

**Das native Tetrazyklin-Repressor/Operator System
zur Kontrolle der Expression von β -Galaktosidase in Gene Gun transfizierten
COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

Von
Christian Troidl
aus München

Frankfurt 2002
(D F 1)

vom Fachbereich Biologie der

Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan :

Gutachter :

Datum der Disputation :

Für meine Eltern ...

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Abteilung für experimentelle Kardiologie, in Bad Nauheim angefertigt. Ich möchte mich bei dem Direktor, Herrn Prof. Wolfgang Schaper, für die Möglichkeit bedanken, hier am MPI zu promovieren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Hans-Peter Vosberg, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und das Thema dieser Doktorarbeit bereit gestellt hat. Er stand bei sämtlichen auftretenden Problemen und Fragestellungen jederzeit als bereitwilliger Diskussionspartner zur Verfügung.

Frau Prof. Starzinski-Powitz danke ich für ihre Bereitschaft, die Arbeit im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt zu betreuen und als Gutachter tätig zu sein.

Bei Dr. Sadayapan Sakthivel möchte ich mich ganz herzlich für seine unermüdliche Anleitung, Unterstützung und Mithilfe der experimentellen Arbeiten bedanken.

Ich danke Dr. Urban Deutsch und allen Mitarbeitern des Tierstalls am MPI für die Hilfe beim etablieren der transgenen Mäuse und der Bereitstellung von Versuchstieren.

Dr. Borja Fernandez und Sven Wolfram danke ich für die Hilfe bei den histochemischen Untersuchungen der Organe transgener Mäuse.

Frau Heike Radhoff danke ich für die akribische Korrektur der Arbeit und der Umstellung des Textes auf die Regeln der neuen Rechtschreibung.

Ein ganz besonderes Anliegen ist es mir, meinen Arbeitskollegen Dr. Maria Golubenko, Yvonne Mücke, Simone Roth, Dirk Schröder, Carmen Selignow, Dr. Gil-Jin Shim, Dr. Stephan Waldmüller, Dr. Katja Unkelbach, für die außergewöhnliche nette Atmosphäre, die Diskussionsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung innerhalb des Labors zu danken („you never clone alone!“).

Danke Kerstin für den fachlichen und persönlichen Beistand während der gesamten Entstehungsphase dieser Doktorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	3
2	Einleitung	5
3	Material	12
3.1	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	12
3.2	MEDIEN.....	14
3.3	OLIGONUKLEOTIDE.....	15
3.4	PLASMIDE UND BAKTERIEN.....	15
3.5	ZELLINIEN.....	16
3.6	VERSUCHSTIERE.....	16
3.7	GERÄTE.....	16
4	Methoden	18
4.1	ARBEITEN MIT RNA.....	18
4.1.1	<i>Isolierung von RNA aus Herzgewebe von Mäusen</i>	18
4.1.2	<i>Agarose / Formaldehyd Gelelektrophorese für RNA</i>	19
4.1.3	<i>RT-PCR</i>	19
4.2	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS E. COLI.....	20
4.2.1	<i>Maxipräparation von Plasmid-DNA</i>	20
4.2.2	<i>Minipräparation von Plasmid-DNA</i>	21
4.3	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION.....	21
4.4	RESTRIKTION VON DNA.....	22
4.5	LIGATION.....	22
4.6	NICK TRANSLATION MIT RADIOAKTIV- ODER CY TM 5-MARKIERTEN NUKLEOTIDEN.....	23
4.7	PCR-BEDINGUNGEN FÜR DIE MUTAGENESE DER α -MHC cDNA.....	23
4.8	TOPO-KLONIERUNG.....	24
4.9	GELELEKTROPHORESE.....	25
4.9.1	<i>Agarosegele</i>	25
4.9.2	<i>Polyacrylamidgele</i>	25
4.10	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN.....	26
4.11	SEQUENZIERUNG VON DNA.....	26
4.12	AUFZUCHT UND AUFBEWAHRUNG VON BAKTERIENSTÄMMEN.....	26
4.13	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN.....	27
4.14	T-REX TM SYSTEM.....	27
4.15	ISOLIERUNG NEONATALER KARDIOZYTEN AUS RATTEN.....	28
4.16	PASSAGIEREN VON COS1 ZELLEN UND MYOBLASTEN.....	29
4.17	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL.....	29
4.18	TRANSFEKTION VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	30
4.18.1	<i>Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)</i>	30
4.18.2	<i>Transfektion mit der Gene Gun</i>	31
4.19	PROTEINBESTIMMUNG IM ZELL- ODER ORGANLYSAT NACH BRADFORD.....	36
4.20	IN SITU FÄRBUNG MIT X-GAL.....	36
4.21	CHEMOLUMINESZENSTEST FÜR β -GALAKTOSIDASE.....	37
4.22	TRANSGENE MÄUSE.....	39
4.22.1	<i>Haltung und Verpaarung transgener Mäuse</i>	40
4.22.2	<i>Etablierung transgener Mauslinien durch Mikroinjektionen</i>	40
4.22.3	<i>Isolierung genomischer DNA aus transgenen Mäusen</i>	41
4.22.4	<i>Analyse genomischer DNA aus transgenen Mäusen</i>	41
4.22.5	<i>X-gal Färbung von Organen und histologischen Schnitten transgener Mäuse</i>	44
4.23	STATISTIK.....	44

5	Ergebnisse	45
5.1	KLONIERUNG GENETISCHER KONSTRUKTE	45
5.1.1	<i>Konstrukte zur tet-kontrollierten Expression von β-Galaktosidase in neonatalen Kardiozyten und transgenen Mäusen</i>	46
5.1.2	<i>Klonieren der cDNA des murinen α-Myosins (Schwere Kette)</i>	50
5.1.3	<i>Mutagenese der FHC-relevanten Mutation in die α-MHC cDNA</i>	53
5.2	TRANSFEKTION VON KULTIVierten ZELLEN MIT DER HELIOS GENE GUN	56
5.2.1	<i>Cartridge-Präparationen nach der Standardmethode</i>	56
5.2.2	<i>Neues Protokoll zur Herstellung von Cartridges für die Gene Gun</i>	58
5.2.3	<i>Vergleich der Eigenschaften beider Arten von Cartridges</i>	59
5.2.4	<i>Physikalische Parameter der Gene Gun für die Transfektion von Zellkulturen</i>	65
5.3	GESTEUERTE GENEXPRESSION MIT DEM TETR/TETO-SYSTEM	76
5.3.1	<i>Induzierte Reporterexpression in COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten</i>	77
5.3.2	<i>Verhältnis tetR zu tetO-Sequenzen</i>	85
5.3.3	<i>Abhängigkeit der Induzierbarkeit von der Doxyzyklinmenge</i>	88
5.4	DAS TETR/TETO-SYSTEM UNTER VERWENDUNG DES α -MHC PROMOTORS	90
5.4.1	<i>Erhöhung der Aktivität des α-MHC Promotors mit Insulin, Trijodthyronin und/oder Dexamethason</i>	90
5.4.2	<i>Induktion der β-Galaktosidase-Expression mit Doxyzyklin nach Stimulierung des α-MHC Promotors durch Insulin, Trijodthyronin und Dexamethason</i>	94
5.5	EXPRESSIONSMUSTER DES α -MHC PROMOTORS IN TRANSGENEN MÄUSEN	95
6	Diskussion	99
7	Zusammenfassung	109
8	Literaturverzeichnis	111
9	Anhang	120
9.1	SEQUENZEN VERWENDETER OLIGONUKLEOTIDE	120
9.2	AUSGEZÄHLTE RASTERPLATTEN VON TRANSFIZIERTEN ZELLKULTUREN	122
9.3	VERWENDETE VEKTOREN	125

1 Abkürzungen

%	als Konzentrationsangabe: g / 100 ml
α -MHC	α Isoform der schweren Kette des Myosins, engl.: α -Myosin Heavy Chain
β -MHC	β Isoform der schweren Kette des Myosins, engl.: β -Myosin Heavy Chain
β -Gal	β -Galaktosidase
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm
A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
ccH ₂ O	Zellkulturwasser, engl.: cell culture water
cDNA	komplementäre DNA, engl.: complementary DNA
CPM	Ausschläge pro Minute, engl.: counts per minute
Cy TM 5	Indodicarbocyanin (Cy-5) phosphoramidit
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEX	Dexamethason
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DOX	Doxyzyklin
DNA	Desoxyriobonukleinsäure
dNTP	Nukleotide
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure
FCS	Fötale Kalbserum, engl.: fetal calve serum
FHC	familiäre Form der Hypertrophischen Kardiomyopathie
G	Guanin
h	Stunde
HGG	Helios Gene Gun (BioRad)
hgh	Polyadenylierungssignal des humanes Wachstumshormons, engl.: human growth hormone)
I	Insulin
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
lacZ	Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase codiert
M	Molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle, engl.: multiple cloning site
min	Minute
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfidsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, engl.: messenger RNA
NBS	Neugeborenes Kälberserum, engl.: new born calve serum
ng	Nanogramm
PCR	Polymerase Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction
PVP	Polyvinylpyrolidon
PAA	Polyacrylamid
PSI	Druckeinheit, engl.: pounds per square-inch
PEI	Polyethylenimin

RT	Raumtemperatur
RS	Restriktionsschnittstelle
RT-PCR	PCR mit vorangegangener reverser Transkription
RNA	Ribonukleinsäure
rtTA	reverser Tetrazyklintransaktivator
RZPD	Ressourcenzentrum Primärdatenbank (deutsches Human-Genom Projekt, Berlin)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
T3	Trijodthyronin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tet	Tetrazyklin
tetO	Tetrazyklinoperator
tetR	Tetrazyklinrepressor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Tetrazyklintransaktivator
U	Unit, Enzymeinheit
WT	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-Chlor-indoxyl- β -D-galaktosid

2 Einleitung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die familiäre Form der dominant erblichen hypertrophischen Kardiomyopathie (FHC), eine Herzkrankheit, die unter anderem zu einer asymmetrischen Hypertrophie, unregelmäßiger Anordnung der Kardiocyten und zu erhöhter, interstitieller Ablagerung von Kollagen im Herzen führt. Sie ist assoziiert mit einem relativ hohen Risiko für einen plötzlichen Herztod. Als Ursachen wurden ca. 160 Mutationen in bisher zehn verschiedenen Genen nachgewiesen, von denen neun für Herzmuskelproteine (β -Myosin Schwere Kette, Myosinbindungsprotein C, Troponin T, Troponin I, Troponin C, α -Tropomyosin, regulatorische und essentielle leichte Kette des β -Myosins und α -Actin) kodieren (Vosberg, 1998a, 1998b; Redwood et al., 1999). Kürzlich wurden Mutationen in einem Gen, welches für eine AMP-abhängige Proteinkinase (*PRKAG2*) codiert, auf Chromosom 7 identifiziert, die mit FHC und dem Wolff-Parkinson-White Syndrom assoziiert sind (Lang et al., 2000; Gollob et al., 2001). Am häufigsten betroffen mit etwa 30 % aller bekannten Mutationen ist das ventrikelspezifische β -Myosin schwere Kette (β -MHC).

Die pathogenen Mechanismen dieser Krankheit sind noch teilweise unbekannt bzw. umstritten. Eine Hypothese ist, dass eine Mutation zu Proteinverlust führt. Das mutierte Produkt könnte entweder gar nicht oder als inaktives Fragment entstehen, welches schnell wieder abgebaut wird. In beiden Fällen wäre das mutierte Gen ein Nullallel und die gestörte Gesamtaktivität des Herzmuskels wäre die Folge eines Mangels an Genprodukten, die sog. Haploinsuffizienz. Eine asymptotische, japanische Familie mit einem Nullallel (Nishi et al., 1992) spricht jedoch gegen diese Vermutung. Eine alternative Erklärung ist der sog. „poison polypeptide“-Mechanismus, d.h. dysfunktionale Proteine sind vorhanden und werden in die Actin- und Myosinfilamente integriert. So kann die Anwesenheit der mutierten Proteine eine Fehlfunktion des gesamten Proteinkomplexes zur Folge haben. Für diesen pathogenen Verlauf spricht, dass mutiertes β -Myosin in Muskelgewebe nachgewiesen wurde und *in vitro* veränderte Kontraktions- oder Motilitätseigenschaften besaß (Lankford et al., 1995). Dieser dominant-negative Effekt eines mutierten Proteins wurde auch im Zusammenhang mit einer Troponin-T-Mutation (mit Verlust des C-Terminus dieses Proteins) beobachtet (Watkins et al., 1996).

Die durch eine Mutation verursachten funktionalen Beeinträchtigungen des kontraktiven Apparates im Herzen führen möglicherweise dann über einen gestörten Kalziumhaushalt (Seidman et al., 2001) zu den typischen Symptomen der hypertrophischen Kardiomyopathie. Die Hypertrophie ist vermutlich eine Kompensationsreaktion der Zellen zum Ausgleich leichter Leistungsdefizite bei der Kontraktion (Vosberg et al., 1998a). Die bekannten zytologischen und

sonstigen Änderungen im Myokard scheinen sich also erst sekundär zu entwickeln und somit die Bedingungen für den klinischen Verlauf dieser Krankheit zu schaffen. Neue Arbeiten zeigen ferner, dass ein gestörter ATP-Stoffwechsel der Herzmuskelzellen mit einer linksventrikulären Hypertrophie in Verbindung gebracht werden kann (Blair et al., 2001; Gollob et al., 2001).

Diese Doktorarbeit ist Teil eines Projekts, dessen Ziel es ist, ein transgenes Mausmodell für eine Mutation (Deletion von GGA im Codon 927/928 des β -MHC Gens, im weiteren Verlauf als $\Delta E927$ bezeichnet), die als Ursache einer schweren Form der FHC in einer indischen Familie identifiziert wurde (Waldmüller et al., 1999; Sakthivel et al., 2001), zu etablieren und so die Pathogenese dieser Krankheit zu erforschen.

Das Etablieren von transgenen Mausmodellen der FHC ist nicht neu. Dabei werden zwei unterschiedliche Techniken angewendet. Beim *gene targeting* werden endogene DNA-Sequenzen anhand homologer Rekombination durch exogen präparierte DNA an den betreffenden Stellen des Genoms ersetzt. Die Vorteile dieser Technik liegen in der genau definierten Position der Integration des Transgens in das Genom der Maus. Dies führt dazu, dass die Expression des Transgens der Kontrolle des entsprechenden, endogenen Promotors unterliegt. Ferner wird ein physiologisch relevantes Expressionsniveau gewährleistet. Außerdem ist die Anzahl integrierter Kopien in die endogene DNA bekannt. Diese Technik ist sehr zeitaufwendig und kann Monate bis Jahre in Anspruch nehmen. Das führt zu hohen Kosten. Ein Beispiel für die Anwendung dieser Technik im Zusammenhang mit FHC ist die Einführung einer Mutation in das endogene α -Myosin (α -MHC^{403/+}; Arg403Gln) in Mäusen (Geisterfer-Lowrance et al., 1996). Für diese Mutation homozygote Mäuse starben 7 Tage nach der Geburt, während heterozygote Mäuse ein Jahr überlebten und typische Symptome wie Verlust normaler Gewebsstruktur („disarray“), Hypertrophie und Fibrose der FHC zeigten. Ferner wurden Leistungsdefizite unter körperlicher Belastung (Schwimmversuche) der FHC-Mäuse beobachtet.

Der überwiegende Teil transgener Mausmodelle der FHC basiert auf der Technik der *Transgenese*, bei der durch Mikroinjektionen von gereinigter DNA in befruchtete Eizellen (Pronucleus) transgene Mauslinien kreiert werden (Gordon et al., 1980). Diese Methode führt jedoch zu einer willkürlichen Integration in nicht kontrollierbarer Kopienzahl des Transgens in das Genom der Maus. Da die homologen Sequenzen nicht wie beim *gene targeting* (s.o.) durch die exogene DNA ersetzt werden, wird die Expression des Transgens der endogenen Expression sozusagen hinzugefügt. Um den erwünschten Phänotyp bzw. eine physiologisch relevante Antwort transgener Expression zu erhalten, muss die endogene von der transgenen Expression dominiert werden. Die Expression integrierter DNA ist abhängig von der Kopienzahl und kann durch die Position der Integration stark beeinflusst werden. Da die verwendeten Transgene zu Veränderungen in Form einer ausgedehnten internen Deletion in Kombination mit einer

partiellen, nichthomologen Insertion führen, sind solche transgenen Mäuse als Modell der humanen FHC mit Vorbehalt zu betrachten (Vosberg et al., 1998b). Da die Technik der *Transgenese* jedoch weniger zeitaufwendig und kostengünstiger ist als das *gene targeting*, wird sie häufiger angewandt. Außerdem kann *Transgenese* auch bei größeren Versuchstieren angewendet werden (Mullins et al., 1996). Eine Reihe von transgenen Mausmodellen der FHC wurde durch *Transgenese* hergestellt. Zum Beispiel wurden transgene Mäuse mit einem α -MHC Gen, welchem durch eine Deletion 26 Aminosäuren (Bindungsstellen für die essentiellen leichten α -Myosinsketten) fehlten, etabliert (Welikson et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die daraus resultierende beeinträchtigte Kraftübertragung der Myosinfilamente FHC verursachte. Durch ein mutiertes Gen des Myosinbindungsproteins C, dem die Sequenzen für die Titin- und Myosinbindungsstellen (Domäne C6-C10) fehlten, wurden transgene Mäuse erzeugt, deren milder pathogener Phänotyp dem der betroffenen FHC-Familien mit analogen Mutationen sehr ähnelt (Yang et al., 1998). In einem weiteren transgenen Tiermodellexperiment der FHC wurden modifizierte α -Myosin Gene (Mutation in Codon 403, Arg->Gln) in Zygoten injiziert (Vikstrom et al., 1996). Weitere transgene Mausmodelle der FHC wurden unter Verwendung mutierter Sequenzen des Gens für Troponin-T oder α -Tropomyosin (Tardiff et al., 1998, 1999; Prabhakar et al., 2001) erzeugt. Die erwähnten Modelle sind nur einige Beispiele der bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Manipulation des Mausgenoms im Zusammenhang mit FHC.

Im Gegensatz zu schon etablierten transgenen Mausmodellen sind wir daran interessiert, nicht nur ein die Krankheit verursachendes Gen in das Mausgenom zu integrieren, sondern dessen Expression auch zu kontrollieren. Da der Zeitpunkt der Repression und Aktivierung von Genen ein kritischer Faktor bei der Ausbildung des Phänotyps ist, spielt die Regulierung des zeitlichen Profils von Transgenen eine wichtige Rolle in der experimentellen Forschung (Yu et al., 1996). Das An- und Ausschalten von transgener Expression hilft, die Charakteristik und den zeitlichen Verlauf phänotypischer Konsequenzen von exogenen Proteinen zu untersuchen. Da man mit dem Einsatz eines kontrollierbaren Transgens die Expression des exogenen Proteins erst postnatal induzieren kann, ist es zusätzlich möglich, embryonale Letalität zu vermeiden (Mills, 2001).

Schon länger war man deshalb auf der Suche nach solchen induzierbaren, experimentellen Systemen. Als zunächst vielversprechend erwiesen sich induzierbare Promotoren wie z.B. der glucocorticoid-responsive *mouse mammary tumor virus long-terminal-repeat*, der Interferon induzierbare *Mx1 Promotor* oder der Schwermetall-induzierbare *methallothionin Promotor* (Ringold, 1983, Kühn et al. 1995, Palmiter et al., 1983). Obwohl diese Promotoren in der

experimentellen Praxis leicht zu handhaben sind, sind sie nicht auf die Kontrolle der Transgene beschränkt, sondern beeinflussen zusätzlich die Expression endogener Proteine.

Um eine transgenspezifische Kontrolle zu erreichen, wurden eine Reihe transkriptionaler Regulationssysteme für Wirbeltierzellen und transgene Tiere entwickelt, welche aus gut beschriebenen prokaryotischen Einheiten, gesteuert durch Repressor/Operator-Wechselwirkungen, bestehen. Ein Beispiel dieser Kontrollsysteme ist der *lac* Repressor von *E. coli*, der als Transkriptionsfaktor für Transgene dienen kann, welche einen Promotor mit integriertem *lac* Operator enthalten (Hall et al., 1983; Brown et al., 1987; Figge et al., 1988; Deuschle et al., 1989, 1990; Cronin et al., 2001).

Eine weitere Methode der kontrollierten Transgenexpression ist das Tetrazyklin-Repressor/Operator System (*tetR/tetO*-System) von *E. coli*. Dieses System ist für eukaryotische Zellen geeignet, wie zunächst an Pflanzen (Gatz und Quail, 1988; Gatz et al., 1991) und später auch in dem Schimmelpilz *Dictyostelium discoideum* (Dingermann et al., 1992) gezeigt werden konnte. Im *tetR/tetO*-System kommen regulatorische Elemente aus dem *tet*-Resistenzoperon von *E. coli* aus dem Transposon *Tn10* zur Anwendung (Hillen und Berens, 1994).

Für die Anwendung dieses Kontrollsystems in Säugerzellen wurde der Tetrazyklinrepressor (*tetR*) mit einem viralen Transkriptionsfaktor zu einem Transaktivator (*tTA*) verschmolzen, welcher den humanen Cytomegaloviruspromoter (*hCMV* Promotor) aktiviert und die Transkription des Transgens startet (Weinmann et al., 1994). In der Anwesenheit von Tetrazyklin (*tet*) bindet der *tTA* nicht an den Tetrazyklinoperator (*tetO*) und die Transkription des Transgens wird unterdrückt. In Abwesenheit von *tet* bindet der *tTA* an den *tetO* und das Transgen wird exprimiert. Nachteile dieses Systems sind die potentiell toxischen Effekte des *tTA* auf das transgene Tier, besonders während der Embryogenese (Baron et al., 1997). Zusätzlich kann es aufgrund des viralen Ursprungs des *hCMV* Promotors zu unspezifischer Expression von Genen in der Nähe des Promotors kommen (Furth et al., 1991). Die viralen Elemente dieses Systems führen außerdem zu einer sehr heterogenen Expression im Zielgewebe (Redfern et al., 1999). Die permanente Zugabe von *tet*, welche zur Unterdrückung der Expression des Transgens benötigt wird, kann sich negativ auf den immunologischen Status des Tieres, besonders pränatal, auswirken. Zusätzlich führt die ständige Verabreichung von *tet* zu hohen Gewebekonzentrationen im Organismus der Maus und nach dem Absetzen kann es mehrere Tage dauern, bis der *tTA* die Expression des Transgens aktiviert (Urban, MPI Bad Nauheim, pers. Mit.). Dieses Problem wurde dadurch vermieden, dass ein reverser *tTA* (*rtTA*) entwickelt wurde, der erst in Gegenwart von *tet* aktiv ist (Gossen et al., 1995). Jedoch verbleiben die toxischen und anderen negativen Nebeneffekte des *tTA*- und des *rtTA*-Systems.

Um die Nachteile zu umgehen sollte die Expressionskontrolle nicht auf einen viralen Transaktivator angewiesen sein und ohne eine permanente Zugabe von *tet* oder dessen Derivat Doxzyklin (DOX) auskommen, um die Expression des betreffenden Gens zu unterdrücken. Zusätzlich sollte kein ubiquitärer Promotor viralen Ursprungs verwendet werden, der zu unspezifischer heterogener Expression endogener Proteine führen kann.

Ein solches System transgener Expressionskontrolle wurde bereits beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass der tetR allein als effizienter Transmodulator in Säugerzellen *in vitro* (in kultivierten Zellen) und *in vivo* (in einem Porcinen Wund Modell) funktional ist (Yao et al., 1998, 1999). Die Steuerungselemente dieses Systems sind im Wesentlichen die des natürlichen *tet*-Operons: Der tetR bindet an den *tetO* (eine 19 bp lange Repressorbindungsstelle zwischen Promotor und untersuchtem Gen) in Abwesenheit von *tet* (dem Induktor) und dissoziiert von der DNA, wenn *tet* an ihn bindet. Die Transkription des untersuchten Gens beginnt, sobald der Repressor die DNA verläßt. Dieses System wurde dahingehend geändert, dass zwei tetR-Bindungsstellen (getrennt durch einen 2 bp-„spacer“) 9 bp in 3' Richtung nach der TATA Box des Promotors, der die Transkription des untersuchten Gens steuert, integriert wurde (Hillen et al., 1983; Boshardt et al., 1985; Nelson et al., 1987). Mit dieser Modifikation erhöht man die Wahrscheinlichkeit, dass der tetR an die DNA bindet, die Transkription verhindert wird und somit weniger Hintergrundexpression stattfindet.

Bevor jedoch damit begonnen wurde, transgene Mäuse zu etablieren (was mit einem hohen Aufwand an Material und Kosten verbunden ist) war es wichtig, das Funktionsprinzip dieses Systems unter Verwendung derselben genetischen Konstrukte, die in den Tieren zur Anwendung kommen sollen, an kultivierten Zellen zu testen. Die Experimente dieser Doktorarbeit konzentrierten sich daher auf die transiente Transfektion von kultivierten Zellen (COS1 Zellen, L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten der Ratte) mit den Konstrukten des nativen tetR/*tetO*-Systems.

Zwei unterschiedliche Promotoren wurden in diesen Experimenten verwendet: der ubiquitäre hCMV Promotor (Postle et al., 1984; Boshart et al., 1985) und der murine, herzspezifische α -Myosin-Heavy-Chain Promotor (α -MHC Promotor).

In den Transfektionsexperimenten im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Helios Gene Gun System (HGG) der Firma BioRad verwendet. Diese Transfektionstechnik des partikelgestützten und durch Gasdruck angetrieben Gentransfers wurde zum ersten Mal an Pflanzen (Klein et al., 1987) und später auch an Säugetierzellen (Zelenin et al., 1989; Yang et al., 1990) etabliert. Wolfram- oder Goldpartikel werden dabei mit DNA beschichtet und, mit Heliumdruck angetrieben, in Gewebe oder kultivierte Zellen geschossen.

Entscheidend für die Wahl dieser Technik war, dass die Einschleusung von Genen in schwer zu transfizierenden Zelltypen, wie neonatale Kardiozyten, mit herkömmlichen Methoden keine reproduzierbaren und stabilen Ergebnisse lieferte (Eizema et al., 1999). Bei Transfektionen dieses Zelltyps mit der Kalziumphosphat-Methode, mit Polyethylimine (PEI) oder Fugene® kam es bei Experimenten immer wieder zu kompletten Misserfolgen. Andere wichtige Anwendungsfelder der HGG sind eine Strategie zur Immunisierung ohne unerwünschte Nebenwirkungen (Fynan et al., 1993; Qiu et al., 1996; Chen et al., 2000) oder neue gentherapeutische Ansätze durch den Transport von Transgenen in Haut, wie z.B. zur Beschleunigung und Verbesserung der Wundheilung (Davidson et al., 2000).

Im Zuge dieser Doktorarbeit und den Versuchen zur kontrollierten Expression von Transgenen unter Verwendung der nativen Elemente des tetR/*tetO*-Systems wurde die Transfektion von COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten mit der HGG getestet, optimiert und standardisiert. Anstatt nur innerhalb der vom Hersteller vorgegebenen Parameter zu variieren um bessere Transfektionsergebnisse zu erreichen, wurde das Protokoll stark modifiziert. Ein kritischer Punkt bei der Anwendung der HGG ist die Präparation der Cartridges (=Patronen) (Eizema et al., 1999, 2000), welche die DNA-beladenen Goldpartikel enthalten. Daher wurde eine neue Technik zur Herstellung der Patronen entwickelt.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, ein zellbiologisches System zu etablieren, an welchem mit den nativen Elementen des tetR/*tetO*-Systems aus *E. coli* in verschiedenen Zelltypen (COS1-Zellen und L6 Myoblasten), besonders jedoch in neonatalen Kardiozyten unter Verwendung des herzspezifischen α -MHC Promotors, geprüft werden soll, ob das Reporter gen β -Galaktosidase kontrolliert exprimiert werden kann. Im Zuge dieser Arbeiten ergaben sich zwei weitere wichtige Fragestellungen: Es musste erstens eine Methode gefunden werden, mit der neonatale Kardiozyten reproduzierbar gut transfiziert werden können, da bei diesem delikaten Zelltyp Transfektionsraten von $< 1\%$ die Regel sind (Eizema et al., 1999; Becker et al., 1997). Und zweitens zeigte sich nach einigen Vorversuchen, dass der α -MHC Promotor in neonatalen Kardiozyten kaum aktiv ist. Da aber die genetischen Konstrukte, die später in den transgenen Mäusen zum Einsatz kommen sollten, mit diesem herzspezifischen Promotor versehen sind, musste ein Weg gefunden werden, um die Promotoraktivität künstlich zu steigern und somit das tetR/*tetO*-System auch in diesen Zellen testen zu können.

Parallel zu den Arbeiten in kultivierten Zellen wurde damit begonnen, transgene Mauslinien zu etablieren. Es wurden sowohl Mäuse gezüchtet, die herzspezifisch den tetR exprimieren (tetR-Mäuse), als auch Linien, die herzspezifisch das Reporter gen β -Galaktosidase exprimieren. Dieses Transgen enthält bereits die Bindungsstelle des tetR, den *tetO* (*tetO/lacZ*-

Mäuse). An diesen Mäusen wurde zusätzlich untersucht, ob der verwendete α -MHC Promotor die Expression der Transgene auf das Herz beschränkt. In Vorversuchen wurde durch Koinjektion beider Transgene oder durch Kreuzung der beiden Linien (tetR- und *tetO/lacZ*-Mäuse) das binäre System der *tet*-gesteuerten Expressionskontrolle in Mäusen erzeugt und getestet.

3 Material

3.1 Puffer und Lösungen

ADS-Puffer

0,11 M NaCl
5 mM KCl
5 mM Dextrose
0,8 mM MgSO₄
12,5 mM NaH₂PO₄
20 mM HEPES
in ddH₂O
(mit NaOH auf pH 7,3 bringen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern)

Fibronectinlösung (10 ml Ansatz)

100 µl Fibronectin
ad 10 ml Medium 199

Glutaraldehydlösung

0,1 M NaH₂PO₄ (pH 7,0)
1,0 mM MgCl₂
0,25% Glutaraldehyd
in ddH₂O
oder
0,25% Glutaraldehyd
in PBS 1x

Goldlösung (0,6 µm)

Suspendieren in 1 ml Ethanol (wasserfrei)
Konz. der Stock-Suspension: 250 µg/µl
bei 4°C aufbewahren

Kollagenaselösung 10 ml Ansatz

5 mg Kollagenase ad 10 ml ADS-Puffer

Lösungspuffer (für Plasmidisolierung aus *E. coli*)

50 mM Tris·HCl; pH 8,0
10 mM EDTA
100 ul/ml RNase

Lysepuffer (Plasmidisolierung aus *E. coli*)

200 mM NaOH
1% SDS

MOPS-Puffer 10x

0,4 M MOPS; pH 7,0
0,1 M Natrium-Acetat
0,01 M EDTA

Neutralisationspuffer

3,0 M Kaliumacetat; pH 5,5

PCR-Reaktionspuffer (Goldstar)

750 mM Tris HCl (pH 8,8)
200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,1 % Tween 20

PBS (1x)

0,14 M NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4
1,8 mM KH_2PO_4
in ddH₂O
(mit HCl auf pH 7,3 bringen)

PAA-Lösung (30 %, 29 : 1)

29 % Acrylamid
1 % Bis-Acrylamid
in ddH₂O

PEI 50

0,09 % PEI 50 (SIGMA)
in ccH₂O
Neutralisieren mit HCl (1 M) und sterilfiltrieren (Porengröße 0,2 µm)

Probenpuffer (Gelelektrophorese)

20 mM EDTA
30 % Glyzerin (99 %)
1 Spatelspitze Bromphenolblau

Solution D (RNA Isolierung)

4 M Guanidiumthiocyanat
25 mM Natriumcitrat (pH 7,0)
0,5 % Sarcosyl
0,1 M 2-Mercaptoethanol
in ddH₂O

SDS-Puffer

10 % Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)
in ddH₂O
(mit HCl auf pH 7,2 bringen)

Spermidinlösung

0,5 M Stock (1 g in 13,8 ml ddH₂O)
Arbeitslösung: 0,05 M
bei 4°C aufbewahren

TBE 10x

0,89 M Tris-Base
0,89 M Borsäure
0,01 M EDTA (pH 8,0)
in H₂O

X-gal-Lösung

0,2 % X-gal
1 mM MgCl₂
150 mM NaCl
10 mM NaH₂PO₄ (pH 7,0)
3,3 mM K₄Fe(CN)₆
3,3 mM K₃Fe(CN)₆

3.2 Medien

LB-Medium für Agar-Agar Platten

1 % Trypton / Pepton
0,5 % Hefe-Extrakt
1 % NaCl
1,8 % Agar-Agar
in ddH₂O
(bei Bedarf 25 µg/ml Kanamyzin, bzw. 100 µg/ml Ampizillin)

LB-Medium flüssig

1 % Trypton / Pepton
0,5 % Hefeextrakt
1 % NaCl
in ddH₂O
(bei Bedarf 25 µg / ml Kanamyzin, bzw. 100 µg / ml Ampizillin)

FBS-Medium 10 % (für COS1 Zellen)

20 mM L-Glutamin (Gibco BRL)
10 mM Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL)
10 mM Natrium Pyrovat (Gibco BRL)
10 % Fötale Rinder Serum (FBS)
in DMEM-Medium (CC Pro)

FBS-Medium 15 % (für L6 Myoblasten)

20 mM L-Glutamin (Gibco BRL)
10 mM Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL)
15 % Fötale Rinder Serum (FBS)
in Weymouth-Medium (CC Pro)

FCS-Medium 5 % (für neonatale Kardiozyten)

20 mM L-Glutamin (Gibco BRL)
10 mM Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL)
5 % Fötale Kälber Serum (FCS)
in Medium 199 (CC Pro)

NBS 1 % (für „preplating“ bei der Isolierung neonataler Kardiozyten)

10 mM Penicillin / Streptomycin (Gibco BRL)
20 mM L-Glutamin (Gibco BRL)
1 % Neonatales Rinderserum (NBS)
in Medium 199 (CC Pro)

3.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (siehe Anhang 9.1) wurden kommerziell (ARK Scientific) bezogen. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass der G, C-Anteil bei etwa 50 % lag und am 3'-Ende kein A oder T in der Sequenz vorkam. Die Primerbezeichnung im Text besteht aus einer laborinterne drei- oder vierstelligen Nummer.

3.4 Plasmide und Bakterien

Plasmide (siehe auch Anhang 9.3):

- pSPORT 1: In diesem Plasmid erhielten wir ein Teilfragment des α -MHC Gens der Maus vom RZPD Berlin.
- pBS II sk+: Für die Klonierung der kompletten cDNA-Sequenz des α -MHC der Maus, des tetR und des β -Galaktosidase-Reportergens. Kommerziell bezogen von Stratagene.
- pTrc99C: Für die Expression des tetR in *E.coli* (Amann et al., 1988).

pCR-Blunt TOPO II: Für die schnelle Klonierung von PCR-Produkten (aus dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen).

pcDNA6/TR: Ein Plasmid (6662 bp), das versehen mit dem hCMV-Promotor tetR exprimiert (T-REx™ System, Invitrogen).

pcDNA4/TO: Dieses Plasmid (5078 bp) enthält einen hCMV-Promotor, zwei hintereinander liegende *tetO*-Sequenzen und eine multiple Klonierungsstelle (MCS), in die Gene von Interesse integriert werden können (T-REx™ System, Invitrogen).

pcDNA/TO/*lacZ*: Dieses Plasmid (8224 bp) enthält auf der Basis von *pcDNA4/TO* das *lacZ*-Gen (T-REx™ System, Invitrogen).

pSV-β-gal: Plasmid (6820 bp) für die Expression von β-Galaktosidase, zur Kontrolle der Transfektionseffizienz in Zellkulturen (Stratagene).

Bakterienstämme:

TOP10: *mcrAd (mrr-hsdRM5-mcrBC)o80, dlac, dM15, dlacX74, deoR, recAI, araD139, d(ara. Leu)7679, galU, galKλ⁻, rpsL (Str^r), endA1:PtrcI*; Bakterienstamm für die Transformation mit dem „heat-shock“-Verfahren (aus dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen).

W3110: (*trp⁻*), *LaI^q*, L8 (Brent und Ptashne, 1981); als Wirtszelle des Expressionsplasmides pTrc99c.

3.5 Zelllinien

COS1: Fibroblasten (CV-1) aus Nieren der grünen Meerkatze, ATCC CCL 70 (Gluzman, 1981).

L6 Myoblasten: L6 Skelett Myoblasten der Ratte (Yaffe, 1968) (freundlicherweise überlassen von Frau Prof. Starzinsky-Powitz, Inst. für Humangenetik, J.W. Goethe Universität Frankfurt).

3.6 Versuchstiere

Ratten: Whistar white; für die Gewinnung neonataler Kardiozyten.

Mäuse: BALB/c und C57B16; Diese Stämme werden im MPI Bad Nauheim gezüchtet und sind für DNA-Experimente gut geeignet. Als vasktomierte Männchen und als Surrogat / Leihmütter werden Mäuse mit dem Genotyp CD1 verwendet.

3.7 Geräte

Brutschrank (zur Anzucht von E. coli)

BvW 30 Memmert, Schwab

<i>Chemolumineszenz-Messgerät</i> Lumat LB 9501	Berthold, Wildbad
<i>Imaging-System</i> s/w-Videoprinter P90 s/w-Kamera	Mitsubishi, Japan LTF Labortechnik, Wasserburg
<i>Magnetrührer</i> MR 3001	Heidolph, Kehlheim
<i>Sequenzierer (automatisch)</i> ALFexpress™ DNA Sequenzierer	Pharmacia, Freiburg
<i>Spektralphotometer</i> Ultrospec III	Pharmacia, Freiburg
<i>Thermocycler</i> Hyaid Omni Gene	MWG-Biotech, Ebersberg
<i>Transfektionssystem</i> Helios Gene Gun	BioRad, München
<i>Schüttelikubator für Mikrotubes</i> Thermomixer5436	Eppendorf, Hamburg
<i>Wasserbad</i> Thermomix HB4	Braun, Melsungen KiKa Labortechnik
<i>Zellkulturinkubator</i> Cytoperm	Heraeus, Hanau
<i>Zentrifugen</i> Centrifuge 5415 C Biofuge fresco Sorvall RC 2- MegaFuge 1.0R (Zellkultur)	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau DuPont, Bad Homburg Heraeus, Hanau

4 Methoden

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Techniken von Arbeiten mit Nukleinsäuren, Bakterien, eukaryotischen Zellen, Ratten und transgenen Mäusen beschrieben. Die chemische Zusammensetzung der Puffer und Lösungen ist auch im Kapitel 3, Material näher ausgeführt. Protokolle, die in dieser Arbeit nicht genauer erklärt werden, erfolgten nach gängiger Laborpraxis (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 2000) oder, soweit kommerziell erhältliche Kits benutzt wurden, nach den Angaben des Herstellers. Dasselbe gilt für Puffer und Lösungen, deren genaue Zusammensetzung nicht näher erwähnt wird.

4.1 Arbeiten mit RNA

Im Zusammenhang mit der Klonierung der cDNA des murinen α -MHC Gens wurde ein Teilfragment am 3'-Ende der cDNA über das RZPD (Ressourcenzentrum Primärdatenbank des deutschen Human-Genom Projekts, Berlin) bezogen. Im Folgenden werden die Techniken für die Isolierung, reverse Transkription (RT-PCR) und Qualitätskontrolle von mRNA aus dem Herzgewebe von Mäusen erläutert, die dazu dienten, den fehlenden Teil des α -MHC Gens zu erhalten.

4.1.1 Isolierung von RNA aus Herzgewebe von Mäusen

Für die Isolierung von RNA aus den Herzen von Mäusen wurde die Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion angewandt (Chomczynski et al., 1986). Diese Methode kombiniert die Guanidiniumthiocyanat-Isolierung und Phenol-Chloroform Extraktion von RNA (Feramisco et al., 1982) und verzichtet dabei auf die Ultrazentrifugation der Guanidinium-CsCl Methode. Die Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet. Die Herzen wurden zügig präpariert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Das homogenisierte Gewebe wurde in 1 ml Guanidiniumthiocyanat (Solution D: 4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5 % Sarcosyl; 0,1 M 2-Mercaptoethanol in ddH₂O) suspendiert. Anschließend wurde RNA mit Phenol / Chloroform extrahiert. Dazu wurden 100 μ l Natriumacetat (2 M, pH 4.0), 1 ml wassergesättigtes Phenol und 200 μ l Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) zugegeben. Der Ansatz wurde geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. In Glaszentrifugenröhrchen wurden die DNA und Proteine (in der Inter- und Phenolphase) bei 10.000 g / 4°C / 20 min (Sorvallzentrifuge) von der RNA (in der wässrigen Phase) abgetrennt. Nach der Abnahme der wässrigen Phase wurde die RNA durch Zugabe von 1

ml Isopropanol (eiskalt) gefällt und der Überstand abzentrifugiert (10.000 g / 4°C / 20 min). Das Pellet wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in 200 µl DEPC behandeltem Wasser aufgenommen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.1.2 Agarose / Formaldehyd Gelelektrophorese für RNA

Eine 1,4 %-ige Agarosesuspension wurde bis zum Schmelzen erhitzt und dann auf 60°C abgekühlt. Dann wurde 10 ml MOPS-Puffer (10-fach: 0,4 M MOPS pH 7,0; 0,1 M Natriumacetat; 0,01 M EDTA) und 18 ml Formaldehyd (12,3 M) zugegeben. Vor dem Erkalten wurde die Agarose in einen vorbereiteten Gelrahmen gegossen. Als Elektrodenpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Vor dem Auftragen der Proben wurden 11 µl RNA (1,8 µg / µl) mit 5 µl MOPS-Puffer (10x), 9 µl Formaldehyd (12,3 M) und 25 µl Formamid gemischt und 15 min bei 55°C denaturiert. Danach wurden die Proben mit 10 µl Probenpuffer (1 mM EDTA, 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylen-Cyanol) versetzt und der gesamte Ansatz (60 µl) auf das Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung (5 V / cm) wurde das Gel 20 min in 0,5 M Ammoniumacetat fixiert. RNA-Banden wurden durch Anfärben mit EtBr (15 min, Färbelösung: 1 µg EtBr / ml ddH₂O) im UV-Licht sichtbar gemacht.

4.1.3 RT-PCR

Im ersten Schritt wurde die mRNA mit einer reversen Transkriptase und einem Primer A (Oligo-dT, 18-mer; 932) inkubiert. Damit wurde zunächst ein DNA-Strang synthetisiert (RT-Reaktion Ansatz, s.u.). Anschließend wurde eine PCR-Reaktion (PCR 1, s.u.) mit Forwardprimer B (1641, bzw. 1645) und Reverseprimer C (1644, bzw. 1648) (für zwei Teilfragmente des α -MHC Gens: 1641 F / 1644 R und 1645 F / 1648 R) durchgeführt, um das erwünschte DNA-Fragment zu vervielfältigen. Um zu prüfen, ob die Reagenzien der RT-Reaktion und der darauf folgenden PCRs nicht mit DNA oder RNA kontaminiert waren, wurde parallel ein Ansatz ohne Zugabe von RNA durchgeführt und diente als negative Kontrolle. Die PCR-Produkte wurden dann durch TOPO-Klonierung (s.u.) in den *pCR Blunt II TOPO*[®]-Vektor integriert und mittels „heat-shock“ (s.u.) in Top10 kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

RT-Reaktion Ansatz:	2 µl	10x PCR-Reaktionspuffer (siehe Kapitel 3, Material)
	2,4 µl	MgCl ₂ 25 mM
	4 µl	dNTP-Mix je 2,5 mM
	2 µl	Primer A (Oligo-dT, 150 ng / µl)
	1 µl	RNasin (40 U / µl, Gibco BRL)
	1,2 µl	MoMULV-RT (200 U / µl, Gibco BRL)
	5,4 µg	RNA
	ad 20 µl	ddH ₂ O

Die Inkubation dauerte 60 min bei 37°C, die Denaturierung 5 min bei 95°C.

PCR-Reaktion Ansatz:	20 µl	Ansatz aus RT-Reaktion Schritt 1
	6 µl	10x PCR-Reaktionspuffer (siehe Kapitel 3, Material)
	4,8 µl	MgCl ₂ 25 mM
	6 µl	dNTP-Mix je 2,5 mM
	2 µl	Primer B 150 ng / µl
	2 µl	Primer C 150 ng / µl
	1 µl	Taq-Polymerase (0,5 U / µl, Eurogentec)
	ad 80 µl	ddH ₂ O

Die PCR-Bedingungen waren (Thermocycler: Hybaid Omni Gen):

1 Zyklus	94°C / 4 min
30 Zyklen:	62°C / 50 s
	72°C / 60 s
	94°C / 50 s
1 Zyklus	72°C / 8 min

4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmide wurden zunächst durch alkalischen Lyse aus den Bakterien freigesetzt und anschließend als Ethanol-Salz Präzipitat isoliert (Birnboim et al., 1979; Ish-Horowicz et al., 1981; Sambrook et al., 1989).

4.2.1 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung größerer Mengen (0,5-1 mg) Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der FlexiPrep™ Kit (Amersham-Pharmacia) verwendet. Zunächst wurde eine 2 ml Vorkultur des Wirtsstammes angezüchtet. Mit dieser wurde im Verhältnis 1:100 eine 100 ml Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert (Schüttelinkubator). Die Bakterien wurden abzentrifugiert (8000 g / 10 min) und das Pellet in 5 ml Lösepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg / ml RNase I) aufgenommen. Sowohl die alkalische Lyse der Zellen als auch die Denaturierung von Proteinen und chromosomaler DNA erfolgte durch Zugabe des Lysepuffers (1 M NaOH; 5,3 % SDS). Der Ansatz wurde leicht geschwenkt und 5 min bei RT inkubiert bis die Lösung klar wurde. Durch Zugabe des Neutralisationspuffers (3,0 M Kaliumacetat; pH 5,5)

wurden im nächsten Schritt Proteine und chromosomale DNA gefällt und durch Zentrifugation (12000 g / 15 min) von der sich im Überstand befindenden Plasmid-DNA abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10,5 ml absolutem Alkohol versetzt (10 min / RT). Dabei wird die Plasmid-DNA ausgefällt und durch Zentrifugation bei 12000 g / 20 min vom Überstand getrennt. Für eine weitere Reinigung wurde der Überstand entfernt und das Plasmid-DNA Pellet mit einer Sephaglas™-Suspension versetzt. DNA bindet reversibel an Sephaglas (Vogelstein et al., 1979; Marko et al., 1982). Die Suspension wurde einmal mit einem Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2 mM EDTA; 200 mM NaCl; 60% Ethanol) und dann mit Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid DNA mit 500 µl H₂O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) von der Sephaglas™-Matrix abgelöst. Nach dem Abzentrifugieren (2400 g / 5 min) konnte der Überstand mit der darin befindlichen DNA abgenommen werden. Dabei waren Ausbeuten von 0,5-1 mg Plasmid-DNA gelöst in 500 µl ddH₂O oder TE-Puffer die Regel.

4.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurden 2 ml Vorkulturen des jeweiligen Bakterienstammes über Nacht angezüchtet. Die Zellen wurden in 2 ml Mikrotubes überführt und anschließend in einer Tischzentrifuge bei 6.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lösepuffer (50 mM Tris·HCl; pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µl / ml RNase) gelöst und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde die Lösung nach leichtem Schütteln nochmals 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Neutralisationspuffer (3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde das Lysat 20 min auf Eis inkubiert. Die dabei ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert (13.000 rpm / 5 min), der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von 1,2 ml absolutem Ethanol 5 min bei RT inkubiert. Die gefällte Plasmid-DNA wurde mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und bei RT an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 20-50 µl TE-Puffer oder ddH₂O gelöst. Dabei waren Ausbeuten von ca. 0,5 µg /µl Plasmid-DNA die Regel.

4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“ = PCR) amplifiziert (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Für analytische PCR-Reaktionen, bei denen die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente untersucht werden sollte, wurde die GoldStar™ DNA-Polymerase (Eurogentec) verwendet. DNA-Fragmente für präparative Zwecke, die im weiteren Verlauf kloniert werden sollten, wurden mit einer Proof-

Reading DNA-Polymerase (PfuTurbo® DNA Polymerase, Stratagene) amplifiziert (Fehlerrate nach Herstellerangabe: $1,3 \times 10^{-6} = 2,6 \%$ Mutanten unter den PCR Produkten). Damit sollten Sequenzfehler während der Amplifikation minimiert werden. Als Reaktionspuffer dienten die jeweils in 10-facher Konzentration mitgelieferten Lösungen der Hersteller. Die PCR-Reaktionen wurden im Touchdown Thermo-Cycler (Hybaid) durchgeführt. Beim Touchdown-Verfahren werden die ersten beiden Zyklen mit einer erhöhten Annealingtemperatur durchgeführt, um möglichst eine spezifische Bindung der Primer an die Template-DNA zu erzielen. Das mindert die Synthese von Nebenprodukten. Darauf folgten 28 Zyklen bei der experimentell ermittelten oder anhand der Sequenz errechneten Annealingtemperatur. Die Denaturierung erfolgte bei 94°C und die Synthese bei 72°C. Denaturierung und Annealing erfolgten jeweils 40 s. Die Synthesezeit wurde der Länge der zu amplifizierenden DNA angepasst (1 min / 1 kb).

4.4 Restriktion von DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von NEB (New England Biolabs) bezogen. Puffer- und Salzlösungen wurden in 10-facher Konzentration mit den Enzymen geliefert.

4.5 Ligation

Ligasen katalysieren die Bildung kovalenter Bindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden von DNA-Fragmenten (Modrich et al., 1975). Sowohl DNA-Moleküle mit glatten wie auch mit überhängenden, komplementären Enden werden von der aus *E. coli* stammenden T4 DNA Ligase ligiert. Überhängende Enden werden allerdings mit höherer Rate ligiert als glatte Enden.

Ligationen wurden in einem 15 µl Ansatz (s.u.) in einem Wasserbad bei 16°C im Kühlraum (4°C) über Nacht durchgeführt.

