

4 Material und Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie z.B. Bakterienzucht, Medienherstellung, Transformation, Restriktionsanalyse, Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren oder Agarosegelelektrophorese wurden nach den in (Sambrook and Russell, 2001) beschriebenen Protokollen durchgeführt.

4.1 Molekularbiologische Methoden:

4.1.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern, Lösungen und Medien wurden von den Firmen Sigma GmbH; Karl Roth GmbH oder von Merck GmbH bezogen.

4.1.2 Lösungen

Lösungen, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden nach einem Standardprotokoll (Sambrook and Russell, 2001) hergestellt.

4.1.3 Bakterien-Stamm

Für Transformationen der Plasmid DNA wurde der *Escherichia coli* Stamm - DH5 α *supE44* ϕ *lacU169* (Δ 80 *lacZ* ϕ *M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* verwendet.

4.1.4 Geräte

Tabelle 1: Geräte für die Molekularbiologie

Gerät	Hersteller und Typ
Geldokumentation	Syngene, GENE GENIUS
Gelsystem (Mini)	Cosmo Bio Co, Mupid 21
Gelsystem	Renner
PCR Maschine	MJ Research, PTC-200
Photometer	Amersham, Ultraspec 2100 pro
Pipetten	Gilsen
Schüttler	Eppendorf, Thermomixer comfort
Sonicator	Bandelin, HD 2070 / UW 2070

Gerät	Hersteller und Typ
UV Einheit	Olympus, U-RFL-T
Wasserbad	Haake, DC10
Zentrifuge für 96 well Platten	Sigma, 4K15, Rotor: 09100
Zentrifuge Mikroreaktionsgefäße	Heraeus, Biofuge

4.1.5 Kits

Tabelle 2: Kits für die Molekularbiologie

Kit	Hersteller
Abi Prism Big Dye Terminator Kit 3.1	Applied Biosystems
Easy Pure DNA Purification Kit	Biozym
ENZA Plasmid Mini Prep Kit I	Paqlab
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Invitex
Nucleo Bond BAC 100	Macherey Nagel
pGEM Teasy Vector System	Promega
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Prime-It Random Primer Labeling Kit	Stratagene
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TAKARA Ligation Kit	TAKARA
Thermoscript First-Strand Synthesis System	Invitrogen

4.1.6 Plasmide

Für die Klonierung von PCR Produkten und für die Generierung der Targeting-Vektoren wurden folgende Plasmide (Tabelle 3) verwendet.

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	Hersteller
pBSSK- Bluescript	Stratagene
pGEM Teasy	Promega
pGemFRTloxNeo	Prof. Gotthardt

4.1.7 Enzyme

Alle nicht gesondert aufgeführten Restriktionsendonukleasen für Klonierungen oder Southernblot Analysen wurden von den Firmen MBI Fermentas oder New England Biolabs bezogen. Für die Isolation von Kardiomyozyten, wurde Liberase Blendzyme von der Firma Roche verwendet. Proteinase K für den Verdau von Mausgewebe wurde von Merck und Taq DNA-Polymerase für PCR von Invitek geliefert. Für den Verdau von DNA wurde die DNase I von Ambion verwendet.

4.1.8 DNA Präparation

4.1.8.1 Präparation von BAC DNA

Die BAC-DNA wurde mit dem Kit „Nucleobond BAC 100“ nach Angaben des Herstellers isoliert.

4.1.8.2 Präparation von Plasmid DNA

Für die Präparation von Plasmid DNA im Mini Maßstab wurden die Kits „Invisorb Spin Plasmid Mini Kit“ und „E.N.Z.A. Plasmid Mini Prep Kit I“ verwendet.

Für die Präparation der Plasmid DNA im Maxi Maßstab, u.a. für die Transformation des Targeting-Vektors in die Embryonalen Stammzellen, wurde die Aufreinigung mit dem „Plasmid Maxi Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.8.3 Präparation von genomischer DNA aus Mausgewebe

Zur Gewinnung von genomischer DNA für die Genotypisierung wurde Gewebe der Schwanzspitze verwendet.

Hierzu wurden 2-4 mm Schwanzspitze im 2 ml Mikrozentrifugentube für 12-16 Stunden in 725 µl Tailpuffer (20 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,2% SDS; 234 mg NaCl) und 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 52 °C im Schüttler bei 750 upm verdaut.

Die DNA wurde anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, unter Zugabe von 1/10 Volumen (~70 µl) 8 M LiCl und 2½ Volumen (1300 µl) 96%igem Ethanol gefällt, in 70%igem Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation (10 min 12000 upm) pelletiert. Die DNA wurde in 100 -200 µl TE Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.1.8.4 Präparation von genomischer DNA aus ES-Zellen

DNA aus ES-Zellen wurde in der 96 well Zellkulturplatte präpariert. Hierzu wurde bei dicht gewachsenen Zellen das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 100 µl Zell-Lysepuffer-ES (10 ml = 0,1% SDS, 200 µl Proteinase K [14 mg/ml], 100 µl RNase A [10 mg/ml]) zugegeben. Der Verdau der Zellen erfolgte über Nacht bei 55°C in einer feuchten Kammer.

Die DNA der verdauten Zellsuspension wurde mit 10 µl 8 M LiCl und 100 µl Isopropanol pro 96 well über Nacht auf dem Schüttler gefällt. Anschließend wurde die 96 well Platte bei 4°C mit 2576 x g (4000 upm) zentrifugiert um die DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen, das DNA Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde für ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in 50 µl TE Puffer aufgenommen und in einer feuchten Kammer bei 55°C über Nacht gelöst.

Die DNA wurde anschließend für die Genotypisierungs-PCR und Southernblot Analyse zum Screen der ES-Zellen eingesetzt.

4.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

4.1.9.1 PCR Chemikalien

Materialien für PCR Reaktionen wie dNTPs und Taq Polymerase wurden von den Firmen Roche oder Invitak bezogen. BSA (Roth) 10 mg/ml wurde in ddH₂O gelöst. Der modifizierte Gitschier Puffer für die Soriano Genotypisierungs-PCR bestand aus: 166 mM Ammoniumsulfat, 670 mM Tris-HCl, 67 mM MgCl, 50 mM β-Mercaptoethanol, 67 µM EDTA gelöst in ddH₂O. Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 8,8 eingestellt.

4.1.9.2 Primer

Primer für Klonierungs- und Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma BioTez synthetisiert.

