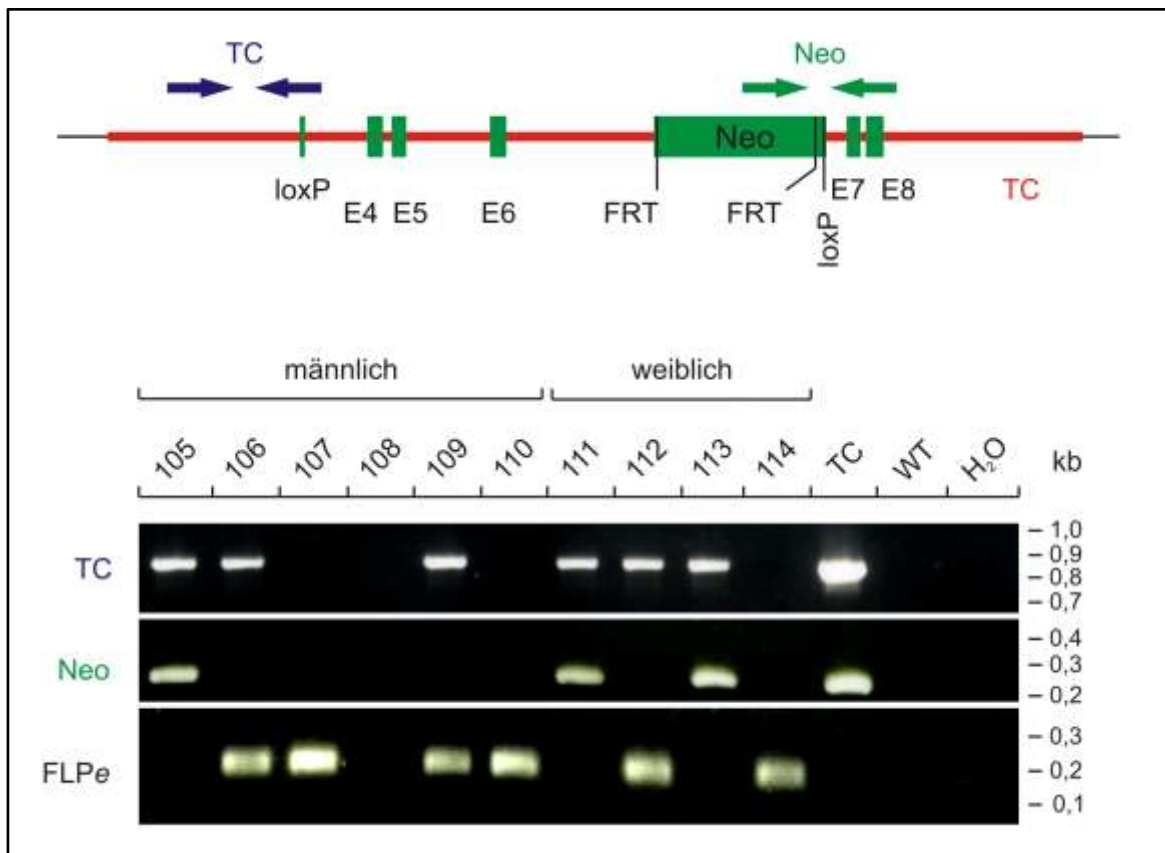


Abbildung 27: Transgene Nachkommen der Gründermaus ($DSG2^{loxP-Neo}$)

– **PCR-Analysen zur Genotypisierung und *FLPe*-induzierte Rekombination, Lage der verwendeten Oligonukleotide und Ergebnisse der Analysen:** Die transgene $DSG2^{loxP-Neo}$ Maus C12#9 wurde mit einem Träger des *FLPe general deleter* Transgens verpaart und die Nachkommen mit den Nummern 105 bis 114 genotypisiert. DNA wurde dazu aus Schwanzbiopsien der Tiere isoliert und als Matrize für unterschiedliche PCR-Analysen eingesetzt. Die Positionen der Primerpaare für den Nachweis des homolog rekombinierten *DSG2*-Locus (TC) und für die erfolgte *FLPe*-induzierte Rekombination (Neo) sind dem oberen Abbildungsteil zu entnehmen.

Sechs der zehn getesteten Tiere sind Träger des transgenen *DSG2*-Allels $DSG2^{loxP-Neo}$. Tragen TC-positive Tiere auch ein Allel der *FLPe*-Rekombinase, so erfolge eine Rekombination der *Neo*-Kassette ($DSG2^{loxP}$). In diesem Fall kann der entsprechende 5'(-Neo)-Primer nicht mehr an die Matrize binden, sodass kein PCR-Fragment mehr entsteht (Mäuse 106, 109, 112).

Diese PCR-Analysen bestätigen die Funktion der *FLPe*-Rekombinase und bestimmen den Genotyp der getesteten Tiere. Sowohl das Verhältnis der transgenen *DSG2*-Allele $DSG2^{loxP-Neo}$ oder $DSG2^{loxP}$ zum WT-Allel, als auch das der *FLPe*-Rekombinase zu nicht *FLPe*-transgenen Tieren entspricht mit jeweils 6:4 beinahe den Erwartungen (5:5).

Diese F1-Tiere hatten demnach den Genotyp $DSG2^{loxP}/DSG2^{wt}$ und wurden durch Inzucht weiter vermehrt. Deren Nachkommen (F2-Generation) wurden dann erstmals gegen C57Bl/6-Tiere rückgekreuzt. Zu diesem Zeitpunkt waren einige der F2-Tiere (wie erwartet ca. 1/4) homozygot, sodass sämtliche Nachkommen der Rückkreuzungen mit diesen Tieren – entsprechend dem ersten Mendelschen Gesetz – mit ihren homozygoten F2-Elterntieren phänotypisch (bzgl. der transgenen DSG2-Allele) uniform waren. Die so gewonnenen homozygoten transgenen $DSG2^{loxP}$ -Stämme wurden als homozygote Linien weitergeführt. Da das *FLPe*-Transgen auf einer Pronukleusinjektion mit unbekannter Zielintegration basiert, wurde darauf geachtet, dass die homozygote Linie $DSG2^{loxP}$ die *FLPe*-Allele wieder verloren hatte. Dazu wurden die Tiere über PCR-Analysen mit den Oligonukleotiden 06-83 und 04-60 genotypisiert und die zweifelsfrei negativ getesteten Tiere zu weiteren Verpaarungen herangezogen.

Sicherheitshalber wurden alle Nachkommen dieser Linie generell per PCR-Untersuchungen mit dem Primerpaar 03-91 und 03-92 genotypisiert. Bislang traten nach zahlreichen Verpaarungen mit insgesamt über 60 homozygoten transgenen Tieren dieses Stammes keine unvorhergesehenen Phänomene wie beispielsweise der Verlust eines Allels auf. Dies konnte mit Hilfe einer weiteren PCR-Untersuchung mit den Primern 03-61b und 03-92 (siehe „Zygotiezustand des loxP-Allels“, Tabelle 51 im Anhang) überprüft werden.

3.2.6.3 $DSG2^{loxP}/DSG2^{delE7-E8}$ bzw. $DSG2^{loxP-Neo}/DSG2^{delE7-E8}$

Dieser Stamm trägt zum einen das induzierbare DSG2-Allel ($DSG2^{loxP}$ bzw. $DSG2^{loxP-Neo}$) und zum anderen ein konstitutiv inaktiviertes DSG2-Allel ($DSG2^{delE7-E8}$, (Eshkind et al., 2002)). Mit diesem Stamm sollte die Möglichkeit geschaffen werden, eine zweite, eventuell unterschiedlich ausgeprägte Reduktion des DSG2-Proteins zu erreichen. Nachkommen der transgenen Maus C12#9, die bereits keine Neomycinresistenz-Kassette mehr in ihrem Genom enthielten, wurden mit (stets heterozygoten) Trägern des konstitutiv inaktivierten DSG2-Allels $DSG2^{delE7-E8}$ verpaart.

Da sich bei den Nachkommen diese beiden Allele auch wieder trennen können (1/4 $DSG2^{loxP};DSG2^{loxP}$ und 1/4 $DSG2^{delE7-E8};DSG2^{delE7-E8}$ (letal)), muss jede Generation aufs Neue mit den Primerpaaren 03-91 und 03-92 für das induzierbare Allel $DSG2^{loxP}$ und mit der Multiplex-PCR (Primer 03-58_ds3, 03-59 und 04-43) für das konstitutiv inakti-

vierte Allel $DSG2^{\text{delE7-E8}}$ genotypisiert werden. Ein homozygoter Zustand des konstitutiv inaktivierten Allels ist letal (Eshkind et al., 2002), sodass das zu erwartende genotypische Verhältnis der Nachkommen nicht 1:2:1 ($DSG2^{\text{loxP}}/DSG2^{\text{loxP}} : DSG2^{\text{loxP}}/DSG2^{\text{delE7-E8}} : DSG2^{\text{delE7-E8}}/DSG2^{\text{delE7-E8}}$), sondern stets 1:2 ($DSG2^{\text{loxP}}/DSG2^{\text{loxP}} : DSG2^{\text{loxP}}/DSG2^{\text{delE7-E8}}$) ist. Sicherheitshalber werden die Tiere, welche nach der Genotypisierung nicht das konstitutiv inaktivierte Allel tragen, einer weiteren PCR-Analyse („Zygotiezustand des loxP-Allels“, Tabelle 51) unterzogen. Dabei trugen sämtliche Tiere zwei Allele des Typs $DSG2^{\text{loxP}}$, sodass eine spätere natürliche Rekombination des $DSG2$ -Lokus nicht erfolgt ist.

Diese Strategie wurde des Weiteren genutzt, um, wie unter 3.2.6 beschrieben, Tiere des Stammes $DSG2^{\text{loxP}}$ bzw. $DSG2^{\text{loxP-Neo}}$ gegen ein „wildtypisches Allel“ rückzukreuzen. Dass natürlich nur ein Allel des stets heterozygoten Stamms $DSG2^{\text{delE7-E8}}$ als rein wildtypisch betrachtet werden kann, ist in diesem Falle unerheblich, denn die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden transgenen Allele $DSG2^{\text{loxP}}$ und $DSG2^{\text{delE7-E8}}$ erlauben eine Diskriminierung derselben. So entstanden quasi als „Nebenprodukt“ Tiere des gewünschten heterozygoten Genotyps $DSG2^{\text{loxP}};DSG2^{\text{delE7-E8}}$ bzw. $DSG2^{\text{loxP-Neo}}/DSG2^{\text{delE7-E8}}$.

3.2.7 Southern-Blot Analysen zur Genotypisierung der transgenen Mäuse

Um die verschiedenen $DSG2$ -Allele nachweisen zu können, wurden wiederum genomische Southern-Blot-Untersuchungen mit der 3'-externen Sonde auf DNA aus Schwanzbiopsien einiger ausgewählter Mäuse durchgeführt. Abbildung 28 bestätigt unterschiedliche $DSG2$ -Allelkombinationen, die bereits durch vorangegangene PCR-Untersuchungen vorhergesagt worden waren. Unter Einwirkung der FLPE-vermittelten Rekombination wurde die Neomycinresistenz-Kassette nachweislich aus dem transgenen $DSG2$ -Lokus entfernt.

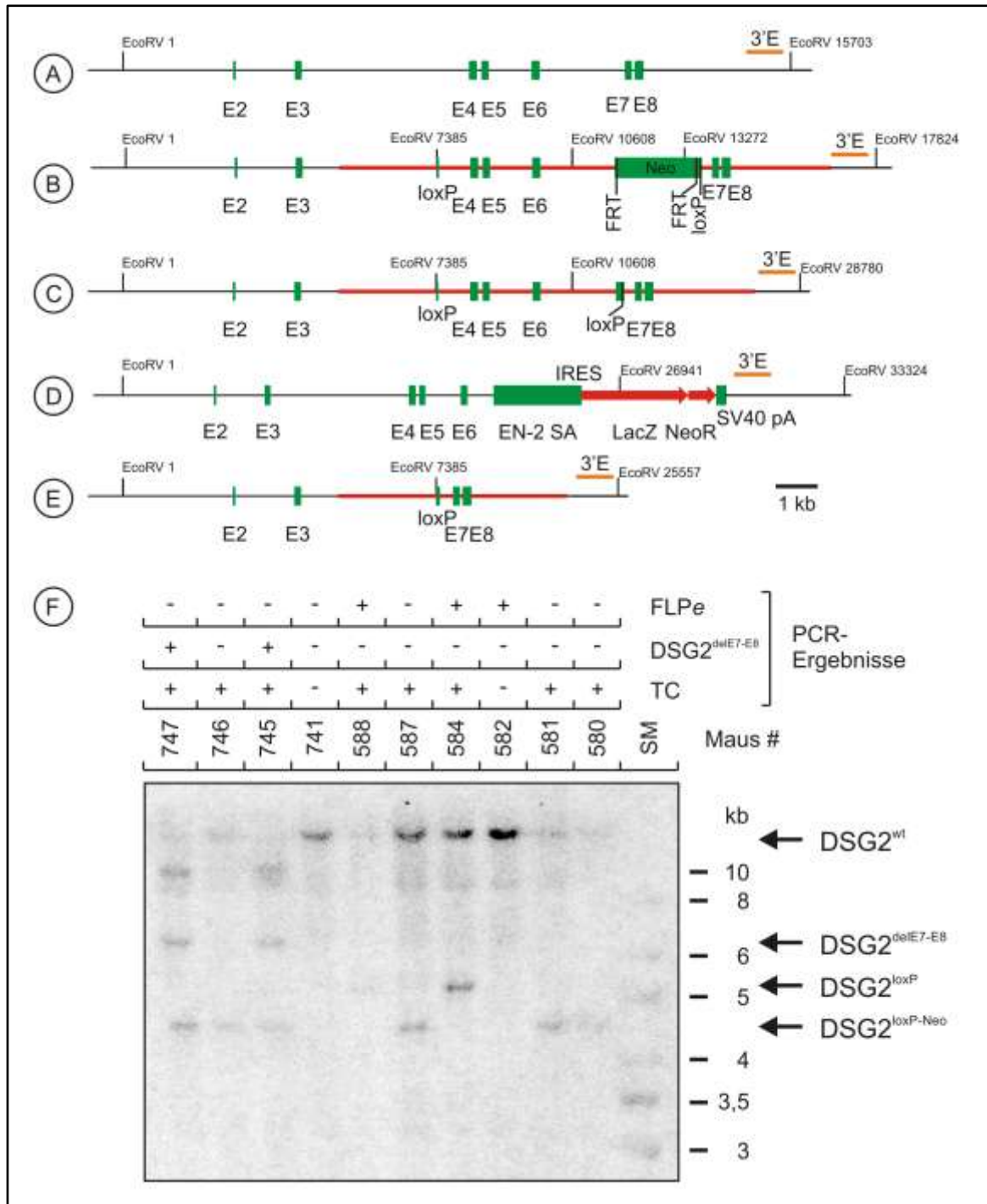


Abbildung 28: Genomische Southern-Blot-Analyse unterschiedlicher DSG2-Allele – Schema verschiedener DSG2-Allele und die jeweilige Lage der für die Southern Blot Analysen eingesetzten 3'-externen Sonde ((A) – (E)) und Autoradiografie (F).

wildtypisches Allel $DSG2^{wt}$ (A), konditional inaktivierbarer, homolog rekombinierter $DSG2$ -Lokus $DSG2^{loxP-Neo}$ (B), konditional inaktivierbarer $DSG2$ -Lokus nach $FLPe$ -induzierter Rekombination und erfolgter Exzision der NFL-Kassette $DSG2^{loxP}$ (C), konstitutiv inaktivierter $DSG2$ -Lokus $DSG2^{delE7-E8}$ (D) und konditional inaktivierter $DSG2$ -Lokus $DSG2^{delE4-E6}$ (E).

(F): EcoRV-verdaute DNA von Mäusen verschiedenen Genotyps ($DSG2^{wt}/DSG2^{wt}$, $DSG2^{wt}/DSG2^{loxP}$, $DSG2^{wt}/DSG2^{loxP-Neo}$, $DSG2^{loxP}/DSG2^{delE7-E8}$) wurde mit einer radioaktiv markierten 3'-externen Sonde hybridisiert. Die generierten DNA-Fragmente stimmen mit den Erwartungen und den Ergebnissen einer vorhergegangenen PCR-Analyse überein. Sämtliche Kombinationen der unterschiedlichen transgenen $DSG2$ -Loci können den einzelnen Banden zugeordnet werden. Die Kombination der Allele von TC und $FLPe$ in ein und demselben Tier (584) sorgt für die $FLPe$ -vermittelte Rekombination der NFL-Kassette. Der daraus resultierende Locus $DSG2^{loxP}$ (584) unterscheidet sich vom nicht-rekombinierten Locus $DSG2^{loxP-Neo}$ (z.B. 587).

3.2.8 Herstellung mehrfach transgener, induzierbarer Mäusstämme

Die Mauslinien, welche die transgenen Eigenschaften für die gewebsspezifische und zeitliche Regulation der Cre-Rekombinase trugen, wurden entweder über die Zentrale Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz (ZVTE), von den Autoren der jeweiligen Mauslinie bezogen oder über die Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA erworben.

Die Mäuse wurden entweder nach der Sanierung des Stammes in der ZVTE über Embryotransfer oder – bei unauffälligem Hygienestatus – direkt in den Tierstall des Anatomischen Instituts transferiert. Dort wurden die Mäuse bis zu Homozygotie der transgenen Allele verpaart, um zum einen die Wahrscheinlichkeit einer Kombination sämtlicher zur Induktion und Rekombination von DSG2 benötigter Allele zu maximieren und zum anderen den Haltungs- und Genotypisierungsaufwand der transgenen Mauslinien möglichst gering zu halten. Des Weiteren wurden diese Homozygoten mit den induzierbaren DSG2^{loxP}- bzw. DSG2^{loxP-Neo}-Varianten verpaart, um Tiere zu erhalten, deren DSG2-Lokus sich induzierbar und gewebsspezifisch rekombinieren ließ. Im Rahmen dieser umfangreichen Zuchtmaßnahmen wurde sämtliche Nachkommen einer Genotypisierung per PCR-Analyse unterzogen um die transgenen Allele nachweisen zu können.

Bei den Verpaarungen wurden keine Kopplungen der transgenen Allele untereinander festgestellt, da sich die einzelnen Allele frei miteinander kombinieren ließen (drittes Mendelsches Gesetz/Unabhängigkeitsregel). Die eingekreuzten transgenen Allele waren also weder auf Chromosom 18, noch auf einem der den Gonosomen lokalisiert.

3.2.9 PCR-Analysen zur Genotypisierung der transgenen Mäuse

Die Genotypen der verschiedenen transgenen Mauslinien wurden über PCR-Analysen genomischer DNA aus Schwanzbiopsien bestimmt. Bis auf die Tiere mit veränderten DSG2-Allelen handelte es sich hierbei um Nachkommen von Gründertieren, die aus einem Pronukleusinjektions-Experiment hervorgegangen sind. Bei diesen Tieren ist der genaue Integrationsort des jeweiligen Transgens unbekannt und eine Analyse des Zygootiezustands nur mit erheblichem Aufwand zweifelsfrei möglich. Die DSG2^{delE7-E8}- und die DSG2^{loxP}-Varianten wurden über eine homologe Rekombination in das Genom inseriert, wobei der Integrationsort festgelegt ist und die transgenen Allele mit Hilfe geeigneter

PCR-Analysen untersucht werden können.

Auch bei Allelen, deren homozygoter Zustand über klassische Rückkreuzungen gegen ein wildtypisches Allel festgestellt worden war, wurde die Genotypisierung durchgeführt. In wenigen Fällen reichte nämlich selbst die hohe Anzahl von zwölf oder mehr heterozygoten Nachkommen dieser Rückkreuzung nicht aus, um den Zygotiezustand der Elterntiere zweifelsfrei bestimmen zu können.

Tabelle 51: PCR-Analysen zur Genotypisierung: verwendete Oligonukleotide (siehe 7.3)

Mauslinie	Nachweis	Primer	Zielsequenz	Referenz
DSG2KO	DSG2 ^{wt} / DSG2 ^{delE7-E8}	03-58_d3	DSG2 (E8)	(Eshkind et al., 2002)
		03-59_d13	DSG2 (I8)	
		04-43	pGTIRES_geopA	-
DSG2 ^{loxP} bzw. DSG2 ^{loxP-Neo}	gefloxtes Allel	03-91	loxP	-
		03-92	DSG2 (E4)	-
DSG2 ^{loxP-Neo}	NFL-Kassette	03-57b	NFL-Kassette	-
		03-58_3' rev	DSG2 (I6)	-
DSG2 ^{loxP} /DSG2 ^X	Zygotiezustand des loxP-Allels	03-61b	DSG2 (I3)	-
		03-92	DSG2 (E4)	-
<i>tetO</i> -Cre	<i>tetO</i> -Cre- Allel	04-38	CRE-cds	(Saam und Gordon, 1999)
		04-39	CRE-cds	
rtTA	rtTA-Allel	04-40	rtTA	(Saam und Gordon, 1999)
		04-41	rtTA	
VilCreER ^{T2}	VilCreER ^{T2} -Allel	04-77	Villin-Promotor	(el Marjou et al., 2004)
		04-78	CRE-cds	
R26CreER ^{T2}	CreER ^{T2} -Allel	04-79	CRE-cds	(Marino et al., 2000)
		04-80	CRE-cds-SV40pA	
α -MHC-opt-rtTA	α -MHC-opt-rtTA- Allel	06-302	α -MHC-Promotor	-
		06-303	opt-rtTA	-
FLPe	FLPe-Allel	06-83	FLPe-cds	-
		04-60	FLPe-cds	Dirk Reutzel
Mer	MerCreMer-Allel	07-03	CRE-cds	Jackson Lab. Maus- Datenbank
		07-04	Östrogenrezeptor	

Waren die zu testenden Mauslinien bereits publiziert worden, so wurde für die PCR-Analysen auf bereits veröffentlichte Parameter zurückgegriffen. In einigen Fällen wurden jedoch zur besseren Unterscheidungsmöglichkeiten der einzelnen Stämme neue Oligonukleotide entworfen, getestet und ggf. angewendet. In Tabelle 51 werden die Oligonukleotide aufgeführt, die bei den Analysen der transgenen Loci verwendet wurden, die PCR-Programme, sowie weitere Informationen zu den Genotypisierungs-Analysen können den Anhängen 7.4 und 7.5 entnommen werden.

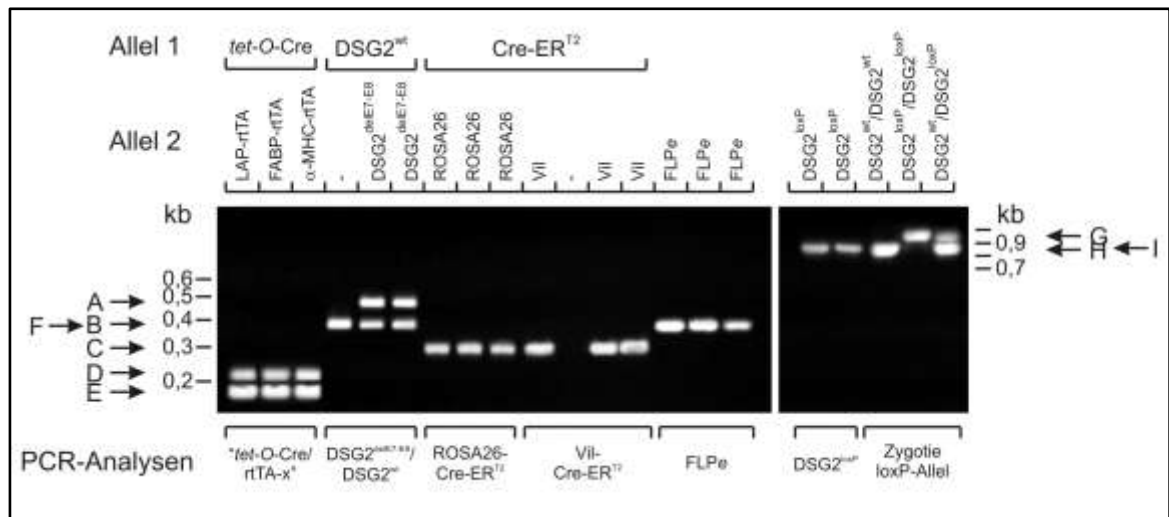


Abbildung 29: PCR-Analysen zur Genotypisierung von transgenen Mäusen

– **Zusammenstellung von PCR-Produkten einiger Genotypisierungs-Analysen zum Nachweis verschiedener transgener Allele:** DNA wurde aus Schwanzbiopsien zum Teil mehrfach transgener Mäuse isoliert und als Matrice für genomische PCR-Analysen eingesetzt (siehe Tabelle 51 bzw. Anhänge 7.4 und 7.5). Der PCR-Assay „tet-O-Cre/rtTA-x“ unterscheidet nicht zwischen den drei unterschiedlichen rtTA-Allelen LAP, FABP und α-MHC. Die ca. 50 bp umfassende Insertion der loxP-Sequenz in das DSG2-Gen diskriminiert ein DSG2^{wt}- von einem DSG2^{loxP}-Allel, wie durch die PCR-Analyse „Zygotie loxP-Allel“ gezeigt werden kann.

A und B: DSG2^{delE7-E8} (500 bp), DSG2^{wt} (361 bp); C: Cre-ER^{T2} (300 bp); D und E: rtTA (220 bp), tet-O-Cre (180 bp); F: FLPe (464 bp); G und H: DSG2^{loxP} (925 bp), DSG2^{wt} (876 bp) – loxP-Allel homo- oder heterozygot; I: DSG2^{loxP} (860 bp – Nachweis der loxP-Sequenz selbst)

3.2.10 PCR-Test auf Cre-vermittelte genomische Rekombination

Die gewebsspezifische Induktion der Cre-Rekombinase durch die entsprechenden Induktoren Tamoxifen bzw. Doxyzyklin wurde anhand der erfolgten Rekombination des DSG2-Lokus festgestellt. Dazu wurde eine PCR-Analyse als ebenso schneller wie aussagekräftiger Test entwickelt, um die Ergebnisse der nachfolgenden Induktionsexperimente zu evaluieren. Zum Einsatz kamen die Oligonukleotide 03-86 und 03-58_3'rev, die spezifisch an Sequenzen in Intron 3 bzw. Intron 7 des DSG2-Gens binden. Nur nach erfolgreicher Rekombination des DSG2-Lokus wird ein 860 bp umfassendes PCR-Produkt gebildet (siehe Abbildung 30).

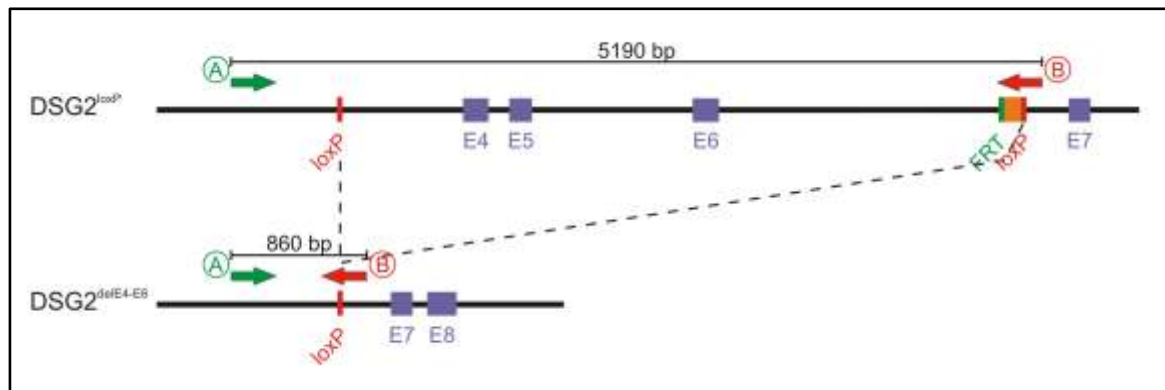


Abbildung 30: PCR-Test auf Rekombination des DSG2-Lokus

– **schematische Abbildung:** Durch die Cre-vermittelte Rekombination der beiden loxP-Sequenzen werden die Exone E4 bis E6 aus dem DSG2-Lokus entfernt. Die Bindungsstellen der beiden Primer (A: 03-86) und (B: 03-58_3'rev) flankieren den zu deletierenden DNA-Bereich, sodass bei erfolgreicher Rekombination ein PCR-Produkt von 860 bp entsteht. Diese Strategie wurde im Folgenden angewandt, um die gewebsspezifische Rekombination des DSG2-Lokus zu evaluieren.

E4 bis E8: Exone

3.2.11 Das Tet-On- System zur gewebsspezifischen Induktion

Um die Cre-Rekombinase exklusiv in der Leber, im Darm und im Herzmuskel zu exprimieren, wurde der zeitlichen Regulierbarkeit des Tet-On-Systems über die Gabe des Induktors eine gewebsspezifische Komponente hinzugefügt. Es kamen gewebsspezifische Promotoren für die Expression des rtTA (Darm: (Saam und Gordon, 1999); Leber: (Kistner et al., 1996; Schonig und Bujard, 2003; Wilkinson et al., 2006); Herz: (Valencik und McDonald, 2001; Russell et al., 2004) zum Einsatz, welche die Regulation des Transgens spezifisch in den jeweiligen Geweben der Tiere kontrollierten.

3.2.11.1 Induktion in der Leber: LAP-rtTA/tetO- P_{hCMV} -Cre

Um Transgene gewebsspezifisch in Hepatozyten zu exprimieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das in der Einleitung (siehe 1.2.2.1) beschriebene Cre/lox-System mit dem leberspezifischen Tet-On-System kombiniert. Bei diesem wird einerseits der rtTA (*effector*) durch den leberspezifischen Promotor des *Liver Activator Protein* (LAP) reguliert (Talbot et al., 1994; Kistner et al., 1996; Urlinger et al., 2000), andererseits wird das Zielgen unter die Kontrolle des minimalen P_{hCMV} gestellt, dessen Aktivität seinerseits vom *tetO* abhängt. Im Falle des vorliegenden Experiments zur gewebsspezifischen und induzierbaren Deletion der geflochtenen DSG2-Allele, wurde die Cre-Rekombinase (*responder*) als Zielgen

eingesetzt (Saam und Gordon, 1999). Ihre Expression ist strikt reguliert und auf die Leber begrenzt, wie Experimente mit Reporterstämmen zeigten (Schonig et al., 2002). Das gefloxtete DSG2-Gen kann also zeitlich und gewebsspezifisch in Hepatozyten rekombiniert werden.