Ligationsansatz (15 µl):	1 µl	T4 Ligase (New England Biolabs)
	1,5 µl	T4 Ligase Reaktionspuffer (10x)
	Vektor	} (maximale Mengen, im Verhältnis 1:4 [w / w])
	DNA-Fragment	
	ad 15 µl	ddH ₂ O

4.6 Nick Translation mit radioaktiv- oder CyTM5-markierten Nukleotiden

Die Fähigkeit der DNA Polymerase I aus *E. coli* (Lehmann, 1981) eine „Nick Translations“-Reaktion durchzuführen, wurde für die Markierung von Plasmid-DNA mit radioaktiv ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$) oder dATP-CyTM5 markierten Nukleotiden benutzt (Kelly et al., 1970; Rigby et al., 1977). Bei dieser Reaktion kommt sowohl die 5'-3' Polymeraseaktivität als auch die 5'-3' Exonukleaseaktivität des Enzyms zum Tragen. Nachdem durch die Aktivität der DNase I Nicks (=Einzelstrangbrüche) in die Plasmid-DNA eingeführt wurden, fügt die DNA Polymerase I am 3'-Ende des Nicks komplementäre Nukleotide an und baut gleichzeitig am angrenzenden 5'-Terminus Nukleotide ab. Dabei wird der Nick von 5' nach 3' der Template-DNA verschoben. Durch den Einbau der bereitgestellten dNTPs wird die Plasmid-DNA radioaktiv bzw. biochemisch markiert.

Ein 100 µl Ansatz wurde 2 h bei 15°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 10 µl EDTA (0,2 M; pH 8,0) gestoppt. Nicht eingebaute heiße dATPs oder CyTM5-dATPs wurden mit einem PCR-Purification Kit (Macherey&Nagel) abgetrennt. Die markierte DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Nick-Translations Ansatz 100 µl:

1 µg	DNA
20 µl	dNTP-Mix (dCTP, dGTP, dTTP; je 300 µM)
5 U	DNA Polymerease I <i>E. coli</i>
100 pg	DNase I
10 µl	$[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 3000 Ci / mmol

und alternativ:

2 µl	150 ng / µl dATP-Cy TM 5
ad 100 µl ddH ₂ O	

4.7 PCR-Bedingungen für die Mutagenese der α-MHC cDNA

Für die Klonierung der eine 3-Basenpaardeletion in Codon 927 / 928 des α-MHC Gens (ΔE927) wurden spezielle PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Bedingungen dieser Reaktionen sind hier näher erläutert, während das grundsätzliche Prinzip der Mutagenese im Abschnitt „Ergebnisse“ beschrieben wird.

Im ersten Schritt wurden zwei herkömmliche PCR-Reaktionen in einem 50 µl Ansatz durchgeführt:

5 µl	Reaktionspuffer (10x)
4 µl	dNTP-Mix, jeweils 25 mM
1 µl	DNA α-MHC in pBS II sk+ 471 ng / µl
1 µl	1681 (bzw. 1731) 150 ng / µl,
1 µl	1732 (bzw. 1641) 150 ng / µl
1,25 U	PfuTurbo [®] DNA Polymerase; Stratagene
ad 50 µl ddH ₂ O	

Die Zykluszeiten und -temperaturen waren $30 \times (94^{\circ}\text{C} / 40 \text{ s} - 57^{\circ}\text{C} / 40 \text{ s} - 72^{\circ}\text{C} / 50 \text{ s})$.

Im darauf folgenden Schritt wurden in einem 100 μl -Ansatz die überlappenden PCR-Produkte gemischt und die komplementären Nukleotide aufgefüllt:

10 μl	Reaktionspuffer (10x)
8 μl	dNTP-Mix (25 mM)
1 U	PfuTurbo [®] DNA Polymerase; Stratagene
40 μl	Fragment 1 aus PCR 1
40 μl	Fragment 2 aus PCR 1
ad 100 μl ddH ₂ O	

Die Reaktionszeiten und Temperaturen waren:

Denaturierung:	4 min / 94 [°] C
Annealing:	1 min. / 57 [°] C
Synthese:	10 min / 72 [°] C

Zur Amplifikation des so entstandenen Mutationsfragments wurde als letzter Schritt nochmals eine PCR mit den endständigen Primern (1681 und 1641) durchgeführt. Diese lief nach den gleichen Bedingungen wie die erste PCR ab.

4.8 Topo-Klonierung

Das Klonieren von PCR-Produkten wurde mit dem TOPO Cloning Kit (Invitrogen) durchgeführt. Die Topoisomerase I integriert PCR-Produkte mit glatten Enden in den *pCR Blunt II TOPO[®]*-Vektor. Mit dem sogenannten „heat-shock“-Verfahren (s.u.) wurde die Plasmid-DNA in Top10 kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

Die Methode basiert auf der Ligationseigenschaft der *Vaccinia* Virus Topoisomerase I (Shuman, 1994). Im aktivierten Zustand ist das Enzym kovalent am 3' Ende des linearisierten Vektors gebunden. Es bindet dabei an eine spezifische Sequenz (5'-CCCTT) und spaltet die darauf folgende Phosphodiester Bindung der duplex DNA eines Stranges. Die dabei frei werdende Energie wird durch die Formation einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen DNA-Stranges und einem Tyrosilrest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. In Anwesenheit des 5'-Hydroxylendes eines PCR-Produktes wird diese Bindung gespalten und die gespeicherte Energie verbraucht, um eine neue Phosphodiesterbindung zwischen Vektor und PCR-Produkt aufzubauen. Die Topoisomerase I löst sich dabei von der DNA. Im Reaktionsansatz (s.u.), der 5 min bei RT inkubiert wurde, ligiert die Topoisomerase I ein zugegebenes PCR-Produkt mit dem Vektor.

TOPO-Klonierungs Ansatz: 1 μ l TOPO-Vektor (10 ng / μ l)
1 μ l Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)
4 μ l PCR-Produkt

4.9 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten (analytisch) und der Fragmentisolierung (präparativ). DNA wurde sowohl in Agarose- als auch in Polyacrylamidgelen mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt. Die Gele wurden unter UV-Licht mit einer CCD Kamera (LTF) aufgenommen und in einem Computer abgespeichert. Die gespeicherten Daten wurden von einem Videoprinter ausgedruckt.

4.9.1 Agarosegele

DNA-Fragmente >1 kb oder nicht restringierte Plasmid DNAs wurden in 1 %-igen Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer (10-fach: 0,89 M Tris-Base; 0,89 M Borsäure; 0,01 M EDTA pH 8,0; in ddH₂O) suspendiert und in einem Mikrowellenofen verflüssigt. Die Agarose wurde nach dem Abkühlen auf 50°C mit EtBr (1 μ g / ml) versetzt und in einer Flachbetтанlage ausgegossen. Als Elektrodenpuffer diente 1x TBE-Puffer. An die Gele (Breite 21 cm / Länge 9 cm) wurde eine konstante Spannung von 120 V bei einer Stromstärke von 120-150 mA angelegt.

4.9.2 Polyacrylamidgele

Für die Trennung kleiner DNA-Fragmente (<1 kb) wurden 6 % Polyacrylamidgele (PAA-Gele) verwendet. Für PAA-Gele mit einer Fläche von 9 x 13 cm wurden 15 ml PAA-Lösung hergestellt. Die Gele wurden in vertikalen Gelkammern an eine Spannung von 120 V bei einer Stromstärke von 30 mA angelegt. Als Elektrodenpuffer diente 1x TBE-Puffer. Das PAA-Gel wurde 15 min in einem EtBr-Bad (1 μ g / ml) angefärbt.

PAA-Lösung 15 ml Ansatz: 3 ml 30% Acrylamid / Bis-Acrylamid (29:1)
1,5 ml 10x TBE
12 μ l TEMED
30 μ l APS (30 %)

4.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für präparative Agarosegele wurde SeaKem GTG Agarose (FMC / Biozym) verwendet. Diese Agarose hat einen niedrigen Schmelzpunkt und besitzt einen hohen Reinheitsgrad. Die DNA wurde nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert. Dazu wurde ein Gel Purification Kit (Qiagen) verwendet. DNA-Banden wurden unter einem UV-Schirm mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dann wurden sie mit dem Lösepuffer (pro 100 mg / 300 µl Lösepuffer; die Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht genauer beschrieben) aus dem Kit versetzt und bei 50°C geschmolzen. Nach vollständigem Lösen der Agarose wurde der Ansatz mit Isopropanol (pro 100 mg Agarose / 100 µl) versetzt und auf Ionentauschersäulen gegeben, um die DNA abzutrennen. Bei pH-Werten < 7,5 bindet die DNA an die Säulenmatrix. Dabei wird die Agarose, die nicht bindet, abgetrennt. Bei pH-Werten > 7,5 kann die DNA mit TE-Puffer von der Säule eluiert werden.

4.11 Sequenzierung von DNA

DNA Sequenzen wurden nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) bestimmt. Dafür wurde das ALF Express System (Amersham-Pharmacia) verwendet. Für die Sequenzierreaktionen wurde der CyTM5 Thermo SequenaseTM Dye Terminator Kit (Amersham-Pharmacia) benutzt. Bei dieser Reaktion wurden ein unmarkierter Primer, eine thermostabile Polymerase, dNTPs und CyTM5-markierte ddNTPs eingesetzt. Die Sequenzierreaktion wurde zyklisch durchgeführt. Die bei dieser Reaktion erhaltenen Kettenabbruchprodukte wurden nach Abtrennung überschüssiger ddNTPs entsprechend den Herstellerangaben in denaturierenden Sequenziergelen (ReproTM Gel Kit, Amersham-Pharmacia) aufgetrennt. Während der Elektrophorese liefen die Fragmente durch einen fixierten Laserstrahl. Dabei entstanden durch Anregung der CyTM5-Markierung Lichtemissionen, die von Photodetektoren des ALF Express-Systems erfasst und digitalisiert wurden. Die Sequenzdaten wurden direkt in einen Computer eingelesen. Für die Auswertung wurde das „ALF Win Sequence-Analyser“-Programm benutzt.

4.12 Aufzucht und Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Zur Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden über Nacht Vorkulturen (3 ml) in flüssigem LB-Medium und dem entsprechenden selektiven Antibiotikum (überwiegend Ampicillin; 50 µg / ml) angezüchtet. Daraus wurde 1 ml Kultur entnommen, mit 600 µl Glycerin (99 %) gut vermischt und in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

Für die Anzucht eines eingefrorenen Bakterienstammes wurde dieser kurz angetaut. Mit einer sterilen Impföse wurde eine Probe entnommen und auf vorgewärmte Agar-Agar Platten ausgestrichen. Gelegentlich wurden direkt 3 ml-Vorkulturen angelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.13 Transformation von Bakterien

Bakterien wurden nach dem Protokoll des *pCR Blunt II TOPO® Cloning Kits* (Invitrogen) „heat-shock“ transformiert. In 50 µl TOP10 kompetenten Zellen aus dem Kit wurden 4 µl Plasmid Lösung gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Bakterien-Plasmid Lösung 30 s in einem vorgewärmten Wasserbad bei 42°C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis herunter gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (2 % Trypton; 0,5 % Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glucose) wurde die Zellsuspension 1h bei 37°C schwenkend inkubiert. Die Bakterien wurden dann in unterschiedlichen Mengen auf vorgewärmten Agar-Agar Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.14 T-REx™ System

Das *tetR/tetO*-System (Yao et al., 1998, 1999) wird kommerziell als T-REx™ Kit (Invitrogen) für die *tet*-kontrollierte Genexpression in kultivierten Zellen angeboten. Dieses System besteht aus zwei Plasmiden (Abb. 1): Konstrukt I (*pcDNA6/TR*, 6662 bp) exprimiert den *tetR* unter Kontrolle des hCMV-Promotors, Konstrukt II (*pcDNA4/TO*, 5078 bp) enthält ebenfalls den hCMV-Promotor mit zwei hintereinander liegenden *tetO*-Sequenzen und einer multiplen Klonierungsstelle (MCS), in die zu untersuchende Gene kloniert werden können. Zusätzlich enthält der Kit ein Kontrollplasmid (*pcDNA/TO/lacZ*, 8224 bp), das den *tetO* und das Reportergen für β-Galaktosidase (*lacZ*) enthält.

Nach der Transfektion von kultivierten Zellen exprimiert Konstrukt I den *tetR*, der an die *tetO*-Sequenz von Konstrukt II bindet und die Transkription des darauf folgenden Gens unterdrückt. Durch Zugabe von *tet* (oder dessen Derivat DOX) wird der *tetR* inaktiviert und das Gen von Interesse exprimiert.

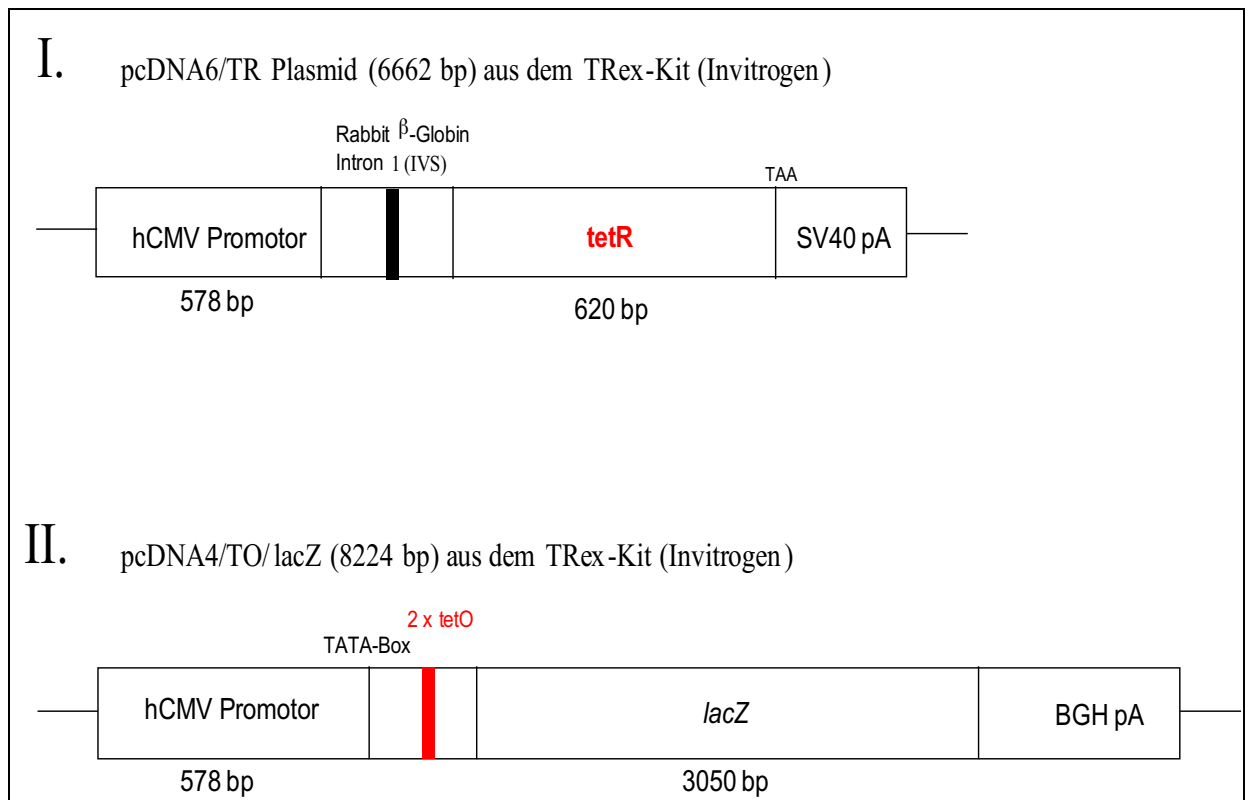


Abbildung 1: *T-RexTM-System (Invitrogen)*; Kommerziell bezogene Konstrukte des TRex-Kit von Invitrogen zur tet-kontrollierten Genexpression in Zellkulturen. **(I)** Ein Vektor, der unter der Kontrolle des hCMV-Promotors den tetR exprimiert. **(II)** Das zweite Konstrukt enthält zwei hintereinander liegende *tetO* und einen Kontrollevektor, der an dieser Stelle die Sequenz des *lacZ*-Gens enthält.

4.15 Isolierung neonataler Kardiozyten aus Ratten

Die Kultivierung und Isolierung neonataler Kardiozyten wurden nach einem von Harary et al. (1966) entwickelten Prinzip durchgeführt. Das Protokoll der Isolierung wurde in einer etwas veränderten Form von Buja et al. (1985) und Vincent und Nadeau (1983) übernommen. Der Verdau des grob homogenisierten Herzgewebes erfolgte dabei nur mit einer Kollagenaselösung ohne Pancreatin. Im Verlauf der Isolierung wurden neonatale Kardiozyten der Zellsuspension nicht wie bei Vincent und Nadeau über eine Percollgradienten, sondern durch das „preplating“ (differentielles Kultivieren) (Blondel et al., 1971) angereichert. Dabei führt eine mehrstündige Inkubation in fibronectinfreiem, neugeborenen Rinderserum (NBS) dazu, dass sich Fibroblasten und andere Zellen am Boden anheften und somit abgetrennt werden. Kardiozyten hingegen reichern sich im Medium an. Der prozentuale Anteil von pulsierenden Kardiozyten liegt für eine Preparation bei mehr als 80 % (Buja et al., 1985). Es wurde wie folgt vorgegangen:

Ein bis drei Tage alte neonatale Ratten (Whistar white) wurden kurz mit 70 % Ethanol desinfiziert und über flüssigem Stickstoff dekapitiert. Die Herzen wurden herauspräpariert, in ADS-Puffer (0,11 M NaCl; 5 mM KCl; 5 mM Dextrose; 0,8 mM MgSO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 20 mM HEPES) gewaschen und mit der Schere zerkleinert. Das grob homogenisierte Gewebe

wurde viermal für 40 min bei 37°C in jeweils frischer Kollagenaselösung (0,5 mg / ml ADS-Puffer; 271 U / mg; Wortington Chemicals) im Schüttelinkubator langsam geschwenkt. Für 20 Herzen benötigte man für den ersten Verdauungsschritt 10 ml Kollagenaselösung und für die folgenden drei Schritte je 15 ml. Der Überstand des ersten Verdauungsschritts wurde verworfen. Die Zellen in den Überständen der anschließenden Verdauungen wurden durch Zentrifugieren (5 min, 400 rpm) angereichert. Das Zellpellet wurde jeweils in 10 ml NBS-Medium (1 %) aufgenommen, in eine Zellkulturschale gegeben und im CO₂-Zellinkubator aufbewahrt. Danach folgte eine weitere zweistündige Inkubation, das sog. „preplating“, im CO₂-Inkubator bei 37°C. Die mit Kardiozyten angereicherte Suspension wurde zentrifugiert (400 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium 5 %-igem fötalem Kälberserum (FCS) aufgenommen. Kardiozyten wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt (siehe s.u.) und mit einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen / ml ausplattiert. Die Zellkulturschalen wurden vorher 1 h mit einer Fibronectinlösung (1 µg / ml Medium) bei 37°C behandelt. Alle verwendeten Zellmedien sowie die Kollagenaselösung wurden vor dem Gebrauch auf 37°C erwärmt.

4.16 Passagieren von COS1 Zellen und Myoblasten

Zum Passagieren der Zellen wurden diese zunächst einmal mit 1x PBS (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) gespült, mit einer Trypsin-EDTA Lösung (0,5 g / l Trypsin; 0,5 mM EDTA pH 7,3; 15 mM NaCl) abgelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren (400 rpm / 5 min) wurden die Zellen in frischem Medium suspendiert. Die Zellen wurden in unterschiedlicher Dichte ausplattiert. Das Volumen des Aliquots und die Inkubationsdauer beeinflussten die Zeit, in der Konfluenz auf der neu angelegten Kultur erreicht wurde. In der Regel wurden für eine Zellkulturschale (Ø 10 cm) 250 µl Zellsuspension verwendet. Dies führte nach 2 Tagen für Myoblasten bei Konfluenz zu einer Zelldichte von ca. 375 000 Zellen / ml und für COS1 Zellen zu 280.000 Zellen / ml.

4.17 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl von neonatalen Kardiozyten in einem bestimmten Volumen Medium wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Vor dem Einbringen der Zellsuspension wurde Trypan-Blau im Verhältnis 1:5 zugegeben. Zelldebris und tote Zellen färbten sich dabei blau und wurden nicht mitgezählt. Die Zellsuspension wurde zwischen Deckglas und Objektträger (Abstand 0,1 mm) gebracht. Es wurden vier Quadrate mit einer Kantenlänge von 0,1 mm ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Das ausgezählte Volumen der

Zellsuspension betrug 1 µl. Mit der folgenden Formel wurde die Anzahl der Zellen / ml Medium berechnet:

$$\text{Gezählte Zellen} \times 1000 \times \text{Verdünnungsfaktor Trypan-Blau} = \text{Zellen / ml Medium}$$

(Verdünnungsfaktor Trypan-Blau = 1,25)

4.18 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Vor den Transfektionsexperimenten wurden neonatale Kardiozyten in Wells (Ø 3,2 cm) einer 6-Well-Platte in einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen / ml Medium ausplattiert. Die Anzahl von Zellen / Well vor der Transfektion von COS1-Zellen und L6 Myoblasten war beim Ausplattieren nicht bekannt. Diese Zellen wurden bis zu vollständiger Konfluenz kultiviert (visuelle Inspektion im Lichtmikroskop). Bei Konfluenz befanden sich bei Myoblasten ca. $0,375 \times 10^6$ Zellen / ml und bei COS1 Zellen ca. $0,3 \times 10^6$ Zellen / ml auf den Zellkulturschalen. COS1-Zellen und L6 Myoblasten wurden zunächst mit Polyethylenimin (PEI) und später mit der Gene Gun transfiziert.

4.18.1 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Für die Transfektion von Zellen in einer Zellkulturschale (Ø 3,2 cm) einer 6-Well-Platte wurden je 50 µl PEI-Mix und DNA-Mix vorbereitet. Beide Lösungen wurden kurz homogenisiert und bei RT 10 min inkubiert. Der PEI-Mix wurde in den DNA-Mix pipettiert, kurz gevortext und bei RT 10 min inkubiert. Im Gegensatz zu Transfektionen mit der Gene Gun wurden Zellkulturen bei nicht vollständiger Konfluenz (ca. 50 %) transfiziert. Sie wurden einmal mit PBS (1x) gewaschen. Dann wurden 900 µl Medium (ohne FBS / Antibiotika) und 100 µl PEI / DNA-Mix zugegeben. Dabei wurde zunächst das Medium in die Zellkulturschale pipettiert. Danach wurde tropfenweise der PEI / DNA-Mix zugegeben. Nach 4 h / 37°C im CO₂-Inkubator wurde das Medium der Zellkultur mit 1 ml Zellmedium mit doppelter Konzentration FBS und Antibiotika gemischt. Am nächsten Morgen wurde das Medium komplett gewechselt. Mit den Analysen wurde 24 h nach dem abschließenden Medienwechsel begonnen.

Ansatz PEI-Mix:	5 µl	NaCl (1,5 M)
	5,4 µl	PEI 50 (Sigma)
	ad 50 µl	ddH ₂ O

Ansatz DNA-Mix:	2 µg	DNA
	5 µl	NaCl (1,5 M)
	ad 50 µl	ddH ₂ O

4.18.2 Transfektion mit der Gene Gun

Die in dieser Arbeit verwendete physikalische Methode des Partikel gestützten Transfers von DNA wurde erstmalig in Pflanzenzellen (Klein et al., 1987) und später (Zelenin et al., 1989; Yang et al., 1990) auch in Säugerzellen durchgeführt. Da diese Methode nicht auf spezifischen Liganden-Rezeptoren und / oder biochemischen Eigenschaften der Zelloberfläche beruht, besitzt dieses Transfektionssystem ein breites Anwendungsspektrum. So wurden neben Zellen erfolgreich Bakterien (Shark et al., 1991; Smith et al., 1992), Pilze (Armaleo et al., 1990) und intrazelluläre Organellen (Johnston et al., 1988; Boynton et al., 1988) transfiziert.

Dabei werden Wolfram- oder Goldpartikel mit DNA beladen und, angetrieben durch Heliumdruck, in Zellen oder Gewebe geschossen. Auf diesem Prinzip beruht auch die von uns verwendete Helios Gene Gun (HGG) von BioRad.

Vor einer Transfektion werden zunächst Goldpartikel mit Plasmid-DNA oder RNA beschichtet. Dies wird durch Präzipitation von DNA mit CaCl₂ in der Anwesenheit des Polykations Spermidin erreicht. Die gefällte DNA lagert sich dabei an den ebenso in der Lösung befindlichen Goldpartikeln ab. Mit den DNA beladenen Goldpartikeln wird die Innenwand 2 cm langer Plastikschlauchstückchen (Tefzel™-Schlauch) beschichtet, welche als Cartridges (=Patronen) bezeichnet werden und die Munition der Helios Gene Gun (HGG) darstellen.

Die HGG nutzt einen Hochgeschwindigkeitsstrom von Helium, um die mit Plasmid-DNA oder RNA beschichteten Goldpartikel stark zu beschleunigen. Die dabei erreichten Geschwindigkeiten sind hoch genug, um Zellmembranen zu überwinden und somit Zellen *in vitro* und *in vivo* effektiv zu transfizieren. Durch Betätigen des Abzugs der HGG wird das Hauptventil geöffnet und das unter Druck stehende Heliumgas freigegeben. Dieses strömt durch die dahinter liegende Bohrung des Cartridge-Holders, in der sich die Patrone mit den DNA/Gold-Partikeln befindet. Dabei werden die DNA/Gold-Partikel mit hoher Beschleunigung von dem Heliumstrom mitgerissen. Nachdem die Partikel im Beschleunigungsteil, der direkt auf die Cartridge folgt, nochmals schneller werden, gelangt der Helium / Gold-Strom in den sich nach vorne kegelförmig öffnenden „Barrel-Liner“. Durch den sich vergrößernden Querschnitt des Barrel-Liners wird das Heliumgas stark abgebremst (der Coanda Effekt; Reba, 1966), während die Goldpartikel mit unverminderter Geschwindigkeit weiterfliegen. Dieser Effekt führt dazu, dass der Druck des Heliumstoßes stark vermindert wird und die zu transfizierenden Zellen

weniger beschädigt. Die DNA/Gold-Partikel treffen hingegen mit hoher Geschwindigkeit auf das zu transfizierende Objekt und können so in Zellen oder Gewebe eindringen.

4.18.2.1 Cartridge - Präparation

Dem Herstellerprotokoll folgend wurden Goldpartikel (25 mg; \varnothing 0,6 μm) und Spermidin (100 μl , 1M) gemischt und in einem Ultraschallbad 5 min homogenisiert. Nach Zugabe der Plasmid-DNA (50 μg ; in maximal 100 μl) wurde Gold und DNA mit 100 μl KCl (1 M) für 10 min / RT gefällt. Die Plasmid DNA setzt sich dabei an den Goldpartikeln ab und sammelt sich am Boden des Reaktionsgefäßes. Anschließend wurden die DNA/Gold-Partikel durch kurzes Anzentrifugieren nochmals am Gefäßboden verdichtet. Der Überstand wurde entfernt und das DNA/Gold Pellet in 1 ml wasserfreiem Ethanol aufgenommen. Daraufhin wurden die DNA/Gold-Partikel zweimal mit wasserfreiem Ethanol (1 ml) gewaschen. Die DNA/Gold-Partikel wurden 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 1 ml wasserfreiem Ethanol gründlich resuspendiert. Nachdem das letzte Ethanolvolumen abzentrifugiert worden war, wurde das DNA/Gold-Pellet in 3,5 ml PVP / Ethanollösung (0,03 mg / ml) aufgenommen. Ein 25 cm langer Tefzel™-Schlauch (\varnothing 4 mm) wurde in die „Tubing-Prep Station“ (Bezeichnung des Herstellers) horizontal montiert und 10 min im N_2 -Gasstrom (0,3-0,4 l / min) getrocknet. Dann wurde die Gold / DNA-Suspension durch Eindrücken mit einer Spritze in den in der „Tubing-Prep Station“ Tefzel™-Schlauch eingefüllt. Nach Absetzen der Gold / DNA-Partikel (5-10 min) wurde der Überstand vorsichtig und gleichmäßig innerhalb von 30 s mit einer Spritze abgezogen. Sofort wurde der Schlauch 5 min lang in der „Tubing-Prep Station“ horizontal rotiert bis sich das Gold gleichmäßig über die gesamte Innenfläche des Schlauchs verteilt hat. Die PVP-Konzentration war entscheidend für die gleichmäßige Verteilung der Gold / DNA-Lösung im Tefzel™-Schlauch. Je mehr PVP in der Lösung enthalten war desto besser lagerten sich die DNA-beladenen Goldpartikel an der Innenwand des Schlauchs ab. Die Menge an PVP war so zu wählen, dass die Goldpartikel zwar an der Innenwand des Tefzel™-Schlauchs haften, aber nur so fest, dass sie sich bei der Horizontalrotation noch gleichmäßig an der Schlauchinnenwand verteilen. Es wurden daher Cartridgepreparationen mit unterschiedlichen von PVP-Konzentration (0,1; 0,05; 0,03 und 0,01 mg / ml Ethanol) durchgeführt. Obgleich bei 0,03 mg PVP pro ml Ethanol die beste Goldverteilung beobachtet wurde, war das Ergebnis nicht zufriedenstellend (s.u.). Nach der Rotation wurde der Schlauch im N_2 -Gasstrom getrocknet (ca. 5 min). Dann wurde der Schlauch in 2 cm lange Stücke (die Cartridges) geschnitten. Die Cartridges wurden in geschlossenen Gefäßen bei 4°C aufbewahrt.

Der Engpass bei dieser Methode bestand in der Schwierigkeit, die Goldpartikel bei der Rotation des Schlauchs gleichmäßig über die gesamte Innenwand zu verteilen. Meist war die Verteilung sehr ungleichmäßig, was auch durch variiierende PVP-Konzentrationen (s.o.) nicht vermieden werden konnte. Daher wurde das Protokoll verändert und der Schlauch vor der Beladung mit den DNA/Gold-Partikeln in 2 cm lange Stücke geschnitten. Diese wurden an einem Ende mit mehr als 9 mm² Parafilm™ verschlossen und mit dem Parafilmende voraus in die Cartridgebohrung des „Cartridge-Holders“ eingeführt. Dabei wurde der Parafilm™ stark gespannt und in eine dünne Haut gedehnt. Die DNA/Gold-Suspensionen wurden nach ihrer oben beschriebenen Herstellung in 5 µl Aliquots so in die Schlauchstücke eingeführt, dass sie als dünne Schicht auf dem Parafilm™ zum Liegen kamen (Abb. 2). Dafür wurden die 5 µl mit einer Pipette (Kristallspitzen) in mehreren Schritten vorsichtig an einer Seite der Innenwand des im Cartridge-Holders befindlichen Schlauchstücks entlang hineinpipettiert. Der Kapazität des Cartridge-Holders entsprechend wurden so 12 „Patronen“ parallel präpariert. Nach Beladung wurden die DNA/Gold-Partikel 30 min an der Luft getrocknet und anschließend sofort verwendet. Bei der Transfektion mit den so hergestellten Cartridges zerriss der Parafilm™ unter dem Druck des Heliumgasstroms und die DNA/Gold-Ladung wurde auf das zu transfizierende Objekt beschleunigt.

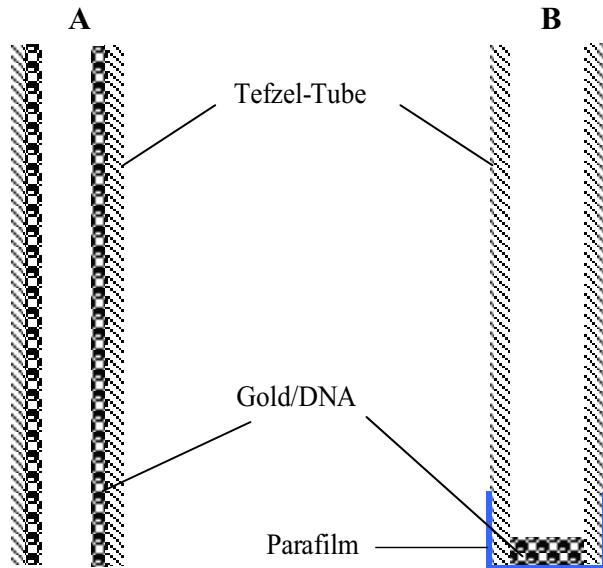


Abbildung 2: *Standard- und Parafilm Cartridges*; Schematischer Querschnitt durch Cartridges hergestellt mit dem Protokoll von BioRad (A) und dem neuen Protokoll (B). Im Standardprotokoll (BioRad) werden die DNA/Gold-Partikel mit Hilfe von Polyvinylpyrrolidon (PVP) an die Innenwand des Tefzel™-Schlauchs gebunden. Bei der neuen Methode werden die Cartridges mit Parafilm verschlossen. Die DNA/Gold-Suspension wird dann direkt in die Patronen gefüllt. Es zeigte sich, dass mit dieser veränderten Methode DNA/Gold-Verluste während der Präparation und des Beschusses vermieden und bessere Transfektionsraten erreicht wurden.

4.18.2.2 *Transfektion von kultivierten Zellen mit der Helios Gene Gun*

Zur Erleichterung und Standardisierung der Transfektion mit der HGG wurde eine Ringhalterung konstruiert, die an den höhenverstellbaren Ständer eines Binokulars montiert wurde (Abb. 3 a). Diese Konstruktion verbesserte die Anwendung der HGG in einer sterilen Werkbank, indem die Entfernung zwischen dem Cartridge-Holder und den Zellen leicht und akkurat eingestellt werden konnte. Damit konnte auch auf den vorderen Teil des „Barrel-Liners“ verzichtet werden, der nach dem Design des Geräts dazu diente, den Abstand zwischen den Cartridges und dem zu transfizierendem Objekt zu kontrollieren. Der Teil des Barrel-Liners, der den Abstand kontrolliert, wurde deshalb entfernt (Abb. 3 b).

Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS (1x) gewaschen. Nach dem Entfernen des Waschpuffers wurden die DNA/Gold-Partikel auf die Zellen geschossen. Sofort danach wurde frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden in der Regel 48 h nach der Transfektion geerntet oder gefärbt.

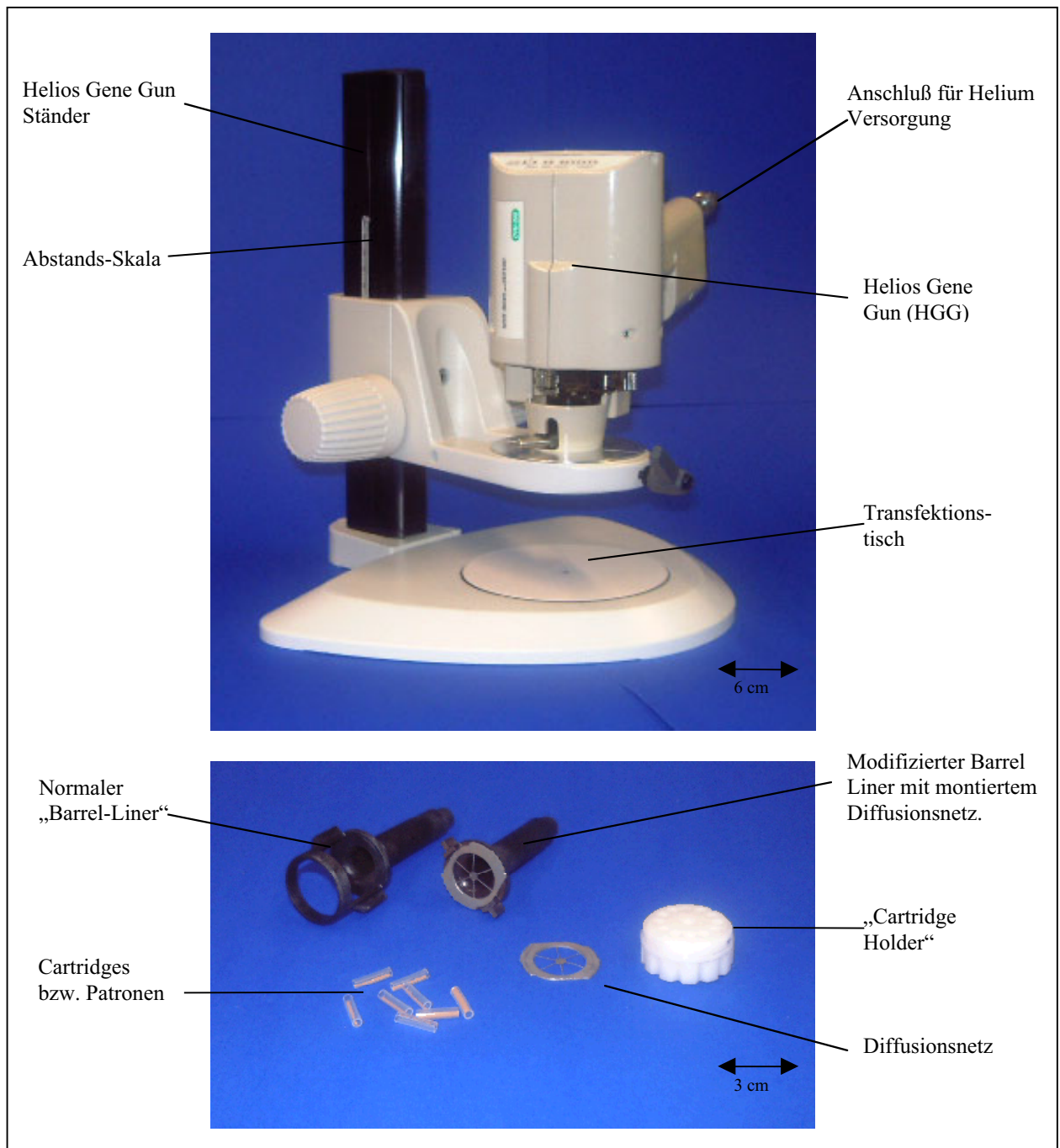


Abbildung 3 a und b: (a) Das Helios Gene Gun System (BioRad); Die Helios Gene Gun wurde optimiert, indem sie mit einer Ringhalterung an dem höhenverstellbaren Ständer eines Binokulars befestigt wurde. Dadurch wurde die Handhabung unter einer sterilen Abzugshaube standardisiert. Diese Modifizierung ermöglicht es bei Transfektionen von Zellkulturen den Abstand zwischen Gene Gun und Zellen reproduzierbar zu fixieren. (b) Gezeigt sind weitere Bestandteile des Helios Gene Gun –Systems (BioRad), Original und modifizierter „Barrel-Liner“, Diffusionsnetz (zur Verbesserung der Goldpartikelverteilung), Cartridges (=Patronen) und „Cartridge-Holder“ (Magazin für 12 Cartridges).

4.19 Proteinbestimmung im Zell- oder Organlysat nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts im klaren Lysat von Zellkulturen oder Organen transgener Mäuse wurde die kolorimetrische Methode von Bradford (1976) angewandt.

1-3 µl klares Lysat wurde mit NaCl (0,15 M) auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Dann wurde der Ansatz mit 1 ml Bradfordlösung (s.u.) gemischt und kurz gevortext. In Abhängigkeit der Proteinkonzentration trat eine Blaufärbung der Lösung ein, welche in Küvetten überführt wurde. Das Absorptionsmaximum des blauen Farbkomplexes lag bei 595 nm. In einem Photospektrometer (Amersham-Pharmacia) wurden die Proben gegen einen Kontrollwert (100 µl NaCl und 1 ml Bradfordlösung) gemessen. Um die ermittelten Absorptionswerte mit der Proteinkonzentration im Lysat zu korrelieren, wurden BSA-Lösungen mit bekannter Proteinkonzentration (2,5-10 µg / ml) hergestellt. Mit den ermittelten Absorptionswerten wurde eine Kalibrierungskurve erstellt.

Ansatz Bradfordlösung:	0,01 %	Coomassie Brilliantblau G-250
	5 %	Ethanol
	8,5 %	Phosphorsäure

4.20 In situ Färbung mit X-gal

Zur Identifizierung von kultivierten Zellen, die nach einer Transfektion das Reportergen für β-Galaktosidase exprimierten, wurden die entsprechenden Zellkulturen mit X-gal gefärbt.

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS (1x) gewaschen. Pro Züchtungsareal (Ø 3,2 cm) wurde 1 ml Glutaraldehydlösung (0,2 %) zur Fixierung zugegeben. Nach 15 min bei RT wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen wurden dreimal mit jeweils 1 ml PBS (1x) gewaschen. Die letzte Waschlösung wurde entfernt und zur Färbung der transfizierten Zellen wurde pro Zellkulturschale 1 ml X-gal-Lösung (s.u.) zugegeben. Die zu färbenden Zellkulturen wurden 12-14 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die X-gal-Lösung entfernt und durch PBS (1x) ersetzt. Transfizierte Zellen, die β-Galaktosidase exprimiert hatten, waren blau gefärbt und wurden unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Um das Zählen und die Auswertung dieser Versuche zu erleichtern, wurden die Zellen in Schalen mit gerasterten Böden (160 Quadrate mit je 2 mm Kantenlänge) gezüchtet. Die Zellen konnten nach dem Färben in den Schalen bei 4°C mehrere Monate aufbewahrt werden. Dazu musste die PBS-Lösung alle 3-4 Wochen ausgetauscht werden.

Ansatz X-gal-Lösung:	0,2 %	X-gal (5-Brom-4-Chlor-indoxyl- β -D-galaktosid)
	1 mM	MgCl ₂
	150 mM	NaCl
	3,3 mM	K ₄ Fe(CN) ₆
	3,3 mM	K ₃ Fe(CN) ₆
	10 mM	Natriumphosphat (pH 7,0)

4.21 Chemolumineszenstest für β -Galaktosidase

Für eine biochemische Messung der β -Galaktosidase-Konzentration in Zellextrakten wurden der *Galacto-Light Plus Kit* (Tropix) und das Chemolumineszenzmessgerät *Lumat LB 9501* (Berthold) benutzt. Dieser Chemolumineszenztest ermöglicht es, sehr geringe Mengen (Messbereich: 2 fg-20 ng) der β -Galaktosidase in einem Zell- oder Organlysat nach Entfernen des Zelldebris nachzuweisen (Bronstein et al., 1994). Das im Galacto Light Plus Kit befindliche Galacton™ ist eine 1,2-Dioxetan-Verbindung (AMPGD: 3-[4-methoxyspiroyl[1,2-dioxetan-3,2'-trizylo-[3.3.1.1^{3,7}]dekan]-4-phenyl] β -D-galaktopyranosid) mit einem β -Galaktosidanteil (Jain und Magrath, 1991). Diese Verbindung wird von β -Galaktosidase gespalten. Dabei entsteht ein Dioxetan Anion (AMP⁻D). Bei pH-Werten >9 zerfällt das AMP⁻D Anion in Adamantanon und das Methylmetaoxybenzoat Anion, welches sich im angeregten Zustand befindet und Licht emittiert (461 nm). Die bei der Hydrolyse von AMPGD entstehende Licht Emission kann dazu verwendet werden, β -Galaktosidase-Konzentrationen zu ermitteln.

Für die Messung wurden 70 μ l Reaktionspuffer (100 mM Natriumphosphat pH 8,0; 1 mM MgCl₂) und 1 μ l Galacton™ gemischt und in einem Polystyrolröhrchen (6 ml, Falcon) auf RT gebracht. Dann wurde der Ansatz nach Zugabe von 1 μ l Zellextrakt leicht geschwenkt und 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die einzelnen Messungen durchgeführt, indem das Polystyrolröhrchen mit dem darin enthaltenen Reaktionsansatz in den Messschacht des Luminometers (Lumat LB 9501 Berthold) eingeführt wurde. Vorher wurde der Accelerator-II in das Vorratsgefäß des Luminometers gegeben. Mit Hilfe einer internen Pumpe wurden kurz vor der Messung automatisch 100 μ l Accelerators-II in das Reaktionsgefäß gepumpt. Dadurch wurde die Reaktion gestoppt und der pH-Wert des Reaktionsansatzes auf >12 erhöht. Dadurch entstand das lichtemittierende Methylmetaoxybenzoat Anion (s.o.). Die Lichtmission wird durch den Accelerator-II zusätzlich verstärkt (Herstellerangabe). Mit der photosensitiven Zelle des Luminometers wurden die über eine Dauer von 5 s auftreffenden Photonen registriert und von dem Photomultiplier (ultraschneller Photonenzähler) gezählt. Der spektrale Empfindlichkeitsbereich des Messgeräts lag dabei zwischen 390 und 620 nm. Gemessen wurde bei 461 nm. Als Maßeinheit für Rohdaten diente nicht die Zahl der Lichtimpulse, sondern es wurden die sogenannten relativen Lichteinheiten (RLU= Relative Light Units) gewählt. Diese

entstanden aus direkt gezählten Impulsen geteilt durch zehn und multipliziert mit dem RLU-Faktor. Durch den vom Hersteller vorgegebenen RLU-Faktor wurden unvermeidbare, individuelle Schwankungen der Kathodenempfindlichkeit des Photomultipliers ausgeglichen. Pro Zellkultur wurden parallel in zwei Proben die β -Galaktosidase-Konzentration gemessen und die RLU-Werte gemittelt.

Für eine Messung wurden die transfizierten Zellen nach 48 h einmal mit eiskaltem PBS (1x) gewaschen. Nach Zugabe von 100 μ l Lysepuffer (100 mM Kaliumphosphat pH 8,0; 1 mM Magnesiumchlorid; 0,05 mM DTT) in die Zellkulturschale (\varnothing 3,4 cm) wurden die Zellen mit einer Zellkratzer vom Boden gelöst und in ein Mikro-Tube überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen wurde der Zelldebris in einer Tischzentrifuge (5 min / 13000 rpm) abgetrennt und das klare Lysat bei -80°C eingefroren.

Um einen Proteinextrakt aus den Organen transgener Mäuse herzustellen, wurden die Mäuse getötet und die entsprechenden Organe heraus präpariert. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Lysepuffer (s.o.; für 100 mg Gewebe 1 ml Lysepuffer) wurde das Gewebe homogenisiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen und Abzentrifugieren des Zelldebris wurde das klare Lysat bei -80°C gelagert.

Um die gemessene Lichtemission mit der Menge an β -Galaktosidase zu korrelieren, wurden für jeden Zelltyp Standardkurven erstellt. Dazu wurden bekannte Mengen an β -Galaktosidase mit Zellextrakten (nach Zentrifugation) von nicht transfizierten Zellen gemischt. Mit den anschließend erhaltenen Messdaten (RLU pro Menge ermittelten β -Galaktosidase) wurden die unbekanntes β -Galaktosidase-Konzentrationen in den Extrakten der transfizierten Zellen bestimmt. Eine typische RLU / β -Galaktosidase-Standardkurve ist in Abb. 4 dargestellt.

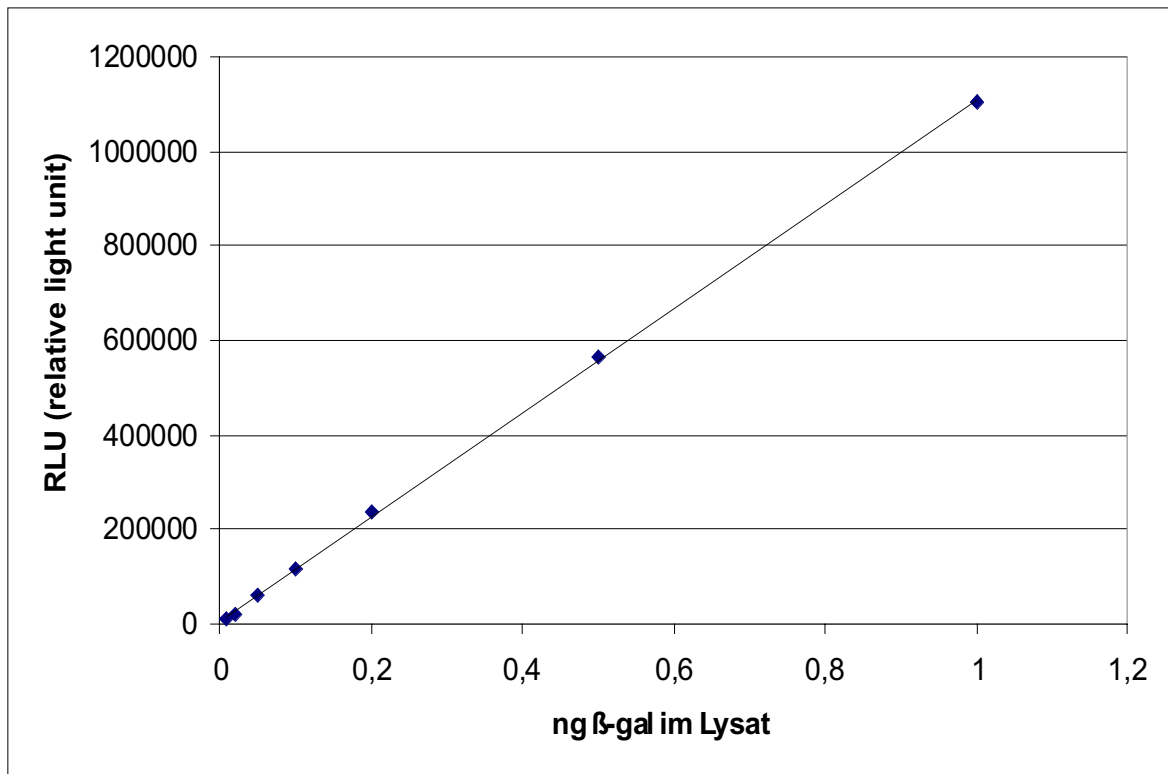


Abbildung 4: Kalibrierungskurve β -Galaktosidase; Repräsentatives Beispiel einer Kalibrierungskurve der mit dem Galacto-Light Plus Kit ermittelten β -Galaktosidase-Konzentrationen. Für diese Versuche stand ein Chemolumineszenzmessgerät Lumat LB 9501 zur Verfügung. Es wurden definierte Mengen an β -Galaktosidase (Sigma, G-5635) im klaren Lysat nicht transfizierter Zellen (gezeigt neonatale Kardiozyten) gelöst und in die Chemolumineszenzreaktion eingesetzt. Die von dem Gerät angezeigten Werte sind in RLU (Relative Light Units) angegeben. Der RLU-Wert entspricht der Anzahl der direkt gemessenen Lichtimpulse / 10 x RLU-Faktor (vom Hersteller vorgegeben). Mit Hilfe der Kurve können RLU-Werte direkt in ng β -Galaktosidase umgerechnet werden: $RLU / ng \beta\text{-Galaktosidase}$. Die gemessenen RLU-Werte sind zelltypspezifisch und wurde daher im Lysat jedes Zelltyps ermittelt. Innerhalb eines Zelltyps wurde eine reproduzierbare Steigung der Kalibrierungskurve (+/- 10 %) beobachtet.