Tabelle 4: Primer

Name	Sequenz	Anwendung
MR-N2B int r	CCACTTCTGGGATTTTCTTTTCT	Sequenzierung
MR-N2B int f	TAACCTTAACAGCTGAACCCAAA	Sequenzierung
MR ttn exon 50 f	AGGCATGCTAATGGGTTCTG	Sequenzierung

Name	Sequenz	Anwendung
MR ttn exon 51 f	AACTTTGATGGGGACCACCT	Sequenzierung
MR ttn exon 52 f	TGTATGCTTCAGTCATCTTCTCAA	Sequenzierung
MR ttn exon 53 f	CTGTGCTTCCCTGCTTTTGT	Sequenzierung
MR ttn exon 54 f	TGTGTCGGAAATGACAGTGG	Sequenzierung
MR ttn exon 55 f	GGGATCCTAACTGTCTGATACCTT	Sequenzierung
MR ttn exon 56 f	TGCCCATGTTGATCTTGCTCT	Sequenzierung
MR ttn exon 57 f	TCCTTCAAATTCTGTCTTCTACCTC	Sequenzierung
MR ttn exon 58 f	TGCCTTCCTCTTTCTACTGCTT	Sequenzierung
MR ttn exon 59 f	ATCCCTGCCCATTAACACAG	Sequenzierung
MR SA N2B f	TTTAAGCTTTGATCAAGCATTCCATGTGTTAC	Klonierung
MR SA N2B r	TTTAAGCTTTTAGACACCAATTAGTGGCCTTC	Klonierung
MR SA N2B f kon	TTTAAGCTTGGAGGAGAATGTGTTTCGTA CTTG	Klonierung
MR N2B E49 5'F	AATCTCACCACAACCTTATTCCA	Genotypisierung
MR N2B E49 3'R	AGTGAATTGCGGGGAAATTATTA	Genotypisierung
MR N2B E49 5'R	GGTTAACAGCATCCCATTAAAGA	Genotypisierung
MR N2B K 3	GTGCTGGGATCAAAGCCATGTGC	Genotypisierung
3'neoflox	TCGACTAGAGGATCAGCTTGGGCTG	Genotypisierung
MR N2B Sonde F	TCTTAAGGAGCAGATACGCAGAC	Klonierung
MR N2B Sonde R	CTTG CATCTATAGTGTACCCGCT	Klonierung
MR PEVK5 wt r	TGAGCAAGGGAATTATACCTGTC	Genotypisierung
PEVK5-P1	GTGGCTCACAACCATCCGTAACAAG	Genotypisierung
PEVK5-P3	TGACCACTGAACCGCTCTGAAGCTA	Genotypisierung
PEVK5-P4	GTGTTTTCACAAAGCGCACAGGAAG	Genotypisierung
JP-con 5-r	GCCTGGACATCAGCATTTTCATCTG	Genotypisierung
MR PEVK5 Probe F	ATGAGTGTTGGTGCTTCCTATGT	Klonierung
MR PEVK5 Probe R	GCTGCCTCAAGTTAGTGAGAAGA	Klonierung

4.1.9.3 PCR Protokolle zur Genotypisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Untersuchungen der ES-Zellen auf homologe Rekombination und die Genotypisierung der Tiere mit Hilfe des Soriano-PCR

Protokolls durchgeführt. Die PCR Reaktion erfolgte in einem 25 µl Reaktionsansatz: 2,5 µl 10x modifizierter Gitschier Puffer, 2,5 µl DMSO, 0,2 µl BSA (10 mg/ml), 1 µl dNTP Mix (10 mM), je 1 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 µM) (Tabelle 5), 1 µl DNA Template (30 - 50 ng) aus Mausgewebe oder 5 µl ES-DNA Template, 0,25 µl *Taq* Polymerase (Invitak 5 U/µl), x µl ddH₂O (steril). Nach einem initialen PCR Schritt: Denaturierung bei 94°C für 1 min 20 sec, Annealing bei 60°C für 2 min, Elongation bei 65°C für 5 min im Thermocycler, erfolgte die PCR Reaktion mit 40 Zyklen des folgenden Standardprogramms: Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing 60°C für 30 sec, Elongation 65°C für 3 min (bei langer PCR zum Testen auf homologe Rekombination der ES-Zellen), oder 65°C für 1 min (für Genotypisierungs-PCR der Tiere). Zum Abschluss erfolgte ein finaler Syntheseschritt für 10 min bei 65°C, danach Kühlung bei 4°C.

Tabelle 5: Primerpaare zum Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen

PCR	Primer	PCR Produkt
N2B SA Neo	MR N2B K 3 3'neoflox	2053 bp
PEVK 5 SA Neo	JP-con5r 3'neoflox	1353 bp

Tabelle 6: Primerpaare und Produktgröße für Genotypisierung der Tiere

PCR	Primer		PCR Produkt
FLP	MG-FLP1 MG-FLP2	FLP	480 bp
N2B neo	MR N2B E49 5'F 3'neoflox	neo	210 bp
N2B recf	MR N2B E49 5'F MR N2B E49 5'R MR N2B E49 3'R	wt recf	376 bp 252 bp
PEVK5 neo	PEVK5-P1 3'neoflox	neo	583 bp

PCR	Primer		PCR Produkt
PEVK 5 wt	PEVK5-P1 MR PEVK5 wt r	wt	542 bp
PEVK5 recf	PEVK5-P1 PEVK5-P4	recf	587 bp

4.1.9.4 Amplifizierung von DNA für Klonierungen

Für die Amplifizierung von DNA Fragmenten aus Plasmiden oder BACs für Klonierungen wurde eine Standard PCR im 25 µl Maßstab durchgeführt. Der PCR Ansatz bestand aus 2,5 µl 10x PCR Puffer (Eppendorf), 0,5 µl dNTP Mix (10 µM), je 0,4 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 µM) Tabelle 4, 0,25 µl Taq Polymerase (5 U/µl), x µl ddH₂O (steril), sowie 50 ng Template DNA.

Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte über 30 Zyklen bei einer Denaturierung bei 94°C für 1 min, ein den Primerpaaren entsprechendes Annealing (normalerweise bei 60°C) für 30 sec und einer Elongation (abhängig von der Länge des PCR Produktes mit 1 min pro 1 kb) bei 72°C für 1 bis 3 min. Zum Abschluss erfolgte ein finaler Syntheseschritt für 8 min bei 72°C, danach wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

4.1.10 Real Time RT-PCR (TaqMan)

Pro Genotyp wurde RNA aus Herzen von drei adulten Tieren gewonnen. Das tiefgekühlte Gewebe wurde mit dem Dispergiergerät T25 (IKA) S25 N-8G (IKA) dreimal für 20 Sekunden homogenisiert und mit 2 ml Trizol (Invitrogen) überschichtet. Die Präparation der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde in RNase freiem H₂O aufgenommen. 50 µg der RNA wurden mit DNase (Ambion) verdaut und mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt und im Gel überprüft. Für die cDNA Synthese wurde 1 µg RNA mit dem Thermoscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) umgeschrieben.

Die quantitative Real-Time RT-PCR wurde mit fluoreszenzmarkierten TaqMan Sonden (Applied Biosystems) durchgeführt.

Die Primer und Sonden wurden von der Firma BioTez GmbH bezogen (Tabelle 7).

Tabelle 7: TaqMan Amplicons

Primer /Sonde	Sequenz
Mouse ANP fw	TTCTAGGCGCAGCCCCT
Mouse ANP Sonde	6-FAM-ACCCCTCCGATAGATCTGCCCTCTTGAA-TAMRA
Mouse ANP rev	GCAGAGCCCTCAGTTTGCTT
18S RNA for	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
18S RNA Sonde	6-FAM-TGGACCGGCGCAAGACGGAC-TAMRA
18S RNA rev	TGGGCAAATGCTTTCGCTC
CARP (ANKRD-1) fw	TGGTGCGGACCTCAA
CARP (ANKRD-1) Sonde	6-FAM-TCAAGAACTGTGCTGGGAAGACCC-TAMRA
CARP (ANKRD-1) rew	CCAGTGCAACACCAGATC

Das FHL2 Amplikon wurde von Applied Biosystems als TaqMan Gene Expression System geordert.