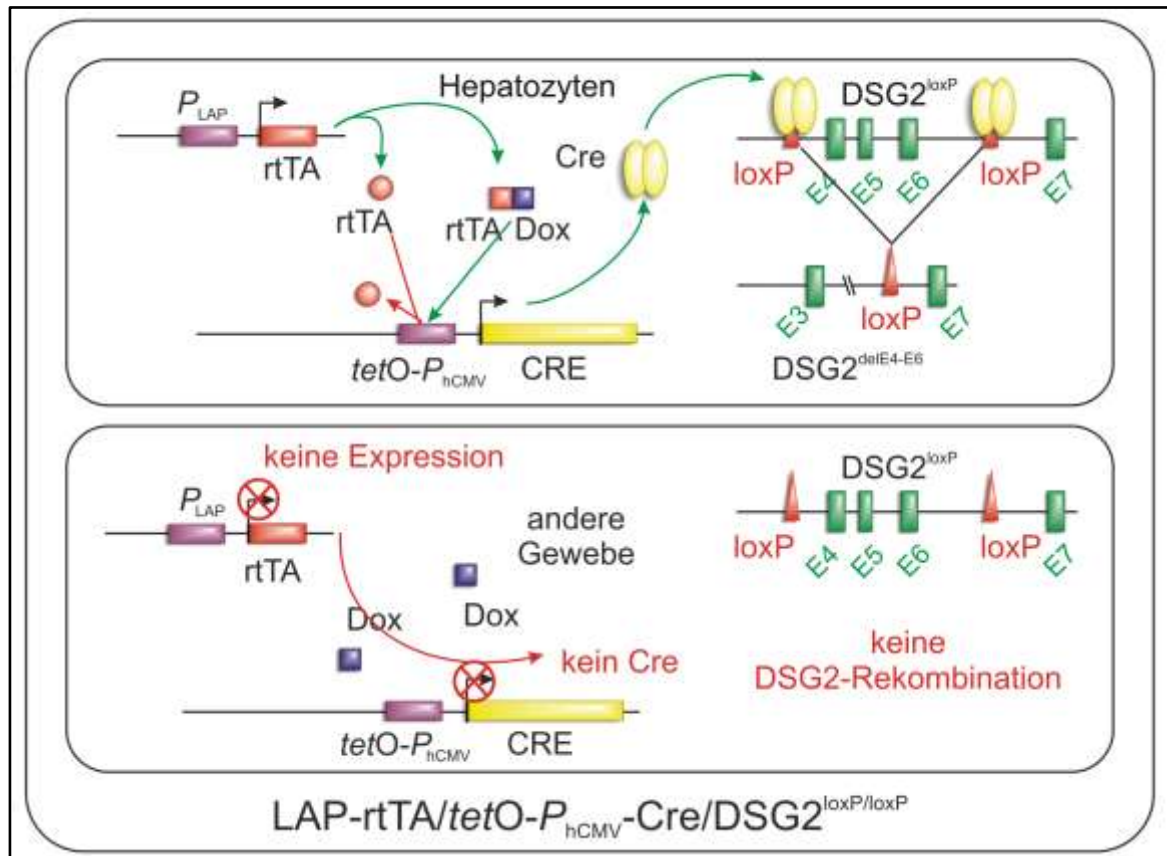


Abbildung 31: Die induzierbare und leberspezifische Rekombination des DSG2-Lokus in der Maus. Der ausschließlich in Hepatozyten aktive Promotor des *Liver Activator Protein* P_{LAP} exprimiert den reversen tetrazyklinabhängigen Transaktivator rtTA. Dieser bindet ohne den Induktor Doxycyclin nicht an den Tet-Operon. Nach Zugabe des Induktors aktiviert der rtTA die Expression der Cre-Rekombinase, die nun an die *gefloxteten* DNA-Sequenzen des DSG2-Lokus binden und diese rekombinieren kann. Da in den restlichen Geweben des Organismus der P_{LAP} nicht aktiv wird, ist in diesen Geweben auch kein rtTA vorhanden, das System bleibt inaktiv. Somit ist die induzierbare Rekombination des Zielgens auf Hepatozyten beschränkt.

P_{LAP} : leberspezifischer Promotor des *Liver Activator Protein*; rtTA: Gen des reversen tetrazyklinabhängigen Transaktivators; $tetO-P_{hCMV}$: minimaler humaner CMV-Promotor unter der Kontrolle des tetrazyklinsensitiven Operons; CRE: Gen der Cre-Rekombinase; Dox: Doxycyclin (=Tetrazyklin – Induktor des Systems); E4 bis E7: Exone 4 bis 7 des DSG2-Gens; loxP: Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase

Mäuse der entsprechenden Genotypen wurden miteinander verpaart, sodass sämtliche benötigten Eigenschaften des Induktionssystems ($DSG2^{loxP}$, $LAP-rtTA$ und $tetO-P_{hCMV}-Cre$) in einem Tier vereint waren. Die Induktion wurde durch Gabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 7,5 mg/ml gezuckertem Trinkwasser (10% w/v Saccharose) ausgelöst. Nach Ablauf von sieben Tagen wurden die Tiere getötet, einige Gewebe präpariert und bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Um die leberspezifische Rekombination des DSG2-Lokus nachweisen zu können, wurde DNA aus den entnommenen Geweben isoliert und als Matrize

für PCR-Analysen eingesetzt. Die verwendeten Primer binden dabei außerhalb des zu deletierenden Bereichs, sodass im Falle einer erfolgreichen Rekombination ein PCR-Produkt von 860 bp gebildet wird (vergleiche Abbildung 30).

Zur Kontrolle der isolierten DNA wurde jeweils ein Fragment aus dem wildtypischen DSG2 Locus amplifiziert. Abbildung 32 zeigt eine durch Gabe von Doxyzyklin induzierbare Rekombination des Zielgens DSG2 exklusiv in der Leber. Die restlichen Gewebe des induzierten Tiers und sämtliche getesteten Gewebe des Kontrolltieres weisen keine Banden für das rekombinierte DSG2-Gen auf. Das Rekombinationssystem ist also funktionsfähig und kann zu weiteren Versuchen der leberspezifischen induzierbaren Depletion des DSG2-Gens eingesetzt werden.

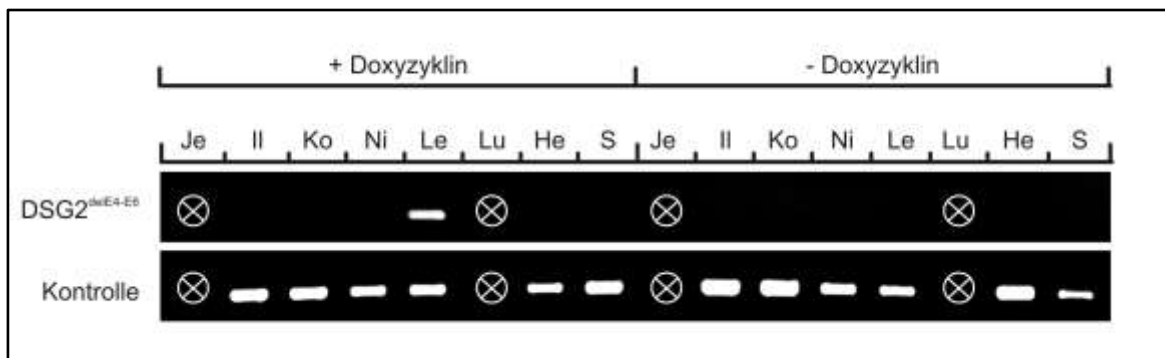


Abbildung 32: Induzierbare zelltypspezifische Rekombination des DGS2-Lokus in der Leber
 – **Ergebnisse der PCR-Analysen:** Nach siebentägiger Induktion mit Doxyzyklin bzw. Zuckerwasser allein wurden die Tiere getötet. DNA wurde aus unterschiedlichen Geweben (Jejunum (Je), Ileum (Il), Kolon (Ko), Niere (Ni), Leber (Le), Lunge (Lu), Herz (He) und Schwanz (S)) isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt. Die Ergebnisse belegen die strikte Kontrolle des LAP-rtTA/tetO-Cre-Systems hinsichtlich der Induzierbarkeit, sowie die Gewebsspezifität der DSG2-Rekombination, welche sich auf die Leber beschränkt.

Nachdem auf eine größere Anzahl von Tieren zurückgegriffen werden konnte, wurde der zeitliche Verlauf der Rekombination untersucht. Dazu wurden mehrere Tiere über einen Zeitraum von 1 bis zu 16 Tagen mit Doxyzyklin behandelt, nach dem Absetzen des Induktors getötet und Gewebeproben der Leber entnommen.

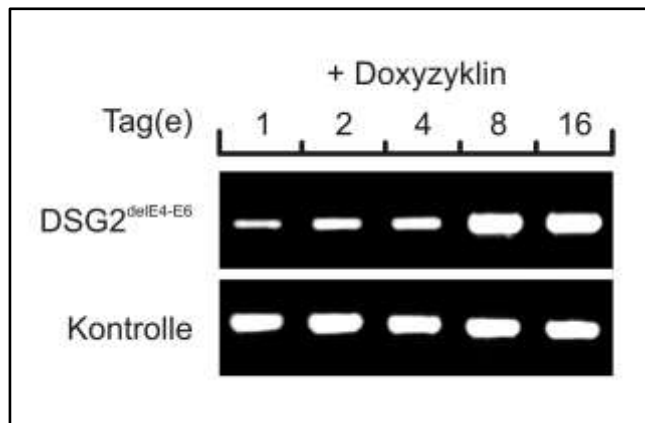


Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der DSG2-Rekombination

– PCR-Analysen: Fünf Tieren wurde über einen unterschiedlich langen Zeitraum Doxyzyklin über das Trinkwasser verabreicht und diese nach Abschluss der Behandlung getötet. DNA wurde aus Gewebeproben der Leber isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt.

Die genomischen PCR-Analysen belegen den frühen Einsatz der Rekombination: bereits nach 24 h ist ein PCR-Produkt des rekombinanten Locus detektierbar.

Die Effizienz der Induktion erreicht zwischen vier und acht Tagen ein Maximum, eine Medikation mit Doxyzyklin darüber hinaus führt zu keiner weiteren Zunahme. Es wurden hierbei vergleichbare Mengen an genomischer DNA (100 ng) eingesetzt, wie die gleiche Stärke der Kontrollbanden unterstreicht

Aus diesen Gewebsfragmenten wurde wiederum DNA isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt. Bereits 24 Stunden nach Beginn der Induktion konnte eine geringe Rekombination des DSG2^{loxP}-Lokus nachgewiesen werden (Abbildung 33), die mit anhaltender Gabe von Doxyzyklin weiter anstieg und zwischen Tag 4 und 8 ein Maximum erreichte. Die Verdopplung der Induktionsdauer auf 16 Tage zeigte – zumindest mit dieser Nachweismethode – keine weitere Zunahme der Rekombinationseffizienz.

3.2.11.2 Induktion im Herzmuskel: α -MHC-opt-rtTA/*tetO*-*P*_{hCMV}-Cre

Das System zur induzierbaren und gewebsspezifischen Expression der Cre-Rekombinase im Herzmuskel basiert ebenso wie die in 3.2.11.1 vorgestellte Methode für die Expression von Cre in Hepatozyten auf den beiden Komponenten rtTA und *tetO*-*P*_{hCMV}-Cre (siehe Abbildung 34). Indem 52 Triplets der kodierenden DNA-Sequenz des rtTA mit der *codon usage* der Maus abgestimmt wurden, konnte die Expressionsrate des rtTA weiter erhöht werden (Valencik und McDonald, 2001). Valencik und McDonald erreichten durch diese Mutationen des rtTA (*effector*) im direkten Vergleich zum nicht optimierten rtTA-System eine ca. 40-fache Steigerung der Expressionsraten für ein nachgeschaltetes Luziferase-Reportergen (*responder*). Allerdings wird das opt-rtTA-Gen bei Weitem nicht in allen Kardiomyozyten exprimiert, es wurde ein eher geflecktes Expressionsmuster beschrieben (Valencik und McDonald, 2001). Hierbei scheinen Positioneffekt-Variegationen eine Rolle zu spielen: das umgebende Chromatin kann am Integrationsort des α -MHC-opt-rtTA einen stark reprimierenden Einfluss auf die Transkription des opt-rtTA-Gens nehmen.

Mäuse der entsprechenden Genotypen wurden miteinander verpaart, sodass sämtliche benötigten Eigenschaften ($DSG2^{loxP}$, α -MHC-opt-rtTA und $tetO$ - P_{hCMV} -Cre) in einem Tier vereint waren. Die Induktion wurde durch Gabe von Doxyzyklin im Trinkwasser ausgelöst. Nach sieben Tagen wurden die Tiere getötet, einige Gewebe präpariert und bei -80°C gelagert. Um die herzspezifische Rekombination des DSG2-Lokus nachzuweisen, wurde DNA aus den entnommenen Geweben isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt.

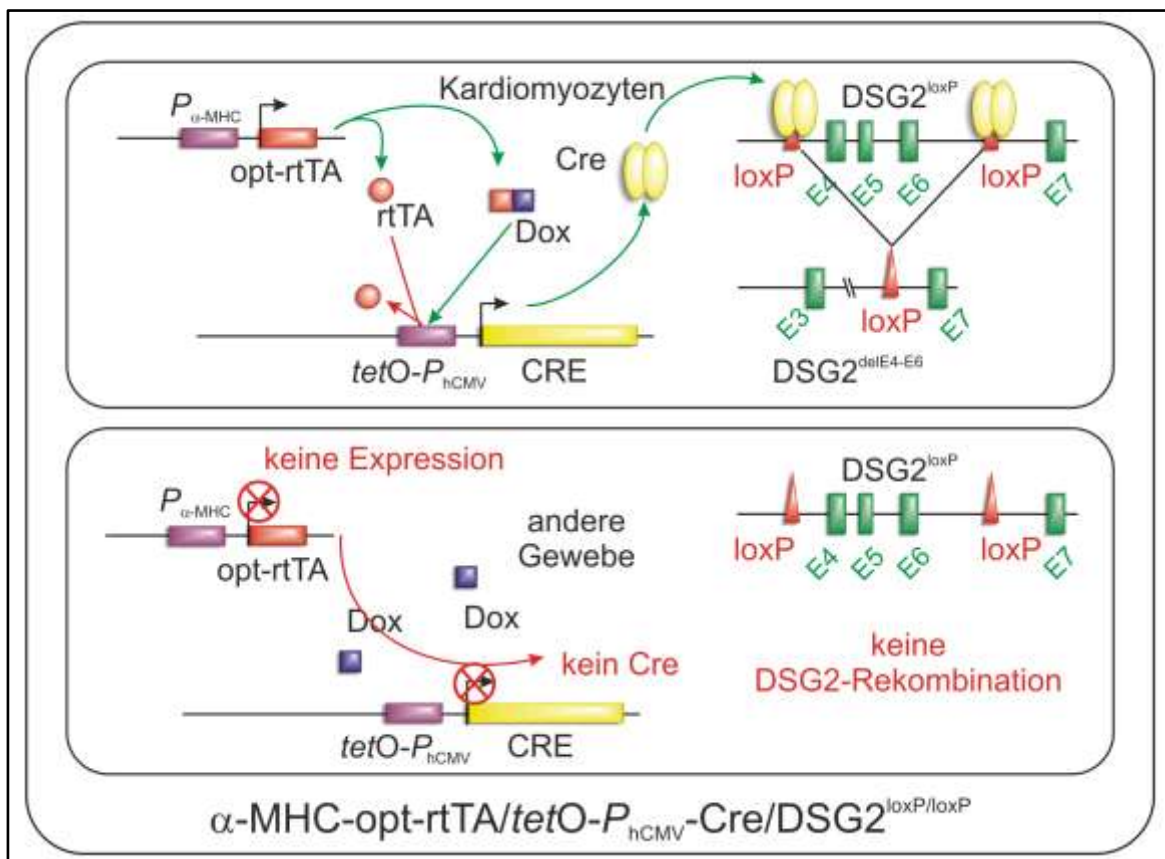


Abbildung 34: Die induzierbare und herzmuskelspezifische Rekombination des DSG2-Lokus in der Maus.

Der ausschließlich in Kardiomyozyten aktive Promotor der schweren Kette des Myosin $P_{\alpha\text{-MHC}}$ exprimiert den optimierten reversen tetrazyklinabhängigen Transaktivator rtTA. Dieser bindet ohne den Induktor Doxyzyklin nicht an den Tet-Operator. Nach Zugabe des Induktors aktiviert der rtTA die Expression der Cre-Rekombinase, die nun an die *geflochten* DNA-Sequenzen des DSG2-Lokus binden und diese rekombinieren kann. Da in den restlichen Geweben des Organismus der $P_{\alpha\text{-MHC}}$ nicht aktiv wird, ist in diesen Geweben auch kein rtTA vorhanden, der das System aktivieren könnte. Somit ist die induzierbare Rekombination des Zielgens auf Kardiomyozyten beschränkt.

$P_{\alpha\text{-MHC}}$: herzspezifischer Promotor des Gens für die schwere Kette des Myosin; opt-rtTA: codon-optimiertes Gen des reversen tetrazyklinabhängigen Transaktivators; $tetO$ - P_{hCMV} : minimaler humaner CMV-Promotor unter der Kontrolle des tetrazyklinsensitiven Operons; CRE: Gen der Cre-Rekombinase; Dox: Doxyzyklin (=Tetrazyklin – Induktor des Systems); E4 bis E7: Exone 4 bis 7 des DSG2-Gens; loxP: Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase

Die verwendeten Primer binden außerhalb des zu deletierenden Bereichs, sodass im Falle einer erfolgreichen Rekombination ein PCR-Produkt von 860 bp gebildet wird (verglei-

che Abbildung 30). Zur Kontrolle der isolierten DNA wurde jeweils ein Fragment aus dem wildtypischen DSG2-Lokus amplifiziert. Im Gegensatz zur erfolgreichen DSG2-Depletion in der Leber nach Gabe von Doxzyklin konnte selbst bei mehreren getesteten Tieren und unabhängigen Versuchen keine Rekombination im Herzen nachgewiesen werden. Die von den Autoren des α -MHC-opt-rtTA angegebene Induktionsdauer von fünf Tagen wurde dabei sogar um zwei Tage überschritten (Valencik und McDonald, 2001). Trotz erfolgreicher Wiederholung der genomischen PCR-Analysen der mehrfach transgenen Mäuse konnte dieses induzierbare herzspezifische Rekombinations-System nicht etabliert werden.

Aus diesem Grunde wurde ein weiteres induzierbares System verwendet, das eine exklusive Expression der Cre-Rekombinase im Herzen ermöglicht: MerCreMer (Sohal et al., 2001), welches im Abschnitt 3.2.12.2 näher beschrieben wird.

3.2.11.1 Induktion im Darm: FABP-rtTA/*tetO*- P_{hCMV} -Cre

Um Transgene gewebsspezifisch in Enterozyten zu exprimieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das in der Einleitung (siehe 1.2.2.1) beschriebene Cre/lox-System mit dem darm-spezifischen Tet-On-System kombiniert. Bei diesem wird einerseits der rtTA (*effector*) durch den darmspezifischen Promotor des *Fatty Acid Binding Proteins* (FABP) reguliert, andererseits wird das Zielgen unter die Kontrolle des minimalen P_{hCMV} gestellt, dessen Aktivität seinerseits vom *tetO* abhängt. Im Falle des vorliegenden Experiments zur gewebsspezifischen und induzierbaren Deletion der geflochten DSG2-Allele, wird die Cre-Rekombinase (*responder*) als Zielgen eingesetzt (Saam und Gordon, 1999). Ihre Expression ist strikt reguliert und auf die Gewebe des Darms begrenzt, wie Experimente mit Reporterstämmen zeigten (Saam und Gordon, 1999). Ein gefloxtes Zielgen kann also zeitlich und gewebsspezifisch in Enterozyten rekombiniert werden.

Nachdem Vorversuche negative Ergebnisse hinsichtlich einer stabilen und gleichmäßigen Expression der Cre-Rekombinase gezeigt hatten, wurde der Einsatz des FABP-rtTA-Systems zur darmspezifischen Induktion nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde das vil-Cre-ER^{T2}-Transgen (vergleiche 3.2.12.1) verwendet, um DSG2 im Darm zu rekombinieren.

3.2.12 Das Cre-ER^{T2}- System zur gewebspezifischen Induktion

Die genetischen und mechanistischen Vorteile des unitransgenen Cre-ER^{T2}-Rekombinationssystems (siehe 1.3.2) wurden genutzt, um die Cre-vermittelte Rekombination in den Geweben des Darmes (el Marjou et al., 2004) und des Herzmuskels (Valencik und McDonald, 2001) zu erreichen. Für eine ubiquitäre Rekombination des DSG2-Gens kam das ROSA26-Cre-ER^{T2}-System (Hameyer et al., 2007) zum Einsatz.

3.2.12.1 Induktion im Darm: vil-Cre-ER^{T2}

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse des Typs vil-Cre-ER^{T2} verwendet (el Marjou et al., 2004), um die geflochtenen DSG2-Allele darmspezifisch und zeitlich gesteuert deletieren zu können. Diese transgenen Tiere tragen das rekombinante Gen der Cre-Rekombinase und des ER^{T2} unter der Kontrolle des darmspezifischen Villin-Promotors in einer trun-kierten Form. Die Mäuse zeichnen sich durch eine stabile und gewebspezifische Expression der Cre-Rekombinase in den Epithelien des Darms (*Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon*) sowie der Niere aus, eine basale Expression des Proteins wurde nicht beschrieben: sowohl in den Zellen der Krypten des Darmepithels, als auch die weiter apikal gelegenen Epithelzellen und Gobletzellen wiesen eine nukleäre Lokalisation des Cre-ER^{T2} Proteins auf. Die basal-apikal graduell zunehmende Intensität dieser Kernfärbungen korrelierte mit der natürlichen Expression des endogenen Villin-Gens. Verpaarungen mit ROSA26/ β -Galaktosidase-Reporterstämmen (R26R – (Soriano, 1999)) zeigten eine hochspezifische Färbung der Enterozyten (Krypten und apikale Zellverbände), die Zellen des Bindegewebes, der Muskelschichten, der Endothelien und der innervierenden Fasern blieben ungefärbt: die hochspezifische Wirkung der Cre-Rekombinase ist also auf die Zellen des Darmes beschränkt. Aufgrund der hohen Austauschraten der Darmepithelzellen ist – gerade für Proteine mit langer Halbwertszeit – eine zielgerichtete Ausschaltung des fraglichen Gens in den proliferativen Stammzellen der Krypten notwendig, denn erst dann wird auch der Verlust eines dauerhaften Proteins Auswirkungen haben. Im vil-Cre-ER^{T2} Mausstamm deletiert die Cre-Rekombinase geflochte Gensequenzen auch in den Stammzell-Kompartimenten des Darmgewebes.

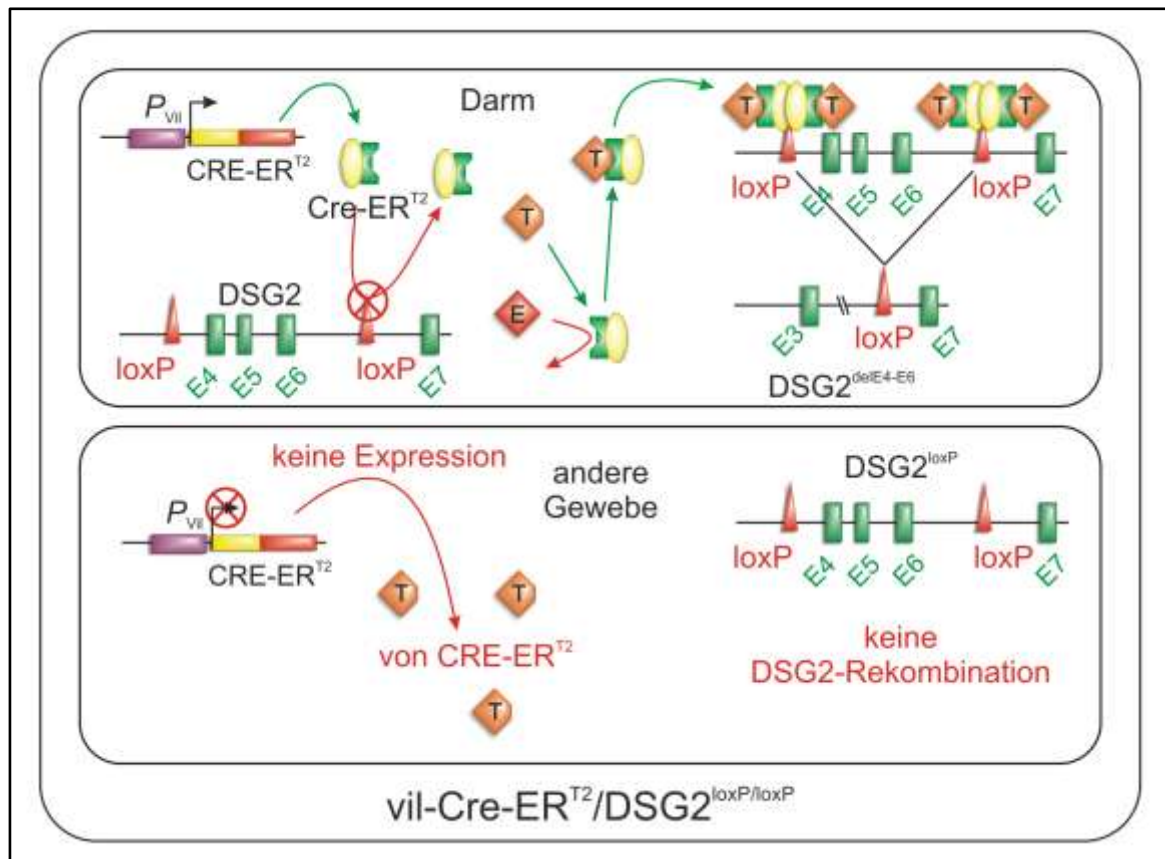


Abbildung 35: Die induzierbare und darmepithelspezifische Rekombination des DSG2-Lokus in der Maus.

Der ausschließlich in Enterozyten aktive Promotor des Villin-Gens P_{vil} exprimiert ein Gen, das für das chimäre Protein Cre-ER^{T2}, bestehend aus der Cre-Rekombinase und einer mutierten Ligandenbinde-Domäne (LBD) des humanen Östrogenrezeptors (ER) kodiert. Ohne den Induktor Tamoxifen liegt die inaktive Proteinchimäre an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) gebunden im Zytoplasma vor. Durch Zugabe des Induktors wird Cre-ER^{T2} aktiviert, löst sich von HSP90 und transloziert in den Kern, wo es spezifisch die geflochtenen DSG2-Allele rekombiniert. In anderen Geweben wird kein chimäres Protein produziert, sodass die Cre-vermittelte Rekombination auf die Darmepithelzellen beschränkt ist.

P_{vil} : Darmepithelzellen-spezifischer Promotor des Villin-Gens; CRE-ER^{T2}: Gen für das Fusionsprotein; Cre: Cre-Rekombinase; ER^{T2}: punktmutierte Ligandenbinde-Domäne des humanen Östrogenrezeptors; Cre-ER^{T2}: chimäres Protein; E4 bis E7: Exone 4 bis 7 des DSG2-Gens; loxP: Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase; DSG2^{delE4-E6}: rekombinierter DSG2-Lokus

Obwohl die Expression der Cre-Rekombinase nach Absetzen der Induktion mit Tamoxifen stoppt, so wurde nach einer Verpaarung mit R26R-Stämmen (Soriano, 1999) die Aktivität der β -Galaktosidase noch nach bis zu 60 Tagen in 80% der Zellen des Dünndarmes und in 40% der Zellen des Kolons nachgewiesen. Im Vergleich zu anderen induzierbaren Cre-Rekombinasesystemen für Darmepithelien – wie beispielsweise FABP-rtTA/*tetO*- P_{hCMV} -Cre (Saam und Gordon, 1999), das eine heterogene und meist nur schwache Rekombination der Zielgene ermöglicht – gewinnt der vil-Cre-ER^{T2} Mausestamm durch seine robuste und homogene Cre-Expression. Da in Mäusen der proximale Abschnitt des Darmes eher zu Tumoren neigt als der distale Kolon (Fodde et al., 1994; Janssen et al., 2002), ist der Stamm vil-Cre-ER^{T2} insbesondere wegen der starken und den gesamten Darm betreffenden Effektivität der Rekombinase für Studien an onkologisch relevanten Genen

interessant.

Homozygote Mäuse des Stammes $\text{vil-Cre-ER}^{\text{T2}}$ wurden aus dem Institut Curie-CNRS, Paris, Frankreich (Dr. Robine) importiert und über Embryotransfer in den SPF-Bereich der Zentralen Versuchstiereinrichtung überführt. Diese heterozygoten Tiere wurden durch eine Inzuchtverpaarung in einen homozygoten Zustand überführt. Heterozygote und homozygote Tiere wurden wiederum sowohl mit homozygoten Trägern des induzierbaren DSG2-Allels ($\text{DSG2}^{\text{loxP}}$), als auch mit heterozygoten induzierbaren DSG2-Tieren ($\text{DSG2}^{\text{loxP}}; \text{DSG2}^{\text{delE7-E8}}$) gekreuzt. Nachdem eine ausreichend große Anzahl von mehrfach transgenen Tieren verfügbar war, wurden erste Induktionsversuche durchgeführt.

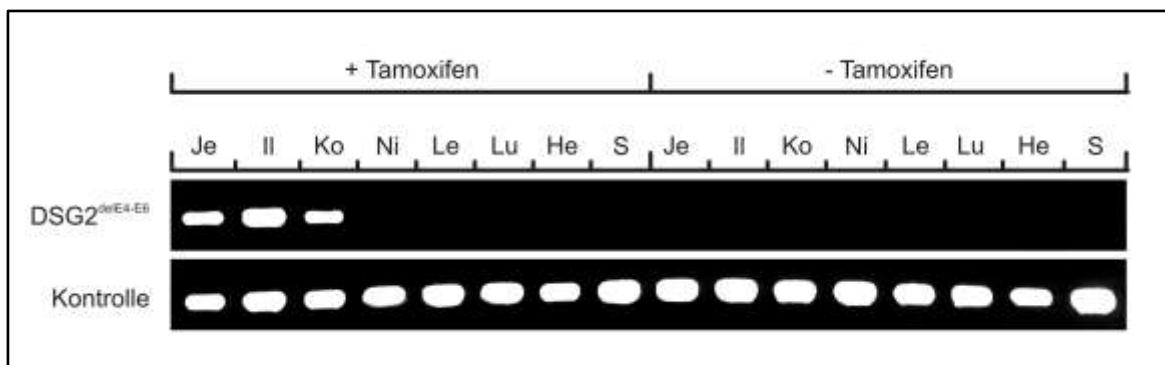


Abbildung 36: Die induzierbare und zelltypspezifische Rekombination des DGS2-Lokus in den Geweben des Darmes

– **Ergebnisse der PCR-Analysen:** Nach fünftägiger Induktion mit Tamoxifen bzw. Vehikel wurden die Tiere geopfert. DNA wurde aus unterschiedlichen Geweben (Jejunum (Je), Ileum (Il), Kolon (Ko), Niere (Ni), Leber (Le), Lunge (Lu), Herz (He) und Schwanz (S)) isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt. Die Ergebnisse belegen die strikte Kontrolle des $\text{VilCreER}^{\text{T2}}$ -Systems hinsichtlich der Induzierbarkeit, sowie die eindeutige Gewebsspezifität der Rekombination des Zielgens, welche auf den Darm beschränkt ist. Eine Expression der Cre-Rekombinase in der Niere konnte nicht nachgewiesen werden.

Dazu wurde den Versuchstieren an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 1 mg Tamoxifen bzw. das Vehikel Äthanol/Speiseöl *i.p.* injiziert und die Tiere im Anschluss getötet. Proben mehrerer Gewebe wurden entnommen und bei -80°C gelagert. Aus diesen Gewebeproben wurde DNA isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt. Die Abbildung 36 verdeutlicht einerseits die strikte Induzierbarkeit des $\text{vil-Cre-ER}^{\text{T2}}$ Systems durch Tamoxifen und andererseits die hohe Spezifität auf die Gewebe des Darms.

3.2.12.2 Induktion im Herzmuskel: MerCreMer

Ein weiterer transgener Mausstamm, der eine induzierbare Expression der Cre-Rekombinase exklusiv im Herzen ermöglicht, basiert ebenso wie die beiden vorgestellten

Mausstämme ROSA26-CreER^{T2} und *vil*-CreER^{T2} auf einem Cre-Fusionsprotein: MerCreMer. Es handelt sich dabei um die Ligandenbinde-Domänen des Östrogenrezeptors der Maus, die durch eine Punktmutation (G525A) nur von dem Östrogenanalogon Tamoxifen aktiviert werden können. Durch die flankierende Anordnung von zwei dieser Domänen konnte einerseits die Aktivität der Cre-Rekombinase erheblich gesteigert und andererseits die Cre-Expression strikter reguliert werden (Verrou et al., 1999). Zur herzspezifischen Expression dieses chimären Proteins wurde die cDNA unter die Kontrolle des α -MHC-Promotors gestellt (Sohal et al., 2001). Der generierte Mausstamm MerCreMer zeichnet sich sowohl durch eine strikte Kontrolle der Cre-Expression, als auch durch eine robuste Rekombinationseffizienz im embryonalen und adulten Herz aus. Nach einer fünftägigen Induktion konnte eine annähernd vollständige Rekombination eines Reporter-Lokus festgestellt werden, sodass sich dieser Mausstamm einerseits wegen seiner robusten Rekombinase-Expression und andererseits wegen seines unitransgenen Charakters für Rekombinationsexperimente im Herzen eignet.