4.22 Transgene Mäuse

Ziel der Züchtung transgener Mäuse ist es, das in neonatalen Kardiozyten angewandte System der *tet*-gesteuerten Genexpression zu etablieren. Unter Verwendung des herzspezifischen α -MHC Promotors soll β -Galaktosidase herzspezifisch exprimiert werden. Die Expression des Reportergens erfolgt dabei durch die Zugabe von DOX (ein *tet*-Derivat). Sollten diese Experimente erfolgreich sein, so ist geplant α -MHC, welches eine FHC-relevante Mutation enthält, in den transgenen Mäusen kontrolliert zu exprimieren. Im Zuge dieser Experimente werden pathogene Mechanismen dieser Krankheit untersucht.

4.22.1 Haltung und Verpaarung transgener Mäuse

Maximal 2-3 Mäuse wurden bei einer Temperatur von 22-23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% in Markolankäfigen Typ II (Bodenfläche 350 cm²) mit Edeldstahlgitter gehalten. Der Käfigboden wurde mit Fasereinstreu von Altramin bedeckt und mit einigen Kleenextüchern zum Nestbau bestückt. Als Nahrung diente Altramin Mäusehaltungs- und Zuchtfutter. Zum Trinken bekamen die Tiere angesäuertes Wasser. Der Tag/Nacht-Rhythmus wurde mit Licht zwischen 7.00-19.00 Uhr und Dunkelheit zwischen 19.00-7.00 Uhr erzeugt.

Die gezielte Zucht wurde permanent monogam durchgeführt, indem ein Weibchen zum Männchen in den Käfig gesetzt wurde. Wenn das Weibchen sichtbar tragend war, wurde es in einem eigenen Käfig platziert. Die Tragzeit der Mäuse beträgt 19-21 Tage und die Säugezeit ca. 3 Wochen. Die Jungtiere wurden nach dieser Zeit in neue Käfige umgesetzt.

4.22.2 Etablierung transgener Mauslinien durch Mikroinjektionen

Transgene Mäuse wurden durch Injektionen von DNA in den Pronucleus von FVB / N Oozyten etabliert (Palmiter et al., 1982; Wassarman et al., 1993; Hogan et al., 1994). Durch Einzelinjektionen wurden transgene Mäuse hergestellt, die entweder das tetR-Gen (tetR-Mäuse) oder das *lacZ*-Gen (*lacZ*-Mäuse) integriert hatten. Durch „Ko-Injektion“ beider Konstrukte wurden transgene Mäuse etabliert, die beide Transgene enthielten. Beiden Transgenen war der α -Myosin Heavy Chain Promoter (α -MHC Promotor) vorgeschaltet. Damit sollte die Expression der Testgene auf das Herz beschränkt werden. Die Injektionen wurden vom Servicelabor des Max-Planck-Institutes für physiologische und klinische Forschung in der Arbeitsgruppe Dr. Müller-Holtkamp durchgeführt.

Die Transgene wurden mit dem Restriktionsenzym *Not I* aus dem Vektor restringiert. Die linearisierten DNA-Fragmente wurden nach einer Gelelektrophorese von der Agarose abgetrennt und gereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, s. Methoden). Durch Mikroinjektion in Pronuclei befruchteter Eizellen von Mäusen wurden die Transgene (1-3 μ g / ml; ~100-300 Kopien / pl) an zufälligen Stellen des Genoms integriert. Nach Verpaarung mit vasktomierten Männchen wurden die Oocyten in den Eileiter von „pseudoschwangeren“ Weibchen retransferiert. Die sich daraus entwickelten „transgenen“ Mäuse (10-20% der Nachkommen) bestanden zu einem großen Anteil aus „transgenen“ Zellen. Befanden sich unter diesen Zellen Keimzellen, so wurden die Transgene an die nächste Generation weitergegeben. Die transgenen Mauslinien wurden in FVB-Inzucht-Stämmen etabliert und propagiert.

4.22.3 Isolierung genomischer DNA aus transgenen Mäusen

DNA wurde aus Schwanzspitzengewebe („tail-cuts“) von 2 Wochen alten, neugeborenen Mäusen gewonnen. Dazu wurden 0,5-1 cm der Schwanzspitze gekappt und in eiskaltem PBS gewaschen. Über Nacht wurde das Gewebe in 300 µl Lysepuffer (s.u.) verdaut. Die Proben wurden bei 55°C unter starkem Schütteln inkubiert. Nach ca. 12-14 h wurden die Proteine durch Erhitzen auf 95°C (20 min) inaktiviert. In einer Tischzentrifuge wurde der Debris bei 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Ansatz Lysepuffer:	50 mM	KCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	Tris-HCl pH 8,3
	0,45 %	IGPAL C-630
	0,45 %	TWEEN 20
	100 µg / ml	Proteinase K

4.22.4 Analyse genomischer DNA aus transgenen Mäusen

Transgenspezifische DNA-Fragmente wurden durch Amplifikation (PCR) nachgewiesen. Bei der Analyse von Mäusen, die nach Einzelinjektion das *lacZ*-, bzw. *tetR*-Gens enthielten, wurde wie folgt vorgegangen:

Für das *lacZ*-Gen (*α-MHCp/tetO/lacZ/hgh*) wurde ein Forward-Primer (1756) aus einem proximalen Bereich des *α*-MHC Promotors gewählt, ein Reverse-Primer (1884) vom 5'-Ende des endogenen *α*-MHC Gens und ein transgenspezifischer Reverse-Primer (1885) des *lacZ*-Gens. Unter Verwendung der drei Primer wurden bei der anschließenden PCR in einem Schritt zwei Fragmente amplifiziert (Abb. 5 a). Das erste PCR-Fragment (318 bp) enthielt einen Teil des endogenen *α*-MHC Promotors und ein Fragment am 5'-Ende des endogenen *α*-MHC Gens. Diese Amplifikation diente als Qualitätskontrolle der DNA. Damit wurde die DNA-Ausbeute im Lysat indirekt quantitativ evaluiert. Das zweite transgenspezifische Fragment bestand aus einem Teil des transgenen *α*-MHC Promotors vom 3'-Ende und einem Teilstück des *lacZ*-Gens (548 bp). Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend nach Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

Zum Nachweis des *tetR*-Gens (*α-MHCp/tetR/hgh*) in Schwanzspitzenlysaten wurden drei Primer ausgewählt. Analog zum Nachweis des *lacZ*-Gens wurden in einer PCR-Reaktion zwei DNA-Fragmente gleichzeitig amplifiziert (Abb. 5 b). Der Forward Primer 1756 vom 3'-Ende des *α*-MHC Promotors begrenzte beide Fragmente am 5'-Ende. Zusammen mit dem Reverse-Primer 1884 vom 5'-Ende des endogenen *α*-MHC Gens wurde ein endogenes DNA-Fragment (318 bp)

amplifiziert und diente der quantitativen Kontrolle der DNA in Schwanzspitzenlysaten. Mit dem Forward-Primer 1756 und dem dritten Primer 1741a vom 5'-Ende des tetR-Gens wurde ein transgenspezifisches DNA-Fragment (701 bp) amplifiziert, dessen Anwesenheit die erfolgreiche Integration des Transgens in das Genom der Maus anzeigte. Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend nach Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

In einigen Experimenten wurden Mäuse aus Zygoten erhalten, in die das *lacZ*-Gen und tetR-Gen gleichzeitig injiziert worden waren. Zum Nachweis der kotransfizierten DNA-Konstrukte wurde eine PCR durchgeführt, bei der von beiden Transgenen spezifische DNA-Fragmente amplifiziert wurden (Abb. 5 c). Dabei wurden jeweils DNA-Fragmente am 3'-Ende der Transgene amplifiziert, die in die *hgh*-Sequenz hineinreicht. Da beide Gene an ihrem 3'-Ende eine *hgh*-spezifische Sequenz enthielten, konnte für beide Amplicons ein einheitlicher Reverse-Primer (1457) verwendet werden. Für den Nachweis des tetR-Transgens diente als Forward-Primer das Oligonukleotid 1740a und für das *lacZ*-Gen 1793. Das PCR-Produkt des *lacZ*-Gens war 730 bp, das Produkt des tetR-Gen war 837 bp lang. Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend nach Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

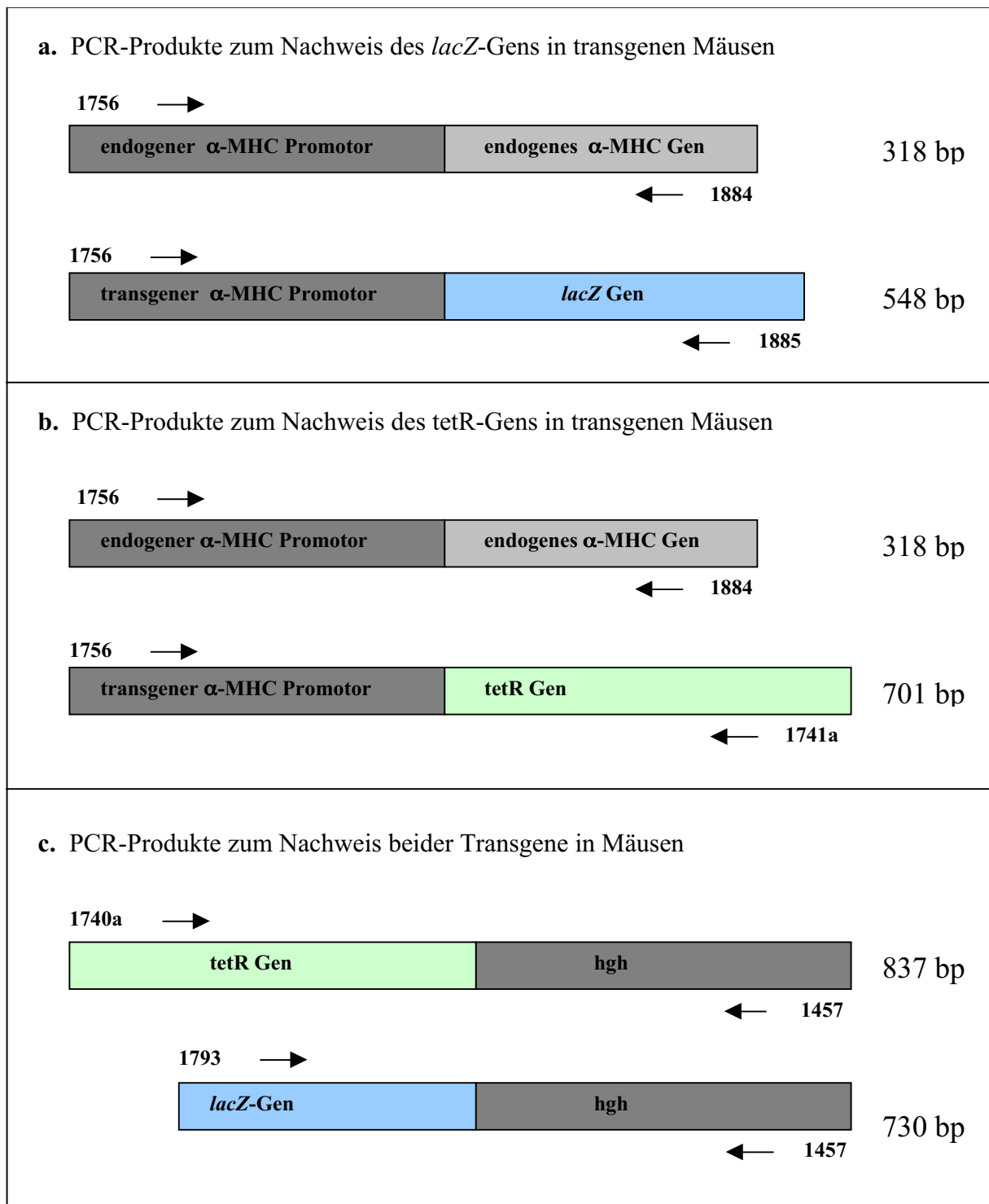


Abbildung 5 a-c: Nachweis von Transgenen in Schwanzspitzenlysaten transgener Mäuse; PCR-Produkte und verwendete Primer zum Nachweis der Transgene des *tetR/tetO*-Systems in Mäusen. Die Transgene wurden durch PCR-Reaktionen in den Schwanzspitzenlysaten nachgewiesen. Schematisch dargestellt sind die PCR-Produkte zum Nachweis (a) des *lacZ* Transgens, (b) des *tetR*-Transgens und (c) für beide Transgene bei gleichzeitiger Injektion in die Oozyte einer Maus. Zur Qualitätskontrolle der Lyse wurden in a und b zusätzlich endogene DNA-Abschnitte amplifiziert. (hgh = Polyadenolierungssignal des menschlichen hgh-Gens; 1457, 1740a, 1741a, 1756, 1793, 1884, 1885 = laborinterne Bezeichnung verwendeter Primer, siehe auch Anhang 9.1).

4.22.5 X-gal Färbung von Organen und histologischen Schnitten transgener Mäuse

Um das Expressionsmuster des α -MHC Promotors in den Organen transgener Mäuse zu untersuchen, wurden *lacZ*-Mäuse (s.o.) durch eine Überdosis Anästhetikum getötet. Zunächst wurde das Herz frei präpariert und über den linken Ventrikel kannuliert. Dann wurde mit 15 ml PBS (1x) und dann mit 50 ml Vorfixierlösung (3 % Paraformaldehyd in PBS) perfundiert. Nach nochmaligem Perfundieren mit 1x PBS (5 min) wurden die Organe herauspräpariert und 3x 5 min mit PBS (1x) gewaschen.

Um das ganze Organ mit X-gal zu färben, wurden sie bei 37°C über Nacht mit 0,1 % X-gal-Lösung (0,1 % X-gal, 5-Brom-4-Chlor-indoxyl- β -D-galaktosid; 1 mM MgCl₂; 150 mM NaCl; 3,3 mM K₄Fe(CN)₆; 3,3 mM K₃Fe(CN)₆; 10 mM Natriumphosphat, pH 7,0) inkubiert. Dabei färbten sich Zellen, die β -Galaktosidase exprimiert hatten, blau. Nach dem Färben wurden die Organe mit PBS (1x) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 2 % Paraformaldehyd- und 0,1 % Glutaraldehydlösung in PBS fixiert. Die Organe wurden nochmals mit PBS (1x) gewaschen und unter einem Binokular fotografiert.

Für die histologische Analyse der Herzen wurde das herauspräparierte Organ über eine Zuckergradienten equilibriert. Mit einem Mikrotom (Tissue-Tek) wurden 10-20 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Objektträger platziert. Die Gewebeschnitte wurden in 2 % Paraformaldehyd in PBS vorfixiert und mit PBS (1x) gewaschen. Bei 37°C wurden die Schnitte dann mit 0,1 % X-gal-Lösung (s.o.) über Nacht inkubiert. Dabei färbten sich Zellen, die β -Galaktosidase exprimiert hatten, blau. Nach dem Färben wurden die Schnitte mit PBS (1x) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 2 % Paraformaldehyd- und 0,1 % Glutaraldehydlösung in PBS fixiert. Die Gewebeschnitte wurden nochmals mit PBS (1x) gewaschen und unter einem Mikroskop fotografiert.

4.23 Statistik

Aus den einzelnen Werten von Messreihen wurde der Mittelwert gebildet und der Standardfehler (SEM=“standard error of mean“) berechnet. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt (Anova und Bonferroni-Test). Waren die Voraussetzungen dafür nicht gegeben wurden die Gruppen mit dem Kruskal-Wallis- und Dunn's-Test verglichen.

5 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit besteht aus vier experimentellen Teilen. Für die Transfektionsexperimente mussten in der ersten Phase der experimentellen Arbeiten genetische Konstrukte kloniert werden.

Darauf folgten im zweiten Teil Experimente, die dazu dienten, die Transfektionstechnik mit der Helios Gene Gun (HGG) von BioRad zu testen und zu optimieren. Es wurde durch eine Reihe von Experimenten mit kultivierten COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten die transiente Transfektion mit der HGG und des Reportergens β -Galaktosidase unter Verwendung eines neuen, selbst entwickelten Protokolls optimiert und standardisiert. Bei allen drei Zelltypen konnte die Transfektionseffizienz im Vergleich zum Standard Protokoll gesteigert werden.

Unter Anwendung dieser Transfektionstechnik wurde das native *tetR/tetO*-System zur *tet*-kontrollierten Expression eines Transgens ebenfalls in kultivierten COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten getestet. Es konnte gezeigt werden, dass das Reportergen β -Galaktosidase mit dem *tet*-Derivat DOX steuerbar exprimiert wurde und dass dies auch unter Verwendung der genetischen Konstrukte, die in transgenen Mäusen zur Anwendung kommen sollen, möglich ist.

Im der letzten Phase wurde damit begonnen, transgene Mauslinien mit einigen dieser genetischen Konstrukte zu etablieren und das Expressionsmuster des α -MHC Promotors in Verbindung mit dem Reportergen β -Galaktosidase zu untersuchen.

5.1 Klonierung genetischer Konstrukte

Neben den kommerziell erhältlichen Konstrukten des native *tetR/tetO*-Systems aus dem T-REx™ Kit (Invitrogen), wurden für die Experimente in neonatalen Kardiozyten und transgenen Mäusen weitere genetische Konstrukte kloniert:

1. *α -MHCp/tetR/hgh*: Zur herzspezifischen Expression des *tetR* in neonatale Kardiozyten und transgenen Mäusen.
2. *α -MHCp/tetO/lacZ/hgh*: Zur herzspezifischen Expression von β -Galaktosidase in neonatale Kardiozyten und transgenen Mäusen. Zwischen Promotor und Reportergen (*lacZ*) befinden sich *tetO*-Sequenzen, an die *tetR* binden kann.

3. *α-MHCp/tetO/α-MHC-WT/hgh*: Zur herzspezifischen Expression von α -Myosin in neonatalen Kardiozyten und transgenen Mäusen. Zwischen Promotor und der α -MHC cDNA befinden sich *tetO*-Sequenzen, an die tetR binden kann.
4. *α-MHCp/tetO/α-MHC-MUT/hgh*: Zur herzspezifischen Expression eines mutierten α -Myosins ($\Delta E927$) in neonatale Kardiozyten und transgenen Mäusen. Zwischen Promotor und der α -MHC cDNA befinden sich *tetO*-Sequenzen, an die tetR binden kann.

5.1.1 Konstrukte zur *tet*-kontrollierten Expression von β -Galaktosidase in neonatalen Kardiozyten und transgenen Mäusen

Um das Prinzip der *tet*-kontrollierten Genexpression zu demonstrieren, wurden zunächst COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten mit den Konstrukten aus dem T-REx™ Kit transfiziert. Um das Reporter-gen β -Galaktosidase herzspezifisch zu exprimieren und unter die Kontrolle des tetR zu stellen, wurden Konstrukte benötigt, deren Gene (*tetR* und *lacZ*) unter die Kontrolle des herzspezifischen α -MHC Promotors gestellt wurden (Abb. 6). Freundlicherweise überließ uns J. Robbins (Cincinnati, USA) ein Plasmid (*pBS II sk+*, im folgenden *JR-Plasmid* genannt), welches den herzspezifischen α -MHC Promotor und die ersten 3 nicht kodierenden Exons sowie Intron 1 und 2 des murinen α -MHC Gens enthält. Zusätzlich beinhaltet dieser Vektor die Sequenz des humanen Wachstumshormons (*hgh*) als Polyadenylierungssignal und eine MCS zwischen Promotor und *hgh* mit den Restriktionsschnittstellen (RS) für *Sal I* und *Hind III*. Unter Verwendung des Plasmids *pcDNA/TR* (T-REx™ Kit, Invitrogen) wurde zunächst über eine PCR die Sequenz des tetR (620 bp) amplifiziert und in den *pCR Blunt II TOPO*®-Vektor integriert. Dabei wurden zwei Primer verwendet (1740-Sal I und 1741-Hind III), die jeweils die Schneidesequenzen für *Sal I* und *Hind III* (an den Enden des Fragments, 663 bp) enthalten. Über diese Sequenzen wurde die tetR-Sequenz in die MCS des *JR-Plasmids* integriert. Das neu entstandene Plasmid wurde mit *α-MHCp/tetR/hgh* bezeichnet (Abb. 7).

Um zwei *tetO*-Sequenzen und das *lacZ*-Gen in das JR-Plasmid zu klonieren, wurde zunächst eine PCR mit *pcDNA4/TO/lacZ* (T-REx™ Kit, Invitrogen) durchgeführt (1794-Nde I und 1762). Das amplifizierte PCR-Fragment (1157 bp), welches zwei *tetO*-Sequenzen (je 19 bp Länge, 5'-*tcc cta tca gtg ata gag a tc tcc cta tca gtg ata gag a*) enthält, wurde zunächst mittels TOPO-Klonierung in den *pCR Blunt II TOPO*®-Vektor integriert. Mit Hilfe von *Nde I* und *Sal I* wurde dieses Fragment in das *JR-Plasmid* zwischen den α -MHC Promotor und das nicht

kodierende Exon 1 des α -MHC Gens eingefügt (die *Sal I*-RS stammt aus der MCS-Sequenz). Da sich der Umgang mit der über 3 kb langen Sequenz des *lacZ*-Gens als schwierig erwies, wurde diese aus dem Plasmid *pcDNA4/TO/lacZ* über zwei PCR Reaktionen (Fragment 1, 1616 bp): 1763-*Sal I* und 1764; Fragment 2, 1561 bp): 1765 und 1766a-*Hind III*) amplifiziert und die beiden Fragmente jeweils in den *pCR Blunt II TOPO*[®]-Vektor integriert. Dabei waren die Primer so gewählt, dass am 5'-Ende des Gens eine *Sal I*-RS und am 3'-Ende eine *Hind III*-RS entstand. In einer einzigen Ligation wurden diese beiden Fragmente über die RS *Sal I*, *BssH II* und *Hind III* in das *JR-Plasmid*, welches die *tetO*-Sequenzen bereits enthält, integriert. Über die RS *Sal I* und *Hind III* wurden die *lacZ*-Fragmente mit dem Vektor verbunden, während über die gemeinsame RS *BssH II* die *lacZ*-Fragmente untereinander zusammen gefügt wurden. Das konstruierte Plasmid wird im Folgenden α -MHC*p/tetO/lacZ/hgh* genannt (Abb. 8).

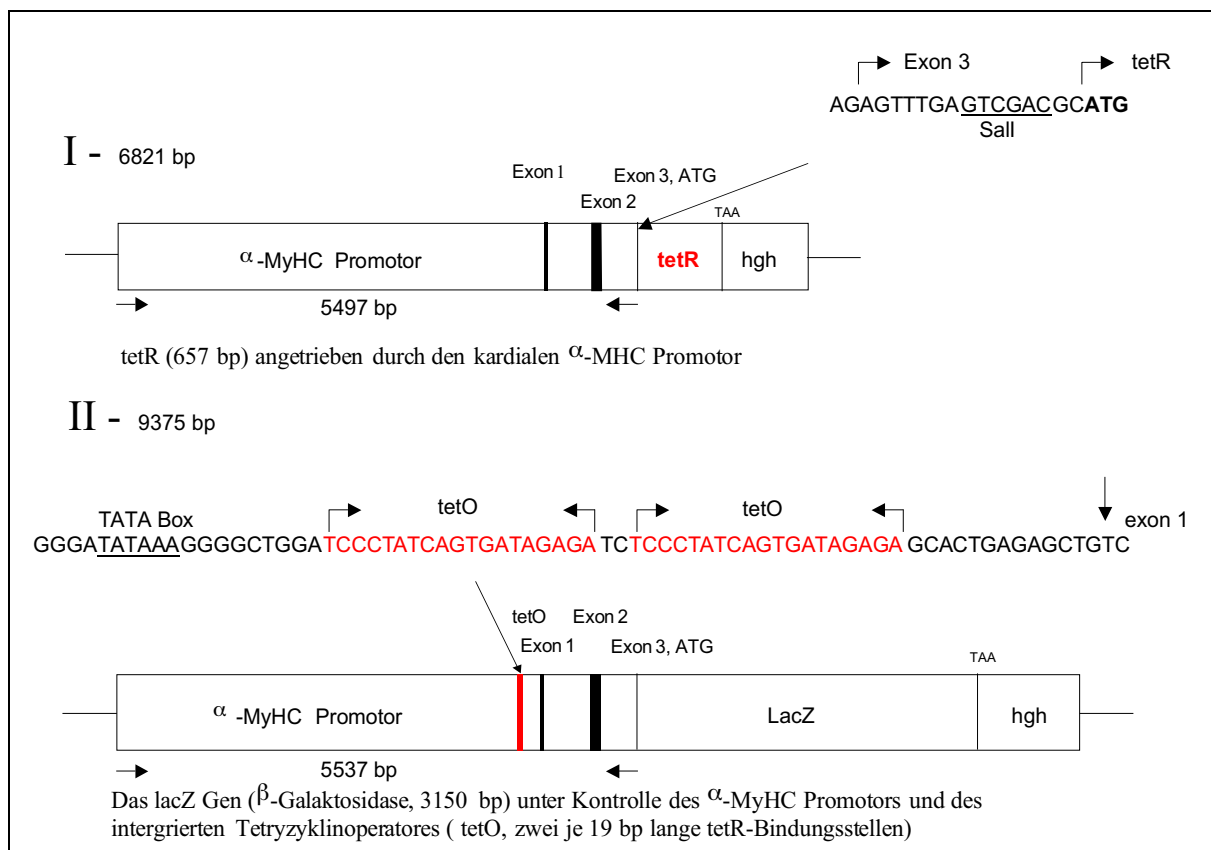


Abbildung 6: *tetR/tetO*-System mit integriertem α -MHC Promotor; Schematische Darstellung der DNA-Fragmente, mit denen die herzspezifische, *tet*-kontrollierte Expression von β -Galaktosidase in neonatalen Kardiozyten und transgenen Mäusen getestet wurde. (I) DNA mit Information für den α -MHC Promotor, mit dessen Hilfe das Gen für den *tetR* reguliert werden sollte. (II) Das zweite Konstrukt enthält nach dem α -MHC Promotor zwei hintereinanderliegende *tetO*-Sequenzen und die Sequenz des *lacZ* Gens enthält. Sowohl dem *tetR*-Gen als auch nach dem *lacZ* Gen sind je ein Polyadenolierungssignal (*hgh* = human growth hormone) angefügt.

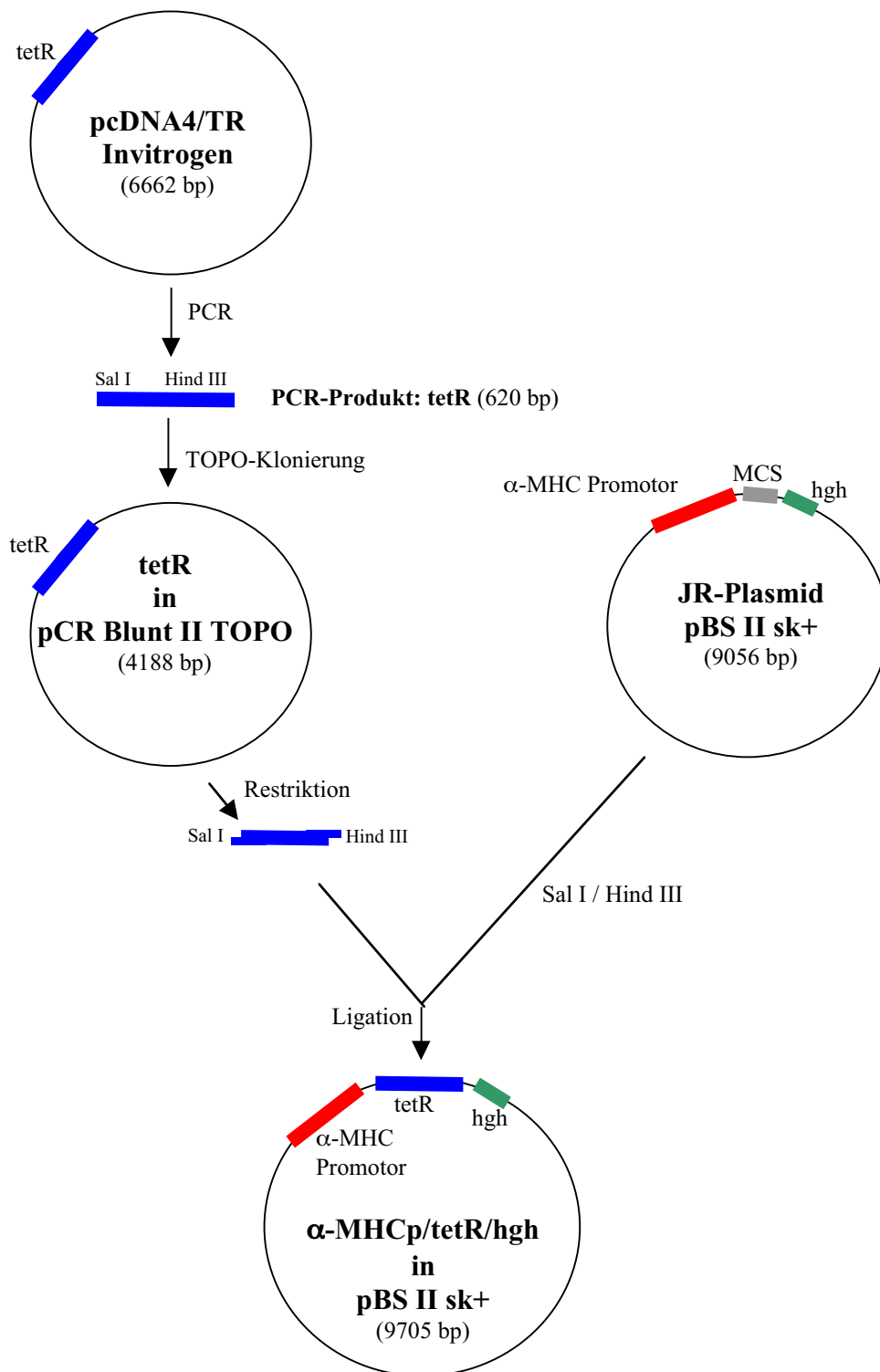


Abbildung 7: Klonierungsstrategie des *tetR* in das JR-Plasmid; Schematische Darstellung der Klonierung des *tetR* zwischen den α -MHC Promotor und das Polyadenylierungssignal hgh. Das Konstrukt diente der Expression des *tetR* in neonatalen Kardiozyten und transgenen Mäusen.

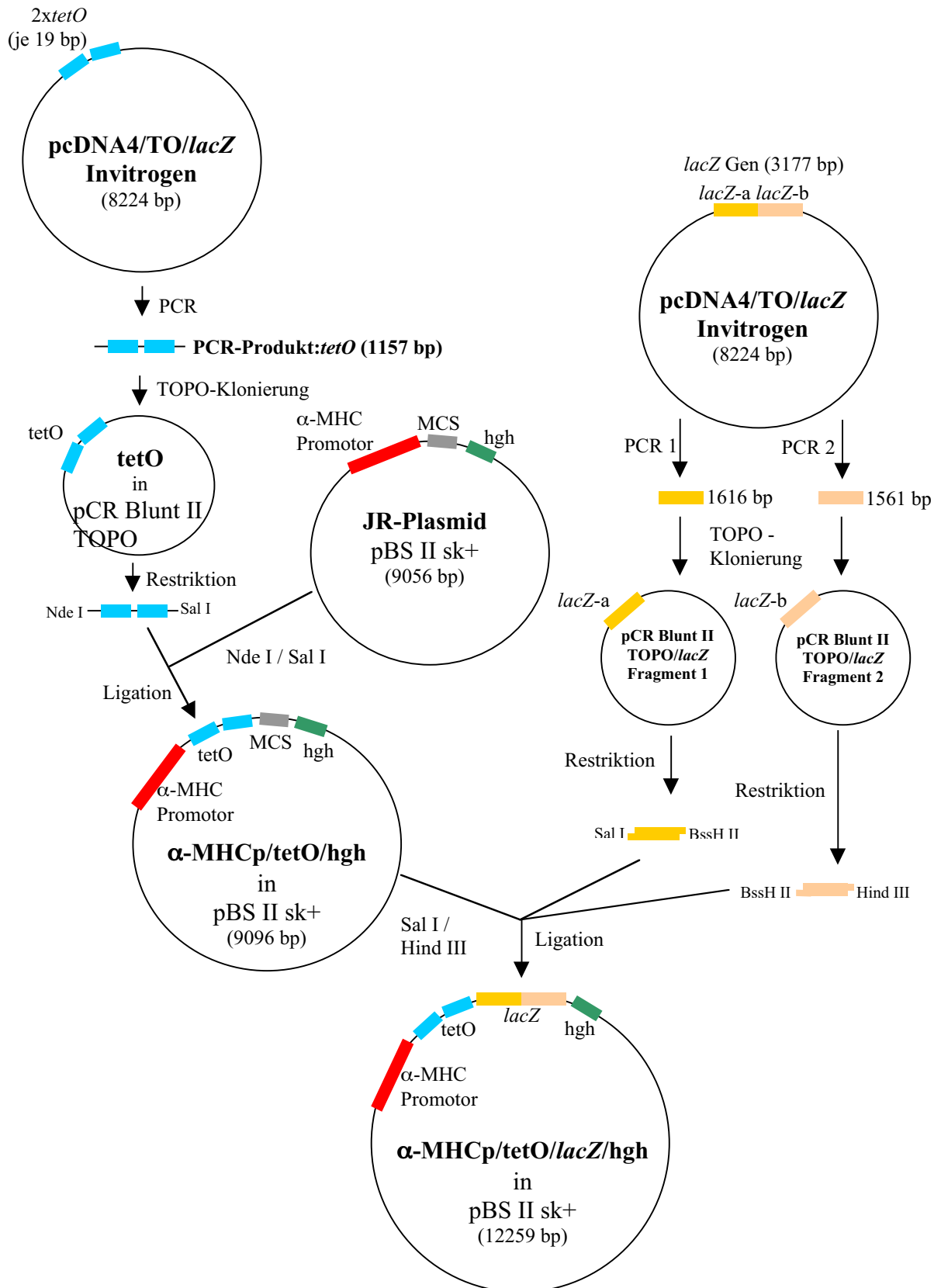


Abbildung 8: Klonierungsstrategie des *tetO* und des *lacZ*-Gens in das JR-Plasmid; Schematische Darstellung der Klonierung des Reportergens *lacZ* zwischen den α -MHC Promotor gefolgt von zwei *tetO*-Sequenzen und dem Polyadenylierungssignal *hgh*. Das Konstrukt diente der *tet*-kontrollierten Expression von β -Galaktosidase in neonatalen Kardiozyten und transgenen Mäusen.

5.1.2 Klonieren der cDNA des murinen α -Myosins (Schwere Kette)

Für die Klonierung der murinen α -MHC cDNA (5924 bp) wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen kombiniert. Zunächst wurde versucht, die cDNA des murinen α -MHC oder Teilfragmente davon über das RZPD (Ressourcen Zentrum-Primär Datenbank des deutschen Human Genom Projektes, Berlin) zu erhalten. Parallel wurde mRNA aus den Herzen von Mäusen isoliert. Diese diente der Herstellung einer α -MHC cDNA in einer RT-PCR Reaktion. Die gesamte Klonierung der α -MHC cDNA ist schematisch in Abb. 9 dargestellt.

Ein vom RZPD erhaltener Filter (eine Nylonmembran) enthielt in einem Koordinatensystem 35 000 aufgespottete Plasmide von cDNA-Klonen einer BALB/c-Mausherz cDNA Bibliothek (Filter: Nr. 422). Der Filter wurde mit Digoxigenin markierten PCR-Produkten von Exon 3 und 32 des humanen β -MHC Gens hybridisiert. Dabei wurden vier positive Klone identifiziert, die als Stab-Kulturen über das RZPD bezogen wurden. Die cDNAs wurden als Inserts im Vektor *pSPORT I* geliefert. Die Plasmid-DNA wurde zunächst mit universellen Primern ansequenziert. Alle vier Klone enthielten als Insert Fragmente des 3'-Endes der cDNA des α -MHC Gens in variabler Länge. Das längste dieser Fragmente, im Folgenden *T3* genannt, war 2130 bp lang. Unter Verwendung der RS *Kpn I* und *Hind III* wurde *T3* zunächst aus *pSPORT I* geschnitten und in den Vektor *pBS II sk+* umkloniert. Zur Kontrolle wurde *T3* vollständig sequenziert. Durch eine PCR-Reaktion bei der in den Reverse-Primer 1709 (der zugehörige Forward-Primer war 1687) die Sequenz einer *c-myc* Markierung („*c-myc tag*“, Länge 30 bp) vor dem Stopcodon und eine unmittelbar darauf folgende *Hind III* Schnittstelle integriert war, wurde ein modifiziertes Fragment (688 bp) des 3'-Endes von *T3* hergestellt. Dieses Fragment wurde durch TOPO-Klonierung in den *pCR Blunt II TOPO* Vektor integriert und in Top10 kompetente Zellen transformiert. Über die RS *Hind III* und *SexA I* wurde das modifizierte 3'-Ende dieses Fragments (243 bp) restringiert und anstelle der ursprünglichen Sequenz in *T3* integriert. Die *c-myc* Markierung dient in weiterführenden Experimenten dazu, das exprimierte transgene α -Myosin zu identifizieren und vom endogenen α -Myosin zu unterscheiden.

Da mit *T3* die cDNA des murinen α -Myosin noch nicht komplett vorlag, wurde parallel mRNA aus den Herzen von Mäusen isoliert. In RT-PCR-Synthesen wurden mit α -MHC spezifischen Primern (1641 / 1644 und 1645 / 1648) cDNAs hergestellt. Die Primer waren so ausgewählt, dass zwei Teilfragmente der cDNA des α -MHC erhalten wurden, die den verbliebenen Teil des Gens abdeckten, welche nicht über das RZPD bezogen werden konnten (im weiteren Verlauf vom 5' nach 3' *T1* und *T2* genannt). Über den Primer 1648 wurde vor dem

Startcodon am 5'-Ende von *T1* eine *Sal I*-RS eingeführt. *T1* und *T2* wurden mittels TOPO-Klonierung in den Vektor *pCR Blunt II TOPO* kloniert und zur Kontrolle sequenziert.

Anschließend wurden *T1* mit *Sal I* und *Age I* und *T2* mit *Age I* und *PflM I* aus dem Vektor *pCR Blunt II TOPO* herausgeschnitten. Gleichzeitig wurde *T3*, welches in dem Vektor *pBS II sk+* integriert ist, mit *PflM I* und *Sal I* restringiert. In der darauf folgenden Ligation wurden in einem Schritt *T1* und *T2* über die gemeinsame RS *Age I* zusammengefügt. Dieses Produkt wurde dann über die RS *Sal I* und *PflM I* mit *T3* und *pBS II sk+* verbunden. Das Ergebnis dieser Klonierung war die komplette cDNA Sequenz (5924 bp) ohne die drei ersten nicht kodierenden Exons des α -MHC Gens. Am 3'-Ende enthielt diese Sequenz *c-myc* Markierung direkt vor dem Stopcodon und eine künstliche *Hind III*-RS am 3'-Ende. Am 5'-Ende enthielt die cDNA ebenfalls eine über PCR eingeführte *Sal I*-RS.

Die α -MHC cDNA wurde über die RS *Sal I* und *Hind III* in das *JR-Plasmid*, in das vorher zwei *tetO*-Sequenzen (s.o) von je 19 bp Länge kloniert wurden, eingefügt (siehe Abb. 8). Das resultierende Konstrukt (im folgenden *α -Myosin WT* genannt) enthielt folgende Elemente: den α -MHC Promotor gefolgt von der kompletten cDNA-Sequenz des murinen α -MHC Gens mit zwei vor dem Startcodon integrierten *tetO*-Sequenzen. Direkt vor dem Stopcodon wurde eine *c-myc* Markierung integriert. Zusätzlich folgt auf die cDNA-Sequenz des α -MHC Gens ein *hgh* Polyadenylierungssignal. Das gesamte Konstrukt (13059 bp) kann mit *Not I* aus dem Vektor geschnitten werden. Durch Injektion in Oozyten von Mäusen können mit dieser DNA transgene Mauslinien etabliert werden, die ein transgenes α -Myosin herzspezifisch exprimieren.

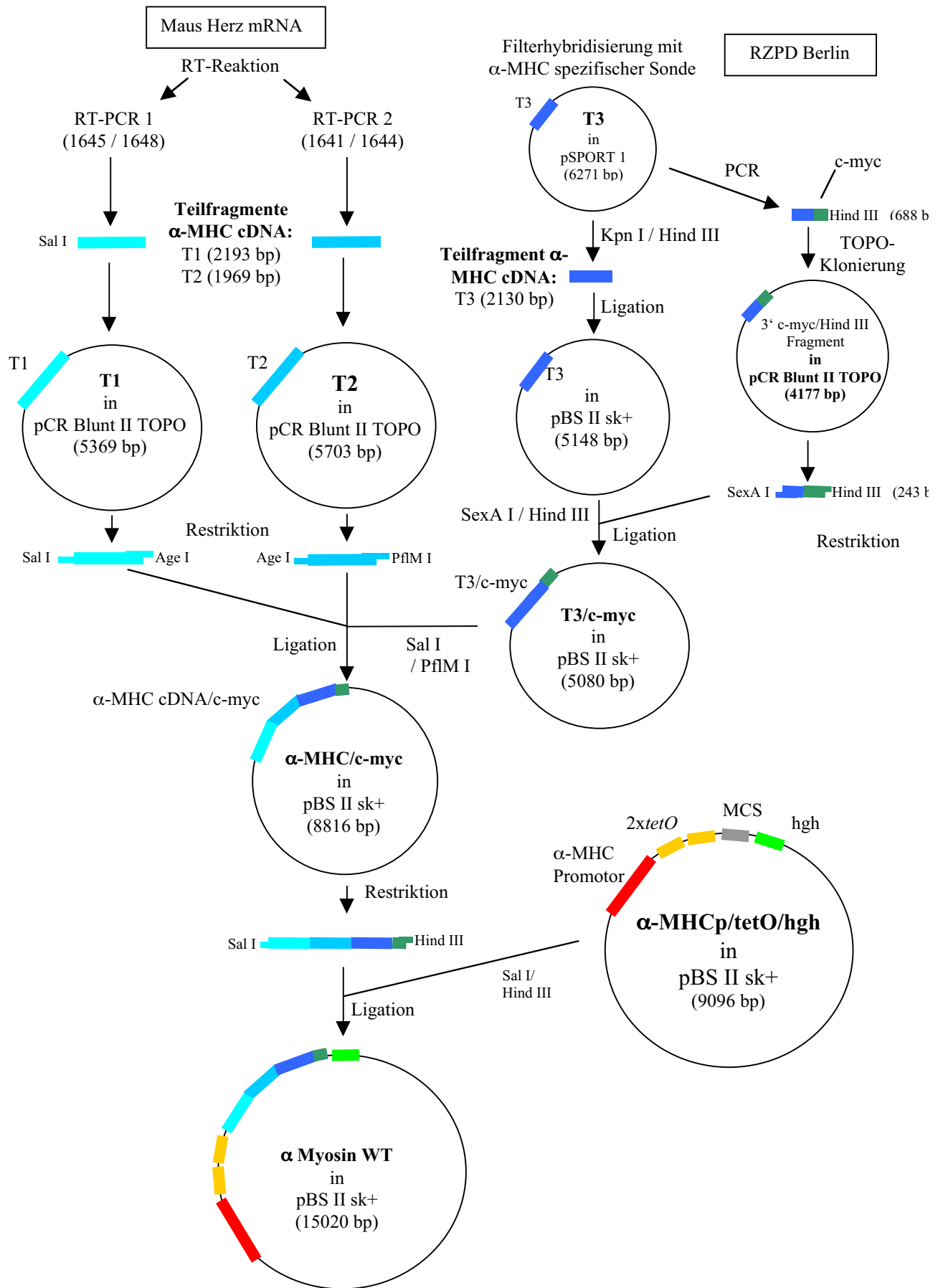


Abbildung 9: Klonierungsstrategie α -Myosin WT. Schematische Darstellung der Klonierung der α -MHC cDNA und Integration des Gens zwischen den α -MHC Promotor gefolgt von zwei *tetO*-Sequenzen und dem Polyadenolierungssignal (*hgh*). (Für die Einzelheiten siehe Text auf S. 49.)

5.1.3 Mutagenese der FHC-relevanten Mutation in die α -MHC cDNA

In die cDNA des murinen α -MHC Gens wurde in Exon 23 (Codon 927/928) eine Dreibasendeletion (GGA) eingeführt. Diese ist analog einer Mutation im β -MHC Gen, die in einer indischen Familie zu einer schweren Form der FHC führt. Resultat der Mutation ist der Verlust (Deletion) eines Glutaminsäurerestes in Position 927 (Δ E927) (Waldmüller et al., 1999; Sakthivel et al., 2001).

Als Template-DNA für die Konstruktion von mutatierten Fragmenten diente das Plasmid T3 mit dem 2130 bp langen 3'-Ende der α -MHC cDNA (Abb. 9). Dazu wurden auf der 5'- und der 3'-Seite des Codons 927 zwei RS identifiziert (*Xho I* und *PflM I*), die in der T3-Sequenz jeweils nur einmal schneiden. Diese RS liegen in nicht allzu großer Entfernung von der zu klonierenden Mutation (*Xho I* ca. 500 bp 5' vom Codon 927, *PflM I* ca. 1,1 kb 3' zu diesem Codon). Mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme wurden *in vitro* mutierte Fragmente später in die WT-DNA eingefügt. Die Mutagenese von Δ E927 ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

Für die Herstellung der Deletionsfragmente wurden vier Primer benutzt, mit deren Hilfe zwei überlappende PCR - Produkte hergestellt wurden (PCR-Bedingungen: siehe 4.7). Zunächst wurde mit Hilfe der Primer 1681 (forward) und 1732 (reverse) von der Position der Mutation aus gesehen ein 5'-ständiges (N-terminales) PCR - Fragment (Fragment 1: 600 bp) amplifiziert. Der Primer 1732 (31-mer) war so gewählt, dass er zu der Region des Codons 927 komplementär war. In der Mitte des Primers fehlten die Nukleotide CCT der Δ E927 des humanen β -Myosin der indischen Familie entsprechend. Durch Amplifikation wurde die Mutation im 3'-ständigen Teil der PCR-Fragmente eingeführt. Nach der gleichen Methode wurde parallel eine zweite PCR-Reaktion mit dem Primer 1731 (forward) und 1641 (reverse) durchgeführt. In dieser PCR-Reaktion war der forward-Primer (1731) komplementär zur Deletionsregion 927/928 in der murinen α -MHC cDNA. Durch Amplifikation wurde Δ E927 in die resultierende PCR-Fragmente fixiert. Dadurch entstand ein von der Mutation aus gesehenes 3'-ständiges PCR-Fragment (Fragment 2: 1273 bp), welches die Deletion am 5'-Ende enthält. Anschließend wurden die beiden Fragmente (Fragment 1 und 2) mit den Deletionen am 3'- und 5'-Ende durch Gelextraktion isoliert und gereinigt.

Im zweiten Schritt wurden die gereinigten PCR-Produkte zusammen mit der PfuTurbo[®] DNA Polymerase in einem 100 μ l-Ansatz (10 μ l Reaktionspuffer, Stratagene (10x); 8 μ l dNTP-Mix (je 25 mM), 1 U PfuTurbo[®] DNA Polymerase, Stratagene; 40 μ l Fragment 1; 40 μ l Fragment 2) gemischt. Nach der Denaturierung (4 min / 94°C) folgte eine 1 min Annealingphase bei 57°C. Die Synthese der DNA-Fragmente erfolgte 10 min bei 72°C. Bei dieser Reaktion entstanden partielle Duplex-DNAs. Die an ihren 3'-Enden partiell doppelsträngigen Moleküle

dienten als Ausgangssubstrate für eine Auffüllreaktion. Dabei entstanden Mutationsfragmente mit einer Länge von 1842 bp. Diese wurden mit endständigen Primern (1681 und 1641) über eine PCR-Reaktion vervielfältigt (50 µl Ansatz: PCR Bedingungen wie in Schritt 1). Nach Gelextraktion wurde das Mutationsfragment mittels TOPO-Klonierung in den *pCR-Blunt TOPO II*-Vektor integriert und in TOP10 kompetente Zellen transformiert. Ein Mutationsfragment mit korrekter Sequenz wurde mit *Xho I* und *PflM I* geschnitten und anstelle der WT-Sequenz in die murine α -MHC cDNA (*α -Myosin WT*; Abb. 9) integriert. Die mutierte cDNA wurde dann über die RS *Sal I* und *Hind III* in das *JR-Plasmid*, in das vorher zwei *tetO*-Sequenzen (siehe Abb. 8) von je 19 bp Länge kloniert wurden, eingefügt. Dieses Konstrukt (α -MHC Δ E927 / c-myc) kann mit *Not I* aus dem Vektor ausgeschnitten und in Mäuse-Oozyten injiziert werden.

