

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Pharmakologie
Vorstand: Prof. Dr. M. J. Lohse

**Das Ecdysonsystern zur induzierbaren Genexpression
im Herzen von transgenen Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Sibylle von Vietinghoff
aus Hannover
Würzburg, Juli 2003

Referent: Prof. Dr. M. J. Lohse

Koreferent: Prof. Dr. H. Koepsell

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Regulierbare Transgenexpression	2
1.1.1.	Bakterielle Systeme	3
1.1.2.	Steroidhormonbasierte Systeme	5
1.1.2.1.	Ecdyson	5
1.1.2.1.1.	Der Ecdysonrezeptor	5
1.1.2.1.2.	Das Hormon Ecdyson	7
1.1.2.1.3.	Entwicklungsregulation bei Insekten	8
1.1.2.1.4.	Anwendung	9
1.1.2.2.	Östrogenrezeptor	11
1.1.2.3.	Progesteronrezeptor	12
1.1.4.	Dimerisierungsinduzierende Moleküle	12
1.1.5.	Regulierbare Gendeletion	13
1.2.	Der L-Typ-Calciumkanal	15
1.2.1.	Aufbau	14
1.2.2.	Modulation der Kanalaktivität	16
1.2.3.	Funktion der β -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals	17
1.2.4.	Veränderungen im Krankheitsfall	18
1.3.	Zielsetzung	19
2.	Material und Methoden	21
2.1.	Material	21
2.1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	21
2.1.2.	Plasmide	21
2.2.	Methoden	22

2.2.1.	Bakterien	22
2.2.1.1.	Kultur von E. coli	22
2.2.1.2.	Erzeugung kompetenter Zellen	22
2.2.1.3.	Transformation	23
2.2.2.	Plasmidisolation und Klonierung	23
2.2.2.1.	Isolation von Plasmid-DNA	23
2.2.2.2.	Konzentrationsbestimmung von DNA	25
2.2.2.3.	Auftrennung und Reinigung von DNA	25
2.2.2.4.	Enzymatische Behandlung von DNA und Klonierung	26
2.2.3.	Kultur eukaryontischer Zellen	27
2.2.3.1.	Zelllinien	27
2.2.3.2.	Transfektion	27
2.2.3.3.	Induktion der ecdysonrezeptorabhängigen Transgenexpression	28
2.2.3.3.1.	Induktor	28
2.2.3.3.2.	Reportergennachweis	28
2.2.3.3.3.	Proteinbestimmung	29
2.2.4.	Erzeugung transgener Mauslinien für den hybriden Bombyx-Ecdysonrezeptor	29
2.2.4.1.	Plasmidpräparation	29
2.2.4.2.	Generierung transgener Mäuse	30
2.2.4.3.	Genotypisierung	30
2.2.4.3.1.	DNA-Isolierung und Präparation	30
2.2.4.3.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.4.3.3.	Southern-Blot	33
2.2.4.4.	Tebufenozidgabe bei der Maus	35
2.2.4.5.	Kardiale Katheteruntersuchungen	34
2.2.4.6.	Proteinnachweis	36

2.2.4.6.1.	Immunfluoreszenz	36
2.2.4.6.2.	Western-Blot	36
2.3.	Statistische Auswertung	39
3.	Ergebnisse	40
3.1.	Plasmidkonstruktion	40
3.2.	Induzierbare Genexpression in transient transfizierten Zellen	42
3.2.1.	Quantifizierung der Geninduktion	44
3.2.2.	Induktionsfaktoren	45
3.2.3.	Kinetik	46
3.3.	Kinetik von Tebufenozid in vivo	46
3.4.	Charakterisierung transgener Mauslinien mit dem hybriden Bombyx-Ecdysonrezeptor	48
3.4.1.	Genotypisierung	48
3.4.2.	Katheteruntersuchung der Herzaktion	49
4.	Diskussion	52
4.1.	Modifikation des Ecdysonsystems und die Ergebnisse in der Zellkultur	52
4.2.	Der Bombyx-Ecdysonrezeptor im transgenen Mausmodell	54
4.3.	Vergleich mit anderen Systemen zur induzierbaren Transgenexpression	55
4.4.	Die Modulation des L-Typ-Calciumkanals am Herzen durch die β_{2a} -Untereinheit	58
4.6.	Perspektiven	60
5.	Zusammenfassung	62
6.	Literatur	64
7.	Abkürzungen	77

1. Einleitung

Gentechnisch veränderte Tiere spielen eine wichtige Rolle als Modelle der medizinischen und biologischen Grundlagenforschung. An ihnen kann die Funktion einzelner Gene im Gesamtorganismus untersucht werden. Zwei grundlegende Ansätze werden verfolgt: die Einbringung eines zusätzlichen Gens (Transgen) und die Entfernung eines körpereigenen Gens („Knockout“).

Ein Transgen kann entweder zur Expression eines völlig neuen Genprodukts oder zur Überexpression eines körpereigenen Gens benutzt werden. Die Expression eines fremden Gens gelang erstmals 1981 bei der Maus nach DNA-Injektion in Embryonen im Pronukleusstadium (Brinster et al., 1981). Eine räumliche Steuerung der Transgenexpression kann durch Klonierung des gewünschten Gens hinter einen zelltypspezifischen Promotor erreicht werden. Für die herzspezifische Genexpression ist der Promotor der schweren Kette des α -Myosin (α MHC) geeignet (Subramaniam et al., 1991, Hein et al., 1997).

Der zweite Ansatz ist die Gendeletion („Knockout“), also der Ausschaltung eines körpereigenen Gens, die an der Maus erstmalig 1989 beschrieben wurde (Thompson et al., 1989).

In beiden Fällen erfolgt die genetische Veränderung schon in der frühen Embryonalzeit. Bei der Beurteilung der Verhältnisse am erwachsenen Tier ergibt sich damit das Problem, daß sich Effekte aus verschiedenen Altersstufen überlagern können – manche Tiere erreichen aber auch gar nicht erst die Geburt. Außerdem läßt sich die Stärke der Transgenexpression nicht regulieren; in einer Linie erreicht sie ein relativ konstantes Ausmaß, an das eine langfristige Adaptation stattfinden kann. Deshalb gibt es verschiedene Ansätze, Transgenexpression und Genausschaltung in vivo zu regulieren (Chien, 2001).

1.1. Regulierbare Transgenexpression

Die modernen, binären Transkriptionssysteme zur regulierbaren Transgenexpression benötigen jeweils zwei Gene: einen Transkriptionsfaktor, der durch einen von außen zugegebenen Liganden steuerbar ist, und das Zielgen, an dessen Promotor der Transkriptionsfaktor bindet (Abb.1).

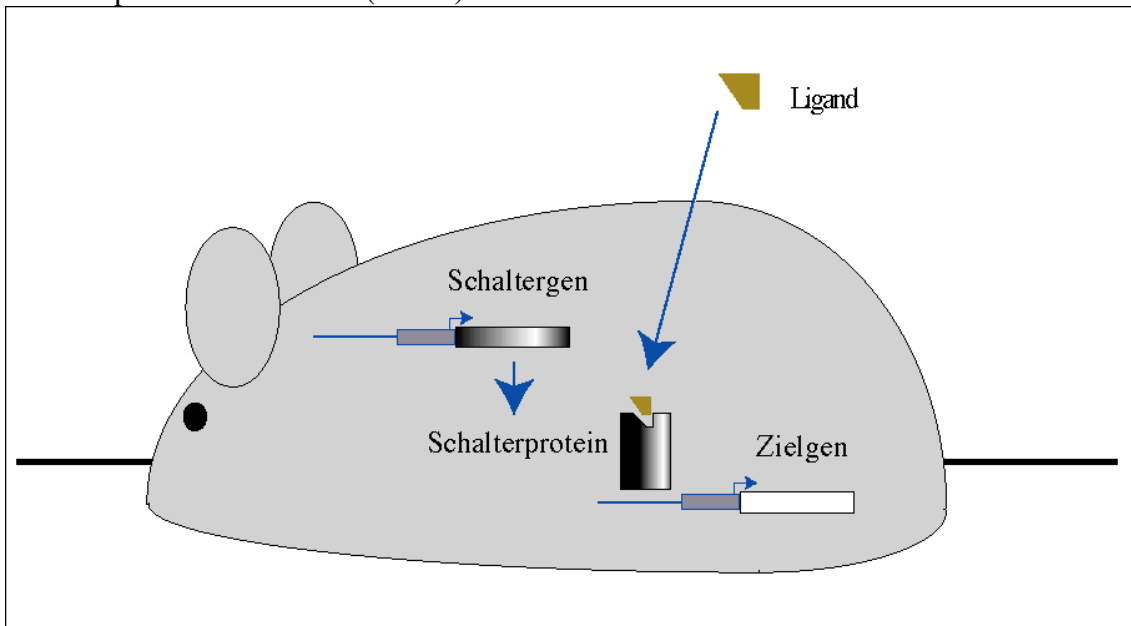


Abb. 1: Das Prinzip der induzierbaren Transgenexpression

Jedes Induktionssystem ist aus drei Grundbestandteilen aufgebaut. Davon sind zwei Gene, die in den Organismus eingebracht werden müssen: ein Gen, das für den "Schalter", also einen Transkriptionsfaktor, kodiert und das Zielgen, das unter Kontrolle eines vom Schalterprotein abhängigen Promotors steht. Die dritte Komponente ist der Ligand, der den Schalter "bedient" und so das Zielgen an- und ausschaltet.

Die zur Zeit am weitesten entwickelten Systeme lassen sich drei großen Gruppen zuordnen: bakterielle Transkriptionsfaktoren, steroidhormonbasierte Systeme und solche auf der Basis dimerisierungsinduzierender Moleküle (Fishman, 1998). Die aktuellen Systeme dieser drei Gruppen sollen ausführlich vorgestellt werden.

Zu erwähnen sind auch durch den Promotor des Hitzeschockgens hsp 70 regulierte, physikalisch induzierbare Gene (Wurm et al., 1986), Methallothionein- (Palmiter et al., 1983) und Interferonabhängige Systeme (Kuhn et al., 1995). Diese sind vor allem durch unspezifische Wirkungen des Induktors limitiert. Die Nutzung eines körpereigenen

Transkriptionsfaktor zur Induktion, wie z. B. des Cytochrom-P450-Systems (Jones et al., 1991) führt zu einem Verlust an räumlicher Steuerbarkeit.

1.1.1. Bakterielle Systeme

Von allen Induktionssystemen ist das von der Arbeitsgruppe um H. Bujard entwickelte, auf dem Tetracyclinoperon von *Escherichia coli* basierende tet-System am weitesten verbreitet (Fishman, 1998).

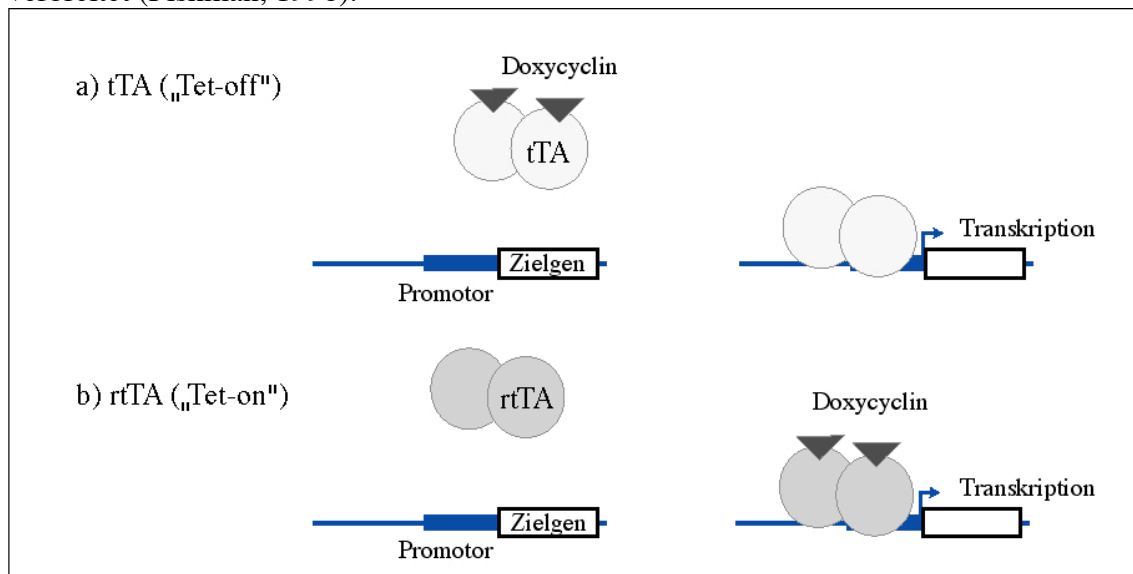


Abb. 2: Das Tetracyclinsystem

a) Der tetracyclingesteuerte Transaktivator (tTA) bindet die DNA und aktiviert die Transkription in Abwesenheit des Antibiotikums.

b) Die reverse Form (rtTA) bindet die DNA nach Zugabe des Liganden und aktiviert die Transkription in seiner Anwesenheit (Einzelheiten im Text).

Es besteht aus einem Resistenzoperon (Tn 10), das mit der Aktivierungsdomäne Vp16 fusioniert wurde. Dieser tetracyclinkontrollierte Transaktivator (tTA) stimuliert die Transkription von einer minimalen Promotorsequenz aus dem humanen Zytomegalieviruspromotor in Kombination mit Tet-Operatorsequenzen. Durch Zugabe von Doxycyclin wird die Genaktivität abgeschaltet (sogenanntes „Tet-off-System“, Abb. 2a) (Gossen und Bujard, 1992).

Durch Austausch von vier Aminosäuren konnte ein Transkriptionsfaktor mit umgekehrter Reaktion auf Tetracycline konstruiert werden, der sogenannte reverse tetracyclinaktivierte Transaktivator (rtTA), der die Genexpression in Anwesenheit von

Doxycyclin aktiviert (sogenanntes „Tet-on-System“, Abb. 2b) (Gossen et al., 1995). Durch die Konstruktion unterschiedlicher DNA-Bindedomänen für diese beiden Transaktivatoren wurde es möglich, zwei verschiedene Gene in einer Zelle durch Veränderung der Doxycyclinkonzentration differentiell zu regulieren: bei niedrigen Konzentrationen ist nur das tTA-, bei hohen nur das rtTA- gesteuerte Gen aktiv, wobei durch die unterschiedlichen Affinitäten der Rezeptoren bei mittleren Konzentrationen keine Transgenexpression nachzuweisen war (Baron et al., 1999). Weitere Mutationen des rtTA ergaben den sogenannten rtTA2 S-M2 mit höherer Affinität zu Doxycyclin, geringerer Basalaktivität und größerer Stabilität in verschiedenen Geweben (Urlinger et al., 2000). Zur Verminderung der Basalaktivität wurde ein modifizierter tet-Repressor konstruiert (Zhu et al., 2001).

Mit dem tTA-System konnte induzierbare Reporter-genaktivität bei transgenen Mäusen demonstriert werden (Furth et al., 1994, Hasan et al., 2001), das rtTA ist dagegen instabil (Urlinger, 2000). Zahlreiche transgene Mauslinien sind erzeugt worden, an denen funktionelle Zielgene untersucht werden konnten.

