

Konditionale Inaktivierung des *Gna13* Gens der Maus mithilfe des *Cre/loxP* Rekombinationssystems

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades im Fachbereich
Biologie, Chemie, Pharmazie der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alexandra Zywietz
aus Göttingen

November 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Korge

2. Gutachter: Prof. Dr. S. Offermanns

Datum der Disputation: 01.02.2002

Im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen

Originalarbeit

Zywietz A., Gohla A., Schmelz M., Schultz G., Offermann S. (2001)

Pleiotropic Effects of *Pasteurella multocida* Toxin Are Mediated by G_q -dependent and -independent Mechanisms.

J. Biol. Chem. 276, 3840-3845

Vorträge und Abstracts

Moers A., Gohla A., Schmelz M., Schultz G., Offermanns S. (2000)

G_q -dependent and -independent effects of *Pasteurella Multocida* Toxin
Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 361 (Suppl.)

Zywietz A., Offermanns S. (2001) Konditionale Inaktivierung des *Gnal3* Gens in der Maus.

Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 363 (Suppl.)

Wettschureck N., Zywietz A., Offermann S. (2001) Cardiomyocyte-restricted $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -deficiency prevents pressure overload in aortic banded mice.

Gordon Reserch Conference, 12.-

1	Einleitung	8
1.1	Struktur und Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	8
1.2	Heterotrimere G-Proteine	9
1.3	Die heterotrimeren G-Protein Untereinheiten	11
1.4	Die G _q -Familie	13
1.5	Die G ₁₂ -Familie	14
1.6	Effektoren von G-Proteinen der G _q und G ₁₂ -Familien	17
1.6.1	Phospholipase C	17
1.6.2	Rho-spezifische Guaninnukleotidaustauschfaktoren	18
1.7	Gezielte konditionale Inaktivierung des <i>Gna13</i> Gens in der Maus	19
1.8	Cre-Linien und Reporter-Mäuse	22
2	Problemstellung	24
3	Material	26
3.1	Reagenzien	26
3.2	Lösungen, Puffer und Medien	27
	Allgemeine Lösungen und Puffer	27
3.3	Medien für die Bakterienkultur	29
3.4	Modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen	29
3.5	Reagenziensysteme	30
3.6	Sonstige Nucleinsäuren und Nucleotide	30
3.7	Filter und Membranen	30
3.8	Radioaktive Substanzen	30
3.9	Zellen und Organismen	31
3.10	Antikörper und Immunreagentien	31
3.11	Chirurgisches Nähmaterial	31
3.12	Reagenzien und Materialien für die Zellkultur	31
	Supplemente für die Zellkultur	31

3.13	Medien für die Zellkultur	32
3.14	Hormone und Narkotika	33
3.15	Materialien für die Mikroinjektion und den Embryotransfer	33
3.16	Verwendete Primer	33
4	Methoden	34
4.1	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	34
4.1.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	34
4.1.2	Dephosphorylierung von Plasmid DNA	34
4.1.3	Auffüllen von 5'-Überhängen mit DNA Polymerase I (Klenow)	34
4.1.4	Glätten von überhängenden Enden mit T4 DNA Polymerase	34
4.1.5	Ligation	35
4.1.6	Radioaktive „random primer“-Markierung von DNA	35
4.1.7	Endmarkierung von Oligonukleotiden	35
4.2	Transformation kompetenter Bakterien	36
4.3	Southernblot Hybridisierung	36
4.4	Polymerasekettenreaktion	36
4.5	Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren	37
4.5.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
4.5.2	Reinigung von zirkulärer DNA durch einen CsCl-Gradienten	37
4.6	Gelelektrophoretische Methoden	37
4.6.1	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	37
4.6.2	Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE)	37
4.7	Transfer von Proteinen auf Membranen	38
4.8	Waschen und abermaliges markieren von Membranen	38
4.9	Herstellung von Cholatextrakten	38
4.10	Extraktion, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
4.10.1	Isolation genomischer DNA aus Gewebe	39
4.10.2	Minipräparation von Plasmid DNA	39
4.10.3	Maxipräparation von Plasmid-DNA	39
4.10.4	Konzentrationsbestimmung am Photometer	39
4.10.5	Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen	40
4.11	Embryonale Stammzellkultur	40
4.11.1	Gelatinieren von Kulturschalen für die ES-Zellkultur	40
4.11.2	Isolierung embryonaler Fibroblasten	40
4.11.3	Kultur embryonaler Fibroblasten	41
4.11.4	Vorbereitung von „Feederlayern“ für die ES-Zellkultur	41
4.11.5	Kultivierung embryonaler Stammzellen	41