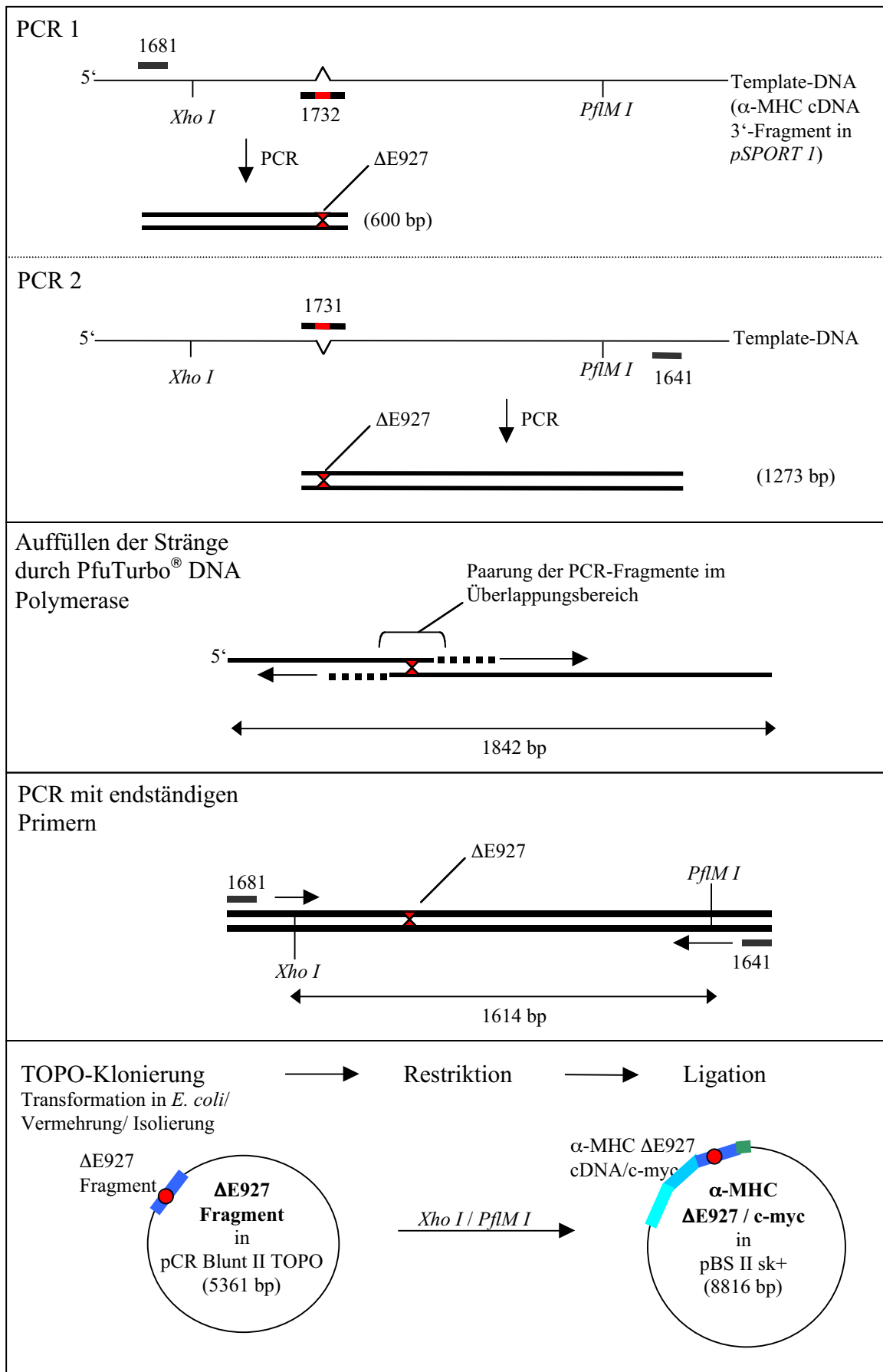


Abbildung 10: Mutagenese der α -Myosin cDNA; Schematische Darstellung der Mutagenese der Dreibasenpaardeletion GGA / Codon 927/928 ($\Delta E927$) in die cDNA des murine α -MHC Gens. (1641, 1681, 1731 und 1732: laborinterne Primerbezeichnung, siehe auch Anhang 9.1)

5.2 Transfektion von kultivierten Zellen mit der Helios Gene Gun

Das getestete System des partikelgestützten Transfers von DNA war ursprünglich an Pflanzenzellen (Klein et al., 1987) und später an Säugerzellen (Zelenin et al., 1989; Yang et al., 1990) durchgeführt worden. Dabei werden Wolfram- oder Goldpartikel mit DNA beschichtet und in Zellen oder Gewebe geschossen. Nach diesem Prinzip wurden in den im Folgenden beschriebenen Experimenten neonatale Kardiozyten aus Rattenherzen, COS1-Zellen und L6 Myoblasten transfiziert.

Ein kritischer Punkt bei der Verwendung des Helios Gene Gun-Systems von BioRad war die Herstellung der Cartridges (= Patronen), die aus 2 cm langen Stücken eines Plastikschauchs (Tefzel™-Schlauch; BioRad) bestanden. Diese wurden in den ersten Versuchen dem Herstellerprotokoll folgend mit einer horizontal rotierenden Beladevorrichtung (ebenfalls von BioRad) an ihrer Innenwand mit DNA-beladenen Goldpartikeln beschichtet. Anschließend wurde eine modifizierte Methode der Beladung geprüft und optimiert.

5.2.1 Cartridge-Präparationen nach der Standardmethode

Zur Prüfung der Eignung des Standardprotokolls für die Herstellung der Cartridges wurden zwei Serien von Cartridges mit radioaktiv markierter Plasmid-DNA ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$) und unterschiedlicher Goldmenge (Präparation1: 0,3 mg / Cartridge und Präparation2: 0,5 mg / Cartridge) hergestellt. Die Versuche sollten zeigen, wie viel DNA an die Goldpartikel bindet und bei welchen Präparationsschritten sich Verluste an DNA ergeben. Es sollte außerdem geprüft werden, ob sich die DNA/Gold-Partikel gleichmäßig in den einzelnen Cartridges verteilen.

Radioaktiv markierte DNA wurde mit einer entsprechenden nicht markierten DNA-Probe in 20-fachem Überschuss verdünnt. Zu Beginn der Cartridgepräparationen wurde die Çerenkov-Strahlung der gesamten eingesetzten DNA gemessen. Sie betrug in Präparation1 $2,6 \times 10^6$ cpm bzw. in Präparation2 $1,35 \times 10^6$ cpm. Während der Präparation wurden zur Bestimmung der Çerenkov-Strahlung Proben entnommen, um die DNA-Verluste der einzelnen Präparationsschritte zu ermitteln (Tab. 1). In beiden Präparationen zeigte sich eine Reduzierung der Çerenkov-Strahlung von durchschnittlich 36 ± 2 % ($n=2$). Die stärkste Abnahme an Radioaktivität entstand nach dem Fällen der DNA/Gold-Partikel in der Spermidinlösung mit CaCl_2 . In Präparation1 nahm die Çerenkov-Strahlung um 9,6 %, in Präparation2 um 14,8 % ab. Während der drei anschließenden Ethanolwaschschritte reduzierte sich die gemessene Strahlung in Präparation1 um insgesamt 1,0 %. In Präparation2 verminderte sich nach dem Waschen mit Ethanol die Çerenkov-Strahlung um 3,7 %. Beim Abnehmen des PVP / Ethanol-Überstands aus dem Schlauch in der Tubing-Prep Station nahm die Çerenkov-Strahlung in Präparation1 um 0,1

% und in Präparation2 um 2 % ab. Die gemessenen Werte zeigten, dass in beiden Präparationen ca. 64 +/-2,2 % (n=2) der eingesetzten DNA an das Gold bindet. Summiert man diesen Wert und die Verluste der einzelnen Präparationsschritte, so verblieb eine Differenz von 27,7 % in Präparation1 bzw. 13,6 % in Präparation2. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf Quenchingeffekte oder nicht untersuchte DNA-Verluste während der Präparation zurückzuführen. Nach der Präparation wurden die Cartridges beider Präparationen einzeln auf ihre radioaktive Strahlung hin untersucht, um die gleichmäßige Verteilung der Gold / DNA-Partikel pro Cartridge zu prüfen. Für Präparation1 wurden durchschnittlich 18007 +/-2701 cpm (n=28) pro Patrone gemessen. In Präparation2 schwankte die Çerenkov-Strahlung um den Mittelwert 11999 +/-1080 cpm (n=28). Die Verteilung der DNA/Gold-Partikel beider Präparationen schwankte in den einzelnen Cartridges um durchschnittlich 12 % um den Mittelwert.

Tabelle 1: Gemessene Çerenkov-Strahlung der DNA-Verluste von zwei Cartridge-Präparationen für die Gene Gun:

	Präparation1 (CPM)	Verlust (in %)	Präparation2 (CPM)	Verlust (in %)
Ausgangs-DNA	2,6 x 10⁶		1,35 x 10⁶	
CaCl ₂ -Fällung	0,25 x 10 ⁶	9,6	0,2 x 10 ⁶	14,8
Ethanolwaschschritt 1	0,0054 x 10 ⁶	0,2	0,011 x 10 ⁶	0,8
Ethanolwaschschritt 2	0,0175 x 10 ⁶	0,6	0,018 x 10 ⁶	1,3
Ethanolwaschschritt 3	0,0046 x 10 ⁶	0,2	0,021 x 10 ⁶	1,6
PVP/Ethanol-Überstand	0,0034 x 10 ⁶	0,1	0,026 x 10 ⁶	2,0
Verluste (gesamt)	--	10,8	--	20,4
Queching / sonstige Verluste	--	27,8	--	13,6
DNA/Gold-Partikel nach der Präparation	1,6 x 10⁶	61,5	0,89 x 10⁶	65,9

Bei der Anwendung des Standardprotokolls zur Herstellung der Cartridges trat immer ein Problem auf. Nachdem die DNA/Gold-Suspension in den horizontal eingeführten Tefzel™-Schlauch in der Tubing-Prep Station eingefüllt wurde, setzten sich die Gold-Partikel am Boden des Schlauchs ab. Wurde nun die horizontale Rotation eingeschaltet, verteilten sie sich nicht gleichmäßig an der Innenwand des Schlauchs, sondern blieben als abgesetzter „Goldstreifen“ am Boden des Tefzel™-Schlauchs haften. Durch Variation der PVP-Konzentration, wie vom Hersteller für diesen Fall empfohlen, konnte das Problem nicht gelöst werden. Obgleich bei 0,03 mg PVP pro ml Ethanol die beste Goldverteilung beobachtet wurde, war das Ergebnis nicht zufriedenstellend. Bei der Verwendung dieser Cartridges zeigte sich, dass sich die DNA/Gold-Partikel durch den Heliumgasstoß nicht vollständig von der Cartridge lösten und auf die Zellen gelangten, was nach der Verwendung als deutlich zu erkennende braune Schicht innerhalb der

Patrone zu sehen war. Ein Teil der DNA/Gold-Partikel ging somit für das Transfektions-experiment verloren.

Bei Vorversuchen wurden Kulturen von COS1-Zellen und L6 Myoblasten mit dem Kontrollplasmid *pSV-β-gal* transfiziert. Dabei zeigte sich eine schlechte Verteilung der DNA/Gold-Partikel auf den beschossenen Zellen. Dies wurde durch Inspektion der Zellen unter einem Lichtmikroskop nach der Transfektion, bei der die Goldpartikel sichtbar waren, deutlich. Während sich ein Großteil der Goldladung im Zentrum der Zellkulturschale befand, nahm die Goldkonzentration pro Fläche zum Rand hin deutlich ab. Als Folge dieser ungleichmäßigen Verteilung wurden die Zellen im Zentrum der Zellkulturschale durch die hohe Goldkonzentration zerstört. Andere Bereiche hingegen, besonders am Rand der Zellkulturschale, wurden von den DNA/Gold-Partikeln nicht erreicht und waren folglich kaum transfiziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit durchschnittlich 64 % der eingesetzten DNA an die Goldpartikel binden. Die Verluste von über 30 % sollten allerdings bei der Planung der Transfektionsexperimente berücksichtigt werden. Ein weiterer kritischer Punkt ist die ungleichmäßige Verteilung der DNA in den einzelnen Cartridges. Eine Standardabweichung von 12 % der gemessenen Werte kann bedeuten, dass sich bei einer geplanten DNA-Konzentration von 1 µg / Cartridge in einer der Patronen nur 0,88 µg und in einer weiteren 1,12 µg DNA befand. Dieser Umstand erschwerte die Interpretierbarkeit von Transfektionsergebnissen erheblich. Die ungleichmäßige Verteilung der DNA/Gold-Partikel innerhalb einer Cartridge, die zu weiteren unkalkulierbaren DNA-Verlusten führte, wirkt sich dabei zusätzlich negativ aus. Die massive Zerstörung nach dem Beschuss von Zellen im Zentrum der Zellkulturschale durch die starke Konzentration von DNA/Gold-Partikeln war ein weiterer Nachteil der Standardmethode. Es stellte sich daher die Frage, ob man durch eine Veränderung des Protokolls der Cartridgepräparation die Schwachpunkte vermindern kann.

5.2.2 Neues Protokoll zur Herstellung von Cartridges für die Gene Gun

Um die Verluste an Gold und DNA bei der Präparation der Cartridges zu vermindern und um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der DNA/Gold-Partikel in den Cartridges zu erhalten, wurde das Standardprotokoll verändert. Das neue Verfahren zur Herstellung der Patronen sollte zusätzlich die Zerstörung von Zellen nach dem Beschuss der Zellkulturen minimieren.

Dem Standardprotokoll folgend wurden DNA und Goldpartikel in einer Spermidinlösung mit CaCl₂ gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wurden die DNA/Gold-Partikel gewaschen und in Ethanol aufgenommen. Aliquots der DNA/Gold - Ethanolsuspension wurden dann einzeln direkt

in die mit Parafilm™ verschlossenen senkrecht stehenden Patronen pipettiert. Das Gold setzte sich dabei als dünne, gleichmäßige Schicht auf dem Parafilm ab. Diese Vorgehensweise gewährleistete eine gute Kontrolle über die Menge an DNA/Gold-Partikeln, da es nach der Füllung der Patronen mit konstantem Volumina der DNA/Gold-Suspension außer dem Abdampfen des Ethanols keinen weiteren mechanischen Prozessierungsschritt gab. Insbesondere wurden die Verluste vermieden, die nach dem Standardprotokoll beim Abziehen des Überstands aus dem horizontal angeordneten Tefzel™-Schlauch entstanden. Ferner wurde nach dem Beschuss beobachtet, dass sich die Cartridges beim Schießen mit Helium vollständig entleerten und sich die DNA/Gold-Partikel während der Transfektion gleichmäßiger auf der Zellkultur verteilten. Diese vielversprechenden Beobachtungen bei der Verwendung des neuen Protokolls zur Herstellung der Cartridges mussten im direkten Vergleich zur herkömmlichen Methode bestätigt werden.

5.2.3 Vergleich der Eigenschaften beider Arten von Cartridges

Um zu zeigen, dass dieses neue Verfahren die Transfektionseffizienz verbessert, wurden Patronen der Standardmethode direkt mit den Parafilm®-Patronen verglichen. Die nach der BioRad-Methode hergestellten Cartridges werden im Folgenden als Standard-Cartridges und die im Alternativverfahren hergestellten als Parafilm-Cartridges bezeichnet.

Zunächst wurden Versuche mit Cartridges durchgeführt, bei denen nur Gold, aber keine DNA eingesetzt wurde. Als Zieloberfläche dienten normale Agarplatten (Ø 10 cm), wie sie sonst für das Anzüchten von Bakterien benutzt werden. Pro Cartridge wurden 0,5 mg Gold eingesetzt. Der Abstand zwischen Cartridge und Agarplatte betrug 4,5 cm. Die Goldpartikel wurden mit einem Heliumdruck von 400 psi (Pounds / Square-Inch) auf die Agarplatten beschleunigt. Die Verteilung der Goldpartikel war nach Freisetzung aus den Cartridges im Lichtmikroskop leicht zu beurteilen. Dabei zeigte sich, dass sich bei Verwendung der Standard-Cartridges ein Großteil des Goldes im Zentrum der Agarplatten befand. Zum Rand der Platte hin nahm die Goldkonzentration stark ab. Mit Parafilm-Cartridges ist die Partikelkonzentration im Zentrum auch hoch, nimmt aber nach außen langsamer und gleichmäßiger ab. Die Ergebnisse dieser Versuche (Abb. 11) deuteten darauf hin, dass mit Parafilm-Cartridges eine bessere Verteilung der Goldpartikel auf transfizierten Zellkulturen erreicht wird. Gleichzeitig ist zu erwarten, dass die Zerstörung von Zellen im Zentrum der Zellkulturschale vermindert wird.

Um die Auswirkungen auf die Beschleunigung der Goldpartikel durch den Heliumdruckstoß von Standard- und Parafilm-Cartridges zu vergleichen, wurden aus einigen beschossenen Agarplatten mit einem Skalpell Querschnitte (Schichtdicke ca. 1 mm)

herausgeschnitten. Die Agarplatten waren unter gleichen Bedingungen (0,5 mg Gold / Cartridge; Abstand 4,5 cm; Druck 400 psi) mit beiden Arten von Cartridges beschossen worden. Die Querschnitte wurden auf Objektträger unter ein Lichtmikroskop gebracht, um die Eindringtiefe der Goldpartikel ausgehend von der Oberfläche der Agarschicht zu messen. Goldpartikel aus den Standard-Cartridges drangen dabei wie in Abb. 12 a zu sehen ist bis zu maximal 0,75 mm in die Agarschicht ein. Bei Parafilm-Cartridges waren Goldpartikel bis zu 5,5 mm in den Agar eingedrungen (Abb. 12 b). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Goldpartikel, die aus Parafilm-Cartridges freigesetzt werden, durch den Heliumdruckstoß stärker beschleunigt werden und somit unter ansonsten gleichen Bedingungen Barrieren (Zellmembran o.ä.) besser überwinden können.

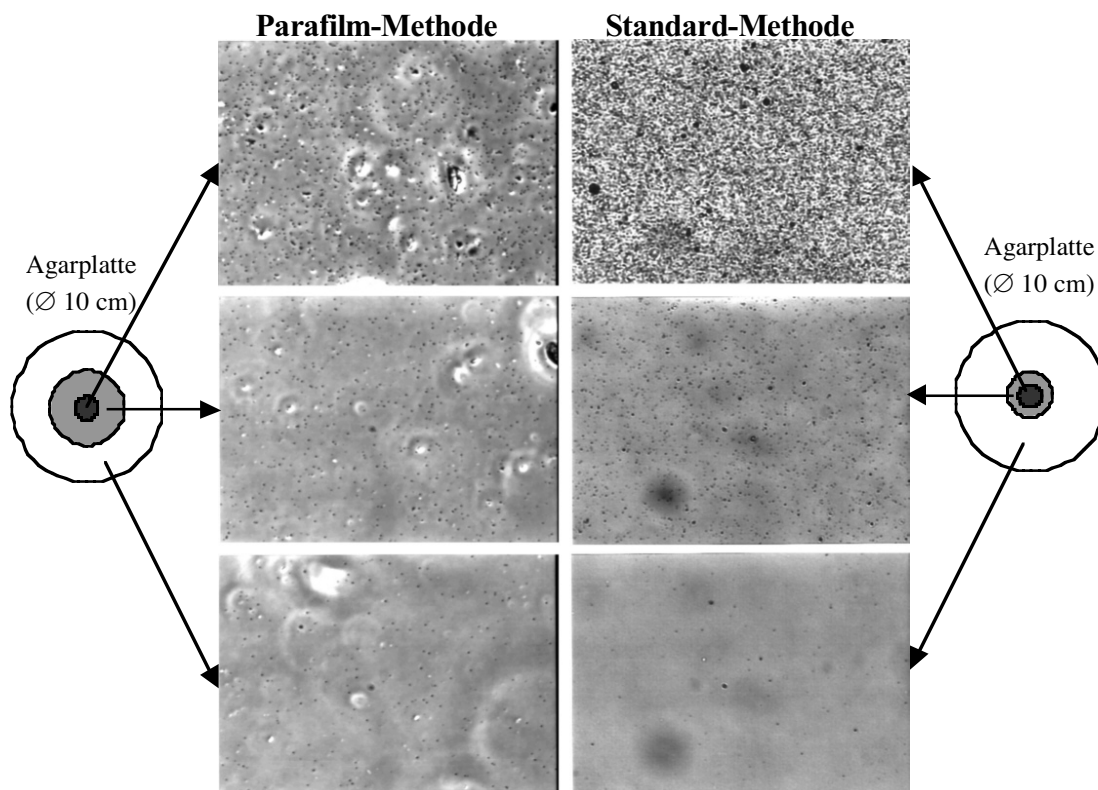
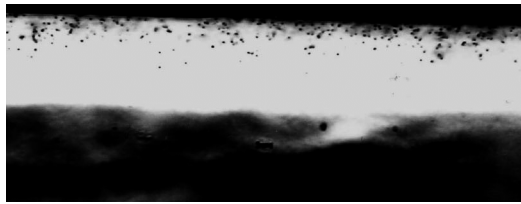


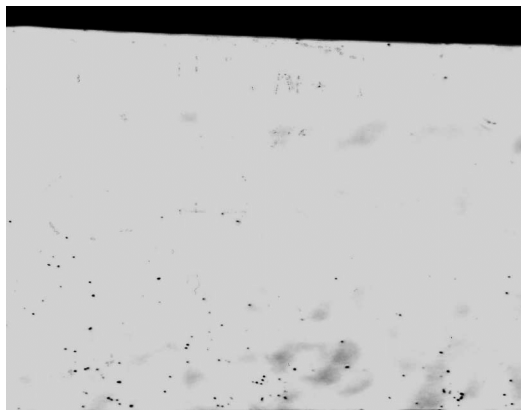
Abbildung 11: Goldverteilung nach Gene Gun-Beschuss; Bilder (Vergrößerung: 200x) der Goldverteilung nach dem Beschuss von Agar-Agar Platten mit der Gene Gun. **Bilder links:** Parafilm-Methode; **Bilder rechts:** Standard-Methode. Bei den Patronen, die mit der Standard-Methode präpariert wurden, war der Großteil des Goldes in einem kleinen Bereich im Zentrum der Agar-Agar Platte. Bei Beschuss der Test-Platte mit Patronen der Parafilm-Methode war das Gold wesentlich gleichmäßiger über die ganze Platte verteilt, mit einer regelmäßigen Abnahme der Goldpartikel vom Zentrum zum Rand der Platte hin.

a. Standard-Methode



← Oberfläche
Agar-Ager Platte
← Gold Partikel

b. Parafilm-Methode



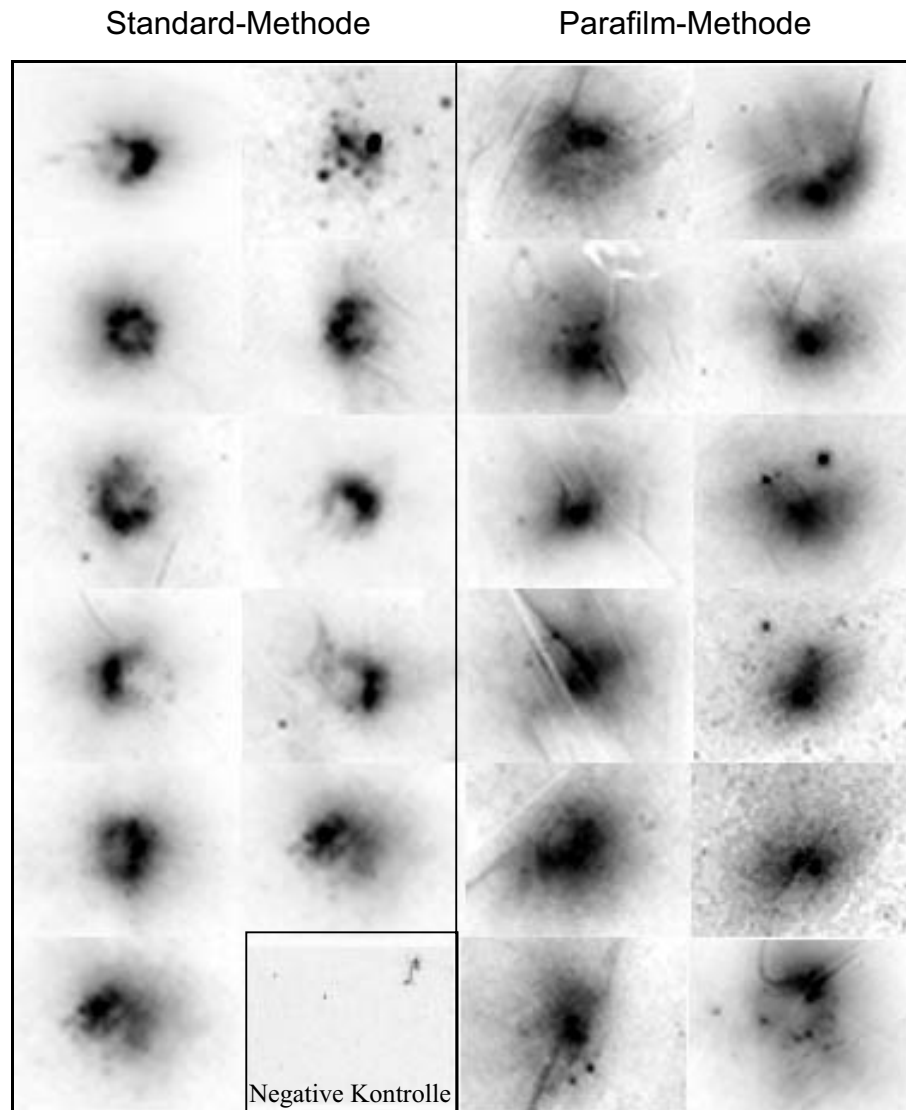
← Oberfläche Agar-
Agar Platte

← Gold Partikel

Abbildung 12 a und b: Eindringtiefe der Goldpartikel nach Gene Gun-Beschuss; Querschnitt in 200x Vergrößerung von Agar-Agar Platten im Lichtmikroskop nach dem Beschuss mit (a) einer herkömmlichen Patrone und (b) einer Patrone, hergestellt mit der Parafilm-Methode. Die hierzu verwendeten Patronen waren lediglich mit Gold bestückt. Die Gold-Partikel (schwarze Punkte) sind direkt unter dem Lichtmikroskop erkennbar. Mit der Parafilm-Methode drangen die Gold-Partikel bei sonst gleichen Bedingungen tiefer in die Agar-Agar-Schicht ein.

In den vorhergehenden Experimenten konnte die Verteilung der Goldpartikel nur ausschnittsweise untersucht werden, da die Vergrößerung des Mikroskops eine Gesamtübersicht über die Agarplatte (\varnothing 10 cm) nicht zuließ. Andererseits konnten die Goldpartikel ($0,6 \mu\text{m}$) mit dem Auge nicht erkannt werden. Deshalb wurden Cartridges sowohl der Standard- als auch der Parafilm-Methode unter Verwendung von CyTM5-markierter Plasmid-DNA hergestellt. Die Markierung wurde dabei über CyTM5-dATP mit einer Nick-Translation in die Plasmide eingeführt. Pro Cartridge wurden $0,5 \text{ mg}$ Gold und $2 \mu\text{g}$ markierte Plasmid-DNA eingesetzt. Die Goldpartikel wurden bei einem Abstand von $4,5 \text{ cm}$ und mit einem Heliumdruck von 400 psi auf die Agarplatten beschleunigt. Die Lichtemission (Anregungsmaximum 649 nm , Emissionsmaximum 670 nm) der angeregten CyTM5-markierten Plasmid-DNA auf den Agarplatten wurde mit dem Storm Imager 860 (Molecular Dynamics) erfasst und digitalisiert (Abb. 13). Auf den Platten, die mit den Standard-Cartridges beschossen wurden, war zu erkennen, dass sich der Hauptanteil der DNA/Gold-Ladung im Zentrum der Agarplatte befand (schwarzer Fleck), während sehr schwache Signale an den Plattenrändern zu sehen waren. Mit den Parafilm-

Cartridges wird zwar auch ein erheblicher Teil der DNA/Gold-Partikel in der Mitte der Platte vorgefunden. An den deutlichen grauen Zonen zum Rand der Platte hin war jedoch zu erkennen, dass die DNA/Gold-Partikel mit den Parafilm-Cartridges gleichmäßiger verteilt wurden als mit den Standard-Cartridges.



stärkere Beschleunigung der DNA/Gold-Partikel zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz führt.

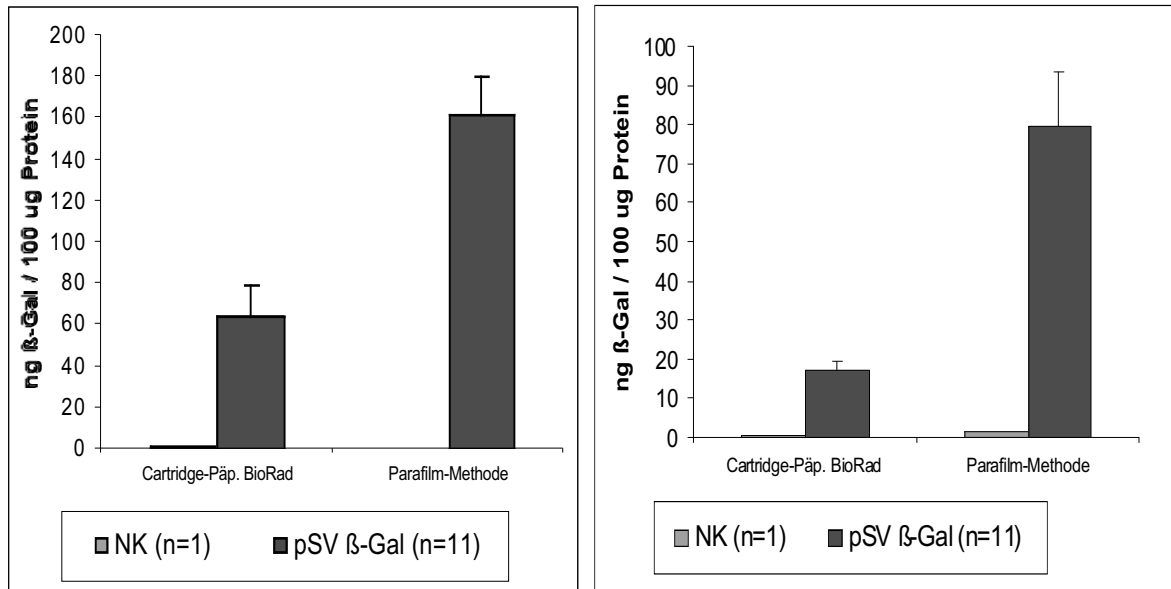
In einer Serie von Experimenten wurden mit Standard- und Parafilm-Cartridges COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten mit dem Kontrollplasmid *pSV-β-gal* transient transfiziert. Die Versuche sollten im direkten Vergleich bestätigen, dass mit den Parafilm-Cartridges im Gegensatz zu Standard-Cartridges eine Steigerung der Transfektionseffizienz beobachtet werden kann.

Dazu wurden je vier 6-Well-Platten (24 Kulturschalen je Ø 3,5 cm) jedes Zelltyps kultiviert. COS1-Zellen und L6 Myoblasten wurden bei Konfluenz transfiziert. Neonatale Kardiozyten wurden mit einer Zellkonzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen / ml Medium ausplattiert und am folgenden Tag transfiziert. Es wurden Cartridges sowohl nach der Standard- wie auch nach der Parafilm-Methode hergestellt. Alle verwendeten Cartridges enthielten 0,5 mg Goldpartikel (Ø 0,6 µm) und waren mit 1 µg des Kontrollplasmids *pSV-β-gal* beschichtet. COS1-Zellen und L6 Myoblasten wurden mit einem Heliumdruck von 400 psi und neonatale Kardiozyten mit 450 psi transfiziert. Der Abstand zwischen Zellen und Gene Gun betrug 4,5 cm. Je 11 Wells von zwei 6-Well-Platten eines Zelltyps wurden mit den Standard-Cartridges, bzw. den Parafilm-Cartridges transfiziert. Als negative Kontrolle diente eine nicht transfizierte Zellkultur. Die Zellernte erfolgte nach 48 h. Die β-Galaktosidase-Konzentration im klaren Zelllysat wurde mit einem Chemolumineszenztest (Galakto-Light Plus Kit, Tropix) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dardurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysat beim Vergleich der erhaltenen β-Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β-Galaktosidase in ng pro 100 µg Gesamtprotein angegeben.

Bei der Gegenüberstellung der Werte (je n=11) beider Carridgetypen ergab sich folgendes Bild: bei den transfizierten COS1-Zellen konnte mit den Parafilm-Cartridges die β-Galaktosidase-Expression um einen Faktor von 2,5 von 64 (+/- 15) ng/mg Protein auf 161 (+/- 19) ng/mg Protein gesteigert werden. Für L6 Myoblasten wurde eine durchschnittliche Steigerung der β-Galaktosidase-Konzentration um das 4,6-fache erreicht (17 +/- 2 ng/mg Protein auf 79 +/- 14 ng/mg Protein) und bei neonatalen Kardiozyten konnte die Menge an β-Galaktosidase annähernd verdoppelt werden (von 9 +/- 0,6 ng/mg Protein β-Galaktosidase auf 17,6 +/- 1,1 ng/mg Protein) (Abb. 14).

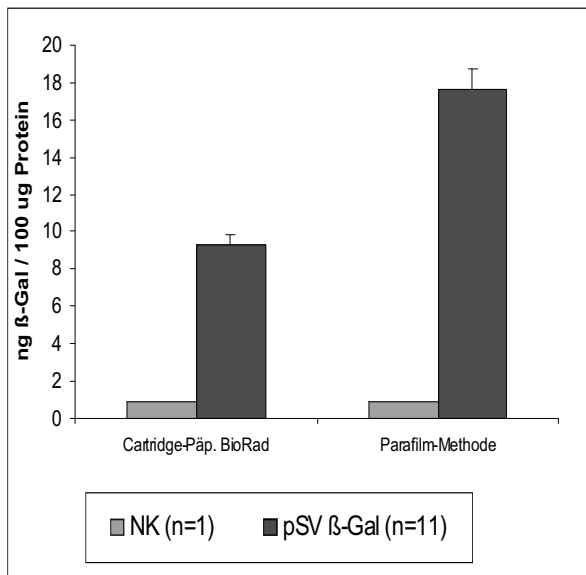
In den Transfektionsversuchen mit dem Kontrollplasmid *pSV-β-gal* wurde mit der neuen Präparationsmethode der Cartridges bei allen untersuchten Zelltypen die Transfektionseffizienz verbessert. Es ist anzunehmen, dass die bessere Verteilung der Goldladung auf die Zellen im

Zusammenspiel mit einer gesteigerten Penetranz der einzelnen Goldpartikel in die Zellen dafür die Ursache sind. Alle folgenden Transfektionsexperimente wurden daher unter Verwendung der Parafilm-Cartridges durchgeführt. Die vorhergehenden Transfektionsversuche wurden unter Bedingungen durchgeführt, die vom Hersteller für die Standard-Cartridges empfohlen werden. Daher mussten zunächst die optimalen Bedingungen (Heliumdruck, Abstand, Goldmenge / Cartridge und DNA-Menge / Cartridge) für Transfektionen der einzelnen Zelltypen mit den neuen Parafilm-Cartridges ermittelt werden.



a. COS1 Zellen

b. L6 Myoblasten



c. neonatale Kardiozyten

Abbildung 14: Vergleich der Transfektionseffizienz von Standard- und Parafilm-Methode; Transfektion von (a) COS1 Zellen, (b) L6 Myoblasten und (c) neonatalen Kardiozyten mit der HGG unter Verwendung des Kontrollplasmids *pSV- β -gal*. Verglichen wurden hier Cartridges, hergestellt mit der Standard- und Parafilm- Methode. Die β -Galaktosidase-Konzentration wurde mit dem Chemolumineszenztest Galakto Light Plus Kit (Tropix) ermittelt. (NK = Negative Kontrolle; nicht transfizierte Zellen)

5.2.4 Physikalische Parameter der Gene Gun für die Transfektion von Zellkulturen

Um die optimalen Bedingungen für die Transfektion von kultivierten Zellen mit der HGG unter Verwendung der neuen Cartridgepräparation zu ermitteln, wurden Transfektionsexperimente mit dem Reporter gen *pSV-β-gal* durchgeführt. Die physikalischen Parameter, welche die Transfektionseffizienz bei Anwendung der HGG beeinflussen, sind:

- | | |
|--------------------------|--|
| 1. Druck | Druck (in psi : Pounds / Square-Inch), unter welchem das Helium vor dem Auslösen des Gasstoßes an der HGG stand, |
| 2. Abstand | Distanz (in cm) zwischen der Mündung des Barrel-Liners (siehe Abb. 3 b) und den Zellen, |
| 3. DNA-Menge / Cartridge | DNA-Menge (in µg / Cartridge), die gebunden an die Goldpartikel in die einzelnen Cartridges pipettiert wurde, |
| 4. Goldmenge / Cartridge | Goldmenge (in mg / Cartridge), mit der die einzelnen Cartridges bestückt wurden. |

Es wurden 6-Well-Platten jedes Zelltyps kultiviert. COS1-Zellen und L6 Myoblasten wurden bei Konfluenz transfiziert. Neonatale Kardiozyten wurden mit einer Zellkonzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen / ml Medium ausplattiert und am folgenden Tag transfiziert. Es wurden zunächst bei gleichbleibendem Abstand (4,5 cm), Goldmenge (0,5 mg / Cartridge) und DNA-Menge (2 µg / Cartridge) Transfektionen mit variierendem Druck durchgeführt. Der auf diesem Weg ermittelte optimale Druck für den jeweiligen Zelltyp wurde dann bei den folgenden Experimenten beibehalten. Daraufhin wurden Experimente mit variierenden Abständen unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Nachdem der optimale Abstand ermittelt worden war, wurden auf diese Weise optimale Gold- und DNA-Mengen für die Transfektion ermittelt. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet. Die β-Galaktosidase-Konzentration im klaren Zelllysate wurde mit einem Chemolumineszenztest (Galakto-Light Plus Kit, Tropix) und einem Photoluminometer (Lumat LB 9501, Berthold) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysate beim Vergleich der erhaltenen β-Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β-Galaktosidase in ng pro 100 µg Gesamtprotein angegeben. Im Durchschnitt wurden bei COS1-Zellen im Mittel 0,85 mg Protein / Well, bei L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten 0,5 mg Protein / Well erhalten.

(1) Helium-Druck (psi)

Zunächst wurde der optimale Heliumdruck ermittelt. Bei COS1-Zellen wurde der zwischen 150-400 psi, bei L6 Myoblasten zwischen 250-550 psi und bei neonatalen Kardiozyten zwischen 250-500 psi variiert. Bei COS1-Zellen wurde die höchste Ausbeute (120 +/-26 ng / 100 µg Protein; n=9) bei einem Druck von 350 psi erreicht. Bei Myoblasten betrug der höchste Wert 68 +/-11 ng / 100 µg Protein (n=7) bei 350 psi und bei neonatalen Kardiozyten 9 +/-0,6 ng β-Galaktosidase / 100 µg Protein (n=15) bei 450 psi (Abb. 15).

Eine Beobachtung im Laufe dieser Transfektionsexperimente war, dass COS1-Zellen durch die Transfektion mit der HGG am stärksten beeinträchtigt wurden. Die im Lichtmikroskop festgestellten Zerstörungen von Zellen im Zentrum der Zellkultur waren im Fall der COS1-Zellen immer großflächiger als bei L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die höchsten Expressionswerte an β-Galaktosidase (120 ng / 100 µg Protein) in COS1-Zellen bei einem niedrigeren Druck (350 psi) erreicht wurden. Bei Transfektionen mit höherem Druck (400 psi) reduzierte sich die Expression von β-Galaktosidase auf 108 +/-15 ng / 100 µg Protein. Bei Drücken von mehr als 400 psi waren die Zerstörungen der Zellen so groß, dass Transfektionsexperimente nicht mehr interpretierbar waren. L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten erwiesen sich gegenüber dem Beschuss mit DNA/Gold-Partikeln als widerstandsfähiger. Sie zeigten im Vergleich zu COS1-Zellen flächenmäßig geringere Zerstörungen von Zellen im Zentrum der Zellkulturschale. An dieser Stelle trafen die DNA/Gold-Partikel mit der höchsten Konzentration auf. Im Gegensatz zu COS1-Zellen wurden höhere Werte an β-Galaktosidase, daher auch bei Transfektionen mit höheren Drücken (bei L6 Myoblasten bis 400 psi und bei neonatalen Kardiozyten 450 psi) erreicht. Im Folgenden wurden COS1-Zellen bei einem Druck von 350 psi, L6 Myoblasten bei 400 psi und neonatale Kardiozyten bei einem Druck von 450 psi transfiziert.

(2) Abstand zwischen Gene Gun und Zellen

Für den ermittelten optimalen Druck der Zelltypen wurde anschließend der Abstand zwischen Gene Gun und Zellen getestet. COS1-Zellen und Myoblasten wurden mit Abständen von 3 bis 5,5 cm transfiziert. Neonatale Kardiozyten wurden bei Abständen von 3,5 bis 5,5 cm transfiziert. Dabei wurden für COS1-Zellen die besten Transfektionsergebnisse (347 +/-43 ng / 100 µg Protein; n=22) bei einem Abstand von 4 cm, bei Myoblasten 4 cm (21 +/-5 ng / 100 µg Protein; n=7) und für neonatale Kardiozyten bei 4,5 cm (9,5 ng +/-0,9/ 100 µg Protein; n=31)

erzielt (Abb. 16). In den folgenden Transfektionsexperimenten wurden für den jeweiligen Zelltyp die ermittelten optimalen Abstände beibehalten.

(3) DNA-Menge / Cartridge

Bei Transfektionsversuchen mit variierenden DNA-Mengen / Cartridge (1-4 μg) ergaben sich für alle transfizierten Zelltypen die höchsten Werte an β -Galaktosidase bei 2 μg DNA / Cartridge. Bei dieser DNA-Menge wurde für COS1-Zellen 233 \pm 25,6 ng (n=27), für L6 Myoblasten 16 \pm 2,1 ng / 100 μg Protein (n=9) und für neonatale Kardiozyten 8,6 \pm 0,9 ng / 100 μg Protein (n=15) erreicht (Abb. 17). Bei L6 Myoblasten wurden auch bei 3 μg und 4 μg DNA / Cartridge ähnlich hohe Werte (13 \pm 1,7 ng, n=5 bzw. 15 \pm 1,4 ng, n=5, / 100 μg Protein) gemessen. Neonatale Kardiozyten exprimierten β -Galaktosidase auch bei 1, 3 und 4 μg auf einem vergleichbar hohen Niveau (7,3 \pm 0,5, n=15; 6,5 \pm 2,2 und 6,8 \pm 1,7 ng / 100 μg Protein, beide n=5) wie bei 2 μg DNA / Cartridge.

Die Ergebnisse in COS1-Zellen zeigen, dass bei 2 μg DNA-Menge / Cartridge eine optimale Transfektionseffizienz erreicht wurde. Bei L6 Myoblasten stieg die β -Galaktosidase-Expression bis 2 μg DNA / Cartridge, reduzierte sich bei einer weiteren Erhöhung der DNA-Menge jedoch nur unwesentlich. Die Ergebnisse in neonatalen Kardiozyten waren nicht eindeutig. Bei allen untersuchten DNA-Konzentrationen wurden ähnliche β -Galaktosidase-Mengen gemessen. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Parametern scheint sich die DNA-Menge bei diesem Zelltyp auf die Transfektionseffizienz nicht als limitierend auszuwirken. Die untersuchten Zelltypen wurden daher im Folgenden mit einer DNA-Menge von 2 μg / Cartridge transfiziert.

(4) Goldmenge / Cartridge

COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten wurden variierend mit 0,15- 0,6 mg Gold / Cartridge transfiziert. Der höchste Wert an β -Galaktosidase (390 \pm 212 ng / 100 μg Protein; n=5) wurde für COS1-Zellen bei einer Goldmenge von 0,6 mg / Cartridge erreicht. Es zeigte sich jedoch, dass auch bei einer Goldmenge von 0,15 mg und 0,35 mg Gold / Cartridge annähernd gute Werte an β -Galaktosidase (322 ng \pm 130 / 100 μg Protein, n=5 und 281 \pm 32 ng / 100 μg Protein, n=24) gemessen wurden. Für L6 Myoblasten wurden bei 0,35 mg (29 \pm 3 ng β -gal / 100 μg Protein; n=16) und 0,6 mg (43 \pm 7,9 ng β -Galaktosidase / 100 μg Protein; n=5) Gold / Cartridge die höchsten β -Galaktosidase-Konzentrationen gemessen. Mit 0,35 mg Gold / Cartridge (8,7 \pm 1,8 ng / 100 μg Protein; n=15) wurden die höchsten β -Galaktosidase-Werte in neonatalen Kardiozyten erreicht. In diesem Zelltyp wurden annähernd gute Werte jedoch mit

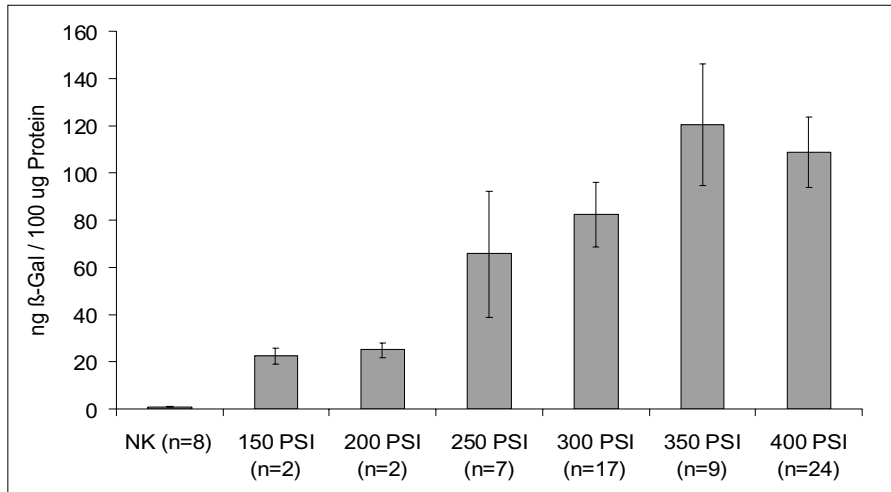
gesteigerter Standardabweichung auch bei einer Goldmenge von 0,5 mg und 0,6 mg Gold / Cartridge ermittelt (5,8 +/-2,1 ng, bzw. 8,1 +/-2 ng / 100 µg Protein; n=5, bzw. 4) (Abb. 18).

Die Ergebnisse der Transfektion von COS1-Zellen mit unterschiedlichen Mengen von Gold / Cartridge sind heterogen. Bei diesem Zelltyp konnte keine Tendenz hin zu einer optimalen Goldmenge festgestellt werden. Bei L6 Myoblasten steigerten sich die Expressionswerte von β -Galaktosidase mit zunehmender Goldmenge, jedoch reduzierten sie sich bei 0,5 mg Gold / Cartridge um mehr als 30 %. Bei 0,6 mg Gold / Cartridge stieg der gemessene Wert wieder stark an. Neonatale Kardiozyten ließen sich mit einer Goldmenge von 0,35 mg / Cartridge optimal transfizieren. Eine weitere Steigerung der Goldmenge brachte keine wesentliche Verbesserung der gemessenen β -Galaktosidase-Konzentration. Die Erhöhung der Goldmenge / Cartridge hatte zwar bei L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten einen positiven Effekt auf die Transfektionsrate, eine zu starke Steigerung der Goldladung bedeutete jedoch eine erhöhte, unkontrollierbare Zerstörung der beschossenen Zellen. Deshalb wurde eine möglichst kleine Goldmenge bei gleichzeitig guter Transfektionseffizienz gewählt. Im Folgenden wurden daher alle Zelltypen mit einer Goldmenge von 0,35 mg / Cartridge transfiziert.

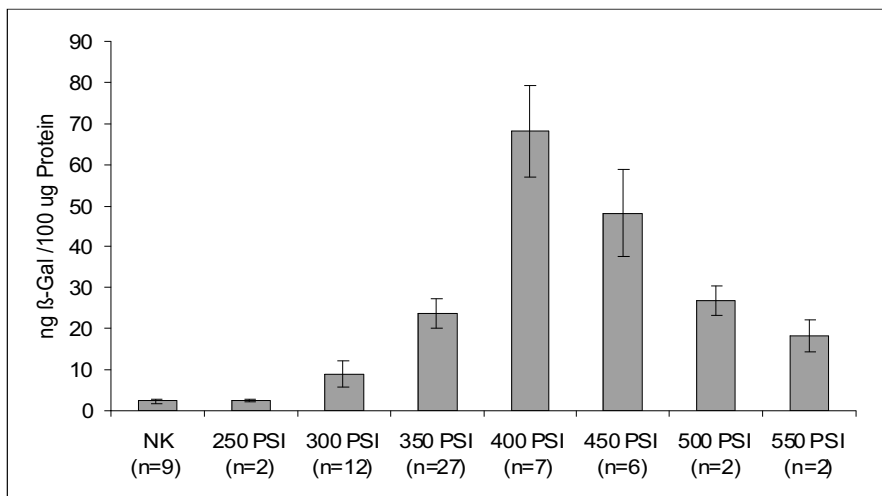
Eine Zusammenfassung der aus diesen Untersuchungen hervorgehenden optimalen Parameter der Transfektion mit der HGG ist in Tab. 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der optimalen Bedingungen für die Transfektion der unterschiedlichen Zelltypen mit der HGG.