Homozygote Tiere dieses Stammes wurden über die Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und mit homozygoten Trägern der loxP-markierten DSG2-Allele verpaart. Sobald eine ausreichende Anzahl an doppelt transgenen Tieren vorhanden war, wurden erste Induktionsexperimente durchgeführt. Dazu wurde den Mäusen über einen Zeitraum von fünf Tagen jeweils 1 mg des Induktors Tamoxifen *i.p.* injiziert und die Tiere nach Abschluss der Behandlung getötet. Gewebeproben einiger Organe wurden entnommen und daraus DNA isoliert, die als Matrize für PCR-Analysen zur Bestimmung der Rekombination des DSG2-Lokus verwendet wurden.

Wie bereits mit dem α -MHC-opt-rtTA/*tetO*-P_{hCMV}-Cre-System zur herzspezifischen Induktion der Cre-Rekombinase (3.2.11.2) konnte auch mit dem vorliegenden MerCreMer-Induktionssystem keine Rekombination des geflochtenen DGS2^{loxP}-Lokus in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.2.12.1 Ubiquitäre Induktion: ROSA26-Cre-ER^{T2}

Da beide induzierbaren Systeme für die herzmuskelspezifische Rekombination der geflochtenen DSG2-Allele keine Funktion zeigten (siehe 3.2.11.2 und 3.2.12.2), kam als dritte Alternative die ubiquitär aktive Cre-Rekombinase des Typs ROSA26-Cre-ER^{T2} zum Einsatz.

Der ROSA26-Lokus wurde 1991 von P. Soriano und seinen Mitarbeitern über einen *Genetrap*-Versuch identifiziert (Friedrich und Soriano, 1991). ROSA steht hierbei für den Aufbau des verwendeten *Genetrap*-Vektors (*Reverse Orientation Splice Acceptor β -Gal*). Ausgehend vom ROSA26-Promotor werden durch alternatives Spleißen zwei Transkripte erzeugt, denen aber bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte. Der ROSA26-Lokus ist für homologe Rekombination sehr gut zugänglich, wie in vielen Beispielen gezeigt wurde (Mao et al., 1999; Soriano, 1999; Srinivas et al., 2001; Possemato, 2002 #188}, Übersichtsartikel: (Branda und Dymecki, 2004)).

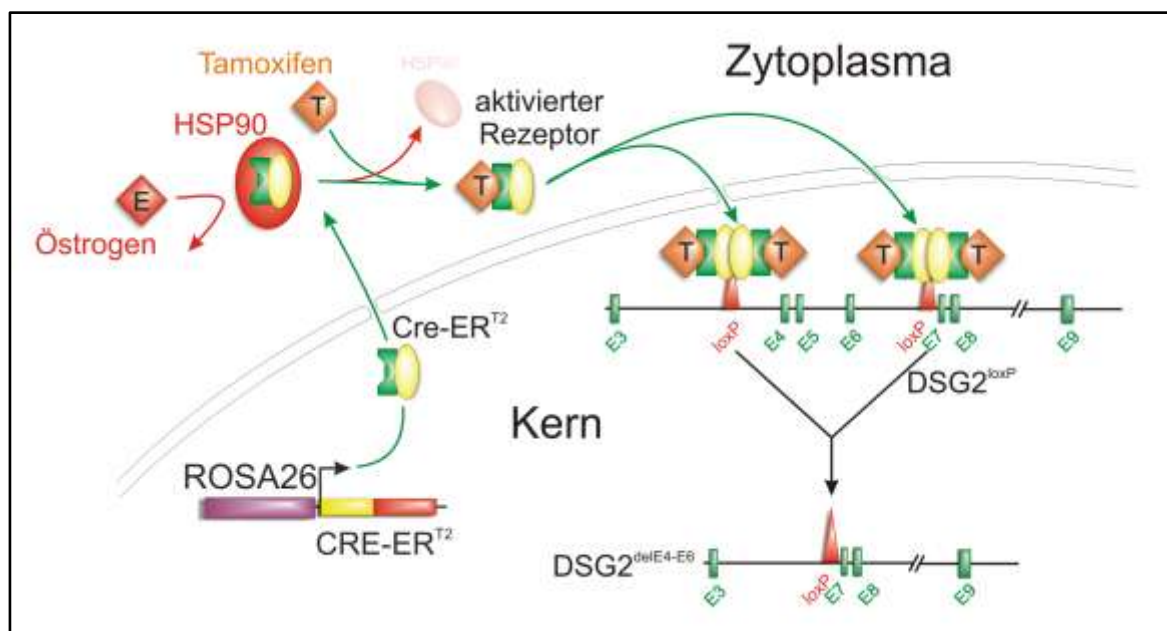


Abbildung 37: Wirkweise der ER^{T2}-gestützten Cre-vermittelten Rekombination am Beispiel des ROSA26 Promotors

Der ubiquitär aktive ROSA26 Promotor exprimiert das chimäre Fusionsprotein Cre-ER^{T2}, bestehend aus der Cre-Rekombinase, an welche carboxyterminal eine mutierte Ligandenbinde-Domäne (LBD) des humanen Östrogenrezeptors (ER) gekoppelt ist. Im Zytoplasma bindet dieses chimäre Protein an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) und ist somit inaktiv. Durch die eingeführten Mutationen ist die LBD unempfindlich gegenüber endogenen Östrogenen, wird jedoch durch das Analogon Tamoxifen aktiviert. Daraufhin löst sich das Protein von HSP90, wandert in den Kern, die Cre-Rekombinase kann spezifisch an die loxP-Sequenzen der DNA binden und die Rekombination des DSG2-Gens einleiten.

ROSA26: Promotor im ROSA26-Lokus; CRE-ER^{T2}: Gen für das Fusionsprotein; Cre: Cre-Rekombinase; ER^{T2}: punktmutierte Ligandenbinde-Domäne des humanen Östrogenrezeptors; Cre-ER^{T2}: chimäres Protein; HSP90: Hitzeschockprotein 90; E4 bis E7: Exone 4 bis 7 des DSG2-Gens; loxP: Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase; DSG2^{delE4-E6}: rekombinierter DSG2-Lokus

Vor Kurzem wurde der Mausstamm ROSA26-Cre-ER^{T2} charakterisiert (Hameyer et al., 2007) und freundlicherweise von Dr. Berns, Amsterdam, NL zur Verfügung gestellt. In das Genom der Tiere dieses Stammes wurde ein Gen für das chimäre Protein Cre-ER^{T2} über homologe Rekombination in den ubiquitär aktiven ROSA26-Lokus integriert.

Die Kombination der beiden gut beschriebenen und wissenschaftlich anerkannten Systeme (ROSA26 (Soriano, 1999) und Cre-ER^{T2} (Indra et al., 1999)) stellt ein vielversprechendes System zur zelltypunabhängigen und induzierbaren loxP-vermittelten Rekombination dar (siehe Abbildung 37).

Nachdem erste Tiere eines zur Induktion der Cre-Rekombinase geeigneten Genotyps verfügbar waren, wurden Induktionsversuche durchgeführt. Es handelte sich hierbei um Tiere des Typs R26CreER^{T2}, die mit Trägern des induzierbaren DGS2-Allels DSG2^{loxP-Neo} verpaart worden waren. Es wurden sämtliche Kombinationen der einzelnen notwendigen Eigenschaften des Systems (CreER^{T2}, DSG2^{loxP(-Neo)}, Tamoxifen) getestet, um einerseits die strikte Induktionsregulation und andererseits die durchgeführten Verpaarungen und Genotypisierungen zu verifizieren. Die Versuchstiere erhielten dazu an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils eine *i.p.* Injektion von 1 mg des Induktors Tamoxifen, der in Speiseöl/Äthanol gelöst war, bzw. das Vehikel Speiseöl/Äthanol allein. Nach Ablauf der siebentägigen Induktion wurden die Tiere getötet, verschiedene Organe entnommen und Gewebeproben bei -80°C gelagert. Aus diesen wurde DNA isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt (siehe 3.2.10).

Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse dieser PCR-Analysen. Die Rekombination des DGS2-Lokus hat unter Einwirkung des Induktors Tamoxifen in der Leber, im Darm und (kaum detektierbar) in den Geweben des Schwanzes (Haut) stattgefunden. Es ist eindeutig festzustellen, dass sowohl das ROSA26CreER^{T2}-Induktionssystem als solches strikt reguliert ist, da ausschließlich nach Einwirkung des Induktors eine Rekombination der loxP-Sequenzen detektiert wird (vergleiche 1738/1736). Mit diesem Ergebnis sind auch die vorangegangenen Genotypisierungsreaktionen validiert worden. Wären beispielsweise die Genotypen der Tiere 1669/1737 als falsch-negativ bestimmt worden, so wäre auch in diesen beiden Mäusen die Rekombination des DGS2-Lokus evident geworden.

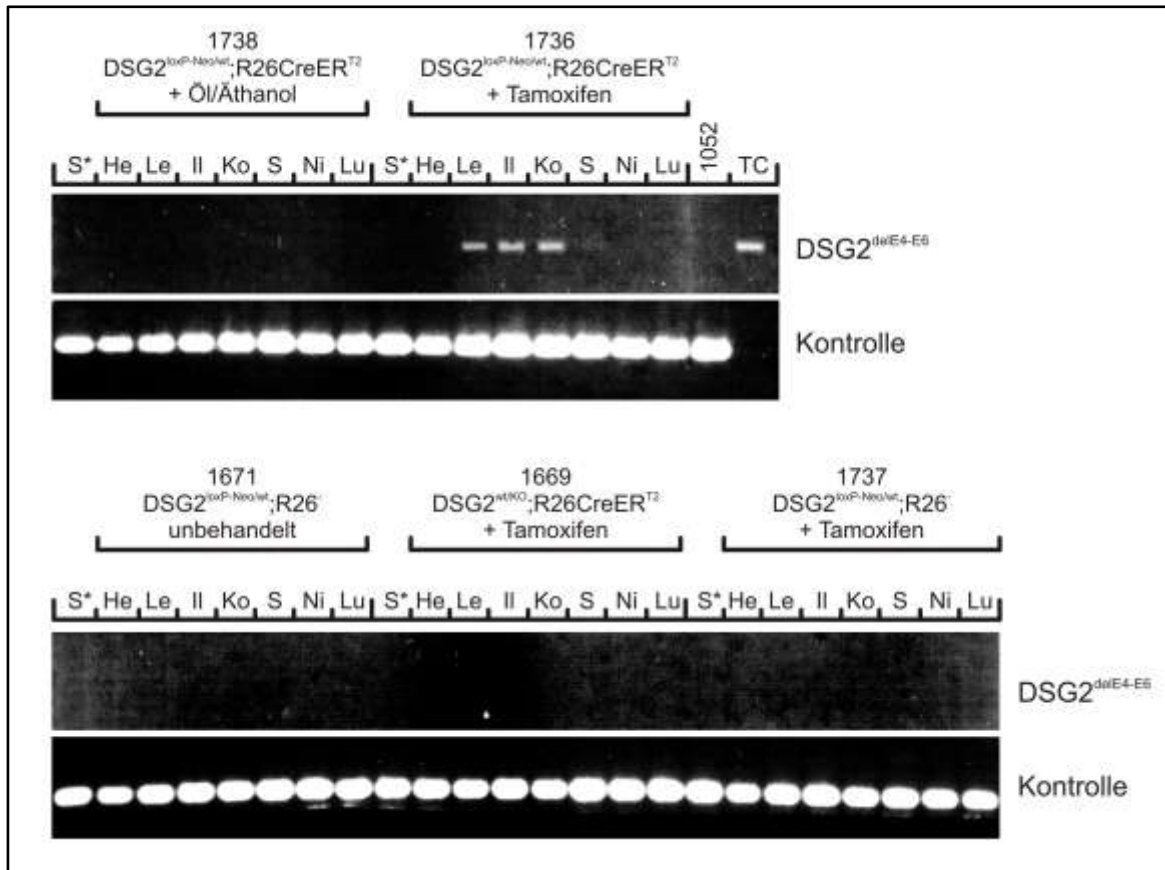


Abbildung 38: Die ubiquitäre Rekombination des DSG2-Lokus

– **Ergebnisse der PCR-Analysen:** Um die strikte Kontrolle der Induzierbarkeit des ROSA26CreER^{T2}-Systems zu testen, wurden unterschiedliche Kombinationen der einzelnen voraussetzenden Eigenschaften (loxP-Sequenzen, ROSA26CreER^{T2}-Transgen bzw. der Induktor Tamoxifen) eingesetzt. Tiere unterschiedlichen Genotyps wurden nach fünftägiger *i.p.* Behandlung mit je 1 mg Tamoxifen bzw. Vehikel getötet. DNA wurde aus unterschiedlichen Geweben (Herz (He), Leber (Le), Ileum (Il), Kolon (Ko) und Schwanz (S) – S*: Schwanzbiopsie zur Genotypisierung, also vor erfolgter Induktion) isoliert und als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt.

Die Ergebnisse belegen die strikte Kontrolle des ROSA26CreER^{T2}-Systems hinsichtlich der Induzierbarkeit: ausschließlich bei Tier 1736 konnten die Signale des rekombinierten DSG2-Lokus detektiert werden. Allerdings kann die ubiquitäre Induktion nicht bestätigt werden, da sich Rekombination auf den Darm und die Leber beschränkt (eine sehr schwache Rekombination konnte auch in der Haut des Schwanzes nachgewiesen werden).

3.2.13 Analyse der rekombinierten DSG2-mRNA per RT-PCR

Die gute Induzierbarkeit des *vil*-Cre-ER^{T2} Systems und die relativ hohe Verfügbarkeit an transgenen Tieren eines geeigneten Genotyps machte diesen Stamm ideal, um weitere Charakterisierungen der Cre-vermittelten Rekombination durchzuführen. Tiere mit unterschiedlichen DSG2-Allelkombinationen wurden über eine Dauer von fünf Tagen mit je 1 mg Tamoxifen induziert, daraufhin getötet und Gewebeproben der drei Darmabschnitte entnommen. Gesamt-RNA wurde isoliert und mit oligo-dT₍₂₃₎-Primern in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt, bei der die beiden Pri-

mer 07-12 und 07-13 die drei zu deletierenden Exone E4 bis E6 flankieren und somit zwei unterschiedlich große PCR-Fragmente generieren.

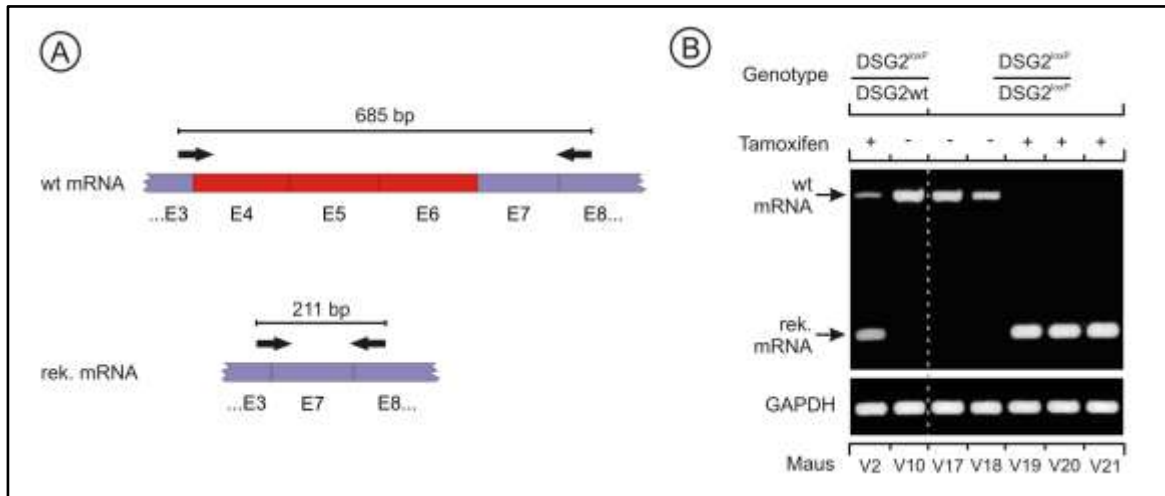


Abbildung 39: Detektion rekombinierter DSG2-mRNA: RT-PCR Analyse

– **Schema der verwendeten Primer (A) und gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (B):** Transgene Mäuse, die das induzierbare DSG2-Allel $DSG2^{loxP}$ entweder in heterozygotem (V2, V10) oder homozygotem (V17 bis V21) Zustand trugen, wurden für fünf Tage mit je 1 mg Tamoxifen behandelt und die Tiere im Anschluss getötet. Durch diese *i.p.* Injektion wurde die Rekombination des DSG2-Lokus induziert. Gewebeproben von Jejunum, Ileum und Kolon wurden entnommen und Gesamt-RNA extrahiert. Jeweils 500 ng Gesamt-RNA wurden in cDNA umgeschrieben, welche als Matrize für sequenzspezifische Primer diente. Durch die Rekombination werden drei Exone aus der DSG2-mRNA deletiert, wodurch unterschiedliche große PCR-Produkte generiert werden (A).

Die Induktion mittels Tamoxifen ist strikt reguliert, da die rekombinierten PCR-Produkte ausschließlich bei den induzierten Tieren nachgewiesen werden können (V2, V19 bis V20). Im Falle des Tieres mit heterozygotem Zustand der DSG2-Allele (V2) werden beide Allele koamplifiziert, jedoch wird bei PCR-Analysen generell das kürzere Fragment bevorzugt und weist deshalb eine stärkere Bande auf. Als Mengenkontrolle der generierten cDNA wurde GAPDH amplifiziert (B).

Abbildung 39 zeigt die rekombinierte DSG2-mRNA. Die PCR-Produkte auf der cDNA der homozygoten $DSG2^{loxP}$ -Tiere V19 bis V21 verdeutlichen die hohe Effizienz des Rekombinationssystems. Es sind keine PCR-Produkte generiert worden, die auf die Anwesenheit von nicht-rekombinierter wildtypischer RNA schließen lassen. Maus V2 trägt neben dem induzierbaren noch das wildtypische DSG2-Allel, sodass beide mRNAs gebildet werden. Die nicht induzierten Kontrolltiere beider Genotypen (V10, V17 und V18) zeigen ausschließlich die nicht rekombinierte mRNA. Es ist also davon auszugehen, dass nach einer Induktionsdauer von fünf Tagen bei homozygoten $DSG2^{loxP}$ -Tieren zu einem hohen Anteil rekombinierte DSG2-mRNA synthetisiert wird.

3.2.14 Analyse des rekombinierten Dsg2-Proteins

3.2.14.1 Western Blot Analysen auf Gewebeextrakten

Nachdem die Synthese von rekombinierter mRNA über RT-PCR-Analysen zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, sollte auch das rekombinante Dsg2-Protein detektiert werden. Dazu wurden aus gefrorenen Gewebeproben erfolgreich induzierter Tiere Gesamtproteinextrakte hergestellt, die Proteinmenge nach Bradford bestimmt und die extrahierten Proteine einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Um die erwarteten geringen Unterschiede des Molekulargewichts zwischen den wildtypischen und den rekombinierten Proteinen hinreichend darstellen zu können, kam ein 6%-iges (v/v) SDS-Gel zum Einsatz. Die Ladekontrolle erfolgte über den Nachweis von Aktin auf einem zweiten, 12%-igen (v/v) SDS-Gel. Beide Gele wurden geblottet und das erste mit rb88-Antiserum (α -Dsg2 – 1:1000), das zweite mit einem α -Aktin-Antiserum (1:500) inkubiert.

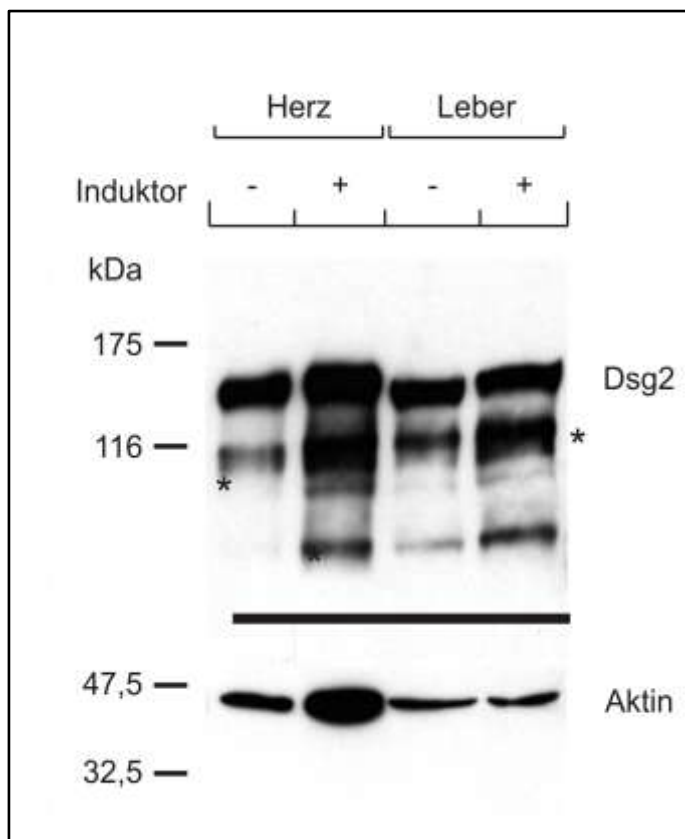


Abbildung 40: Detektion des rekombinanten Dsg2-Proteins in Protein-Extrakten

Western-Blot-Analysen: Gesamtprotein-Extrakte wurden aus gefrorenen Leber- und Herz- Gewebefragmenten der jeweiligen Versuchs- und Kontrolltiere hergestellt. 50 μ g dieser Gesamtprotein-Extrakte wurden je einer SDS-PAGE (6%) unterzogen und im Anschluss per Western-Blot-Verfahren immobilisiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden einerseits mit rb88-Antiserum (1:1000 – oben) bzw. einem α -Aktin-Antiserum als Ladekontrolle (1:500 – unten) inkubiert.

Die Proteinextrakte aus den induzierten, bzw. nicht induzierten Herzmuskel- bzw. Leber-Gewebe zeigen jeweils eine Bande vergleichbarer Intensität und Größe. Das erwartete geringere apparente MW der Dsg2-Proteine in den Proben der induzierten Gewebe konnte nicht nachgewiesen werden. Stattdessen scheinen die Dsg2-Hauptbanden im Falle der induzierten Protein-Proben ein gering-fülig höheres apparentes MW aufzuweisen.

Abbildung 40 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analysen. Die unterschiedliche Intensität der Aktinfärbung belegt zwar die Anwesenheit von Proteinen in den Gewebeextrakten, deutet aber auf eine hohe Ungenauigkeit der Bradford-Analysen und demnach auf eine unterschiedliche Proteinladung des Gels hin. Das rb88-Antiserum markiert in den

Extrakten aus Leber und dem Herzen eine Bande um 165 kDa, die dem apparenten Molekulargewicht von Dsg2 entspricht. Einige proteolytische Abbauprodukte von geringerem MW wurden ebenso detektiert (*), was auf Degradationsprobleme hinweist. Die Dsg2-Hauptbanden der einzelnen Gewebeeextrakte unterscheiden sich kaum in ihrer Größe von ca. 165 kDa. Die Dsg2-Proteine verschiedener Gewebetypen scheinen sich hinsichtlich ihres Laufverhaltens marginal zu unterscheiden (vergleiche Abbildung 19): das Dsg2 der Leber scheint ein etwas größeres apparentes MW aufzuweisen, als das Protein des Herzmuskels.

Durch die Induktion der Cre-Rekombinase wurde eine Rekombination des DSG2-Lokus verursacht. Die daraus resultierende Deletion eines Bereiches der extrazellulären Cadherindomänen des Dsg2-Proteins konnte bisher mit Western-Blot-Analysen nicht detektiert werden. Weder wurde eine zusätzliche Dsg2-Proteinbande mit eindeutig kleinerem apparenten MW nachgewiesen, noch konnte eine Reduktion des wildtypischen Dsg2-Proteins gezeigt werden.

3.2.14.2 Immunfluoreszenz auf Gewebsschnitten

Wie mit RT-PCR Analysen gezeigt werden konnte, wird bei homozygot induzierbaren Tieren des Stammes DSG2^{loxP} nach einer Dauer von fünf Tagen bereits keine wildtypische mRNA mehr gebildet. Die Enterozyten in der Darmschleimhaut haben in der Regel eine Lebensspanne von 72 Stunden und wandern in diesem Zeitraum aus basal gelegenen Stammzellkompartimenten nach apikal und werden schließlich in das Darmlumen abgeschilfert. Die Verknüpfung der Intermediärfilamente in diesem Gewebe erfolgt exklusiv über die kraftvermittelnde Brückenfunktion von Dsg2 und Dsc2 (vergleiche Übersicht im Anhang Tabelle 55). Wird also in den Enterozyten der DSG2-Lokus nachweislich rekombiniert (siehe 3.2.12.1) und wird ausschließlich veränderte mRNA synthetisiert (vergleiche 3.2.13) so ist davon auszugehen, dass sich diese Veränderungen auch auf das Dsg2-Protein auswirken. Es darf angenommen werden, dass die Depletion der wichtigen Funktionen in den extrazellulären Domänen EC1 und EC2 zu einer veränderten Verteilung von Dsg2 führt.

Die induzierten Tiere V19 bis V21 und die Kontrolltiere V17 und V18 wurden nach Abschluss der Induktion mit Poly-L-Lysin Perjodat (PLP) perfundiert, um eine bestmögliche Erhaltung der Gewebe zu ermöglichen. Die so vorfixierten Gewebeproben wurden in 4%

igem Paraformaldehyd weiter fixiert und zur Demaskierung der Antigene in Zitratpuffer gekocht. Abschließend wurden Kryostatschnitte angefertigt und mit polyklonalen rb88 α -DSG2 Serum (siehe 3.1.4.2) inkubiert. Abbildung 41 zeigt die Antikörperfärbung von Dsg2 auf Kolon-Schnitten induzierter Tiere. Die spezifisch baso-laterale, punktförmige Markierung des Proteins ist klar detektierbar, eine Umverteilung von Dsg2 oder eine Abnahme der Konzentration dieses Proteins ist nicht festzustellen. Im Vergleich zu Kolonpräparaten nicht induzierter Tiere (Abbildung 15) erscheint die Fluoreszenz etwas unschärfer und weniger distinkt zu sein. Auch eine ausgeprägt punktförmige Markierung der Enterozytenmembranen ist nicht festzustellen.

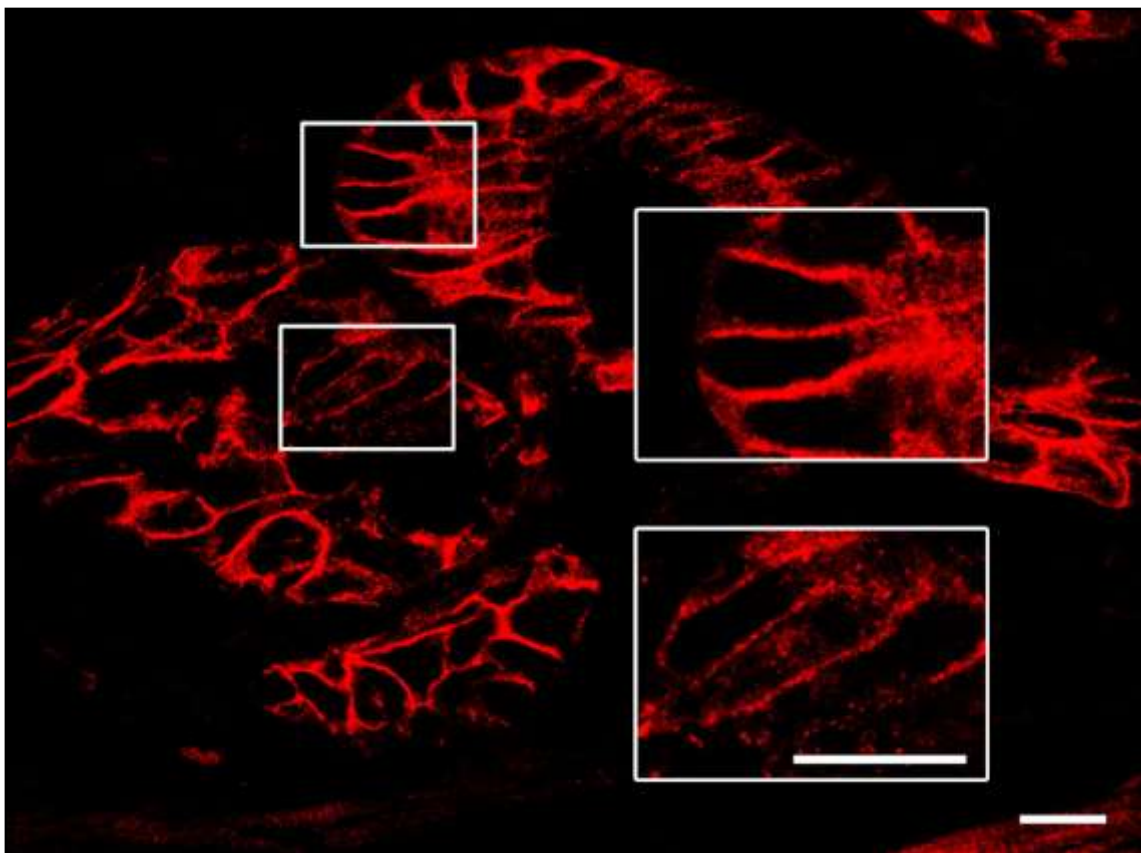


Abbildung 41: Dsg2-Markierung in Kolonepithelzellen nach erfolgter Rekombination

– **konfokale Fluoreszenzaufnahme:** Mäuse des geeigneten Genotyps wurden mit Tamoxifen behandelt, um die Rekombination des DSG2-Lokus zu induzieren. Die Tiere wurden mit PLP perfundiert und Schnitte von Gewebeproben des Darmes angefertigt. Diese wurden zur Antigenemaskierung vorbehandelt und mit rb88-Antiserum (1:800) inkubiert; Zweitantikörper: Cy2-gekoppeltes α -Kaninchen-Serum (1:800). Der Vergleich mit Kolonpräparaten eines nicht-induzierten Tiers (Abbildung 15) zeigt keine groben Unterschiede hinsichtlich der Stärke und des Verteilungsmusters der beiden Antikörperfärbungen. Die baso-laterale membranöse Lokalisierung deutet auf eine Markierung desmosomaler Strukturen hin, was auch die beiden Vergrößerungen verdeutlichen. Insgesamt erscheint jedoch der punktförmige Charakter der desmosomalen Antikörperfärbungen weniger detailliert. Größenbalken: 10 μ m

3.2.15 Untersuchungen an rekombinierter DSG2-cDNA in Eph4-Zellen

Nachdem keine offensichtlichen und größeren Defekte bei der Verteilung von Dsg2 in den Kolonschnitten nachgewiesen wurden, sollte die Expression der mutierten DSG2-mRNA in Eph4-Zellen (siehe Tabelle 13) untersucht werden. Dazu wurden die Exone E4 bis E6 aus der DSG2-cDNA deletiert und diese rekombinante DNA mit einer carboxy-terminalen eGFP-Markierung versehen. Des Weiteren wurde als Kontrolle eine wt-DSG2-cDNA mit eGFP markiert, um eine eventuell unterschiedliche Expression bzw. Verteilung der beiden desmosomalen Proteine vergleichen zu können.