Die Real-Time RT-PCR Reaktion wurde mit dem Sequence Detection System 7900 HT (Applied Biosystems) durchgeführt. Die PCR Reaktion bestand aus dem qPCR Master-Mix Plus (Eurogentec), welcher nach Angaben des Herstellers eingesetzt wurde (2x TaqMan universal PCR Master-Mix, 900 nM Primer, und 250 nM Sonde).

Die PCR Konditionen für die Reaktion waren: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min gefolgt von 59 Zyklen mit 95°C für 10 sec, und 60°C für 1 min. Die Daten wurden mit der Sequence Detection System 2.1 Software (Applied Biosystems) aufgenommen und ausgewertet. Für die Normalisierung auf 18S cDNA und den Vergleich der Expression wurde die komparative CT Methode ($\Delta\Delta C_T$ Methode), wie in dem Benutzer Handbuch 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System beschrieben, angewendet.

4.1.11 Gelelektrophorese

4.1.11.1 Agarose-Gele für DNA

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach Restriktionsverdau oder PCR wurden 0,7% bis 2% Agarose (Cambrex) in 0,5x TAE (50x 1L= 242 g Tris, 57,1 ml konz. Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8.0) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung (Roth)

verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit dem Mupid-21 Gel System bei 100 V für 20 min. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde der 1 kb Leiter Marker (Invitrogen) verwendet. Die Visualisierung der DNA Fragmente erfolgte mit der UV Einheit U-RFL-T (Olympus).

4.1.11.2 Titin Agarose-Gele

Für die Auftrennung von Titin Isoformen wurde die Proteinagarosegelelektrophorese nach Warren (Warren et al., 2003b) angewandt. Als Gelelektrophoresesystem wurde das SE600 (Hoefer) verwendet.

4.1.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt hierbei nach ihrer molekularen Masse (Laemmli, 1970). Die Proteinlösung wurde mit 4x Laemmlipuffer (240 mM Tris pH 6,8; 400 mM DTT; 8% SDS; 20% Glycerol; 0,004% Bromphenolblau) gemischt, auf 95°C für 3 min erhitzt und im 12% SDS-Gel mit 6%igem Sammelgel im Mini Gelsystem SE250 (Hoefer) mit 1x Elektrophoresepuffer (0,1% SDS, 80 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl pH 8,0) bei 60 – 110 V aufgetrennt.

4.1.12 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Um DNA Fragmente aus Agarose-Gelen aufzureinigen, wurden drei Methoden verwendet. Die DNA Bande der gewünschten Größe wurde mit einem Skalpell unter UV Licht ausgeschnitten.

Für die Aufreinigung von PCR Produkten wurde das Kit „Nucleo Spin Extract II“ von Macherey-Nagel, für die Aufreinigung von DNA Fragmenten nach Restriktionsverdau wurde das Biozym Kit „Easy Pure“ nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten von mehr als 6 kb wurde nach „freeze and squeeze“ durchgeführt. Hierzu wurde das Agarosegelstück mit zu isolierender DNA nach grober Zerkleinerung mit Phenol überschichtet (v/w) und kurz in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt. Es folgt 10 min Zentrifugation 12000 x g bei RT. Der Überstand wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 1/10 Vol. 8 M LiCl und 2,5 Vol. 100% Ethanol bei 12000 x g Zentrifugation gefällt. Das Pellet wird in 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in TE Puffer aufgenommen.

4.1.13 Klonierung von DNA Fragmenten und Vektoren

Die Planung der Klonierungen erfolgte mit dem Programm Clone Manager (Sci Ed Central).

4.1.13.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Durchführung des Restriktionsverdaus erfolgte nach molekularbiologischer Standardmethode (Sambrook and Russell, 2001). Enzym- und Puffermengen, sowie Reaktionstemperatur wurden nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, NEB) gewählt.

4.1.13.2 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Bei Klonierungen mit nur einem Restriktionsenzym wurden, um Selbstligation des Vektors zu verhindern, dessen Enden dephosphoryliert. Hierzu wurde 1 U Alkalische Phosphatase (CIP) (Roche) nach 2 Stunden zu dem Restriktionsansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt und das Fragment mit Phenol extrahiert oder über das Gel aufgereinigt.

4.1.13.3 Ligation

PCR Produkte wurden nach Aufreinigung (s. 4.1.11.3) direkt über TA Klonierung mit dem „pGEM-Teasy[®]-Vektor“ (Promega) nach Anweisung des Herstellers ligiert. Typischerweise wurde ein 1:3 Insert zu Vektor Mengenverhältnis für die Ligation gewählt.

Für alle anderen Ligationen wurde das „Ligation Kit II“ von TAKARA[®] nach Anweisung des Herstellers verwendet. Typischerweise wurden 11 µl Puffer A, 2,5 µl Puffer B, sowie 2,5 µl zu ligierende Fragmente verwendet. Vektor und Insert wurden in gleichen Mengen eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 2-4 Stunden bei RT, oder bei 4°C über Nacht.

4.1.13.4 Transformation

Hitzeschock Transformationen wurden nach (Sambrook and Russell, 2001) durchgeführt.

4.1.14 Generierung der Targeting-Vektoren

Um den N2B Targeting-Vektor zu klonieren wurden ein 17,7 kb *Xba*I Fragment aus dem BAC Klon 96022 in pBSSK- subkloniert. Hieraus wurde der lange Arm des

Targeting-Vektors mit *Bst1107I/XbaI* ausgeschnitten und in den *XbaI/EcoRV* geöffneten pBSSK- Vektor kloniert. Der Kurze Arm des Targeting-Vektors und Kontrollarm wurden auf BAC DNA durch PCR mit den Primern „MR SA N2B f“ bzw. „MR SA N2B f kon“ und MR SA N2B r“ amplifiziert und in den pGEM-Teasy Vektor subkloniert. Die Neomycinresistenzkassette wurde mit *HincII* aus dem pgemfrtloxneo Vektor (AG Gotthardt) ausgeschnitten und in den pBSSK Vektor kloniert. Durch Öffnen dieses Vektors mit *XhoI* konnte das kurze Armfragment, bzw. das Kontrollarmfragment geschnitten mit *XhoI/SalI*, in den Vektor kloniert werden. Durch Verdau des Langenarm-Vektors und des Kurzenarm-Vektors mit *Clal/XhoI* und anschließende Ligation der Fragmente (SA Neo 3627 bp und pBSSK- LA 10924 bp) entstand der N2B Targeting-Vektor. Dieser konnte durch Restriktionsverdau an der unikalen *NotI* Schnittstelle linearisiert und anschließend für das Targeting-Experiment eingesetzt werden.

Der PEVK Targeting-Vektor wurde von Dr. Peng kloniert und zur Verfügung gestellt.

4.1.15 Sequenzierung

Die Sequenzreaktionen wurden mit dem Abi Prism Big Dye Terminator Kit 3.1 von Applied Biosystems durchgeführt.

Für die Sequenzierung von Plasmid DNA wurden 10 ng DNA pro 100 bp Plasmid eingesetzt. Weiterhin bestand die Sequenzreaktion aus 2 µl 5x Puffer, 0,25 µl spezifischem Primer (Tabelle 4), 1 µl BigDye. Der Ansatz wurde mit ddH₂O zu 10 µl aufgefüllt. Das Sequenzierungs-PCR-Programm bestand aus 30 Zyklen mit den folgenden Schritten: Denaturierung bei 96°C für 10 sec, Annealing bei 50°C für 5 sec, Elongation bei 60°C für 4 min. Nach Beendigung der Reaktion wurde der PCR-Block auf 4°C gekühlt.