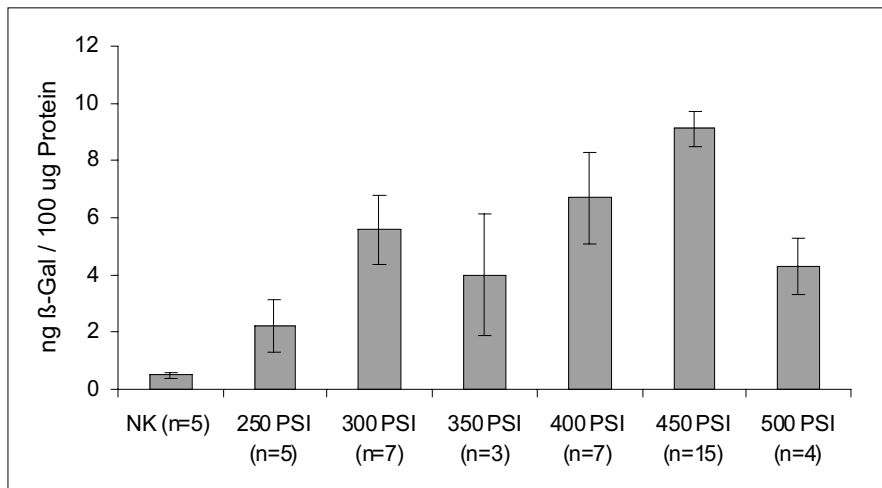
	<i>COS1-Zellen</i>	<i>Myoblasten (L6)</i>	<i>neo. Kardiozyten</i>
<i>Druck (PSI)</i>	350	400	450
<i>Abstand (cm)</i>	4	4	4,5
<i>Gold/Cartridge (mg)</i>	0,35	0,35	0,35
<i>DNA/Cartridge (ug)</i>	2	2	2



a. COS 1-Zellen

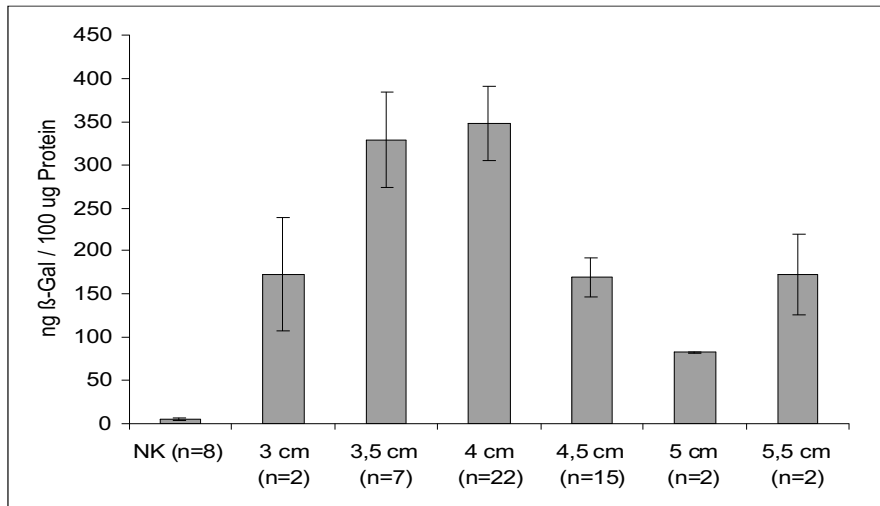


b. L6 Myoblasten

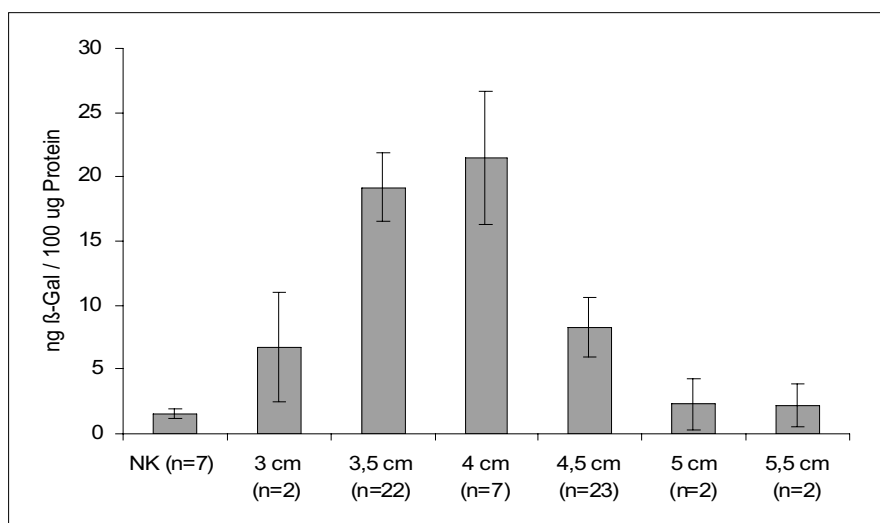


c. neonatale Kardiozyten

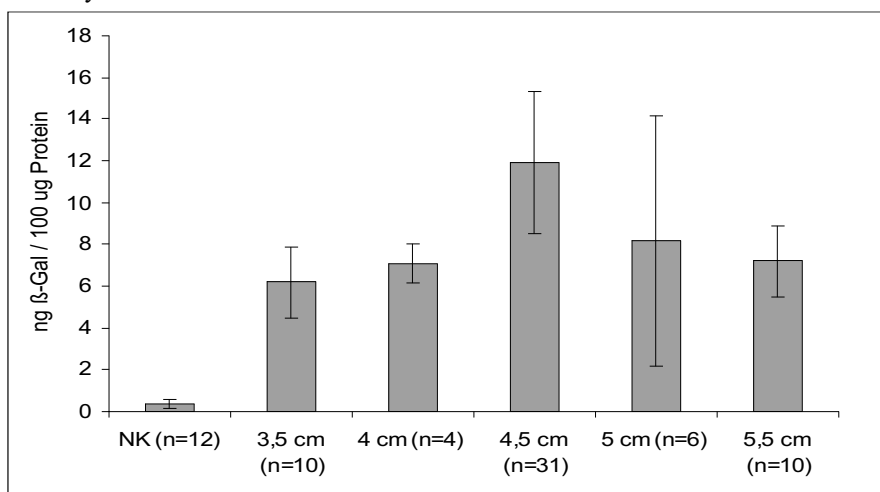
Abbildung 15: Optimierung des Heliumdrucks. (a) COS1-Zellen, (b) Myoblasten (L6) und (c) neonatale Kardiozyten transfiziert mit der Gene Gun mit unterschiedlichen Drücken. Verwendet wurde das Kontrollplasmid *pSV-β-gal*. β-Galaktosidase wurde mittels Chemolumineszenz ermittelt. Die anderen Parameter (Abstand, DNA- und Goldmenge) wurden konstant gehalten. NK = Negative Kontrolle; Zellkulturen, die nicht transfiziert wurden. Anzahl ausgewerteter Zellkulturen = n.



a. COS1-Zellen

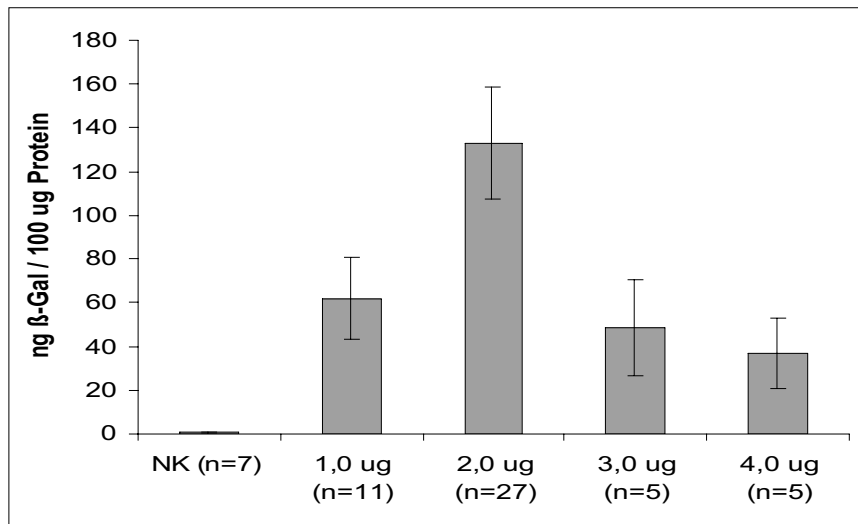


b. L6 Myoblasten

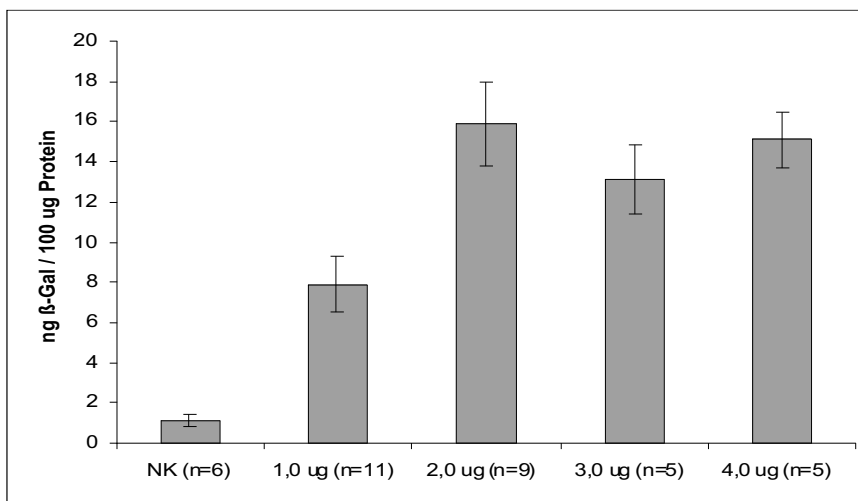


c. neonatale Kardiozyten

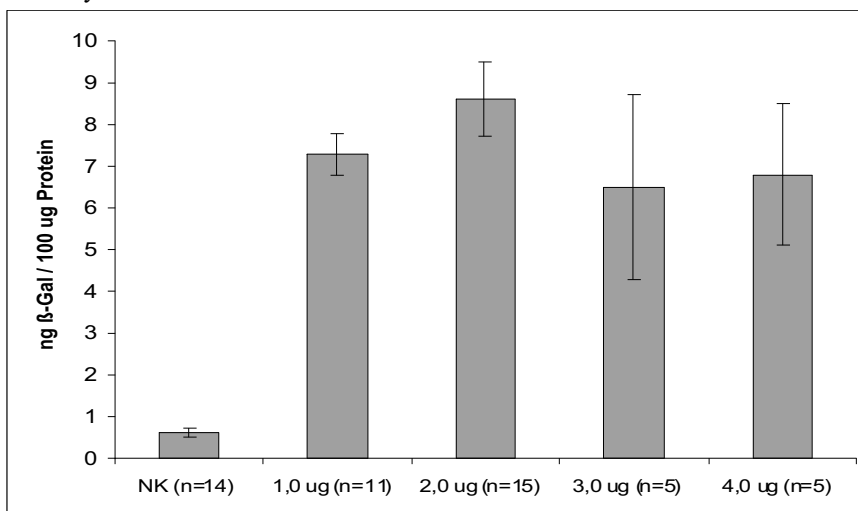
Abbildung 16: Optimierung des Abstandes. Transfektionen mit unterschiedlichen Abständen (cm) zwischen Gene Gun (Mündung Barralliner) und Zellen während der Transfektion von kultivierten (a) COS1-Zellen, (b) L6 Myoblasten und (c) neonatalen Kardiozyten mit der Gene Gun bei ansonsten gleichem Druck, Gold- und DNA-Menge. NK = Negative Kontrolle; Zellkulturen, die nicht transfiziert wurden. Anzahl ausgewerteter Zellkulturen = n.



a. COS1-Zellen

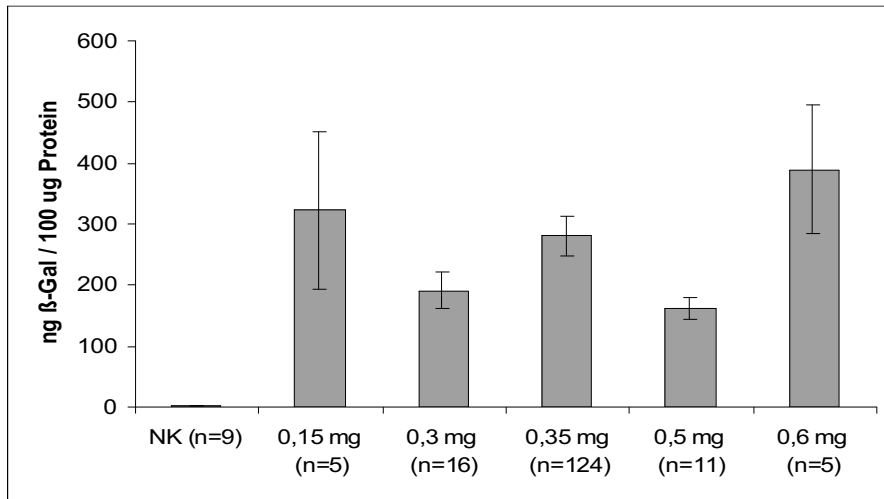


b. L6 Myoblasten

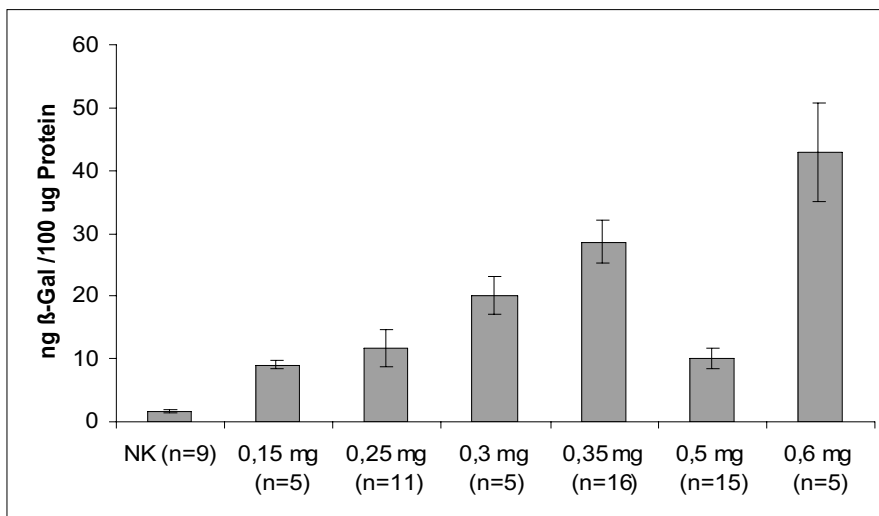


c. neonatale Kardiozyten

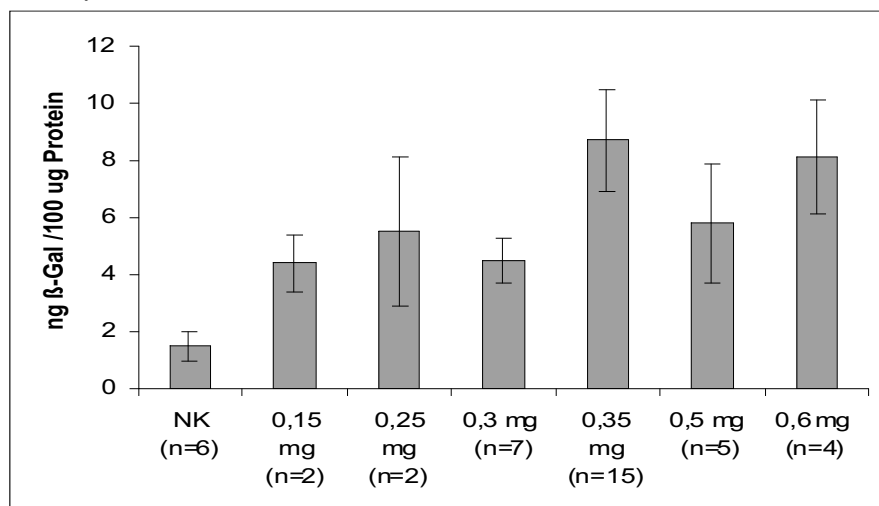
Abbildung 17: Optimierung der DNA-Menge. (a) COS1-Zellen, (b) Myoblasten (L6) und (c) neonatale Kardiozyten transfiziert mit der Gene Gun mit unterschiedlichen DNA-Mengen. Verwendet wurde das Kontrollplasmid *pSV- β -gal*. β -Galaktosidase wurde mittels Chemolumineszenz ermittelt. Die anderen Parameter (Abstand, Druck und Goldmenge) wurden konstant gehalten. NK = Negative Kontrolle; Zellkulturen, die nicht transfiziert wurden. Anzahl ausgewerteter Zellkulturen = n.



a. COS1-Zellen



b. L6 Myoblasten



c. neonatale Kardiozyten

Abbildung 18: Optimierung der Goldmenge. (a) COS1-Zellen, (b) Myoblasten (L6) und (c) neonatale Kardiozyten transfiziert mit der Gene Gun bei unterschiedlichen Mengen von Gold. Verwendet wurde das Kontrollplasmid *pSV- β -gal*. β -Galaktosidase wurde mittels Chemolumineszenz ermittelt. Die anderen Parameter (Abstand, DNA-Menge und Druck) wurden konstant gehalten. NK = Negative Kontrolle; Zellkulturen, die nicht transfiziert wurden. Anzahl ausgewerteter Zellkulturen = n.

Die β -Galaktosidase-Expression pro Zellkultur, die mit dem Chemolumineszenztest ermittelt wurde, gibt keinen Aufschluss über die Transfektionsrate, d.h. die Zahl der Zellen pro Zellkultur, die erfolgreich transfiziert wurden gegenüber nicht transfizierten Zellen. Die ermittelten Werte repräsentieren anteilig die Menge an β -Galaktosidase in Relation zu dem Gesamtproteingehalt im klaren Lysat der Zellkultur. In den folgenden Experimenten wurde die Anzahl der Zellen ermittelt, die durch die Transfektion mit der HGG erfolgreich transfiziert wurden und β -Galaktosidase exprimieren.

Dazu wurden COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten auf je 3 gerasterte Zellkulturschalen (\varnothing 3,4 cm; mit einem Gitter aus 160 Rasterfelder von 2 mm Kantenlänge) ausplattiert. Die Zellkulturen wurden unter den jeweils ermittelten optimalen Bedingungen (s.o.) mit dem Reporterplasmid *pSV- β -gal* transfiziert. Dann wurden sie mit einer Glutaraldehydlösung fixiert und mit X-gal-Lösung inkubiert. Dabei färbten sich die Zellen, die das Reportergen exprimieren, blau. Die gefärbten Zellen / Rasterfeld wurden ausgezählt und auf die gesamte Zellzahl / Rasterfeld bezogen. Die Gesamtzellzahl / Rasterfeld wurde ermittelt, indem repräsentativ 29 Rasterfelder einer transfizierten Zellkultur jedes Zelltyps ausgezählt wurden (COS1-Zellen und L6 Myoblasten ca. 1000 / Rasterfeld; neonatale Kardiozyten ca. 1500 / Rasterfeld). Dem errechneten Mittelwert wurde die Anzahl blau gefärbter Zellen jedes Rasterfeldes gegenüber gestellt. Dabei ergab sich für COS1-Zellen und L6 Myoblasten eine durchschnittliche Transfektionsrate / Zellkultur von 18,5 +/-6,3 % (n=3); bzw. 14,6 +/-4,4 % (n=3). Für neonatale Kardiozyten wurde eine durchschnittliche Transfektionsrate von 0,58 +/-0,1 % (n=3) ermittelt. Die Transfektionseffizienzen (in %) der einzelnen Zelltypen sind in Tab. 3 (schematische Abbildungen der ausgezählten Rasterplatten befinden sich im Anhang 9.2) Werten gegenüber gestellt, die die β -Galaktosidase-Konzentration nach Transfektion mit dem Kontrollplasmid *pSV- β -gal* darstellen und mit einem Chemolumineszenztest ermittelt wurden.

Dabei wurden kultivierte Zellen jedes Zelltyps auf 6-Well-Platten angezüchtet und unter optimalen Bedingungen (Tab. 2) unter Verwendung der Gene Gun mit dem Kontrollplasmid *pSV- β -gal* transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und die β -Galaktosidase-Konzentration im klaren Lysat wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) und dem Photoluminometer Lumat LB 9501 (Berthold) ermittelt. Anhand eines Bradford-Assays wurde die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysate beim Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β -Galaktosidase in ng pro 100 μ g Gesamtprotein angegeben.

Dabei wurde bei COS1-Zellen eine durchschnittliche β -Galaktosidase-Konzentration von 246 +/-54 ng / 100 μ g Protein (n=48), bei L6 Myoblasten 38 +/- 11 ng / 100 μ g Protein (n=48) und bei neonatalen Kardiozyten 7,4 +/-4 ng / 100 μ g Protein (n=72) ermittelt.

Auf den X-gal gefärbten Rasterplatten zeigte sich, dass die Expression des Reportergens sehr heterogen war. Im Zentrum des Auftreffens der DNA/Gold-Partikel und in größerer Entfernung (ca. 1 cm) davon war die Anzahl blauer Zellen deutlich geringer (bei COS1-Zellen z.B.: 0-100 Zellen / Rasterfeld) als in einem ringförmigen Bereich zwischen diesen beiden Zonen (bei COS1-Zellen z.B.: 100-600 Zellen / Rasterfeld). Im Zentrum der auftreffenden Goldladung war die Konzentration der Goldpartikel so hoch, dass ein Großteil der Zellen zerstört wurde (< 50 intakte Zellen / Rasterfeld). In Rasterfeldern am Rand der Zellkulturschale hingegen wurden bis zu 3200 Zellen gezählt, von denen aber kaum Zellen β -Galaktosidase exprimiert hatten. Die Ursache dafür war die geringe Konzentration von DNA/Gold-Partikeln pro Fläche, die in diesem Bereich beobachtet wurde. Eizema et al. (1999; 2000) argumentieren in ihren Publikationen, dass als Grundlage zur Berechnung der Transfektionseffizienz Bereiche der Zellkulturschale ausgeschlossen werden können, die durch auftreffende Goldpartikel zu stark zerstört oder wie in den Randbereichen der Zellkulturschale gar nicht oder nur unzureichend von DNA/Gold-Partikeln erreicht wurden. Würde man nur den Bereich zwischen den beiden schwach transfizierten Zonen der Zellkultur in die Berechnungen der Transfektionsrate einfließen lassen, so könnte man die oben ermittelten Werte deutlich erhöhen. COS1-Zellen und L6 Myoblasten zeigten in einigen Rasterfeldern Transfektionsraten bis zu 60 %. In einigen Bereichen der Zellkultur neonataler Kardiozyten wurden Transfektionsraten von über 10 % erzielt. Novakovic et al. (1999) hingegen geben in ihren Arbeiten die Transfektionseffizienz als Bandbreite der erreichten Transfektionsraten in verschiedenen Bereichen der Zellkulturschale an.

Tabelle 3: Durchschnittliche Transfektionseffizienz von COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten mit der HGG. Die Zellen wurden mit dem Kontrollplasmid *pSV- β -gal* transfiziert.

	<i>X-gal Färbung</i> % Blaue Zellen / Zellkultur	<i>n</i>	<i>Chemolumineszenztest</i> ng β -gal / mg gesamt Protein	<i>n</i>
<i>COS1-Zellen</i>	18,5% (+/- 6,3)	3	246 ng (+/- 54)	48
<i>L6 Myoblasten</i>	14,6% (+/- 4,4)	3	38 ng (+/- 11)	48
<i>neo. Kardiozyten</i>	0,58 % (+/-0,1)	3	7,4 ng (+/- 4)	72

Beim Vergleich der Transfektionseffizienz mit den unterschiedlichen Auswertungsmethoden (siehe Tab. 3) zeigte sich, dass mit X-gal-Färbung bei COS1-Zellen und L6 Myoblasten ähnliche Transfektionsraten erreicht wurden (18,5 % und 14,5 %). Mit dem Chemolumineszenztest lag die β -Galaktosidase-Expression jedoch bei COS1-Zellen (247 ng / 100 μ g Protein) um das 6-fache höher als bei L6-Myoblasten (38 ng / 100 μ g Protein). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass COS1-Zellen im Gegensatz zu L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten mit einem Replikationsursprung-defizienten *SV40* Virus transformiert wurden, der in die chromosomale DNA der Zellen integriert ist. COS1-Zellen exprimieren daher das *Wildtyp-SV40-T-Antigen*, welches ursprünglich für die virale Replikation von *SV40* verantwortlich ist. Plasmide wie *pSV- β -gal*, die einen *SV40 origin of replication* besitzen, werden daher in COS1-Zellen repliziert und führen so in den transfizierten Zellen zu einer stark gesteigerten Expression des Reportergens. Bei der Auswertung von X-gal-Versuchen wurde hingegen nicht zwischen schwach und stark blau gefärbten Zellen (also schwach und stark Reportergen-exprimierenden Zellen) unterschieden. Beim Vergleich von L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten fällt auf, dass beim Auszählen X-gal-gefärbter Zellen 25x mehr L6 Myoblasten β -Galaktosidase-Expression zeigten, während mit der Chemolumineszenz-Messung nur das 5-fache der Reporterprotein-Konzentration ermittelt wurde. Über die Ursache kann nur spekuliert werden. Es könnte sein, dass in X-gal-gefärbten Kulturen neonataler Kardiozyten viele Zellen so schwach blau gefärbt waren, dass sie unter dem Lichtmikroskop nicht erkannt und daher nicht mitgezählt wurden. Eine weitere Erklärung wäre, dass in neonatalen Kardiozyten der hCMV-Promotor aktiver ist als in L6 Myoblasten und so zu höheren Transkriptionsraten des Reportergens pro Zelle führt.

5.3 Gesteuerte Genexpression mit dem *tetR/tetO*-System

Ein über diese Doktorarbeit hinausgehendes Ziel ist die Etablierung eines Systems der *tet*-kontrollierten Genexpression nach Yao et al. (1998, 1999) in den Herzen transgener Mäuse. Dieses System, bestehend aus regulatorischen Elementen des *tet*-Resistenzoperons von *E. coli* aus dem Transposon Tn10, kam in transgenen Tieren noch nie zur Anwendung. Wenn das Funktionsprinzip dieses Systems unter Verwendung eines Reportergens (β -Galaktosidase) in Mäusen demonstriert werden kann, soll ein *in vitro* hergestelltes, FHC verursachendes α -MHC Gen in transgenen Mäusen kontrolliert exprimiert werden. Dies könnte es ermöglichen, pathogene Mechanismen der Krankheit vor dem Hintergrund zeitlich kontrollierter Transgenexpression zu untersuchen.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Doktorarbeit war es, das Funktionsprinzip der *tet*-kontrollierten Genexpression vor dem Übertragen auf transgene Mäuse in kultivierten Zellen, insbesondere in neonatalen Kardiozyten, zu testen. Um die erwünschte physiologische Antwort im transgenen Wirtsorganismus zu erreichen, muss das Transgen nach Induktion mit *tet* in hohen Konzentrationen exprimiert werden. In kultivierten Zellen wurde daher das Niveau der induzierten Reportergenexpression untersucht. Vor der Induktion hingegen sollte die Hintergrundexpression des untersuchten Gens so gering sein, dass keine physiologischen Veränderungen im transgenen Tier zu erwarten sind. Dies wird unter anderem dadurch erreicht, dass der *tetR*, der die Transkription des Transgens unterdrückt, in ausreichender Menge vorhanden ist. Unterschiedliche Expressionsniveaus des *tetR* im Verhältnis zu dem zu untersuchenden Gen wurden dadurch simuliert, dass Zellkulturen mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen des *pcDNA/TR*-Plasmids und des *pcDNA/TO/lacZ*-Plasmids transfiziert wurden. Weitere Experimente sollten die Abhängigkeit der Induktion von der *tet*-Menge klären.

Das auf den nativen Komponenten des Tetrazyklinresistenz-Operons basierende, kommerziell erhältliche T-REx™ System der kontrollierten Genexpression ist ausschließlich für den Einsatz in unterschiedlichen kultivierten Zellen konzipiert. Die Transkription des *tetR* und des kontrollierten Gens wird dabei von dem ubiquitären hCMV-Promotor angetrieben. Dieser soll unabhängig vom untersuchten Zelltyp hohe Expressionsraten der in die Zellen transfizierten Gene gewährleisten. Im Gegensatz dazu sollte die Expression der Transgene in Mäusen auf das zu untersuchende Gewebe oder Organ beschränkt sein. Damit sollen negative Auswirkungen der Transgene oder deren Produkte an anderen Stellen im Organismus der Maus vermieden werden. Aus diesem Grund wurden die Elemente des untersuchten *tetR/tetO*-Systems mit dem herzspezifischen α -MHC Promotor versehen. Es sollte daher in kultivierten, neonatalen

Kardiozyten gezeigt werden, dass unter ansonsten gleichen Bedingungen die Verwendung des α -MHC Promotors die Funktion der *tet*-kontrollierten Genexpression nicht beeinträchtigt.

Parallel zu den Experimenten in kultivierten Zellen wurde damit begonnen, transgene Mauslinien mit den Konstrukten (siehe 5.1.1) des *tetR/tetO*-Systems zu etablieren. In einem sehr ähnlichen System der *tet*-kontrollierten Genexpression wurde der *tetR* mit einem viralen Transkriptionsfaktor zu einem Transaktivator (tTA) verschmolzen, welcher einen viralen hCMV Promoter aktiviert und die Transkription des Transgens startet (Weinmann et al., 1994). Es wurde jedoch über potentiell toxische Effekte des tTA auf das transgene Tier besonders während der Embryogenese berichtet (Baron et al., 1997). Es muss daher geprüft werden, ob dies auch für die Komponenten des nativen *tetR/tetO*-Systems der Fall ist. Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob unter Verwendung des α -MHC Promotors transgene Expression auf das Herz der Maus beschränkt ist, wurde in solchen Mauslinien, die das Reporter-gen β -Galaktosidase exprimieren, das Expressionsmuster untersucht.

5.3.1 Induzierte Reporter-genexpression in COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatalen Kardiozyten

Zunächst wurde das Funktionsprinzip der *tet*-gesteuerten Genexpression unter Verwendung des T-REx™ Kits (Invitrogen) in COS1-Zellen untersucht. Das binäre System umfasst zwei Plasmide. Das Plasmid *pcDNA6/TR* exprimiert, angetrieben durch den ubiquitären hCMV-Promotor, den *tetR*. Das zweite Plasmid exprimiert, ebenfalls angetrieben durch den hCMV-Promotor, das Reporter-gen β -Galaktosidase. Es enthält zusätzlich zwischen Promotor und *lacZ*-Gen zwei *tetO*-Sequenzen. In Abwesenheit von *tet* binden zwei *tetR*-Proteine an den Operator und verhindern die Expression des Reporter-gens. Durch Zugabe von *tet* (oder dessen Derivat DOX) wird der *tetR* inaktiviert und das *lacZ*-Gen transkribiert.

In Pilotversuchen wurden COS1-Zellen mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI) transient mit den Plasmiden *pcDNA6/TR* und *pcDNA4/TO/lacZ* kotransfiziert. Es sollte gezeigt werden, dass die kotransfizierten COS1-Zellen nach Zugabe von *tet* β -Galaktosidase exprimieren. Ohne Zugabe von *tet* sollte die Expression des Reporter-gens unterdrückt werden.

Im 6-Well-Platten (\emptyset je 3,4 cm) kultivierte COS1-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50-70 % mit beiden Plasmiden im Verhältnis 1:1 (w/w) kotransfiziert. Bezogen auf die Zahl der transfizierten Plasmide entspricht das einem molaren Verhältnis *pcDNA6/TR* (6662 bp) : *pcDNA4/TO/lacZ* (8224 bp) von 1,2 : 1. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden in jedem Experiment einige COS1-Zellkulturen mit dem Kontrollplasmid *pSV- β -gal* transfiziert. Des Weiteren wurden zur Kontrolle einige Zellkulturen nur mit *pcDNA6/TR* oder nur mit

pcDNA4/TO/lacZ transfiziert. In jede Transfektion wurden 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Für kotransfizierte Zellkulturen wurden jeweils 1 µg *pcDNA6/TR* und *pcDNA/TO/lacZ* eingesetzt. Nach der Transfektion wurden einige der kotransfizierten Zellkulturen mit *tet* (1 µg / ml) induziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutaraldehydlösung (2,5 %) fixiert und mit X-gal-Lösung (0,2 %) inkubiert. Dabei färbten sich Zellen, die β-Galaktosidase exprimiert hatten, blau. Die Zellen wurden mit bloßem Auge auf einem Lichtkasten und unter einem Lichtmikroskop untersucht.

Visuelle Inspektion der Zellen zeigte, dass kotransfizierte Zellkulturen, die mit *tet* behandelt wurden, stark blau gefärbt waren, während ohne *tet* eine schwächere Blaufärbung der Zellkultur zu erkennen war (Abb. 19). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass in COS1-Zellen die Steuerung der Reportergenexpression durch die nativen Elemente des *tetR/tetO*-Systems möglich war. Es wurde jedoch eine starke Hintergrundexpression in nicht induzierten Zellkulturen beobachtet. Da diese Versuche keine quantitativen Aussagen der Reportergenexpression zulassen, wurden im Folgenden ähnliche Experimente durchgeführt, bei denen β-Galaktosidase mit einem Chemolumineszenztest quantitativ bestimmt wurde. Zusätzlich wurden einige Transfektionen von Zellkulturen auf Rasterplatten (160 Rasterfelder, Kantenlänge 1 mm) durchgeführt, mit deren Hilfe die blau gefärbten Zellen gezählt werden konnten. Da es sich bei COS1-Zellen um einen sehr unspezifischen Zelltyp handelte, wurden die Transfektionsexperimente auf L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten ausgeweitet. Es sollte getestet werden, ob *tet*-gesteuerte Genexpression in beliebigen Zelltypen funktional ist.

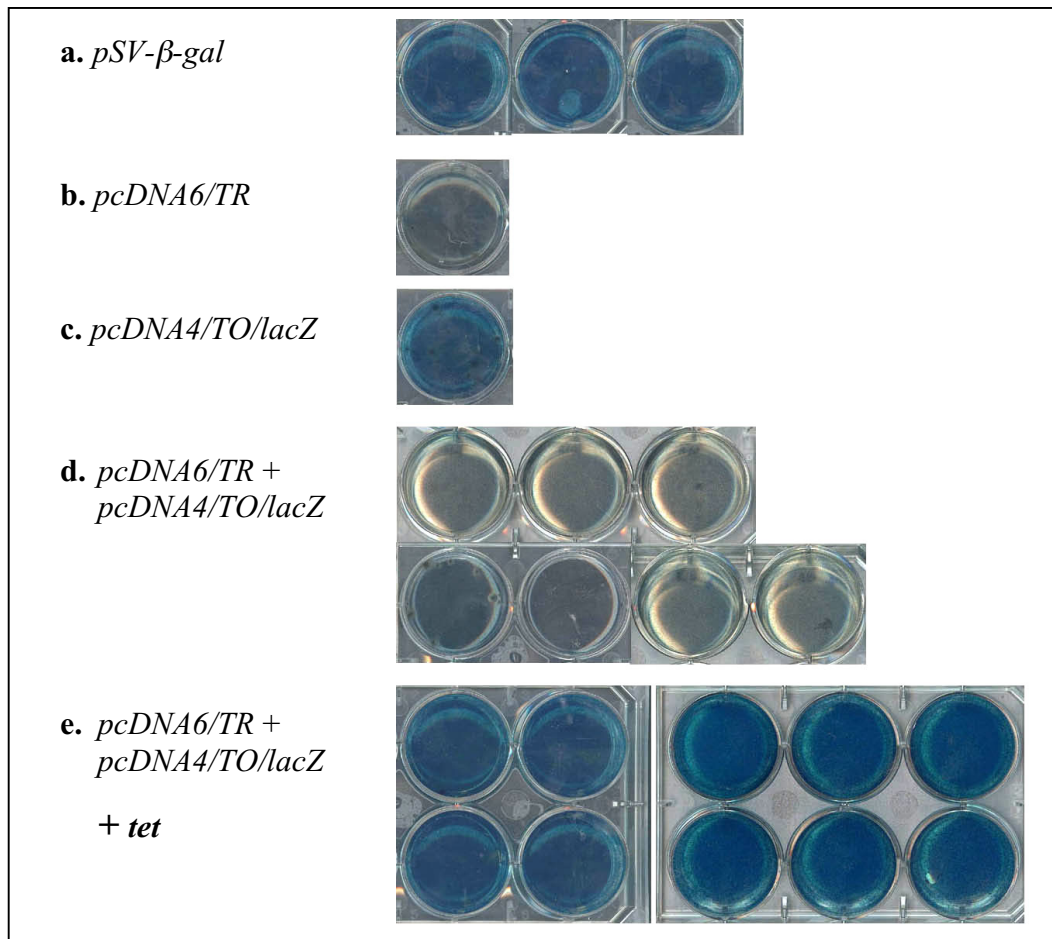


Abbildung 19: Konditionale Genexpression mit dem T-Rex Kit in COS1-Zellen - ein Vorversuch. Transfektion von COS1-Zellen mit tetR und tetO/lacZ DNA. Transfiziert wurde mit PEI. **(a)** Die Wells wurden mit dem Kontrollplasmid *pSV-β-gal* transfiziert und dienen als Transfektionskontrolle. Die Zellen in **b** wurden mit *pcDNA6/TR* (tetR) und in **c** mit *pcDNA/TO/lacZ* (tetO/lacZ) transfiziert. Die Zellkulturen in **d** und **e** wurden mit *pcDNA/TR* und *pcDNA/TO/lacZ* kotransfiziert. Die Wells von **a-d** wurden nicht mit *tet* induziert, während die Zellen der Wells in **e** direkt nach der Transfektion mit 1 µg / ml *tet* induziert wurden. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit X-gal gefärbt. Die Anwesenheit von blauer Farbe zeigt die Expression von β-Galaktosidase.

Zuerst wurden Versuche mit Zellen durchgeführt, die auf Rasterplatten kultiviert waren. Alle folgenden Transfektionen wurden mit der HGG unter optimierten Bedingungen (siehe Tab. 2) durchgeführt. Dazu wurden COS1-Zellen, L6 Myoblasten und neonatale Kardiozyten auf je sechs Rasterplatten (Ø 3,4 cm, 160 Felder von 2 x 2 mm Größe) kultiviert. COS1-Zellen und L6 Myoblasten wurden bei Konfluenz transfiziert. Neonatale Kardiozyten wurden mit einer Zellkonzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen / ml Medium ausplattiert und nach 24 h transfiziert. Die Zellkulturen wurden mit 2 µg Plasmid-DNA / Cartridge (je 1 µg *pcDNA6/TR* und *pcDNA4/TO/lacZ*) bei einem molaren Verhältnis von 1,2 : 1 kotransfiziert. Direkt nach der Transfektion wurde die Hälfte der Kulturen mit DOX (1 µg / ml Medium) induziert. Das tet-Derivat DOX wurde alternative verwendet, da es wasserlöslich ist und nicht wie *tet* in einer für

die Zellen schädlichen Ethanollösung appliziert werden muss. Nach 48 h wurden die Zellen mit Glutaraldehydlösung (2,5 %) fixiert und mit X-gal-Lösung (0,2 %) inkubiert. Zellen, die β -Galaktosidase exprimierten, färbten sich dabei blau. Alle blauen Zellen / Kultur wurden mit Hilfe der Rasterfelder unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Induktion durch DOX führte bei COS1-Zellen zu einer 2,6-fachen Steigerung der blau gefärbten Zellen von 1172 +/-68 / Kultur (n=3) auf 3030,3 +/-629,9 / Kultur (n=3). Bei Myoblasten erhöhte die Induktion die Anzahl der blau gefärbten Zellen von 3849 +/- 766,1 / Kultur (n=3) auf 9051 +/-1140 / Kultur (n=3), was einem Steigerungsfaktor von 2,4 entspricht. Im Falle der neonatalen Kardiozyten steigerte sich die Anzahl der positiv gefärbten Zellen nach Induktion mit DOX um das 9,1-fache (187,3 +/-69,8 / Kultur auf 1707,7 +/-133,0 / Kultur; n=3). Schematische Darstellungen der ausgezählten Rasterplatten sind in Abb. 20 a-f zu sehen. Dabei wurden jedem Rasterfeld entsprechend der Anzahl blau gefärbter Zellen fünf verschieden Blautöne zugeordnet. Durch ein Lichtmikroskop wurden mit einer schwarz/weiß-Kamera Bilder der transfizierten Zellkulturen aufgenommen (Abb. 21 a-f). Bei der Auswertung dieser Ergebnisse zeigte sich zunächst im Vergleich zwischen Transfektionen mit dem Kontrollplasmid *pSV- β -gal* (s.o.) bei DOX-induzierten COS1-Zellen eine um das 8,6-fach reduzierte Transfektionsrate. Neben der um die Hälfte reduzierte Menge an *pcDNA4/TO/lacZ* - Plasmid, die transfiziert wurde (nur 1 μ g / Zellkultur) im Vergleich zu 2 μ g *pSV- β -gal* / Zellkultur, könnten auch suboptimale Versuchsbedingungen (zu häufiges Passagieren der Zellen, zu starke Zerstörung der Zellen nach der HGG-Transfektion, o.ä.) dafür in Frage kommen. Da jedoch in diesen Experimenten hauptsächlich der Unterschied zwischen DOX-induzierten und nicht induzierten Zellen im Vordergrund stand, wurde nicht versucht, die Transfektionseffizienz in weiteren Experimenten zu steigern. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von β -Galaktosidase in Anwesenheit von DOX in allen untersuchten Zelltypen gesteigert werden konnte. Wird der Repressor nicht durch DOX inaktiviert, kann er an den Operator binden und die Expression des Reportergens unterdrücken. Die Reportergenexpression wurde in Abwesenheit von DOX nicht vollständig inhibiert, was besonders bei COS1-Zellen und L6 Myoblasten beobachtet wurde. Bei diesen Zellen wurde die Anzahl blau gefärbter Zellen nur etwas mehr als verdoppelt. Dies könnte die Folge zu geringer Konzentration des Repressorproteins sein. Bei der Kotransfektion könnte es auch vorgekommen sein, dass Zellen nur mit dem *pcDNA4/TO/lacZ* - Plasmid transfiziert wurden. In solchen Zellen kommt es auch ohne Induktion zu unkontrollierter Expression von β -Galaktosidase. Es stellte sich daher die Frage, ob durch einen Überschuss an transfiziertem *pcDNA6/TR*-Plasmid im Verhältnis zu *pcDNA4/TO/lacZ* die Hintergrundexpression minimiert werden kann. Eine weitere Beobachtung während dieser Experimente war, dass sich nicht nur die Anzahl der blau gefärbten Zellen nach

Induktion mit DOX steigerte. Auch die Intensität der Blaufärbung einzelner Zellen nach Induktion deutete auf eine gesteigerte β -Galaktosidase-Expression hin. Dies wird in Abb. 21 d-f an der Intensität der schwarz gefärbten Zellen in Kontrast zu den schwächer schwarz gefärbten Zellen in Abb. 21 a-c deutlich.

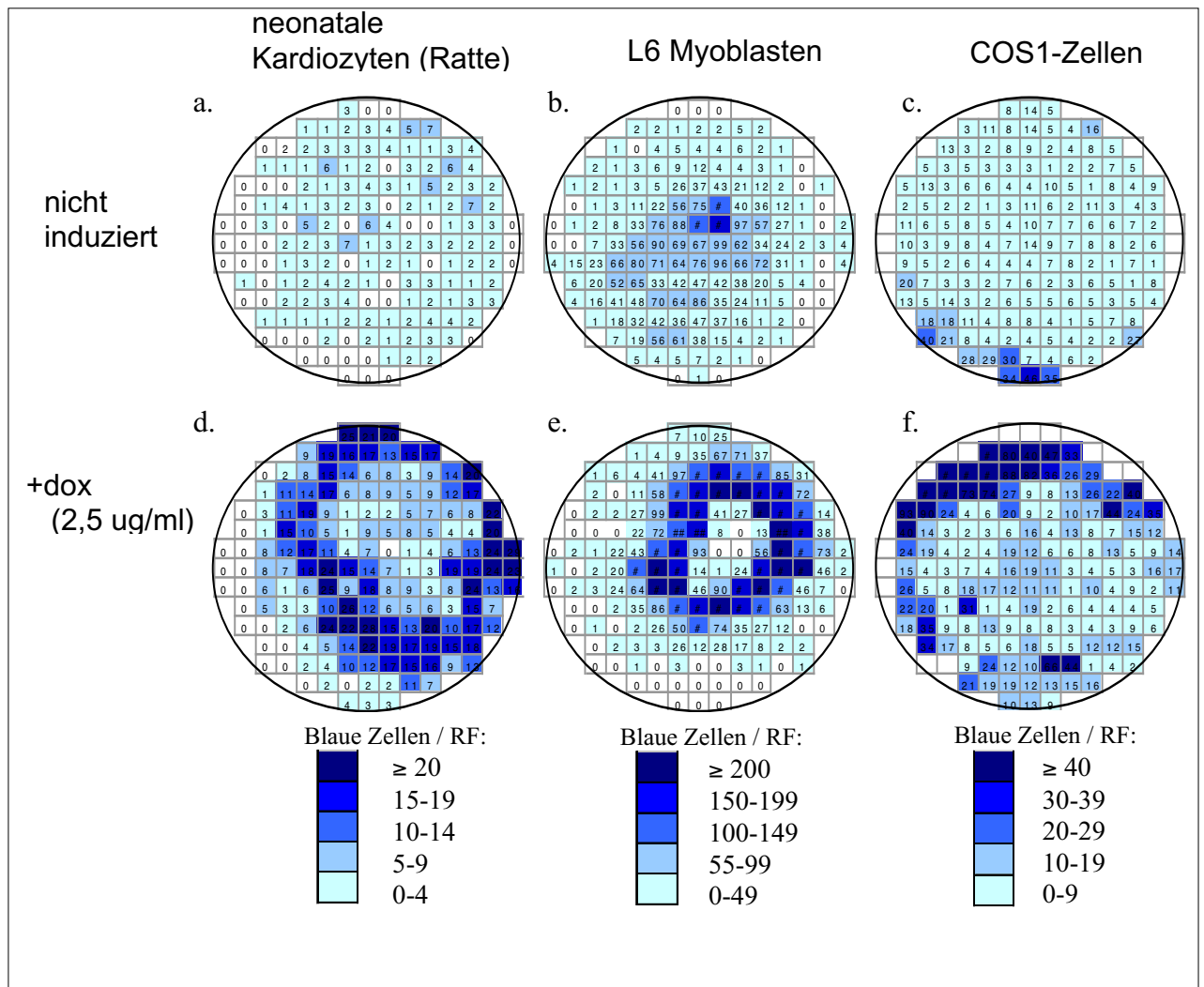


Abbildung 20: DOX-Induktion der β -Galaktosidase-Expression in verschiedenen Zelltypen. Kointransfektion von verschiedenen Zelltypen mit den Plasmiden des T-RExTM-Systems (Invitrogen) *pcDNA/TR* und *pcDNA/TO/lacZ*, gefolgt von der Induktion mit DOX (d-f). Die Zellen in a-c wurden nicht induziert. Die Zellen wurden nach zwei Tagen mit X-gal gefärbt. Die blauen Zellen (Expression von β -Galaktosidase) in jedem der Rasterfelder (RF) der Platten wurden gezählt. Die Intensität der Blaufärbung entspricht einer bestimmten Spanne gezählter blauer Zellen / RF.

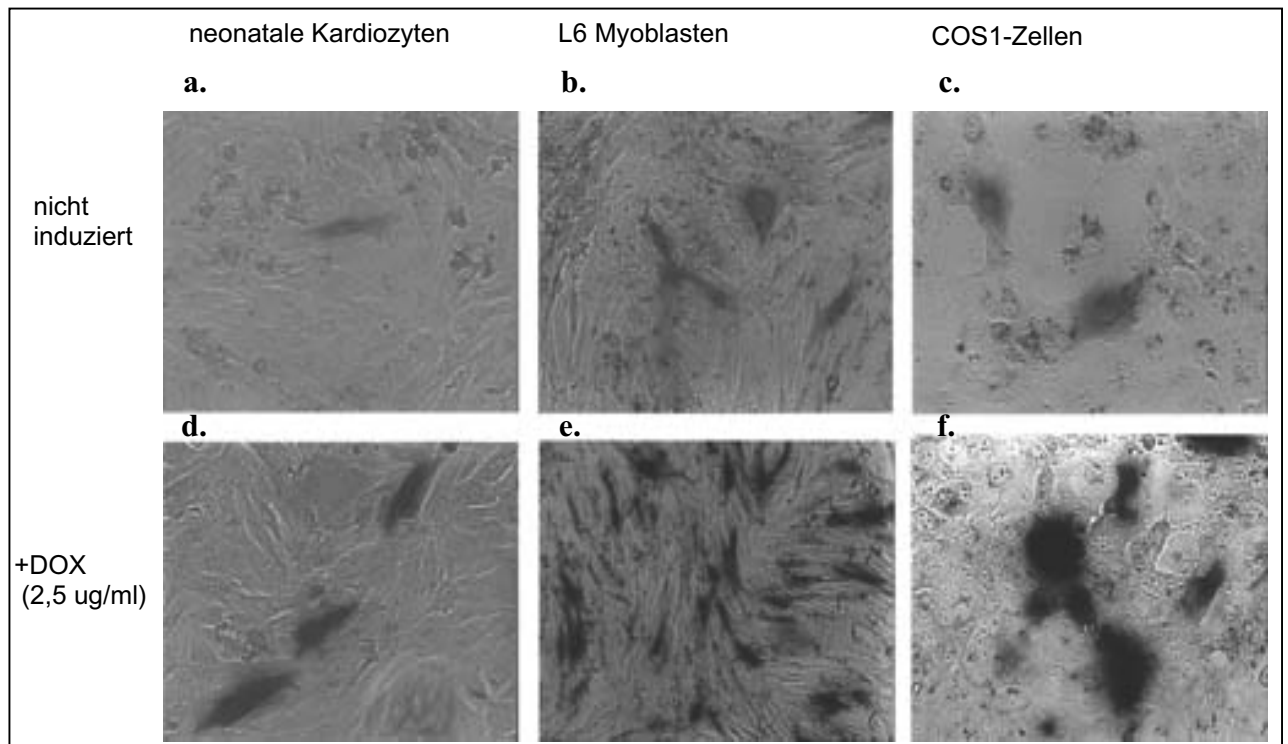


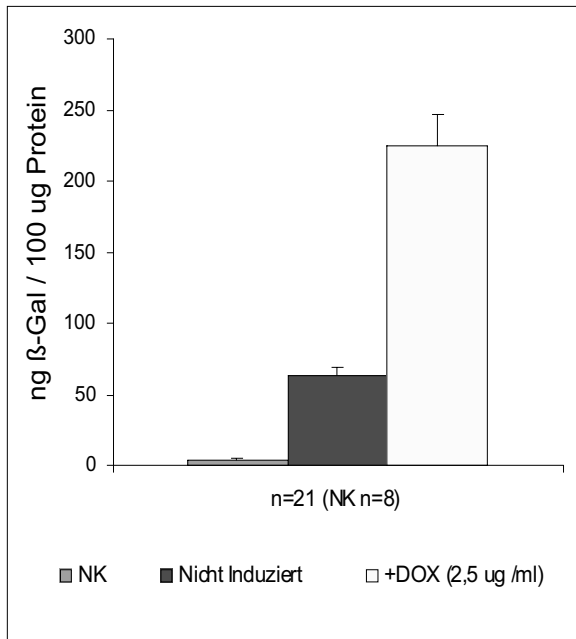
Abbildung 21: DOX-Induktion der β -Galaktosidase-Expression in verschiedenen Zelltypen. Videoprints von X-gal-gefärbten Zellen (in dieser Darstellung schwarz) bei 200x Vergrößerung nach Kotransfektion mit *pcDNA6/TR* und *pcDNA4/TO/lacZ* gefolgt von der Induktion mit DOX (**d-f**). Die Zellen auf den Bildern **a-c** wurden nicht induziert. Die Bilder zeigen Bereiche der Zellkulturen mit optimaler Konzentration blaugefärbter Zellen / Fläche. Neben der gesteigerten Anzahl von Zellen, die β -Galaktosidase exprimieren, ist zu erkennen, dass nicht nur die Anzahl an gefärbten Zellen in den DOX-induzierten Zellkulturen steigt, sondern auch die Intensität der Färbung. Dies ist auf eine stärkere Expression von β -Galaktosidase innerhalb einer Zelle zurückzuführen.