Die Deletion der Exone E4 bis E6 wurde mit mehreren Strategien verfolgt, die letztendlich erfolgreiche Methode wird im Folgenden beschrieben (vergleiche Abbildung 42):

(Abbildung 42-1): Als Matrize für eine inverse „*longrun*-PCR“ sollte ursprünglich eine freundlicherweise von Dr. Garrod (Manchester, England) zur Verfügung gestellte mDSG2cDNA dienen. Mehrere unterschiedliche Strategien blieben erfolglos, weshalb das cDNA-Fragment exklusive der carboxyterminalen HA-Markierung mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NotI und EcoRV in den Vektor pBlueskriptI SK subkloniert wurde. Dieses Konstrukt (3050) ließ sich nun als Matrize für die inverse *longrun*-PCR mit den Oligonukleotiden 06-11 und 06-12 einsetzen, wurde jedoch für eine erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Bereiches mit der Restriktionsendonuklease XcmI innerhalb von Exon 6 zuvor linearisiert. Das generierte PCR-Produkt, welches 5' die Exone E7 bis E15 der DSG2-cDNA, gefolgt von den Sequenzen des Vektor pBlueskriptI und 3' die Exone E1 bis E3 der DSG2-cDNA enthielt, wurde religiert (Abbildung 42-2).

(Abbildung 42-3): Die so mutierte DSG2-cDNA wurde nun aus dem resultierenden Vektor 3051 über eine PCR-Amplifikation mit den randständigen Oligonukleotiden 06-10 und 06-77, die an ihren jeweiligen 5'-Enden die Sequenzen für die Restriktionsendonukleasen SalI bzw. SacII trugen, isoliert. Da die verwendeten Oligonukleotide produktionsbedingt keine 5'-Phosphatgruppen tragen, musste das PCR-Produkt zunächst mit Hilfe des Enzyms T4-PNK für die Ligationsreaktion vorbereitet werden. Nach einer Restriktion des PCR-Fragments und des Zielvektors pEGFP-N3 (Clontech) mit den Restriktionsendonukleasen SalI und SacII wurden die beiden DNAs miteinander ligiert (Klon 3052).

Für das Kontrollkonstrukt wurde die vollständige DSG2-cDNA über eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 06-10 und 06-77 amplifiziert und in den Vektor pEGFP-N3 inseriert (Klon 3053).

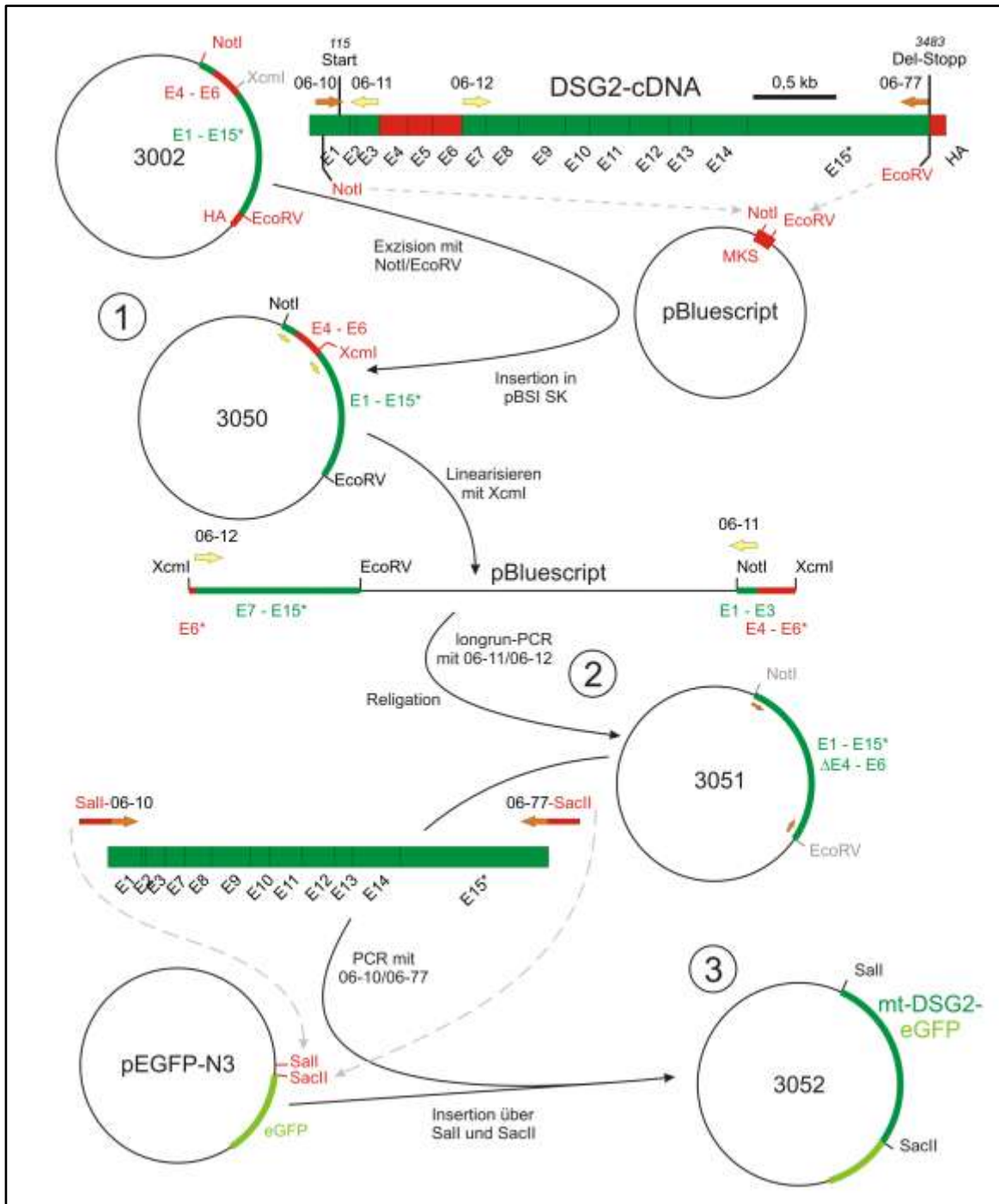


Abbildung 42: Klonierungsstrategie des mtDSG2-eGFP-Expressionskonstrukts

Die DSG2-cDNA wurde mit einer carboxyterminalen eGFP-Markierung versehen, zuvor jedoch die Exone E4 bis E6 aus der cDNA entfernt. Sämtliche für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben, wobei die für den aktuellen Klonierungsschritt verwendeten Schnittstellen in roter Farbe hervorgehoben wurden. Die ausführlichen Erklärungen zu den einzelnen Klonierungsschritten (1 bis 3) sind dem Text zu entnehmen.
 E1, E2 usw.: Exone (* = Exonfragment), HA: Hämagglutinin, 06-10, 06-11 etc.: Oligonukleotide

Die Bereiche der beiden DSG2-cDNAs innerhalb der Konstrukte 3052 und 3053 wurden mit Hilfe mehrerer überlappender Sequenzierungsreaktionen vollständig verifiziert, um eventuelle Basenaustausche detektieren zu können. In beiden Fällen wurden die Sequenzen bestätigt und es konnte ein offenes Leseraster beginnend mit dem Startkodon des

DSG2-Gens bis in den kodierenden Bereich eGFP-Gens bestimmt werden.

Eph4-Zellen wurden nun mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert, nach 48 Stunden mit Methanol/Aceton fixiert und die Expression der beiden Vektoren am Konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

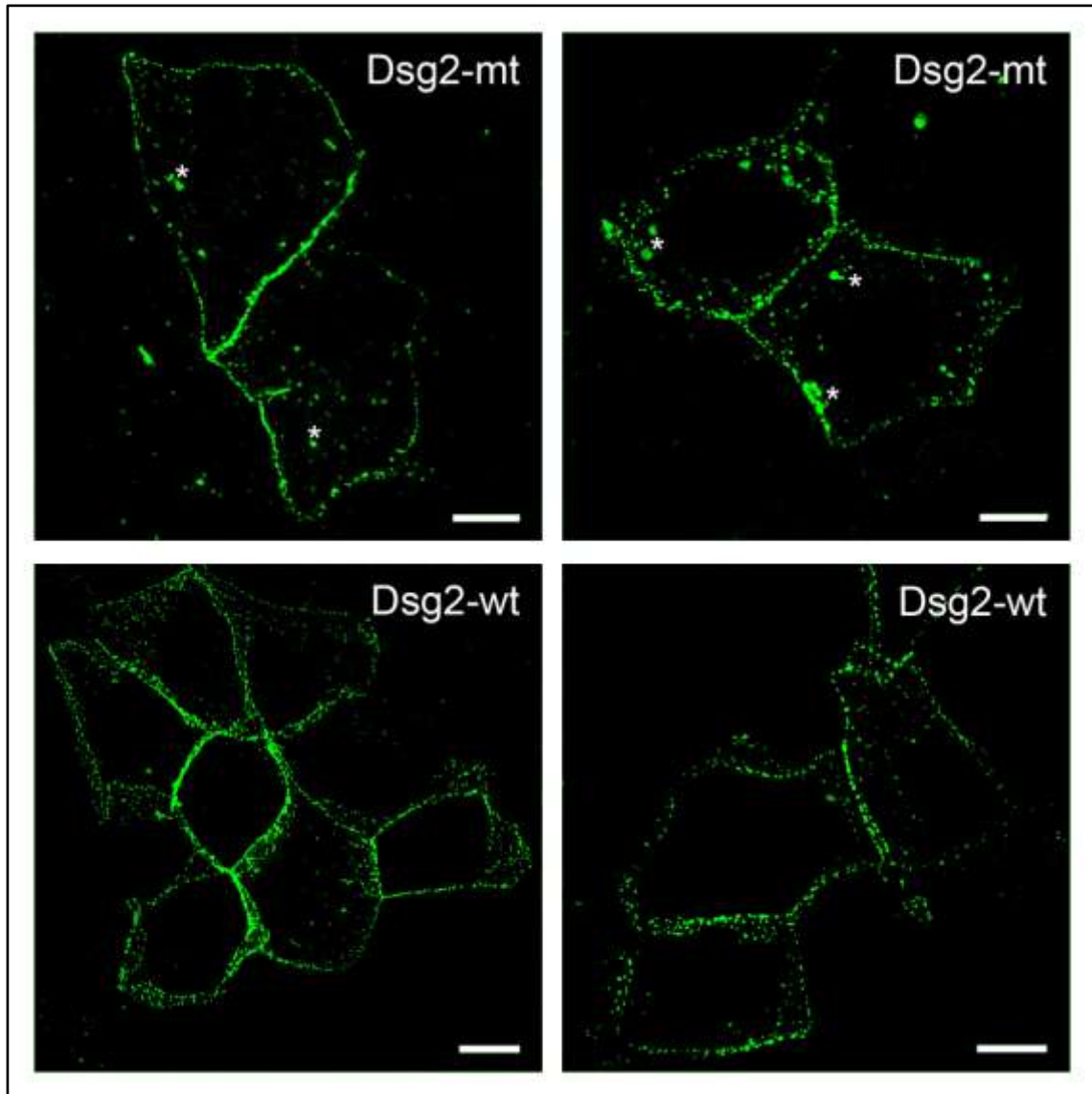


Abbildung 43: Komparative Analyse von eGFP-markierten Dsg2-Proteinen in Eph4-Zellen
 – **Projektionen konfokaler Fluoreszenzaufnahmen:** Eph4-Zellen wurden mit den Konstrukten 3052 (DSG2-mt (delE4-E6)) und 3053 (DSG2-wt) transfiziert und nach Erreichen der Konfluenz mit Methanol/Aceton fixiert. Am konfokalen Laserscanning-Mikroskop wurden Stapelaufnahmen angefertigt und diese mit der Software LAS AF übereinander projiziert. Abgebildet sind jeweils zwei typische Zellgruppen, die das FP-markierte DSG2 exprimieren.

Die Transformationseffizienz beider Konstrukte ist vergleichbar; die Expression zeichnet sich durch eine robuste membranöse und punktförmige Fluoreszenzfärbung aus: die beiden unterschiedlichen FP-markierten Dsg2-Proteine werden in reife Desmosomen inkorporiert. Durch die Projektion der einzelnen Stapelbilder erscheinen die Desmosomen in verschiedenen Ebenen insgesamt flächiger. Im Vergleich der wt-DSG2- mit der mt-DSG2-cDNA ist die Fluoreszenzfärbung des mutierten Proteins unregelmäßiger und insgesamt weniger fein punktiert. Des Weiteren fallen wenige kompakte Proteinaggregate (*) im Zytoplasma sowie an der Zellmembran auf, die bei der Expression von wt-DSG2 nicht detektiert werden. Größenbalken: 10 µm

Abbildung 43 zeigt repräsentative Ausschnitte des Zellrasens mit erfolgreich transient transfizierten Eph4-Zellen. Die jeweiligen Dsg2-Proteine werden in vergleichbarem Maße exprimiert, es können mehrere Gruppen benachbarter transfizierter Zellen erfasst werden, die mindestens eine gemeinsame Zellmembran teilen. Die Fluoreszenzfärbung beider Proteinspezies ist membranständig und punktförmig, sodass in beiden Fällen von einer desmosomalen Lokalisierung des FP-markierten Dsg2 auszugehen ist. Es sind keine groben Unterschiede zwischen den Fluoreszenzeigenschaften der beiden Proteine feststellbar: im Falle der wt-DSG2-cDNA sind jedoch die einzelnen fluoreszierenden Partikel von kleinerem Durchmesser und es treten keine Proteinaggregate auf, wie sie beim mutierten Dsg2 vereinzelt detektiert werden können („*“ in Abbildung 43).

Auch ein Dsg2-Protein, dem wichtige extrazelluläre Proteindomänen fehlen, wird demnach in die Membran transportiert und in reife Desmosomen inkorporiert. Sowohl Größe als auch Morphologie der beiden mit den unterschiedlichen DSG2-cDNAs transfizierten Eph4-Zellen unterschieden sich nicht von einander, sodass die Deletion des extrazellulären Protein-Bereiches keinen maßgeblichen Einfluss auf die Verteilung des mt-Dsg2 hat. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die verwendeten Eph4-Zellen ein intaktes endogenes wt-DSG2 exprimieren.

4. Diskussion

4.1 Herstellung Dsg2-spezifischer Antiseren

Zu Beginn der Arbeit waren keine Isotyp-spezifischen Antiseren für das murine Dsg2 verfügbar. Die monoklonalen Antikörper DG3.4 und DG3.10 (Schmelz et al., 1986) sind gegen das humane Dsg1 gerichtet und zeigen nur eine schwache Immunreaktion. In Vorversuchen konnten mit diesen Antikörpern keine befriedigenden Reaktionsprotokolle etabliert werden. Zur Herstellung polyklonaler Antiseren gegen das Dsg2 der Maus wurden 6xHis-markierte Dsg2-Proteinfragmente in *E. coli* überexprimiert, affinitätsgereinigt und als Antigene zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

Es sollten Antikörper gegen extrazelluläre bzw. intrazelluläre Dsg2-Domänen hergestellt werden. Aufgrund der Sequenzhomologie der Dsg-Isoformen untereinander (vergleiche Anhänge 7.6 und 7.8) wurden keine Peptide verwendet, da diese aufgrund ihres kurzen Charakters keine isoformspezifischen Antikörper generiert hätten. Stattdessen sollten rekombinante Proteine hergestellt werden, die ein His-Hexapeptid zur Aufreinigung besitzen. Dem His-Hexapeptid wird auf Grund seiner Eigenschaften zudem nur eine sehr geringe Eigenimmunogenität zugesprochen.

Die ausgewählten Antigene ließen sich ohne Schwierigkeiten in *E. coli* überexprimieren, es konnten keine proteolytischen Abbauprodukte nachgewiesen werden. Auf Grund der unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der beiden Antigene unterschied sich die Löslichkeit der Proteine. Dem aminoterminalen Antigen wird eine α -helikale Sekundärstruktur vorhergesagt (Nakashima et al., 1986; Deleage und Roux, 1987), der isoelektrische Punkt liegt bei 5,0 und das Protein weist eine starke negative Ladung von -9,91 (bei pH 7,0) auf. Trotz der nicht globulären Struktur war das Protein durch seinen polaren Charakter gut löslich und konnte deshalb unter nativen Bedingungen affinitätsgereinigt werden. Im Gegensatz dazu konnte die Proteinklasse des intrazellulären Antigens nach Deléage und Roux/Nakashima, Nishikawa und Ooi nicht klar definiert werden (*irregular*). Die Eigenladung dieses Proteins ist mit 4,88 (bei pH 7,0) geringer, auch der isoelektrische Punkt von 6,28 weist auf ein neutraleres Protein hin. Das intrazelluläre Antigen wurde deshalb in einem kaum löslichen Zustand exprimiert und von den Bakterienzellen in Inklusionskörpern produziert.

Im Falle des 1N-Serums war bei Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Eph4-Zellen (siehe Abbildung 13) keinerlei Unterschied zwischen dem Präimmun- und dem Test-Serum bzw. dem finalen Serum festzustellen. Das 2N-Serum zeigte zwar einen spezifischen Nachweis seines Antigens, jedoch wiesen Immunfluoreszenz- (siehe Abbildung 13) sowie Western-Blot-Analysen von Dsg2-Proteinen (nicht gezeigt) einen sehr hohen Hintergrund auf. Das Signal-Hintergrundverhältnis dieses 2N-Serums war mangelhaft, sodass es nicht weiter bei Experimenten eingesetzt wurde. Trotz identischer Mengen des zur Immunisierung herangezogenen Antigens und der stimulierenden Wirkung der Freund'schen Adjuvanzien spielten hier offensichtlich individuelle Unterschiede der Immunantwort zwischen den beiden immunisierten Kaninchen eine Rolle.

Alle generierten Seren (gegen amino- und carboxyterminale Antigene von Dsg2) erkannten zwar bei Western-Blot-Analysen ihre jeweiligen Antigene (nicht gezeigt), die beiden aminoterminalen Seren zeigten jedoch bei Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analysen mit Gesamtzellprotein-Extrakten keine Affinität zum Dsg2-Gesamtprotein. Obwohl die Vorhersagen der biochemischen Eigenschaften wie der Antigenindex, die Verteilung α -helikaler Bereiche und β -Faltblatt-Strukturen beider antigenen Proteinfragmente einander ähnlich sind, wurden beim aminoterminalen Antigen anscheinend Antikörper gegen nicht-native Epitope des Dsg2-Proteins gebildet.

Die Antiseren gegen das carboxyterminale Antigen (3C und 4C) wiesen ein gutes Signal-Hintergrundverhältnis auf und die Antikörper konnten bei Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Untersuchungen in hohen Verdünnungen eingesetzt werden (Abbildung 14 bis Abbildung 18.). Das Antiserum 3C wurde weiterhin für die Analysen von Dsg2 eingesetzt.

Dieses Serum erkannte bei Western-Blot-Untersuchungen auch Dsg2-Protein nicht murinen Ursprungs (Abbildung 18), was auf die hohe Konservierung der antigenen Dsg2-Domänen zwischen unterschiedlichen Spezies zurückzuführen ist: der phylogenetische Baum in Abbildung 45 (Anhang 7.7) basiert auf Sequenzvergleichen der extrazellulären desmosomalen Cadherindomänen, da Länge und Aufbau der intrazellulären Domänen zwischen den Proteinen stärker variieren. Wie Abbildung 45 zeigt, weisen die extrazellulären Cadherin-Domänen von Desmogleinen und Desmocollinen unterschiedlicher Spezies eine höhere Homologie untereinander auf, als die Mitglieder der Desmosomenfamilie einer Spezies (z.B. gruppieren alle Dsg2-Proteine unterschiedlicher Herkunft zusammen). Die Tabelle 54 (Anhang 7.8) gibt Auskunft über die Identitäten und Similaritäten der

Maus-Desmogleine bzw. der Dsg2-Proteine von Maus, Ratte, Mensch und Schimpanse und bestätigen diese Aussage. Dies lässt sich auch auf die intrazellulären Domänen der desmosomalen Cadherine übertragen, sodass die spezieübergreifende Reaktivität des Dsg2-Antiserums damit erklärt wird.

Es wurden reproduzierbare, minimale Größenunterschiede zwischen den „Dsg2 volle-Länge-Banden“ aus dem Kolon, dem Herzen und der Leber detektiert (siehe Abbildung 19), die mit einer unterschiedlich ausgeprägten N-Glykosylierung von Dsg2 erklärt werden können. Die extrazellulären Domänen der Desmogleine (und Desmocolline) sind mehrfach N-glykosyliert (Kapprell et al., 1985; Penn et al., 1987; Uematsu et al., 2005). Die erste der drei putativen Glykosylierungsstellen in der Desmoglein-Aminosäuresequenz ist unter den Mammalia konserviert (vergleiche dazu die Pfeilmarkierung im Anhang 7.6) und ist gleichzeitig die Haupt-Glykosylierungsstelle (Koch et al., 1991; Uematsu et al., 2005), bzw. die einzigen Glykosylierungsstelle von murinem Dsg2 (siehe Anhang 7.6). Aufgrund dieser Proteinmodifikationen wich bei SDS-PAGE-Analysen das apparente MW mit ca. 165 kDa vom errechneten MW des reifen Dsg2 (ca. 116 kDa) ab. Wurden beispielsweise die Mannoseketten experimentell von Dsg1 entfernt (Ortiz-Urda et al., 2003) oder die N-Glykosylierung im Golgi-Apparat mit Hilfe von Tunicamycin blockiert (Pasdar und Nelson, 1989), so traten Größenunterschiede von 5 bis 15 kDa auf.

Obwohl gleiche (Gesamt-)Proteinmengen auf das SDS-Gel geladen worden sind, zeigen die verschiedenen Extraktionsmethoden unterschiedliche Ausbeuten an Dsg2-Protein: insbesondere die Behandlung mit Ultraschall in Kombination mit dem Extraktionspuffer 2 hat Dsg2 aus den Herzmuskelzellen und den Hepatozyten in hohem Maße herausgelöst, wobei es allerdings zu verstärktem proteolytischen Abbau der Proteine kam. Die Extraktion von Dsg2 aus Geweben über Trizol® konnte nicht überzeugen. Die erarbeiteten Bedingungen erlauben mit dem Extraktionspuffer 2 eine hohe Ausbeute von Gesamtproteinen aus den untersuchten Geweben und eine gute Detektion von Dsg2 in Western-Blot-Analysen.

Eine weitere Dsg2-Bande (siehe Abbildung 19, Pfeil) entspricht einer Größe von ca. 95 kDa und wird mit Fragmenten eines proteolytischen Abbaus durch Proteasen der ADAM-Familie in Verbindung gebracht. Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17

spalten spezifisch extrazelluläre Domänen von Dsg2 (*shedding*) und spielen bei der EGFR-vermittelten Signaltransduktion von Apoptosevorgängen (Herren et al., 1998; Weiske et al., 2001; Lorch et al., 2004; Bech-Serra et al., 2006) und bei der Tumorgenese (Santiago-Josefat et al., 2007) eine Rolle. Da den Proteinextraktionspuffern keine Metalloprotease-Inhibitoren zugesetzt wurden, waren endogene Proteasen in der Lage, ihr Substrat spezifisch zu spalten. Bei der Extraktion mit Puffer 2 wurden die Gewebe zudem durch den unterstützenden Einsatz von Ultraschall wesentlich gründlicher als bei den beiden anderen Extraktionsmethoden lysiert. Dadurch wurden vermutlich diese proteolytisch aktiven Enzyme vermehrt in die Extraktionslösung freigesetzt und spalteten Dsg2. Zusätze von Protease-Inhibitoren werden Aufschluss darüber geben, ob diese Abbauprodukte durch Metalloproteasen generiert worden sind.

Um Dsg2 in Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe nachweisen zu können, mussten die Antigene zunächst demaskiert werden. Die dazu häufig angewendeten Behandlungen mit nicht-ionischen Detergenzien oder Proteinase K führten nicht zum Erfolg (nicht gezeigt). Erst die Inkubation der Schnitte in sauren oder basischen Antigendemaskierungs-Puffern konnte die Quervernetzung der Proteine mindern und die Dsg2-Antigene wieder für die Antikörper zugänglich zu machen.

Damit wurde erstmals ein Antiserum generiert, mit dem Dsg2 im Darmgewebe der Maus spezifisch nachgewiesen werden kann.

Im Kolon wurden Desmosomen ausschließlich in den Zellmembranen der Enterozyten markiert, wie Abbildung 15 verdeutlicht. Die sowohl quer, als auch längs geschnittenen Darmepithelzellen zeigten eine punktierte, baso-laterale Desmosomenfärbung, wobei die apikale Zellmembran der Enterozyten nicht markiert wurde. In diesem Bereich der Zellen sind keine Desmosomen vorzufinden, da dort keine Partnerzelle zur Adhäsion zur Verfügung steht. Auch im Bindegewebe des Darmes findet keine desmosomale Adhäsion statt, auch hier wurde erwartungsgemäß kein Dsg2 nachgewiesen.

Das Dsg2-Antiserum markierte in der Leber eine hexagonale Struktur und färbte die Desmosomen der Gallengänge spezifisch an. Es zeigte sich, dass perfundiertes Gewebe für Immunfluoreszenz-Analysen besonders geeignet ist, da die Eigenfluoreszenz der Leber durch den Ersatz des Blutes mit PBS bzw. Fixativ drastisch gesenkt werden konnte.

Im Herzen werden die einzelnen Kardiomyozyten über Glanzstreifen miteinander verbunden. In diesen *disci intercalares* befinden sich mehrere desmosomale Junctionen, die eine mechanische Kopplung der einzelnen Herzmuskelzellen bewirken, sowie *gap junctions*, über welche die Erregungsweiterleitung im Herzen erfolgt. Mit Hilfe des Dsg2-Antiserums ließen sich die Glanzstreifen im Herzmuskel spezifisch anfärben (Abbildung 17), die Dsg2-Markierung ist mit der Immunfärbung anderer Proteine der *disci intercalares* vergleichbar (Gutstein et al., 2003). Das gute Signal-Hintergrund-Verhältnis verdeutlicht eine hohe Spezifität des Antiserums für Dsg2, da andere Bereiche der Muskelzellen sind kaum angefärbt wurden.

Durch die Antigendemaskierung wurde das Herzmuskelgewebe etwas fragmentiert, jedoch können die einzelnen Herzmuskelzellen und Glanzstreifen auch lichtmikroskopisch detektiert werden.

4.2 Induzierbare und gewebsspezifische Mutagenese von DSG2

4.2.1 Herstellung von induzierbaren und gewebsspezifischen DSG2-Mutanten in der Maus

In den letzten Jahren sind zahlreiche transgene Mausmodelle zur Erforschung grundlegender biologischer, aber auch klinischer Fragestellungen generiert und charakterisiert worden. Dabei wurde auf die in zunehmender Zahl verfügbaren transgenen Maus-Systeme zur induzierbaren und gewebsspezifischen Rekombination von Zielgenen zurückgegriffen. Die hohe Effizienz von Cre/loxP macht dieses zu einem besonders populären Rekombinationssystem.

Mehrfach transgene Mauslinien, die eine regulierbare Cre-Rekombinase (Saam und Gordon, 1999) in Kombination mit gewebsspezifischen Regulatoren (tTA/rtTA) exprimieren (Kistner et al., 1996; Saam und Gordon, 1999; Valencik und McDonald, 2001; Schonig und Bujard, 2003; Russell et al., 2004; Wilkinson et al., 2006), wurden zunehmend von unitransgenen Mausstämmen ersetzt. Bei diesen kodiert das Transgen für ein chimäres Protein, das aus der Cre-Rekombinase und der Ligandenbinde-Domäne humaner oder muriner Östrogenrezeptoren zusammengesetzt ist (Cre-ER^{T2}: (Kuhn et al., 1995; Danielian et al., 1998; Schwenk et al., 1998; Vooijs et al., 2001; Guo et al., 2002; Hayashi und McMahon, 2002; Seibler et al., 2003; el Marjou et al., 2004)). Da sich diese beiden induzierbaren Systeme auf Grund ihrer zeitlichen Rekombinationskontrolle besonders zur

Untersuchung von Genen eignen, welche einen letalen Phänotyp von homozygoten *Knockout*-Mäusen zeigten, wurden sie in der vorliegenden Arbeit zur exogenen Rekombinations-Regulation des DSG2-Gens herangezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mauslinie generiert, in deren DSG2-Lokus zwei loxP-Sequenzen inseriert wurden. Nach externer pharmakologischer Induktion der Cre-Rekombinase wurden die drei Exone E4 bis E6 des DSG2-Gens entfernt und eine verkürzte mRNA gebildet, sodass dem resultierenden Protein Aminosäuresequenzen fehlten, die an der *cis*- und *trans*-Interaktion der Cadherindomänen, der kalziumvermittelten Adhäsion und an der N-Glykosylierung beteiligt sind. Um diese genomische Rekombination zeitlich und örtlich steuern zu können, kamen mehrere transgene Mauslinien zum Einsatz, die eine gewebsspezifische Synthese der Cre-Rekombinase ermöglichten. Durch Verpaarungen der geflochtenen *Dsg2*^{loxP}-Stämme mit den Trägern dieser Cre-Transgene konnten Tiere generiert werden, in denen DSG2-Rekombinationen erfolgreich induziert wurden.

In einem *in vitro*-Test (siehe Abbildung 25) wurde im Vorfeld gezeigt, dass eine korrekte Rekombination des Targeting-Konstrukts in Anwesenheit der Cre-Rekombinase stattfindet. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die funktionstragenden Sequenzen (loxP-Stellen, Neomycinresistenzgen-Kassette) des Konstrukts fehlerfrei sind.

Die verwendete ES-Zelllinie W9.5 (Szabo und Mann, 1994) weist – wie sich erst später herausstellte – eine umfangreiche Deletion in Chromosom 6 auf (Guo et al., 2005). Diese Chromosomen-Aberration hat aber keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Embryonen oder die Keimbahntransmission des transgenen Allels, wie die vorliegende Arbeit und Dutzende von Einträgen transgener Mausstämmen in der *Jax Mouse Database* belegen.

Insgesamt wurden 576 Neomycin-resistente W9.5-Zellklone isoliert, die auf eine homologe Rekombination des geflochtenen DSG2-Lokus untersucht wurden. Neben den in Abbildung 26 dargestellten fünf Kandidatenklonen wurden mehr als sechzig weitere homolog rekombinierte ES-Zell-Klone detektiert. Da sowohl die genomische DNA des Targeting-Konstrukts (λ -Mg1-Bakteriophagen-Klon), als auch die verwendeten ES-Zellen W9.5 aus SV129-Mäusen stammten, liegt ein isogener Zustand der involvierten DNAs vor. Bei nicht-isogener DNA hätte die Rekombinationseffizienz durch Nukleotid-Polymorphismen zwischen der Donor- und der Empfänger-DNA beeinträchtigt werden können.

Da eine zusätzliche Negativselektion z.B. mit Hilfe des Diphterietoxin A Fragments

(DTA) oder der Herpes simplex Typ 1 Thymidinkinase (HSV-TK) (Borrelli et al., 1988; Yanagawa et al., 1999; Chen und Bradley, 2000) für eine homologe Rekombination als nicht mehr unbedingt notwendig erachtet wird und eine derartige Kasette das Targeting-Konstrukt nochmals vergrößert hätte, wurde diese Strategie nicht angewendet. Die große Zahl der G418-resistenten Klone, sowie die hohe Effizienz der homologen Rekombination von über 10% zeigen, dass der Verzicht keine Auswirkungen auf die Effizienz gehabt haben kann.

Die Blastozysteninjektion verlief zwar erfolgreich, die resultierenden Tiere wiesen jedoch einen Chimärismus von lediglich 40 bis 60% auf und die Effizienz der Keimbahntransmission war mit zwei aus mehr als 1600 getesteten Tieren äußerst niedrig. Um eine hohe Keimbahntransmissions-Rate zu erzielen, sollte der Grad des Chimärismus deutlich über 50% liegen. Die Pluriotenz der ES-Zellen scheint durch eventuell suboptimale Zellkultur-Bedingungen oder durch zu lange Einlagerung in flüssigem Stickstoff während der Southern-Blot-Analysen eingeschränkt worden zu sein.