Die Sequenz-PCR-Produkte wurden anschließend über Sephadex G50 (Amersham) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Zur gereinigten Sequenzprobe wurden 10 µl HiDi Formamid (Applied Biosystems) gegeben und die Proben im Abi Prism 7000 Kapilarsequenziersequenziert.

Die Analyse und der Abgleich der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm SaqMan von DNASTAR.

4.1.16 Southernblot mit genomischer DNA

Für den Southernblot wurden 10-20 µg genomischer DNA in einem 40 µl Ansatz mit 30 U Enzym bei 37°C über Nacht verdaut.

Der Verdauansatz wurde im 0,8% Agarose-Gel bei 70 V aufgetrennt.

Zur Denaturierung der DNA für bessere Transfereffizienzen wurde das Agarose-Gel 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt, anschließend zur Neutralisierung in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl für 20 min inkubiert. Die DNA wurde auf Hybond N+ Membran (Amersham), welche zuvor 20 min in H₂O equilibriert wurde, über Nacht geblottet. Anschließend wurde die Membran 10 min in 0,5 M Tris; 1,5 M NaCl pH 7,2 equilibriert und die DNA im UV-Ofen (Vilber Lourmat) zweimal mit 240 Joule auf der Membran fixiert.

Die Membran mit genomischen DNA Fragmenten wurde in einer Hybridisierungsröhre mit 10 ml PreHyb Buffer (Amersham) 1-4 Stunden bei 65°C im Rollofen prehybridisiert. Die Markierung der Sonde mit α-³²P dCTP (NEG) wurde mit dem Prime-It Random Primer Labeling Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zum Abtrennen der überschüssigen Nukleotide wurden vorgepackte „MicroSpin S-300 HR Columns“ (Amersham) verwendet. Die Sonde wurde auf die Säule gegeben und bei 3000 upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge aufgereinigt. 1 µl der markierten Sonde wurde im Beckman counter LS6000 SC (Beckman) gemessen, die restliche Sondenlösung bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die Sonde wurde dann zur Prehybridisierungslösung gegeben und die Membran über Nacht bei 65°C im Rollofen inkubiert.

Um die nicht gebundene Sonde vom Blot zu waschen wurde der Blot dreimal je eine Stunde im Rollofen bei 65°C mit Waschlösung SET (0,2x SET; 0,2% SDS [20X SET Stock besteht aus 3 M NaCl; 0,4 M Tris pH 7,8; 20 mM EDTA; pH 7,8]) gewaschen. Anschließend wurde zur Analyse die Imaging Plate BAS-IP-MS 2300 (Fuji Film) in einer Filmkassette für 4 bis 48 Stunden, abhängig von der Signalintensität der Sonde, inkubiert. Die Auslesung des Signals erfolgte im FLA 3000 Scanner (Fuji Film) mit der Software BASReader 3.14, die Bildanalyse mit der Software AIDA 3.15. und die Bearbeitung der Bilder mit Corel DRAW.

4.1.17 Proteinpräparation

Für die Proteinpräparation wurden Herzen adulter Mäuse verwendet.

Die Präparation von Titinprotein erfolgte nach Warren (Warren et al., 2003b). Für die Proteinpräparation zum Nachweis im Westernblot wurde der tiefgekühlte linke Ventrikel in 20fachem Volumen (v/w) Lysepuffer HAB (6 M Harnstoff, 2% CHAPS, 1 mM DTT) aufgenommen und zweimal 30 sec im Dispergiergerät T25 (IKA) S25 N-8G (IKA) auf Eis zerkleinert. Anschließend wurde die Lösung sechsmal 10 sec mit dem Sonikator (Bandelin) bei 70% Leistung auf Eis aufgeschlossen. Die Probe wurde bei 4°C für 10 min mit 14000 upm zentrifugiert und die Proteinlösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

4.1.18 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde als Standard eine Eichreihe mit BSA verwendet.

4.1.18.1 Bradford Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde mit dem BioRad Protein Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden bei 595 nm im Photometer gemessen.

4.1.18.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz beruht auf der Publikation von (Schaffner and Weissmann, 1973).

Sie wurde für die Proteinkonzentrationsbestimmung der Titinproteinproben verwendet, da das SDS im Lysepuffer die Bradford Proteinbestimmung beeinflusst hätte.

Zusätzlich zur BSA Eichreihe wurde je 1 µl Proteinlösung auf eine Nitrozellulose Membran (Schleicher & Schüll) aufgetragen. Die Membran wurde in 0,1% Amidoschwarzlösung (45% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Amidoschwarz) für 1 min inkubiert, anschließend in Entfärbelösung (90% Methanol, 2% Essigsäure) unter Schütteln gewaschen, bis die Membran mit Ausnahme der Proteinspots, vollständig entfärbt war. Die Lösung wurde hierzu mehrfach gewechselt.

Die Proteinspots wurden mit dem Skalpell möglichst gleichgroß ausgeschnitten, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 800 µl Elutionslösung (50% Ethanol, 0,05 mM EDTA, 25 mM NaOH) 30 min im Schüttler bei RT inkubiert.

Die gefärbte Elutionslösung wurde bei 630 nm im Photometer gemessen, aus den BSA Proben die Standardreihe berechnet und die Proteinkonzentration der Proben nach der Standardkurve mit Hilfe des Programms Excel berechnet.

4.1.19 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Westernblotanalysen oder immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet.

Tabelle 8: Primäre Antikörper für Westernblot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper	Generiert in	Hersteller /Lieferant	Verdünnung	Verwendung
Anti-Aktin	Kaninchen	Sigma	1:1000	WB
Titin anti-Z12	Kaninchen	Siegfried Labeit	1:2000	WB
Titin anti-N2B UN	Kaninchen	Siegfried Labeit	1:2000	WB / IF
Titin anti-N2B UC	Kaninchen	Siegfried Labeit	1:2000	WB
Titin anti-N2B US	Kaninchen	Siegfried Labeit	1:2000 / 1:200	WB / IF
Titin anti-M8-M9	Kaninchen	Siegfried Labeit	1:2000 / 1:200	WB / IF
Anti-FHL2	Maus	MBL	1:1000	WB
Anti-FHL2	Kaninchen	Bethyl	1:200	IH
Anti- α B-Crystallin	Kaninchen	CalBiochem	1:1000 / 1:200	WB / IF
Anti- α -Actinin	Maus	Sigma	1:500	IH

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für Westernblot

Antikörper	Gekoppelt mit	Hersteller /Lieferant	Verdünnung
Anti-Maus	HRP	Amersham	1:2000
Anti-Kaninchen	HRP	Calbiochem	1:5000

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Farbstoff	Firma	Verdünnung
Schaf anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	1:1000
Schaf anti Maus	Cy3	Jackson immunoresearch	1:1000

4.1.20 Westernblot

Die Westernblotanalyse der Proteine (Towbin et al., 1979) wurde nach dem klassischen Protokoll durchgeführt, zu finden in Nature Methods Vol.2 No.10. Hierzu wurde das SDS-Gel im Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 0,2 M Glycin, 20% Methanol) in einer Tankblotapparatur Mini Trans-blot Cell (Bio Rad) bei 20 V über Nacht bei 4°C auf eine PVDF Membran Hybond P (Amersham) transferiert. Der Transfer wurde mit einer Ponceaufärbung der Membran überprüft. Die Unspezifischen Antikörperbindungsstellen mit 5% Magermilchpulver in TBS-T (0,05% Tween 20; 20 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl; pH 7,5) abgesättigt, der Blot kurz in TBS-T gewaschen und mit dem ersten Antikörper in TBS-T für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Blot viermal mit TBS-T gewaschen, mit dem 2. Antikörper in TBS-T für 30 min inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Die Detektion des Proteinsignals erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem Super Signal West Pico Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers. Das Signal wurde mit einer LAS-1000 CCD Kamera in der Intelli Dark Box (FujiFilm) und der Image Reader LAS-1000 pro V2.6 Software aufgezeichnet, und mit der Software Aida visualisiert und ausgewertet.