Um dies näher zu untersuchen, wurden weitere Transfektionen durchgeführt, bei denen mittels eines Chemolumineszenztests die Konzentration an β -Galaktosidase im gesamten klaren Lysat einer Zellkultur ermittelt wurde. Zellen jedes Zelltyps wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und unter optimierten Bedingungen (s.o.) mit der HGG kotransfiziert. In jedem Experiment wurden einige Zellkulturen nicht transfiziert und dienten als negative Kontrolle der Reporterexpression. Pro Cartridge wurden je 1 μ g Plasmid-DNA (*pcDNA6/TR* und *pcDNA4/TO/lacZ*) eingesetzt. Die Hälfte der Zellkulturen wurden direkt nach der Transfektion mit DOX (1 μ g / ml) induziert und nach 48 h geerntet. Die β -Galaktosidase-Konzentration im klaren Lysat wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) und dem Photoluminometer Lumat LB 9501 (Berthold) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysate beim Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidase-Werte abgeglichen.

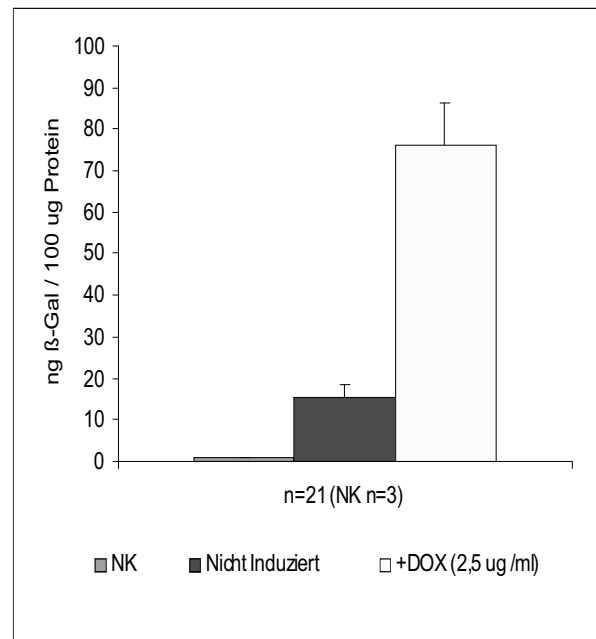
Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β -Galaktosidase in ng pro 100 μ g Gesamtprotein angegeben.

In DOX induzierten COS1-Zellen wurde dabei eine β -Galaktosidase-Konzentration von 224 \pm 23 ng / 100 μ g Protein (n=21) gemessen, während in nicht induzierten Zellen 63 \pm 6,1 ng β -Galaktosidase / 100 μ g Protein (n=21) ermittelt wurden. Das entspricht einem Steigerungsfaktor von 3,6. Bei L6 Myoblasten konnte durch DOX-Induktion die β -Galaktosidase-Konzentration von 15,5 \pm 3,4 ng / 100 μ g Protein (n=21) auf 76 \pm 10 ng / 100 μ g Protein (n=21) gesteigert werden, was einer Erhöhung der exprimierten Reportergenmenge um das 4,9-fache bedeutet. Bei neonatalen Kardiozyten konnte die β -Galaktosidase-Menge nach DOX-Induktion um das 5,1-fache gesteigert werden (von 3,7 \pm 0,6 ng / 100 μ g Protein auf 19 \pm 1,8 ng / 100 μ g Protein; je n=21).

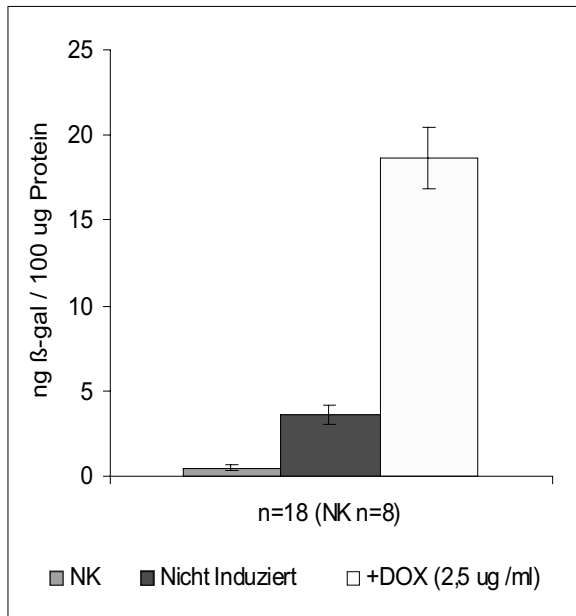
Diese Ergebnisse (Abb. 22) bestätigen teilweise die Vermutung aus den vorangegangenen Experimenten. Durch Induktion mit DOX steigerte sich die Reportergenkonzentration / Zellkultur insgesamt mehr als durch Auszählung X-gal blau gefärbter Zellen ermittelt wurde. Dies gilt für COS1-Zellen und L6 Myoblasten. In neonatalen Kardiozyten erhöhte sich die gemessene β -Galaktosidase-Konzentration nur um einen Faktor von 4,3 im Gegensatz zu einer 9,1-fachen Steigerung der Anzahl blau gefärbter Zellen im vorhergehenden Experiment. Eine plausible Erklärung dafür wäre, dass nach X-gal-Färbung nicht induzierter neonataler Kardiozyten schwach blau gefärbte Zellen im Lichtmikroskop übersehen und nicht mitgezählt wurden. Dies ist generell ein Schwachpunkt von Transfektionsexperimenten, bei denen die β -Galaktosidase-Expression über die Anfärbung der Zellen mit X-gal ermittelt wird. Reporteraktivität mittels Chemolumineszenz liefert in dieser Hinsicht quantitativ stabilere Werte.



a. COS1-Zellen



b. L6 Myoblasten



c. neonatale Kardiozyten

Abbildung 22: Kontrollierte Genexpression mit dem *tetR/tetO*-System in Zellkulturen; DOX-induzierte und nicht induzierte Expression von β -Galaktosidase in Gene Gun transfizierten (a) COS1-Zellen, (b) L6 Myoblasten und (c) neonatalen Kardiozyten. Die Zellen wurden mit *pcDNA6/TR* und *pcDNA4/TO/LacZ* kotransfiziert. Die β -Galaktosidase-Konzentration wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) gemessen. (NK = Negativkontrolle, Zellkulturen, die nicht transfiziert wurden.)

Die durchgeführten Experimente stützen die Behauptung, dass es mit den nativen Elementen des *tetR/tetO*-Systems möglich ist, in unterschiedlichen Zelltypen, besonders aber in neonatalen Kardiozyten, die Reporterexpression gezielt durch Zugabe von DOX zu steuern. In allen untersuchten Zelltypen zeigte sich in nicht induzierten Zellkulturen eine starke

Hintergrundexpression des Reportergens. Die Vermutung liegt nahe, dass bei einem molaren Verhältnis von 1,2 : 1 (w/w = 1:1) des tetR-exprimierenden Plasmids zu dem Reportergenkonstrukt die Proteinkonzentration des tetR nicht ausreicht, um die Transkription von β -Galaktosidase zu unterdrücken. In einer Serie von Experimenten sollte daher geprüft werden, ob durch ein gesteigertes Verhältnis von Repressorkonstrukt zu Reportergenkonstrukt die Hintergrundexpression vermindert werden kann. Dies wäre eine wichtige Voraussetzung für die Übertragbarkeit des tetR/*tetO*-Systems auf transgene Mäuse. Die Vermeidung häufig auftretender letaler Auswirkungen der Transgene, besonders während der Embryogenese des transgenen Tieres, wäre mit dieser Hintergrundexpression nicht möglich. Des Weiteren wäre die Interpretierbarkeit induzierter Transgenaktivität durch zu starke Hintergrundexpression sehr eingeschränkt.

In allen Experimenten wurde zusätzlich beobachtet, dass die Transgene oder deren Produkte im Lichtmikroskop keinerlei sichtbare histologische Veränderungen der kotransfizierten Zellen hervorgerufen haben. Außer den Zellen, die durch den Beschuß mit den DNA/Gold-Partikeln zerstört wurden, zeigten die transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen ein normales äußeres Erscheinungsbild ohne eine Veränderung in Form und Größe. Im Falle der neonatalen Kardiozyten konnten auch nach der Transfektion in transfizierten Zellen spontane Kontraktionen beobachtet werden.

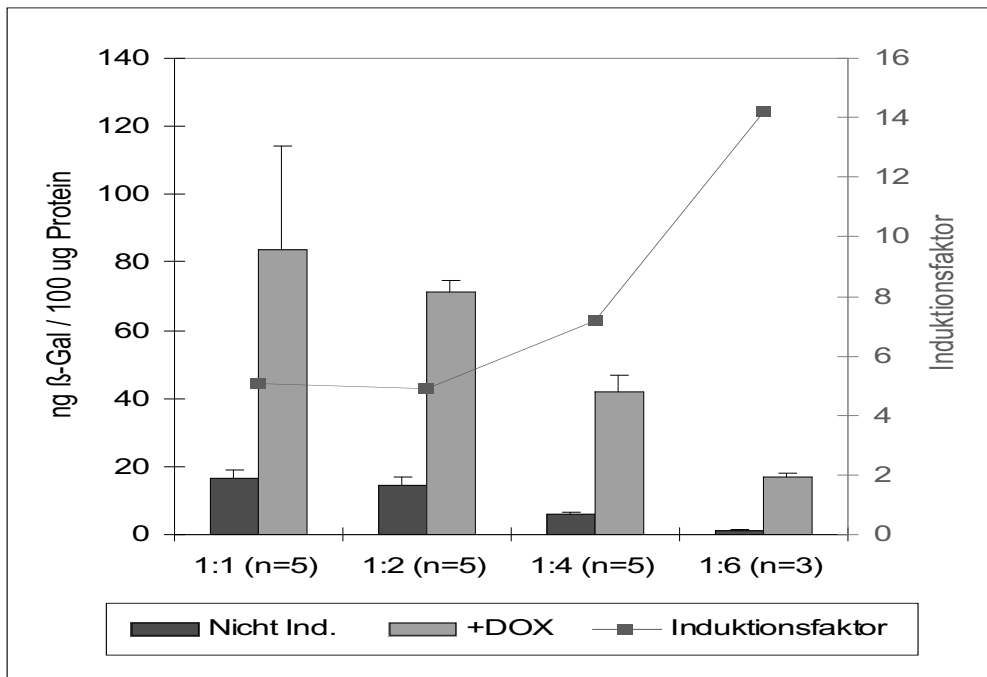
5.3.2 Verhältnis tetR zu *tetO*-Sequenzen

Ein kritischer Faktor der kontrollierten Genexpression unter Verwendung nativer Elemente des tetR/*tetO*-Systems ist das Mengenverhältnis von Repressorprotein zu Operatorsequenzen. In den vorangegangenen Experimenten deutete sich an, dass nur bei hohen Konzentrationen des Repressorproteins die Reportergenexpression unterdrückt werden kann. Dabei sollte die Hintergrundexpression so niedrig sein, dass in transgenen Tieren kein physiologisch wirksamer Effekt hervorgerufen wird. Durch Variationen im molaren Verhältnis der transfizierten Plasmide sollten die Auswirkungen auf die Reportergenexpression in nicht induzierten im Vergleich zu DOX-induzierten Zellkulturen untersucht werden. Vom Hersteller des T-REx™ Kits wird für die Transfektion ein Verhältnis von mindestens 6:1 (*pcDNA6/TR* : *pcDNA4/TO/lacZ*) empfohlen, um bei Zellen, die nicht mit DOX induziert wurden, eine möglichst niedrige Expression des Reportergens sicherzustellen. Um dies in den untersuchten Zelltypen zu verifizieren, wurden mit COS1-Zellen und L6 Myoblasten Transfektionen mit unterschiedlichen relativen Mengen an *pcDNA6/TR* zu *pcDNA4/TO/lacZ* durchgeführt.

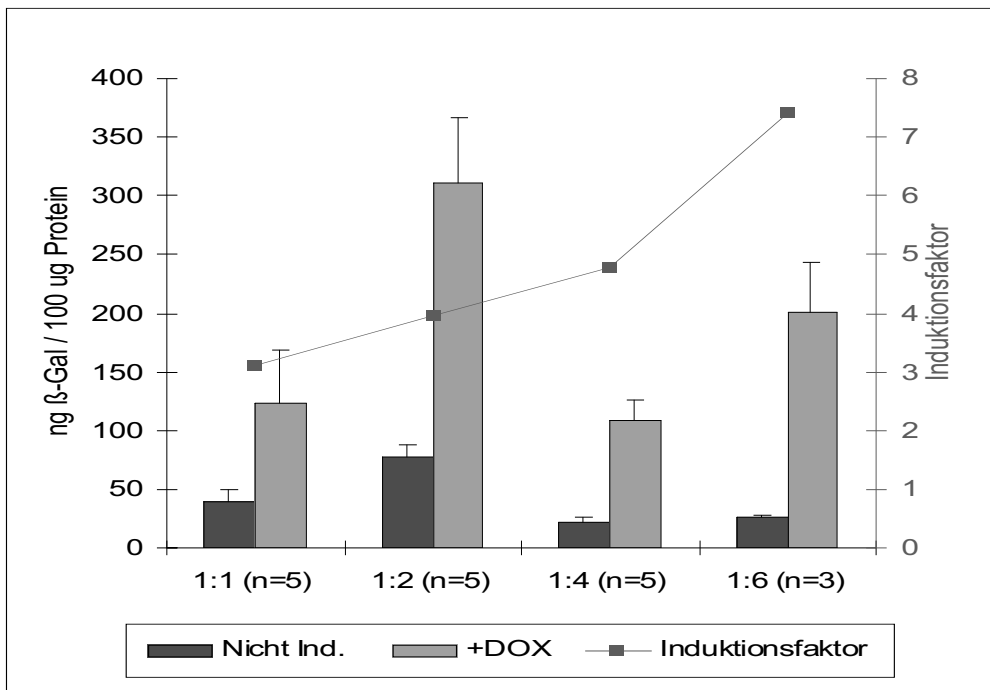
Auf Zellkulturschalen (\varnothing 3,4 cm) von 6-Well-Platten wurden COS1-Zellen und L6 Myoblasten angezüchtet. Eine Zellkulturschale wurde nicht transfiziert und diente als negative Kontrolle der Reporterexpression. Die Zellen wurden unter optimierten Bedingungen (Tab. 2) bei Konfluenz transfiziert. Es wurden Cartridges mit den Plasmiden hergestellt, die in unterschiedlichen relativen Mengen (w/w; 1:1; 2:1; 4:1; 6:1) *pcDNA6/TR* : *pcDNA4/TO/lacZ* enthielten. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Plasmide entspricht dies molaren Verhältnissen von 1,2 : 1; 2,4 : 1; 4,8 : 1 und 7,2 : 1. Um die Vergleichbarkeit der Reporterexpression zu gewährleisten, wurde dabei in die Cartridgepräparation konstant 1 μ g *pcDNA4/TO/lacZ* eingesetzt, während die eingesetzte Menge an *pcDNA6/TR* entsprechend dem angestrebten Verhältnis variiert wurde (1, 2, 4 und 6 μ g / Cartridge). Die Hälfte der Zellkulturen wurde direkt nach der Transfektion mit DOX (1 μ g / ml) induziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Die β -Galaktosidase-Konzentration im klaren Lysat wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) und dem Photoluminometer Lumat LB 9501 (Berthold) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysate beim Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β -Galaktosidase in ng pro 100 μ g Gesamtprotein angegeben.

Zunächst wurde beobachtet, dass sich bei L6 Myoblasten die Reporterexpression in DOX-induzierten Zellkulturen reduzierte, je höher die transfizierte Menge an *pcDNA6/TR* im Verhältnis zu *pcDNA4/TO/lacZ* war. Sie verminderte sich von 84 \pm 30 ng / 100 μ g Protein (n=5) bei einem Verhältnis von 1:1 auf 17 \pm 0,9 ng / 100 μ g Protein bei einem Verhältnis von 6:1. Bei COS1-Zellen wurde diese Tendenz nicht beobachtet. Dennoch zeigte sich bei beiden Zelltypen, dass sich mit zunehmendem transfizierten Überschuss an *pcDNA6/TR*-Plasmid die β -Galaktosidase-Expression in nicht induzierten Zellkulturen im Verhältnis zu DOX-induzierten Zellen verringerte. Setzt man die Werte der Expression von β -Galaktosidase in DOX-induzierten Zellkulturen gleich 100 %, so verminderte sich in COS1-Zellen die Hintergrundexpression in nicht induzierten Zellen von 32 % (1:1) über 20,7 % (2:1) und 21 % (4:1) auf 13 % (6:1) (Abb. 23 b). Bei L6 Myoblasten verringerte sich die unerwünschte Reporterexpression bei nicht induzierten Zellkulturen von 19,7 % (1:1) über 20,4 % (2:1) und 14 % (4:1) auf 7 % (6:1) (Abb. 23 a). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Steigerung der Expression des tetR im Verhältnis zu tetO-Sequenzen die Hintergrundexpression von β -Galaktosidase in nicht induzierten COS1-Zellen und L6 Myoblasten verringert. Dies unterstützt die Vermutung, dass durch die richtige Auswahl transgener Mauslinien, bei denen hohe tetR-Konzentrationen die Transkription des dem

Operator nachgeschalteten Gens solange effektiv unterdrücken, bis die Expression durch DOX induziert wird.



a. L6 Myoblasten



b. COS1-Zellen

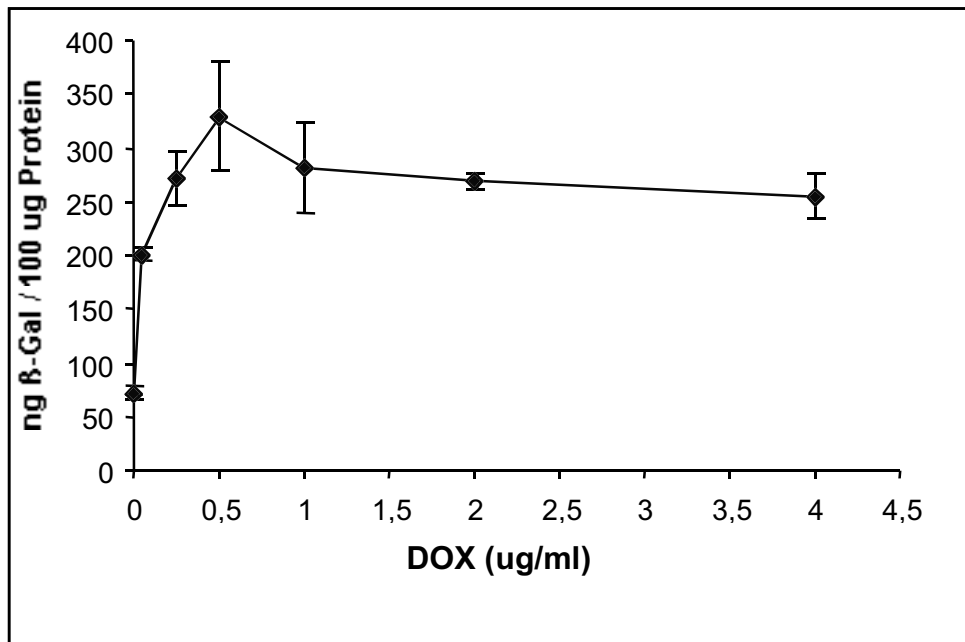
Abbildung 23 a und b: Verhältnis von *tetR* zu *tetO*-Sequenzen bei der DOX-kontrollierten Genexpression. (a) COS1-Zellen und (b) L6 Myoblasten wurden mit unterschiedlichen relativen Mengen von *pcDNA4/TO/LacZ* und *pcDNA6/TR* (1:1, 1:2, 1:4 und 1:6) transfiziert. Der Induktionsfaktor beschreibt die Steigerung der Expression nach Zugabe von DOX im Vergleich zu nicht induzierten Zellen. (n = Anzahl durchgeführter Experimente)

5.3.3 Abhängigkeit der Induzierbarkeit von der Doxyzyklinmenge

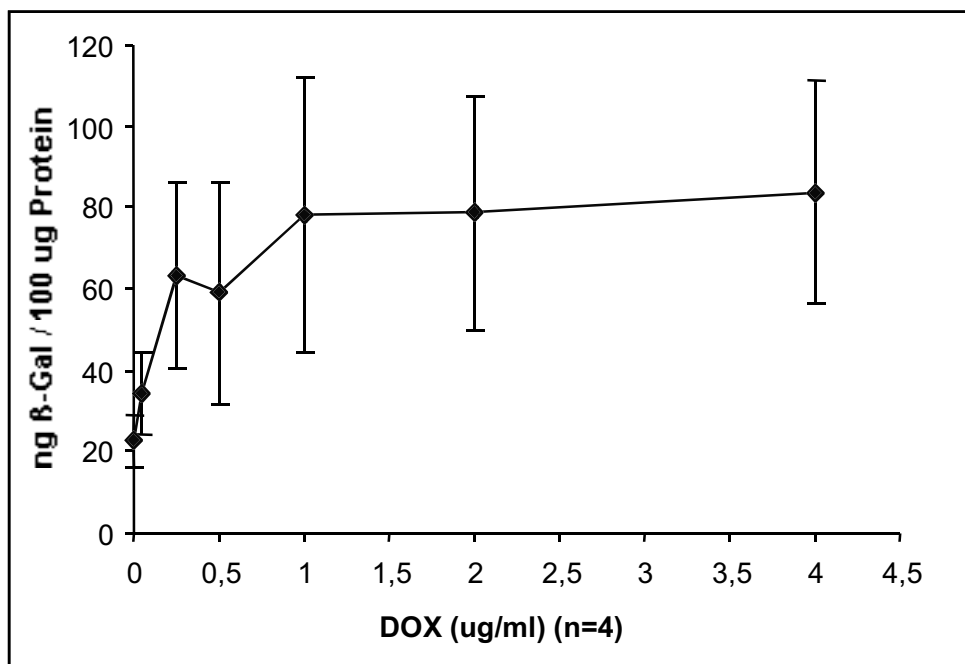
Es war zu erwarten, dass die Expression von β -Galaktosidase innerhalb des *tetR/tetO*-Systems von der Menge an zugegebenen DOX abhängt. Yao et al (1998, 1999) induzierten in ihren Experimenten die Expression des zu untersuchenden Gens durch Zugabe von 1 μg *tet* /ml Zellmedium. In Experimenten sollte getestet werden, bei welchen Konzentrationen von DOX eine optimale Induktion des Systems möglich ist. Daher wurden Versuche mit COS1-Zellen und L6 Myoblasten durchgeführt, bei denen die kotransfizierten Zellen mit unterschiedlichen Mengen an DOX (0,05-4,0 μg / ml Medium) induziert wurden.

Dazu wurden je 24 Kulturen von COS1-Zellen und L6 Myoblasten in 6-Well-Platten (\emptyset einer Kulturschale 3,4 cm) angezchtet. Die Zellen wurden mit der HGG bei Konfluenz mit 1 μg / Cartridge *pcDNA6/TR* und 1 μg / Cartridge *pcDNA4/TO/lacZ* kotransfiziert. Direkt nach der Transfektion wurden je 4 Kulturen eines Zelltyps mit 0,05 μg , 0,25 μg , 0,5 μg , 1 μg , 2 μg und 4 μg DOX / ml Zellmedium induziert. 4 Zellkulturen jedes Zelltyps wurden nicht induziert. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet. Die β -Galaktosidase-Konzentration im klaren Lysat wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) und dem Photoluminometer Lumat LB 9501 (Berthold) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysate beim Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β -Galaktosidase in ng pro 100 μg Gesamtprotein angegeben. Die vier ermittelten Werte der mit der gleichen DOX-Konzentration induzierten Zellkulturen wurden gemittelt und die jeweilige Standardabweichung berechnet.

Bei COS1-Zellen wurde die höchste Konzentration des Reportergens bei einer DOX-Konzentration von 0,5 μg / ml Medium gemessen (329 +/-51 ng / 100 μg Protein; n=4). Ausgehend von einer Expression des Reportergens von 72,1 +/-10 ng / 100 μg ohne DOX-Induktion stieg die β -Galaktosidase-Konzentration bei 0,05 und 0,25 μg DOX / ml Medium steil an und steigerte sich nach Zugabe von mehr als 0,5 μg DOX nicht mehr (Abb. 24 a). Bei L6 Myoblasten wurde mit 84 +/- 27 ng / 100 μg Protein nach Induktion von 4 μg DOX / ml Medium die höchste Reporterexpression gemessen. Jedoch wurde auch bei diesem Zelltyp ein starke Steigerung der Konzentration des Reportergens bei 0,05 μg und 0,25 μg DOX / ml Medium beobachtet, die dann bei mehr als 0,5 μg DOX / ml Medium (63 +/- 20 ng / 100 μg Protein; n=4) nur noch unwesentlich anstieg (Abb. 24 b).



a. COS1-Zellen



b. L6 Myoblasten

Abbildung 24 a und b: *Abhängigkeit der induzierten Reprotergenexpression von der DOX-Menge*; Kotretransfektion von (a) COS1-Zellen und (b) L6 Myoblasten mit den Konstrukten des T-REx Kits (*pcDNA6/TR* und *pcDNA/TO/LacZ*). Nach der Transfektion wurde die Expression von β -Galaktosidase mit unterschiedlichen Mengen von DOX induziert. Anzahl ausgewerteter Zellkulturen = n.

In beiden Zelltypen zeigte sich, dass mit DOX-Zugaben von mehr als 0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Medium die Induktion der β -Galaktosidase-Expression nicht mehr wesentlich steigerbar war. Die Repressorproteine wurden bei dieser Konzentration von DOX ausreichend inhibiert, so dass die Transkription des *lacZ*-Gens optimal induziert wurde. Diese Ergebnisse beziehen sich auf

Experimente, bei denen die Zellen mit einem molaren Verhältnis von 1,2 : 1 des Repressorkonstruktes zu dem Operatorkonstrukt transfiziert wurden. Es ist anzunehmen, dass eine Steigerung der Expression des Repressorproteins im Verhältnis zu Operatorsequenzen, die zu einer Verminderung der Hintergrundexpression des Systems führt (siehe 5.3.2), die Zugabe höherer Mengen an DOX erfordert. In den folgenden Experimenten wurde daher DOX im Überschuss zugegeben (2,5 µg / ml Medium), um eine optimale Inhibierung des Repressors zu erreichen.

5.4 Das *tetR/tetO*-System unter Verwendung des α -MHC Promotors

Ein Ziel dieses Projekts ist es, dieses System der *tet*-gesteuerten Genexpression in den Herzen transgener Mäuse zu etablieren. Daher wurden von Anfang an Transfektionsexperimente mit neonatalen Kardiozyten durchgeführt. Um die Expression der Transgene auf das Herz der Mäuse zu beschränken, wurde der ubiquitäre hCMV Promotor durch den herzspezifischen α -MHC Promotor ersetzt. In Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass dieser Promotor in neonatalen Kardiozyten nicht aktiv war. Die Expression eines dem Promotor nachgeschalteten Reportergens (*lacZ*) konnte in Transfektionsversuchen mit neonatalen Kardiozyten nicht detektiert werden. Der Grund dafür ist, dass in Mäusen das schnelle α -MHC im Gegensatz zur β -Isoform dieses Proteins adult exprimiert wird (Subramaniam et al, 1991). Da aber die Transfektion adulter Kardiozyten nicht reproduzierbar gelang, wurden solche Zellen für weitere Untersuchungen nicht in Betracht gezogen. Um das *tetR/tetO*-System unter der Kontrolle des α -MHC Promotors in neonatalen Kardiozyten zu testen, musste die Aktivität des Promotors durch zusätzliche zell- und molekularbiologische Intervention gesteigert werden.

5.4.1 Erhöhung der Aktivität des α -MHC Promotors mit Insulin, Trijodthyronin und/oder Dexamethason

Für die Stimulierung des α -MHC Promotors wurden Kulturen neonataler Kardiozyten mit dem *α -MHCp/tetO/lacZ/hgh*-Plasmid transfiziert und zusätzlich mit Trijodthyronin, Insulin und Dexamethason behandelt. Von diesen Hormonen ist bekannt, dass sie u.a. die Aktivität des α -MHC Promotors steigern (Chang et al., 1997; Haddad et al., 1996; Muangmingsuk et al., 2000).

Es wurden neonatale Kardiozyten aus den Herzen von Ratten isoliert und $0,4 \times 10^6$ Zellen / ml Medium (Kulturschale: Ø 3,4 cm) angezüchtet. In einer Serie von Experimenten wurden die Hormone einzeln, in Kombinationen von zweien oder allen dreien direkt nach dem Ausplattieren dem Medium zugegeben. Zu Beginn wurden Trijodthyronin, Insulin oder Dexamethason einzeln

in varriierenden Mengen verwendet, um deren optimale Konzentrationen für die Stimulierung des Promotors zu untersuchen. Ausgangspunkt für die verwendeten Konzentrationen waren die Arbeiten von Chang et al. (1997), Haddad et al. (1996) und Muangmingsuk et al. (2000). Danach wurden die kultivierten neonatalen Kardiozyten vor der Transfektion mit Kombinationen von zwei oder allen drei Hormonen behandelt. Parallel wurden in jedem Experiment Kulturen neonataler Kardiozyten nicht transfiziert oder transfiziert, aber nicht mit Hormonen behandelt und dienten als negative Kontrolle. Nach 24 h wurden die Zellen mit 2 µg α -MHCp/tetO/lacZ/hgh-Plasmid mit der HGG unter optimierten Bedingungen transfiziert (Tab. 2). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet. Die β -Galaktosidase-Konzentration im klaren Lysat wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) und dem Photoluminometer Lumat LB 9501 (Berthold) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysate beim Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β -Galaktosidase in ng pro 100 µg Gesamtprotein angegeben.

Zunächst wurde Trijodthyronin in Mengen von 20, 100, 200 und 300 ng / ml Medium getestet. Die höchste Reporterexpression wurde bei 200 ng / ml Medium ermittelt und lag bei 5 +/-0,8 ng β -Galaktosidase / 100 µg Protein (n=14). Dies war das 2,5-fache der nicht mit Trijodthyronin behandelten neonatalen Kardiozyten (2 +/-0,6 ng / 100 µg Protein; n=8). Dann wurde Dexamethason in Konzentrationen von 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg und 2 µg / ml Medium vor der Transfektion mit dem Reportergenkonstrukt in die Zellkulturen gegeben. Dabei wurde die höchste β -Galaktosidase-Expression bei einer Konzentration von 1 µg Dexamethason / ml Medium ermittelt. Sie lag mit 4,4 +/-0,18 ng / 100 µg Protein um das 2,2-fache über dem Wert (6,1 +/-0,5 ng / 100 µg Protein; n=5) der nicht mit Hormonen behandelten Zellen. Durch Zugabe von variierenden Mengen an Insulin (5 µg, 10 µg, 20 µg und 50 µg / ml Medium) konnte der α -MHC Promotor nicht stimuliert werden. Es zeigte sich kein Unterschied zu neonatalen Kardiozyten, die nicht mit Insulin behandelt wurden. In den folgenden Experimenten wurde zunächst willkürlich eine Insulinkonzentration von 10 µg / ml Medium gewählt.

Dann wurden je zwei Hormone in das Medium gegeben. Zur Kontrolle wurden parallel neonatale Kardiozyten nicht mit Hormonen behandelt und mit dem α -MHCp/tetO/lacZ/hgh-Plasmid transfiziert. Nach dem Ernten dieser Zellen wurde im klaren Lysat eine Konzentration von 2,1 +/-0,6 ng β -Galaktosidase / 100 µg Protein (n=30) gemessen. Die Zugabe von Insulin / Dexamethason (4,9 +/-0,6 ng / 100 µg Protein; n=6) oder Insulin / Thrijodothyronin (4,8 +/-0,5 ng / 100 µg Protein; n=10) steigerte die Reporterexpression um mehr als das Doppelte (2,3-

fache). Durch Zugabe von Trijodthyronin / Dexamethason wurde die Aktivität des Promotors um das 4-fache ($8 \pm 1,1$ ng / 100 μ g Protein; n=6) gesteigert. Die stärkste Stimulierung der Promotoraktivität wurde jedoch in Anwesenheit aller drei Hormone erreicht. Die Aktivität konnte im Gegensatz zu kultivierten neonatalen Kardiozyten, die nicht mit Hormonen behandelt wurden, um das 5-fache ($10,9 \pm 2,19$ ng / 100 μ g Protein; n=11) gesteigert werden (Abb. 25). Die Experimente zeigten, dass nach Zugabe aller drei Hormone die Aktivität des Promotors am höchsten war. Daraus lässt sich schließen, dass sich die stimulierenden Effekte entweder unabhängig voneinander addieren und die größte Promotoraktivität hervorrufen oder sich die Hormone auch untereinander beeinflussen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Insulin nur in Gegenwart von Trijodthyronin eine verstärkte α -MHC Promotoraktivität zur Folge hat (Haddad et al., 1996). Dies erklärt auch, dass Insulin allein keine Wirkung auf die Promotoraktivität hatte.

Die Zugabemengen, die mit den einzelnen Hormonen ermittelt wurden (s.o.), waren nicht mehr aussagekräftig, da sie sich wahrscheinlich auch untereinander beeinflussten. Die Hormone mussten daher untereinander nochmals variiert werden, um eine optimale Stimulierung der Promotoraktivität zu erreichen. Daher wurden die drei Hormone in vier verschiedenen Mischungsverhältnissen vor der Transfektion auf neonatale Kardiozyten gegeben (Abb. 26). Für eine optimale Aktivierung des Promotors ($9,3 \pm 0,5$ ng / 100 μ g Protein; n=5) wurden 15 μ g / ml Medium Insulin, 200 ng / ml Medium Trijodthyronin und 1,5 μ g / ml Medium Dexamethason zugegeben. Mit diesen Konzentrationen wurde eine Steigerung der Promotoraktivität um das 4,2-fache im Vergleich zu nicht hormonbehandelten Zellen erreicht. Dieses Mischungsverhältnis wurde für alle weiteren Experimente beibehalten.

Die erfolgreiche Stimulierung der Aktivität des α -MHC Promotors durch Zugabe von Dexamethason, Trijodthyronin und Insulin ermöglichte es nun, das tetR/*tetO*-System unter Verwendung des herzspezifischen α -MHC Promotors in neonatalen Kardiozyten zu testen.

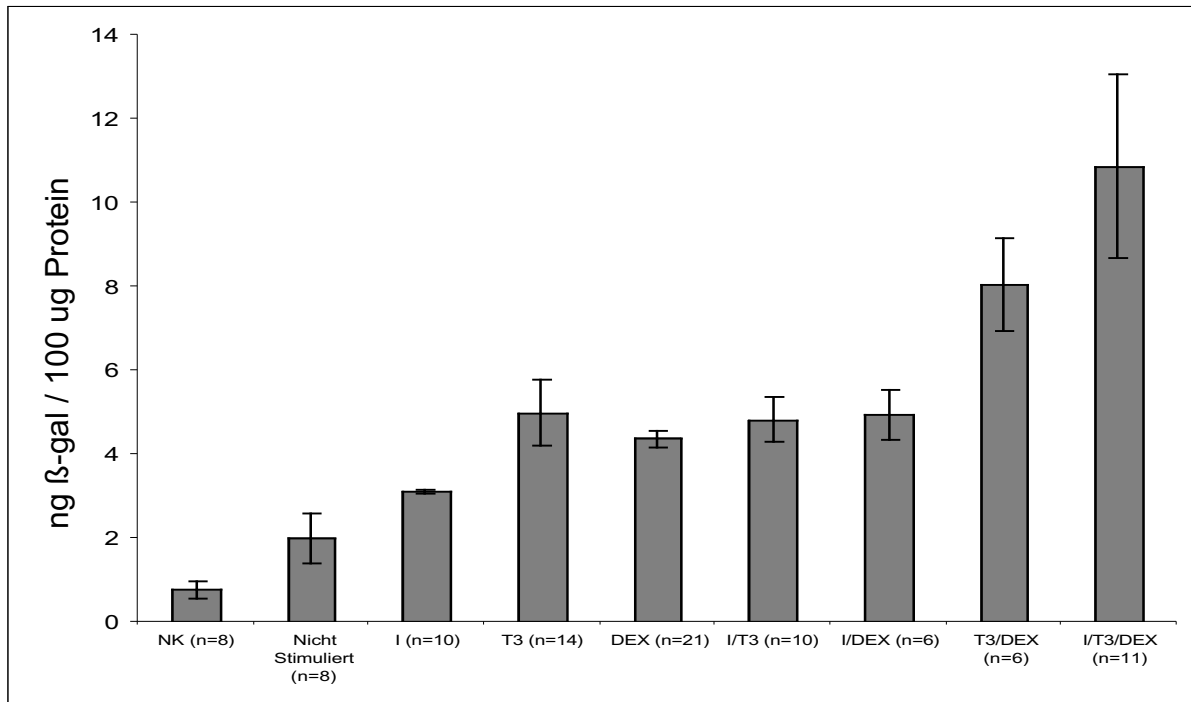


Abbildung 25: *Stimulierung des α -MHC Promotors.* Steigerung der Aktivität des α -MHC Promotors durch Insulin (I), Dexamethason (DEX) und / oder Trijodthyronin (T3) nach Transfektion von neonatalen Kardiozyten mit α -MHCp/tetO/LacZ/hgh. Mit den Kombinationen T3 / DEX und I / T3 / DEX wurde die Promotoraktivität im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen signifikant gesteigert ($p < 0,05$). NK = Negative Kontrolle; Zellkulturen, die nicht transfiziert wurden. Anzahl ausgewerteter Zellkulturen = n.

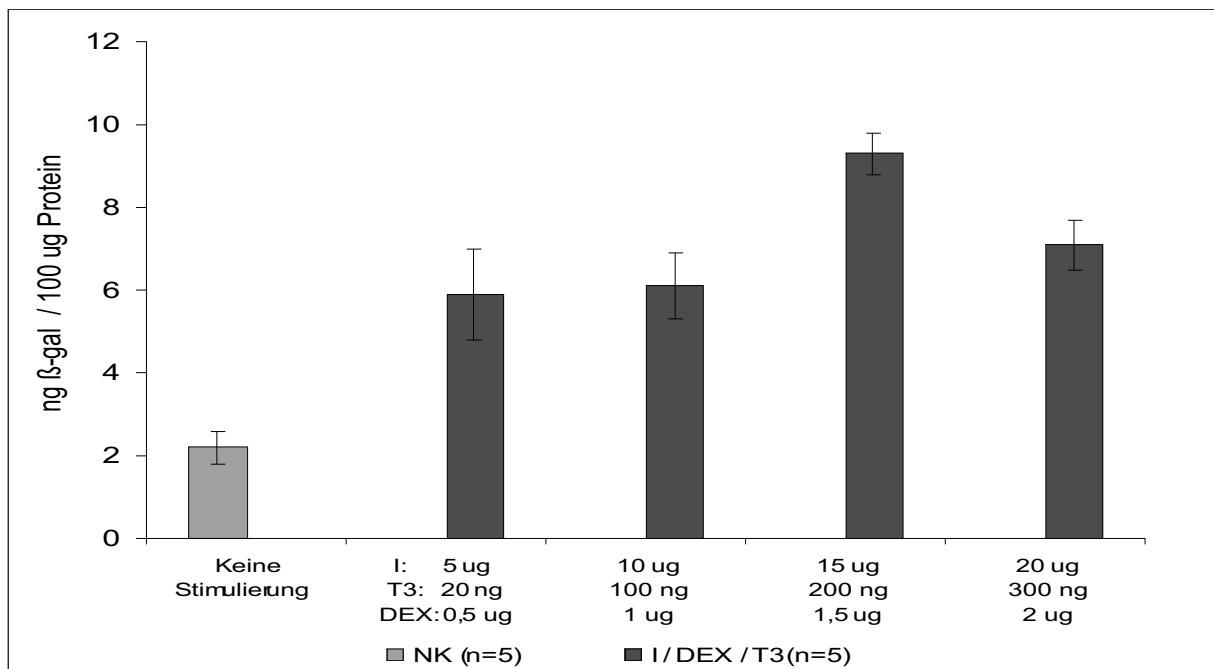


Abbildung 26: *Optimierung der α -MHC Promotor-Stimulierung.* Transfektion von neonatalen Kardiozyten mit α -MHC Promotor/tetO/LacZ/hgh. Steigerung der Aktivität des Promotors durch Zugabe von Insulin (I), Dexamethason (DEX) und Trijodthyronin (T3) in verschiedenen Konzentrationen. Als optimale Mengenkombination wurden 15 μ g / ml Insulin, 200 ng / ml Dexamethason und 2 μ g / ml Trijodthyronin ermittelt. NK = Negative Kontrolle; Zellkulturen, die nicht transfiziert wurden. Anzahl ausgewerteter Zellkulturen = n.

5.4.2 Induktion der β -Galaktosidase-Expression mit Doxyzyklin nach Stimulierung des α -MHC Promotors durch Insulin, Trijodthyronin und Dexamethason

Auf der Basis der Resultate aus den vorangegangenen Experimenten konnte jetzt die DOX-kontrollierte Genexpression auch in neonatalen Kardiozyten unter Verwendung des herzspezifischen α -MHC Promotors getestet werden.

Neonatale Kardiozyten wurden aus den Herzen von Ratten isoliert und $0,4 \times 10^6$ Zellen / ml Medium (Kulturschale: \varnothing 3,4 cm) angezüchtet. Direkt nach der Isolation der Kardiozyten wurden die Zellen mit $15 \mu\text{g} / \text{ml}$ Medium Insulin, $200 \text{ ng} / \text{ml}$ Medium Trijodthyronin und $1,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ Medium Dexamethason behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen mit je $1 \mu\text{g}$ α -MHCp/tetR/hgh und α -MHCp/tetO/lacZ/hgh unter Verwendung der HGG kotransfiziert (optimierte Bedingungen: siehe Tab. 2). Parallel wurden in jedem Experiment Kulturen neonataler Kardiozyten nicht transfiziert und dienten als negative Kontrolle. Direkt nach der Transfektion wurde sowohl in einen Teil der hormonbehandelten als auch in einen Teil der nicht behandelten Zellkulturen DOX ($2,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ Medium) gegeben. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet. Die β -Galaktosidase-Konzentration im klaren Lysat wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) und dem Photoluminometer Lumat LB 9501 (Berthold) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysate beim Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β -Galaktosidase in ng pro $100 \mu\text{g}$ Gesamtprotein angegeben.

Bei der Auswertung der ermittelten Reporterexpression ergab sich folgendes Bild (Abb. 27): In den Zellkulturen, die nicht mit den Hormonen behandelt wurden, führte die Induktion mit DOX zu fast keiner Auswirkung auf die ermittelten Reporterexpressionen. Mit $7,2 \pm 0,2 \text{ ng} / 100 \mu\text{g}$ Protein ($n=20$) in nicht induzierten Zellen und $9,0 \pm 0,1 \text{ ng} / 100 \mu\text{g}$ Protein ($n=20$) in DOX-induzierten Zellen lagen die Werte nur wenig über der Hintergrundexpression ($5,7 \pm 1 \text{ ng} / 100 \mu\text{g}$ Protein, $n=3$) von nicht transfizierten neonatalen Kardiozyten. Die Induktion der Reporterexpression durch DOX war somit nicht möglich. Die Zellkulturen, die mit den Hormonen behandelt worden waren, zeigten eine stimulierte α -MHC Promotoraktivität. Durch Induktion der Zellen mit DOX wurde die Expression von β -Galaktosidase auf $15,7 \pm 0,4 \text{ ng} / 100 \mu\text{g}$ Protein ($n=24$) gesteigert. Im Vergleich zu nicht induzierten Zellen ($9 \pm 0,4 \text{ ng} / 100 \mu\text{g}$ Protein; $n=25$) entspricht das fast einer Verdopplung der Reporterexpression.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind der entscheidende Beweis dafür, dass das tetR/tetO-System in neonatalen Kardiozyten unter Einbeziehung des herzspezifischen α -MHC Promotors funktional ist. Mit den gleichen genetischen Konstrukten, die in diesen Versuchen

verwendet wurden, sollen transgene Mauslinien etabliert werden. Die Resultate erlauben den Schluss, dass gesteuerte Transgenexpression unter Verwendung nativer Elemente des *tet*-Resistenzoperons *Tn10* aus *E. coli* in den Herzen von Mäusen möglich ist.

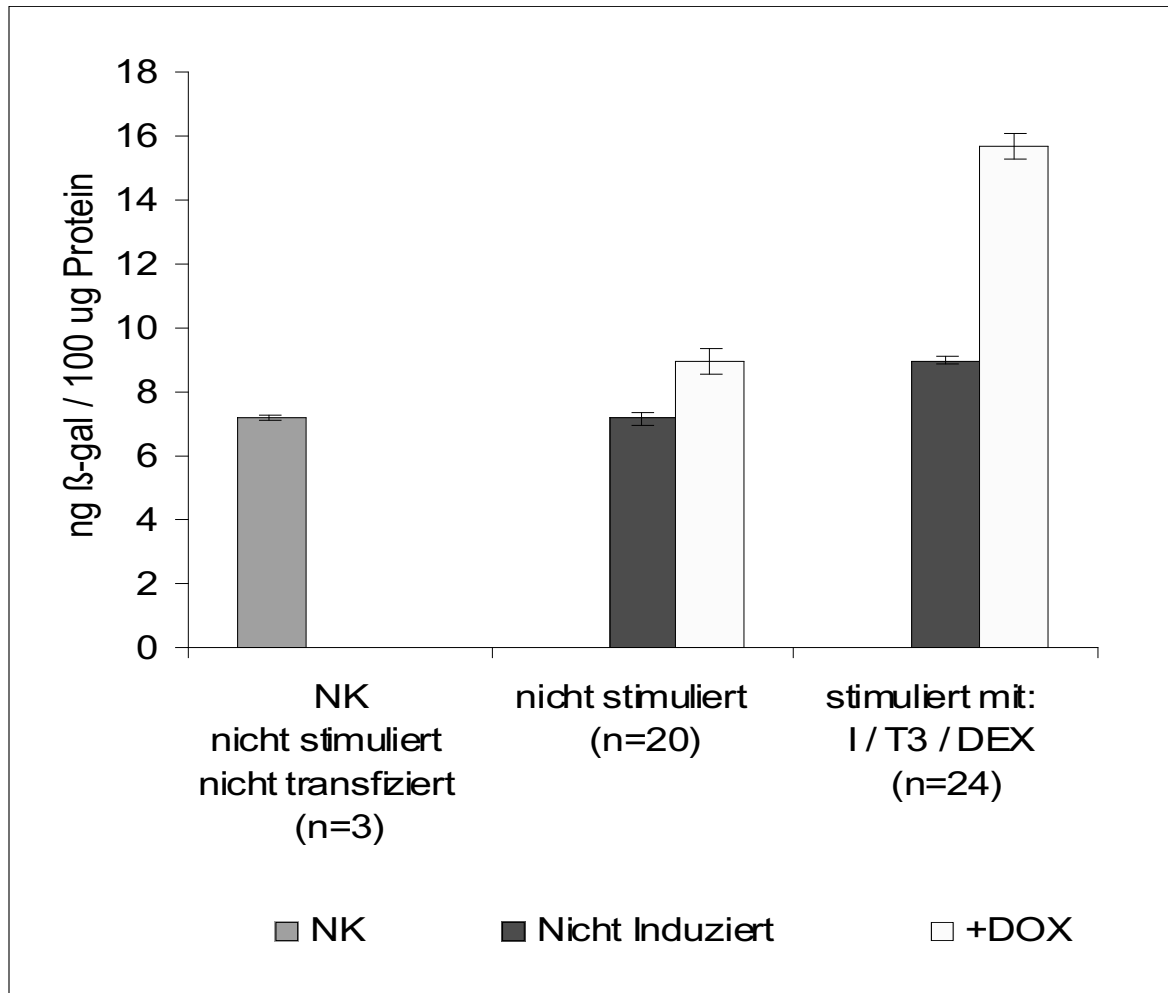


Abbildung 27: DOX-Induktion nach stimulierter Aktivität des α -MHC Promotors. Induktion der Expression von β -Galaktosidase mit DOX nach der Transfektion von neonatalen Kardionzyten mit α -MHCp/*tetR*/*hgh* und α -MHCp/*tetO*/*lacZ*/*hgh*. 24 Zellkulturen wurden mit Insulin (I), Dexamethason (DEX) und Trijodthyronin (T3) behandelt, um die Aktivität des α -MHC Promotors zu steigern. Nach der Stimulierung der Promotoraktivität wurde die DOX-induzierte Reporterexpression signifikant gesteigert ($p < 0,05$). NK = Negative Kontrolle; Zellkulturen, die nicht transfiziert und stimuliert wurden. Anzahl der Versuche = n.