Da die Neuverteilung sämtlicher wildtypischer und transgener Allele, die im Rahmen der umfangreichen Verpaarungen eingesetzt wurden, den Mendelschen Gesetzen der Vererbung folgte, müssen die verschiedenen Transgene auf jeweils unterschiedlichen Chromosomen integriert worden sein. Bis auf den DSG2-Lokus (Chromosom 18) und den ROSA26-Lokus (Chromosom 6) sind die genauen Integrationsorte jedoch unbekannt. Diese zufällige Verteilung der Transgene auf unterschiedliche Chromosomen erlaubte die freie Kombination der benötigten Eigenschaften. Bei einer Integration mehrerer Transgene auf demselben Chromosom wäre eine Kombination dieser Eigenschaften nur durch eine zufällige und entsprechend seltene Rekombination der Allele während der Meiose zustande gekommen.

4.2.2 Rekombination des DSG2-Lokus in der Leber

In der Leber wurde der DSG2-Lokus mit Hilfe des bitransgenen LAP-rtTA/*tetO*-Cre-Rekombinationssystems gewebspezifisch und zeitlich durch die Gabe des Induktors Doxyzyklin über das Trinkwasser manipuliert. Wie Abbildung 32 verdeutlicht, wurde die rekombinierte DNA ausschließlich in der Leber der induzierten Tiere per PCR-Analyse

nachgewiesen, der LAP-Promotor ist also wie erwartet nur in Hepatozyten aktiv. In den Geweben der nicht induzierten Tiere wurden keinerlei PCR-Fragmente produziert, was die strikte Kontrolle des tet-Operators und des minimalen hCMV-Promotors über die Cre-Rekombinase bestätigt. Das eingesetzte System zeichnet sich demnach durch eine sichere Induzierbarkeit bei vollständig supprimierter Basalaktivität aus (vergleiche Abbildung 32).

Die Rekombination des DSG2-Lokus ist in der Leber zwischen Tag 4 und Tag 8 abgeschlossen, eine Gabe von Doxyzyklin darüber hinaus bewirkt keine weitere Steigerung der Rekombinationseffizienz (Abbildung 33). Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss beachtet werden, dass es sich hierbei um keine quantitative Analyse handelt, obwohl exakt gleiche DNA-Mengen als Matrize in den PCR-Analysen eingesetzt wurden. Eine Wiederholung des Versuches unter quantitativen Bedingungen und einer statistischen Absicherung über eine größere Anzahl von Versuchstieren ist notwendig, um dieses Ergebnis zu untermauern. Allerdings sollte dieser Vorversuch lediglich einen Hinweis auf den zeitlichen Ablauf der Rekombination in der Leber geben, um spätere Versuche mit der optimalen Zeitdauer durchzuführen. Der ermittelte optimale Zeitraum von 8 Tagen deckt sich mit den Ergebnissen, die von Gallagher und Kollegen erarbeitet worden sind (Gallagher et al., 2003).

Gesamtproteinextrakte aus Leberfragmenten induzierter und nicht induzierter Tiere wurden per Western-Blot-Analysen untersucht, um das rekombinierte Dsg2-Protein nachzuweisen. Wie Abbildung 40 zeigt, wurde kein signifikanter Größenunterschied zwischen den beiden Proteinbanden festgestellt und auch die proteolytischen Abbauprodukte beider Proteine (Abbildung 40, *) zeigen die gleiche Größe – in den vorliegenden Proteinextrakten wird also kein rekombinantes Protein nachgewiesen. Auch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Dsg2-Antiserum zeigen keine Veränderung der Dsg2-Verteilung in Leberschnitten induzierter und nicht induzierter Mäuse (nicht gezeigt).

Bei Hepatozyten handelt es sich um einen nicht-terminal differenzierten Zelltyp (Michalopoulos und DeFrances, 1997), nach einer partiellen Leberresektion ist das Organ in der Lage, in kurzer Zeit (ca. 3 Tage) den entfernten Organteil zu ersetzen (Michalopoulos und DeFrances, 1997; Abshagen et al., 2006). Über die Halbwertszeit von desmosomalen Cadherinen *in vivo* sind keine Daten verfügbar. Es ist anzunehmen, dass Dsg2 in einem mechanisch wenig beanspruchten Organ wie der Leber eine hohe Lebensdauer erreicht

und sich deshalb ein rekombiniertes Protein erst nach einem längeren Zeitraum im Gewebe akkumulieren und analytisch darstellen ließe. Um dieses Problem zu umgehen, können die Hepatozyten durch eine partielle Leberresektion zur Proliferation angeregt und dadurch – bei hoher Rekombinationseffizienz – defizientes Dsg2 in großem Ausmaß produziert werden.

Darüber hinaus können Tumorinduktionsprotokolle angewendet werden, die eine erhöhte Proliferation der Hepatozyten zur Folge haben (mit Griseofulvin (Yuan et al., 1996; Zatloukal et al., 2000)). Dieses Toxin bewirkt langsam wachsende, nicht metastasierende Tumoren in der Leber und wird Auskunft über die Adhäsion des veränderten Dsg2-Proteins in langsam proliferierenden Hepatozyten geben.

Die vorliegende Datenlage lässt noch keine endgültigen Aussagen über die Funktion von Dsg2 in Hepatozyten zu. Bei einer vollständigen Depletion der adhäsiven Eigenschaften könnte eine Lockerung des Parenchyms erfolgen, sodass unter Umständen die Ableitung der Gallenflüssigkeit gestört wäre. Es wäre möglich, dass im Extremfall die Integrität der Leber verloren ginge, sodass die strikte Kompartimentierung der Leberbalken aufgehoben würde und Gallenflüssigkeit zwischen den Hepatozyten in die Sinusoide einströme. Diese Defekte hätten eine Gelbsucht zur Folge, da Bilirubin als Abbauprodukt der Erythrozyten mit der Gallenflüssigkeit ins Blut transportiert würde. Diese Veränderungen könnten über eine Analyse der typischen Leberwerte verfolgt werden.

Weitere Versuche müssen zeigen, ob der Verlust von Bereichen der extrazellulären Dsg2-Domänen eine Auswirkung auf die Adhäsion und die Gewebshomöostase der normalen und malignen Leber hat.

4.2.3 Rekombination des geflochtenen DSG2-Allels im Darm

Das darmspezifische Rekombinationssystem *vil-CreER*^{T2} eignet sich in Kombination mit loxP-flankierten DNA-Sequenzen hervorragend, um eine zeitlich gesteuerte Rekombination in den Geweben des Darmes auszulösen: wie erwartet, wurde der DSG2-Lokus durch eine *i.p.* Injektion des externen Induktors Tamoxifen ausschließlich im Darm rekombiniert (siehe Abbildung 35). Da in anderen Geweben des induzierten Tieres keinerlei PCR-Produkte des rekombinierten DSG2-Lokus nachgewiesen wurden, wird eine ungesteuerte Translokation des chimären *CreER*^{T2}-Proteins in den Nukleus ausgeschlossen, die Cre-

Expression wurde also über die Ligandenbinde-Domäne des ER^{T2} strikt reguliert. Auch eine schwache Aktivierung des Villin-Promotors in anderen Geweben wurde nicht festgestellt, sodass die Rekombination auf die Gewebe des Darmes begrenzt war.

Bei Untersuchungen des vil-CreER^{T2}-Stammes in Kombination mit R26R-Stämmen fand die stärkste Expression des Cre-Proteins im Jejunum statt (el Marjou et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurde hier die stärkste PCR-Bande bei DNA-Extrakten des Ileums detektiert, wobei die eingesetzte nicht-quantitative Analysemethode nur ein sehr ungenaues Bild der Rekombinationseffizienz vermittelt.

Homozygote Tiere mit geflochten DSG2-Allelen zeigten eine hohe Aktivität der Cre-Rekombinase, wie mit Hilfe von RT-PCR-Analysen bei den Tieren V19 bis V21 festgestellt wurde (siehe Abbildung 39). Das Tier V2 hingegen war für das induzierbare DSG2-Allel heterozygot, sodass hier eine maximal 50%-ige Rekombination des DSG2-Lokus zu erwarten war. Bei einer PCR-Analyse werden unter gleichen Reaktionsbedingungen kleinere PCR-Produkte generell bevorzugt amplifiziert. Aus diesem Grund war bei den Proben des Tiers V2 das größere, nicht-rekombinierte Fragment schwächer ausgeprägt, als das rekombinierte und deshalb kleinere. Da bei den Proben der Tiere V19 bis V21 kein wt-mRNA-Produkt gebildet wurde, kann hier von einer annähernd vollständigen Rekombination des Genlokus ausgegangen werden.

4.2.4 Wirkung der Deletion extrazellulärer Dsg2-Domänen auf die Gewebshomöostase im Darm

Murine Enterozyten durchlaufen in 72 bis 96 Stunden ihren Lebenszyklus von den basalen Bereichen der Schleimhaut bis zur Spitze des Villus, wie mit ³H-pulse-chase-Experimenten gezeigt wurde (Cheng und Leblond, 1974a, b, c). Da über die physiologische *in vivo*-Halbwertszeit des Dsg2-Proteins keine Daten vorliegen, bot sich ein schnell differenzierendes Gewebe mit einer kurzen Lebensspanne an, um dort die Interaktion der mutierten Dsg2-Proteine zu untersuchen. Die Tatsache, dass die Cre-Rekombinase auch in den Stammzellkompartimenten des Darmes aktiv ist und ihre Aktivität bis zu 60 Tage nach Abschluss der Induktion nachgewiesen werden kann (el Marjou et al., 2004), hebt den Darm als optimales Zielgewebe für diese Untersuchungen hervor. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen der Mucosa innerhalb einer Induktionsdauer von fünf Tagen

zum einem vollständig ausgetauscht werden und zum anderen das mutierte Dsg2-Protein alleine in den neu gebildeten Zellen für die desmosomale Adhäsion verantwortlich ist. Um völlig ausschließen zu können, dass eine eventuell nicht-rekombinierte Enterozyten-Subpopulation noch wildtypisches DSG2 exprimiert und somit das Ergebnis falsch-negativen beeinflusst, müssten die Tiere über eine Zeitdauer von insgesamt zehn Tagen induziert werden. Da die Cre-Rekombinase jedoch eine stabile und homogene Expression zeigt (el Marjou et al., 2004), wurde auf diese verlängerte Behandlung verzichtet.

Vergleichende Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Darmschnitten wildtypischer (Abbildung 15) und induzierter (Abbildung 41) Mäuse zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Dsg2-Markierung durch das Antiserum. Sowohl die Intensität der Markierung, als auch Anzahl, Größe und Struktur einzelner Desmosomen wichen zwischen den induzierten Geweben und den Kontrollschnitten nicht voneinander ab. Der Verlust von Teilen der extrazellulären Dsg2-Domänen hat demnach keinen sichtbaren Einfluss auf die Gewebshomöostase im Darm.

4.2.5 Rekombinations-Induktion im Herzmuskel

Gerade im mechanisch stark beanspruchten Herzen ist die Minderung der adhäsiven Eigenschaften von Desmosomen in den Glanzstreifen von besonders dramatischer Auswirkung. In den letzten Monaten wurden mehrere Arbeiten über die Beteiligung von Mutationen im DSG2-Gen bei der Rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) veröffentlicht, einer vererbaren Herzmuskelschwäche mit hoher Penetranz (Awad et al., 2006; Basso et al., 2006; Pilichou et al., 2006; Syrris et al., 2006; Syrris et al., 2007). Diese Krankheit zeichnet sich durch einen Austausch von Herzmuskelzellen durch Fett- oder Bindegewebe zunächst im rechten Ventrikel aus. Später ist das gesamte Herzen von diesen Veränderungen betroffen und die Krankheit führt zum Tod des Patienten durch Herzversagen. Ultrastrukturell wird im krankhaften Gewebe eine geringere Anzahl von Desmosomen beobachtet und es kommt zu abnormen Glanzstreifen mit aufgeweiteten Interzellularspalten (Basso et al., 2006). Da die wildtypischen DSG2-Allele die Auswirkungen der Mutationen nicht kompensieren können, kommt es bei der ARVC zu einer Haploinsuffizienz. Die veränderten Proteinbereiche befinden sich in den meisten Fällen in den extrazellulären Cadherindomänen, die für die adhäsiven Eigenschaften verantwortlich

sind. Des Weiteren kommt es zu Aminosäure-Austauschen, die entweder den Translationsstart verhindern oder vorzeitige Stopp-Kodons implementieren, sodass wiederum ein trunkiertes aminoterminalen Dsg2-Proteinfragment ohne Transmembrandomäne und zyttoplasmatische Domäne generiert wird. Diese Dsg2-Varianten sind deshalb nicht in der Lage, die zyttoplasmatischen Brückenproteine wie Plakoglobin zu binden, sodass die Anknüpfung der Intermediärfilamente an die Desmosomen nicht mehr geleistet werden kann. Weiterhin wurden Mutationen beschrieben, die ein untypisches Spleißen der mRNA verursachen und ein anormales Protein zur Folge haben. Außerdem existieren Mutationen innerhalb der Furin-Erkennungsstelle, die für die proteolytische Abspaltung des Signalpeptids und der Pro-Sequenz vom Hauptprotein verantwortlich ist, sodass die adhäsive Kopplung der desmosomalen Cadherine im Interzellularspalt gestört ist. Diese Arbeiten zeigen erstmals die Beteiligung von desmosomalen Cadherinen an diesen Erkrankungen und unterstreichen die Relevanz von Dsg2 für die Gewebshomöostase des Herzens.

Es ist erstaunlich, dass die Kombination des geflochtenen DSG2-Lokus mit je einem der drei unterschiedlichen transgenen Systeme (α -MHC-opt-rtTA/*tetO*-Cre, MerCreMer und ROSA26-CreER^{T2}) keine funktionstüchtige Induktion zuließ, obwohl die Rekombination in anderen Gewebstypen mit den gleichen Mechanismen einwandfrei erfolgte. Trotz mehrerer Wiederholungen des Induktionsversuches mit teilweise verlängerten Induktionsdauern bzw. höheren Dosen der Induktoren wurde im Herzen keinerlei Rekombination – weder auf DNA, noch auf mRNA-Ebene – nachgewiesen (nicht gezeigt). Da DSG2 im Herzmuskel der Maus eindeutig exprimiert wird (siehe Anhang 7.9 und Abbildung 17), ist der Genlocus transkriptionell aktiv. Eine Blockade der loxP-Sequenzen durch epigenetische Effekte kann also ausgeschlossen werden und wurde bisher nicht beschrieben. Weitere Experimente mit Cre-spezifischen Antikörpern bei Western-Blot- bzw. Immunfluoreszenz-Analysen und RT-PCR-Untersuchungen werden Aufschluss über die Expression der Rekombinase im Herzmuskel geben.

4.2.6 Rekombination von DSG2 im ROSA26-CreER^{T2}-Hintergrund

Nachdem feststand, dass die Funktionen von Dsg2 durch die eingeführten Veränderungen nicht maßgeblich beeinträchtigt wurden (vergleiche 4.2.2 und 4.2.4) und deshalb keine

gravierenden Beeinträchtigungen der Versuchstiere wie beispielsweise multiples Organversagen wegen mangelnder Adhäsion zu erwarten waren, sollte DSG2 in allen Geweben rekombiniert werden. Durch die ubiquitäre Expressions-Charakteristik des ROSA26-Lokus wurde angenommen, dass die Cre-Rekombinase unter anderem im Herzmuskel aktiv sein würde, um die DSG2-Genfunktion Herz-spezifisch zu deletieren.

Die geflochtenen DSG2^{loxP}-Allele wurden zwar in den meisten Geweben mit Hilfe der ROSA26-Cre-Rekombinase verändert, jedoch war die Rekombination nicht immer auf demselben hohen Niveau reproduzierbar. Abbildung 38 verdeutlicht das Ergebnis eines Induktionsversuches, bei dem lediglich in der Leber und in den Geweben des Darmes eine Veränderung von DSG2 stattgefunden hat, PCR-Analysen mit höherer Zyklenzahl zeigten zusätzlich eine Expression in der Haut des Schwanzes (nicht gezeigt). Weitere Versuche bestätigten die Rekombination in Darm, Leber und Haut, zusätzlich wurden auch Niere und Lunge als positive Organe identifiziert; allerdings blieb die Rekombination im Herzen stets negativ. Das Rekombinationssystem ist zweifelsfrei durch den Induktor Tamoxifen induzierbar und zeigt keinerlei unerwünschte Basisaktivierung der Cre-Rekombinase (vergleiche Kontrollen in Abbildung 38).

Sind veränderte DSG2-Allele in mehreren unterschiedlichen Gewebetypen in einem einzigen induzierbaren Versuchstier verfügbar, so ist dies von großem Vorteil, da so Tier-Ressourcen eingespart werden können. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Rekombinations-Eigenschaften der unterschiedlichen transgenen Systeme miteinander vergleichbar sind und gleiche, reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Weitere Vorversuche hinsichtlich Homogenität, sowie Stärke und Effizienz der CRE-Expression müssen die Eignung des ROSA26-CreER^{T2}-Systems zur Rekombination der geflochtenen DSG2-Allele beweisen.

4.2.7 Inkorporation des mutierten Dsg2 in Desmosomen

Aufgrund der umfangreichen Veränderungen am DSG2-Gen und des resultierenden Proteins wurde angenommen, dass die adhäsiven Eigenschaften von Dsg2 für eine erfolgreiche *trans*-Interaktion mit anderen Dsg2-Molekülen oder Dsc2 nicht ausreichend sind. Zudem fehlt die Haupt-N-Glykosylierungsstelle des reifen Proteins, sodass die Qualitätskontrollmechanismen des Golgi-Apparats dieses „fehlerhafte“ Protein möglicherweise

erkennen und zum proteolytischen Abbau freigeben. Die Beobachtungen an den Mäusen legten jedoch nahe, dass desmosomale Adhäsion weiterhin stattfindet und das mutierte Dsg2-Protein in Desmosomen inkorporiert wird. Um feinere Defekte zu induzieren, wurde daher einerseits die cDNA des rekombinierten DSG2-Gens und andererseits die wildtypische DSG2-cDNA in einen Vektor kloniert, der für ein carboxyterminales grün fluoreszierendes Protein (eGFP) kodiert. Damit sollten Expression und Verteilung der beiden fluoreszierenden Desmogleine vergleichend *in vitro* untersucht werden.

In beiden Fällen wurde eine membranständige, partikuläre Fluoreszenz detektiert und die Eigenschaften der Desmosomen hinsichtlich Größe, Verteilung und Anzahl waren bei beiden Dsg2-Varianten vergleichbar (siehe Abbildung 43). Es befanden sich wenige fluoreszierende Proteinpartikel im Zytoplasma der Eph4-Zellen, jedoch ist dies auf den Vorgang der transienten Transfektion zurückzuführen und stellt nicht die erwarteten, granulären Dsg2-eGFP-Aggregate im ER oder dem Golgi-Apparat dar. Da die transfizierten Zellen noch endogenes Dsg2 besaßen und die Desmosomen-Verteilung der von wildtypischen Zellen entsprach, kann des Weiteren ein dominant-negativer Effekt des mt-Dsg2-Proteins ausgeschlossen werden.

Nachfolgende Versuche mit Doppelfärbungen des endogenen Dsg2 und der beiden eGFP-Dsg2-Varianten mit dem Dsg2-Antiserum und Antikörpern gegen weitere desmosomale Proteine werden zusätzliche Erkenntnisse über die genaue Verteilung und eventuelle Unterschiede der beiden Proteine zu Tage bringen.

Da in den Mäusen keine Veränderung der desmosomalen Adhäsion festzustellen war, wurden die Untersuchungen an einem Zellkultursystem fortgesetzt. Hierbei können die feinen Unterschiede der Dsg2-Funktionen zwischen dem wildtypischen und dem mutierten Protein mit biochemischen, molekularbiologischen und mikroskopischen Verfahren wesentlich einfacher und umfassender untersucht werden, als am Tiersystem.

Ein weiterer Ansatz zur Überprüfung der desmosomalen Adhäsion in einem Zellkultursystem ist die schrittweise Transfektion von HT-1080 Fibroblasten mit den desmosomalen Proteinen Dsg2-eGFP, Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin. Diese Fibrosarkom-(Bindegewebs-)zellen bilden keine endogenen Desmosomen und wurden in der Vergangenheit erfolgreich verwendet, um desmosomale Interaktionen zu testen (Koeser et al., 2003). Über Immunfluoreszenz-Analysen könnten Interaktionsstudien der beiden fluoreszierenden Dsg2-Varianten erstellt werden, um Aussagen über das Bindungsverhalten des mutierten Dsg2-Proteins zu treffen.

4.2.8 Auswirkungen der Dsg2-Mutation auf die desmosomale Adhäsion

Der in dieser Arbeit generierten Dsg2-Mutante fehlt einerseits eine von vier Kalzium-Bindestellen, andererseits fehlt den beiden ersten extrazellulären Domänen durch die Mutation ein großer Proteinbereich. Sämtliche carboxyterminalen Bindungsepitope für die desmosomalen Adapterproteine wie z.B. Plakoglobin und Plakophilin sind dagegen nicht verändert worden. Aus diesem Grund wird für das mutierte Protein ein Phänotyp erwartet, der unabhängig von intrazellulären desmosomalen Proteininteraktionen ist.

Röntgenstrukturanalysen des klassischen C-Cadherins (Boggon et al., 2002), sowie elektronentomografische Untersuchungen von Desmosomen (He et al., 2003) haben zu neuen Erkenntnissen der molekularen Interaktionen von Cadherinen geführt. Man geht davon aus, dass sich die extrazellulären Domänen der Cadherine im Extrazellulärspalt in einer gebogenen Konformation sowohl in *cis*, als auch in *trans* in drei unterschiedlichen Anordnungen aneinander anlagern. Es wurde postuliert, dass die *trans*-Interaktion über die Spitze der EC1 erfolgt, wobei die Aminosäure Trp2 und eine hydrophobe Tasche des Partnermoleküls eine wichtige Rolle spielten (Reißverschluss (Shapiro et al., 1995; Boggon et al., 2002)). Andere Studien, die allerdings auf *in vitro*-Untersuchungen basieren, beschreiben eine überlappende Interaktion der Cadherindomänen (Gitterstruktur (Chappuis-Flament et al., 2001)).

Man muss daher davon ausgehen, dass die Deletion von Bereichen der EC1 und der EC2 den extrazellulären Proteinteil so verkürzt, dass die Konformation des Dsg2-Proteins verändert wird. Die Spitze der EC1 inklusive der konservierten Aminosäure Trp2 wurde zwar nicht entfernt, jedoch ist der komplette Proteinbereich, der die hydrophobe Tasche formt, deletiert worden. Somit ist eine Auswirkung der Mutation auf die *trans*-Interaktion wahrscheinlich.

Auch die an der *cis*-Interaktion beteiligten Aminosäuren wurden im mutierten Dsg2-Protein entfernt, sodass keine potente „strand dimer interface“-Interaktion (Boggon et al., 2002) zustande kommen sollte. Des Weiteren könnte auch die teilweise Verkürzung des Moleküls insgesamt die Konformation der extrazellulären Domänen verändern und so die *cis*-Interaktion kompromittieren. Es erscheint wahrscheinlich, dass die Flexibilität der Desmosomen bzw. Adhärenz-Verbindungen auf der Blattfeder-ähnlichen gebogenen Struktur der extrazellulären Cadherindomänen basiert. Durch die teilweise Verkürzung dieses Proteinteils könnte demnach die Konformation auf Grund sterischer Erfordernisse und der Abmessungen des Interzellularspalts in eine gerade Form übergehen, um den Zellzwischenraum zu überspannen. Somit wäre die transversale Flexibilität der Desmo-

somen eingeschränkt und die Adhäsion in einen starren Zustand übergegangen. Alternativ könnte die beschriebene Verkürzung der extrazellulären Dsg2-Domänen die verbleibenden EC-Domänen in eine anders geartete Interaktion zwingen und so den Interzellularspalt verkleinern. Dazu müssen jedoch noch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Geweben und Zellkultursystemen durchgeführt werden.

Um die Defekte der desmosomalen Adhäsion auf molekularem Niveau zu identifizieren, sind weitere Experimenten notwendig.

Beispielsweise können Analysen zum Verhalten primärer Kulturzellen bei Scherstress Aussagen über die Flexibilität der kompromittierten Desmosomen treffen. Hierzu eignen sich in erster Linie Organe, die das entsprechende DSG2 exklusiv exprimieren. Häufig werden diese Untersuchungen an primären Keratinozyten vorgenommen. Allerdings könnten hierbei die koexprimierten desmosomalen Cadherine Dsg1 und Dsg3 die Auswirkungen eines Dsg2-Funktionsverlusts vermutlich ausgleichen (vergleiche Kompensationshypothese bei Pemphigus-Erkrankungen).

Als *in vitro*-Tests der mutierten Dsg2-Proteine eignen sich Interaktionsstudien an isolierten extrazellulären Domänen am Kraftmikroskop. Dabei werden die zu testenden Proteine mit einem Fc-Adapterprotein fusioniert, das seinerseits über einen PEG-Anker an den Untergrund gekoppelt wird. Der identische Interaktionspartner wird an die Spitze eines Kraftmikroskops adhärirt und nun die Spitze an den Untergrund herangeführt. Bei der Annäherung der beiden Interaktionspartner adhären diese aneinander und die Bindungseigenschaften, wie z.B. Bindekraft und durchschnittliche Verweildauer der Bindung kann bestimmt werden. Diese Analysen wurden unter anderem bereits für das desmosomale Cadherin Dsg1 durchgeführt und zeigten die Möglichkeiten dieses Verfahrens zur Untersuchung auch von desmosomalen Cadherinen auf (Waschke et al., 2005).

4.2.9 Auswirkungen der Dsg2-Mutation auf das „desmosomale *signalling*“

Das mutierte Dsg2-Protein unterscheidet sich vom wildtypischen Dsg2 ausschließlich durch Veränderungen der ersten beiden extrazellulären Cadherindomänen, die carboxy-terminalen Bindungsepitope für Plakoglobin und Plakophilin sind nicht verändert worden. Es wurde eine Translokation des Armadillo-Proteins Plakoglobin in den Kern beschrieben, wo es über den c-Myc-Signaltransduktionsweg die Zellproliferation beeinflusst (Wil-

liamson et al., 2006). Diese Dysbalance führte sowohl beim Plakoglobin-*Knockout* (Charpentier et al., 2000), als auch bei einer DSG2-Überexpression in der Haut (Brennan et al., 2007) zu massiven Proliferationsveränderungen im betroffenen Gewebe.

Die vorliegenden Daten zeigen die unveränderte Synthese des mutierten Proteins, sodass die Gesamtmenge an Dsg2 nicht signifikant verändert ist. Aus diesem Grund wird weder eine atypische Translokation von Plakoglobin in den Kern, noch eine proliferative Veränderung der Gewebe erwartet.

Bei Pemphigus-Erkrankungen wurde durch die Kopplung von Autoantikörpern gegen extrazelluläre Domänen von Dsg3 eine Signaltransduktion ins Zellinnere beschrieben (Osada et al., 1997; Aoyama et al., 1999). Dies lässt auf eine Sensor- bzw. Rezeptorfunktion dieses desmosomalen Cadherins schließen, wobei die Proteinkinase C alpha (PKC α) einen direkter Einfluss auf proliferative Vorgänge in der Zelle ausgeübt.

In diesem Falle könnte die veränderte desmosomale Interaktion der mutierten Dsg2-Proteine ähnliche „*outside-in*“ Signale induzieren und die Zellproliferation über die PKC α verändern.

5. Zusammenfassung

Desmosomen sind hoch organisierte interzelluläre Verbindungen, die Zellverbänden eine mechanische Stabilität verleihen. Die Intermediärfilamentnetzwerke benachbarter Zellen werden mit Hilfe der desmosomalen Cadherine vom Desmoglein- und Desmocollin-Typ miteinander verknüpft. Diese Glykoproteine interagieren miteinander im Interzellularspalt zwischen benachbarten Zellen und stellen mit ihren zytoplasmatischen Domänen einen Ankerpunkt für desmosomale Brückenproteine dar, an welche wiederum die Proteine des Intermediärfilament-Zytoskeletts binden. Bei der Maus spielt das desmosomale Cadherin Desmoglein 2 (DSG2) bereits in frühen Stadien der Embryogenese eine entscheidende Rolle. Homozygote *DSG2-Knockout*-Mäuse sterben bereits vor der Implantation des Embryos ab. Im adulten Tier ist *Dsg2* die am weitesten verbreitete Isoform, in Darm, Leber und Herzmuskel wird es zudem exklusiv exprimiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von *Dsg2* in differenzierten Gewebeverbänden adulter Tiere zu untersuchen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mehrere transgene Mauslinien hergestellt, in denen mit Hilfe des Cre/loxP-Systems eine Deletion im DSG2-Gen konditional und gewebsspezifisch induziert werden konnte. Dazu wurden zuerst zwei loxP-Sequenzen und eine mit zwei FRT-Stellen flankierte Neomycinresistenzgen-Kassette in das DSG2-Gen von embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination eines Targeting-Konstrukts inseriert. Diese Zellen wurden in Blastozysten injiziert und Mauslinien hergestellt. Mit Hilfe der *Flpe*-Rekombinase wurde anschließend die Resistenzgen-Kassette entfernt. Diese Stämme wurden mit Mäusen verpaart, die eine induzierbare und gewebsspezifische Synthese der Cre-Rekombinase ermöglichen.

Im Darmepithel und der Leber konnte eine gewebsspezifische Rekombination des DSG2-Gens induziert werden. Untersuchungen der DSG2-mRNA zeigten, dass die DSG2-Rekombination in der Darmschleimhaut nahezu vollständig erfolgte. Immunfluoreszenz-Analysen an Gewebsfragmenten induzierter Tiere mit Isotyp-spezifischen Antikörpern, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden waren, zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Desmosomenzahl und -verteilung.

Daher wurden eGFP-Hybride des zu erwartenden mutierten *Dsg2*-Proteins in Zellen exprimiert und mit wildtypischem *Dsg2* verglichen. Es konnte hinsichtlich der Verteilung und Morphologie der Desmosomen keine Unterschiede zwischen beiden *Dsg2*-Proteinen festgestellt werden.

Der Dsg2-Mutante fehlen wichtige Proteinbereiche, die für die *trans*-Interaktion der extrazellulären Domäne verantwortlich sind, die Haupt-N-Glykosylierungsstelle, sowie eine der insgesamt vier Kalzium-Bindestellen. Dies sind Eigenschaften, von denen man bisher annahm, dass sie eine zentrale Bedeutung für die desmosomale Adhäsion besitzen.

Weitere Experimente werden zeigen, inwieweit die hergestellte Dsg2-Mutante in „Stress-situationen“, wie sie z.B. bei Regenerationsvorgängen oder der Tumorgenese auftreten, zu veränderten adhäsiven Eigenschaften führt.