4.1.21 Präparation von Herzen für Histologische Untersuchungen

Die zu untersuchenden Herzen wurden, nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation, mit 3 ml PBS und anschließend mit 3 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Das Herz wurde aus dem Tier entnommen und über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert.

Herzen für Kryoschnitte wurden am nächsten Tag in 30% Saccharose überführt und für 6-7 Stunden inkubiert, anschließend in TissueTek (Vogel) eingebettet und bei -20°C bis zum Schneiden gelagert.

Herzen für histologische Färbungen wurden in H₂O überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte je eine zweistündige Inkubation in 70%igem und 90%igem Ethanol, sowie erneute Inkubation über Nacht in 96%igem Ethanol. Das Gewebe wurde dann dreimal für zwei Stunden in 100%igem Ethanol und danach zwei Stunden in Roti Histol (Roth), inkubiert. Anschließend wurde das Herz in Parafin über Nacht bei 60°C inkubiert und am nächsten Tag in Parafinblöcke gegossen. Bis zum Schneiden der Herzen wurden die Parafinblöcke bei 4°C gelagert.

4.1.22 H&E Färbung an Parafinschnitten des Herzens

Von den in Parafin gegossenen Herzen wurden mit dem Mikrotom (Leica, RM2155) 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf dem Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 30°C getrocknet. Für die H&E Färbung wurden die Schnitte für jeweils 3 min in Roti Histol, 100%igem, 96%igem, 90%igem und 70%igem Ethanol inkubiert, anschließend kurz in dH₂O geschwenkt und dann, für die Kernfärbung, für 1 min in Hämatoxylinlösung (Merck, 1:5 Verdünnung mit H₂O) gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend für 5 min unter fließendem Wasser „gebläut“, kurz in dH₂O gespült und für 100 sec in 1% Eosinlösung (Fluka) gefärbt. Nach der Cytoplasmafärbung wurden die Schnitte erneut kurz in dH₂O gespült und die Ethanolreihe für jeweils 3 sec rückwärts durchlaufen. Die Schnitte wurden abschließend in Einbettmedium (Roth) eingebettet.

4.1.23 Azan novum Färbung an Parafinschnitten des Herzens

Für die Azan novum Färbung nach Geides wurden die histologischen Schnitte wie unter 4.1.22 angefertigt, entparaffiniert und in dH₂O eingebracht. Hiernach folgte eine 30 min Färbung mit Kernechtrotlösung (Roth). Die Schnitte wurden kurz mit dH₂O gespült und anschließend 10 Minuten in 5%iger Wolframatophosphorsäure (Morphisto) gebeizt. Nach erneutem abspülen in dH₂O erfolgte die Gegenfärbung mit Anilinblau-Orange-Gemisch (Morphisto) für 5 min. Die Schnitte wurden anschließend erneut kurz in dH₂O gewaschen und hiernach in Isopropanol entwässert und differenziert, bis die Färbung der Gewebebestandteile scharf hervortrat. Abschließend wurden die Schnitte dreimal eine Minute in Roti Histol (Roth) inkubiert und mit Einbettmedium (Roth) eingebettet.

4.1.24 Immunfluoreszenz

4.1.24.1 Antikörperfärbung an Herzschnitten

Von den in TissueTek gegossenen Herzen wurden mit dem Kryotom (Leica, Cryocut 3000) 10 µm dicke Schnitte angefertigt und diese bei -20°C gelagert. Vor der Antikörperfärbung wurden die Schnitte 1-3 h bei 20°C getrocknet, für 10-15 min mit 4% PFA fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte ein Block- und Permeabilisierungsschritt mit Blocklösung (10% Ziegesserum, 0,3% Triton-X100, 0,2% BSA in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubation der ersten Antikörper (Tabelle 8) erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C in

Blocklösung. Anschließend folgten fünfmal 10 min waschen mit PBS und die Inkubation mit den sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Tabelle 10), sowie die Inkubation mit DAPI 1:2000 (Roth). Diese wurden in PBS verdünnt auf die Schnitte gegeben und für 4-5 h bei 10°C und 45 min bei 20°C inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend fünfmal für 10 min mit PBS und zweimal für 5 min mit H₂O gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit Einbettmedium (Dako Cytomytion) eingebettet. Nach Trocknung des Mediums über Nacht konnten die Herzschnitte am konfokalem Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM 5 Pascal Version 3.0 SP2) betrachtet werden, die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Programm Photoshop.

4.1.24.2 Antikörperfärbung an Kardiomyozyten

Für Antikörperfärbungen an isolierten Kardiomyozyten wurden diese auf Laminin beschichteten Glas Coverslips (Roth) ausgesät. Nach 4-24 Stunden Anheftzeit wurden die Zellen mit PBS-Azid gewaschen, dann für 15 min mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Für die Färbung mit Antikörpern wurden die Zellen durch 15 min Behandlung mit 0,2 % Triton-X100 in PBS-Azid permeabilisiert. Um unspezifische Antikörpersignale zu minimieren, wurden die Zellen für 50 min mit 1% Ziegesserum in PBS-Azid geblockt, anschließend über Nacht mit dem primären Antikörper (Tabelle 8) inkubiert. Die Zellen wurden hiernach zwei- bis dreimal 15 min mit PBS-Azid gewaschen und mindestens 30 min mit dem sekundären Antikörper (

Tabelle 10) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Azid folgte die Kernfärbung mit DAPI (Roth) 1:2000 in PBS-Azid. Abschließend wurden die Zellen zweimal in PBS-Azid, zweimal mit H₂O gewaschen und mit Einbettmedium (Dako Cytomytion) eingebettet und auf dem Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung des Mediums über Nacht konnten die Zellen am konfokalem Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM 5 Pascal Version 3.0 SP2) betrachtet werden, die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Programm Photoshop.

4.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung und das Targeting von ES-Zellen wurde nach (Willnow and Herz, 1994) durchgeführt.

4.2.1 Zellkultur Geräte

Tabelle 11: Zellkultur Geräte

Gerät	Hersteller und Typ
Brutschrank	Binder APT Line CB
Wasserbad	GFL 1083
Sterilwerkbank	BDK
Zentrifuge	Eppendorf centrifuge 5804
Mikroskop	Olympus CK30
Schlauchrollpumpe	Pharmacia LKB-Pumpe P1
Elektroporator	BIORAD Gene Pulser II

4.2.2 Zellen

Primäre Fibroblastenzellen wurden aus neomycinresistenten Mäusen (Jackson und AG Willnow) generiert (s. 4.2.1).