5.5 Expressionsmuster des α -MHC Promotors in transgenen Mäusen

Parallel zu den Experimenten in kultivierten Zellen wurde damit begonnen, transgene Mauslinien zu züchten. Um das *tetR*/*tetO*-System in Mäusen zu etablieren, wurden neben Mäusen, die herzspezifisch den *tetR* exprimieren, auch transgene Mäuse hergestellt, die herzspezifisch das Reporterogen β -Galaktosidase exprimieren. Bei diesen Mäusen enthält das

Transgen zwei *tetO*-Sequenzen zwischen α -MHC Promotor und dem *lacZ*-Gen. Diese Mäuse wurden dazu verwendet, das Expressionsmuster des α -MHC Promotors zu untersuchen. Zusätzlich wurde geprüft, ob die Transgene negative Auswirkungen auf den Wirtsorganismus haben.

Zur Untersuchung des Expressionsmusters des α -MHC Promotors wurden je zwei transgene Mäuse aus vier verschiedenen Linien, welche das *α -MHCp/tetO/lacZ/hgh*-Konstrukt enthalten (*lacZ*-Mäuse), getötet. Herz, Lunge, Nieren, Leber, ein Teil der Skelettmuskulatur, Gehirn und Zunge wurden herauspräpariert und mit einer Schere zerkleinert. Zusammen mit 1 ml Lysepuffer (100 mM Kaliumphosphat pH 8,0; 1 mM Magnesiumchlorid; 0,05 mM DTT) / 100 mg Gewebe wurden die Organe homogenisiert und der Zelldebris abzentrifugiert (8000 rpm / 5 min). Die β -Galaktosidase-Konzentration im klaren Lysat wurde mit dem Galacto Light Plus Kit (Tropix) und dem Photoluminometer Lumat LB 9501 (Berthold) ermittelt. Zusätzlich wurde anhand eines Bradford-Assays die Gesamtproteinkonzentration im Lysat bestimmt. Dadurch wurden Schwankungen des Proteingehalts im Zelllysat beim Vergleich der erhaltenen β -Galaktosidase-Werte abgeglichen. Die Menge des Reportergens wird im Folgenden als der jeweilige Anteil an β -Galaktosidase in ng pro 100 μ g Gesamtprotein angegeben.

Zusätzlich wurden drei *lacZ*-Mäuse getötet und über den kannulierten linken Ventrikel mit 2 % Paraformaldehydlösung perfundiert. Die vorfixierten Organe oder Teile davon (Herz, Lunge, Gehirn, Nieren, Leber, Zunge und Skelettmuskulatur) wurden entnommen. Nach dem Waschen mit PBS (1x) wurden die Organe mit 0,1 % X-gal-Lösung inkubiert (12 h / 37°C) und mit 2 % Paraformaldehyd- und 0,1 % Glutaraldehydlösung in PBS fixiert (12 h / 4°C). Dabei färbten sich Zellen, die β -Galaktosidase exprimiert hatten, blau. Zur Kontrolle wurden auf diese Art die Organe von zwei WT-Mäusen präpariert. Zusätzlich wurden von zwei *lacZ*-Mäusen histologische Schnitte von Herz und Lunge angefertigt. Dazu wurden von den vorfixierten Organen (s.o.) Gefrierschnitte angefertigt und mit X-gal-Lösung inkubiert (s.o.). Dabei färbten sich Zellen, die β -Galaktosidase exprimiert hatten, blau.

Wie erwartet und in früheren Publikationen beschrieben (Subramaniam et al., 1991; Franz et al., 1997), beschränkte sich die Aktivität des α -MHC Promotors hauptsächlich auf das Herz der transgenen Mäuse (Abb. 28). Die Expression von β -Galaktosidase wurde sowohl in den Ventikeln als auch in den Atria beobachtet (Abb. 29 b-d). Die Expression des Reportergens war jedoch sehr heterogen und nicht in allen Zellen zu beobachten, wie in histologischen Gefrierschnitten deutlich wurde (Abb. 29 e-f). Um einen quantitativen Eindruck der heterogenen Expression von β -Galaktosidase im Herzen zu erlangen, wurden aus einer *lacZ*-Maus adulte Kardiozyten isoliert und auf einer gerasterten Zellkulturschale kultiviert. Nach anschließender

Inkubation mit X-gal-Lösung wurde deutlich, dass nur etwa 10 % der Kardiozyten β -Galaktosidase exprimiert hatten (Abb. 29 g). Eine starke Expression wurde des Weiteren in den Wänden der Lungenvenen (*Vena pulmonaris*) beobachtet (Abb. 29 h). Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen (Subramaniam et al., 1991). Eine geringe endogene β -Galaktosidase-Aktivität, die auch bei WT Mäusen beobachtet wurde, zeigte sich in der Leber.

Die Ergebnisse bestätigen, dass mit dem α -MHC Promotor bestückte Transgene herzspezifisch exprimiert wurden. In den untersuchten Mauslinien zeigte sich zudem eine ausreichend starke Expression des Reportergens, die hohe Expressionsraten von anderen Transgenen gewährleisten. Die Aktivität des Promotors in den Lungenvenen ist zu berücksichtigen. Die Resultate dieser Versuche unterstützen die Wahl dieses Promotors für die Verwendung in transgenen Modellen kardialer Krankheiten, wie z.B. der FHC.

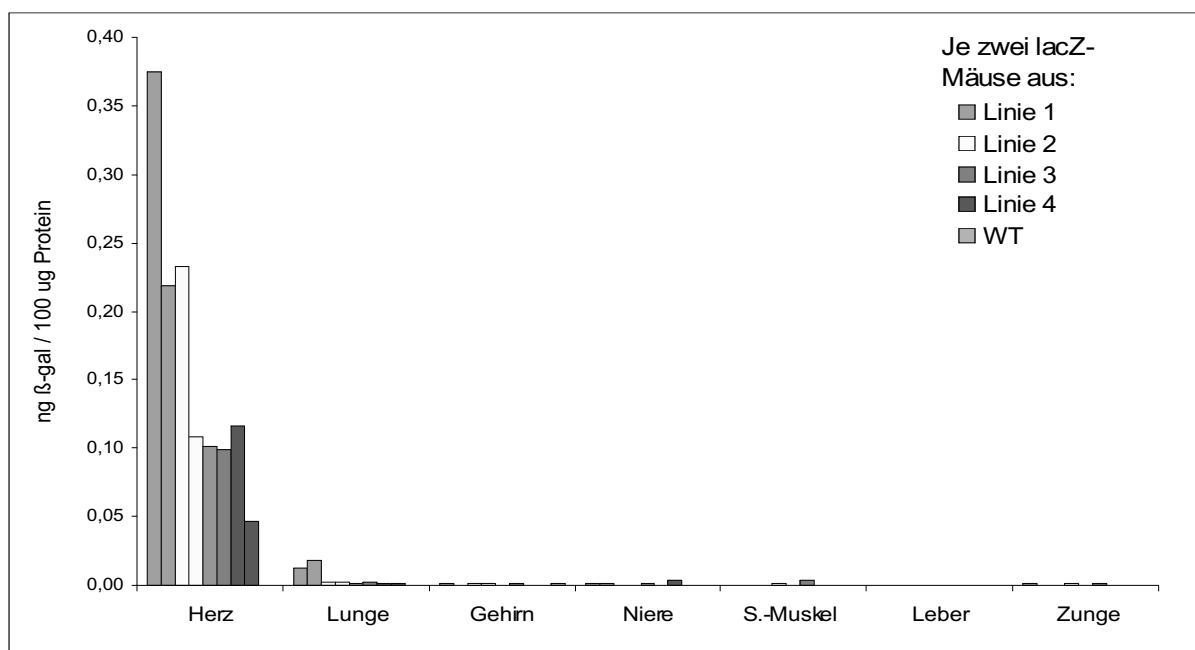


Abbildung 28: *Expressionsmuster des α -MHC Promotors in transgenen Mäusen.* Untersucht wurden je zwei *lacZ*-Mäuse aus vier Linien, die das Transgen *α -MHCp/tetO/lacZ/hgh* enthalten. Die Aktivität des Promotors beschränkt sich auf das Herz. Neben etwas endogener Expression von β -Galaktosidase in den Nieren, die auch bei WT Kontrollen gefunden wurde, zeigte sich eine geringe Promotoraktivität auch in der Lunge. Die Werte wurden durch einen Chemolumineszenztest im klaren Lysat der Organe ermittelt.

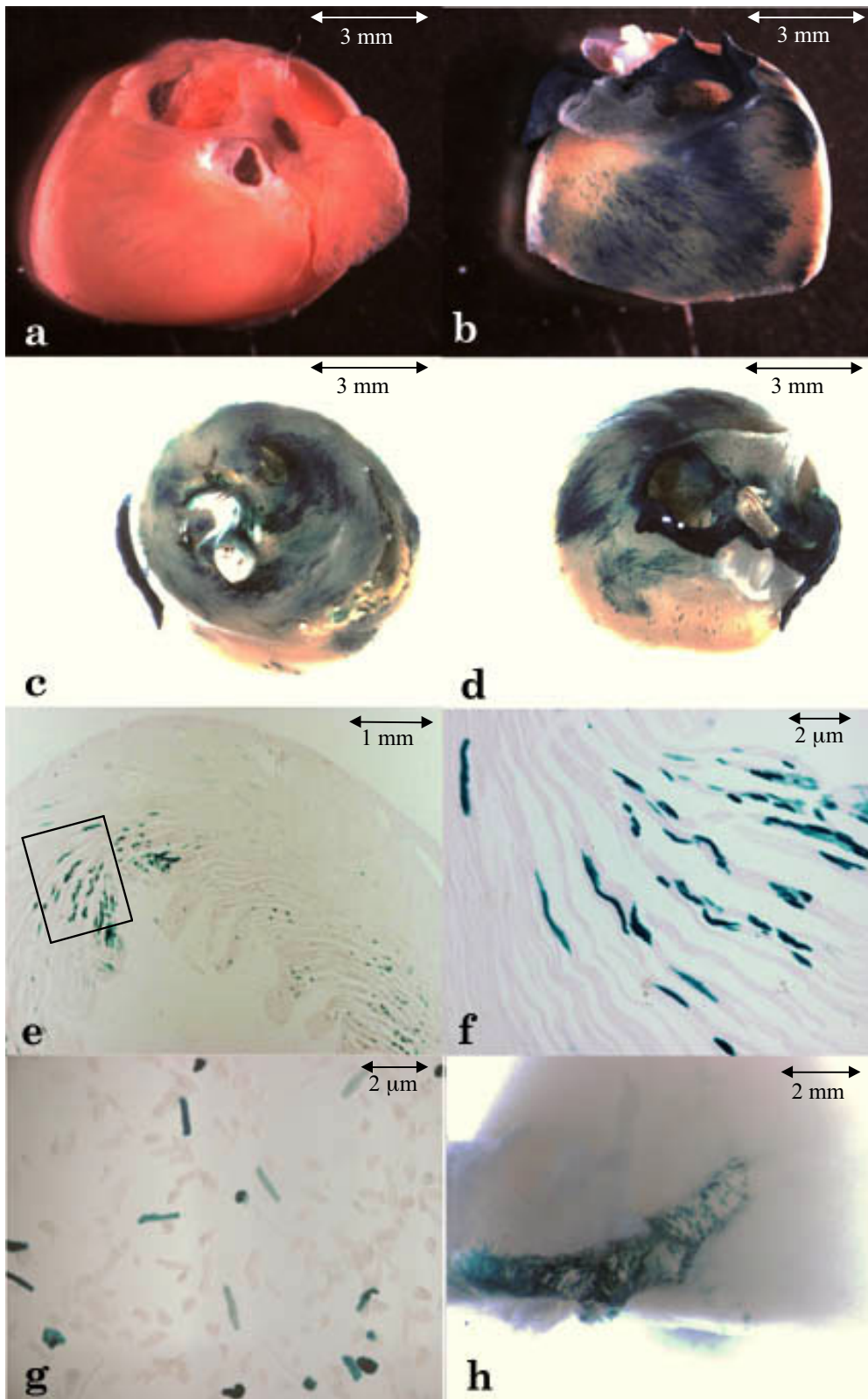


Abbildung 29: β -Galaktosidase-Expression in transgenen Mäusen. Expressionsmuster des α -MHC Promotors in transgenen Mäusen, die das α -MHCp/tetO/lacZ/hgh Konstrukt enthalten (lacZ-Mäuse). Expression von β -Galaktosidase ist an der blauen Färbung zu erkennen. (a) Ventrale Ansicht auf das Herz einer WT-Maus als Kontrolle. (b-d) Herz einer lacZ-Maus, wobei b. eine ventrale Ansicht, c. ein medianer Schnitt durch die Ventrikel und d. eine craniale Aufsicht ist. (e, f) Histologische Schnitte des rechten Ventrikels (f Ausschnitt von e). (g) Kultivierte und X-gal gefärbte adulte Kardiozyten einer lacZ-Maus. (h) Teil der Lunge einer lacZ-Maus mit Expression von β -Galaktosidase in der *Vena pulmonalis*.

6 Diskussion

Um zur Erforschung der pathologischen Mechanismen der FHC beizutragen sind wir an einem Mausmodell dieser Krankheit interessiert, bei dem die Expression der FHC-verursachenden Transgene durch ein einfach zu bedienendes externes „Signal“ (tet, bzw. dessen Derivat DOX) steuerbar ist.

Eine bereits existierende Technik, die in diesem Zusammenhang viel versprechende Perspektiven eröffnet, ist die tetrazyklingesteuerte Genexpression, wie sie von Gossen und Bujard (1992) entwickelt wurde. Bei diesem System wurde der Tetrazyklinrepressor (tetR) mit einem viralem Transaktivator der VP16-Domäne zu einem von Tetrazyklin (*tet*) gesteuerten Transkriptionsaktivator (tTA) verschmolzen. In Abwesenheit von *tet* (dem Induktor) bindet tTA an *tetO* und induziert damit die Expression des von dem hCMV Promotor kontrollierten Transgens. Neben der Etablierung dieses „tet-OFF“-Systems (die Anwesenheit von *tet* schaltet die Expression des betreffenden Gens ab) in kultivierten eukaryotischen Zellen wurde es erfolgreich in transgenen Mausmodellen etabliert (Kistner et al., 1996; Redfern et al., 1999). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Verwendung des Fusionsproteins tTA in transgenen Mäusen toxische Nebeneffekte provoziert (siehe auch Einleitung, S. 8). Ferner muss die Transkription der Transgene durch Verabreichung von *tet* während der gesamten Entwicklung (auch während der Embryogenese) inhibiert werden, was den immunologischen Status der Tiere möglicherweise negativ beeinflusst. Da dabei zugleich hohe Gewebekonzentrationen des Induktors entstehen, ist die Induktion der Transgenexpression durch Entzug von *tet* zeitlich nicht gut steuerbar (Deutsch, U., MPI Bad Nauheim, persönliche Mitteilung).

Wir haben daher an einem „tet-ON“-System gearbeitet, das keine viralen Komponenten enthält und auf die Zufuhr des Induktors *tet* mit der Anschaltung des zu prüfenden Gens reagiert. Ein solches System existiert bereits. Es wurde jedoch bisher nur in Pflanzen (Gatz und Quail, 1988; Gatz et al. 1991; Kleinschmidt et al., 1988), dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Dingermann et al., 1992) und eukaryotischen Zellen (Yao et al., 1998) eingesetzt. Dabei wurden Elemente des nativen *tet*-Operons des Transposons *Tn10* aus *E. coli* verwendet. In diesem Operon blockiert der tetR in Abwesenheit des Induktors die Transkription eines auf *tetO* folgenden Gens. Zugabe von *tet* induziert die Transkription des vom Repressor inhibierten Gens. Mit diesem „tet-ON“-System können Nachteile des tTA-Systems vermieden werden. Es wurde jedoch bisher nicht an transgenen Tieren getestet. Aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwands, der mit der Etablierung von transgenen Mauslinien verbunden ist, war das vorrangige Ziel der hier durchgeführten Experimente die Prüfung der Frage, ob das bakterielle

„tet-ON“-System in isolierten neonatalen Rattenkardiozyten funktioniert. Die Herstellung von transgenen Mäusen sollte von den Ergebnissen abhängig gemacht werden. Es wurden deshalb in neonatale Kardiozyten und anderen kultivierte Zellen *in vitro* transient transfiziert, und zwar mit zwei Plasmiden gleichzeitig. Das eine enthielt das Gen für tetR, das zweite den *tetO* gefolgt von dem *lacZ*-Gen. Die *tet*-abhängige Expression des β -gal-Gens in neonatalen Kardiozyten zu zeigen, war besonders wichtig, da es sich bei diesem Zelltyp um die späteren Zielzellen der Transgene in den Mäusen handelt. Mit diesen Transgenen wurde anschließend versucht, die *tet*-kontrollierte Genexpression auf transgene Mäuse zu übertragen.

Der native tetR zeigte *in vitro* (in kultivierten Zellen) die erwartete Aktivität als Regulator des Reportergens, *in vivo* (in transgenen Mäusen) dagegen nicht. Die Gründe dafür, die nur vermutet werden können (s.u.), sind unklar. Daher konzentriert sich die Diskussion vorwiegend auf die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse.

Eine effiziente tetR/*tetO*-Kontrolle sollte in eukaryotischen Zellen (oder Geweben) folgende Bedingungen erfüllen (Mills, 2001): (1) Eine präzise Regulation ohne Hintergrundexpression des Reportergens. (2) Ein hohes Expressionsniveau des Reportergens, bzw. des späteren „Zielgens“, um die beabsichtigte physiologische Antwort in Zellen oder transgenen Tieren auch zu erhalten. (3) Der Induktor, in diesem Fall *tet*, sollte nur das „Zielgen“ regulieren, die Expression endogener Proteine nicht beeinflussen und keine toxischen Nebenwirkungen haben und er sollte die Expression endogener Proteine nicht beeinflussen. (4) Die Kontrolle des „Zielgens“ sollte reversibel sein. (5) Das System sollte sowohl *in vitro* in den Zellen in Kultur als auch *in vivo* (in transgenen Tieren) funktionieren.

Bei den Untersuchungen des tetR/*tetO*-Systems in Zellkulturen erwies sich der Umgang mit kultivierten neonatalen Kardiozyten im Gegensatz zu COS1-Zellen und L6 Myoblasten als problematisch. Besonders die Transfektion der neonatalen Kardiozyten mit herkömmlichen Methoden wie zum Beispiel mit Kalziumphosphatpräzipitation, Polyethylenimin (PEI) oder Fugene™ führte zu Ergebnissen mit hoher Schwankungsbreite bei insgesamt niedrigem Transfektionsniveau. Als effizientes Transfektionssystem standen Adenoviren nicht zur Verfügung, da ein dafür erforderliches S2-Labor in Bad Nauheim nicht existiert. Für die Transfektion neonataler Kardiozyten wurde daher das Helios Gene Gun System von BioRad gewählt. Mit diesem partikelgestützten, biolistischen Transfer von DNA konnten bei diesen Zellen Transfektionsraten von bis zu 15 % erreicht werden (Eizema et al., 1999, 2000). Bisher wurde dieses System vor allem für immunbiologische Fragestellungen (Fynan et al., 1993; Qiu et al., 1996; Chen et al., 2000) und bei gentherapeutischen Versuchen zur Verbesserung der Wundheilung (Davidson et al. 2000; Sohn et al., 2001) benutzt. Hier wurde es als Alternative für den Transfer von DNA in schwer zu transfizierende Zellen (neonatale Kardiozyten) benutzt.

Ein Nachteil des HGG Systems sind Schwankungen der Transfektionsraten, wenn es so benutzt wurde, wie vom Hersteller (BioRad) angegeben. Dies hängt mit der heterogenen Verteilung der DNA/Gold-Partikel in den Cartridges zusammen und führt bei der Transfektion zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Goldpartikel auf den beschossenen Zellen. Deshalb wurde das Standardprotokoll zur Herstellung der Cartridges verändert. Durch Verschließen der Cartridges mit Parafilm (siehe Abb. 2) wurden die Verteilung der Goldpartikel nach dem Beschuss verbessert und Verluste von Gold und DNA während der Präparation vermieden. Aufgrund der gleichmäßigeren Verteilung und der stärkeren Beschleunigung der Gold / DNA-Partikel auf die Zellkultur nach dem Beschuss, konnte mit drei getesteten Zelltypen eine Verdopplung bis Vervierfachung der Transfektionsausbeute erreicht werden (COS1-Zellen: 2,5x, L6 Myoblasten: 4,6x und neonatale Kardiozyten: 2x) (Abb. 14). Ein gewisser Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Cartridges nicht gelagert werden können, da die Gold / DNA-Partikel nach vollständigem Trocknen am Parafilm hängen bleiben. Da die Parafilm-Methode jedoch nicht aufwendig und leicht handhabbar ist, wiegt dieser Nachteil nicht schwer.

Zu beachten ist bei der Gene Gun, dass beim Beschuss der Zellen mit DNA/Gold-Partikel mit der Zerstörung eines (vermutlich kleinen) Teils der Zellen gerechnet werden muss. Insgesamt überwiegen jedoch die Vorteile dieses Verfahrens: (a) Die Transfektion ist einfach zu handhaben, leicht zu standardisieren und gut reproduzierbar. (b) Die Herstellung der DNA/Gold-Partikel ist nicht aufwendig. (c) Der Zeitbedarf für ein Transfektionsexperiment (ca. 2 h) ist gering (wenn man den Aufwand für die Isolierung der Plasmid-DNA nicht einrechnet). (d) Es werden keine Fremdproteine oder Substanzen benötigt, die die kultivierten Zellen (oder Versuchstiere) beeinträchtigen könnten. Ein weiterer Vorteil der Gene Gun ist, dass bei der Transfektion von zwei Plasmiden - wie im Fall des *tetR/tetO*-Systems - Zellen beide Plasmide mit hoher Wahrscheinlichkeit erhalten. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle Gold-Partikel gleichmäßig mit beiden Plasmiden beschichtet werden und damit alle transfizierten Zellen auch tatsächlich beide Plasmide erhalten.

Bei einem in der Literatur berichteten Vergleich verschiedener Transfektionssysteme (Gene Gun, Fugene6™, DOTAP, Kalziumphosphat) mit dem Reportergen β -Galaktosidase und einem anschließenden ELISA konnten bei neonatalen Kardiozyten mit der Gene Gun die besten Transfektionsergebnisse erreicht werden (Eizema et al., 1999). Die Expression des Reportergens lag dabei bis zu 50-fach höher als bei den anderen Methoden.

Die hier erreichten Ergebnisse zeigen, dass bei der Transfektion von COS1-Zellen und L6 Myoblasten die biolistische Technik mit anderen Transfektionsmethoden (z.B. Lipofektin oder Kalziumphosphatpräzipitation) vergleichbar gut ist. Bezogen auf die Gesamtzellzahl konnten mit der Gene Gun bei COS1-Zellen 18,5 % und L6 Myoblasten 14,6 % der Zellen erfolgreich

transfiziert werden (Tab. 3). Bei der Transfektion von neonatalen Kardiozyten ist die Transfektionseffizienz immer noch gering. Bezogen auf die Gesamtzellzahl wurden 0,54 % der Zellen transfiziert. Betrachtet man allerdings bei der Auswertung nur solche Bereiche der Zellkultur, in denen der Partikelstrom mit optimaler Dichte und Geschwindigkeit zu den höchsten Transfektionraten führte, so steigert sich die Transfektionseffizienz bis auf ca. 10 % der Zellen (Abb. 20 und Anhang 9.2). Dieser Wert übertrifft bei diesem Zelltyp andere getestete Transfektionsmethoden (Eizema et al., 1999, 2000 und eigene Beobachtungen). Es ist zwar problematisch zwischen schlecht und gut transfizierten Bereichen auf einer Zellkulturschale zu unterscheiden, weil diese Unterscheidung auf visueller Inspektion beruht und damit nicht völlig frei von subjektiven Kriterien ist. Aber es ist nicht völlig unplausibel, Bereiche in der Schale, die vom Partikelstrom offensichtlich nicht erreicht wurden, bei der Auswertung der Ergebnisse zu vernachlässigen. Eine Effizienz von 10 % dürfte eine plausibel geschätzte Obergrenze des biologischen Transfektionssystems bei neonatalen Kardiozyten darstellen. Damit waren die Voraussetzungen für eine Prüfung des bakteriellen *tetR/tetO*-Systems zunächst an kultivierten COS1-Zellen und L6 Myoblasten sowie anschließend an neonatalen Kardiozyten geschaffen.

In den dazu durchgeführten Experimenten wurde nach der Transfektion die Expression des Reportergens durch Zugabe von DOX induziert. Die beiden Plasmide mit dem *tetR*-Gen einerseits und dem Reportergen andererseits wurden in einem stoichiometrischen Verhältnis von 1 : 1 eingesetzt. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde nach Induktion um das mind. 3-fache im Vergleich zu transfizierten und nicht induzierten Zellkulturen gesteigert (Abb. 22). Dabei zeigte sich, dass der Hintergrund an β -Galaktosidase-Aktivität, der in nicht induzierten Zellen bis zu 50 % gemessen an der DOX-Induzierten Reportergenaktivität lag, mit einer Erhöhung der *tetR*-Plasmid-Konzentration gegenüber der *tetO/lacZ*-Plasmid-Konzentration reduzierbar war. Bei COS1-Zellen wurde die Hintergrundexpression bei einem stoichiometrischen Verhältnis von 6 : 1 (*tetR* : *tetO/lacZ*) auf 12,5 % und bei L6 Myoblasten auf 6,8 % im Vergleich zu DOX-induzierten Zellkulturen reduziert (Abb. 23). Ferner wurde an COS1-Zellen und L6 Myoblasten demonstriert, dass die Inhibition des Repressors und damit der Induktionserfolg von der Konzentration von DOX im Medium abhängig ist. Dabei wurde mit 1 μ g / ml Medium ein Maximum der Induktion erzielt.

Die Reversibilität der Induktion wurde hier nicht getestet. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass nach Entfernung von DOX aus dem Medium die Expression eines Transgens rückgängig gemacht werden kann. Das wurde an der reversiblen Expression von anti-HSV-1 Aktivität in Vero-Zellen demonstriert (Yoa et al., 1999).

In den bisher diskutierten Transfektionsversuchen war als Promotor der ubiquitäre hCMV Promotor verwendet. Dieser gewährleistete zelltypunspezifisch hohe Expressionsraten und

sicherte so den Nachweis der Funktion des *tetR/tetO*-Systems. Ein wichtiger Aspekt der geplanten Etablierung dieses Systems in transgenen Mäusen war aber, dass seine Funktion auf das Herz beschränkt werden sollte. Daher wurden die im weiteren Verlauf benutzten Transgene (*tetR* und *tetO/lacZ*) mit dem herzspezifischen α -MHC Promotor ausgestattet. Mit diesem Promotor konnten dann nur noch Versuche mit Kardiocyten durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass dieser Promotor allein für eine ausreichende Expression der Transgene in neonatalen Herzmuskelzellen nicht ausreichend war (Abb. 25). In kleinen Nagetieren wie Mäuse und Ratte wird die schnelle α -Myosin Isoform vorwiegend postnatal im adulten Herzen exprimiert (Subramaniam et al., 1991). Es könnte sein, dass der α -MHC Promoter in dem Entwicklungsstadium, aus dem die hier benutzten Kardiocyten stammen, nur eingeschränkt aktiv ist. Um die mit dem α -MHC Promotor ausgestatteten Gene dennoch in diesen Zellen zu testen, wurde geprüft, ob seine Aktivität durch Zugabe von Dexamethason (Dex), Insulin (I) und Trijodthyronin (T3) gesteigert werden kann.

Dexamethason ist eine Glukokortikoid, das unter anderem bei der Behandlung von bronchopulmonarer Dysplasie bei Neugeborenen eingesetzt wird (Cummings et al., 1989). Schon vor längerer Zeit wurde beobachtet, dass eine Therapie mit Dex in Neugeborenen mit hypertrophischer Kardiomyopathie assoziiert sein kann (Werner et al., 1992). Von diesem Pharmakon ist bekannt, dass es die Aktivität des α -MHC Promotors stimuliert (Clark et al., 1986; Kurowski et al., 1990; Czerwinski et al., 1991; Della Bruna et al., 1995).

Trijodthyronin beeinflusst die α -MHC Promotoraktivität indirekt über ein vermutlich komplexes System von Thyroidhormon-Rezeptoren, weiteren nuklearen Rezeptoren und *cis*-regulatorischen Elementen in der DNA, die bei kleinen Nagetieren gemeinsam einerseits die β -MHC Expression postnatal vermindern und andererseits die Transkription des α -MHC Gens verstärken (Flink und Morkin, 1990; Glass und Holloway, 1990; Rottman et al., 1990; Rosen et al., 1991; Thompson et al., 1991; Edwards et al., 1994).

Insulin hat hingegen nur in Gegenwart von T3 eine verstärkte α -MHC Promotor Aktivität zur Folge. In transgenen Ratten mit einer Thyroidhormon-Insuffizienz und Diabetes wurde gezeigt, dass die höchsten Expressionsraten von α -MHC nach Zugabe von exogenem T3 und I beobachtet wurden (Haddad et al., 1996). T3 oder I allein hatten hingegen keine Auswirkung auf die α -Myosinexpression.

Hier wurden alle drei Hormone gemeinsam, getrennt oder in wechselnden Kombinationen in ihrer Wirkung auf die Aktivität des α -MHC Promotors getestet (Abb. 25). Nach der Isolierung der Zellen wurden sie direkt mit T3, I und Dex ausplattiert. Nach einem Tag wurden die Zellen mit den Komponenten des *tetR/tetO*-Systems transfiziert und mit DOX induziert. Es zeigte sich,

dass allein nur Dex die Aktivität des Promotors um das 1,8-fache steigerte. T3 oder I hatten einzeln keine Auswirkung auf die Promotoraktivität. Erst als beide Substanzen gemeinsam in das Medium gegeben wurden, war eine Verdopplung der Promotoraktivität im Vergleich zu nicht stimulierten neonatalen Kardiozyten feststellbar, was sich mit den aus der Literatur bekannten Beobachtungen deckt (s.o.). Durch Zugabe von I + Dex konnte die Aktivität des α -MHC Promotors nicht mehr gesteigert werden als durch Dex allein. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivitätssteigerung in diesem Fall wahrscheinlich nur auf Dex zurückzuführen ist. Die höchste Steigerung der Promotoraktivität wurde beobachtet, als T3 + Dex (4-fach) oder I + T3 + Dex gleichzeitig in das Medium gegeben wurden (5-fach). Die Werte für die beobachteten Stimulierungen schwanken stark, insbesondere die nach Zugabe von T3 + Dex und von I + T3 + Dex erhaltenen. Die Unterschiede zwischen den letzteren beiden Kombinationen sind statistisch nicht signifikant. In den weiteren Versuchen wurde jedoch die Dreierkombination verwendet, da die höchsten Mittelwerte in 11 Versuchen mit diesen erhalten wurden.

Die gesteigerte Aktivität des Promotors reichte aus, um ausreichende Transgenexpression zu induzieren und die kontrollierte Genexpression anschließend durch die Zugabe von DOX zu demonstrieren. Die Reprotergenexpression wurde dabei durch Zugabe des Induktors (DOX) verdoppelt (Abb. 27).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das *tetR/tetO*-System unter Kontrolle des α -MHC Promotors erfolgreich funktioniert. Damit war ein entscheidendes Argument dafür erhalten worden, dass - jedenfalls im Prinzip - die *tet*-regulierte Transgensteuerung in der „*tet*-ON“-Version in Mäusen möglich sein sollte.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden in weiteren Versuchen drei Arten transgener Mauslinien etabliert: (a) transgene Mäuse, die nur das *tetR*-Konstrukt (*α -MHCp/tetR/hgh*, im folgenden *tetR*-Mäuse genannt) enthielten. Diese Mäuse sollten nur *tetR* unter Kontrolle des α -MHC Promotors exprimieren. (b) Parallel dazu wurden transgene Mäuse etabliert, die als Reporter das Gen für β -Galaktosidase, ebenfalls versehen mit dem α -MHC Promotor (*α -MHCp/tetO/lacZ/hgh*, im folgenden „*lacZ*-Mäuse“ genannt), enthielten. Das Transgen zur Expression von β -Galaktosidase enthält dabei zwei *tetO*-Sequenzen zwischen dem α -MHC Promotor und dem *lacZ*-Gen. (c) Durch Kotransfektion des *tetR*-Konstruktes (*α -MHCp/tetR/hgh*) und des *tetO/lacZ*-Konstruktes (*α -MHCp/tetO/lacZ/hgh*) wurden transgene Mäuse erzeugt, die das komplette *tetR/tetO*-System enthielten (im folgenden *tetR/O-lacZ* Mäuse genannt). Alternative zur Kotransfektion wurden doppelt transgenen Mäuse durch Kreuzung von *tetR*- und *lacZ*-Mäusen gezüchtet.

Mäuse aus verschiedenen etablierten Linien hatten ein normales Körpergewicht und zeigten kein verändertes Trink- oder Fressverhalten. Paarungen zur Weiterzucht verliefen bei normalen Wurfgrößen problemlos. Bei den untersuchten Organen wurden keine anatomischen Veränderungen zwischen transgenen und Wildtypmäusen festgestellt. Daraus wird – mit Vorbehalt – geschlossen, dass Transgene keinen Einfluss auf den Phänotyp hatten. Diese Schlussfolgerung bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

In vier *lacZ*-Mauslinien wurde zunächst die Aktivität des transgenen α -MHC Promotors untersucht. Wie erwartet beschränkte sich die Expression des Reportergens *lacZ* auf das kardiale System (Abb. 28). Es zeigte sich jedoch, dass nicht alle Zellen β -Galaktosidase exprimierten. Bei X-gal-Färbungen von Herzen und histologischen Schnitten des Herzens zeigten deutlich weniger als die Hälfte der Herzzellen blaue Färbung. In Experimenten, deren Durchführung im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beschrieben wird, wurden aus einer *lacZ*-Maus adulte Kardiozyten isoliert und kultiviert. Nach der Inkubation der Zellen mit X-gal zeigten nur etwa 10 % der Kardiozyten Reportergenaktivität (Blaufärbung) (Abb. 29 g).

Bis jetzt gibt es (in der Literatur) keine Hinweise darauf, dass mit den nativen Elementen des *tet*-Operons eine extern kontrollierte Transgenexpression in Tieren etabliert werden kann. Die Entscheidung, ein künstliches Fusionsprotein (tTA) (Gossen und Bujard, 1992) anstelle der nativen Elemente des *tet*-Operons auf Tn10 aus *E. coli* in transgenen Mausmodellen zu verwenden, war damit begründet worden, dass eine für eine Genkontrolle (Repression) ausreichend hohe Expression des nativen tetR nicht für möglich gehalten wurde (Gossen et al., 1993; und pers. Mitteilung).

Gegen diese Vermutung sprachen zunächst die hier beschriebenen Resultate an Rattenkardiozyten *in vitro*, dann aber auch Ergebnisse aus der Literatur, nach denen in einem Wundheilungsmodell am Schwein der bakterielle tetR die erwartete Funktion als Genregulator hatte (Yao et al., 1998). Bei den tetR/*lacZ*-Mäusen konnte eine entsprechende, DOX-abhängige Expression des *lacZ*-Gens nicht nachgewiesen werden. Bei acht untersuchten Mäusen, die sämtlich sowohl das tetR-Gen wie auch das *lacZ*-Gen enthielten, wurden sowohl bei den nicht induzierten wie bei DOX-induzierten Mäusen (jeweils 4 wurden getestet) ähnlich hohe β -Galactosidasewerte im Herzmuskel nachgewiesen. (Die Zahl der Kopien der tetR-Gene und der β -gal-Gene war in diesen Versuchen nicht bestimmt worden.)

Eine naheliegende Erklärung für das negative Ergebnis könnte eine nicht ausreichende Konzentration an tetR-Molekülen in den Herzmuskelzellen der transgenen Tiere sein. Ein Nachweis von tetR-Protein im Westernblot und in der Immunhistochemie mit Hilfe kommerzieller Antikörper wurde versucht, führte aber zu keinem Ergebnis. Dass die tetR-

Konzentration eine kritische Größe ist, war ja in den *in vitro* Transfektionsversuchen mit COS1-Zellen und L6 Myoblasten eindeutig gezeigt worden (Abb. 23).

Eine zu niedrige Konzentration könnte theoretisch auf verschiedene Umstände zurückgeführt werden. Erstens könnte vermutet werden, dass der murine α -MHC Promoter in der vorliegenden Transgenkonstruktion weniger aktiv ist als der endogene physiologische α -MHC Promoter. Ein zweites, verwandtes Argument bezieht sich auf die unbekanntenen Integrationsorte der tetR-Transgene im Genom der transgenen Mäuse. Die Rate der Transkriptionsinitiation könnte von einem für effiziente Transkription unvorteilhaften Integrationsort negativ beeinflusst sein. Eine hohe Genkopienzahl könnte den Mangel kompensieren, aber das ist keineswegs sicher. Drittens schließlich ist nicht auszuschließen, dass nicht die Transkription, sondern die Translation der kritische Engpass bei der Expression des Transgens ist. Das benutzte tetR-Gen ist bakterieller Herkunft und hat eine von eukaryotischen Genen abweichende Codonnutzung. Dass diese ein kritischer Faktor bei der Expression prokaryotischer Gene in eukaryotischen Organismen sein kann, ist bekannt. So war ein lac-Repressor aus *E. coli* in Mäusen erst nach Anpassung an eukaryotische Codon-Häufigkeiten exprimierbar, wie an der Regulation eines Tyrosinase-Gens als Reporter gezeigt wurde (Cronin et al. 2001).

Eine unzureichende Transkriptionsrate des tetR-Gens wurde bisher nicht bündig ausgeschlossen. Entsprechende Experimente zum Nachweis der tetR mRNA sind z.Z. noch in Bearbeitung. Ein genetisches "remodelling" mit dem Ziel einer Anpassung der Codonnutzung des tetR-Gens an eukaryotische Regeln scheint gleichwohl in hohem Maße plausibel. Es wurde deshalb (von Dr. Sakthivel im Bad Nauheimer Labor) eine Angleichung des tetR-Gens an seine eukaryotische Codon-Umgebung durchgeführt (nach Maßgabe von Wells et al., 1999). Ein entsprechend verändertes tetR-Gen wurde inzwischen in doppelt transient transfizierten Kardiozyten positiv getestet (Dr. Sakthivel, pers. Mitteilung). Mit einem neuen Injektionsversuch in Mäuse-Oozyten (Zygoten) wurde inzwischen ein erster Schritt zu neuen, modifizierten tetR-Mäusen unternommen. Ergebnisse dazu werden in einigen Monaten erwartet.

Ogleich transgene Mausmodelle der FHC wichtige Erkenntnisse über Ursachen und Symptome dieser Herzkrankheit erbrachten, gibt es noch kein vollständiges Bild der Pathogenese dieser Krankheit. In einer neuen Veröffentlichung über Tiermodelle von kardiovaskulären Krankheiten wird festgestellt, „es ist demütigend zu erkennen, dass wir vorhaben, ein komplexes physiologisches System zu beschreiben ohne über ein komplettes Verständnis oder ausreichende Kenntnis der Identität der beteiligten ‚Mitspieler‘ zu verfügen“ (Daloz et al., 2001). Es ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt, ob eine Mutation in einem der kardialen Gene zu einem Mangel an intaktem Protein führt und durch

Haploinsuffizienz zum Krankheitsverlauf beiträgt oder ob „poison polypeptide“-Mechanismen verantwortlich sind, bei denen ein fehlerhaftes Protein exprimiert wird und nach Einbau in das Sarkomer zu Funktionsdefiziten führt.

In der Folge von Beeinträchtigungen des kontraktiven Apparates im Herzen führen Mutationen in kardialen Genen sekundär möglicherweise über einen gestörten Kalziumhaushalt (Seidman et al., 2001) zu den typischen Symptomen der hypertrophischen Kardiomyopathie. Die Hypertrophie ist vermutlich eine Kompensationsreaktion der Zellen zum Ausgleich leichter Leistungsdefizite bei der Kontraktion (Vosberg et al., 1998a). Die bekannten zytologischen und sonstigen Veränderungen im Myokard scheinen sich dabei erst sekundär zu entwickeln, wie u.a. aus dem protrahierten Verlauf dieser Krankheit geschlossen werden kann. Neue Arbeiten (Blair et al., 2001; Gollob et al., 2001) legen ferner die Vermutung nahe, dass die Symptome der FHC auf einen gestörten ATP-Haushalt der Zellen zurückzuführen sind.

Ein konditionales System, bei dem ein FHC-verursachendes Transgen gezielt von außen an- und ausgeschaltet werden kann, eröffnet neue Perspektiven für die Erforschung der Pathogenese der FHC. So wurde bereits an einem *in vivo*-Modell am Rattenherz gezeigt, dass mit dem tTA-System die Expression eines Reportergens (Luciferase) durch *tet* induziert wird (Fishman et al., 1994). Sollte es gelingen, ein mutiertes α -MHC Gen in transgenen Mäusen kontrolliert zu exprimieren und damit FHC-typische Veränderungen zu induzieren, könnten auch altersabhängige Effekte auf die Entwicklung von FHC-Phänotypen analysiert werden.

Ein über diese Arbeit hinausgehendes Ziel ist die Erforschung pathologischer Mechanismen von Mutationen im β -Myosin, von denen bekannt ist, dass sie in Menschen zu hypertrophischer Kardiomyopathie führen. Analog zum β -Myosin im Menschen wird in Mäusen die α -Myosin Isoform (92 % Sequenzübereinstimmung) adult exprimiert (Subramaniam et al., 1991; Rindt et al., 1995; Knotts et al., 1994). Daher wurde ein Transgen konstruiert, welches für die murine α -Myosin schwere Kette kodiert und die Mutation $\Delta E927$ enthält. Die Mutation führt analog im β -Myosin in einer indischen Familie zu einer malignen Variante der familiären Form der Hypertrophischen Kardiomyopathie (Waldmüller et al., 1999; Sakthivel et al., 2001). Das mutierte murine α -Myosin soll im transgenen Modell durch ein externes Signal (*tet*) in seiner Transkriptionsaktivität gesteuert werden, und zwar so, dass mit dem Signal das Gen angeschaltet wird. Experimente in Mäusen mit den schon klonierten α -MHC cDNAs (siehe 5.1.2 und 5.1.3) werden begonnen, sobald das *tetR/tetO*-System unter Verwendung des Reportergens β -Galaktosidase in transgenen Mäusen etabliert und erprobt wurden.

Die Steuerbarkeit eines FHC-verursachenden α -MHC Transgens in Mäusen würde eine ganze Reihe von experimentellen Möglichkeiten eröffnen, die das Wissen über die

pathogenetischen Mechanismen der Krankheit erweitern. Entscheidend ist, dass man z.B. durch nicht invasive Untersuchungsmethoden (Echokardiographie oder NMR) physiologische und anatomische Daten in einem Tier vor und nach der Induktion von FHC gewinnen kann. Wenn die Induktion der Transgenexpression zuverlässig reversibel ist (was zu zeigen sein wird), könnte man deren Expression stoppen und untersuchen, inwieweit eine Regression der FHC eintritt. Dass pathogenetische Prozesse, wie sie bei FHC vermutet werden, angehalten werden können, wurde unlängst an einem transgenen Mausmodell der FHC gezeigt, bei dem eine Inhibierung von Kalzineurin, einer kalziumregulierten Phosphatase, durch Zyklosporin zu einer Rückbildung einer hypertrophischen Kardiomyopathie führte (Lim et al., 2000). Die hier beschriebenen Versuche könnten helfen, Methoden auszuarbeiten, die erstens die Kenntnisse über pathologische Prozesse erweitern, und zweitens Wege zur therapeutischen Kontrolle dieser Prozesse aufzeigen.

7 Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Doktorarbeit ist die dominant erbliche hypertrophische Kardiomyopathie, eine Herzkrankheit, die mit Funktionseinschränkungen des Myokards und einem relativ hohen Risiko für einen plötzliche Herztod assoziiert ist. Als Ursachen wurden ca. 160 Mutationen in bisher zehn verschiedenen Genen nachgewiesen, die - mit einer möglichen Ausnahme - für Proteine des kardialen Sarkomers kodieren. Am häufigsten betroffen sind das ventrikelspezifische β -Myosin (schwere Kette) sowie das kardiale Myosin-Bindungsprotein C. Ein in Bad Nauheim initiiertes Projekt hat zum Ziel, die Wirkungen einer Mikrodeletion im β -Myosin (Deletion des Codons 927, $\Delta E927$) auf die Struktur und Arbeitsweise des Herzens in transgenen Mäusen zu untersuchen.

Es ist bei diesem Projekt beabsichtigt, die Expression des mutierten Myosin-Transgens so zu steuern, dass es nicht unkontrolliert dauernd (konstitutiv), sondern zeitlich kontrolliert (induzierbar) im Herzen exprimiert wird. Als Induktionssystem der Wahl ist dabei das bakterielle Tetrazyklinrepressor-System vorgesehen. Dieses besteht aus dem Repressor *tetR*, einer DNA-Repressor-Bindungssequenz *tetO* und einem von außen zugeführten Induktor (Tetrazyklin, *tet*, oder Doxyzyklin, DOX, einem *tet*-Derivat). Da dieses Regulationssystem vor dem aufwändigen Einsatz an transgenen Mäusen zunächst *in vitro* an Zellkulturen zu testen war, wurden für die transiente Transfektion von Zellen in Kultur zwei Plasmide (mit jeweils zwei verschiedenen Promotoren, also insgesamt vier Plasmide) hergestellt. Ein Plasmid enthielt den Repressor und das zweite die *tetO*-Sequenz mit einem nachgeschalteten Reportergen (*lacZ* für β -Galactosidase). Die beiden Promotoren waren der ubiquitäre virale CMV-Promotor (hCMV-Promotor) einerseits und der herz- und mäusespezifische α -Myosin-Promotor (α -MHC Promotor) andererseits. Getestet wurde die Regulierbarkeit des Reportergens in transient transfizierten COS1-Zellen, L6 Myoblasten sowie an neonatalen Kardiozyten von Ratten. Für die Kotransfektion von jeweils einem Paar der Plasmide (mit dem *tetR*-Gen, bzw. dem *tetO/lacZ*-Gen) wurde ein modifiziertes und in dieser Arbeit optimiertes ballistisches System (Gene Gun von BioRad) benutzt. Die Versuchsanordnung bestand aus Anzucht der Zellen, Transfektion, Induktion und Nachweis des Reporterenzym. Mit dem hCMV-Promotor wurde in allen drei getesteten Zelltypen eine von DOX abhängige Expression der β -Galaktosidase nachgewiesen. Mit dem α -MHC Promotor, der wegen seiner Herzspezifität nur an kardialen Rattenmyozyten getestet werden konnte, waren in der Standardversuchsanordnung (nach DOX Induktion) nur sehr geringe Mengen an β -Galaktosidase nachweisbar. Um die Regulierbarkeit des *lacZ*-Gens eindeutig zu demonstrieren,

wurden als Stimulatoren des α -MHC Promotors die Hormone Trijodthyronin, Insulin und Dexamethason einzeln und in Kombination verwendet. Die höchste Stimulierung (ca. 5-fach) wurde mit einer Kombination aller drei Hormone erreicht. In dieser Anordnung wurde damit gezeigt, dass das binäre tetR/*tetO*-System *in vitro* nach Induktion auch mit dem α -MHC Promotor funktioniert.

Mit diesem Resultat war - im Prinzip - der Weg für Experimente mit transgenen Mäusen vorgegeben. In Transgen-Linien mit Einzeltransgenen (entweder mit dem tetR-Gen oder dem *lacZ*-Gen, beide unter Kontrolle des α -MHC Promotors, letzteres zusätzlich mit der *tetO*-Sequenz für den Repressor) wurde die herzspezifische Expression der β -Galaktosidase eindeutig nachgewiesen, nicht jedoch die des tet-Repressors. Die Gründe dafür können gegenwärtig nur vermutet werden. Die Zahl der Genkopien könnte unzureichend gewesen sein. Da es sich um ein bakterielles Gen handelt, könnte auch eine ungünstige Codon-Verwendung einer effizienten Expression entgegenstehen. Zur Klärung dieser Umstände sind weitere Versuche (die nicht mehr Gegenstand dieser Doktorarbeit sind) inzwischen initiiert worden.

Das hier in Zellkultur getestete Regelsystem wird als tetON-System charakterisiert, bei dem das Transgen, dessen Expression kontrolliert werden soll (jetzt das Gen für β -Galaktosidase, später ein mutiertes ventrikelspezifisches Myosin), erst nach Zugabe des Induktors (Doxozyklin, bei Mäusen im Trinkwasser) aktiviert wird. Damit unterscheidet sich dieses System von vielfach benutzten tetOFF-Systemen. Diese bestehen aus einem hybriden Protein, das aus zwei verschiedenen Struktur/Funktionsdomänen besteht: der tet-Bindungsdomäne des bakteriellen tet-Repressors und einem viralen ubiquitären Transkriptionsaktivator (das Hybridprotein hat die Bezeichnung tTA). Die zu regulierenden Zielgene enthalten die *tetO*-Sequenz. Bindung von *tet* an tTA führt zur Dissoziation des tTA/*tetO*-Komplexes und damit zur Deaktivierung des Zielgens. Entzug von *tet* erlaubt die Bindung von tTA an den Promotor des Zielgens und ermöglicht damit dessen Transkription. Dieses System, dessen Funktionalität an Modellversuchen nachgewiesen wurde, hat gleichwohl Nachteile. Diese sind erstens auf eine gewisse Toxizität des Transkriptionsaktivators tTA und zweitens auf negative Wirkungen in Verbindung mit der Dauerzufuhr von Tetrazyklin (zur Unterdrückung der Expression des Zielgens) zurückzuführen. Da ein in der Literatur auch beschriebenes tTA-basiertes tetON-System als nicht ausreichend berichtet wird, erscheint der Aufwand für die Herstellung eines einfachen (nicht-viralen) und ggf. genetisch modifizierten tetON-Systems für die Anwendung an Mäusen sinnvoll und notwendig.