6. Literaturverzeichnis

- Abremski, K., Hoess, R. und Sternberg, N. 1983. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*. 32:1301-11.
- Abshagen, K., Eipel, C., Menger, M.D. und Vollmar, B. 2006. Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res*. 134:354-62.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287:2185-95.
- Agha-Mohammadi, S. und Lotze, M.T. 2000. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J Clin Invest*. 105:1177-83.
- Al-Amoudi, A., Dubochet, J. und Norlen, L. 2005. Nanostructure of the epidermal extracellular space as observed by cryo-electron microscopy of vitreous sections of human skin. *J Invest Dermatol*. 124:764-77.
- Alexander, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W. und Lecatsas, G. 1976. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S Afr Med J*. 50:2124-8.
- Allen, E., Yu, Q.C. und Fuchs, E. 1996. Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. *J Cell Biol*. 133:1367-82.
- Amagai, M., Klaus-Kovtun, V. und Stanley, J.R. 1991. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell*. 67:869-77.
- Amagai, M., Matsuyoshi, N., Wang, Z.H., Andl, C. und Stanley, J.R. 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med*. 6:1275-7.
- Andreas, S., Schwenk, F., Kuter-Luks, B., Faust, N. und Kuhn, R. 2002. Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLP_e recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 30:2299-306.
- Aoyama, Y., Owada, M.K. und Kitajima, Y. 1999. A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur J Immunol*. 29:2233-40.
- Arnemann, J., Spurr, N.K. und Buxton, R.S. 1992. The human gene (DSG3) coding for the pemphigus vulgaris antigen is, like the genes coding for the other two known desmogleins, assigned to chromosome 18. *Hum Genet*. 89:347-50.
- Arnemann, J., Spurr, N.K., Wheeler, G.N., Parker, A.E. und Buxton, R.S. 1991. Chromosomal assignment of the human genes coding for the major proteins of the desmosome junction, desmoglein DGI (DSG), desmocollins DGII/III (DSC), desmoplakins DPI/II (DSP), and plakoglobin DPIII (JUP). *Genomics*. 10:640-5.
- Arnemann, J., Sullivan, K.H., Magee, A.I., King, I.A. und Buxton, R.S. 1993. Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *J Cell Sci*. 104 (Pt 3):741-50.
- Austin, S., Ziese, M. und Sternberg, N. 1981. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*. 25:729-36.
- Awad, M.M., Dalal, D., Cho, E., Amat-Alarcon, N., James, C., Tichnell, C., Tucker, A., Russell, S.D., Bluemke, D.A., Dietz, H.C., et al. 2006. DSG2 mutations contribute

- to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 79:136-42.
- Baron, U. und Bujard, H. 2000. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 327:401-21.
- Baron, U., Schnappinger, D., Helbl, V., Gossen, M., Hillen, W. und Bujard, H. 1999. Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1013-8.
- Basso, C., Czarnowska, E., Della Barbera, M., Bauce, B., Beffagna, G., Wlodarska, E.K., Pilichou, K., Ramondo, A., Lorenzon, A., Wozniak, O., et al. 2006. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J.* 27:1847-54.
- Bech-Serra, J.J., Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Saftig, P., Baselga, J., Arribas, J. und Canals, F. 2006. Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Mol Cell Biol.* 26:5086-95.
- Bello, B., Resendez-Perez, D. und Gehring, W.J. 1998. Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system. *Development.* 125:2193-202.
- Berkowitz, P., Hu, P., Liu, Z., Diaz, L.A., Enghild, J.J., Chua, M.P. und Rubenstein, D.S. 2005. Desmosome signaling. Inhibition of p38MAPK prevents pemphigus vulgaris IgG-induced cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem.* 280:23778-84.
- Berkowitz, P., Hu, P., Warren, S., Liu, Z., Diaz, L.A. und Rubenstein, D.S. 2006. p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12855-60.
- Beutner, E.H. und Jordon, R.E. 1964. Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. *Proc Soc Exp Biol Med.* 117:505-10.
- Bierkamp, C., Schwarz, H., Huber, O. und Kemler, R. 1999. Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development.* 126:371-81.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Bizzozero, G. 1864. Delle cellule cigliate, del reticolo Malpighiani d'ell epiderme. *Ann. Univ. Med.* 190.
- Bizzozero, G. 1871. Sulla struttura degli epiteli pavimentosi stratificati. *Rend. dell'inst. Lombardo.* 2.
- Blaschuk, O.W., Manteuffel, R.L. und Steinberg, M.S. 1986. Purification of desmoglein II: a method for the preparation and fractionation of desmosomal components. *Biochim Biophys Acta.* 883:426-31.
- Blaschuk, O.W., Sullivan, R., David, S. und Pouliot, Y. 1990. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol.* 139:227-9.
- Bocker, R., Warnke, L. und Estler, C.J. 1984. Blood and organ concentrations of tetracycline and doxycycline in female mice. Comparison to males. *Arzneimittelforschung.* 34:446-8.
- Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M. und Shapiro, L. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science.* 296:1308-13.
- Bonne, S., Gilbert, B., Hatzfeld, M., Chen, X., Green, K.J. und van Roy, F. 2003. Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol.* 161:403-16.

- Bornslaeger, E.A., Godsel, L.M., Corcoran, C.M., Park, J.K., Hatzfeld, M., Kowalczyk, A.P. und Green, K.J. 2001. Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci.* 114:727-38.
- Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M. und Evans, R.M. 1988. Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:7572-6.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Branda, C.S. und Dymecki, S.M. 2004. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell.* 6:7-28.
- Brennan, D., Hu, Y., Joubert, S., Choi, Y.W., Whitaker-Menezes, D., O'Brien, T., Uitto, J., Rodeck, U. und Mahoney, M.G. 2007. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *J Cell Sci.* 120:758-71.
- Brocard, J., Feil, R., Chambon, P. und Metzger, D. 1998. A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res.* 26:4086-90.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Chambon, P. und Metzger, D. 1997. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14559-63.
- Bromham, L.D. und Hendy, M.D. 2000. Can fast early rates reconcile molecular dates with the Cambrian explosion? *Proc Biol Sci.* 267:1041-7.
- Buchholz, F., Angrand, P.O. und Stewart, A.F. 1996. A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res.* 24:3118-9.
- Buchholz, F., Angrand, P.O. und Stewart, A.F. 1998. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol.* 16:657-62.
- Burdett, I.D. 1998. Aspects of the structure and assembly of desmosomes. *Micron.* 29:309-28.
- Buxton, R.S., Cowin, P., Franke, W.W., Garrod, D.R., Green, K.J., King, I.A., Koch, P.J., Magee, A.I., Rees, D.A., Stanley, J.R., et al. 1993. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol.* 121:481-3.
- Buxton, R.S. und Magee, A.I. 1992. Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Semin Cell Biol.* 3:157-67.
- Buxton, R.S., Wheeler, G.N., Pidsley, S.C., Marsden, M.D., Adams, M.J., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J. und Copeland, N.G. 1994. Mouse desmocollin (Dsc3) and desmoglein (Dsg1) genes are closely linked in the proximal region of chromosome 18. *Genomics.* 21:510-6.
- Capecchi, M.R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 244:1288-92.
- Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L.D., Kay, C.M. und Gumbiner, B.M. 2001. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol.* 154:231-43.
- Charpentier, E., Lavker, R.M., Acquista, E. und Cowin, P. 2000. Plakoglobin suppresses epithelial proliferation and hair growth in vivo. *J Cell Biol.* 149:503-20.
- Chen, X., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F. und Green, K.J. 2002. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* 277:10512-22.

- Chen, Y., Narendra, U., Iype, L.E., Cox, M.M. und Rice, P.A. 2000. Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol Cell*. 6:885-97.
- Chen, Y.T. und Bradley, A. 2000. A new positive/negative selectable marker, puDeltatk, for use in embryonic stem cells. *Genesis*. 28:31-5.
- Cheng, H. und Leblond, C.P. 1974a. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat*. 141:461-79.
- Cheng, H. und Leblond, C.P. 1974b. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. *Am J Anat*. 141:503-19.
- Cheng, H. und Leblond, C.P. 1974c. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat*. 141:537-61.
- Cheng, X., Mihindukulasuriya, K., Den, Z., Kowalczyk, A.P., Calkins, C.C., Ishiko, A., Shimizu, A. und Koch, P.J. 2004. Assessment of splice variant-specific functions of desmocollin 1 in the skin. *Mol Cell Biol*. 24:154-63.
- Chidgey, M., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Cruchley, A., Hail, C., Kirk, S., Merritt, A., North, A., Tselepis, C., Hewitt, J., et al. 2001. Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *J Cell Biol*. 155:821-32.
- Chidgey, M.A., Yue, K.K., Gould, S., Byrne, C. und Garrod, D.R. 1997. Changing pattern of desmocollin 3 expression accompanies epidermal organisation during skin development. *Dev Dyn*. 210:315-27.
- Chitaev, N.A., Averbakh, A.Z., Troyanovsky, R.B. und Troyanovsky, S.M. 1998. Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex. *J Cell Sci*. 111 (Pt 14):1941-9.
- Chitaev, N.A., Leube, R.E., Troyanovsky, R.B., Eshkind, L.G., Franke, W.W. und Troyanovsky, S.M. 1996. The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. *J Cell Biol*. 133:359-69.
- Chitaev, N.A. und Troyanovsky, S.M. 1997. Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 138:193-201.
- Christ, N. und Droge, P. 2002. Genetic manipulation of mouse embryonic stem cells by mutant lambda integrase. *Genesis*. 32:203-8.
- Collins, J.E., Legan, P.K., Kenny, T.P., MacGarvie, J., Holton, J.L. und Garrod, D.R. 1991. Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins): cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains. *J Cell Biol*. 113:381-91.
- Cowin, P., Kapprell, H.P. und Franke, W.W. 1985. The complement of desmosomal plaque proteins in different cell types. *J Cell Biol*. 101:1442-54.
- Cowin, P., Kapprell, H.P., Franke, W.W., Tamkun, J. und Hynes, R.O. 1986. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell*. 46:1063-73.
- Cowin, P., Matthey, D. und Garrod, D. 1984. Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'. *J Cell Sci*. 70:41-60.
- Cowley, C.M., Simrak, D., Marsden, M.D., King, I.A., Arnemann, J. und Buxton, R.S. 1997. A YAC contig joining the desmocollin and desmoglein loci on human chromosome 18 and ordering of the desmocollin genes. *Genomics*. 42:208-16.

- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K. und McMahon, A.P. 1998. Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol.* 8:1323-6.
- Deleage, G. und Roux, B. 1987. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* 1:289-94.
- Den, Z., Cheng, X., Merched-Sauvage, M. und Koch, P.J. 2006. Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo. *J Cell Sci.* 119:482-9.
- Diaz, V., Rojo, F., Martinez, A.C., Alonso, J.C. und Bernad, A. 1999. The prokaryotic beta-recombinase catalyzes site-specific recombination in mammalian cells. *J Biol Chem.* 274:6634-40.
- Doetschman, T., Maeda, N. und Smithies, O. 1988. Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:8583-7.
- Drochmans, P., Freudenstein, C., Wanson, J.C., Laurent, L., Keenan, T.W., Stadler, J., Leloup, R. und Franke, W.W. 1978. Structure and biochemical composition of desmosomes and tonofilaments isolated from calf muzzle epidermis. *J Cell Biol.* 79:427-43.
- el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D. und Robine, S. 2004. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis.* 39:186-93.
- Elias, P.M., Matsuyoshi, N., Wu, H., Lin, C., Wang, Z.H., Brown, B.E. und Stanley, J.R. 2001. Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function. *J Cell Biol.* 153:243-9.
- Eshkind, L., Tian, Q., Schmidt, A., Franke, W.W., Windoffer, R. und Leube, R.E. 2002. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol.* 81:592-8.
- Farquhar, M.G. und Palade, G.E. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17:375-412.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D. und Chambon, P. 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10887-90.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. und Chambon, P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 237:752-7.
- Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M. und Beug, H. 1996. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol.* 132:1115-32.
- Fleming, T.P., Butler, L., Lei, X., Collins, J., Javed, Q., Sheth, B., Stoddart, N., Wild, A. und Hay, M. 1994. Molecular maturation of cell adhesion systems during mouse early development. *Histochemistry.* 101:1-7.
- Fleming, T.P. und Hay, M.J. 1991. Tissue-specific control of expression of the tight junction polypeptide ZO-1 in the mouse early embryo. *Development.* 113:295-304.
- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., Khan, P.M., et al. 1994. A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8969-73.
- Fogh, J., Fogh, J.M. und Orfeo, T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 59:221-6.
- Franke, W.W., Kapprell, H.P. und Mueller, H. 1983. Isolation and symmetrical splitting of desmosomal structures in 9 M urea. *Eur J Cell Biol.* 32:117-30.

- Franke, W.W., Schmid, E., Grund, C., Muller, H., Engelbrecht, I., Moll, R., Stadler, J. und Jarasch, E.D. 1981. Antibodies to high molecular weight polypeptides of desmosomes: specific localization of a class of junctional proteins in cells and tissue. *Differentiation*. 20:217-41.
- Friedrich, G. und Soriano, P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*. 5:1513-23.
- Furth, P.A., St Onge, L., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H. und Hennighausen, L. 1994. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:9302-6.
- Futcher, A.B. 1986. Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol*. 119:197-204.
- Gallagher, A.R., Schonig, K., Brown, N., Bujard, H. und Witzgall, R. 2003. Use of the tetracycline system for inducible protein synthesis in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 14:2042-51.
- Garrod, D.R., Berika, M.Y., Bardsley, W.F., Holmes, D. und Taberner, L. 2005. Hyperadhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J Cell Sci*. 118:5743-54.
- Getsios, S., Huen, A.C. und Green, K.J. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:271-81.
- Giancotti, F.G. und Ruoslahti, E. 1999. Integrin signaling. *Science*. 285:1028-32.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. und Parks, W.P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 51:1417-23.
- Giudice, G.J., Cohen, S.M., Patel, N.H. und Steinberg, M.S. 1984. Immunological comparison of desmosomal components from several bovine tissues. *J Cell Biochem*. 26:35-45.
- Gorbsky, G., Cohen, S.M., Shida, H., Giudice, G.J. und Steinberg, M.S. 1985. Isolation of the non-glycosylated proteins of desmosomes and immunolocalization of a third plaque protein: desmoplakin III. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:810-4.
- Gorbsky, G. und Steinberg, M.S. 1981. Isolation of the intercellular glycoproteins of desmosomes. *J Cell Biol*. 90:243-8.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. und Ruddle, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:7380-4.
- Gossen, M. und Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:5547-51.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. und Bujard, H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 268:1766-9.
- Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84:345-57.
- Guo, C., Yang, W. und Lobe, C.G. 2002. A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. *Genesis*. 32:8-18.
- Guo, F., Gopaul, D.N. und van Duyn, G.D. 1997. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*. 389:40-6.
- Guo, J., Jauch, A., Heidi, H.G., Schoell, B., Erz, D., Schrank, M. und Janssen, J.W. 2005. Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 41:278-83.

- Gutstein, D.E., Liu, F.Y., Meyers, M.B., Choo, A. und Fishman, G.I. 2003. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J Cell Sci.* 116:875-85.
- Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E. und Bird, A. 2001. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet.* 27:322-6.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K. und Kemler, R. 1995. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development.* 121:3529-37.
- Hameyer, D., Eshkind, L., Schmitt, S., Antunes, C., Groen, A., Bindels, E., Jonkers, J., Krimpenfort, P., Meuwissen, R., Rijswijk, L., et al. 2007. Toxicity of ligand-dependant Cre-recombinases and generation of a conditional Cre-deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiol Genomics.*
- Hamilton, D.L. und Abremski, K. 1984. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol.* 178:481-6.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204:63-113.
- Hanakawa, Y., Li, H., Lin, C., Stanley, J.R. und Cotsarelis, G. 2004. Desmogleins 1 and 3 in the companion layer anchor mouse anagen hair to the follicle. *J Invest Dermatol.* 123:817-22.
- Hardman, M.J., Liu, K., Avilion, A.A., Merritt, A., Brennan, K., Garrod, D.R. und Byrne, C. 2005. Desmosomal cadherin misexpression alters beta-catenin stability and epidermal differentiation. *Mol Cell Biol.* 25:969-78.
- Harlow, E., Lane, D. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hasan, M.T., Schonig, K., Berger, S., Graewe, W. und Bujard, H. 2001. Long-term, non-invasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis.* 29:116-22.
- Hatzfeld, M., Haffner, C., Schulze, K. und Venzens, U. 2000. The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol.* 149:209-22.
- Hayashi, S. und McMahon, A.P. 2002. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol.* 244:305-18.
- He, W., Cowin, P. und Stokes, D.L. 2003. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science.* 302:109-13.
- Henkler, F., Strom, M., Mathers, K., Cordingley, H., Sullivan, K. und King, I. 2001. Transgenic misexpression of the differentiation-specific desmocollin isoform 1 in basal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 116:144-9.
- Herren, B., Levkau, B., Raines, E.W. und Ross, R. 1998. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell.* 9:1589-601.
- Hochman, L., Segev, N., Sternberg, N. und Cohen, G. 1983. Site-specific recombinational circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology.* 131:11-7.
- Hoess, R.H., Ziese, M. und Sternberg, N. 1982. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:3398-402.
- Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnolzer, M. und Herrmann, H. 2000. Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci.* 113 (Pt 13):2471-83.

- Horstmann, E. und Knoop, A. 1958. [Electron microscopic studies on the epidermis. I. Rat paw.]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 47:348-62.
- Huelsken, J. und Birchmeier, W. 2001. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 11:547-53.
- Hunt, D.M., Sahota, V.K., Taylor, K., Simrak, D., Hornigold, N., Arnemann, J., Wolfe, J. und Buxton, R.S. 1999. Clustered cadherin genes: a sequence-ready contig for the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18. *Genomics.* 62:445-55.
- Imai, T., Jiang, M., Chambon, P. und Metzger, D. 2001. Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:224-8.
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P. und Metzger, D. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* 27:4324-7.
- Ishii, K., Norvell, S.M., Bannon, L.J., Amargo, E.V., Pascoe, L.T. und Green, K.J. 2001. Assembly of desmosomal cadherins into desmosomes is isoform dependent. *J Invest Dermatol.* 117:26-35.
- Janssen, K.P., el-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D. und Robine, S. 2002. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology.* 123:492-504.
- Jayaram, M. 1985. Two-micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:5875-9.
- Jonca, N., Guerrin, M., Hadjiolova, K., Caubet, C., Gallinaro, H., Simon, M. und Serre, G. 2002. Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties. *J Biol Chem.* 277:5024-9.
- Kapprell, H.P., Cowin, P., Franke, W.W., Ponstingl, H. und Opferkuch, H.J. 1985. Biochemical characterization of desmosomal proteins isolated from bovine muzzle epidermis: amino acid and carbohydrate composition. *Eur J Cell Biol.* 36:217-29.
- Kapprell, H.P., Owaribe, K. und Franke, W.W. 1988. Identification of a basic protein of Mr 75,000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *J Cell Biol.* 106:1679-91.
- Karrer, H.E. 1959. Cell interconnections in normal human cervical epithelium. *J Biophysic and Biochem Cytol.* 7:181-185.
- Kelly, D.E. 1966. Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis. *J Cell Biol.* 28:51-72.
- Kemler, R., Brulet, P., Schnebelen, M.T., Gaillard, J. und Jacob, F. 1981. Reactivity of monoclonal antibodies against intermediate filament proteins during embryonic development. *J Embryol Exp Morphol.* 64:45-60.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R. und Murray, J.A. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 9:413-21.
- Kimmel, R.A., Turnbull, D.H., Blanquet, V., Wurst, W., Loomis, C.A. und Joyner, A.L. 2000. Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.* 14:1377-89.
- King, I.A., Angst, B.D., Hunt, D.M., Kruger, M., Arnemann, J. und Buxton, R.S. 1997. Hierarchical expression of desmosomal cadherins during stratified epithelial morphogenesis in the mouse. *Differentiation.* 62:83-96.

- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. und Bujard, H. 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:10933-8.
- Kljuic, A. und Christiano, A.M. 2003. A novel mouse desmosomal cadherin family member, desmoglein 1 gamma. *Exp Dermatol*. 12:20-9.
- Koch, P.J., Goldschmidt, M.D., Walsh, M.J., Zimbelmann, R. und Franke, W.W. 1991. Complete amino acid sequence of the epidermal desmoglein precursor polypeptide and identification of a second type of desmoglein gene. *Eur J Cell Biol*. 55:200-8.
- Koch, P.J., Mahoney, M.G., Cotsarelis, G., Rothenberger, K., Lavker, R.M. und Stanley, J.R. 1998. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *J Cell Sci*. 111 (Pt 17):2529-37.
- Koch, P.J., Mahoney, M.G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G.F., Whitaker-Menezes, D. und Stanley, J.R. 1997. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol*. 137:1091-102.
- Koch, P.J., Walsh, M.J., Schmelz, M., Goldschmidt, M.D., Zimbelmann, R. und Franke, W.W. 1990. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol*. 53:1-12.
- Koeser, J., Troyanovsky, S.M., Grund, C. und Franke, W.W. 2003. De novo formation of desmosomes in cultured cells upon transfection of genes encoding specific desmosomal components. *Exp Cell Res*. 285:114-30.
- Kowalczyk, A.P., Borgwardt, J.E. und Green, K.J. 1996. Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Invest Dermatol*. 107:293-300.
- Kowalczyk, A.P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E.A., Kopp, D.S., Borgwardt, J.E., Corcoran, C.M., Settler, A. und Green, K.J. 1999. The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *J Biol Chem*. 274:18145-8.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M. und Rajewsky, K. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science*. 269:1427-9.
- Kurzen, H., Moll, I., Moll, R., Schafer, S., Simics, E., Amagai, M., Wheelock, M.J. und Franke, W.W. 1998. Compositionally different desmosomes in the various compartments of the human hair follicle. *Differentiation*. 63:295-304.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. und Berns, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*. 19:4293.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Legan, P.K., Yue, K.K., Chidgey, M.A., Holton, J.L., Wilkinson, R.W. und Garrod, D.R. 1994. The bovine desmocollin family: a new gene and expression patterns reflecting epithelial cell proliferation and differentiation. *J Cell Biol*. 126:507-18.
- LeLoup, R., Laurent, L., Ronveaux, M.F., Droch-Mans, P. und Wanson, J.-C. 1978. Desmosomes and desmogenesis in the epidermis of calf muzzle. *Biol. Cell*. 34:137-152.

- Lewis, J.E., Wahl, J.K., 3rd, Sass, K.M., Jensen, P.J., Johnson, K.R. und Wheelock, M.J. 1997. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *J Cell Biol.* 136:919-34.
- Li, M., Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D. und Chambon, P. 2000. Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature.* 407:633-6.
- Logie, C. und Stewart, A.F. 1995. Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5940-4.
- Lorch, J.H., Klessner, J., Park, J.K., Getsios, S., Wu, Y.L., Stack, M.S. und Green, K.J. 2004. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem.* 279:37191-200.
- Mack, A., Sauer, B., Abremski, K. und Hoess, R. 1992. Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res.* 20:4451-5.
- Madin, S.H., Andriese, P.C. und Darby, N.B. 1957. The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals. *Am J Vet Res.* 18:932-41.
- Madin, S.H. und Darby, N.B., Jr. 1958. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 98:574-6.
- Mao, X., Fujiwara, Y. und Orkin, S.H. 1999. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5037-42.
- Marcozzi, C., Burdett, I.D., Buxton, R.S. und Magee, A.I. 1998. Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J Cell Sci.* 111 (Pt 4):495-509.
- Marino, S., Vooijs, M., van Der Gulden, H., Jonkers, J. und Berns, A. 2000. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev.* 14:994-1004.
- Marinus, M.G. und Morris, N.R. 1973. Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol.* 114:1143-50.
- Martin, G.R. und Evans, M.J. 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:1441-5.
- Mathur, M., Goodwin, L. und Cowin, P. 1994. Interactions of the cytoplasmic domain of the desmosomal cadherin Dsg1 with plakoglobin. *J Biol Chem.* 269:14075-80.
- May, M.S. und Hattman, S. 1975. Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes. *J Bacteriol.* 123:768-70.
- Merritt, A.J., Berika, M.Y., Zhai, W., Kirk, S.E., Ji, B., Hardman, M.J. und Garrod, D.R. 2002. Suprabasal desmoglein 3 expression in the epidermis of transgenic mice results in hyperproliferation and abnormal differentiation. *Mol Cell Biol.* 22:5846-58.
- Messent, A.J., Blissett, M.J., Smith, G.L., North, A.J., Magee, A., Foreman, D., Garrod, D.R. und Boulton, M. 2000. Expression of a single pair of desmosomal glycoproteins renders the corneal epithelium unique amongst stratified epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:8-15.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H. und Chambon, P. 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:6991-5.
- Michalopoulos, G.K. und DeFrances, M.C. 1997. Liver regeneration. *Science.* 276:60-6.
- Miller, K., Matthey, D., Measures, H., Hopkins, C. und Garrod, D. 1987. Localisation of the protein and glycoprotein components of bovine nasal epithelial desmosomes by immunoelectron microscopy. *Embo J.* 6:885-9.

- Moon, R.T., Bowerman, B., Boutros, M. und Perrimon, N. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*. 296:1644-6.
- Moralli, D., Vagnarelli, P., Bensi, M., De Carli, L. und Raimondi, E. 2001. Insertion of a loxP site in a size-reduced human accessory chromosome. *Cytogenet Cell Genet*. 94:113-20.
- Müller, H. und Franke, W.W. 1983. Biochemical and immunological characterization of desmoplakins I and II, the major polypeptides of the desmosomal plaque. *J Mol Biol*. 163:647-71.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:263-73.
- Nagahashi, S., Nakayama, H., Hamada, K., Yang, H., Arisawa, M. und Kitada, K. 1997. Regulation by tetracycline of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 255:372-5.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M. und Rini, J.M. 1996. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*. 380:360-364.
- Nakashima, H., Nishikawa, K. und Ooi, T. 1986. The folding type of a protein is relevant to the amino acid composition. *J Biochem (Tokyo)*. 99:153-62.
- Nollet, F., Kools, P. und van Roy, F. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*. 299:551-72.
- North, A.J., Chidgey, M.A., Clarke, J.P., Bardsley, W.G. und Garrod, D.R. 1996. Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded distributions in bovine nasal epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:7701-5.
- Nuber, U.A., Schafer, S., Schmidt, A., Koch, P.J. und Franke, W.W. 1995. The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. *Eur J Cell Biol*. 66:69-74.
- Nunes-Duby, S.E., Azaro, M.A. und Landy, A. 1995. Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination. *Curr Biol*. 5:139-48.
- Odland, G.F. 1958. The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *J Biophysic and Biochem Cytol*. 4:529-557.
- Olivares, E.C., Hollis, R.P. und Calos, M.P. 2001. Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells. *Gene*. 278:167-76.
- Oliveira Crema, V., Antunes Teixeira Vde, P., Reis, M.G., Marinho Ede, O. und Dos Santos, V.M. 2005. Morphometric study of desmosomes from oral squamous cell carcinoma. *Ultrastruct Pathol*. 29:349-55.
- Ortiz-Urda, S., Elbe-Burger, A., Smolle, J., Marquart, Y., Chudnovsky, Y., Ridky, T.W., Bernstein, P., Wolff, K. und Rappersberger, K. 2003. The plant lectin wheat germ agglutinin inhibits the binding of pemphigus foliaceus autoantibodies to desmoglein 1 in a majority of patients and prevents pathomechanisms of pemphigus foliaceus in vitro and in vivo. *J Immunol*. 171:6244-50.
- Orwin, D.F., Thomson, R.W. und Flower, N.E. 1973. Plasma membrane differentiations of keratinizing cells of the wool follicle. II. Desmosomes. *J Ultrastruct Res*. 45:15-29.
- Osada, K., Seishima, M. und Kitajima, Y. 1997. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 108:482-7.
- Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K.I., Yau, P., Takeichi, M. und Ikura, M. 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*. 267:386-9.

- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. und Evans, R.M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*. 300:611-5.
- Pasdar, M. und Nelson, W.J. 1989. Regulation of desmosome assembly in epithelial cells: kinetics of synthesis, transport, and stabilization of desmoglein I, a major protein of the membrane core domain. *J Cell Biol.* 109:163-77.
- Payne, A.S., Hanakawa, Y., Amagai, M. und Stanley, J.R. 2004. Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol.* 16:536-43.
- Peifer, M., Berg, S. und Reynolds, A.B. 1994. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell.* 76:789-91.
- Peifer, M., McCrea, P.D., Green, K.J., Wieschaus, E. und Gumbiner, B.M. 1992. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol.* 118:681-91.
- Penn, E.J., Hobson, C., Rees, D.A. und Magee, A.I. 1987. Structure and assembly of desmosome junctions: biosynthesis, processing, and transport of the major protein and glycoprotein components in cultured epithelial cells. *J Cell Biol.* 105:57-68.
- Pertz, O., Bozic, D., Koch, A.W., Fauser, C., Brancaccio, A. und Engel, J. 1999. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J.* 18:1738-47.
- Pilichou, K., Nava, A., Basso, C., Beffagna, G., Bauce, B., Lorenzon, A., Frigo, G., Vettori, A., Valente, M., Towbin, J., et al. 2006. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 113:1171-9.
- Pulkkinen, L., Choi, Y.W., Kljuic, A., Uitto, J. und Mahoney, M.G. 2003. Novel member of the mouse desmoglein gene family: Dsg1-beta. *Exp Dermatol.* 12:11-9.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. und Reed, S.I. 1994. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol.* 14:1669-79.
- Richardson, U.I., Tashjian, A.H., Jr. und Levine, L. 1969. Establishment of a clonal strain of hepatoma cells which secrete albumin. *J Cell Biol.* 40:236-47.
- Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R. und Stewart, A.F. 1998. Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *J Mol Biol.* 284:363-84.
- Russell, L.K., Mansfield, C.M., Lehman, J.J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., Valencik, M.L., McDonald, J.A. und Kelly, D.P. 2004. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res.* 94:525-33.
- Saam, J.R. und Gordon, J.I. 1999. Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. *J Biol Chem.* 274:38071-82.
- Sadowski, P.D. 1995. The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 51:53-91.
- Sakai, T., Johnson, K.J., Murozono, M., Sakai, K., Magnuson, M.A., Wieloch, T., Cronberg, T., Isshiki, A., Erickson, H.P. und Fassler, R. 2001. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med.* 7:324-30.
- Sambrook, J. 2002. Molecular cloning: A Laboratory Manual. CSHL Press.

- Sande, M.A. und Mandell, G.L. 1990. The Pharmacological Basis of Therapeutics. A.G. Gilman, Rall, T.W., Nies, A.S. and Taylor, P., editor. Pergamon Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. 24:104-8.
- Santiago-Josefat, B., Esselens, C., Bech-Serra, J.J. und Arribas, J. 2007. Post-transcriptional up-regulation of ADAM17 upon epidermal growth factor receptor activation and in breast tumors. *J Biol Chem*. 282:8325-31.
- Sauer, B. und Henderson, N. 1990. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol*. 2:441-9.
- Schafer, S., Koch, P.J. und Franke, W.W. 1994. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res*. 211:391-9.
- Schaffer, J. 1920. Vorlesungen über Histologie und Histogenese.
- Schmelz, M., Duden, R., Cowin, P. und Franke, W.W. 1986. A constitutive transmembrane glycoprotein of Mr 165,000 (desmoglein) in epidermal and non-epidermal desmosomes. I. Biochemical identification of the polypeptide. *Eur J Cell Biol*. 42:177-83.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S. und Capecchi, M.R. 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:13702-7.
- Schonig, K. und Bujard, H. 2003. Generating conditional mouse mutants via tetracycline-controlled gene expression. *Methods Mol Biol*. 209:69-104.
- Schonig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K. und Bujard, H. 2002. Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res*. 30:e134.
- Schrön, O. 1865. Über die Porenkanäle in der Membran der Zellen des fete Malpighii beim Menschen. *Moleschotts Untersuch. Naturlehre*, 9.
- Schwarz, M.A., Owaribe, K., Kartenbeck, J. und Franke, W.W. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *Annu Rev Cell Biol*. 6:461-91.
- Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P.O., Rajewsky, K. und Stewart, A.F. 1998. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*. 26:1427-32.
- Schwikardi, M. und Droge, P. 2000. Site-specific recombination in mammalian cells catalyzed by gammadelta resolvase mutants: implications for the topology of episomal DNA. *FEBS Lett*. 471:147-50.
- Seibler, J., Zevnik, B., Kuter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heilmann, C., Faust, N., Kauselmann, G., et al. 2003. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res*. 31:e12.
- Shaikh, A.C. und Sadowski, P.D. 2000. Chimeras of the Flp and Cre recombinases: tests of the mode of cleavage by Flp and Cre. *J Mol Biol*. 302:27-48.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R. und Hendrickson, W.A. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 374:327-37.
- Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Saito, H., Oka, H., Tsunoda, K., Amagai, M. und Nishikawa, T. 2005. In vivo ultrastructural localization of the desmoglein 3 adhesive interface to the desmosome mid-line. *J Invest Dermatol*. 124:984-9.
- Simrak, D., Cowley, C.M., Buxton, R.S. und Arnemann, J. 1995. Tandem arrangement of the closely linked desmoglein genes on human chromosome 18. *Genomics*. 25:591-4.