Für eine herzspezifische Geninduktion wurde der tTA unter die Kontrolle des herzspezifischen α MHC-Promotors gestellt (Yu et al., 1996). Die Zielgenexpression in einzelnen Herzzellen war aber heterogen. Ein wichtiges funktionelles Gen, das im Herzen gesteuert exprimiert werden konnte, ist ein durch synthetische Liganden aktivierbarer G_i -gekoppelter Rezeptor (Redfern et al., 1999, Redfern et al., 2000).

Die Hauptschwierigkeit des tTA im transgenen Tier, das in seiner optimierten Version mit sensitiveren Transaktivatoren nur sehr geringe Tetracyclindosen braucht, sieht H. Bujard (Mansuy und Bujard, 2000) in der Kinetik der Elimination des über lange Zeiträume verabreichten Doxycyclin aus dem tiefen Kompartiment. Die Zeit bis zur vollen Genaktivität beträgt unter optimalen Bedingungen immer noch sieben Tagen (Hasan, 2001).

Im Bereich der bakteriellen Induktionssysteme sind noch das lac- und das ara-Operon von *Escherichia coli* zu nennen (Baim et al., 1991, Lutz und Bujard, 1997), die bis jetzt nur in der Zellkultur erprobt wurden und u.a. durch die Labilität der Liganden limitiert sind.

1.1.2. Steroidhormonbasierte Systeme

Neben dem Ecdysonrezeptor dienen auch der Glucocorticoid- (Lee et al., 1981), der Östrogen- und der Progesteronrezeptor als Grundlagen zur Entwicklung von Steuerungssystemen.

1.1.2.1. Ecdyson

1.1.2.1.1. Der Ecdysonrezeptor

Der Ecdysonrezeptor (EcR) gehört zur Gruppe der heterodimerisierenden Steroidhormonrezeptoren, zu der auch der Vitamin-D-Rezeptor und der Thyroidhormonrezeptor zählen (Riddiford, 1993, Thummel, 1995). Weitere Untergruppen der Steroidhormonrezeptorfamilie sind die der homodimerisierenden Steroidrezeptoren, zu der der Glucocorticoid-, der Mineralocorticoid- und die Sexualhormonrezeptoren gehören, sowie die uneinheitliche Gruppe der sog. „orphan-receptors“, die hetero- oder homodimerisieren. Für sie ist bisher kein Ligand bekannt, manche besitzen auch keine erkennbare Ligandenbindedomäne und scheinen ligandenunabhängige Transkriptionsfaktoren zu sein.

Die Sequenzen der Ecdysonrezeptoren vieler Arten sind bekannt. Zuerst wurde er bei *Drosophila melanogaster* kloniert (Koelle et al., 1991). Für den Seidenspinner *Bombyx mori* erfolgte die Klonierung 1995 (Swevers et al., 1995). Er besteht aus einer aminoterminalen Transaktivierungsdomäne (A/B), einer DNA-Bindedomäne mit zwei Zinkfingermotiven (C), einer als „Scharnier“ dienenden D-Domäne und carboxyterminal der Ligandenbindedomänen (E und ggf. F) (Abb. 3) (Koelle, 1991).

Damit entspricht sein Aufbau der allgemeinen Steroidhormonrezeptorstruktur (Kumar und Thompson, 1999).

Der Heterodimerisierungspartner des Ecdysonrezeptors im physiologischen Umfeld ist das Ultraspiracle-Protein (usp), ein Homolog des Retinoid-X-Rezeptors der Vertebraten (Yao et al., 1992, Thomas et al., 1993, Yao et al., 1993, Swevers, 1995).

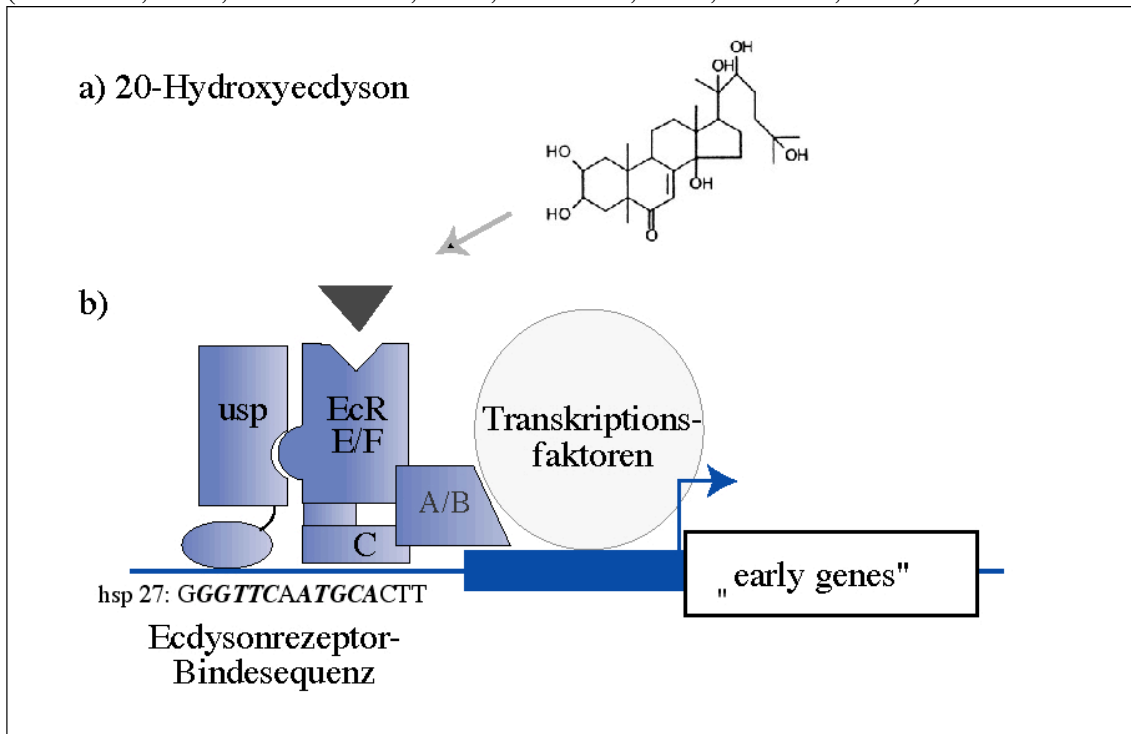


Abb. 3: Genregulation durch Ecdyson bei Insekten

a) Das Steroidhormon Ecdyson in seiner aktiven Form, 20-Hydroxyecdysone

b) Das Hormon bindet an die carboxyterminalen Domänen (E/F) des Ecdysonrezeptors (EcR) und induziert die Dimerisierung mit dem Ultraspiracle-Protein (usp). Die C-Domäne bindet an eine entsprechende DNA-Sequenz wie das unperfekte Palindrom hsp 27 und der Komplex induziert die Transkription. Daran ist vor allem der aminoterminale Bereich des Ecdysonrezeptors (A/B-Domäne) beteiligt.

Das Dimer bindet an eine spezifische DNA-Sequenz („Ecdyson-response-element“).

Das ist entweder die Verdopplung einer Basenabfolge oder ein nicht perfektes

Palindrom (Yao et al., 1992). Die höchste Affinität besteht für das Heat-

shock-response-Element hsp27 (Antoniewski et al., 1993). Es besteht aus jeweils fünf

Basenpaare langen Hälften, die von einem einzigen Nukleotid getrennt werden (Abb.

3b). Es konnte gezeigt werden, daß das unperfekte Palindrom zu einer Orientierung der

Bindung mit usp in 5'- und EcR in 3'-Richtung führt (Niedziela-Majka et al., 2000).

Nicht nur in der Promotorregion, sondern auch innerhalb der kodierenden Sequenz

eines Gens konnte eine Ecdyson-Rezeptorbindesequenz nachgewiesen werden (Crispi et al., 2001). Die DNA-Bindung wird von zahlreichen Kofaktoren in ihrer Stärke beeinflusst (Arbeitman und Hogness, 2000).

Der Ecdysonrezeptor wird in Abhängigkeit von der Konzentration des Hormons im Serum exprimiert. Er liegt in den Isoformen A, B1 und B2 vor, die sich bei gleicher DNA- und Ligandenbindedomäne im N-Terminus unterscheiden (Talbot et al., 1993). Sie lassen sich einzelnen Gewebetypen zuordnen. Während die Klasse A bei *Drosophila* vor allem in sich entwickelnden adulten Zellen zu finden ist, wird die Variante B1 in embryonalem, zum Absterben vorgesehenen Gewebe exprimiert. In anderen Insektenpezies findet sich eine andere funktionelle Verteilung, so herrscht bei *Bombyx mori* die Isoform B1 vor. Im Entwicklungsablauf reguliert der wechselnde Ecdysonspiegel die Isoformexpression (Kamimura et al., 1997).

1.1.2.1.2. Das Hormon Ecdyson

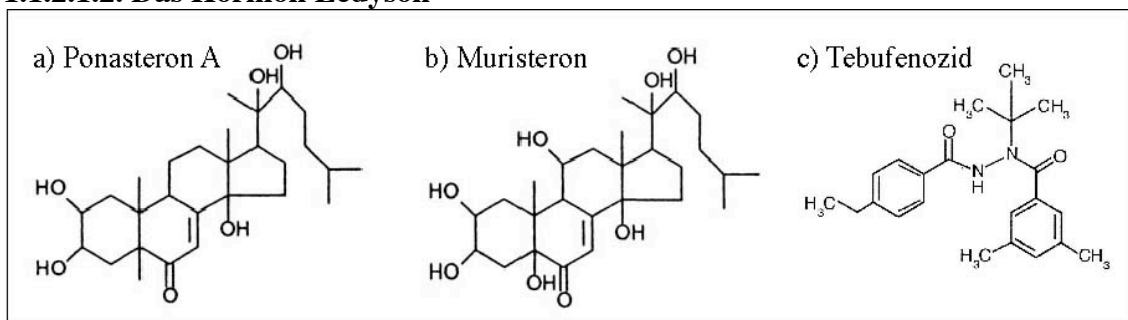


Abb. 4: Liganden verschiedener Ecdysonrezeptoren

Ponasteron A (a) und Muristeron (b) sind pflanzliche Ecdysteroide, die agonistische Wirkung auf die Ecdysonrezeptoren vieler Insektenpezies haben. Tebufenozid (c) ist ein synthetischer, nichtsteroidaler Ligand, der spezifisch an den Ecdysonrezeptor der Lepidoptera (Schmetterlinge, z.B. verschiedene Mottenarten, aber auch der Seidenspinner *Bombyx mori*) bindet.

Ecdyson in seiner aktiven Form 20-Hydroxyecdyson (Abb.3a) ist neben dem Sesquiterpenoid Juvenilhormon das einzige bei Insekten bekannte Steroidhormon (Crispi, 2001). Abhängig von Spezies und zellulärem Umfeld können auch andere Stoffe als Ecdysonagonisten wirken (Abb. 4). So kann der Ecdysonrezeptor der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* von pflanzlichen Steroiden wie Ponasteron A oder Muristeron aktiviert werden. Ecdysonrezeptoren der Lepidoptera (Schmetterlinge)

wie des Seidenspinners *Bombyx mori* können auch von Bisazylhydrazinen stimuliert werden (Thomas, 1993, Yao, 1993, Wurtz et al., 2000).

Bisazylhydrazine sind nichtsteroidale Agonisten, wie zum Beispiel Tebufenozid (Abb.3c)(Substanz RH 5992 im Produkt MIMIC® der Firma Rohm und Haas), die zur Bekämpfung von in der Land- und Forstwirtschaft schädlichen Insekten entwickelt wurden. Sie führen zu einer vorzeitigen und unvollständigen Häutung und damit zum Tod der Insekten. Dabei wird ihnen hohe Spezifität und geringe Umwelttoxizität bescheinigt (Dhadialla et al., 1998, Rohm und Haas, 1999, 2000).

1.1.2.1.3. Entwicklungsregulation bei Insekten

Das Steroidhormon Ecdyson spielt bei den Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen im komplexen Lebenszyklus der Insekten eine zentrale Rolle. Der Ecdysteroidspiegel steigt vor Häutungen und am stärksten vor der Verpuppung an (Thummel, 1995). Makroskopisch führt das Ansteigen des Titors zur Separation von Epidermis und alter Schale (Apolysis) und Füllen des entstandenen Raumes mit Häutungsflüssigkeit, die zunächst noch inaktive chitinolytische Enzyme enthält. In der Epidermis findet massive Proteinsynthese statt. Bei Abfallen des Ecdysontiters werden die chitinolytischen Enzyme aktiviert und die alte Haut wird abgebaut. Außerdem härtet die neue Schale vor. Wenn der Ecdysontiter wieder auf das basale Niveau abgefallen ist, werden Eclosionshormon und „Ecdysis-triggering-hormone“ ausgeschüttet, die zum Schlüpfen (Ecdysis) des gehäuteten Insekts führen (Dhadialla, 1998).

Die Vorgänge auf molekularer Ebene werden mit dem Ashburner-Modell beschrieben (Ashburner et al., 1974). Danach aktiviert Ecdyson auf genetischer Ebene zunächst direkt eine kleine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die sogenannten „early genes“, die wiederum die Transkription der sogenannten „late genes“, einer größeren Gruppe,

steuern, während sie inhibitorisch auf ihre eigene Transkription wirken (Talbot et al., 1993, Dhadialla et al., 1998).

1.1.2.1.4. Anwendung

Das Ecdysonrezeptorsystem bietet sich als hochentwickeltes, eukaryontisches Induktionssystem zur Steuerung der Transgenexpression an. Da es im Säugetierorganismus kein Analog zu diesem Signalweg gibt, ist die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Wirkungen gering.