8 Literaturverzeichnis

- Amann, E., Brosius, J., Ptashne, M., (1983); Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *E. coli*; *Gene*, 25:167-178;
- Armaleo, D., Ye, G.N., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C., Johnston, S.A., (1990); Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi; *Cur.Gen.*, 17(2):79-103;
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., (eds.) (2000); Current protocols in molecular biology; John Wiley & Sons, Inc.; New York;
- Baron, U., Gossen, M., Bujard, H., (1997); Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential; *Nucleic Acid Res.*, 25(14):2723-2729;
- Becker, K.D., Gottshall, K.R., Hickey, R., Perriard, J.-C., Chien, K.R. (1997); Point mutation in human β Myosin heavy chain have differential effects on sarcomeric structure and assembly: an ATP binding site change disrupts both thick and thin filaments, whereas hypertrophic cardiomyopathy mutations display normal assembly; *J.Cell Biol.*, 137(1):131-140;
- Birnboim, H.C., Doly, J., (1979); A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA; *Nucl. Acids Res.*, 7(6):1513-1523;
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, L., Kerr, B., Salmon, A., Östman-Smith, I., Watkins, H., (2001); Mutations in the γ_2 subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis; *Hum. Mol. Gen.*, 10(11):1215-1220;
- Blondel, B., Roijen, I., Cheneval, J.P., (1971); Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts; *Experientia*, 27(3):357-358;
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W., (1985); A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus; *Cell*, 41(2):521-530;
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, P.J., Johnston, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C., (1988); Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles; *Science*, 240:1534-1538;
- Bradford, M., (1976); A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding; *Anal. Biochem.*, 72:248-254;
- Brent, R., Ptashne, M., (1981); Mechanism of action of the *lexA* gene product; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(7):4204-4208;

- Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P.E., Stewart, G.S., Kricka, L.J., (1994); Chemoluminescent and bioluminescent reporter gene assays; *Anal. Biochem.*, 219:169-181;
- Brown, M., Figge, J., Hansen, U., Wright, C., Jeang, K.T., Khoury, G., Livingston, D.M. and Roberts, T.M. (1987). Lac repressor can regulate expression from a hybrid SV40 early promoter containing a lac operator in animal cells. *Cell*, 49(5):603-612;
- Buja, L.M., Muntz, K.H., Rosenbaum, T., Haghani, Z., Buja, D.K., Sen, A., Chien, K.R., Willerson, T., (1985); Characterization of potentially reversible increase in β -adrenergic receptors in isolated, neonatal rat cardiac myocytes with impaired energy metabolism; *Circ. Res.*, 57(4):640-645;
- Chang, K.C., Figueredo, M., Schreur, J.H.P., Kariya, K., Weiner, M.W., Simpson, P.C., Camacho, S.A., (1997); Thyroid hormone improves function an Ca^{2+} handling in pressure overload hypertrophy, *J. of Clin. Invest.*, 100(7):1742-1749;
- Chen, Z., Kadowaki, S., Hagiwara, Y., Yoshikawa, T., Matsuo, K., Kurata, T., Tamura, S. (2000); Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase; *Vaccine*, 18(28):3214-3222;
- Chomczynski, P., Sacchi, N., (1986); Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform extraction; *Anal. Biochem.*, 162:156-159;
- Clark, A.F., DeMartino, G.N., Wildenthal, K. (1986); Effects of glucocorticoid treatment on cardiac protein synthesis and degradation; *Am J Physiol*, 250(6 Pt 1):C821-C827;
- Cronin, C.A., Gluba, W., Scrable, H. (2001); The *lac* operator-repressor system is functional in the mouse; *Genes and Develop.*, 15:1506-1517;
- Cummings, J.J., D'Eigenio, D.B., Gross, S.J., (1989); A controlled trial of dexamethasone in preterm infants at high risk for bronchopulmonary dysplasia; *New Engl. J. Med.*, 320(23):1504-1510;
- Czerwinski, S.M; Kurowski, T.T, McKee, E.E., Zak, R., Hickson, R.C. (1991); Myosin heavy chain turnover during cardiac mass changes by glucocorticoids; *J Appl Physiol* 70(1):300-305;
- Dalloz, F., Osinska, H., Robbins, J., (2001); Manipulating the contractile apparatus: genetically defined animal models of cardiovascular disease; *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33:9-25;
- Davidson, M.J., Krieg, T., Eming, S.A., (2000); Particle-mediated gene therapy of wounds; *Wound Rep. Reg.*; 8(6):452-459;
- Della Bruna, R, Ries, S., Himmelstoss, C., Kurtz, A., (1995); Expression of cardiac angiotensin II AT1 receptor genes in rat hearts is regulated by steroids but not by angiotensin II; *J. of Hypert.*, 13(7):763-769;
- Deuschle, U., Pepperkok, R., Wang, F.B., Giordano, T.J., McAllister, W.T., Ansorge, W., Bujard, H., (1989); Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and lac repressor; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5400-5404;

- Deuschle, U., Hipkind, R.A., Bujard, H., (1990); RNA polymerase II transcription blocked by Escherichia coli lac repressor; Science. 248:480-483;
- Dingermann, T., Werner, H., Schutz, A., Zundorf, I., Nerke, K., Knecht, D., Marschalek, R., (1992); Establishment of a system for conditional gene expression using an inducible tRNA suppressor gene; Mol. and Cell. Biol. 12(9):4038-4045;
- Edwards, J.G., Bahl, J.J., Cheng, S-Y., Morkin, E. (1994); Thyroid hormone influences β myosin heavy chain expression; Biochem. Biophys. Res. Comm., 199(3):1482-1488;
- Eizema, K., van Heugten, H.A.A., Bezstarosti, M., van Stetten, C., Lamers, M.J. (1999); *In vitro* analysis of SERCA2 gene regulation in hypertrophic cardiomyocytes and increasing transfection efficiency by Gene-Gun Biolistics; Annals New York Acad. Sci., 874:111-124;
- Eizema, K., van Heugten, H.A.A., Bezstarosti, M., van Stetten, C., Lamers, M.J. (2000); Endothelin-1 responsiveness of a 1,4 kb phospholamban promoter fragment in rat cardiomyocytes transfected by the Gene Gun; J. Mol. Cell Cardiol., 32:311-321;
- Feramisco, J.R., Helfman, D.M., Smart, J.E., Burridge, K., Thomas, G.P., (1982); *in* Molecular cloning (Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F., Ed.); Cold Spring Harbor Lab. Press, New York: S. 194-195;
- Figge, J., Wright, C., Collins, C.J., Roberst, T.M. and Livingston, D.M., (1988). Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by E.Coli lac repressor in monkey cells. Cell, 52(5):713-722;
- Fishmen, G.I., Kaplan, M.L., Buttrick, P.M., (1994); Tetracycline-regulated cardiac gene expression *in vivo*; J. Clin. Invest., 93:1864-1868;
- Flink, IL, Morkin, E., (1990); Interactions of thyroid hormone receptors with strong and weak cis-acting elements in the human α -myosin heavy chain gene promoter; Biol. Chem., 265(19):11233-11237;
- Franz, W.-M., Mueller, O.J., Hartong, R., Frey, N., Katus, H.A., (1997); Transgenic animal models: new avenues in cardiovascular research; J. Mol. Med., 75:115-129;
- Furth, P.A., Hennighausen, L., Baker, C., Beatty, B., Woychick, R., (1991); The variability in activity of universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene I enhancer/promoter in transgenic mice; Nucleic Acid Res., 19(22):6205-6208;
- Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L., (1993); DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal, and Gene-Gun inoculations; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 90(24):11478-82;
- Gatz, C., Kaiser, A., Wendenburg, R., (1991); Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet-repressor in transgenic tobacco; Mol. and Gen. Genet. 227(2):229-237;
- Gatz, C., Quail, P.H., (1988); Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85(5):1394-1397;

- Geisterfer-Lowrance, A.A.T., Christie, M., Conner, D.A., Ingwall, J.S., Schoen, F.J., Seidman, C.E., Seidman, J.G., (1996); A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy; *Science*, 272:731-734;
- Glass, C.K., Holloway, L.M., (1990); Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor; *Biochemica et Biophysica Acta.*, 1032(2-3):157-176;
- Gluzman, Y., (1981); SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants; *Cell*, 23(1):175-182;
- Gollob, M., Green, M.S., Tang, A.S.-L., Gollob, T., Karibe, A., Hassan, A.-S., Ahmad, F., Lozado, R., Shah, G., Fananapazir, L., Bachinski, L., Robert, R., (2001); Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome; *N. Engl. J. Med.*, 344(24):1823-1831;
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H., (1980); Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(12):7380-7384;
- Gossen, M., Bujard, H., (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89(12):5547-5551;
- Gossen, M., Bonin, A.L., Bujard, H., (1993); Control of gene activity in higher eukaryotic cells by procaryotic regulatory elements; *Trends in Biol. Sci.*, 18:471-475;
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H., (1995); Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells; *Science*, 269:1766-1769;
- Haddad, F., Masatsugu, M., Bodell, P.W., Qin, A., McCue, S.A., Baldwin, K.M., (1996); Role of thyroid hormone in control of cardiac isomyosin expression; *J Mol Cell Cardiol*, 29:559-569;
- Hall, C.V., Jacob, P.E., Ringold, G.M., Lee, F., (1983); Expression and regulation of *E. coli lacZ* gene fusions in mammalian cells; *J. of Mol: Appl. Genet.*, 2(1):101-109;
- Harary, I., McCarl, R., Farley, B., (1966); Studies *in vitro* on single beating rat heart cells. IX. The restoration of beating by serum lipids and fatty acids; *Biochem. et Biophysica Acta.*, 115(1):15-22;
- Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K., Meier, I., (1983); Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes. Equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions; *J. Mol. Biol.*, 169:707-721;
- Hillen, W., Berens, C., (1994); Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance; *Annual Review of Microbiol.*, 48:345-369;
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E., (1994); Microinjecting DNA into pronuclei; *in Manipulating the mouse embryo – a laboratory manual*; Second Edition, S.226-250, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York;
- Ish-Horowicz, D., Burke, J.F., (1981); Rapid and efficient cosmid cloning; *Nucl. Acids Res.*, 9(13):2989-2998;

- Jain, V.K., Magrath I.T., (1991); A chemoluminescent assay for quantitation of β -galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of β -galactosidase in *lacZ*-transfected cells; *Anal.Biochem*, 199(1):119-124;
- Johnston, S.A., Anziano, P.Q., Shark, K., Sanford, J.C., Butow, R.A., (1988); Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles; *Science*, 240:1538-1541;
- Kelly, R.B., Cozzarelli, N.R., Deutscher, M.P., Lehman, I.R., Kornberg, A., (1970); Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at single strand break; *J. Biol. Chem.*, 245(1):39-45;
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. (1987), High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells; *Nature*, 327:70-73;
- Kleinschmidt, C., Tovar, K-H., Hillen, W., Porschke, D., (1988); Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control; *Biochemistry*, 27(4):1094-1104;
- Kistner, A.; Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., Bujard, H., (1996); Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10933-10938;
- Knotts, S., Rindt, H., Neumann, J., Robbins, J., (1994); In vivo regulation of the mouse β myosin heavy chain gene; *J. Biol. Chem.*, 269(49):31275-31282;
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K. (1995), Inducible gene targeting in mice; *Science*, 269:1427-1429;
- Kurowski, T.T., Czerwinski, S.M., (1990); Glucocorticoid modulation of cardiac mass and protein; *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 22:312-315;
- Lang, T., Yu, L., Tu, Q., Jiang, J., Chen, Z., Xin, Y., Liu, G., Zhao, S., (2000); Molecular cloning, genomic organization, and mapping of *PRKAG2*, a heart abundant γ_2 subunit of 5'-AMP-activated protein kinase, on human chromosome 7q36; *Genomics*, 70:258-263;
- Lankford, E.B., Epstein, N.D., Fananapazir, L., Sweeney, L.E., (1995); Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing β -myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophy cardiomyopathy; *J. Clin. Invest.*, 95(3):1409-1414;
- Lehmann, I.R., (1981); DNA Polymerase I from *E. coli*; *in: The Enzymes*; (Boyer, P.D., ed.), Vol. 14A:16-38, Academic Press, San Diego;
- Lim, H.W., De Windt, L.J., Mante, J., Kimball, T.R., Witt, S.A., Sussman, M.A., Molkenkin, J.D., (2000); Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition; *J. Mol. Cell Cardiol.*, 32:697-709;
- Marko, M.A., Chipperfield, R., Birnboim, H.C. (1982); A procedure for large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder; *Anal. Biochem.*, 121:382-387;

- Mills, A.A., (2001); Changing colours in mice: an inducible system that delivers; *Gene and Dev.*, 15 1461-1467;
- Modrich, T., Lehmann, I.R., (1975); Enzymatic joining of polynucleotides; *J. Biol. Chem.*, 245(14):3626-3631;
- Muangmingsuk, S, Ingram, P., Gupta, M.P., Arcilla, R.A., Gupta, M. (2000); Dexamethasone induced cardiac hypertrophy in new-born rates is accompanied by changes in myosin heavy chain phenotypes and gene transcription; *Mol. Cel. Biochem.*, 209:165-174;
- Mullins, L.J., Mullins, J.J., (1996); Transgenesis in the rat and larger animals; *J. Clin. Invest.*, 97(7):1557-1560;
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986); Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction; *Cold Spring Harbour Symposium on quantitative biology*, 51 Pt 1:263-274;
- Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Toshima, H., Sasazuki, T., (1992); Novel myosin missense mutation in cardiac β myosin heavy chain gene found in a japanese patient with hypertrophic cardiomyopathy; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 188(1):379-387;
- Nelson, J.A., Reynolds-Kohler, C., Smith, B.A., (1987); Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene; *Mol. and Cell. Biol.*, 7(11):4125-4129;
- Novacovic, S., Knezevic, M., Golouh, R., Jezersek, B., (1999); Transfection of mammalian cells by methods of receptor mediated gene transfer and particle bombardment; *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 18(4):531-536;
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C., Evans, R.M., (1982); Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes; *Nature*, 300:611-615;
- Palmiter, R.D., Norstedt, G., Gelinas, R.E., Hammer, R.E., Brinster, R.L., (1983), Methallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice, *Science*, 222:809-814;
- Postle K. Nguyen TT. Bertrand KP. (1984). Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nuc. Acids Res.* 12(12):4849-4863;
- Prabhakar, R., Boivin, G.P., Grupp, I.L., Hoit, B., Arteaga, G., Solaro, R.J., Wieczorek, D.F, (2001); A familial hypertrophic cardiomyopathy α -Tropomyosin mutation causes severe cardiac hypertrophy and death in mice; *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33:1815-1828;
- Qiu, P., Ziegelhoffer, P.; Sun, J., Yang, N.S., (1996); Gene Gun delivery of mRNA *in situ* results in efficient transgene expression and genetic immunisation; *Gene Ther.*, 3(3):262-268;
- Reba, I., (1966); Application of the Coanda Effect; *Scientific American*, 214(Juni):84-92;
- Redfern, C.H., Coward, P., Degtyarev, M.Y., Lee, E.K., Kwa, A.T., Hennighausen, L., Bujard, H., Fishman, G.I., Conklin, B.R., (1999); Conditional expression and signaling of a

- specifically designed G1-coupled receptor in transgenic mice; *Nature Biotechnol.*, 17:165-169;
- Redwood, S., Moolman-Smook, J., Watkins, H., (1999); Properties of mutant contractile proteins that causes hypertrophic cardiomyopathy; *Cardiov. Res.*, 44:20-36;
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P., (1977); Labeling deoxyribonucleic acids to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I; *J. Mol. Biol.*, 113(1):237-251;
- Rindt, H., Knotts, S., Neumann, J., Robbins, J., (1995); An *in vivo* analysis of the transcriptional elements in the mouse α myosin heavy chain gene promoter; *Transgenic Res.*, 4(6):397-405;
- Ringold, G.M., (1983); Regulation of mouse mammary tumor virus gene expression by glucocorticoid hormones; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 106:79-103;
- Rosen, ED., O'Donnell, AL., Koenig, R.J. (1991); Protein-protein interactions involving erbA superfamily receptors: through the TRAP door; *Mol Cell Endocrinol*, 78(1-2):C83-C88;
- Rottman, J.N., Thompson, W.R., Nadal-Ginard, B.N., Mahdavi, V., (1990); Myosin heavy chain gene expression: interplay of cis and trans factors determines hormonal and tissue specificity; *in* (Pette, D., ed.), *Dynamic state of muscle fibers*; Walter de Gruyter, Berlin, pp 3-16;
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., (1988); Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase; *Science*, 239:487-494;
- Sakthivel, S., Walmüller, S., Saadi, A., Joseph, P.K., Rakesh, P.G., Padmakumar, R., Jagan, M.T., Richard, P., Schwartz, K., Rajamanickam, C., Vosberg, H.P., (2001); Novel Mutation in MYH7 and MYBPC3 of an Indian family causing hypertrophic cardiomyopathy; Poster: XVII world congress of ISHR, Winnipeg, Canada; Abstract in *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33(6):A105;
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989); *Molecular cloning – a laboratory manual*; 2. Edition, Cold Spring Harbor Lab. Press;
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., (1977); DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 74:5463-5467;
- Seidman, J.G., Seidman, C. (2001); The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms; *Cell*, 104:557-567;
- Shark, K.B., Smith, F.D., Harpending, P.R., Rasmussen, J.L., Sanford, J.C., (1991); Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*; *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(2):480-485;
- Shuman, S., (1994); Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA Topoisomerase; *J. Biol. Chem.*; 269(51), 32678-32684;

- Smith, F.D., Harpending, P.R., Sanford, J.C., (1992); Biolistic transformation of prokaryotes: factors that effect biolistic transformation of very small cells; *J. General Microbiol.*, 138(Pt 1):239-248;
- Sohn, R.L., Murray, M.T., Schwarz, K., Nivitray, J., Purray, P., Franko, A.P., Palmer, K.C., Diebel, L.N., Dulchavsky, A.S., (2001); In-vivo particle mediated delivery of mRNA to mammalian tissues: Ballistic and biologic effects; *Wound Rep. Reg.*, 9:287-296;
- Subramaniam, A., Jones, W.K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., Robbins, J., (1991); Tissue-specific regulation of the β -myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice; *J. Biol. Chem.* 266(36) 24613-24620;
- Tardiff, J.C., Factor, S.M., Tompkins, B.D., Hewett, T.E., Palmer, B.M., Moore, R.L., Schwartz, S., Robbins, J., Leinwand, L.A., (1998); A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic mice suggests multiple cellular mechanisms for familial hypertrophic cardiomyopathy; *J. Clin. Invest.*, 101(12):2800-2811;
- Tardiff, J.C., Hewett, T.E., Palmer, B.M., Olsson, C., Factor, S.M., Moore, R.L., Robbins, J., Leinwand, L.A., (1999); Cardiac troponin T mutations result in allele-specific phenotypes in a mouse model for hypertrophic cardiomyopathy; *J. Clin. Invest.*, 104(4):469-481;
- Thompson, W.R., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. (1991); A myoD1-independent muscle-specific enhancer controls expression of the β myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells; *J. Biol. Chem.*, 266(33):22678-22688;
- Vikstrom, K.L., Factor, S.M., Leinwand, L.E., (1996); Mice expressing mutated myosin heavy chains are a model for familial hypertrophic cardiomyopathy; *Mol. Med.*, 2(5):556-567;
- Vincent, R., Nadeau, D., (1983); A micromethod for quantitation of cellular proteins in percoll with the coomassie brilliant blue Dye-binding assay; *Anal. Biochem.*, 135:355-362;
- Vogelstein, B., Gillespie, E.F., (1979); Preparative and analytical purification of DNA from agarose; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(2):615-619;
- Vosberg, H.P., (1998a); Die genetischen Ursachen der hypertrophischen Kardiomyopathie; *Medizinische Klinik*, 93(4):252-259;
- Vosberg, H.P., Haberbosch, W., (1998b); Kardiomyopathien – genetische Ursachen und Pathogenese; *in* (Ganten, K. und Ruckpaul, K., ed.) *Handbuch der molekularen Medizin, Herz-Kreislauf-Erkrankungen*; Springer Verlag; Band 3, Kapitel 1.3, S.61-110;
- Waldmüller, S., Sakthivel, S., Vosberg, H.P., (1999); $\Delta E927$: Eine Myosin „rod“-Mutation ist assoziiert mit einer schwereren Form der hypertrophischen Kardiomyopathie; *Abstract in Kardiologie (German J. Cardiol.)*, Suppl. I, Band.88, S.250;
- Wassarman, P.M., DePamphilis, M.L., (1993); Guide to techniques in mouse development; *in* *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Ed.), Academic Press, San Diego;
- Watkins, H., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Feng, H.S., Sweeney, H.L., (1996); Expression and functional assessment of a truncated cardiac troponin-T that causes hypertrophic cardiomyopathy; *J. Clin. Invest.*, 98(11):2456-2461;

- Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H., Gatz, C., (1994); A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants; *Plant J.*, 5(4):559-569;
- Welikson, R.E., Buck, S.H., Patel, J.R., Moss, R.L., Vikstrom, K., Factor, S.M., Miyata, S., Weinberger, H.D., Leinwand, L.A., (1999); Cardiac myosin heavy chains lacking the light chain binding domain cause hypertrophic cardiomyopathy in mice; *Am. J. Physiol.*, 276:H2148-H2158;
- Wells, K.D., Foster, J.A., Moore, K., Pursel, V.G., Wall, R.J. (1999); Codon optimization, genetic insulation, and an rtTA reporter improve performance of tetracycline switch; *Transgenic Res.*, 8:371-381;
- Werner, J.C., Sicard, R.E., Hansen, W.R., Solomon, E., Cowett, R.M., Oh, W., (1992); Hypertrophic cardiomyopathy associated with dexamethasone therapy for bronchopulmonary dysplasia; *J. Pediatr.*, 120(2 Pt 1):286-291;
- Yaffe, D., (1968); Retention of differentiation during prolonged cultivation of myogenic cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61(2):477-483;
- Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., McCabe D. (1990), *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572;
- Yang, Q., Sanbe, A., Osinska, H., Hewett, T.E., Klevitsky, R., Robbins, J., (1998); A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy; *J. Clin. Invest.*, 102(7):1292-1300;
- Yao, F., Svensjö, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C. and Eriksson, E., (1998). Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Therapy*, 9:1939-1950;
- Yao, F., Eriksson, E., (1999); A novel tetracycline-inducible replication switch; *Hum. Gene Therapy*, 10:419-427;
- Yu, Z., Redfern, C.S. and Fishman, G.I., (1996); Conditional transgene expression in the heart; *Circ Res*, 79(4):691-697;
- Zelenin, A.V., Titomirov, A.V., Kolesnikov, V.A., (1989); Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection; *FEBS Letters*, 244(1):65-67.

9 Anhang

9.1 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Dabei befindet sich in der ersten Spalte die laborinterne Nummer des Primers, gefolgt von der Sequenz und in der letzten Spalte das betreffende Gen, dem der jeweilige Primer zugeordnet werden kann.

<i>Primer-Nr.:</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Gen</i>
932	5'-ttt ttt ttt ttt ttt	Oligo-dT
1457	5'-ggg cat gca tgc ctg gaa tcc	hgh
1641	5'-ttc cct cag cag gtc aca gtc atg	α -MHC
1641F	5'-ttc cct cag cag gtc aca gtc atg	α -MHC
1644R	5'-ctc atg gct aca ctc ttc tet ac	α -MHC
1645F	5'-cgg tgg aga gca gac act gtt tg	α -MHC
1648R	5'-ttc cag ctg tgg tcc aca ttc ttc	α -MHC
1681	5'-ggg caa ttc att gat agc agg aaa	α -MHC
1687	5'-aac acc agc cta atc aac cag aag	α -MHC
1709	5'-aag ctt att cct cgt cgt gca tct tct tgg cac caa tgt c	α -MHC
1731	5' gat gac cga gag gct gga cga gga gga gat g	α -MHC
1732	5' c atc tcc tcc tcc tcc agc ctc tcc gtc atc	α -MHC
1740 Sal I	5'-gtc gac gca tgt cta gat tag ata aaa gta	tetR
1740a	5'-gct cga cgc ctt agc cat tga g	tetR
1741 Hind III	5'-aag ctt aat aag atc tga att cc	tetR
1741a	5'-ctg gct ctg cac ctt ggt gat	tetR
1756	5'-cag gca ctt tac atg gag tcc tg	<i>lacZ</i>
1762	5'-gtc gac tca aac tct tat ggg gga	<i>lacZ</i>
1763 Sal I	5'-gtc gac cca tgg ggg gtt ctc atc atc atc	<i>lacZ</i>
1764	5'-gac tgt tac cca tcc cgt ggg cgt att c	<i>lacZ</i>
1765	5'-tat ttg ccc gat gta cgc gcg cgt g	<i>lacZ</i>
1766a Hind III	5'-aag ctt att ttt gac acc aga cca act ggt a	<i>lacZ</i>
1793	5'-ggcgca ggt agc aga gcg ggt aa	<i>lacZ</i>
1794 Nde I	5'-cat atg gga tgg gat ata aag ggg ctg gat ccc tat cag tga tag aga tct ccc tat cag tga tag aga gca ctg aga gct gtc aga gat ttc	<i>tetO</i>

1884 5'-ggg aca cga cct tgg cct taa c

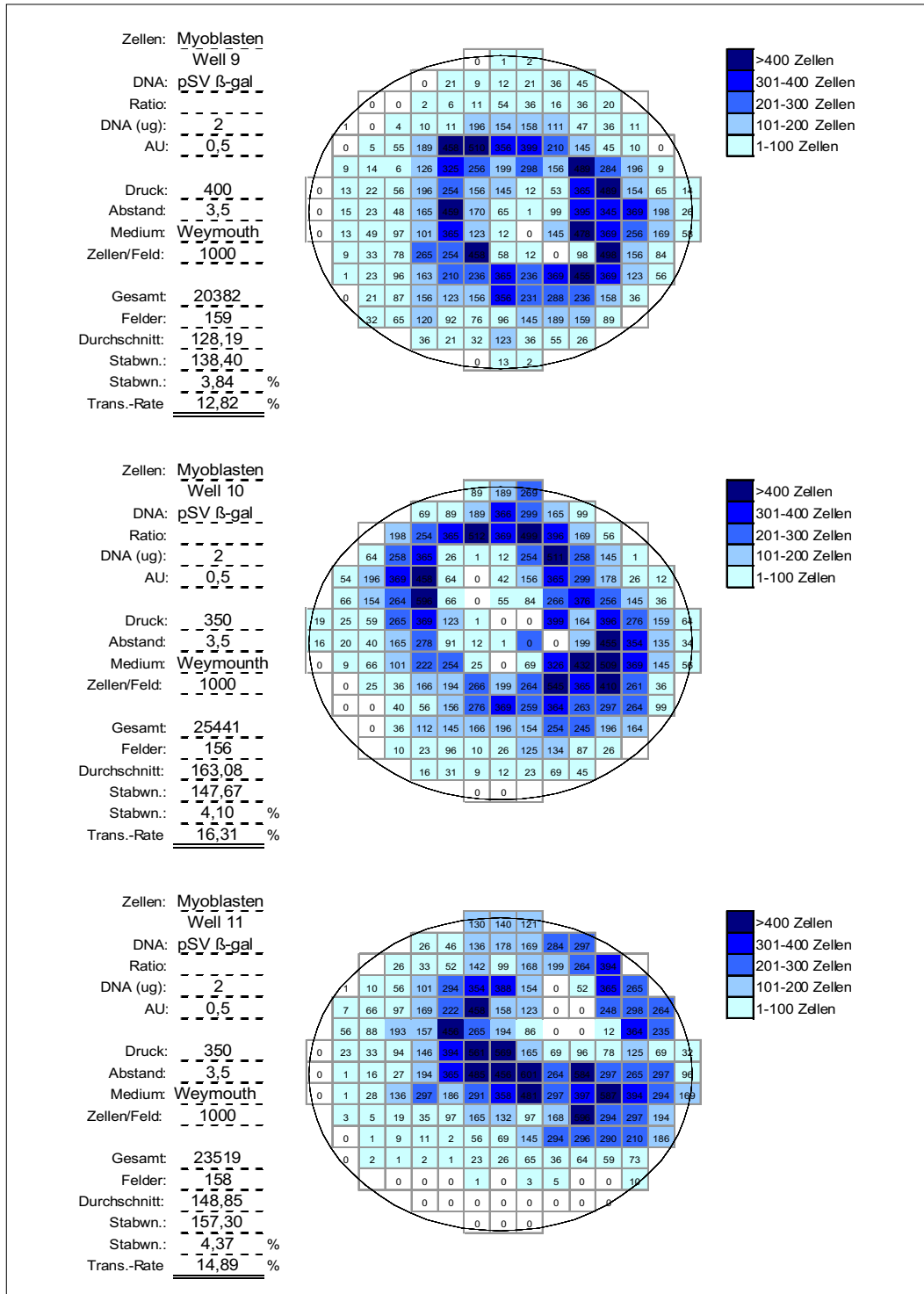
1885 5'-cat cgt aac cgt gca tct gcc

α -MHC Promotor

lacZ

9.2 Ausgezählte Rasterplatten von transfizierten Zellkulturen

Gezeigt werden je drei Kulturen von (a) L6 Myoblasten, (b) COS1-Zellen und (c) neonatalen Kardiozyten, die mit dem Kontrollplasmid *pSV-β-gal* unter Verwendung der HGG transfiziert wurden. Die Zellen wurden nach zwei Tagen mit X-gal gefärbt. Die blauen Zellen (Expression von β-Galaktosidase) in jedem der Rasterfelder (RF) der Platten wurden gezählt. Die Intensität der Blaufärbung entspricht einer bestimmten Spanne gezählter blauer Zellen / RF.



a. Myoblasten

Zellen: **neonatale Kardiozyten**

Well 9

DNA: **pSV-β-gal**

Ratio: _____

DNA (ug): **2**

AU: **0,5**

Druck: **450**

Abstand: **4,5**

Medium: **5% FCS**

Zellen/Feld: **1500**

Gesamt: **1047**

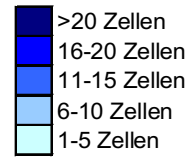
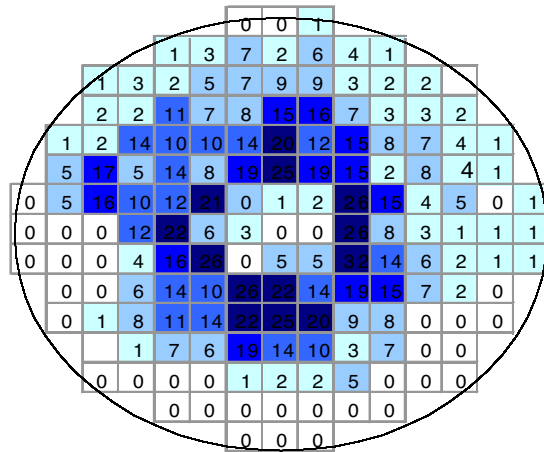
Anzahl Felder: **159**

Durchschnitt: **6,58**

Standardabw. **7,45**

Standardabw. **0,21%**

Infektionsrate: **0,44%**



Zellen: **neonatale Kardiozyten**

Well 8

DNA: **pSV-β-gal**

Ratio: _____

DNA (ug): **2**

AU: **0,5**

Druck: **450**

Abstand: **4,5**

Medium: **5% FCS**

Zellen/Feld: **1500**

Gesamt: **1523**

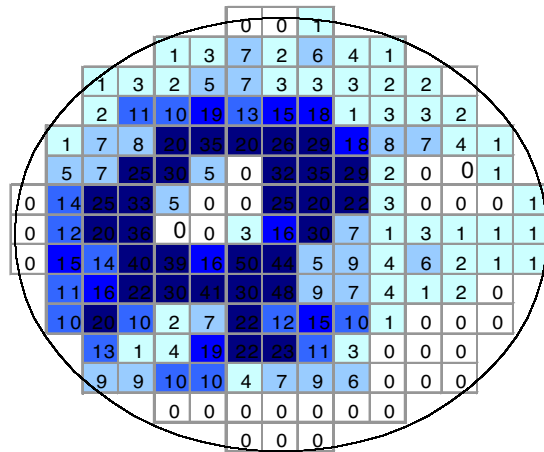
Anzahl Felder: **160**

Durchschnitt: **9,52**

Standardabw. **11,58**

Standardabw. **0,32%**

Infektionsrate: **0,63%**



Zellen: **neonatale Kardiozyten**

Well 8

DNA: **pSV-β-gal**

Ratio: _____

DNA (ug): **2**

AU: **0,5**

Druck: **450**

Abstand: **4,5**

Medium: **5% FCS**

Zellen/Feld: **1500**

Gesamt: **1653**

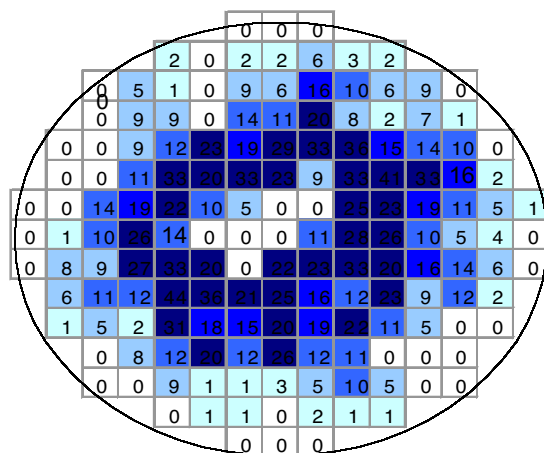
Anzahl Felder: **161**

Durchschnitt: **10,27**

Standardabw. **10,72**

Standardabw. **0,30%**

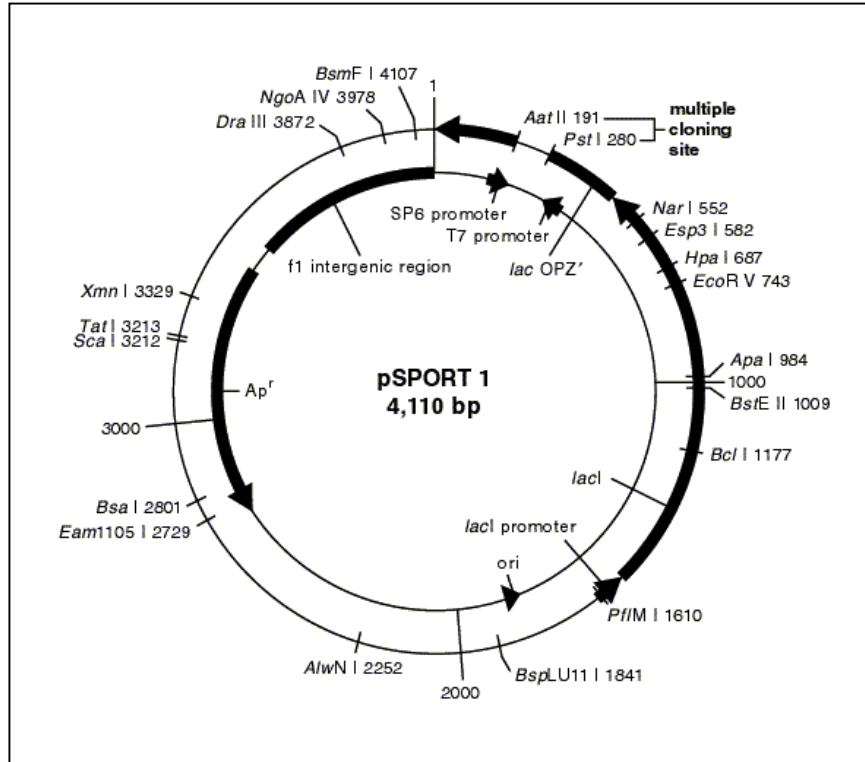
Infektionsrate: **0,68%**



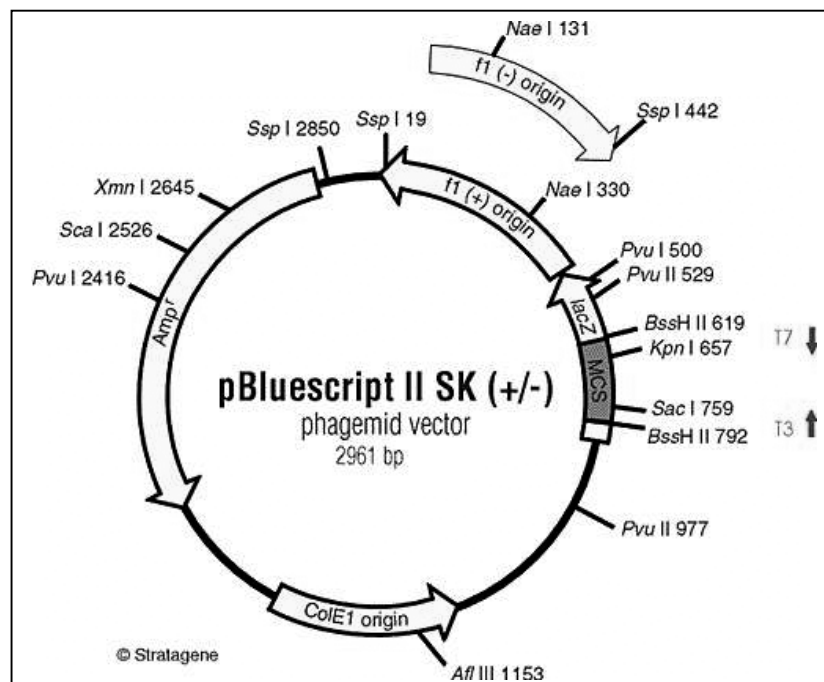
c. Neonatale Kardiozyten

9.3 Verwendete Vektoren

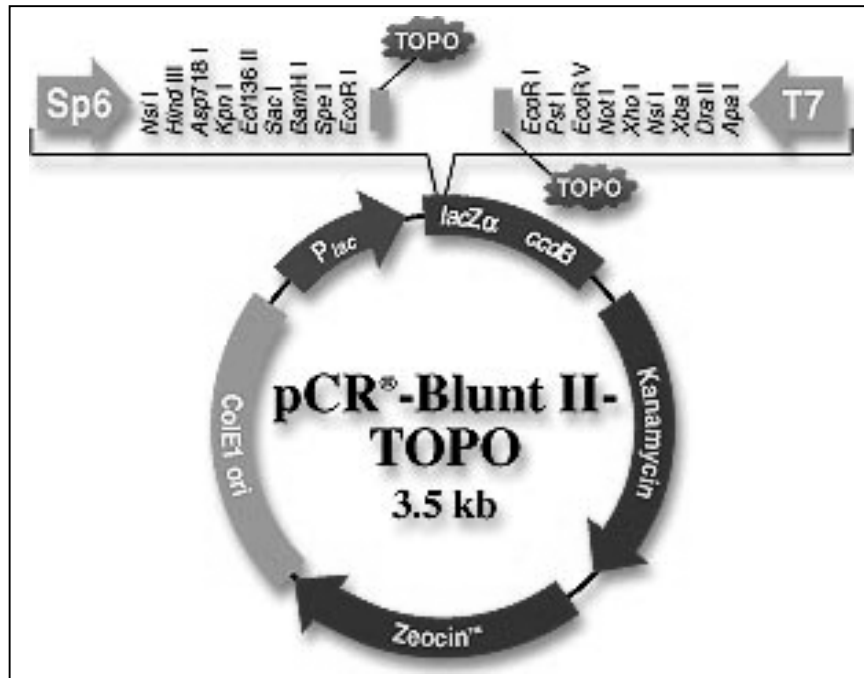
pSPORT 1: In diesem Plasmid erhielten wir ein Teilfragment des α -MHC Gens der Maus vom RZPD Berlin.



pBS II sk+: pBluescript II sk(+/-); für die Klonierung der kompletten cDNA-Sequenz des α -MHC der Maus, des tetR und des β -Galaktosidase-Reportergens.

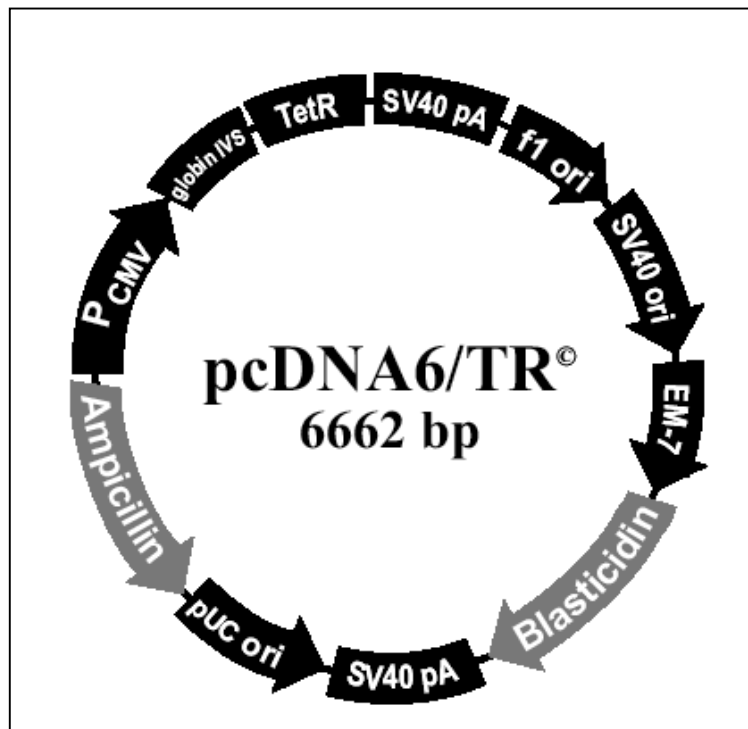


pCR-Blunt TOPO II: Für die schnelle Klonierung von PCR-Produkten (aus dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen).



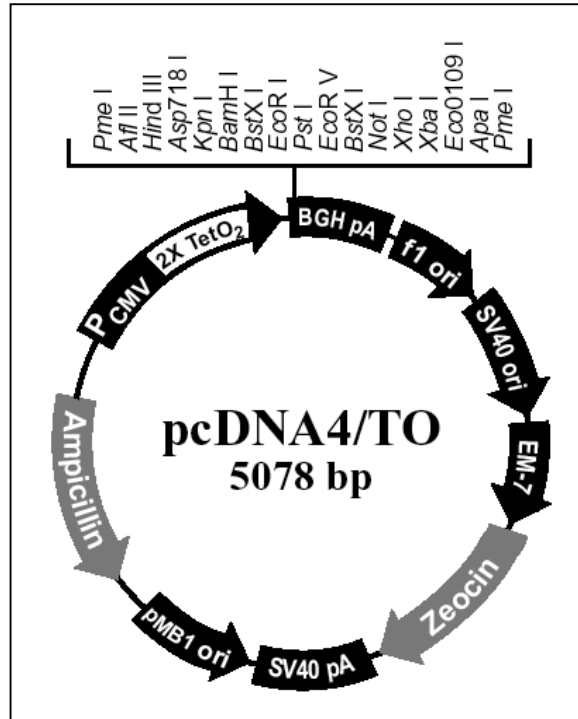
pcDNA6/TR:

Ein Plasmid (6662 bp), das angetrieben von dem hCMV-Promotor tetR exprimiert (T-REx™ System, Invitrogen).



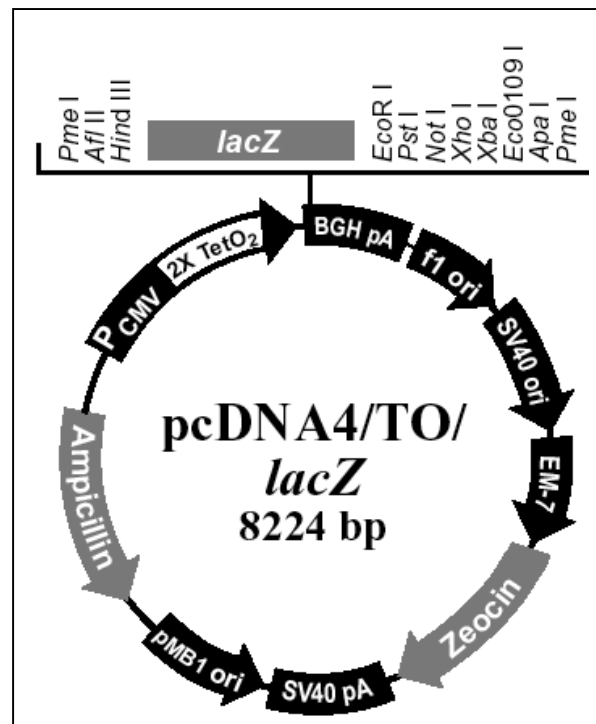
pcDNA4/TO:

Ein Plasmid (5078 bp), das angetrieben durch den hCMV-Promotor, zwei hintereinander liegende *tetO*-Sequenzen und eine *multiple cloning site* (MCS) enthält, in die Gene von Interesse integriert werden können (T-REx™ System, Invitrogen).



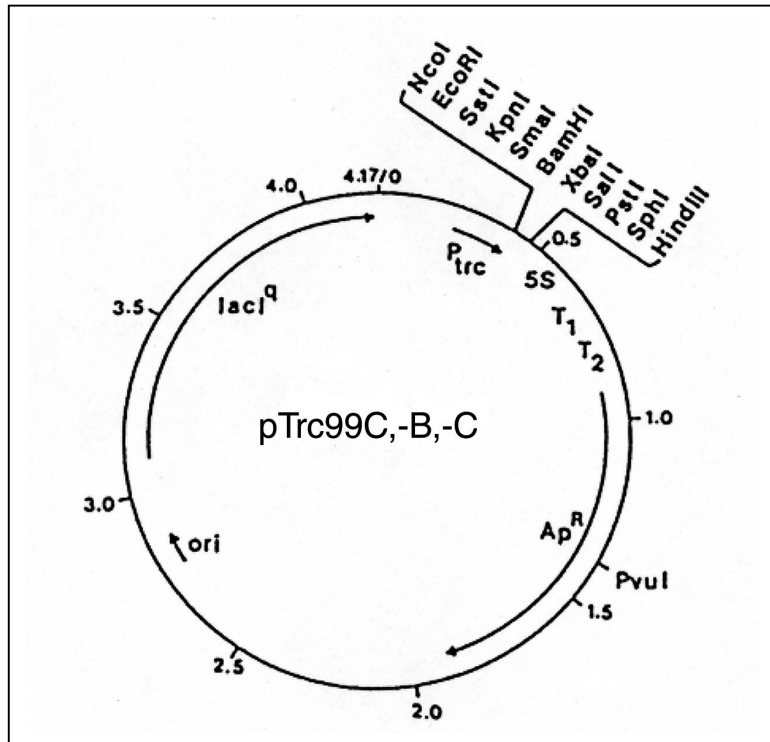
pcDNA/TO/*lacZ*:

Dieses Plasmid (8224 bp) enthält auf der Basis von *pcDNA4/TO* die Sequenz der β -Galaktosidase (T-REx™ System, Invitrogen).



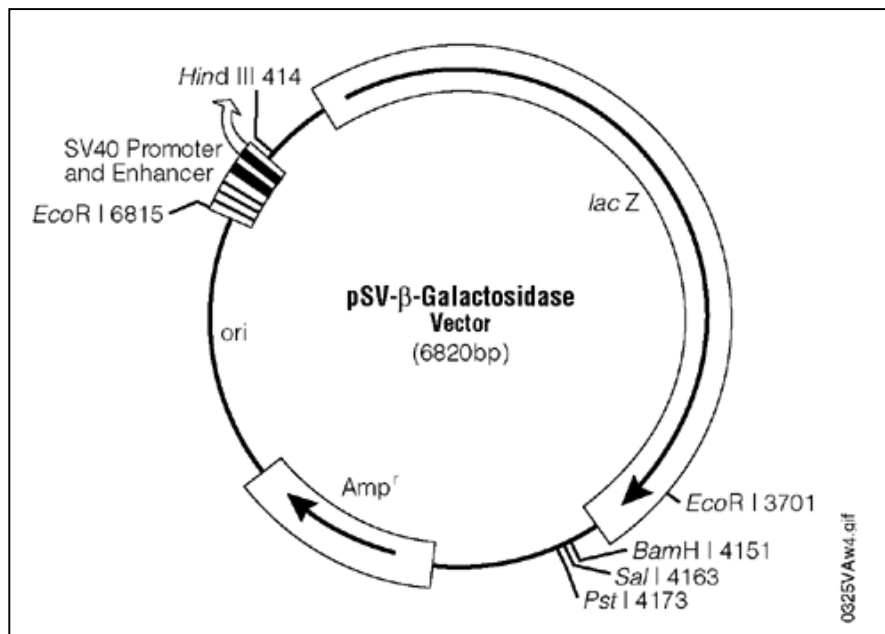
pTrc99C:

Für die Expression des tetR in *E.coli* (Amann et al., 1988).



pSV-β-gal:

Plasmid für die Expression von β-Galaktosidase zur Kontrolle der Transfektionseffizienz in Zellkulturen.



Lebenslauf

Name: Christian Troidl
Geburtsdatum: 18.03.1968
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet, ein Kind

1974 - 1978 Grundschule Cappel (Marburg a.d. Lahn).

1978 - 1982 Gymnasium Kronshagen (Kiel).

1982 - Mai 1987 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium (Rösrath); Abschluß: Abitur.

Mai - Juli 1987 3 Monate Forstpraktikum (Forstbetrieb Vischel, Eifel).

Sept. 1987 - April 1988 University of New Brunswick (Fredericton, Kanada); Studium der Forstwissenschaft und Biologie.

April 1989 - März 1990 Grundwehrdienst.

Juni - Aug. 1990 Concordia University (Montreal, Kanada); Französischkurse.

Nov. 1990 - März 1993 Technische-Universität München; Grundstudium der Biologie, Abschluß: Vordiplom.

April 1993 - Dez. 1996 Ludwig-Maximilian-Universität München; Hauptstudium Biologie mit den Schwerpunkten Zoologie, Anthropologie / Humangenetik, Wildbiologie, Wildtiermanagement, und Ökologie; Abschluß: Hauptdiplom.

Jan. 1997-Sept. 1997 Diplomarbeit am zoologischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität München bei Prof. Bohn.

Sept. 1998 - heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim bei Prof. Vosberg.