Die ES-Zellen AB1 (*Hprt^{b-m2}*) für die Targetingexperimente wurden von der AG Willnow zur Verfügung gestellt.

Primäre Kardiomyozytenkulturen wurden nach dem AfCS Protokoll PP00000125 aus WT, heterozygoten und KO Tieren isoliert (s.a. 4.2.11).

4.2.3 Material für die Zellkultur

Tabelle 12: Zellkultur Material

Material	Hersteller
Zellkulturschalen 10; 15cm	TPP
Zellkulturplatten 96; 48; 24; 6 well	TPP
Zellkulturschalen für ES-Zellen	Greiner bio-one
Zellkulturplatten für ES-Zellen	Greiner bio-one
Einmalpipetten 2; 5; 10 und 25 ml	Greiner bio-one
Kammern für Kardiomyozyten	Lab-Tek 4Kammerträger Borosilikat
Cryoröhrchen	Cellstar
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Greiner

4.2.4 Zellkultur Medien, Lösungen und Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Zellkultur Medien und Lösungen wurden von Gibco oder Invitrogen bezogen.

Tabelle 13: Zellkultur Medien und Lösungen

Medium / Lösung	Hersteller / Zusammensetzung
DMEM mit Glukose und Glutamin	Cambrex
HBSS	Sigma- Aldrich
Laminin	Sigma
Gelatine Type A	Sigma
ESGRO 1×10^7	Chemicon
Fibroblasten Medium	DMEM +10% FKS
ES-Medium	6,7 g DMEM Pulver (Gibco), 1,2 g NaHCO_3 in 540 ml ddH ₂ O steril gefiltert, 6 ml nicht essentielle Aminosäuren, 6 ml L-Glutamin, 6 ml Pen/Strep, 4,2 μl β -Mercaptoethanol, 75 ml FKS, 80 μl ESGRO
Aussaatmedium für Kardiomyozyten	0,9x MEM mit Henkssalzen und L-Glutamin; 5% FKS; 10 mM BDM; 100 U/ml Pen/Strep; 2 mM L-Glutamin
Perfusionslösung Kardiomyozyten	113 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 0,6 mM KH_2PO_4 ; 0,6 mM Na_2HPO_4 ; 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,032 mM Phenol Rot; 12 mM NaHCO_3 ; 10 mM KHCO_3 ; 10 mM HEPES; 30 mM Taurin; 10 mM 2,3-BDM; 5,5 mM Glukose
Verdaulösung Kardiomyozyten	Perfusionslösung mit 0,25 mg/ml Liberase Blendzyme 1; 0,14 mg/ml Trypsin; 12,5 μM CaCl_2
Isoproterenol hydrochloride	Sigma
Krebs Lösung	4,7 mM KCl, 127 mM NaCl, 0,36 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,08 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 21 mM NaHCO_3 , 5 mM Glukose, 5 mM Pyruvat, 2,5 U/l Insulin, 40 mg/l BSA, die Lösung wurde vor der Perfusion mit CO_2 und O_2 angereichert

4.2.5 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Gelatine

Damit die Fibroblastenzellen besser auf den Zellkulturschalen haften können, wurden diese zuvor mit Gelatine Type A behandelt. In PBS gelöste Gelatine (0,1%) wurde auf die Zellkulturschalen gegeben und für 30 min im Inkubator inkubiert. Die Gelatinelösung wurde direkt vor dem Aussäen der Zellen abgenommen.

4.2.6 Erzeugung primärer Fibroblasten

Für die Generierung von primären murinen fetalen Fibroblasten wurden 10,5 bis 14,5 Tage alte Embryonen einer Mauslinie verwendet, die eine Neomycinresistenz aufweist. Die Embryonen wurden der schwangeren Maus entnommen. Kopf, Herz und Leber wurden mit der Pinzette entfernt. Das restliche Gewebe wurde, pro Embryo, über Nacht in 200 µl 0,05% Trypsin-EDTA bei 4°C inkubiert, so dass das Trypsin in das Gewebe eindringen konnte ohne aktiv zu werden. Am nächsten Tag wurde das Gewebe für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, der Verdau anschließend mit 5 ml DMEM mit 10% FKS gestoppt und die Zellen durch pipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde 3 min bei 800 upm pelletiert, die Zellen anschließend in 10 ml Medium resuspendiert und auf 10 cm Zellkulturschalen (eine Schale pro Embryo) ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen.

4.2.7 Kultivieren / Passagieren von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.2.7.1 Fibroblasten Zellkultur

Die Fibroblasten wurden in DMEM +10% FKS kultiviert.

Die auf einer 10 cm Zellkulturschale konfluent gewachsenen Fibroblasten wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit 1 ml 0,05% Trypsin-EDTA bei 37°C für 4 min im Inkubator inkubiert und anschließend mit 9 ml Fibroblastenmedium von der Kulturschale gewaschen, durch pipettieren vereinzelt und im 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wurde 3 min bei 800 upm zentrifugiert, das Medium abgenommen und anschließend das Pellet in 10 ml resuspendiert und auf neuen 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Fibroblasten Zellen wurden 1:3 bis 1:5 gesplittet.

4.2.7.2 ES- Zellkultur

Die ES-Zellen wurden in ES-Medium kultiviert, welches jeden Tag gewechselt wurde.

Die ES-Zellen durften nicht konfluent wachsen, da sie sonst anfangen zu differenzieren. ES-Zellen werden wie Fibroblasten, jedoch mit stärkerem 0,25% Trypsin-EDTA, gesplittet sobald sich gut sichtbare Kolonien gebildet haben. Hierbei war es wichtig Einzelzellen zu generieren. Gesplittet wurde im Verhältnis 1:3 bis 1:5. Die Zellen sollten 2-3 Tage nach dem Splitten erneut Kolonien aufweisen, die gesplittet werden können.

4.2.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung von Zelllinien wurden diese weggefroren. Die durch Trypsinierung von der Kulturschale gelösten, vereinzelt Zellen wurden in Medium aufgenommen und durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden in Medium und durch tropfenweise Zugabe des gleichen Volumens von 2x Freezing-Medium (40% Medium, 40% FKS, 20% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Cryoröhrchen (Cellstar) verteilt und in Cryoboxen (Nalgene) bei -80°C langsam heruntergekühlt. Nach 24 Stunden konnten die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen der Zelllinien aus der Cryokonservierung wurden sie im Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend auf einer Zellkulturschale entsprechender Größe ausgesät.

ES-Zellen wurden auf Fibroblastenkulturen ausgesät.

4.2.9 Inaktivieren von Fibroblasten

90% konfluent gewachsene Fibroblasten der Passage 3 bis 4 wurden durch Zugabe von Mitomycin-C (Sigma) inaktiviert. Dieses ist notwendig, damit die Fibroblasten nicht die ES-Zellen überwachsen. Hierzu wurde das Medium der Fibroblastenkultur mit $10\ \mu\text{g/ml}$ Mitomycin-C versetzt und die Zellen 2 bis 3 Stunden im Inkubator bei 37°C behandelt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, gesplittet und auf Gelatine beschichteten Zellkulturplatten (Greiner) ausgesät bzw. für spätere Verwendung weggefroren.