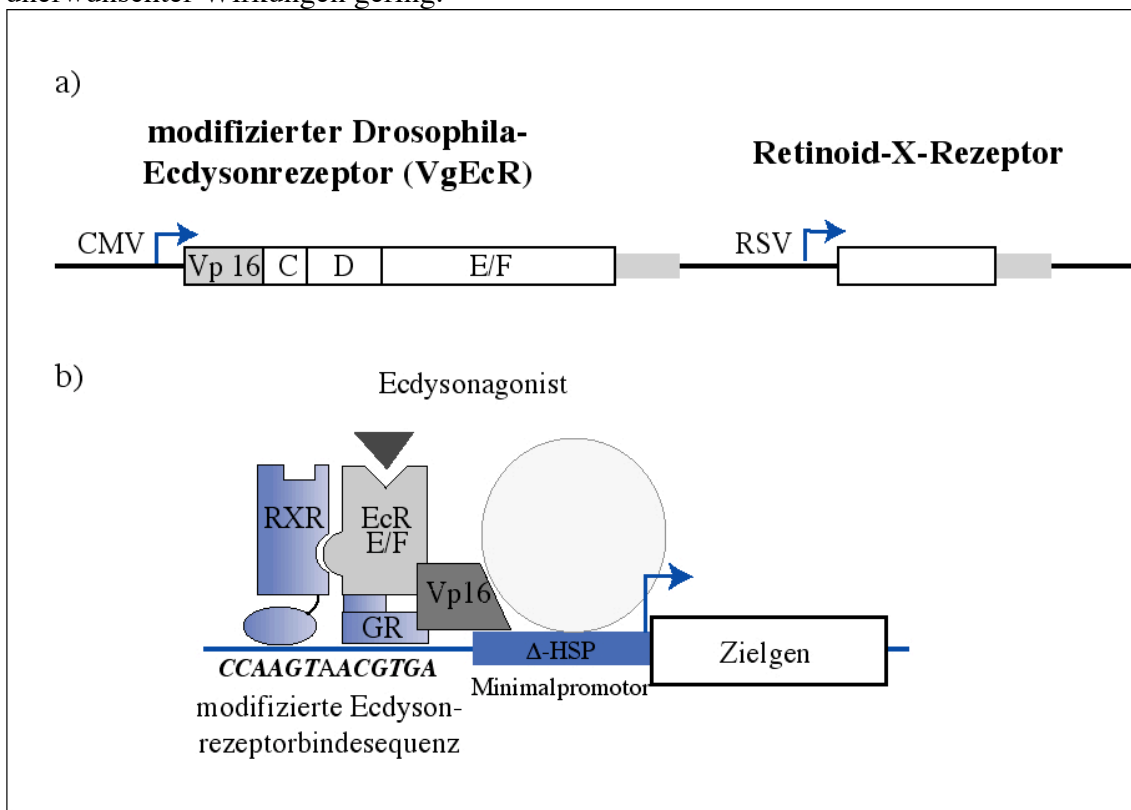


Abb. 5: Das Ecdysonrezeptorsystem zur gesteuerten Transgenexpression in Säugerzellen (No, 1996)

a) Die Struktur des Expressionsplasmids. Am Ecdysonrezeptor von Drosophila wurden die Domänen A und B durch die Transaktivierungsdomäne Vp16 des Herpes simplex Virus ersetzt. Die DNA-Bindedomäne (C) wurde der des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) angepasst. Der so erhaltene Rezeptor (VgEcR) wird zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) transfiziert (CMV: Zytomegalievirus-Promotor, RSV: Rous-Sarcomavirus-Promotor)(No 1996).

b) Nach Zugabe eines Ecdysonagonisten dimerisieren die Rezeptoren und binden am ebenfalls eingebrachten Zielgen an eine modifizierte Ecdysonrezeptorbindesequenz, die eine Bindestelle für RXR und eine Glucocorticoidrezeptorbindestelle enthält, so daß es spezifisch für die VgEcR/RXR-Heterodimerkombination ist. Über die Transaktivierungsdomäne Vp16 kann nun die Transkription initiiert werden (Δ HSP: Δ Heat-Shock-Protein Minimalpromotor).

Das Verhalten des Drosophila-Ecdysonrezeptors bei Expression in Säugetierzellen untersuchten Thomas (1993) und Yao (1993). Hier hatte er andere Eigenschaften als in der Insektenzelle. Erstens führte die Kotransfektion des ursprünglichen Heterodimerisierungspartners usp zu konstitutiver Aktivierung. Mit dem Homolog Retinoid-X-Rezeptor konnte dagegen eine regulierbare Zielgenexpression erreicht werden. Zweitens konnte Ecdyson selbst das Rezeptorsystem in der Säugetierzelle nicht beeinflussen, während die pflanzlichen Steroide Ponasteron A und Muristeron potente Agonisten blieben.

Der Rezeptor selbst wurde durch Austausch der Transaktivierungs- und der DNA-Bindedomäne zu maximaler Induzierbarkeit bei minimaler Basalaktivität optimiert (Christopherson et al., 1992, No et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Variante von No und Kollegen ist die A- und B-Domäne durch die Aktivierungsdomäne des Virusproteins 16 (Vp16) des Herpes simplex Virus und die DNA-Bindedomäne des Ecdysonrezeptors durch die des Glucocorticoidrezeptors ersetzt (Abb. 5). Dieses Konstrukt heterodimerisiert mit dem Retinoid-X-Rezeptor, der neben dem Ecdysonrezeptor und dem Reporter gen ebenfalls transgen exprimiert werden muß, und zeigt keine Interaktion mit dem (homodimerisierenden) Glucocorticoidrezeptor (No et al., 1996). Es kann durch die pflanzlichen Steroidanaloga Ponasteron A und Muristeron aktiviert werden.

Transgene Mäuse, die diesen Ecdysonrezeptor exprimierten, zeigten eine reversible Induktion des Reportergens Luciferase, die nach 10 h ihr Maximum erreichte. Durch zusätzliche Gabe synthetischer RXR-Agonisten konnte die Induktion weiter verstärkt werden (Saez et al., 2000). Durch Expression des Ecdysonrezeptors mit dem Promotor des murinen Mammatumor-Virus konnte eine brustdrüsenspezifische Reporter genaktivierung bei der transgenen Maus erreicht werden (Albanese et al., 2000).

Die Verwendung der Ligandenbindedomäne der Spezies *Heliothis virescens* (Martinez et al., 1999) und *Bombyx mori* (Suhr et al., 1998, Hoppe et al., 2000) änderte die Ligandenspezifität des Ecdysonrezeptors. Er sprach nun auch auf den nichtsteroidalen Agonisten Tebufenozid an. Der Ecdysonrezeptor des Seidenspinners *Bombyx mori* ist ohne exogenes RXR im Säugetiersystem *in vitro* und *in vivo* in Herzzellen funktionsfähig (Suhr et al., 1998, Hoppe et al., 2000). Auch am Ecdysonrezeptor von *Choristoneura fumiferana* wurden Modifikationen vorgenommen, um die Induktion durch verschiedene steroidale und nichtsteroidale Liganden zu optimieren (Kumar et al., 2002, Palli et al., 2003).

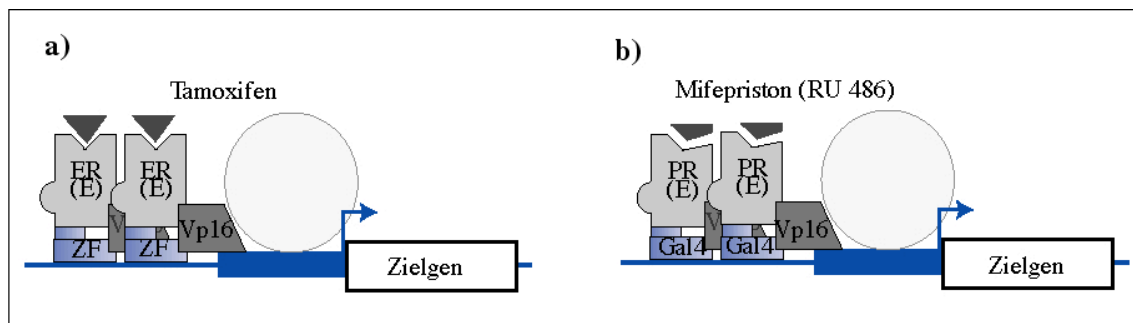


Abb. 6a: Tamoxifen-induzierbare Genexpression

Es wird eine Ligandenbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) genutzt, die mit einem eukaryontischen Zinkfinger-DNA-Bindemotiv (ZF) und der viralen Transaktivierungsdomäne Vp16 fusioniert ist. Eine andere Version verwendet die Gal4-Domäne (s. Text).

Abb. 6b: Mifepriston-induzierbare Genexpression

Die Ligandenbindedomäne des Progesteronrezeptors (PR) ist an ihrem N-Terminus trunziert, so daß sie nur noch den Progesteronantagonisten Mifepriston bindet, der jetzt als Agonist wirkt. (Gal4: DNA-Bindedomäne aus Hefe, Vp16: Transaktivierungsdomäne)

1.1.2.2. Östrogenrezeptor

Der Östrogen- und der Progesteronrezeptor haben dieselbe Grundstruktur wie der Ecdysonrezeptor. Auch bei ihnen wurde die Steuerbarkeit durch Austausch und Veränderung der einzelnen Domänen optimiert. Die Ligandenbindedomäne des Östrogenrezeptors wurde aminoterminal mit dem Hefetranskriptionsfaktor Gal-4 mit DNA-Bindedomäne und carboxyterminal mit der Transaktivierungsdomäne Vp16 fusioniert (Brasemann et al., 1993). Dieses Konstrukt kann nach Stimulation mit Östrogen in Zellen Genexpression durch Bindung an ein modifiziertes Gal-4-Responseelement hervorrufen. Xu (2001) modifizierte den Rezeptor weiter (Abb. 6a)

und konnte nach Mutation der Ligandenbindedomäne zu einer geringeren Affinität für Östrogen und höherer zum Östrogenantagonisten Tamoxifen, das nun als Aktivator wirkt, und Einfügen einer Zinkfinger-DNA-Bindedomäne eine verbesserte Induzierbarkeit erreichen. Nach adenoviralem Gentransfer ließ sich auch in vivo ein Reporter gen induzieren. Jedoch führte eine Steigerung der Tamoxifendosis zu hoher Letalität.

1.1.2.3. Progesteronrezeptor

Da die Ligandenbindedomäne für Progesteron carboxyterminal von der für Mifepriston (RU 486) liegt, konnte durch Trunkierung des Progesteronezeptors eine mifepristonspezifische Form konstruiert werden, bei der die DNA-Bindedomäne des Progesteronrezeptors durch eine Gal-4-Domäne und die Aktivierungsdomäne durch eine Vp16 Domäne ersetzt wurden (Abb. 6b) (Wang et al., 1994). Bei transgenen Mäusen konnte mit diesem System eine induzierbare Expression des menschlichen Wachstumshormons erreicht werden (Wang et al., 1997, Tsai et al., 1998). Eine andere Variante mit der Transaktivierungsdomäne des menschlichen p65 Proteins, einem Teil des NF- κ B-Komplexes, zeigte nach adenoviraler Transfektion von Mäusen über Wochen hinweg steuerbare Genexpression (Burcin et al., 1999).

1.1.4. Dimerisierunginduzierende Moleküle

Rapamycin ist ein sogenannter niedermolekularer Dimerisierungsinduktor. Es bindet gleichzeitig an das FK 506-bindende Protein (FKBP12) und das FKBP12-Rapamycin-assoziierte Protein (= FRAP oder RAFT). Es hemmt damit die Kinaseaktivität von FRAP und den Zellzyklusfortschritt in der G1-Phase und hat durch Hemmung der T-Zellaktivierung immunsuppressive Wirkung (Liberles et al., 1997).

Durch Fusion mehrerer rapamycinbindenden FKBP-Domänen mit einer DNA-Bindedomäne sowie der Rapamycindomäne des FRAP (FRB) mit einer

Transkriptionsaktivierungsdomäne konnte eine durch Rapamycin induzierbare Genexpression erreicht werden (Abb. 6). Dabei wurden verschiedene Proteinkombinationen erprobt, u.a. Gal-4 mit VP 16 (Ho et al., 1996) und eine Zinkfinger-DNA-Bindedomäne (ZFHD 1) mit dem p65 Protein als Transaktivator (Rivera et al., 1996). Bei Mäusen und bei Rhesusaffen wurde nach adenoviralem Gentransfer eine Induktion nachgewiesen (Rivera, 1996, Rivera et al., 1999, Ye et al., 1999).

Um die immunsuppressive Wirkung des Rapamycin zu vermeiden, wurden Analoga entwickelt, die spezifisch ein modifiziertes FRB binden (Liberles et al., 1997).

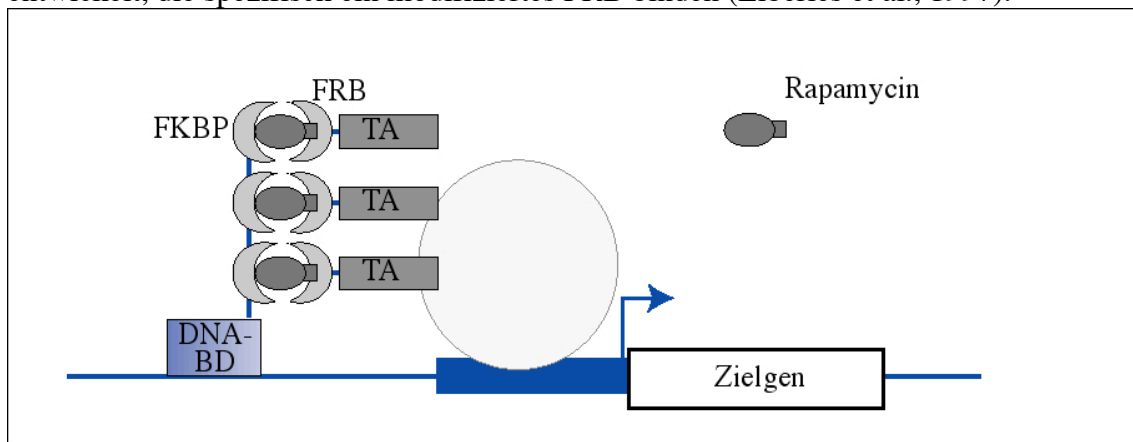


Abb. 7: Das Rapamycinsystem

DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und Transaktivierungsdomäne (TA) liegen auf verschiedenen Proteinen. Sie sind an das FK-bindende Protein (FKBP) bzw. die Rapamycin-bindende FRAP-Domäne (FRB) gekoppelt und assoziieren deshalb nach Zugabe von Rapamycin. Damit wird die Transaktivierungsdomäne an die DNA gebracht und kann die Transkription des Zielgens induzieren.

1.1.5. Regulierbare Gendeletion

Ein induzierbarer „Knockout“ wird mit Hilfe sequenzspezifischer bakterieller DNA-Rekombinasen bewerkstelligt, wobei die CRE („cyclisation-recombination“)-Rekombinase des Bakteriophagen P1 zur Zeit am weitesten verbreitet ist (Metzger und Feil, 1999, Gorman und Bullock, 2000). Mittels homologer Rekombination wird das Zielgen mit den Erkennungssequenzen der Rekombinase („loxP-sites“ für „locus of X-over of P1“) versehen und kann dann durch die Rekombinase entfernt werden.

Zur Regulation dieses Schrittes kann die CRE-Rekombinase mit einem geeigneten Promotor gewebsspezifisch exprimiert werden (für eine Zusammenstellung verwendeter Promotoren s. Metzger 1999). Zur zeitlichen Regulation der Gendelektion wurde einerseits das Gen der Rekombinase unter induzierbaren Promotoren exprimiert (Interferon-(Kuhn et al., 1995) und Tetracyclin-System (St-Onge et al., 1996)). Andererseits wurden regulierbare Fusionsproteine aus CRE-Rekombinase und einer Ligandenbindedomäne entwickelt. Dazu wurden Domänen des Östrogenrezeptors (Indra et al., 1999, Metzger, 1999, Li et al., 2000) und des Progesteronrezeptors (Kellendonk et al., 1999) verwendet.

1.2. Der L-Typ-Calciumkanal

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die β_{2A} -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals im Herzen von transgenen Mäusen induzierbar überzuexprimieren. Elektrophysiologische Untersuchungen an Einzelzellen zeigten, daß sie die Kanalmodulation vermittelt (Bunemann et al., 1999). Der Einfluß dieses Effekts auf die Herzfunktion in vivo sollte untersucht werden.