4.11.6	Elektroporation von ES-Zellen	41
4.11.7	Selektion von ES-Zellen und Isolierung resistenter Einzelklone	42
4.11.8	Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
4.12	Erzeugung chimärer Tiere	42
4.12.1	Superovulation und Ammenmütter	42
4.12.2	Blastozystenisolation	43
4.12.3	Injektion von ES-Zellen in Blastozysten	43
4.12.4	Narkose und Embryotransfer	44
4.12.5	Test der Chimären auf Keimbahntransmission	44
4.13	Thrombozytenexperimente	44
4.13.1	Präparation von Thrombozyten	44
4.13.2	Retroorbitale Blutentnahme	45
4.13.3	Bestimmung von Blutungszeiten	45
4.13.4	Bestimmung der Aggregation von Thrombozyten am Aggregometer	45
4.14	Immunologische Methoden	45
4.14.1	Isolation von Zellen aus Mausorganen	45
4.14.2	Durchflusszytometrie	46
4.15	Partielle Hepatektomie	46
4.16	Endothelzell-Präparation	46
4.16.1	Isolierung von Endothelzellen aus Maus Aorta	46
4.16.2	Passagieren und Wachstum von Endothelzellen	47
4.16.3	Immunhistochemische Techniken zur Identifizierung von Endothelzellen	47
4.17	Isolierung von Kardiomyozyten	47
5	Ergebnisse	49
5.1	Konstruktion des Vektors zur konditionalen Inaktivierung des <i>Gna13</i> Gens	49
5.2	Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen	51
5.3	Cre-mediierte Rekombination in embryonalen Stammzellen	55
5.4	Generierung und Identifizierung von Keimbahntransmittern	59
5.5	Analyse von <i>Gna13</i>^{D1/-}; <i>Ella</i>^{Cre/+} Mäusen	60
5.6	Generierung von <i>Gna13</i>^{flox/flox} Mäusen	61
5.7	Analyse von <i>Gna13</i>^{flox/flox}; <i>Mlc2a</i>^{Cre/+} Tieren	62
5.8	Leberregeneration an <i>Gna13</i>^{flox/-}, <i>tie-1</i> Cre Tieren	65
5.9	Leberresektion an <i>Gna13</i>^{flox/-}; <i>Mx1</i>-Cre Tieren	67
5.10	Immunologische Analysen an <i>Gna13</i>^{flox/-}; <i>Mx1</i>-Cre Tieren	70

5.11	Untersuchungen an Thrombozyten aus <i>Gna13^{flox⁻}</i> ; <i>Mx1</i> -Cre und <i>Gna12^{-/-}</i> ; <i>Gna13^{flox/flox}</i> ; <i>Mx1</i> -Cre Tieren	73
6	Diskussion	82
6.1	Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen	82
6.2	Cre-mediierte Rekombination in embryonalen Stammzellen	82
6.3	Generierung und Identifizierung von Keimbahntransmittern sowie <i>Gna13^{TA/TA}</i> Mäusen	83
6.4	Analyse von <i>Gna13^{flox⁻}</i> ; <i>Ella^{Cre/+}</i> Mäusen	83
6.5	Analyse von <i>Gna13^{flox/flox}</i> ; <i>Mlc2a^{Cre/+}</i> Tieren	84
6.6	Leberregeneration an <i>Gna13^{flox⁻}</i> , <i>tie-1</i> Cre Tieren	86
6.7	Leberresektion an <i>Gna13^{flox⁻}</i> ; <i>Mx1</i> -Cre Tieren	89
6.8	Immunologische Analysen an <i>Ga13^{flox⁻}</i> ; <i>Mx1</i> -Cre Tieren	89
6.9	Untersuchungen an Thrombozyten <i>Gna13^{flox⁻}</i> ; <i>Mx1</i> -Cre Tieren	91
7	Zusammenfassung	95
8	Abkürzungsverzeichnis	97
9	Literaturverzeichnis	99