4.2.10 ES-Zell-Targeting

4.2.10.1 Elektroporation

Für die Elektroporation wird eine mit ES-Zellen dicht bewachsene 10 cm Zellkulturschale trypsiniert, hierbei wurde darauf geachtet Einzelzellen zu produzieren. Die Trypsinierung wurde mit ES-Medium gestoppt, die Zellen

anschließend zweimal in PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und die Konzentration auf 1×10^7 Zellen pro 0,8 ml PBS eingestellt. 50 µg linearisierter, aufgereinigter Targeting-Vektor wurde in 800 µl PBS aufgenommen und zu den ES-Zellen gegeben. Die Elektroporation erfolgte in 0,4 cm Küvetten (Bio-Rad) mit dem Gene Pulser II (Bio-Rad) bei 240 V, 500 µF. Der Elektroimpuls dauerte ca. 7 bis 8 ms. Nach dem Elektroschock wurden die Zellen in 30 ml ES-Medium überführt und anschließend auf 5 Zellkulturschalen, welche mit inaktivierten Fibroblasten bewachsen waren, ausgesät. Der Tag der Elektroporation wird als Tag 0 markiert.

4.2.10.2 Selektion auf G418-resistente ES-Zellklone

Die Selektion der ES-Zellen mit G418 (Gibco) begann am Tag 2 nach dem Targeting. Hierzu wurde dem ES-Medium G418, mit einer aktiven Konzentration von 250 µg/ml, zugesetzt und täglich gewechselt. Die Selektion dauerte bis Tag 7.

4.2.10.3 Picken von ES-Zellklonen

Am Tag 7 und 8 nach der Elektroporation wurden die G418-resistenten ES-Zellen, die während dieser Zeit große Kolonien gebildet hatten, gepickt. Die gepickten Kolonien sollten scharf begrenzt, aber nicht flach sein.

Die 10 cm Zellkulturschale wurde nach zweimaligem Waschen mit 3 ml PBS überschichtet. Die Kolonien wurden mit einer 20 µl-Pipette unter dem Mikroskop gepickt und in 50 µl Trypsin überführt, anschließend im Inkubator für 3 bis 5 min verdaut. Durch Zugabe von 100 µl ES-Medium wurde der Verdau gestoppt und durch pipettieren die Zellen vereinzelt. 50 µl der Zellsuspension wurde auf ein gelatinisiertes 96 Well mit 150 µl ES-Medium für die Analyse der Zellen ausgesät. Die restlichen 100 µl der ES-Zellsuspension wurde im 96 Well mit 100 µl ES-Medium auf Fibroblastenzellen für die Erhaltung der Zelllinie ausgesät.

4.2.10.4 Injektion positiver ES-Zellen in Blastozysten

Die Injektion von positiven ES-Zellen in Blastozysten von Black 6 superovulierten Spendertieren wurde von Frau Schütz (AG Willnow, MDC) und Frau Becker (MDC) durchgeführt. Als Ammen dienten NMRI Tiere. Die entstandenen schimären Tiere wurden bis zur Keimbahngängigkeit der ES-Zellen mit C57BL/6 Tieren verpaart.

4.2.11 Isolation adulter Kardiomyozyten

Für den Versuch wurden männliche Tiere im Alter von 11-18 Wochen verwendet.

Die verwendeten Tiere wiesen einen gemischten 129/C57BL/6 genetischen Hintergrund auf.

Die Isolation adulter Kardiomyozyten wurde nach dem AfCS Protokoll PP00000125 durchgeführt (www.signaling-gateway.org).

Für den Versuch wurde das Tier zwei min vor Herzentnahme mit 250 μ l (50 Einheiten) Heparin (Ratiopharm) in PBS injiziert um die Blutgerinnung zu minimieren. Nach zervikaler Dislokation wurde das Herz entnommen in Perfusionslösung überführt und die Aorta an die Perfusionskanüle angeschlossen, anschließend wurde das Herz 3-4 min mit Perfusionslösung (3 ml/min) gespült, und hiernach der Verdau durch Wechsel zur Verdaulösung (Perfusionslösung mit 0,25 mg/ml Liberase Blendzyme 1; 0,14 mg/ml Trypsin; 12,5 μ M CaCl_2) durchgeführt. Nach 8-10 min war das Herz so weit verdaut, dass die Kardiomyozyten isoliert werden konnten. Das Herz wurde von der Perfusionskanüle geschnitten, Vorhöfe abgetrennt und die Ventrikel in 2,5 ml Verdaulösung mit Pinzetten zerteilt. Der Verdau wurde durch Zugabe von 2,5 ml Stopplösung I (Perfusionslösung mit 10% FKS; 12,5 μ M CaCl_2) gestoppt. Die Zellen wurden durch pipettieren vereinzelt, die Ausbeute der Präparation durch Zellzählung bestimmt. Nach Absetzenlassen der Zellen für 10 min wurde der Überstand eine min bei 1000 upm zentrifugiert, der entstandene Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Stopplösung II (Perfusionslösung mit 5% FKS; 12,5 μ M CaCl_2) resuspendiert und mit dem Ursprünglichen Zellpellet vereinigt. Die Zellsuspension wurde durch ein 100 μ m-Zellsieb (DB Falcon) gegeben. Durch Zugabe von Ca^{2+} wurde der ausgewaschene Ca^{2+} Spiegel der Zellen wieder hergestellt. Hierzu wurden im Abstand von 4 min, 50 μ l 10 mM; 50 μ l 10 mM; 100 μ l 10 mM; 30 μ l 100 mM und 50 μ l 100 mM Calciumlösung zugegeben.

Die Zellen wurden erneut absitzen gelassen und der Überstand wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in geeigneter Menge Aussaatmedium (0,9x MEM mit Henkssalzen und L-Glutamin; 5% FKS; 10 mM BDM; 100 U/ml Penicillin/Streptavidin; 2 mM L-Glutamin) resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und dann auf mit Laminin beschichtete 4-Kammer Zellkulturschalen (Lab-Tek) ausgesät. Nach zwei Stunden waren die Kardiomyozyten soweit angehaftet, dass ein Mediumwechsel durchgeführt werden konnte.

4.2.12 Kontraktionsmessung der Kardiomyozyten

Die Kardiomyozyten wurden einmal mit HBSS gewaschen, anschließend für 30 min mit 0,5 μM Fura 2AM im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit HBSS gewaschen und mit 1 ml HBSS pro Kammer versehen. Nach erneuter Inkubation von 30 min wurden einzelne Zellen am Mikroskop mit der Ion optix Software vermessen. Die Stimulation der Zellen für die Kontraktion erfolgte mit 20 V 1 Hz. Die Basalkontraktilität der Zellen wurde ca. 1 min gemessen, dann wurden die Zellen durch Zugabe von 0,1 μM Isoproterenol-hydrochlorid stimuliert. Nach Erreichen der maximalen Kontraktilität (ca. 2-3 min) wurde diese erneut für 1 min gemessen. Für die Auswertung wurde jeweils aus 10 Kontraktionen der Mittelwert gebildet.