Der spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanal ist zentral für die Erregungs-Kontraktionskopplung im Herzen, denn er initiiert den erregungsabhängigen Calciumeinstrom in die Herzzelle und damit die sarkoplasmatische Calciumfreisetzung, die zur Kontraktion des Muskels führt. Bei seiner Regulation spielen adrenerge Rezeptoren eine herausragende Rolle (Rahn und Reuter, 1966, Reuter und Scholz, 1977). Der Calciumkanal hat in der Medizin als das Zielmolekül der Calciumantagonisten vom Dihydropyridin- (z.B. Nifedipin), Phenylalkylamin- (Verapamil) und Benzothiazepintyp (Diltiazem) Bedeutung bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie, der koronaren Herzkrankheit und von Herzrhythmusstörungen.

1.2.1. Aufbau

Der Calciumkanal ist ein integrales Membranprotein (Abb. 8). Die Kanalpore wird von der zentralen α_1 -Untereinheit gebildet (Singer et al., 1991). Sie ordnet sich in der Zellmembran in vier Gruppen mit jeweils sechs Transmembranhelices an. Am N-Terminus befindet sich ein Spannungssensor. Der zytoplasmatische C-Terminus wird im Regelfall abgespalten, bleibt aber im physiologischen Umfeld mit dem Kanal assoziiert. Im Herzen wird vor allem der Subtyp α_{1C} gefunden (Walker und De Waard, 1998, Striessnig, 1999).

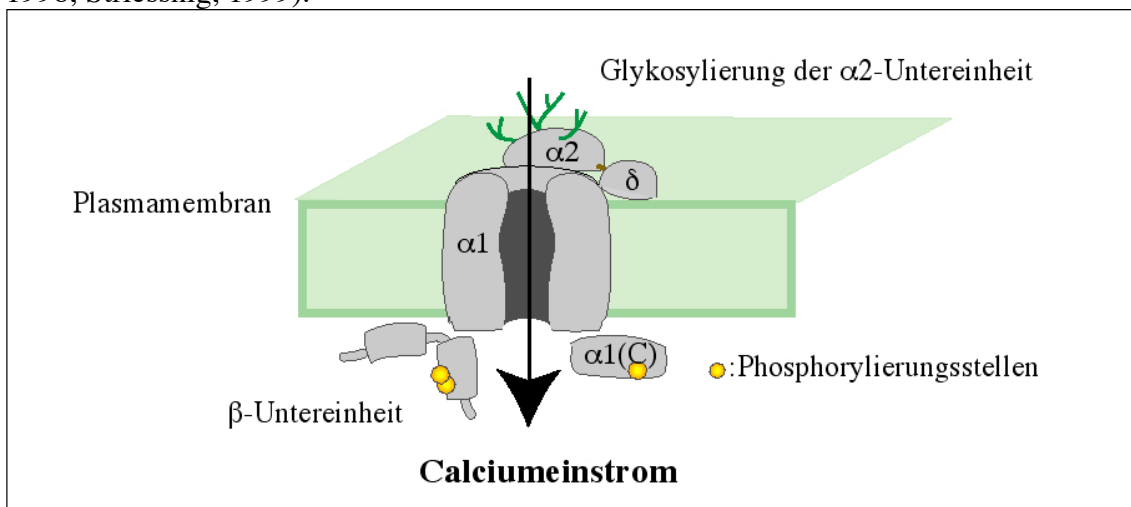


Abb. 8: Der kardiale L-Typ-Calciumkanal

Die Pore wird von der α_1 -Untereinheit gebildet, deren C-Terminus (α_1C) proteolytisch abgespalten wird, aber an der Membran verbleibt. Die β -Untereinheit ist ein intrazelluläres, membranassoziertes Protein. Die β_2 -Isoform ist an ihrem N-Terminus durch Palmitoylierung in der Membran verankert. Die Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A auf der β - und dem C-Terminus der α_1 -Untereinheit sind dargestellt.

Die β -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals ist ein aus zwei konservierten Domänen aufgebautes, intrazelluläres Protein (Ruth et al., 1989). Sie existiert in den Isoformen β_{1-4} , wobei sich die β_2 -Form durch eine Palmitoylierung am N-Terminus (Chien et al., 1996) auszeichnet. Im Herzen wird vor allem die β_{2A} -Untereinheit exprimiert (Perez-Reyes et al., 1992, Haase et al., 1996, Freise et al., 1999). Dagegen fand Hullin (1999) vor allem β_1 im Herzen, Biel (1991) und Collin (1993) fanden verschiedene Isoformen u.a. auch β_3 , das allerdings von Haase (1996) nicht bestätigt werden konnte. Es gibt eine Reihe neuer Untersuchungen zur Identität der kardialen β -Untereinheit des L-Typ-

Calciumkanals. Yamada und Kollegen (2001) konnten im Rattenherzen eine Variante nachweisen, die sich n-terminal von der β_{2A} -Untereinheit unterschied und der humanen β_{2C} -Untereinheit ähnlich war. Ihre transgene Expression führte auch dazu, daß sich der rekonstruierte Kanal ähnlich wie ein nativer verhielt. Colecraft und Kollegen (2002) wiesen ebenfalls im Rattenherzen die mRNA einer als β_{2B} -Untereinheit bezeichneten, ebenfalls n-terminal unterschiedlichen Untereinheit nach. In adulten Kardiomyozyten der Ratte, die mit einem adenoviralen Vektor mit verschiedenen β -Untereinheiten des Calciumkanals transfiziert worden waren, fanden sie, daß die β_{2A} -Untereinheit zwar den größten Einfluß auf das Kanalverhalten zeigte, mit der β_{2B} -Untereinheit aber das elektrische Verhalten nativer Zellen am besten simuliert werden konnte. Am menschlichen Herzen wurde die Expression von β_{2B} , β_3 und β_{2A} in abnehmender Reihe beschrieben (Hullin et al., 2003). Die Frage, welches „die“ kardiale β -Untereinheit ist, ist wohl noch nicht abschließend geklärt. Die Rolle der β_{2A} -Untereinheit ist wahrscheinlich geringer als noch zu Beginn dieser Arbeit angenommen. Andererseits zeigen die Untersuchungen, daß sie einen besonders starken Einfluß auf die Kanalaktivität hat.

Die stark glykosylierte α_2 - und die δ -Untereinheit sind extrazelluläre Proteine, die von einer einzigen mRNA stammen und durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. In Gehirn und Skelettmuskel finden sich außerdem intrazelluläre γ -Untereinheiten.

1.2.2. Modulation der Kanalaktivität

Die Kanalaktivität wird über verschiedene Signaltransduktionswege den physiologischen Anforderungen angepasst (Kamp und Hell, 2000). β -adrenerge Rezeptoren können den Kanal über Proteinkinase A (PKA) vermittelte Phosphorylierung aktivieren. Ebenso wirken die ebenfalls G_s -gekoppelten Rezeptoren für Histamin (H_2) und Glukagon. M_2 -muskarinerge Rezeptoren (G_i -gekoppelt) können diese Aktivierung, nicht aber die Basalaktivität hemmen. Die spannungsabhängige

Stromerleichterung („voltage dependent current facilitation“) wird dagegen durch cAMP-unabhängige Phosphorylierung durch PKA vermittelt (Kamp et al., 2000). Über die Bedeutung der einzelnen Untereinheiten des L-Typ Calciumkanals für seine Regulation finden sich teilweise widersprüchliche Ergebnisse, denn sie hängt sehr vom Expressionssystem ab. Neben den Kanaluntereinheiten werden auch andere Proteine mit der Regulation in Verbindung gebracht, vor allem das A-Kinase-Ankerprotein (AKAP) in Skelettmuskelzellen, das die Proteinkinase A am Kanal lokalisieren kann (Kamp, 2000).

Die PKA-vermittelte Modulation ist ganz wesentlich von einer Phosphorylierungsstelle am C-Terminus der α -Untereinheit (Serin 1928) (De Jongh et al., 1996, Gao et al., 1997) und von zwei Stellen in der β -Untereinheit (Serine 478 und 479) abhängig (Bunemann, 1999, Gerhardstein et al., 1999).

1.2.3. Funktion der β -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals

Die β -Untereinheit hat entscheidenden Einfluß auf Lokalisation und elektrisches Verhalten der Kanalpore. Die zusätzliche Expression der β -Untereinheit im heterologen Expressionssystem führt dazu, daß die α -Untereinheit vermehrt an die Membran transloziert wird, besser an Liganden (Dihydropyridine) bindet, und zu vermehrter Stromdichte und Anschließung des Strom bei negativerem Zellpotential („hyperpolarizing shift of current activation“) (Walker, 1998). Weitere Einflüsse auf der Calciumstrom sind vom Subtyp der β -Untereinheit abhängig. Eine Koexpression der Untereinheiten β_1 , β_3 und β_4 führt zu Strominaktivierung bei negativerem Membranpotential („hyperpolarizing shift of current inactivation“) (Cens et al., 1998). Diese Isoformen beschleunigen außerdem die Aktivierungskinetik und die spannungs- und calciumabhängige Inaktivierung und vermitteln eine Präpuls-vermittelte Stromerleichterung („prepulse induced current facilitation“) (Cens, 1998, Walker, 1998). Letzteres könnte aber auch von der β_2 -Untereinheit geleistet werden (Dai et al.,

1999).

Für die Funktion der β_2 -Untereinheit ist die Palmitoylierung entscheidend, die sie in der Plasmamembran verankert. Ihr Verlust führt zu vermindertem Gesamtzellcalciumstrom (Chien, 1996) sowie zu diffuser Lokalisation der β_{2A} -Untereinheit im Zytoplasma (Chien et al., 1998). Die β_2 -Untereinheit verlangsamt im Gegensatz zu den anderen Isoformen strom- und spannungsabhängige Inaktivierung (Cens, 1998, Restituito et al., 2000). Das kann dadurch erklärt werden, daß die Palmitoylierung durch mechanische Fixierung der β_{2A} -Untereinheit an der Zellmembran den Kanal offenhält (Restituito, 2000). In Herzzellen wurde die Überexpression der β_{2A} -Untereinheit in vitro getestet. Sie führte zu dramatischer Erhöhung der Stromdichte und Verminderung der spannungsabhängigen Inaktivierung unabhängig von äußerer Stimulation (Wei et al., 2000). Transgene Mäuse, die die β -Bindedomäne der α -Untereinheit überexprimierten, hatten eine signifikant geringere Membranfraktion der β_2 -Untereinheit als Wildtypiere (Serikov et al., 2002). Die Verteilung von β_1 und β_3 , die hauptsächlich zytosolisch lokalisiert sind, veränderte sich dagegen nicht signifikant. Die transgenen Tiere zeigten eine verminderte Herzmuskelkontraktilität und eine verminderte Dichte des L-Typ-Calciumstroms. Transgene Mäuse, die die β_{2A} -Untereinheit konstitutiv überexprimierten, waren nicht lebensfähig (D.T.Yue, pers. Mitteilung). Das deutet auf einen maßgeblichen, limitierenden Einfluß der β_2 -Untereinheit auf die Kanalaktivität im Herzen hin.

1.2.4. Veränderungen im Krankheitsfall

Bei Herzinsuffizienz ist die Exzitations-Kontraktionskopplung der Kardiomyozyten schwer gestört. Auf die Frage, welche Veränderung die einzelnen Komponenten der Calciumregulation erfahren, finden sich widersprüchliche Antworten aus zahlreichen klinischen Studien und Tiermodellen. Die basale Calciumstromdichte durch L-Typ-Kanäle ändert sich bei Herzinsuffizienz nach einer Metaanalyse nicht signifikant

(Mukherjee und Spinale, 1998). In verschiedenen Herzhypertropie und -insuffizienzmodellen wird eine Verminderung des Maximalstroms des L-Typ-Calciumkanals beschrieben, der u.a. auf eine Veränderung der Regulation über β -adrenerge Rezeptoren und PKA zurückgeführt wird (Mukherjee, 1998). Die Veränderung der einzelnen intrazellulären Botenstoffe zwischen Rezeptor und Kanal ist nur in Ansätzen bekannt. Ihre Lokalisation und Ausprägung könnte auch je nach Ätiologie und Schweregrad der Herzinsuffizienz variieren.

Was die β -Untereinheit des Calciumkanals betrifft, wurde in Biopsien aus dem Septum von insuffizienten Herztransplantaten eine Verminderung der β_1 -Untereinheit gefunden, während die α_1 - und die $\alpha_2\gamma$ -Untereinheit unverändert blieben (Hullin et al., 1999). Bei hypertropher Kardiomyopathie beschreiben Haase et al. (1996) eine Vermehrung der β_2 -Untereinheit. Bei Herzversagen aufgrund von ischämischer Kardiomyopathie wurde eine Verschiebung der Anteile der β_3 -Isoformen hin zu einer trunkierten Form beschrieben (Hullin, 2003).

1.3. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit des Ecdysonsystems zur induzierbaren Genexpression in einem transgenen Mausmodell untersucht werden.

Dazu sollte mit der Ligandenbindedomäne des Ecdysonrezeptors des Seidenspinners *Bombyx mori* ein neuer Rezeptor konstruiert werden und seine Eigenschaften in der Zellkultur mit dem Drosophilarezeptor verglichen werden. Danach sollte der neue Rezeptor auf seine Funktionsfähigkeit zur Induktion eines kardialen Gens bei transgenen Mäusen untersucht werden. Als Zielgen wurde die β_{2a} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals gewählt, die im heterologen Expressionssystem wichtigen Einfluß auf die Aktivität des Kanals zeigt und an seiner Regulation durch die Proteinkinase A maßgeblich beteiligt ist. Eine Untersuchung ihrer Rolle in vivo an einem transgenen

Tier wurde bis jetzt noch nicht durchgeführt, weil die konstitutive Überexpression letal war.

Mit diesem Zielgen sollten die Funktionsfähigkeit des neuen Ecdysonsystems in vivo getestet und gleichzeitig auch noch Erkenntnisse zu seiner Funktion im Herzen gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die für die jeweilige Methode zentralen Materialien sind dort beschrieben. Alle übrigen wurden von den Firmen Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

2.1.2. Plasmide

CMV- β -Gal	β -Galaktosidase mit dem CMV-Promotor	Laborbestand
pVgRXR	Konstrukt aus dem Drosophila-Ecdysonrezeptor zur Genexpression in Säugetierzellen.	Invitrogen (Karlsruhe)
pInd-LacZ	Ecdysoninduzierbare β -Galaktosidase	Invitrogen
pBSIIKS+BmB1 (N379-2079)cDNA	Ecdysonrezeptor B1 des Seidenspinners <i>Bombyx mori</i>	H. Fujiwara, Tokyo
pVgBmEcR	Konstrukt aus pVgRXR und dem <i>B. mori</i> Ecdysonrezeptor	diese Arbeit
pBlue-MHC β_1 ARSV40polyA	β_1 -adrenerger Rezeptor unter der Kontrolle des α MHC-Promotors	S.Engelhardt, Würzburg
α -MHC-VgBmEcR	VgBmEcR unter der Kontrolle des α MHC-Promotors	diese Arbeit
pCR3- β_{2A} -6myc	β_{2A} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals, durch Myc-Tag markiert	A. J. Chien, Chicago
pInd- β_{2A} -6myc	Ecdysoninduzierbare β_{2A} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals	diese Arbeit

2.2. Methoden

2.2.1. Bakterien

2.2.1.1. Kultur von E. coli

E. coli Kulturen wurden aus einer Einzelkolonie angeimpft und in 5 ml (Vorkulturen) bzw. 200-500 ml (Hauptkulturen) Luria-Bertani-Medium (1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) bei 37°C in einem Rotationsschüttler mit 150-200 rpm kultiviert. Einzelkolonien wurden auf Agarplatten (LB-Medium mit 1,2% (w/v) Agar) bei 37 °C im Brutschrank gezogen.