- Sivasankar, S., Gumbiner, B. und Leckband, D. 2001. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J.* 80:1758-68.
- Skerrow, C.J. und Matoltsy, A.G. 1974a. Chemical characterization of isolated epidermal desmosomes. *J Cell Biol.* 63:524-30.
- Skerrow, C.J. und Matoltsy, A.G. 1974b. Isolation of epidermal desmosomes. *J Cell Biol.* 63:515-23.
- Smith, E.A. und Fuchs, E. 1998. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol.* 141:1229-41.
- Sohal, D.S., Nghiem, M., Crackower, M.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Tymitz, K.M., Penninger, J.M. und Molkentin, J.D. 2001. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res.* 89:20-5.
- Soriano, P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 21:70-1.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., Williams, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M. und Costantini, F. 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol.* 1:4.
- Steinberg, M.S., Shida, H., Giudice, G.J., Shida, M., Patel, N.H. und Blaschuk, O.W. 1987. On the molecular organization, diversity and functions of desmosomal proteins. *Ciba Found Symp.* 125:3 - 25.
- Sternberg, N. und Hamilton, D. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 150:467-86.
- Syed, S.E., Trinnaman, B., Martin, S., Major, S., Hutchinson, J. und Magee, A.I. 2002. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J.* 362:317-27.
- Syrris, P., Ward, D., Asimaki, A., Evans, A., Sen-Chowdhry, S., Hughes, S.E. und McKenna, W.J. 2007. Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease. *Eur Heart J.* 28:581-8.
- Syrris, P., Ward, D., Evans, A., Asimaki, A., Gandjbakhch, E., Sen-Chowdhry, S. und McKenna, W.J. 2006. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet.* 79:978-84.
- Szabo, P. und Mann, J.R. 1994. Expression and methylation of imprinted genes during in vitro differentiation of mouse parthenogenetic and androgenetic embryonic stem cell lines. *Development.* 120:1651-60.
- Talbot, D., Descombes, P. und Schibler, U. 1994. The 5' flanking region of the rat LAP (C/EBP beta) gene can direct high-level, position-independent, copy number-dependent expression in multiple tissues in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 22:756-66.
- Tanaka, A.S., Tanaka, M. und Komuro, K. 1998. A highly efficient method for the site-specific integration of transfected plasmids into the genome of mammalian cells using purified retroviral integrase. *Gene.* 216:67-76.
- Thanaraj, T.A. und Clark, F. 2001. Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res.* 29:2581-93.
- Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51:503-12.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C. und Calos, M.P. 2000. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene.* 244:47-54.

- Tian, Q. 2000. Molekularbiologische Charakterisierung des menschlichen Desmoglein 2 (DSG2)-Gens und Ausschaltung dieses Gens bei der Maus durch homologe Rekombination, Heidelberg.
- Troyanovsky, S.M. 1999. Mechanism of cell-cell adhesion complex assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 11:561-6.
- Troyanovsky, S.M., Eshkind, L.G., Troyanovsky, R.B., Leube, R.E. und Franke, W.W. 1993. Contributions of cytoplasmic domains of desmosomal cadherins to desmosome assembly and intermediate filament anchorage. *Cell.* 72:561-74.
- Troyanovsky, S.M., Troyanovsky, R.B., Eshkind, L.G., Krutovskikh, V.A., Leube, R.E. und Franke, W.W. 1994a. Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage. *J Cell Biol.* 127:151-60.
- Troyanovsky, S.M., Troyanovsky, R.B., Eshkind, L.G., Leube, R.E. und Franke, W.W. 1994b. Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10790-4.
- Tsujita, M., Mori, H., Watanabe, M., Suzuki, M., Miyazaki, J. und Mishina, M. 1999. Cerebellar granule cell-specific and inducible expression of Cre recombinase in the mouse. *J Neurosci.* 19:10318-23.
- Tsukita, S. 1985. Desmocollin: a calmodulin-binding high molecular weight protein isolated from desmosomes. *J Cell Biol.* 101:2070-80.
- Uematsu, R., Furukawa, J., Nakagawa, H., Shinohara, Y., Deguchi, K., Monde, K. und Nishimura, S. 2005. High throughput quantitative glycomics and glycoform-focused proteomics of murine dermis and epidermis. *Mol Cell Proteomics.* 4:1977-89.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H. und Hillen, W. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7963-8.
- Utomo, A.R., Nikitin, A.Y. und Lee, W.H. 1999. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 17:1091-6.
- Valencik, M.L. und McDonald, J.A. 2001. Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Res.* 10:269-75.
- Valentine, J.W., Jablonski, D. und Erwin, D.H. 1999. Fossils, molecules and embryos: new perspectives on the Cambrian explosion. *Development.* 126:851-9.
- van der Weyden, L., Adams, D.J. und Bradley, A. 2002. Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics.* 11:133-64.
- Van Duyne, G.D. 2001. A structural view of cre-loxp site-specific recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 30:87-104.
- Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L. und Fuchs, E. 2001. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol.* 3:1076-85.
- Verrou, C., Zhang, Y., Zurn, C., Schamel, W.W. und Reth, M. 1999. Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol Chem.* 380:1435-8.
- Vooijs, M., Jonkers, J. und Berns, A. 2001. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep.* 2:292-7.
- Wagner, T.E., Hoppe, P.C., Jollick, J.D., Scholl, D.R., Hodinka, R.L. und Gault, J.B. 1981. Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent

- expression in adult mice and their offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:6376-80.
- Wahl, J.K., Sacco, P.A., McGranahan-Sadler, T.M., Sauppe, L.M., Wheelock, M.J. und Johnson, K.R. 1996. Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins: identification of unique and shared domains. *J Cell Sci*. 109 (Pt 5):1143-54.
- Wallis, S., Lloyd, S., Wise, I., Ireland, G., Fleming, T.P. und Garrod, D. 2000. The alpha isoform of protein kinase C is involved in signaling the response of desmosomes to wounding in cultured epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 11:1077-92.
- Wan, H., Dopping-Hepenstal, P.J., Gratian, M.J., Stone, M.G., McGrath, J.A. und Eady, R.A. 2003. Desmosomes exhibit site-specific features in human palm skin. *Exp Dermatol*. 12:378-88.
- Wang, Y., Amagai, M., Minoshima, S., Sakai, K., Green, K.J., Nishikawa, T. und Shimizu, N. 1994. The human genes for desmogleins (DSG1 and DSG3) are located in a small region on chromosome 18q12. *Genomics*. 20:492-5.
- Waschke, J., Bruggeman, P., Baumgartner, W., Zillikens, D. und Drenckhahn, D. 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest*. 115:3157-65.
- Waschke, J., Spindler, V., Bruggeman, P., Zillikens, D., Schmidt, G. und Drenckhahn, D. 2006. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol*. 175:721-7.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420:520-62.
- Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H. und Gatz, C. 1994. A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J*. 5:559-69.
- Weiske, J., Schoneberg, T., Schroder, W., Hatzfeld, M., Tauber, R. und Huber, O. 2001. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem*. 276:41175-81.
- Whittock, N.V. 2003. Genomic sequence analysis of the mouse desmoglein cluster reveals evidence for six distinct genes: characterization of mouse DSG4, DSG5, and DSG6. *J Invest Dermatol*. 120:970-80.
- Whittock, N.V. und Bower, C. 2003. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *J Invest Dermatol*. 120:523-30.
- Wilkinson, J.t., Di, X., Schonig, K., Buss, J.L., Kock, N.D., Cline, J.M., Saunders, T.L., Bujard, H., Torti, S.V. und Torti, F.M. 2006. Tissue-specific expression of ferritin H regulates cellular iron homeostasis in vivo. *Biochem J*. 395:501-7.
- Williamson, L., Raess, N.A., Caldelari, R., Zakher, A., de Bruin, A., Posthaus, H., Bolli, R., Hunziker, T., Suter, M.M. und Muller, E.J. 2006. Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. *Embo J*. 25:3298-309.
- Witcher, L.L., Collins, R., Puttagunta, S., Mechanic, S.E., Munson, M., Gumbiner, B. und Cowin, P. 1996. Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *J Biol Chem*. 271:10904-9.
- Wu, H., Stanley, J.R. und Cotsarelis, G. 2003. Desmoglein isotype expression in the hair follicle and its cysts correlates with type of keratinization and degree of differentiation. *J Invest Dermatol*. 120:1052-7.
- Yanagawa, Y., Kobayashi, T., Ohnishi, M., Kobayashi, T., Tamura, S., Tsuzuki, T., Sanbo, M., Yagi, T., Tashiro, F. und Miyazaki, J. 1999. Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res*. 8:215-21.

- Yin, T. und Green, K.J. 2004. Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol.* 15:665-77.
- Yuan, Q.X., Marceau, N., French, B.A., Fu, P. und French, S.W. 1996. Mallory body induction in drug-primed mouse liver. *Hepatology.* 24:603-12.
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Lehner, M., Denk, H., Baribault, H., Eshkind, L.G. und Franke, W.W. 2000. Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am J Pathol.* 156:1263-74.
- Zhu, B., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Jensen, I.E., Gumbiner, B.M. und Leckband, D. 2003. Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys J.* 84:4033-42.
- Zirlinger, M., Lo, L., McMahon, J., McMahon, A.P. und Anderson, D.J. 2002. Transient expression of the bHLH factor neurogenin-2 marks a subpopulation of neural crest cells biased for a sensory but not a neuronal fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:8084-9.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 52: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammonium-Persulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
cDNA	komplementäre DNA
<i>cds</i>	kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
<i>cpm</i>	Zerfallsereignisse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
DAPI	4, 6-Diamidino-2-Phenylindol
<i>dpc</i>	Tage nach der Befruchtung (<i>dies post coitum</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreit
E12	Embryonaltag 12 (Embryogenese)
ECL	“ <i>enhanced chemi-luminescence</i> ”
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	fetales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
G418	Antibiotikum, Neomycin-Analogon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish-Peroxidase</i>)
H ₂ O _{a.i.}	Wasser zur Injektion
H ₂ O _{dd}	Wasser bidestilliert
<i>i.p.</i>	<i>intra</i> peritoneal (in die Bauchhöhle)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LB-Medium	Luria-Berthani-Medium
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
loxP	“locus of crossover x in P1“
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MKS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)

Anhang

MWCO	Ausschlussgewicht (<i>molecular weight cut off</i>)
OD	Optische Dichte
<i>p.A.</i>	zur Analyse(<i>pro analysi</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PF	<i>Pemphigus foliaceus</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyzeratkinase
PLP	Poly-L-Lysin Perjodat
PV	<i>Pemphigus vulgaris</i>
RNA	Ribonukleinsäure
PNK T4	Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
U/Min	Umdrehungen pro Minute
UFA	unvollständiges Freund'sches Adjuvanz
FV	Verdünnungsfaktor
VFA	vollständiges Freund'sches Adjuvanz
VT	Volumenteil
v/v	Volumen pro Volumen („Volumenprozent“)
w/v	Gewicht pro Volumen („Gewichtsprozent“)
wt	Wildtyp

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: vergleichende Übersicht vom desmosomalen Haftkomplex und Adhärenzkontakten.....	3
Abbildung 2: Ultrastruktur von Desmosomen der Rattenhaut.....	4
Abbildung 3: Interaktion der extrazellulären Domänen von C-Cadherinen im Interzellularspalt.....	8
Abbildung 4: Genomstruktur des desmosomalen Cadheringen-Clusters von Maus und Mensch im Vergleich	10
Abbildung 5: Differenzielle Expression der desmosomalen Proteine in der Epidermis....	12
Abbildung 6: Domänenstruktur der reifen desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 (Spleißformen a und b).....	14
Abbildung 7: Reaktionstypen der sequenzspezifischen Rekombination.	24
Abbildung 8: Ermittlung der Dsg2-Antigensequenzen zur Generierung von Antiseren ...	95
Abbildung 9: Klonierung der Expressionskonstrukte zur Antigenproduktion.....	96
Abbildung 10: Optimierung der Expressionsbedingungen	98
Abbildung 11: Lyse der Bakterien (A) und Affinitätsaufreinigung des überexprimierten carboxyterminalen Antigens über NTA-Agarose (B)	99
Abbildung 12: Test des Antikörpertiters – Dot-Blot-Analyse:	100
Abbildung 13: Test der Spezifität und des Titers der polyklonalen Seren gegen das murine Dsg2	102
Abbildung 14: Test der endgültigen polyklonalen Seren gegen das murine Dsg2	103
Abbildung 15: Dsg2-Markierung auf Schnitten von Kolonepithel.....	105
Abbildung 16: Dsg2-Markierung auf Schnitten der Leber	106
Abbildung 17: Dsg2-Nachweis im Herzmuskel.....	107
Abbildung 18: Nachweis von Dsg2 in kultivierten Zellen.....	108
Abbildung 19: Nachweis von Dsg2 in Proteinextrakten aus Geweben der Maus	110
Abbildung 20: Generierung eines induzierbaren DSG2-Transgens in der Maus – Übersicht der einzelnen Projektabschnitte	112
Abbildung 21: Das DSG2-Gen	114
Abbildung 22: Deletion wichtiger Proteinbereiche von Dsg2	115
Abbildung 23: Klonierung des 5'-Arms.....	117
Abbildung 24: Klonierung des 3'-Arms.....	120
Abbildung 25: In vitro-Rekombination des Targeting-Konstrukts.....	121
Abbildung 26: Southern Blot Analysen der homologen Rekombination in ES-Zellen ...	124
Abbildung 27: Transgene Nachkommen der Gründermaus ($DSG2^{loxP-Neo}$).....	128
Abbildung 28: Genomische Southern-Blot-Analyse unterschiedlicher DSG2-Allele.....	131
Abbildung 29: PCR-Analysen zur Genotypisierung von transgenen Mäusen.....	134
Abbildung 30: PCR-Test auf Rekombination des DSG2-Lokus	135
Abbildung 31: Die induzierbare und leberspezifische Rekombination des DSG2-Lokus in der Maus.....	136
Abbildung 32: Induzierbare zelltypspezifische Rekombination des DGS2-Lokus in der Leber.....	137
Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der DSG2-Rekokmbination.....	138
Abbildung 34: Die induzierbare und herzmuskelspezifische Rekombination des DSG2-Lokus in der Maus.....	139
Abbildung 35: Die induzierbare und darmepithelspezifische Rekombination des DSG2-Lokus in der Maus.....	142
Abbildung 36: Die induzierbare und zelltypspezifische Rekombination des DGS2-Lokus in den Geweben des Darmes	143

Abbildung 37: Wirkweise der ER ^{T2} -gestützten Cre-vermittelten Rekombination am Beispiel des ROSA26 Promotors	145
Abbildung 38: Die ubiquitäre Rekombination des DSG2-Lokus	147
Abbildung 39: Detektion rekombinierter DSG2-mRNA: RT-PCR Analyse	148
Abbildung 40: Detektion des rekombinanten Dsg2-Proteins in Protein-Extrakten	149
Abbildung 41: Dsg2-Markierung in Kolonepithelzellen nach erfolgter Rekombination	151
Abbildung 42: Klonierungsstrategie des mtDSG2-eGFP-Expressionskonstrukts	153
Abbildung 43: Komparative Analyse von eGFP-markierten Dsg2-Proteinen in Eph4-Zellen	154
Abbildung 44: Aminosäuresequenzvergleich der murinen Desmogleine	202
Abbildung 45: Phylogenetischer Baum desmosomaler Cadherine	203

7.3 Oligonukleotide

Tabelle 53: Liste der versendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Zweck
03-51pBS2SK-EI+Sph-a	5' -AGCTT GATATCGCATGC CTGCA-3'	Klonierung
03-51pBS2SK-EI+Sph-b	5' - GCGATGCGATATCA -3'	Klonierung
loxP-F	5' - CTAGAAGCTT tataacttcgtataatgtatgctatacgaagttat GATATC -3'	Klonierung
loxP-R	5' - CTAGGATATC tataacttcgtatagcatacattatacgaagttat AAGCTT -3'	Klonierung
Seq-F-V4-5'ins-loxP	5' -TGGACTCATGCGTGTAGTG-3'	PCR/Sequenzierung
Seq-1491-F	5' -GGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3'	PCR/Sequenzierung
Seq-1491-R	5' -TCCCCGCGGGGATAATACGACTCA-3'	PCR/Sequenzierung
01-01	5' -CGAGATCATCGCCGTCGGGCATGCGCG-3'	PCR/Sequenzierung
03-54-3ext-for	5' -AGCATGCATAGAGGCCAAATTC-3'	Sonden Southern Bl.
03-55-3ext-rev	5' -CAAGCTTAATTCCTGGAC-3'	Sonden Southern Bl.
03-72-3ext-rev2	5' -CTGCCATTCCAGGAAATGC-3'	Sonden Southern Bl.
05-251-Eco-PGK-Neo-f	5' -GCCG GAATTC CGCTGCGATTATAGGCCTGAG-3'	Klonierung
05-252-Eco-PGK-Neo-r	5' -GATC GAATTC GCGGGGATAATACGACTC-3'	Klonierung
03-56-3'forWT	5' -CGAGTATCCAGCCAAAGAG-3'	PCR/Sequenzierung
03-57-3'forNEO	5' -CTAGTCGTCGGAGACAAGG-3'	PCR/Sequenzierung
03-57b-3'forNEO	5' -gatcagcagcctctgttcc-3'	PCR/Sequenzierung
03-58-3'rev	5' -GTGTCACCAGGGATAGTC-3'	PCR/Sequenzierung
Eco_PGK-Neo_GM_f	5' -TCC GAATTC TATGACCATGATTAC-3'	Klonierung
Eco_PGK-Neo_GM_r	5' -TCC GAATTC GGATAATACGACTCA-3'	Klonierung
03-58-ds3	5' -aggaaatgaaggggctatt-3'	PCR/Sequenzierung
03-59-d13	5' -ctctgaaaggcaagtaactg-3'	PCR/Sequenzierung
03-60-h1	5' -attggagatcgccgccg-3'	PCR/Sequenzierung
Not-Xho-Not-f	5' - GGCCGT ACCTCGAGCG TC -3'	Klonierung
Not-Xho-Not-r	5' - GGCCGA GCGCTCGAGT AC -3'	Klonierung
Eco-Xho-Bst-f	5' - AATTC CGGCTCGAGATACCGCG-3'	Klonierung
Eco-Xho-Bst-r	5' -GTAT CTCGAG CCG G -3'	Klonierung
03-61-Seq-5-loxP	5' -GGTAAATGCAGACGGATCAG-3'	PCR/Sequenzierung
03-61b-Seq-5-loxP	5' -GTCATCCACAGCCTCATAAC-3'	PCR/Sequenzierung
03-62-Seq-E4-E5	5' -ACCTGCCTCCTGTCCATAC-3'	PCR/Sequenzierung
03-63-Seq_E6	5' -TCAGCAGACTCGGCAACAAG-3'	PCR/Sequenzierung
03-64-Seq-E7-E8	5' -GCATCTCCACACCAGTATTC-3'	PCR/Sequenzierung
03-65-Neo-for	5' -CTTTGCTCCTTCGCTTCTTG-3'	Sonden Southern Bl.
03-66-5ext-for	5' -GATGTGGGAGGCTTAAGAG-3'	Sonden Southern Bl.
3-67-5ext-rev	5' -GTGCTGCGACCCTTTAATC-3'	Sonden Southern Bl.
03-68-int-for	5' -GAGTGCAGCACGTAAGAATG-3'	Sonden Southern Bl.
03-69-int-rev	5' -AATCGAGGGAGTGGAGAAAC-3'	Sonden Southern Bl.
03-70-NeoProbe-for	5' -AGGCTATTCGGCTATGAC-3'	PCR/Sequenzierung
03-71-NeoProbe-rev	5' -GAGCTGGCCCTTAATTTG-3'	PCR/Sequenzierung
03-72-3ext-rev2	5' -CTGCCATTCCAGGAAATGC-3'	PCR/Sequenzierung
03-73	5' -CCCAGCCAAGTATCTTACC-3'	PCR/Sequenzierung
03-74	5' -GGATCCGCTGTAAGTCTG-3'	PCR/Sequenzierung
03-75	5' -AAAGGCCCGGAGATGAG-3'	PCR/Sequenzierung
03-76	5' -CTGGGAAGAGTGCATATC-3'	PCR/Sequenzierung
03-86-TC5loxP-f	5' -ACTGCACTTGCAGAGG-3'	PCR/Sequenzierung
03-87-TC5loxP-r	5' -GCTATACGAAGTTATGATATCC-3'	PCR/Sequenzierung
03-91-TC5loxP-f	5' -CGAAGTTATAAGCTTCTAGCC-3'	PCR/Sequenzierung
03-92-TC5loxP-r	5' -AAGGCGGTTCTGTAATTC-3'	PCR/Sequenzierung
03-74	5' -GGATCCGCTGTAAGTCTG-3'	PCR/Sequenzierung
03-90-TC3loxP-r	5' -AAGTTATTCGAGGTCGACG-3'	PCR/Sequenzierung
04-07-dsg1a-f	5' -CACTGGCTGGGTAAGTGG-3'	PCR/Sequenzierung
04-08-dsg1a-r	5' -CGAGTGCCATCGATGCCG-3'	PCR/Sequenzierung
04-09-dsg1b-f	5' -GGTGGTAATCGTGACCCAG-3'	PCR/Sequenzierung
04-10-dsg1b-r	5' -TTGCCTACCGGAGTGTG-3'	PCR/Sequenzierung
04-11-dsg1c-f	5' -TTGTTGACTCAGGCATAATAAC-3'	PCR/Sequenzierung
04-12-dsg1c-r	5' -TACGTTTGGAGTGATGGATAG-3'	PCR/Sequenzierung

Anhang

04-13-dsg2-f	5' -GAGCTGTCTGAGGTTGACG-3'	PCR/Sequenzierung
04-14-dsg2-r	5' -GCGAGCCAGAAGCTGCAC-3'	PCR/Sequenzierung
04-15-dsg3-f	5' -ATGTGGACCATCACGACGC-3'	PCR/Sequenzierung
04-16-dsg3-r	5' -ATCACATTGACACACTGTGTCAG-3'	PCR/Sequenzierung
04-17-dsg4-f	5' -GATTCTGTATGCCAACGATTA-3'	PCR/Sequenzierung
04-18-dsg4-r	5' -GACTGCCTAACTCCATCATC-3'	PCR/Sequenzierung
04-19-gapdh-f	5' -CAACGACCCCTTCATTGACC-3'	PCR/Sequenzierung
04-20-gapdh-r	5' -CAGTAGACTCCACGACATAC-3'	PCR/Sequenzierung
dsg2-AK5-f	5' -GGCAGC CTCGAG GGAAGACGTCAATGACAATTG-3'	PCR/Sequenzierung
dsg2-AK5-r	5' -GGCAGC CTCGAG CAACCCGACGTAGTTGTC-3'	PCR/Sequenzierung
dsg2-AK3-f	5' -GGCAGC CTCGAG CGAAAGATCGATCTGGATG-3'	PCR/Sequenzierung
dsg2-AK3-r	5' -GGCAGCC CTCGAG GGAGTAAGAATGTTGCAT-3'	PCR/Sequenzierung
04-21-dsg2-ko-f	5' -CGCATTGTCTGAGTAGGTGTC-3'	PCR/Sequenzierung
04-22-dsg2-wt-f	5' -ATGTAGAAGTCATGCGGATCA-3'	PCR/Sequenzierung
04-23-dsg2-r	5' -CTAGGCAAGCCATCTACCACCT-3'	PCR/Sequenzierung
04-24-SP6	5' -CATTTAGGTGACACTATAG-3'	Sequenzierung
04-25-T3	5' -AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	Sequenzierung
04-26-T7	5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sequenzierung
04-27-T7term	5' -CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'	Sequenzierung
04-37-dsg2AK3-r	5' -GAGGTCACCCAGCATCTGAAAG-3'	PCR/Sequenzierung
04-38-Cre-f	5' -CCGGTTATTCAACTTGCACC-3'	PCR/Sequenzierung
04-39-Cre-r	5' -CTGCATTACCGGTCGATGCAA-3'	PCR/Sequenzierung
04-40-FABP-f	5' -CGCCCAGAAGCTAGGTGTAG-3'	PCR/Sequenzierung
04-41-FABP-r	5' -GCTCCATCGCGATGACTTAG-3'	PCR/Sequenzierung
04-42-dsg2I8-r	5' -ATATGACTTGTGCTATGAAGG-3'	PCR/Sequenzierung
04-43-dsg2Qi-f	5' -CCCCGGATCTAAGCTCTAGATA-3'	PCR/Sequenzierung
04-59-FLP-f	5' -TGGGAAATTGGAGCGATAAG-3'	PCR/Sequenzierung
04-60-FLP-r	5' -CTGCCACTCCTCAATTGGAT-3'	PCR/Sequenzierung
04-61-aMHC-f	5' -GTGGGAGATCGAGCAGGCCCTCG-3'	PCR/Sequenzierung
04-62-aMHC-r	5' -CTGGGTTGCGTGTGGAAGATC-3'	PCR/Sequenzierung
04-75-f	5' -TGCTGTGCTGTGGTTATG-3'	PCR/Sequenzierung
04-76-r	5' -CTAGTGAGACGTGCTACTTC-3'	PCR/Sequenzierung
04-77-CreERT2-f	5' -CAAGCCTGGCTCGACGGCC-3'	PCR/Sequenzierung
04-78-CreERT2-r	5' -CGCGAACATCTTCAGGTTCT-3'	PCR/Sequenzierung
04-79-Cre-f (R26)	5' -ACCAGCCAGCTATCAACTC-3'	PCR/Sequenzierung
04-80-Cre-r (R26)	5' -TATACGCGTGTAGCGAAGATCTCCATCTTCCAGCAG-3'	PCR/Sequenzierung
05-31-GAPDH-f	5' -ATGAGCCCTTCCACAATG-3'	PCR/Sequenzierung
05-32-GAPDH-r	5' -TCCACTCACGGCAAATTC-3'	PCR/Sequenzierung
05-186-CreErT-f	5' -GCACGTTACCCGGCATCAAC-3'	PCR/Sequenzierung
05-187-CreErT-r	5' -CGATGCAACGAGTGATGAGGTTTC-3'	PCR/Sequenzierung
06-10-Sall	5' -ATC GTCGAC ATGGCGCGGAGCCCGGGTG-3'	Klonierung
06-11-blunt	5' -CTTGGCAATCGGTTCTTTC-3'	Klonierung
06-12-blunt	5' -GAACACAGCAGCTATTCCTG-3'	Klonierung
06-13-SacII	5' -ATC CCGCGG GGAGTAAGAATGTTGCATGG-3'	Klonierung
06-14-f	5' -GGTGGTCTGCTTGGACTTTG-3'	PCR/Sequenzierung
06-15-r	5' -GGCAATCGGTTCTTCTG-3'	PCR/Sequenzierung
06-16-r	5' -GCCACAACCTTTCAGTGTAG-3'	PCR/Sequenzierung
06-17-f	5' -GGTTGTGGCCATATCCAAAG-3'	PCR/Sequenzierung
06-18-f	5' -TGACGGAAGATGGGAAGAAC-3'	PCR/Sequenzierung
06-45-PvuI	5' -CTTGG CgATCG GGTTCTTTC-3'	Klonierung
06-46-PvuI	5' -ACC CGATCG ccaagGAACACAGCAGCTATTCCTTG-3'	Klonierung
06-48-PvuI-2	5' -ACC CGATCG ccaAGGAACACAGCAGCTATT-3'	Klonierung
06-73-BclI	5' -ATC TGATCA ATGGCGCGGAGCCCGGGTG-3'	Klonierung
06-74	5' -TCGAG TGATCA TCCT CGATCG CTGCA-3'	Klonierung
06-75	5' - CGATCG AGGAT TGATCA -3'	Klonierung
06-76	5' -GTTCTTATCGACGACAAAGcttggcgatcgggttctttctgg-3'	Klonierung
06-77-SacII	5' -ATC CCGCGG ccgcggaGGAGTAAGAATGTTGCATGG-3'	Klonierung
06-83-FLPe-f	5' -ACTTCTTTAGCGCAAGGG-3'	PCR/Sequenzierung
06-84-FLPe-r	5' -TCTATATGCTGCCACTCCTC-3'	PCR/Sequenzierung
07-01-Sry-f	5' -GAGAGCATGGAGGGCCAT-3'	PCR/Sequenzierung
07-02-Sry-r	5' -CCACTCCTCTGTGACT-3'	PCR/Sequenzierung

Anhang

07-03-Mer-f	5' -ATACCGGAGATCATGCAAGC-3'	PCR/Sequenzierung
07-04-Mer-r	5' -AGGTGGACCTGATCATGGAG-3'	PCR/Sequenzierung
07-11-r	5' -GAGGAGGCTTCTGTGTTCTTC-3'	PCR/Sequenzierung
07-12-f	5' -CCAGAAAGAACCCGATTG-3'	PCR/Sequenzierung
07-13-r	5' -GATCCGCATGACTTCTAC-3'	PCR/Sequenzierung
M13	5' -TGAGTTTCGTCACCAGTA-3'	Sequenzierung
M13-rev	5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'	Sequenzierung

- fett:** Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen
- kursiv:* „klebrige Überhänge“, die nach erfolgter gegenseitiger Primeranlage an einen passend restringierten DNA-Strang komplementär binden können
- ~~durchgestrichen:~~ Basen, welche nach erfolgter Linker-Klonierung die Erkennungsstelle der jeweils zuvor verwendeten Restriktionsendonuklease maskieren, sodass diese Restriktionsendonuklease das Ligationsprodukt nicht mehr schneiden kann.
- Kleinbuchstaben: Basen, die mit der Matrize nicht paaren (Fehlpaarungen, Mutationen)

7.4 PCR-Programme

BAS-DSGX			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
initiale Denaturierung	94°C	4 Minuten	1
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	35
Anlagerung	54°C	15 Sekunden	
Polymerisation	74°C	30 Sekunden	
finale Polymerisation	74°C	5 Minuten	1

BAS-TET6			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
initiale Denaturierung	94°C	4 Minuten	1
Denaturierung	94°C	60 Sekunden	30
Anlagerung	58°C	60 Sekunden	
Polymerisation	72°C	60 Sekunden	
finale Polymerisation	72°C	5 Minuten	1

BAS-VIL			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
initiale Denaturierung	94°C	4 Minuten	1
Denaturierung	94°C	45 Sekunden	30
Anlagerung	55°C	45 Sekunden	
Polymerisation	72°C	45 Sekunden	
finale Polymerisation	72°C	5 Minuten	1

BAS-R26			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
initiale Denaturierung	94°C	4 Minuten	1
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	30
Anlagerung	56°C	30 Sekunden	
Polymerisation	72°C	50 Sekunden	
finale Polymerisation	72°C	5 Minuten	1

BAS-2ND1			
Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
initiale Denaturierung	94°C	4 Minuten	1
Denaturierung	94°C	15 Sekunden	35
Anlagerung	57°C	15 Sekunden	
Polymerisation	72°C	30 Sekunden	
finale Polymerisation	72°C	5 Minuten	1

7.5 Eigenschaften der PCR-Reaktionsansätze

Allel(e)	DSG2^{deltaE7-E8/wt}
Programm	BAS-DSGX
Fragmente [bp]	361/~500
Primer	03-58_ds3/03-59/04-43
Zusätze	-

Allel(e)	DSG2^{wt}
Programm	BAS-DSGX
Fragment [bp]	361
Primer	03-58_ds3/03-59
Zusätze	-

Allel(e)	DSG2^{loxP}
Programm	BAS-TET6
Fragment [bp]	860
Primer	03-91/03-92
Zusätze	-

Allel(e)	(<i>tet-O</i>-)Cre/rtTA
Programm	BAS-TET6
Fragmente [bp]	180/220
Primer	04-38/04-39/04-40/04-41
Zusätze	c [Mg ²⁺] = 3,3 mM

Allel(e)	Vil-CreERT²
Programm	BAS-VIL
Fragment [bp]	~300
Primer	04-77/04-78
Zusätze	-

Allel(e)	ROSA26-CreERT²
Programm	BAS-R26
Fragment [bp]	~300
Primer	04-79/04-80
Zusätze	-