4.3 Funktionelle Studien

4.3.1 Haltung und Verpaarung der Versuchstiere

Die aus den ES-Zellen generierten schimären Tiere wurden mit C57BL/6 Tieren verpaart. Die aus dieser Verpaarung entstandenen Tiere mit brauner Fellfarbe (agouti) wurden mit dem FLP-Deleter Stamm (Rodriguez et al., 2000) verpaart, um die Neomycinresistenzkassette zu eliminieren. Heterozygote Nachkommen dieser Verpaarung wurden, nach Auskreuzen der FLP Rekombinase, verpaart um die Tiere für die durchgeführten Experimente zu generieren (Abbildung 8).

Die Züchtung der verschiedenen Mausstämme wurde im institutseigenen Tierstall (MDC-Berlin) durchgeführt. Ebenfalls wurden hier die Blastozysteninjektionen zur Generierung der Knockout Linien (Susanne Schütz, Katja Becker) durchgeführt.

Die Haltung der Tiere erfolgte, um die Möglichkeit einer Infektion gering zu halten, in IVC Käfigen, bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Nahrung und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

4.3.2 Isoliertes arbeitendes Herz nach Langendorf

Die Arbeit am isolierten Herzen wurde an der WSU Pullman in der Arbeitsgruppe von Prof. Granzier in Zusammenarbeit mit Dr. Peng durchgeführt.

Für den Versuch wurden ca. 6 Monate alte wildtyp N2B, N2B heterozygote und N2B knockout Tiere mit 129/C57BL/6 gemischtem genetischem Hintergrund aus gleichen Verpaarungen verwendet.

Der Versuchsaufbau des isoliert arbeitenden Herzens wurde gewählt, um die entwickelten (systolischen) und passiven (diastolischen) Druck zu Volumen Verhältnisse im Herzen zu bestimmen.

Die Tiere wurden vor der Herzentnahme anästhesiert (Natrium-Pentobarbitone, 60 mg/kg, I.P.) und zur Minimierung der Blutgerinnung mit Heparin (1000 IU/kg, I.P.) behandelt. Das Herz wurde nach der Entnahme mit der Aorta an eine Nadel zur retrograden koronaren Perfusion mit oxygenierter Krebs Lösung angeschlossen. Die Perfusion erfolgte bei konstantem Druck von 80 mmHg bei 37°C.

Ein dünnwandiger Latexballon wurde durch einen Schnitt in der linken Ventrikelwand eingeführt und das Leervolumen (bei 5 mmHg) des Ventrikels bestimmt. Der Druck wurde durch ein Mikromanometer im Zentrum des Ballons bestimmt.

Für die Kontraktion wurde das Herz mit elektrischen Impulsen (alle 200ms für 5ms Stimulation) durch den SD9 Stimulator (Astro-Med. Inc.) stimuliert.

Durch Änderung der Füllung des Ballons im linken Ventrikel von 90% auf 125% des Leervolumens (5 mmHg) um jeweils 5%, wurden Frank-Starling-Kurven generiert und aufgenommen.

Der passive Druck wurde aus dem geringsten linksventrikulären Druck nach einer gleich bleibenden Druckbelastung von 30 sec bestimmt. Der höchste systolische Druck wurde von der hierauf folgenden Kontraktion bestimmt. Der entwickelte Druck errechnet sich aus der Subtraktion des passiven Drucks vom systolischen Druck.

Um der unterschiedlichen Herzgröße Rechnung zu tragen, wurden die gemessenen Drücke in Wandstress umgerechnet. Die Berechnung des Wandstress erfolgte nach der Formel 1.

$$\sigma = \frac{P}{\left(\left(\frac{V_w \times 1,05}{V} + 1 \right)^{\frac{2}{3}} - 1 \right)}$$

Formel 1: Berechnung des Wandstresses; σ = Wandstress, P = Druck, V_w = Ventrikel Gewicht, V = Volumen

Nach Beendigung der Messung ohne Stimulation wurde der Ballon entleert und der Messzyklus nach Zugabe von 0,2 M Dobutamin (adrenerge Stimulation) wiederholt. Ein dritter Messzyklus folgte nach Zugabe von 0,1 M Propranolol (adrenerge Blockade).

4.3.3 Echokardiographie

Zur Untersuchung der Herzfunktion am lebenden Tier wurde eine Echokardiographie durchgeführt. Die echokardiographischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Lynne Nelson (WSU, Pullmann USA) am MDC durchgeführt und mit Ihrer Hilfe ausgewertet.

Untersucht wurden je 9 N2B^{+/+}, N2B^{+/-} und N2B^{-/-}, sowie 7 PEVK^{-/-} Tiere mit einem Alter zwischen 90 bis 150 Tagen und einem Gewicht zwischen 21 g bis 34 g.

Die Aufnahme der Daten erfolgte mit einem Schallgerät von Visual Sonics (Visual Sonics Vevo 770 Version 1.2.0), verwendet wurde der Schallkopf RMV710 (Visual Sonics).

Die Tiere wurden mit 2% ISOFLO (Abbott) in einer Univentor 400 Narkosekammer narkotisiert und das Bauchfell rasiert. Die Echokardiographie erfolgte unter Narkose mit 0,5-1,5% ISOFLO. Die Daten des M-Modus und B-Modus wurden aus der parasternalen langen Achse aufgenommen, die Daten der Doppleruntersuchung aus der apikalen Zweikammersicht. Im M-Modus kann hierbei die zeitliche Veränderung der Position der unterschiedlichen Herzgewebe in einer Linie unter dem Schallkopf betrachtet werden, der B-Modus hingegen gibt ein zweidimensionales Bild von Tiefen- und Längenausdehnung des Gewebes unter dem Schallkopf wieder.

4.3.4 Induktion von Hypertrophie durch adrenerge Stimulation

Um Hypertrophie zu induzieren, wurden adulte Wildtyp, N2B Heterozygote und N2B defiziente Tiere adrenerge stimuliert. Hierfür wurde 8 Tage lang einmal täglich 20 mg/kg Isoproterenol-hydrochlorid interperitoneal (i.p.) injiziert. Nach 8 Tagen Injektion wurden die Herzen entnommen und die linken Ventrikel in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde die RNA für die Real Time RT-PCR Analyse (4.1.10) präpariert.

4.4 Auswertung der Daten und Statistische Analyse

Die Auswertung der Kontraktionsmessungen an isolierten Kardiomyozyten (4.2.12) erfolgte mit der Ion Optix Analyse Software, die Datenaufnahme am isoliert arbeitenden Herzen (4.3.2) erfolgte mit der Software FS 3.00.01 von Robert Kirkpatrick WSU. Die Quantifizierung von Westernblots wurde mit der Software Aida durchgeführt.

Die Aufnahme der Daten und die weitere Bearbeitung, sowie die Erstellung von Diagrammen erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft). Die Graphiken wurden mit dem Programm CorelDRAW 12 (Corel) erstellt. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit der Software Photoshop (Adobe) bearbeitet. Die Dissertation wurde mit dem Programm Word 2002 (Microsoft) erstellt.

Zur Überprüfung der Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der Student-Test (T-Test) angewendet. Bei Experimenten mit mehr als zwei Gruppen wurde eine ANOVA Analyse mit anschließendem Post Hoc Tukey HSD Test angewandt. Für die statistische Analyse wurde die Software SPSS 12 verwendet. Ein P-Wert unter 0,05 galt als signifikant.