2.2.1.2. Erzeugung kompetenter Zellen

20 µl DH5α-Zellen (Life Technologies, Karlsruhe) wurden in 250 ml SOC-Medium inokuliert und bei Raumtemperatur und 225 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,6 gezogen. Nach 10 Minuten auf Eis wurde die Kultur für 10 min bei 2500xg und 4°C abzentrifugiert, das Pellet mit 80 ml eisgekühlten TB-Puffer resuspendiert und 10 min eisgekühlt. Danach wurde wieder für 10 min bei 2500xg und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 20 ml eisgekühlten TB resuspendiert und 7% DMSO hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

SOC-Medium:	2% Pepton	10 mM MgCl ₂
	0,5% Hefeextrakt	10 mM MgSO ₄
	10 mM NaCl	20 mM Glucose
	2,5 mM KCl	

TB-Puffer:	10 mM PIPES (Piperazin-N,N'-bis[2-Ethansulfonylsäure]), pH 6,7
	15 mM CaCl ₂
	250 mM KCl
	55 mM MnCl ₂

2.2.1.3. Transformation

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, zu je 50 µl Suspension wurde im Regelfall 1 µg Plasmid-DNA gegeben und 30 min auf Eis inkubiert, danach einem Hitzeschock (42°C für 45s) unterzogen und dann 2 min eisgekühlt. Nach einer Kultur in 900 µl LB- Medium für 30-50 min bei 37°C wurden auf Agarplatten mit dem dem Plasmid entsprechenden Selektionsfaktor (60 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Zeocin®, Invitrogen) Kolonien herangezogen.

2.2.2. Plasmid isolation und Klonierung

2.2.2.1. Isolation von Plasmid-DNA

Plasmidmaxipräparation

Die Präparation erfolgte mit dem DNA-MaxiPrepKit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers; eine Übernachtskultur in ca. 250 ml LB-Medium wurde 10 min bei 4500 rpm (Avanti J25-Zentrifuge, Beckman, USA, Rotor JA 14) abzentrifugiert, danach in 10 ml Puffer P1 mit 0,1 mg/ml RNase I resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde 10 ml Puffer P2 zugegeben, vier- bis sechsmal invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 10 ml Puffer P3 zugegeben, invertiert, 20 min auf Eis inkubiert und die ausgefällten Proteine bei 4800xg und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch mehrere Lagen einer Mullbinde gefiltert und zum Binden der DNA zweimal durch eine mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte Qiagen-Säule (Tip 500) geleitet. Danach wurde sie zweimal mit je 30 ml Puffer QC

gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol für 30 min bei 4800xg und 4°C gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in ca 250-500 µl H₂O gelöst. Die DNA-Konzentration wurde auf 1 µg/µl eingestellt.

Pufferzusammensetzung:

P1:	10 mM EDTA	P2:	200mM NaOH
pH 8,0	50 mM Tris/ HCl		1% (w/v) SDS
	100 µg/ml RNase A		
P3:	3 M K-Acetat	QBT:	750 mM NaCl
pH 5,5		pH 7,0	50 mM MOPS
			15% (v/v) EtOH
			0,15% (v/v) Triton X- 100
QC:	1M NaCl	QF:	1,25 M NaCl
pH 7,0	50 mM MOPS	pH 8,5	50 mM MOPS
	15% (v/v) EtOH		15% (v/v) EtOH

Plasmidminipräparation

Zur Ligationskontrolle wurden aus einzelnen Bakterienklonen in je 2 ml LB-Medium bei 37°C im Rotationsschüttler Kulturen gezogen und das Plasmid nach einem modifizierten Qiagenprotokoll extrahiert. Nach Zentrifugation bei 6800xg für 10 min wurde das Pellet in 250 µl P1-Puffer resuspendiert, 250 µl P2 zugegeben, invertiert, 300 µl P3 zugegeben und nach Invertieren 10 min bei 21000xg abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Aus dem Überstand wurde die DNA mit 750 µl Isopropanol für mindestens 15 min bei 4°C gefällt und für 15 min bei 4°C und 21000xg abzentrifugiert, dann mit Ethanol gewaschen und in 20 µl H₂O gelöst.

2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Sie erfolgte durch photometrische Absorptionsbestimmung bei 260 und 280 nm (Photometer UV-1601, UV-Visible, Shimadzu, Duisburg). Die Konzentration der DNA wurde nach der folgenden Formel bestimmt:

$$C = 50 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor (ng/}\mu\text{l)}$$

Indikator für die Reinheit der DNA war ein Verhältnis E_{260}/E_{280} von 1,8- 2,0.

2.2.2.3. Auftrennung und Reinigung von DNA

Plasmid-DNA wurde in 1%igen Agarosegelen mit 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid in TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA) bei 80-100 V aufgetrennt. Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung wurde ein DNA-Standard (NEB 1kb DNA-Leiter) in einer Menge von 0,5 μg benutzt. Die DNA wurde durch UV-Anregung des Ethidiumbromids nachgewiesen (Herolab UVT- 20 S/W, Herolab, Wiesloch) und photographiert (Herolab E.A.S.Y., Kamera Typ 429K).

Zur Aufreinigung von Plasmidfragmenten aus dem Gel zur Ligation wurde der Qiaquick Gel-Extraktionskit nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde auf einem UV-Schirm (Biometra TFX 35 M, Biometra, Göttingen) aus dem Gel ausgeschnitten und mit 3 μl Puffer QG/mg Gel bei 50°C geschmolzen. 1 μl Isopropanol/mg Gel wurde zugegeben und die DNA durch Zentrifugation bei 18000xg für 1 min an die Qiaquick-Säule gebunden. Die Säule wurde durch eine weitere Zentrifugation mit 500 μl Puffer QG nachgespült, in der nächsten Zentrifugation mit dem ethanolhaltigen Puffer PE (750 μl) gewaschen, nach Entfernen des Filtrats noch einmal zentrifugiert. Nun wurde das DNA-Fragment mit 20-50 μl H₂O eluiert und Fragmenttrennung und DNA-Konzentration mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.2.4. Enzymatische Behandlung von DNA und Klonierung

Für Restriktionsabbauten zum sequenzspezifischen DNA-Abbau wurden Enzyme der Firma New England BioLabs (NEB, Beverly, USA) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in den angegebenen Puffern verwendet. Normalerweise wurde 1U Enzym für den Abbau von 1 µg DNA in einer Stunde eingesetzt.

Um eine Ligation des leeren Plasmids zu verhindern, wurden in manchen Fällen die Enden mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase, CIP, Boehringer, Mannheim), 1U/µg DNA für 60 min bei 37 °C dephosphoryliert.

Wenn für die Ligation stumpfe Enden notwendig waren, wurde zum Auffüllen der Enden 1-3 U T4 DNA-Polymerase (NEB)/µg DNA und 10 nM NTPs in einem der NEB-Enzympuffer verwendet. Die Reaktion wurde für 30 min bei 12°C durchgeführt und dann für 10 min bei 75°C inaktiviert.

Bei Ligationen ging ich von einer Gesamt-DNA-Menge von etwa 300 ng für 20 µl Reaktionsvolumen mit einem molaren Verhältnis von Plasmid zu Insert von 1:3 aus, die ich für die einzelnen Ligationen variierte. Die Reaktion wurde bei kohäsiven Enden mit 400U T4 Ligase (NEB) in Ligasepuffer incl. ATP für 10-20 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Für stumpfe Enden wurde die Reaktionszeit auf zwei Stunden ausgedehnt. Alternativ wurde die Reaktion bei 16°C über Nacht durchgeführt. Zur Transformation wurde etwa 1/3 des Ansatzes eingesetzt.

Die zweite benutzte Ligationmethode war der Rapid Ligation Kit (Roche, Mannheim). Hier wurden pro Reaktion 25 ng Plasmid und 125 ng Insert eingesetzt, die nach Angaben des Herstellers mit 2 µl Puffer 2, 10 µl Puffer 1 und H₂O auf 20 µl aufgefüllt wurden. Nach 5 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz direkt zur Transformation eingesetzt.

Die erhaltenen Plasmide wurden über Restriktionsenzymabbau charakterisiert und vor der Weiterverwendung vollständig sequenziert (Medigenomix, München).

2.2.3. Kultur eukaryontischer Zellen

2.2.3.1. Zelllinien

Eukaryontische Zellen wurden als Monolayerkulturen bei 37°C gezogen. HEK293- und COS-Zellen (Gluzman et al., 1981) wurden in DMEM-Medium bei 7,5% CO₂ gehalten und alle zwei Tage passagiert. Dazu wurden sie mit Trypsin-EDTA (PAN, Aidenbach) von der Zellkulturschale abgelöst und in einer Verdünnung von bis zu 1:10 ausgesät.

Kulturmedium: Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), 4,5 % Glucose (PAN, Aidenbach)
10% (v/v) Fötale Kälberserum (PAN)
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

HL-1 Zellen, eine atriale Mauszelllinie (Claycomb et al., 1998), wurden nach Vorschriften des Autors in Ex-Cell 320 Medium (JRH biosciences, Lenexa, USA) bei 5% CO₂ kultiviert.

2.2.3.2. Transfektion

Die Zellen wurden 3-4 h vor der Transfektion von einer konfluent gewachsenen Platte im Verhältnis von etwa 1:3 auf neue Kulturschalen ausgesät.

HEK 293-Zellen wurden mit der Calciumphosphatmethode transfiziert (Chen, 1987). Zur Transfektion wurde für eine 10-cm Schale 20 µg Plasmid-DNA in BBS (25 mM BES (N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure), pH 6,95, 140 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄·2H₂O) mit 125 mM CaCl₂ gründlich gemischt und nach 10-20 min bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Die Kultur wurde über Nacht, mindestens aber für sechs Stunden, bei 3% CO₂ inkubiert, woraufhin die transfizierten Zellen eine abgerundete Form zeigten und ausgefallene Calciumphosphat-DNA-Komplexe erkennbar waren. Nun erfolgte ein Mediumwechsel und, wenn nötig, eine Passage der

Kultur. Zur weiteren Kultivierung auf 96-well-Platten wurde jeweils 1/100 der Zellmenge pro well eingesetzt.

COS-Zellen wurden mit der DEAE-Methode transfiziert. Dazu wurde die Kulturschale mit TBS gespült und dann 9 µg Plasmid-DNA in 6 ml TBS mit 0,5 mg/ml DEAE-Dextran (für eine 10-cm Schale) auf die Zellen gegeben. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde 7 ml DMEM mit 60 µg/ml Chloroquin hinzugegeben und für 3h bei 37°C belassen. Für drei Minuten wurde Medium mit 10% DMSO zugesetzt, dann wurde das Medium gewechselt.

TBS:	25 mM Tris	0,05 mM MgCl ₂
	137 mM NaCl	0,7 mM CaCl ₂
	5 mM KCl	0,6 mM Na ₂ HPO ₄

2.2.3.3. Induktion der ecdysonrezeptorabhängigen Transgenexpression

2.2.3.3.1. Induktor

Zur Induktion wurden Muristeron und Ponasteron (Invitrogen), die in einer 2 mM Lösung in 100% Ethanol bei -20°C aufbewahrt wurden, sowie Tebufenozid, das in Form von Mimic®, einer 0,7 M wässrigen Suspension, (Rohm und Haas) bezogen und in H₂O verdünnt wurde, verwendet. Der Induktor wurde in den angegebenen Konzentrationen mindestens 12 h nach der Transfektion zum Medium hinzugegeben.

2.2.3.3.2. Reportergennachweis

Als Reporter für die durch den hybriden Ecdysonrezeptor regulierte Genaktivität wurde das Enzym β-Galaktosidase verwendet.

Zur mikroskopischen Darstellung der einzelnen Zellen wurde die Kulturschale nach dem angegebenen Induktionszeitraum mit PBS gewaschen, mit 2% (v/v) Formaldehyd und 0,2% (v/v) Glutaraldehyd in PBS für 5 min fixiert, wiederum mit PBS gewaschen

und dann mit X-Gal-Färbelösung (X-Gal-Substrat: 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-Galaktosid) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Spaltung des X-Gal-Substrats durch β -Galaktosidase entsteht ein blauer Farbstoff. Mikroskopische Beurteilung und photographische Dokumentation erfolgten an einem Zeiss Axiovert135-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen).

PBS:	140 mM NaCl
pH 7,3	30 mM KCl
	6,5 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄

X-Gal-Färbelösung in PBS:	1mg/ml X-Gal-Substrat
	2 mM MgCl ₂
	5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]K ₃ [Fe(CN) ₆]

Die Quantifizierung der β -Galaktosidaseexpression erfolgte photometrisch mit dem Substrat Ortho-nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG), das nach Spaltung ein Absorptions-maximum von 420 nm hat.

Die Zellkulturschalen wurden zunächst auf Eis zweimal mit PBS gewaschen. Bei 96-well Platten wurden nun pro well 10 μ l Lysepuffer (0,25 M Tris, pH 8) eingefüllt und die Zellen durch zweimaliges Gefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37°C Wasserbad lysiert. Danach wurden 50 μ l Reaktionpuffer und 17 μ l ONPG-Lösung (4 mg/ml in H₂O) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 125 μ l Stoppuffer (1 M Na₂CO₃) wurde die Absorption bei 420 nm Wellenlänge in einem Plattenphotometer (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bestimmt. Bei 24-well Platten wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA von der Unterlage gelöst, abzentrifugiert und das Pellet in 30 μ l

Lysepuffer gelöst. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 10 µl eingesetzt. Zur Auswertung wurde die Absorption untransfizierter Zellen der gleichen Wachstumsphase als Leerwert abgezogen.

Reaktionspuffer:	0,6 M Na ₂ HPO ₄ •7 H ₂ O
pH 7	0,4 M NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O
	0,1 M KCl
	10 mM MgSO ₄ •7 H ₂ O
	38 mM β-Mercaptoethanol

2.2.3.3.3. Proteinbestimmung

Sie erfolgte mit roti-pharm Reagenz (Roth) photometrisch bei 595 nm. Es zeigte sich keine signifikante Abweichung in der Proteinmenge der einzelnen Ansätze und damit eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf die einzelnen Kulturschalen.

2.2.4. Erzeugung transgener Mauslinien für den hybriden Bombyx-Ecdysonrezeptor

2.2.4.1. Plasmidpräparation

Die kodierenden Bereiche der Plasmide α-MHC-VgBmEcR und pInd-β_{2A}-6myc wurden mit den Enzymen SacII bzw. NsiI und PvuI herausgeschnitten und über Gelelektrophorese und Qiaquick-Gel-Extraktionskit gereinigt (s.o.) und in TE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) eluiert. Das Eluat wurde zweimal gefiltert (Schleicher und Schüll (Dassel) 0,2 µm Sterilfilter) und für 24 h mit vierfachem Pufferwechsel in einer Slide-A-Lyzer Kassette (Pierce, Rockford, USA) bei 4°C dialysiert. Die DNA-Konzentration im Dialysat wurde auf 5 ng/µl eingestellt.