Allel(e)	α-MHC-opt-rtTA
Programm	BAS-MHC2
Fragment [bp]	472
Primer	06-302/06-303
Zusätze	-

Allel(e)	FLPe
Programm	BAS-TET6
Fragment [bp]	464
Primer	06-83/04-60
Zusätze	-

Anhang

Allel(e)	DSG2^{loxP}/DSG2^X
Programm	BAS-TET6
Fragmente [bp]	876/925
Primer	03-61_b/03-92
Zusätze	-

Allel(e)	MerCreMer
Programm	BAS-VIL
Fragment [bp]	440
Primer	07-03/07-04
Zusätze	-

Allel(e)	Rekombinationstest (DNA)
Programm	BAS-TET6
Fragment [bp]	860
Primer	03-86/03-58_3'rev
Zusätze	-

Allel(e)	Rekombinationstest (cDNA)
Programm	BAS-2ND1
Fragmente [bp]	210/686
Primer	07-12/07-13
Zusätze	-

Allel(e)	GAPDH (cDNA)
Programm	BAS-2ND1
Fragment [bp]	374
Primer	05-32/05-32
Zusätze	-

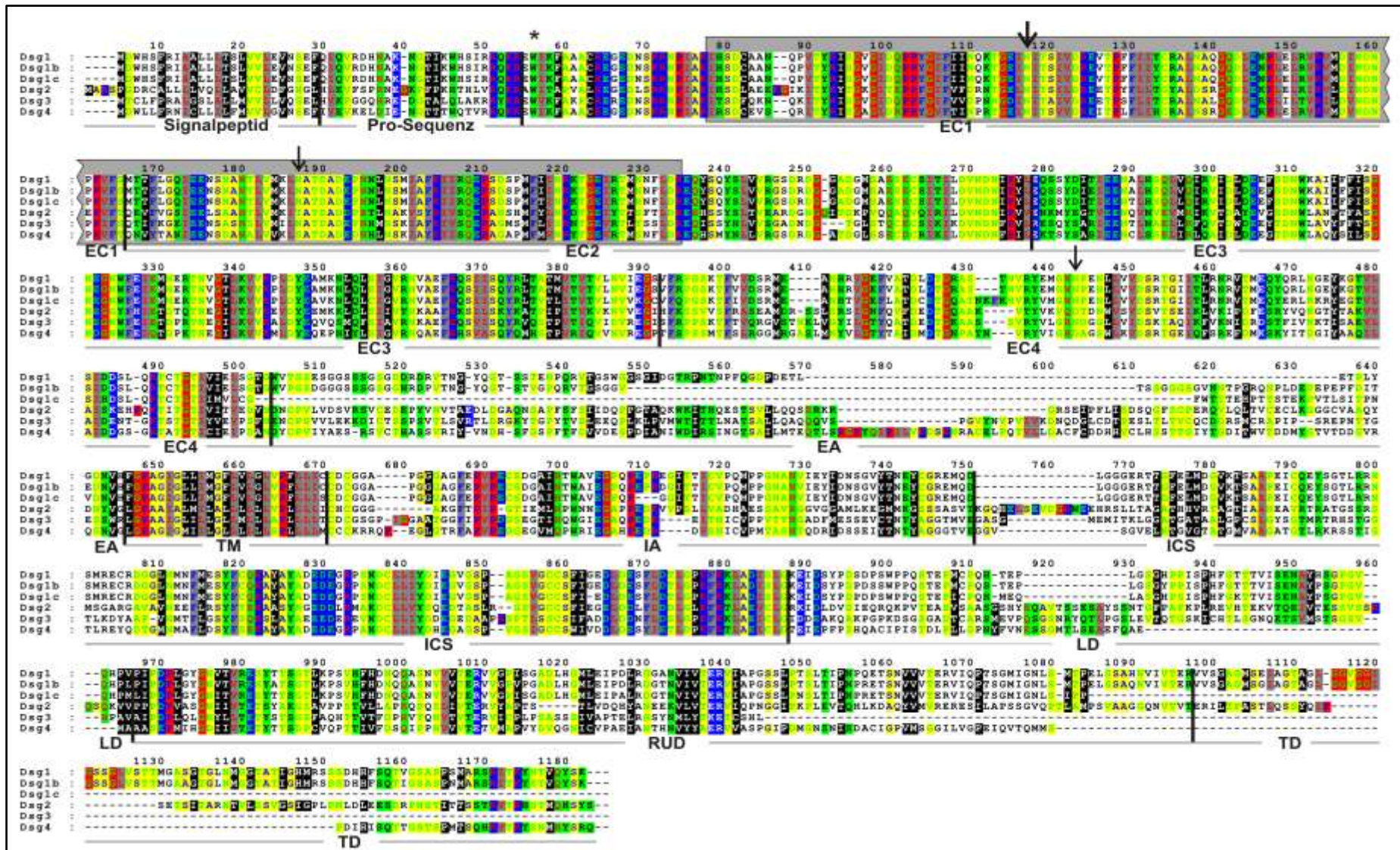


Abbildung 44: Aminosäuresequenzvergleich der murinen Desmogleine

Die Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des Programms „GeneDoc“ eingelesen und das *Alignment* manuell optimiert. Die Farbcodierung verdeutlicht physiochemisch konservierte Aminosäuren, die Lage der Proteindomänen ist angegeben. Graue Rechtecke: Bereich der Deletion (nur Dsg2), *: Lage der Aminosäure Tryptophan 2, senkrechte Pfeile: N-Glykosylierung (dicker Pfeil: konserviertes Asparagin), EC1 - EC4: extrazelluläre Cadherindomänen; EA: extrazelluläre Ankerdomäne; TM: Transmembrandomäne; IA: intrazelluläre Ankerdomäne; ICS: intrazelluläres Cadherin-artiges Segment; LD: Linkerdomäne; RUD: „repeated unit domain“; TD: terminale Domäne. *Accession Numbers*: Dsg1: XM_484705; Dsg1b: NM_181682; Dsg1c: AY314983; Dsg2: NM_007883; Dsg3: NM_030596; Dsg4: NM_181564

7.7 Phylogenie der desmosomalen Cadherine

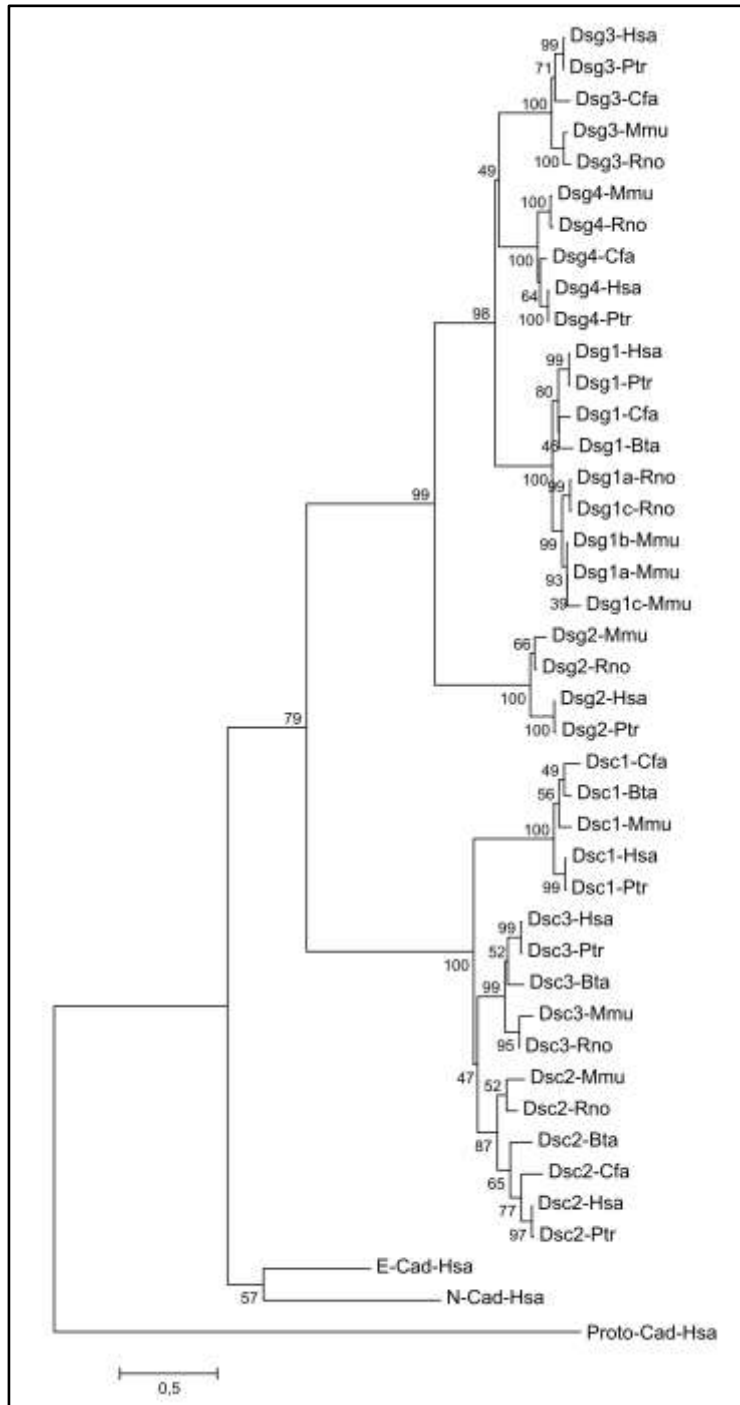


Abbildung 45: Phylogenetischer Baum desmosomaler Cadherine

Die Berechnung erfolgte nach dem Modell der Neighbour-Joining-Methode (PAM-Matrix, Dayhoff-Modell mit paarweiser Deletion und 1000 Replikationen). Verglichen wurden die konservierten Bereiche der extra-zellulären Domänen von desmosomalen Cadherinen der Spezies *Homo sapiens* (Hsa), *Pan troglodytes* (Ptr), *Mus musculus* (Mmu), *Rattus norvegicus* (Rno), *Bos taurus* (Bta), and *Canis familiaris* (Cfa). Zwei Vertreter der klassischen Cadherine des Menschen E-Cadherin (E-Cad) und N-Cadherin (N-Cad) wurden in den Vergleich mit einbezogen, als Außengruppe wurde ein wenig konserviertes Protein (menschliches Proto-Cadherin (Proto-Cad)) verwendet. Der Maßstab entspricht 0,5 Aminosäureaustauschen pro Position, die Zahlen an den Verzweigungen verdeutlichen die "bootstrap"-Unterstützungswerte.

Accession Numbers:

Dsg1-Hsa: NM_001942.1;
 Dsg1-Ptr: XM_523899.2;
 Dsg1a-Mmu: XM_484705.3;
 Dsg1b-Mmu: NM_181682.1;
 Dsg1c-Mmu: NM_181680.1;
 Dsg1a-Rno: XM_001054208.1;
 Dsg1c-Rno: XM_214616.4;
 Dsg1-Bta: NM_174045.1;
 Dsg1-Cfa: NM_001002939.1;
 Dsg2-Hsa: NM_001943.1;
 Dsg2-Ptr: XM_512079.2;
 Dsg2-Mmu: NM_007883.1;
 Dsg2-Rno: XM_001054396.1;
 Dsg3-Hsa: NM_001944.1;
 Dsg3-Ptr: XM_523900.2;
 Dsg3-Mmu: NM_030596.2;
 Dsg3-Rno: XM_001054333.1;
 Dsg3-cfa: NM_001002983.1;

Dsg4-Hsa: NM_177986.2; Dsg4-Ptr: XR_021674.1; Dsg4-Mmu: NM_181564.2; Dsg4-Rno: NM_199490.1;
 Dsg4-Cfa: XM_850325.1; Dsc1-Hsa: NM_024421.1; Dsc1-Ptr: XM_512078.2; Dsc1-Mmu: X97986.1;
 Dsc1-Bta: NM_174044.1; Dsc1-Cfa: XM_547623.2; Dsc2-Hsa: NM_024422.2; Dsc2-Ptr: XM_512077.2;
 Dsc2-Mmu: L33779.1; Dsc2-Rno: BC101864.1; Dsc2-Bta: XM_615164.2; Dsc2-Cfa: XM_861837.1;
 Dsc3-Hsa: NM_001941.2; Dsc3-Ptr: XM_512076.2; Dsc3-Mmu: NM_007882.2;
 Dsc3-Rno: XM_001053804.1; Dsc3-Bta: L33774.1; E-Cad-Hsa: NM_004360.2; N-Cad-Hsa: NM_001792.2;
 Proto-Cad-Hsa: NM_019120.2.

7.8 Identitäten/Similaritäten diverser Desmogleine

Desmoglein 2				
	Mmu	Rno	Hsa	Ptr
Mmu	-	92,7	83,8	83,8
Rno	89,3	-	81,7	81,8
Hsa	76,5	74,6	-	99,1
Ptr	76,5	74,6	98,9	-

Desmoglein 2 - EC1 bis EC4				
	Mmu	Rno	Hsa	Ptr
Mmu	-	96,4	90,1	89,6
Rno	92,8	-	89,6	89,2
Hsa	83,1	82,7	-	99,5
Ptr	82,9	82,4	99,5	-

Desmogleine der Maus						
	Dsg1a	Dsg1b	Dsg1c	Dsg2	Dsg3	Dsg4
Dsg1a	-	95,5	80,5	43,6	48,1	51,9
Dsg1b	94,4	-	80,4	42,7	48,4	51,9
Dsg1c	78,9	78,3	-	41,6	50,0	52,2
Dsg2	30,6	30,0	29,8	-	44,8	45,8
Dsg3	37,0	37,5	39,8	32,8	-	57,3
Dsg4	40,3	40,3	40,5	32,2	43,5	-

Desmogleine der Maus - EC1 bis EC4						
	Dsg1a	Dsg1b	Dsg1c	Dsg2	Dsg3	Dsg4
Dsg1a	-	99,8	93,0	57,7	69,7	71,5
Dsg1b	99,8	-	93,0	57,3	69,7	71,1
Dsg1c	90,5	90,5	-	57,5	62,1	67,8
Dsg2	43,7	43,4	43,6	-	62,1	61,7
Dsg3	57,0	57,0	46,4	46,4	-	74,0
Dsg4	59,0	58,9	56,0	46,0	59,3	-

Tabelle 54: Identitäten/Similaritäten unterschiedlicher Desmogleine in %

Die Aminosäuresequenzen verschiedener Desmogleine wurden mit Hilfe des Programms „AlignX“, basierend auf der Blosum62-Matrix miteinander verglichen. Analysiert wurden zum einen das Gesamtprotein, zum anderen lediglich die extrazellulären Cadherindomänen EC1 bis EC4. Identität: **fett**, Similarität: *kursiv*

Accession Numbers:

Dsg1a-Mmu: XM_484705.3

Dsg2-Mmu: NM_007883.1

Dsg2-Hsa: NM_001943.1

Dsg1b-Mmu: NM_181682.1

Dsg3-Mmu: NM_030596.2

Dsg2-Ptr: XM_512079.2

Dsg1c-Mmu: NM_181680.1

Dsg4-Mmu: NM_181564.2

Dsg2-Rno: XM_001054396.1

Zelltypspezifische Synthese der desmosomalen Cadherine in **Mensch**, **Rind** und **Maus**

	Dsg1- α (Dsg1)	Dsg1- β (Dsg5)	Dsg1- γ (Dsg6)	Dsg2	Dsg3	Dsg4	Dsc1	Dsc2	Dsc3
Blastozyste				+ ⁶		- ₄		+ ^{3,4}	+ ⁴ / ₃
E7	- _{19;24;28}	- _{24;28}	- ₂₈	+ _{19;28}	+ _{19;28}	+ ₂₈			
E11/E11.5	- _{19;24;28}	- _{24;28}	- ₂₈	+ _{19;28}	+ _{19;28}	+ ₂₈			(+) ⁴
E12.5	(+) ^{8c,d,e} / _{-8g}			+ ^{8c,d,e,f,g}	(+) ^{8c} / _{+8e} / _{-8d,g}		- _{8c,d,e,g}	+ ^{8c,d,e,f,g}	+ ^{4;8c,d,e} / _{-8g}
E13.5	+ ^{8e,f;9} / _{-3;8a,b}			+ ^{8a,b,e,f}	+ ^{8e,f} / _{-8a,b}		(+) ^{8e} / ₊₉ / _{-8a,b,f}	+ ^{8a,b,e,f}	+ ^{4;8b,e,f} / _{-8a}
E14/E14.5	(+) ^{8c} / _{+2;8a,d,f} / _{-8b,g}	+ ²	+ ²	+ ^{8a,b,c,d,f,g}	(+) ^{8c,d} / _{+2;8a,f,g} / _{-8b}		+ ^{8f} / _{-8a,b,c,d,g}	+ ^{8a,b,c,d,f,g}	+ ^{4;8a,b,c,d,f} / _{-8g}
E15/15.5	+ ^{8a,b,c,d,e;9;19;24;28}	- _{24;28}	- ₂₈	+ ^{8a,b,c,d,e;19;28}	(+) ^{8c} / _{+8a,b,d;19;28} / _{-8e}	+ ₂₈	+ ^{8e;9} / _{-8a,b,c,d}	+ ^{8a,b,c,d,e}	+ ^{4;8a,b,c,d,e}
E16.5/17	+ ^{8g,f;9;19;24;28}	+ _{24;28}	+ ₂₈	+ ^{8g,f;19;28}	+ ^{8g,f;19;28}	+ ₂₈	+ ^{8f;9} / _{-8g}	+ ^{8f,g}	+ ^{4;8f,g}
Magen	- ₂₅ / ₋₂	- ₂	+ ²	+ ^{25;26}	- ₂₅	- ₁₁	- _{22;23}	+ ²² / ₊₁₇	- _{22;23}
Pansen							- ₁₆	+ ¹⁶	+ ¹⁶
Darm							+ ¹⁶	+ ¹⁷ / ₋₁₆	- ₁₆
Dünndarm	- ₂₅ / ₋₂ / ₋₂₅	- ₂	+ ²	+ ²⁵ / ₊₂₅	- ₂₅ / ₋₂₅	- ₁₁	- _{22;23}	+ ²²	- _{22;23}
Dickdarm	- ₂₅ / ₋₂	- ₂	+ ²	+ ²⁵	- ₂₅		- _{22;23}	+ ²²	- _{22;23}
Leber	(+) ²⁵ / _{+19;28} / _{-2;11;12;24} / ₋₂₅	- _{2;24;28}	+ ^{11;12} / _{-2;28}	+ ^{25;26} / _{+19;28}	- ₂₅ / ₊₁₉ / ₋₂₈ / ₋₂₅	- ₂₉ / ₍₊₁₁₎ / _{-11;28}	- _{22;23} / ₊₁₆	+ ²² / ₊₁₇ / ₋₁₆	- _{22;23} / ₋₁₆
Pankreas	- ₂	- ₂	+ ²			+ ¹¹			
Gallenblase							- ₁₆	+ ¹⁶	- ₁₆
Uterus	- _{2;11;12}	+ ²	+ ^{2;11;12}			- ₂₉	- ₁₆	- ₁₆	- ₁₆
Niere	- ₂₅ / _{-2;11;12;24;28} / ₍₊₁₉₎ / ₋₂₅	- _{2;24;28}	- _{2;11;12;28}	+ ²⁵ / _{+19;28} / ₊₂₅	- ₂₅ / ₍₊₁₉₎ / ₋₂₈ / ₋₂₅	+ ¹¹ / ₋₂₉ / _{-11;28}	- ₂₂ / ₋₁₆	+ ²² / ₊₁₇ / ₊₁₆	- ₂₂ / ₋₁₆
Lunge	+ ¹⁹ / ₍₊₂₄₎ / _{-2;28}	- _{2;24;28}	- _{2;28}	+ _{19;28}	+ ₁₉ / ₋₂₈	- _{11;29} / _{-11;28}	- ₁₆	+ ¹⁷ / ₊₁₆	- ₁₆
Trachea						- ₂₉	- ₂₃ / ₋₁₆	+ ¹⁶	+ ^{23h} / ₋₁₆
Urothel	- ₂₅ / ₋₂ / ₋₂₅	- ₂	- ₂	+ ^{25;26} / ₊₂₅	- ₂₅ / ₋₂₅		- ₂₃ / ₋₁₆	+ ¹⁷ / ₋₁₆	+ ^{23h} / ₋₁₆
Speicheldrüse	- ₂₅ / ₋₂	- ₂	- ₂	+ ^{25;26}	- ₂₅	(+) ²⁹	- ₂₂	+ ²²	+ ²²

Zelltypspezifische Synthese der desmosomalen Cadherine in **Mensch**, **Rind** und **Maus**

	Dsg1- α (Dsg1)	Dsg1- β (Dsg5)	Dsg1- γ (Dsg6)	Dsg2	Dsg3	Dsg4	Dsc1	Dsc2	Dsc3
Ösophagus	+ ²⁵ / ₋₂ / ⁺²⁵	+ ²	+ ²	+ ^{25;26i} / ⁺²⁵	+ ²⁵ / ⁺²⁵		- _{10;22;23;27} / ₍₊₎ ¹⁶	+ _{10;22;27h,j} / _{+17j} / ₊	+ _{10;22;23h,j} / _{+16h}
Muttermund							- _{10;27}	+ _{10;27h,j}	+ ₁₀
Scheide				+ _{26i}			- ₂₃		+ _{23h,j}
Zahnfleisch				+ _{26i}					
Mundschleimh.							- ₁₀	+ ₁₀	+ ₁₀
Zunge	+ ²⁵ / ₊₂ / ⁺²⁵	+ ²	+ ²	+ ²⁵ / ⁺²⁵	+ ²⁵ / ⁺²⁵		+ _{13;16}	+ _{17j} / _{+13;16}	+ ₁₆
Auge									
Hornhaut	- ₂₀			+ ₂₀	- ₂₀		- ₂₀	+ ₂₀	- ₂₀
Limbus	- ₂₀			+ ₂₀	+ ₂₀		- ₂₀	+ ₂₀	+ ₂₀
Bindehaut	- ₂₀			+ ₂₀	+ ₂₀		- ₂₀	+ ₂₀	+ ₂₀
Epidermis	+ _{1;13;18;25;30} / _{+2;11;12;28} / ₊₂₅	+ _{2;28}	+ _{2;11;12;28}	+ _{1;18;25;26;30} / ₋₁₃ / ₊₂₈ / ₊₂₅	+ _{1;18;25;30} / ₊₂₈ / ₊₂₅	+ _{1;11;18;29} / _{+11;28}	+ _{10;22;23;27} / _{+13;16;21}	+ _{10;22;27} / ₊₁₇ / _{+13;16}	+ _{10;22;23} / _{+16;21}
basal	+ ₁₈ / ₊₂	- ₂	- ₂	+ _{1;18;26;30}	+ _{1;18;30}	- _{1;11;18}	- _{10;23;27} / ₋₂₁	+ _{10;27} / ₋₁₇	+ _{10;23} / ₊₂₁
suprabasal	+ _{1;18;30} / ₊₂	+ ₂	+ ₂	- _{1;26;30}	- _{1;30}	+ _{1;11;18}	+ _{10;23;27} / ₊₂₁	+ _{10;27} / ₊₁₇	+ _{10;23} / ₊₂₁
Haar							+ ₂₃		+ ₂₃
irs	+ _{1;5;15;30} / ₊₂	+ ₂	+ ₂	- _{1;15;30}	- _{1;15;30}	+ _{1;11} / ₊₁₁	+ _{15;23}	- ₁₅	+ _{15;23}
ors	+ ₃₀ / ₊₂	+ ₂	+ ₂	+ _{2;30}	+ _{1;30;14} / ₊₁₄	+ ₁₁ / ₊₁₁	- ₂₃		+ ₂₃
obere:									
bc	+ ₁			+ ₁	+ ₁				
cl	- ₁₅			+ ₁₅	+ ₁₅		- ₁₅	+ ₁₅	+ ₁₅
cc	+ ₁₅			- ₁₅	- ₁₅		- ₁₅	+ ₁₅	+ ₁₅
untere:									
bc	+ ₁₅			+ ₁₅	+ ₁₅		- ₁₅	(+) ₁₅	+ ₁₅
cl	+ ₁₅			+ ₁₅	+ ₁₅		- ₁₅	+ ₁₅	+ ₁₅
cc	+ ₁₅			- ₁₅	+ ₁₅		- ₁₅	(+) ₁₅	+ ₁₅
Präcortex				+ ₁	+ ₁	+ ₁			
Cortex	- ₁			- ₁	- ₁	+ _{1;18}			
Matrix/	(+) ₁₅ / _{-1;18}			(+) _{1;15;30}	+ _{1;15;30}	+ _{1;11} / ₊₁₁	- ₁₅	+ ₁₅	+ ₁₅
Trichozyten									
Medulla	+ ₁₅			- _{15;30}	+ _{15;30}		- ₁₅	+ ₁₅	+ ₁₅

Zelltypspezifische Synthese der desmosomalen Cadherine in **Mensch**, **Rind** und **Maus**

	Dsg1- α (Dsg1)	Dsg1- β (Dsg5)	Dsg1- γ (Dsg6)	Dsg2	Dsg3	Dsg4	Dsc1	Dsc2	Dsc3
Talgdrüse	- ²	+ ²	+ ²						
Schweißdrüse									
Acinus							- ₂₃		- ₂₃
mittlerer							- ₂₃		+ ²³
oberer Gang							- ₂₃		- ₂₃
Herz	- ₂₅ / ₂ ; ₁₁ ; ₁₂ ; ₂₄ ; ₂₈ / ₁₉ / ₂₅	- ₂ ; ₂₄ ; ₂₈	- ₂ ; ₁₁ ; ₁₂ ; ₂₈	+ ₇ ; ₂₅ ; ₂₆ / ₁₉ ; ₂₈ / ₇ ; ₂₅	- ₂₅ / ₁₉ / ₂₈ / ₂₅	- ₁₁ ; ₂₉ / ₁₁ ; ₂₈	- ₂₂ ; ₂₃ / ₍₊₎ / ₁₃ ; ₁₆	+ ₇ ; ₂₂ / ₁₇ / ₁₃ / ₁₆	- ₂₃ / ₁₆
Skelettmuskel	- ₂ ; ₁₁ ; ₁₂ ; ₁₉ ; ₂₈ / ₍₊₎ ²⁴	- ₂ ; ₂₄ ; ₂₈	+ ₁₁ ; ₁₂ / ₂ ; ₂₈	+ ₁₉ ; ₂₈	- ₁₉ ; ₂₈	+ ₁₁ / ₂₉ / ₁₁ ; ₂₈	- ₁₆	- ₁₆	- ₁₆
Lymphknoten				+ _{26k}			+ ₂₂	+ ₂₂	- ₂₂
Milz	- ₂₅ / ₁₉ ; ₂₄ / ₂ ; ₂₈	- ₂ ; ₂₄ ; ₂₈	- ₂ ; ₂₈	+ ₂₅ / ₁₉ ; ₂₈ / ₂₅	- ₂₅ / ₁₉ / ₂₈ / ₂₅	+ ₁₁ / ₂₉ / ₁₁			
Tonsillen	+ ²⁵			+ ²⁵	+ ²⁵		- ₂₂	+ ₂₂	+ ₂₂
Thymus	- ₂ / ₂₅	- ₂	+ ²¹	+ ²⁵	+ ²⁵	+ ₁₁ / ₂₉ / ₁₁	+ _{23m}		+ _{23n}
Schilddrüse	- ₂₅			+ ²⁵	- ₂₅	- ₂₉			
Nebenniere						- ₂₉			
Gehirn	- ₂ ; ₁₁ ; ₁₂ ; ₂₄ ; ₂₈ / ₍₊₎ ¹⁹	- ₂ ; ₂₄ ; ₂₈	+ ₁₁ ; ₁₂ / ₂ ; ₂₈	+ ₁₉ ; ₂₈	+ ₁₉ / ₂₈	+ ₁₁ / ₂₉ / ₁₁			
Cerebellum	- ₂	- ₂	- ₂			- ₂₉			
fötales						- ₂₉			
Hoden	+ ₁₉ ; ₂₄ ; ₂₈ / ₂	- ₂₄ ; ₂₈ / ₂	+ ₂ ; ₂₈	+ ₁₉ ; ₂₈	+ ₁₉ / ₂₈	+ ₂₉ / ₁₁ ; ₂₈			
Nebenhoden	- ₂	+ ²	- ₂						
Samenblase	- ₂	- ₂	+ ²						
Prostata	- ₂₅			+ ²⁵	- ₂₅	+ ₂₉	- ₂₃		+ _{23h}
Ovar	- ₂	- ₂	- ₂						
Plazenta						- ₁₁ ; ₂₉			
Knochenmark						- ₂₉			

Tabelle 55: Zusammenfassung der Expressionsdaten desmosomaler Cadherine in verschiedenen Geweben von Mensch, Rind und Maus.

^a; Mundepithel; ^b; Zunge; ^c; Zahnepithel; ^d; Lippenfurche; ^e; Nasenepithel; ^f; Tastaar-epidermis; ^g; Magenepithel; ^h; basal; ⁱ; ausschließlich basal; ^j; suprabasal; ^k; dendritisches Retikulum; ^l; Hassall Körperchen dendritisches Retikulum; ^m; Hassall Körperchen; ⁿ; Hassall Körperchen epitheliales Retikulum

Kursive Buchstaben zeigen die frühe Expression des entsprechenden Gens im angegebenen Gewebe an.

¹Bazzi et al., 2006: Immunhistologie

²Brennan et al., 2004: Immunhistologie

³Collins et al., 1995: RT-PCR

⁴Den et al., 2006: Northern Blot und Immunhistologie

⁵Donetti et al., 2004: quantitative Immun-Elektronenmikroskopie

⁶Eshkind et al., 2002: Immunhistologie

⁷Franke et al., 2006: quantitative Immun-Elektronenmikroskopie

⁸King et al., 1997: in situ Hybridisierung

⁹King et al., 1996: nur die Ergebnisse der in situ Hybridisierung aufgelistet

¹⁰King et al., 1995: in situ Hybridisierung und Immunhistologie

¹¹Kljuic et al., 2003: RT-PCR, Immunhistologie, in situ Hybridisierung

¹²Kljuic et al., 2003: RT-PCR

¹³Koch et al., 1992: Northern Blot

¹⁴Koch et al., 1998: Immunhistologie

¹⁵Kurzen et al., 1998: Immunhistologie

¹⁶Legan et al., 1994: RT-PCR, Northern Blot und in situ Hybridisierung

¹⁷Lorimer et al., 1994: RT-PCR und in situ Hybridisierung

¹⁸Mahoney et al., 2006: Immunhistologie

¹⁹Mahoney et al., 2002: RT-PCR

²⁰Messent et al., 2000: Immunhistologie und Western-Blot

²¹North et al., 1996: quantitative Immun-Elektronenmikroskopie

²²Nuber et al., 1995: Northern Blot und RNase protection assay

²³Nuber et al., 1996: Immunhistologie

²⁴Pulkkinen et al., 2003: RT-PCR

²⁵Schafer et al., 1994: RNase protection assay

²⁶Schafer et al., 1996: Immunhistologie

²⁷Theis et al., 1993: in situ Hybridisierung

²⁸Whitlock, 2003: RT-PCR

²⁹Whitlock et al., 2003: RT-PCR

³⁰Wu et al., 2003: Immunhistologie

Publikationen:

Holthöfer, B., Windoffer, R., Troyanovsky, S. and Leube, R.E. (2007). Structure and function of desmosomes.

The International Review of Cytology, Vol. 264: in press

Kongressbeiträge:

Holthöfer B., Eshkind L., Windoffer R., Leube R.E. Generation of conditional tissue-specific null mutants of Dsg2 in mice.

Fourth European Discussion Workshop on Intermediate Filaments. Bonn. 10/2005

Holthöfer B., Eshkind L., Windoffer R., Leube R.E. Generation of conditional tissue-specific desmoglein 2 null mutant mice.

30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie. Frankfurt. 03/2007

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den 29. Juni 2007

Bastian Holthöfer