2.2.4.2. Generierung transgener Mäuse

Die Generierung transgener Mauslinien wurde mit einer Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken (Az. 621-2531.01-14/97-16/97) von Frau Dr. E. Schmitteckert durchgeführt. Wir verwendeten Mäuse des Inzuchtstammes FVB/N. Weibliche Mäuse im Alter von 4-6 Wochen wurden durch intraperitoneale Gabe von 5 U follikelstimulierendem Hormon und 22h später 5 U humanem Choriongonadotrophin zur Superovulation gebracht und in der folgenden Nacht verpaart. Am Morgen wurden sie durch zervikale Dislokation getötet und die Pronukleusstadien der Embryonen aus den Eileitern entnommen. Sie wurden in 1 ml Medium M2 (Sigma) mit 125 µg Hyaluronidase gespült und in einem Mediumtropfen unter Mineralöl bei Raumtemperatur aufbewahrt.

In lebenden Eizellen, in denen beide Vorkerne deutlich erkennbar waren, wurde das gereinigte Plasmid in den männlichen Vorkern injiziert. Nach der Pronukleusinjektion wurden die Eizellen in den Eileiter mit Ketamin anästhesierter scheinträchtiger Ammentiere der Linie CD 1 übertragen.

2.2.4.3. Genotypisierung

2.2.4.3.1 DNA- Isolierung und Präparation

Den 3 Wochen alten Mäusen wurde beim Absetzen von der Mutter ein etwa 0,2 cm langes Stück Schwanz zur DNA-Gewinnung entfernt. Die Probe wurde zunächst mit Proteinase K (0,2 µg/ µl) in Lysepuffer (0,5 % Natriumlauroylsarcosin, 100 mM NaCl, 50 g/l Chelex®-100 (Biorad, Hercules, CA)) bei 55°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Probe kurz abzentrifugiert und durch Erhitzen auf 100°C für 8 min inaktiviert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 18000xg wurde der Überstand direkt für die PCR verwendet.

Alternativ wurde die Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode angewendet. Der Abbau durch Proteinase K fand in 750 µl Abbaupuffer (100mM NaCl, 10 mM Tris, 25 mM

EDTA, 0,5% SDS, pH 8) statt. Der Probe wurde nun 400 µl Phenol (pH 7,5- 8,0) zugegeben und 10 min bei 1700xg zentrifugiert. Von der wässrigen Oberphase wurden 600 µl abgenommen, erneut mit 300 µl Phenol gefällt und wiederum zentrifugiert. 400 µl des Überstands wurden mit 300 µl Chloroform/Isomylalkohol (25:1) geschüttelt und nach Zentrifugation unter denselben Bedingungen aus 300 µl der Oberphase mit 100% Ethanol die DNA ausgefällt. Nach einem Waschschrift mit 75% Ethanol wurde die DNA in H₂O gelöst und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.4.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht eine sequenzspezifische Amplifikation und dadurch den Nachweis definierter Genabschnitte. Hier wurde sie zum Nachweis der Transgenintegration in das Mausgenom verwendet.

Für den Nachweis des α -MHC-VgBmEcR wurde ein Sense-Primer aus dem α -MHC-Promotor mit einem Antisense-Primer aus dem modifizierten Ecdysonrezeptor kombiniert, für den Nachweis des Ind- β_{2A} -6myc ein Primer aus der Rezeptorbindedomäne mit einem aus der für die β_{2A} -Untereinheit kodierenden Sequenz. Sie wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

α -MHC-VgBmEcR-Sense	5'- TAGCCCACACCAGAAATGAC- 3'
α -MHC-VgBmEcR-Antisense	5'- CAAGGGCATCGGTAAACATC- 3'
Ind- β_{2A} -6myc-Sense	5'-GTGCATTGTTCTCGATACCG- 3'
Ind- β_{2A} -6myc-Antisense	5'- GTATTCAGAGTTCTCTTCTTGT- 3'

Reaktionsansätze: Die PC-Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl in Boehringer PCR-Puffer incl. MgCl₂ mit 0,01 U Taq-Polymerase, 0,1 mM NTPs und jeweils 0,5 mM der einzelnen Primer mit 1 µl der Lösung der genomischen DNA

durchgeführt. Nach 3 min bei 94°C zum Aufschmelzen der DNA in Einzelstränge wurde folgender Reaktionszyklus durchlaufen:

Für α -MHC-VgBmEcR 30x (15s Denaturierungsschritt bei 94°C, 20s Anlagerungstemperatur von 57°C, 30s Syntheseschritt bei 72°C).

Für Ind- β_{2A} -6myc 38x (20s Denaturierungsschritt bei 94°C, 20s Anlagerungstemperatur von 54°C, 1 min Syntheseschritt bei 72°C).

Nach einer abschliessenden Synthesephase von 10 min bei 72°C wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt. Die Reaktionsprodukte (302 bzw. 436 Basenpaare lang) wurden elektrophoretisch in einem zweiprozentigen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfluoreszenz nachgewiesen.

2.2.4.3.3. Southern-Blot

Alternativ wurde die Integration des Transgens durch Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde nachgewiesen. Dazu wurde eine definierte Menge (20 μ g) mit der Lithiumchloridmethode präparierter DNA einem Enzymverdau unterworfen (EcoRI für α -MHC-VgBmEcR, HindIII und BamHI für Ind- β_{2A} -6myc). Die Enzyme wurden so gewählt, daß innerhalb des zu integrierenden Plasmidstücks ein Stück definierter Länge entstand. Die DNA wurde mittels Gelelektrophorese bei 50 V aufgetrennt. Das Gel wurde mit einem Größenstandard und Lineal photographiert, um die Größe der Banden am fertigen Blot bestimmen zu können.

Nach Depurinierung für 10 min in 0,2 M HCl und Denaturierung der DNA über 45 min in 1,5 M NaCl und 0,5% M NaOH wurde das Gel nach einem Neutralisationschritt (2x 30 min in 1 M Tris pH 7,4 mit 1,5 M NaCl) geblottet. Die Nylonmembran (Qiabrane Nylon, Qiagen) wurde in 10x SSC getränkt. Nun wurde die Anordnung zum Blotten aufgebaut: Die DNA wird über einen kapillären SSC-Puffer-Strom, der von einem unter dem Gel befindlichen Behältnis durch Gel, Membran und Filterpapier in einen

Papiertuchstapel zieht, aus dem Gel auf die Membran transferiert. Nach etwa 12 h wurde die DNA auf der Membran mit UV-Licht (254 nm) für 2 min fixiert.

Der nächste Schritt ist die Hybridisierung der denaturierten DNA. Die Membran wurde bei 42°C in Hybridisierungslösung geschwenkt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde für 2h hitzedenaturierte Lachssperma-DNA zugegeben.

Vorbereitung der Sonde: Innerhalb der aus der genomischen DNA ausgeschnittenen Fragmente wurden Sonden von 1-2 kB Länge ausgeschnitten (α -MHC-VgBmEcR: SacI, Ind- β_{2A} -6myc: KpnI und HindIII) und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese mit dem Qiaquick Gel-Extraktionskit aufgereinigt. 50 ng DNA wurden denaturiert und mit 10 μ l Oligo-labeling-mix (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA), 5 μ l α^{32} P-dCTP (Amersham) und 1 μ l Klenowfragment für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 70 μ l Stopplösung zugegeben und der Fragmentmix durch eine MicroSpin™ S-300HR-Säule (Amersham) zentrifugiert. Nach Hitzedenaturierung wurde die Sonde auf die Membran gegeben und für mindestens 24 h bei 42°C hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde entsorgt, der Blot mit 10x SSC gewaschen. Der Hybridisierungsnachweis fand durch Exposition eines Biomax MSM Films bei – 80°C statt.

20x SSC:	3M NaCl 460 mM Na-Zitrat (pH7,0)
Denhardtsche Lösung:	1%(w/v) Ficoll (Type 400, Amersham) 1%(w/v) Polyvinylpyrrolidin 1%(w/v) BSA
Starksche Lösung (2x):	100 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM NaH ₂ PO ₄ in 10x Denhardtscher Lösung und 10x SSC
Hybridisierungslösung:	7 ml Starksche Lösung

8 ml Formamid

4 ml Dextransulfat

2 ml SDS 20%

2.2.4.4. Tebufenozidgabe bei der Maus

Den Mäusen wurde 4,5 mg Tebufenozid in Form von einem Teil Mimic®, zwei Teilen Sesamöl und zwei Teilen sterilem Wasser intraperitoneal injiziert. Die Gesamtmenge betrug 100µl. Bei den Katheterisierungsversuchen wurde die Induktion über 2-14 Tage durchgeführt, zumeist mit Injektionen im Abstand von 2 Tagen. Bei der Mehrzahl der Tiere wurden die Injektionen gut vertragen.

2.2.4.5. Kardiale Katheteruntersuchungen

Zur Untersuchung der kardialen Auswirkungen des Transgens führte Herr Prof. Lutz Hein Linksherzkatheteruntersuchungen durch, die bereits mehrfach beschrieben sind (Brede et al., 2001). Dazu wurden die Mäuse mit 2,5% Tribromethanol narkotisiert (15 µl/g Körpergewicht) (Firma Aldrich, Deisenhofen). Nach Freipräparation und Kanülierung der rechten A. carotis wurde ein 1,4 Millar-Druckkatheter (Millar Instruments, Houston, USA) zum Herzen vorgeschoben und die Druckverhältnisse mit Hilfe eines MacLab/4S-Systems (AD Instruments, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet. Zur Untersuchung der Kreislaufparameter unter Medikamentengabe wurde ein Katheter in die linke Vena jugularis eingeführt. Es wurde ein Polyethylenkatheter verwendet (Eppendorf, Hamburg), über den Dopamin mit einer Mikroinfusionspumpe (Braun, Melsungen) injiziert wurde. Es wurden Herzfrequenz, systolischer und diastolischer Blutdruck und über die Druckanstiegsgeschwindigkeit die Kontraktilität bestimmt.

Die in-vivo-Induktionen des Transgens und die Herzkatheteruntersuchungen wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Az. 621-2531.01-30/01).

2.2.4.6. Proteinnachweis

Für den Nachweis der mit einem sechsfachen Myc-Epitop versehenen β_{2A} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals wurden ein monoklonaler Anti-Myc-Antikörper und ein monoklonaler Anti- β_{2A} -Antikörper aus Mausaszites verwendet, die freundlicherweise von A.J. Chien (Chicago) zur Verfügung gestellt wurden. Alternativ wurde ein monoklonaler Anti-Myc-Antikörper der Firma NEB eingesetzt.

2.2.4.6.1. Immunfluoreszenz

Zur Darstellung des Proteins mit seiner Lokalisation in der Zelle wurden die Zellen auf Deckgläschen gezüchtet. Diese wurden mit PBS gewaschen und in 4% Formaldehyd fixiert. Nach drei Waschgängen mit PBS wurden unspezifische Stellen durch die Zugabe von 2% BSA in PBS für eine Stunde geblockt. Nach Entfernung dieser Lösung wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 in BSA/PBS aufgetragen und eine Stunde belassen. Die Deckgläschen wurden wieder dreimal gewaschen und dann mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Anti-Maus Alexa, Molecular Probes, Göttingen) in einer Verdünnung 1:1000 versehen, der 20 min verblieb, bevor noch einmal gespült wurde. Nach Anregung konnte die Fluoreszenz unter einem Zeiss IM35-Mikroskop nachgewiesen und fotografiert werden.

2.2.4.6.2. Western-Blot

Herstellung von Zellysaten: Die Zellkulturschalen wurden auf Eis mit PBS gewaschen und in Lysepuffer (50 mM Tris pH 6,7, 1 mM Na-Vanadat, 1:200 Soja-Trypsininhibitor) vom Untergrund gelöst. Nach Zerkleinerung in einem Glaspotter wurden ganze Zellen für 10 min bei 1000xg und 4°C abzentrifugiert und der Überstand zur Denaturierung unter reduzierenden Bedingungen mit 10% (v/v) 20%SDS und 2%(v/v) β -Mercaptoethanol versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur

wurde dem Lysat Bromphenolblau (in 50% Glyzerin) zugegeben und es nach 10 min bei 60°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Präparation von Herzgewebe erfolgte nach dem Protokoll von Gao (Gao, 1997).

Das Gewebe wurde zunächst in Puffer A mit einem Glaspotter homogenisiert, für 10 min mit 5000xg zentrifugiert und dann dreimal mit Puffer A mit 600mM KCl gewaschen, indem jeweils resuspendiert und abzentrifugiert wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit Puffer B wurde in Puffer B, dem 1% SDS zugegeben war, resuspendiert.

Puffer A:

250 mM Sucrose

250 mM KCl

10 mM Imidazolin, pH 7,4

5 mM MgCL₂

10 mM EDTA

1:200 Soja-Trypsininhibitor

Puffer B:

50 mM Tris- HCl, pH 7,4

2 mM EDTA

2 mM EGTA

1:200 Soja-Trypsininhibitor

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese: Die Auftrennung der durch das SDS masseabhängig negativ geladenen Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel. Nach etwa 1 cm Sammelgel folgte ca. 5 cm Trenngel bei etwa 100 V in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3). Als Standard wurde ein 10 kDa Größenmarker aufgetragen (Gibco, Karlsruhe).

Sammelgel:

125 mM Tris/HCl (pH 6,8)

0,2% (w/v) SDS

5% Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8) (Rotiphoresegel 30)

1 ‰ TEMED (N,N,N',N',- tetramethylethylendiamin)

1%(v/v) 10% Ammoniumperoxodisulfat

Trenngel: 375 mM Tris/HCl (pH 8,8)
0,4% (w/v) SDS
10% Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8) (Rotiphoresegel 30)
0,5 %o TEMED
0,7%(v/v) 10% Ammoniumperoxodisulfat

Übertragen der Proteine auf eine PDVF-Membran: Das eigentliche Western-Blotting fand für 1 h bei 80 V in einer Biorad-Nassblottapparatur (Biorad, Hercules, USA) statt. Dafür wurde das Gel der Halterung entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel auf eine in Methanol getränkte Membran (Immobilon P, Millipore, Bedford, USA) aufgelegt, die zwischen Filterpapieren in die Apparatur eingespannt wurde. Der Transfer fand in Puffer mit 25 mM Tris, 150 mM Glycin und 10% Methanol statt. Der Proteintransfer wurde durch Anfärbung der Membran mit Ponceaurot (0,2% Ponceau-S-Pulver in 3% Trichloressigsäure) nachgewiesen, danach die Membran mit PBS wieder entfärbt.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 2% BSA in PBS für eine Stunde geblockt. Nach Entfernung dieser Lösung wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde dreimal in Waschpuffer (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,2% BSA, 0,2% NP-40) gewaschen und dann mit dem sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörper (Ziege-anti-Maus, Molecular Probes) in einer Verdünnung 1: 4000 1h bei Raumtemperatur geschaukelt. Nach dreimaligem Waschen wurde zum Reaktionsnachweis eine Chemolumineszenzlösung (SuperSignal®West Pico Chemolumineszenzdetektionskit, Pierce, Rockford, USA) zugegeben und die Lumineszenz als Schwärzung eines Röntgenfilms (Biomax ML, Eastman Kodak, Rochester, USA) nachgewiesen.

Zum Entfernen der Antikörper vor Hybridisierung mit einem anderen primären Antikörper wurde die Membran in 100 mM Glycin, pH 2,5 gewaschen und danach in Waschpuffer gespült.

2.3. Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind als arithmetische Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler dargestellt. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen und Messungen ist bei den einzelnen Experimenten vermerkt.

3. Ergebnisse

3.1. Plasmidkonstruktion

Zunächst sollte ein neuer Ecdysonrezeptor konstruiert werden, der wie die Rezeptoren der Lepidopteranart (Schmetterlingsart z.B. *Bombyx mori*) mit einem nichtsteroidalen Liganden aktivierbar ist und gleichzeitig die bereits am *Drosophila*-Ecdysonrezeptor vorgenommenen Modifikationen zur besseren Regulierbarkeit in Säugerzellen besitzt.

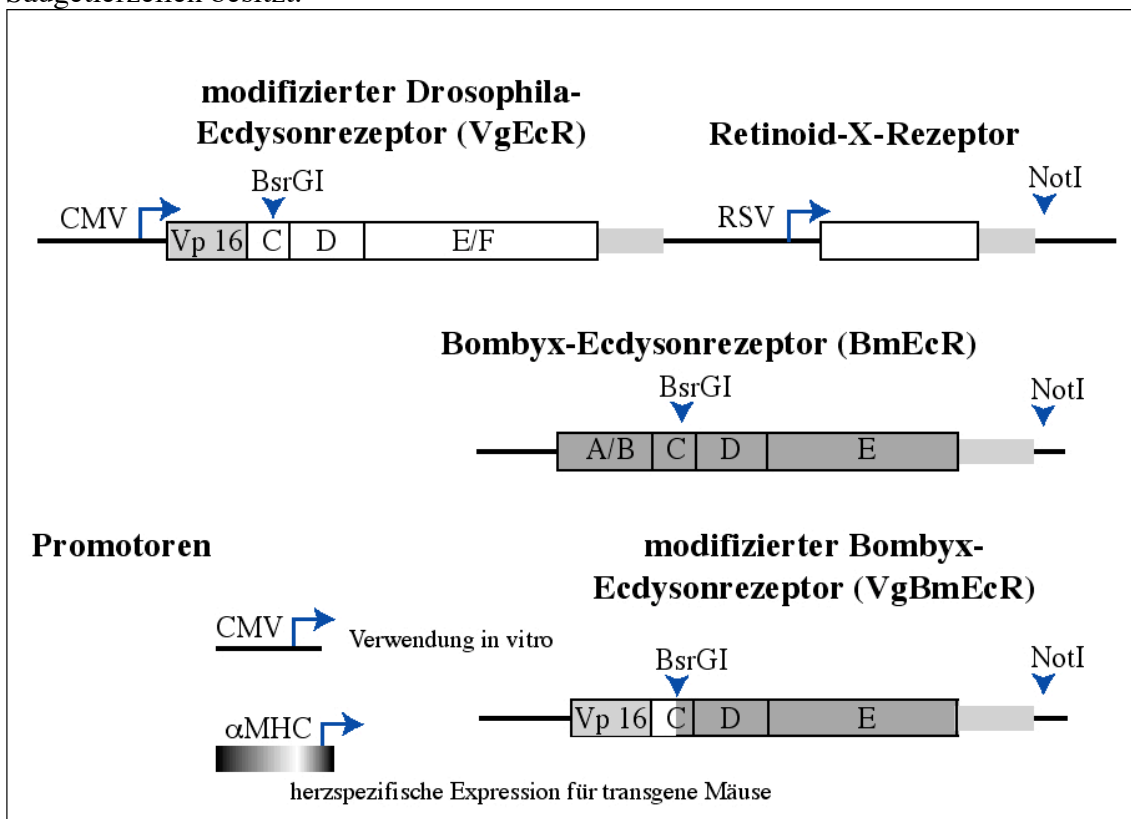


Abb. 9: Konstruktion eines hybriden Bombyx-Ecdysonrezeptors

Der hybride Bombyx-Ecdysonrezeptor (VgBmEcR) wurde aus der B1-Isoform des Ecdysonrezeptors des Seidenspinners *Bombyx mori* und einem Plasmid mit einem modifizierten Drosophila-Ecdysonrezeptor (VgEcR) und dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) mit den Enzymen BsrGI und NotI kloniert. Für eine herzspezifische Expression des Ecdysonrezeptors im transgenen Tiermodell wurde eine zweite Version unter der Kontrolle des Promotors der schweren Kette des α -Myosin (α MHC) hergestellt.

In dieser Arbeit wurde zur Konstruktion eines hybriden Ecdysonrezeptors die cDNA der Ligandenbindedomäne des Ecdysonrezeptors (B1 Isoform) des Seidenspinners *Bombyx mori* (BmEcR) mit den Enzymen BsrGI und NotI dem Plasmid pBSII KS+BmBI

entnommen und in das mit denselben Enzymen geöffnete Plasmid pVgRXR eingesetzt, so daß eine Kombination aus DNA-Bindedomäne und Transaktivierungsdomäne des Drosophilasystems mit der Ligandenbindedomänen des BombyxEcR entstand (Abb. 9). Das Zielgen sollte herzspezifisch exprimiert werden. Dazu wurde der neu konstruierte Bombyx-Ecdysonrezeptor (pVgBmEcR) hinter den Promotor der schweren Kette des α -Myosin (α MHC) kloniert. Er wurde mit den Enzymen DraI und PvuII dem Plasmid pVgBmEcR entnommen und in das mit denselben Enzymen geöffnete Plasmid pBlue-MHC β_1 ARSV40polyA eingesetzt. Dadurch wurde die Expression des „Schalters“ auf das Herzgewebe, in dem der Promotor des α -Myosin aktiv ist, begrenzt, und damit konnte er auch nur dort das Zielgen anschalten.

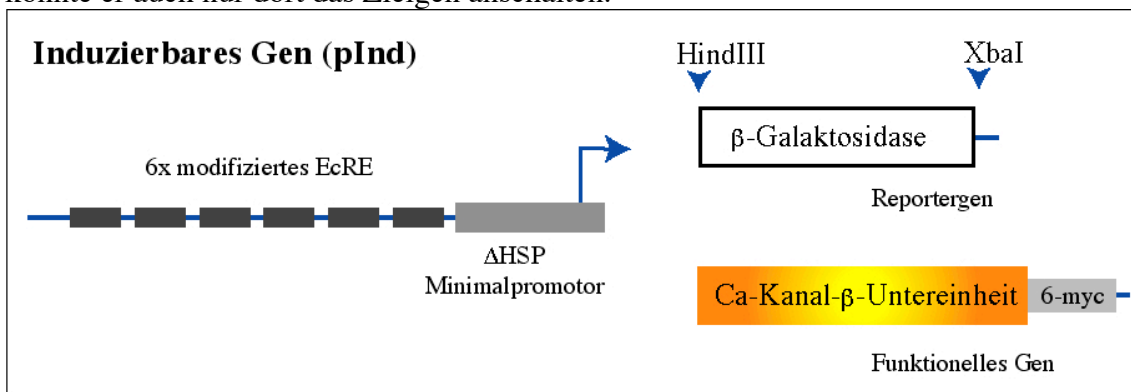


Abb. 10: Konstruktion eines ecdysoninduzierbaren Gens für den L-Typ-Calciumkanal (pInd β_2a)

Das Reportergen β -Galaktosidase wurde mit den Enzymen HindIII und XbaI durch die β_2a -Untereinheit des kardialen L-Typ Calciumkanals ersetzt. Dieses ist c-terminal mit einem sechsfachen Myc-Tag versehen und dadurch durch Anti-Myc-Antikörper nachweisbar. (EcRE: Ecdyson-Rezeptorbindesequenz, Δ HSP: Δ Heat-Shock-Protein)

Das Ecdyson-regulierbare Plasmid (pInd) besteht aus einer sechsfachen Wiederholung einer modifizierten Ecdysonrezeptorbindesequenz, die spezifisch mit der modifizierten DNA-Bindedomäne interagiert (No et al., 1996), gefolgt von einem minimalen Hitzeschockpromotor (Δ HSP). Danach folgt das zu regulierende Gen.

Für diese Arbeit wurde das Gen für die β_{2A} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals hinter den induzierbaren Promotor kloniert. Um einen immunologischen Nachweis zu vereinfachen, wurde es in einer Form mit carboxyterminalem, sechsfachen „Myc“-Epitop verwendet. Es wurde mit den Enzymen HindIII und XbaI aus dem Plasmid

pCR3- β_{2A} -6myc herausgeschnitten und in das Plasmid pInd-LacZ eingesetzt, aus dem vorher mit denselben Enzymen das Reporter-gen β -Galaktosidase entfernt worden war (Abb. 10).

3.2. Induzierbare Genexpression in transient transfizierten Zellen

Das Expressionssystem wurde zunächst in HEK293-Zellen in vitro getestet. Dazu wurden die hybriden Ecdysonrezeptoren von *Drosophila* und *Bombyx* transient transfiziert. Die Funktion des *Bombyx*EcR wurde mit und ohne Dimerisierungspartner Retinoid-X-Rezeptor (RXR) untersucht. Als Reporter-gen diente das Enzym β -Galaktosidase im ecdysonrezeptorgesteuerten Plasmid pIndLacZ.

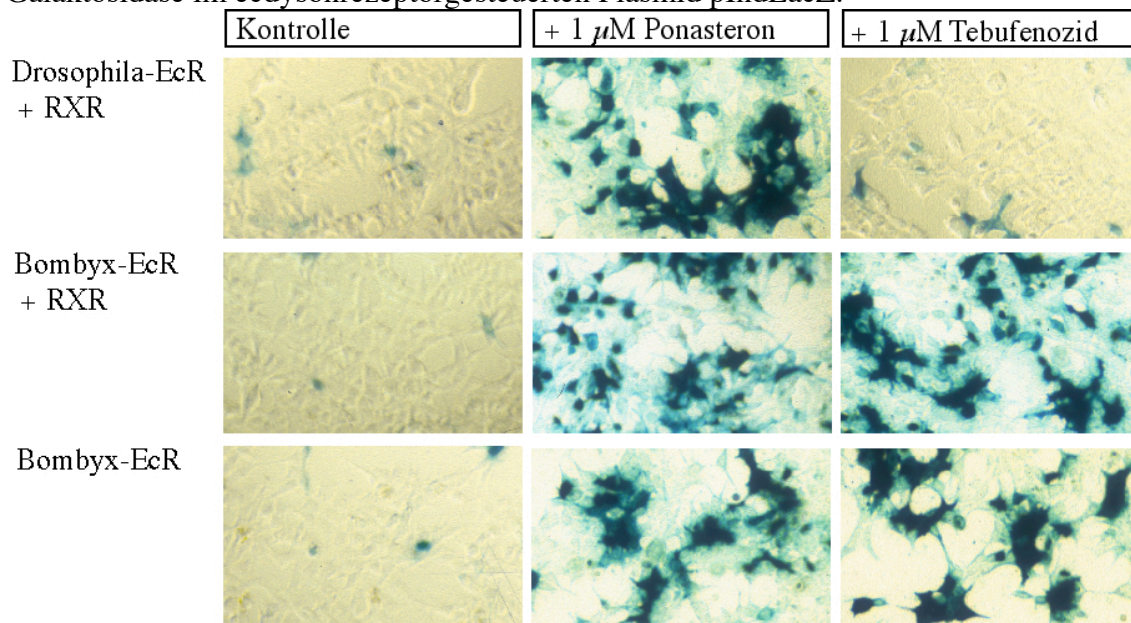


Abb. 11: Induzierbare Genexpression in transient transfizierten HEK293-Zellen

Zellfärbung für das Reporter-gen β -Galaktosidase nach vierundzwanzigstündiger Behandlung mit dem steroidalen pflanzlichen Ecdysonanalogon Ponasteron und dem nichtsteroidalen, synthetischen Liganden Tebufenozid zeigt, daß die β -Galaktosidaseproduktion nur beim *Bombyx*rezeptor durch beide Liganden induzierbar ist, unabhängig davon, ob die Zellen auch mit dem Retinoid-X-Rezeptor transfiziert wurden.

Für eine 10 cm-Kulturschale wurden jeweils 10 μ g Rezeptor- und Reporter-DNA eingesetzt. Zusätzlicher RXR wurde in Form des im Promotor für den hybriden Ecdysonrezeptor gespaltenen Plasmids (nach Kontrolle auf vollständigen Abbau durch Agarosegelelektrophorese) ebenfalls mit 10 μ g Plasmid pro Schale eingesetzt. Die

Transfektionsrate betrug gleichbleibend etwa 90%. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt des Mediumwechsels am Morgen nach der Transfektion abtrypsiniert und auf 24-well-Platten ausgesät, um die Induktion unter verschiedenen Bedingungen durchführen zu können. Der zytochemische Nachweis des Reporters nach 24 h Induktion mit verschiedenen Ecdysonagonisten ergab folgendes Bild (Abb. 11). In untransfizierten Zellen zeigte sich keinerlei Färbung, in ausschließlich mit dem Reporter transfizierten Zellen eine sehr schwache (beide ohne Abbildung), in mit Rezeptor und Reporter transfizierten Zellen eine schwache Blaufärbung einzelner Zellen. In den mit dem Drosophila-Ecdysonrezeptor und RXR transfizierten Zellen zeigte sich eine deutliche Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität nach Stimulation mit dem steroidal Ecdysonagonisten Ponasteron (Abb. 11). Das gleiche galt für ein anderes pflanzliches Steroid, Muristeron (ohne Abbildung). Die Behandlung mit dem niedermolekularen Agonisten Tebufenozid induzierte die β -Galaktosidaseexpression nicht.

Nach Transfektion mit dem Bombyx-Ecdysonrezeptor dagegen war die Reporterexpression sowohl durch Ponasteron und Muristeron als auch durch Tebufenozid regulierbar (Abb. 11). Das galt auch, wenn der Heterodimerisierungspartner RXR nicht wie beim Drosophilarezeptor kotransfiziert wurde. In COS-Zellen, die als C11-Zelllinie als arm an RXR gelten (Suhr, 1998) wurde dasselbe Ergebnis erzielt (ohne Abbildung).

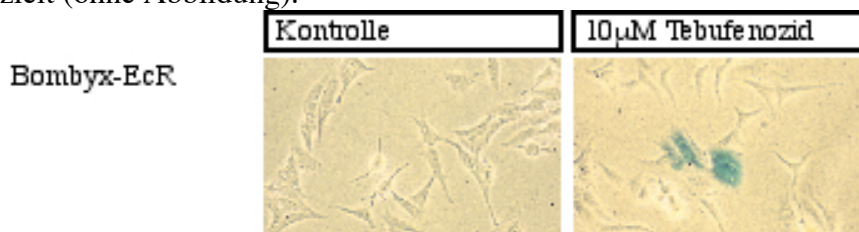


Abb. 12: Induzierbare Genexpression in transient transfizierten H11- Zellen

Die Zellfärbung für β -Galaktosidase zeigt daß in dieser kardialen Zelllinie die Reporterexpression durch den Bombyx-Ecdysonrezeptor und den Liganden Tebufenozid gesteuert werden konnte.

Bei Transfektion in die kardiale Zelllinie H11 ergab sich bei insgesamt sehr niedriger Transfektionseffizienz bei der besten Transfektion ebenfalls eine Geninduktion in mit

dem BombyxEcR transfizierten und mit Tebufenozid behandelten Zellen ohne nachweisbare Aktivität in unstimulierten Vergleichszellen (Abb. 12).

3.2.1. Quantifizierung der Geninduktion

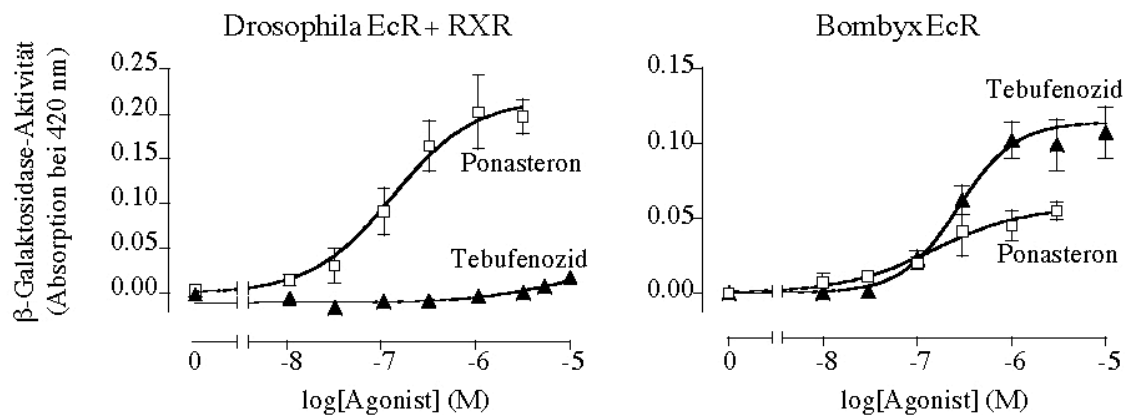


Abb. 13: Quantitative Bestimmung der Reporter-genaktivität im Zellysat transient transfizierter HEK293- Zellen

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde im Zellysat mit dem farbgebenden Substrat ONPG photometrisch bestimmt. Der *Drosophila*-Ecdysonrezeptor (*Drosophila*EcR) steuerte die Reporter-genexpression zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) abhängig von der Ponasterondosis. Die Transfektion mit dem Bombyxecdysonrezeptor allein führte ebenfalls zur ligandenabhängigen Expression des Reporters. Dabei waren sowohl der steroidale Agonist Ponasteron als auch das Bisazylylhydrazin Tebufenozid wirksam. Die Abbildung ist das Ergebnis von Dreifachbestimmungen aus mehr als drei unabhängigen Transfektionen mit jeweils 24 h Induktionszeit.

Die Aktivität des Reportergens β -Galaktosidase in Zellysaten wurde mit dem chromogenen Substrat ONPG photometrisch bestimmt. In Abb. 13 ist die Absorptionserhöhung über den Basalwert nach Stimulation mit Ecdysonrezeptorliganden dargestellt. Beim *Drosophila*EcR ließ sich die Genaktivität nur mit Ponasteron, beim BombyxEcR mit beiden verwendeten Substanzen induzieren. Die Konzentrationen für halbmaximale Aktivierung beider Rezeptoren waren vergleichbar.

3.2.2. Induktionsfaktoren

Der Induktionsfaktor gibt an, wie stark der Ligand die Aktivität des Reportergens steigern kann. Er ergab sich aus dem Verhältnis der β -Galaktosidaseaktivität im induzierten und uninduzierten Zustand, bei Photometrie des farbgebenden Substrats als Quotient folgender Absorptionen:

$$\frac{(\text{Induzierte Zellen} - \text{untransfizierte Zellen})}{(\text{Transfizierte, aber uninduzierte Zellen} - \text{untransfizierte Zellen})}$$

(Transfizierte, aber uninduzierte Zellen - untransfizierte Zellen).

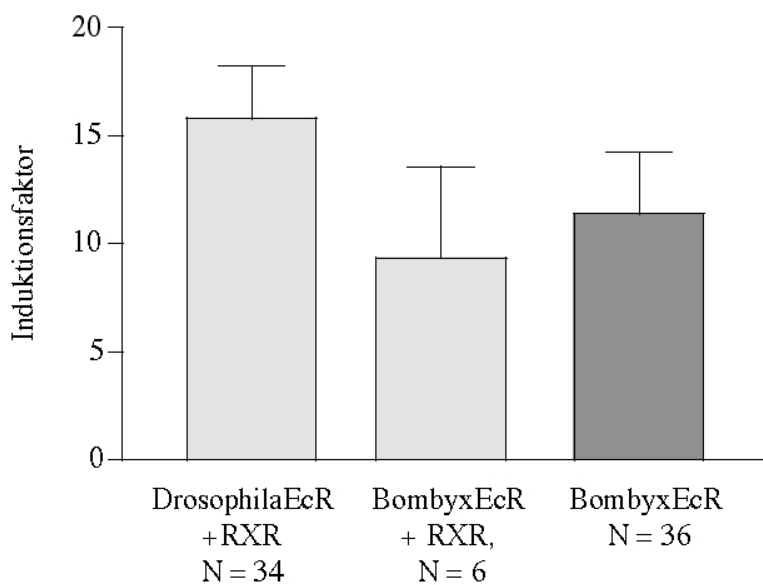


Abb.14: Induzierbarkeit transient transfizierter HEK 293- Zellen

Die Reportergenexpression im unstimulierten Zustand wurde mit der nach 24 h Induktion mit dem optimalen Liganden (Ponasteron für den Drosophila-Ecdysonrezeptor, Tebufenozid für den Bombyx-Ecdysonrezeptor) verglichen. Der jeweilige Ligand wurde dem Zellkulturmedium in einer Konzentration von 1 μ M zugesetzt.

Es ergab sich ein Induktionsfaktor von ca. 10-15 für alle getesteten Systeme (Abb. 14). Damit änderte sich die Induzierbarkeit des Systems durch das Ersetzen der Drosophila- durch die Bombyxligandenbindedomäne nicht signifikant. Im Bombyxsystem führte die Zugabe von RXR tendenziell zu einer Verminderung des Induktionsfaktors. Dieser Versuch wurde in transient transfizierten Zellen mit einer hohen Plasmidkopienzahl durchgeführt.

3.2.3. Kinetik

Die Kinetik der Genaktivierung der beiden Systeme wurde durch Zugabe des optimalen Agonisten (Ponasteron für den DrosophilaEcR, Tebufenozid für den BombyxEcR) über verschiedene Zeiträume von sechs bis 96 Stunden verglichen (Abb. 15).

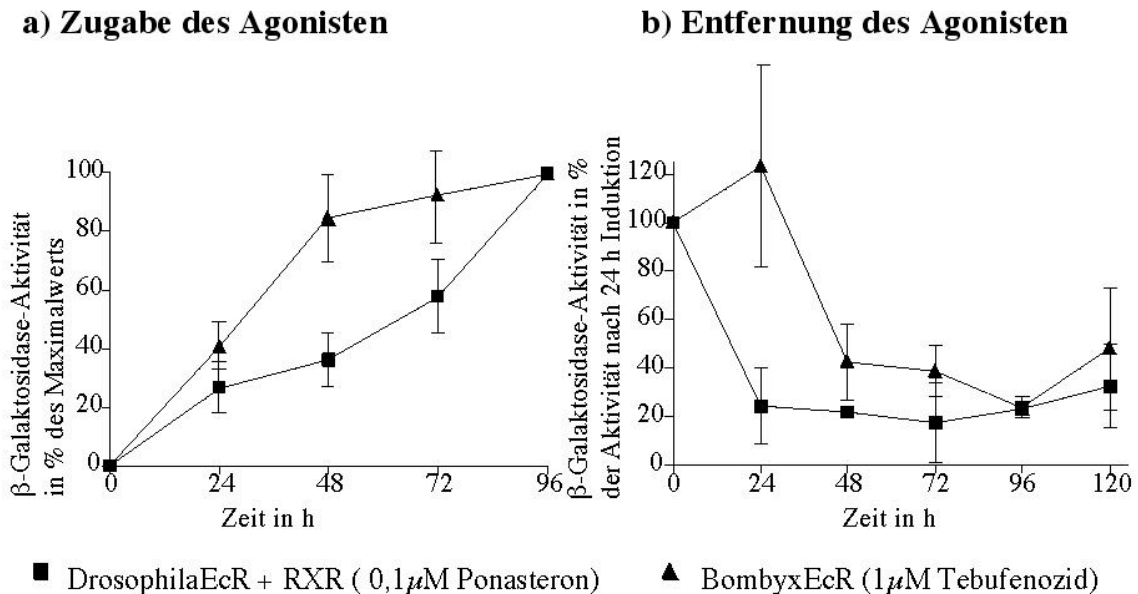


Abb. 15: Kinetik

a) Bestimmung der Reporter-genaktivität in Abhängigkeit von der Induktionszeit nach transienter Transfektion in HEK239-Zellen. Nach 96 h Induktion wurden in beiden Systemen maximale Werte erreicht. Längere Induktionszeiten von 120 und 144h ergaben keine weitere Zunahme der Reporter-genaktivität.

b) Die transient transfizierten Zellen wurden 24 h mit Agonisten stimuliert, dann wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Reporter-genaktivität ist als Verhältnis zum Wert nach 24 h Induktion aufgetragen. Die X-Achse bezeichnet die Zeit seit dem Mediumwechsel. Die Ergebnisse beruhen auf Dreifachbestimmungen aus mehr als drei unabhängigen Transfektionen.

Im hier gewählten System und bei den verwendeten Ligandendosierungen wurden beim Bombyxsystem schneller maximale Induktionswerte erreicht als beim Drosophilasystem. Nach Entfernung des Agonisten blieb im Bombyxsystem die Genaktivität zunächst unverändert, bis sie wie beim Drosophilasystem abfiel.

3.3. Kinetik von Tebufenozid in vivo

Da das Bombyx-Ecdysonrezeptorsystem zur Induktion eines kardialen Gens in der transgenen Maus verwendet werden sollte, mußte die Bioverfügbarkeit des Agonisten

Tebufenozid untersucht werden. Den Mäusen wurde 4,5 mg Tebufenozid in Form von einem Teil Mimic®, zwei Teilen Sesamöl und zwei Teilen sterilem Wasser intraperitoneal injiziert. Das Serum behandelter Tiere wurde 12, 24 und 48 h nach der Injektion gewonnen und dem Kulturmedium transfizierter HEK293-Zellen zugegeben. Nach 24 h wurde die Induktion des Reportergens β -Galaktosidase im Vergleich zu Zellen, die mit einer definierten Menge Tebufenozid stimuliert worden waren, photometrisch bestimmt (Abb. 16).

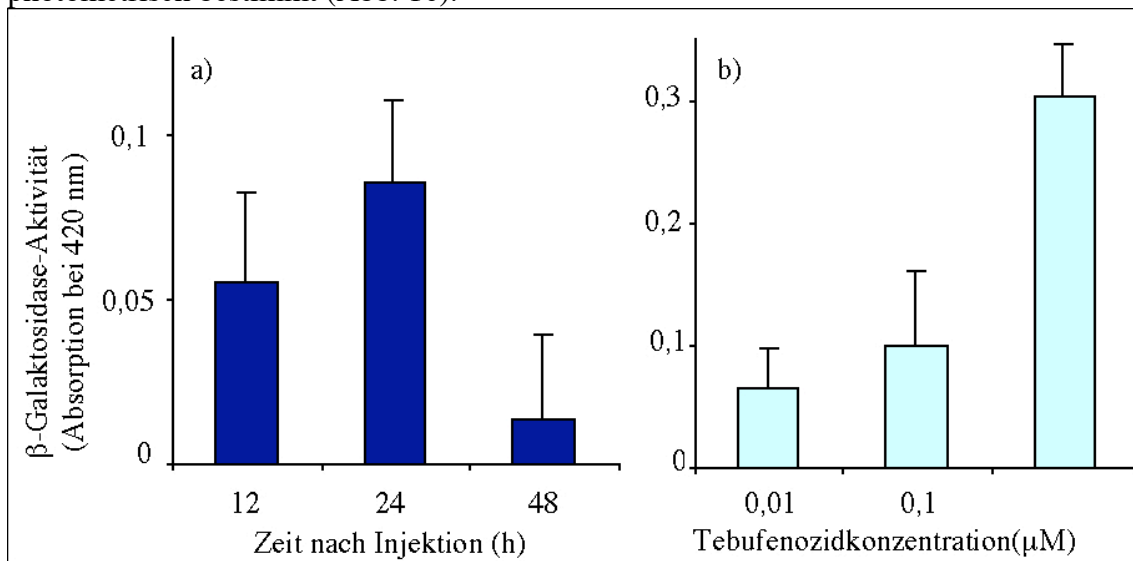


Abb. 16: Serumaktivität von Tebufenozid nach intraperitonealer Injektion bei Mäusen

a) In einem Bioassay wurde transient transfizierten HEK293-Zellen jeweils 5% Mäuseserum zum Kulturmedium hinzugegeben, nachdem die Mäuse bis zu 96 h vorher eine Dosis von 4,5 mg Tebufenozid in 100 μ l Lösung intraperitoneal erhalten hatten. Nach 24 h Induktion wurde die Reportergenaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen photometrisch bestimmt. Die Induktionswerte mit Serum 24 h nach der Applikation entsprachen etwa denen bei 0,1 μ M Tebufenozid bei parallel dazu mit definierten Konzentrationen induzierten Zellen derselben Transfektion (b).

Schon die einmalige Tebufenozidinjektion führte zu einer Serumkonzentration, die die Genexpression nach Zugabe von 5% Mäuseserum zum Zellkulturmedium induzierte. Durch Vergleich mit Kontrollen mit definierter Tebufenozidkonzentration im Medium ließ sich eine Blutkonzentration von etwa 1 μ M nach 24 h abschätzen. Bei den folgenden Induktionsversuchen des kardialen Gens wurde den Mäusen täglich über bis zu zwei Wochen die doppelte Dosis (9 mg Tebufenozid) intraperitoneal appliziert.

3.4. Charakterisierung transgener Mauslinien mit dem hybriden Bombyx-Ecdysonrezeptor

Der Bombyx-Ecdysonrezeptor sollte nun einem transgenen Mausmodell auf seine Funktionsfähigkeit zur Induktion eines kardialen Gens getestet werden. Als „Reporter-gen“ wurde die β_{2A} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals gewählt, weil sie in vitro einen bedeutenden Einfluß auf der Kanalaktivität gezeigt hat, der bis jetzt noch nicht in vivo untersucht werden konnte.

3.4.1. Genotypisierung

Die nach Pronukleusinjektion geborenen Mäuse wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf die Integration der Gene für den hybriden Bombyxecdysonrezeptor und die induzierbare β_{2A} -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals untersucht (Abb. 17).

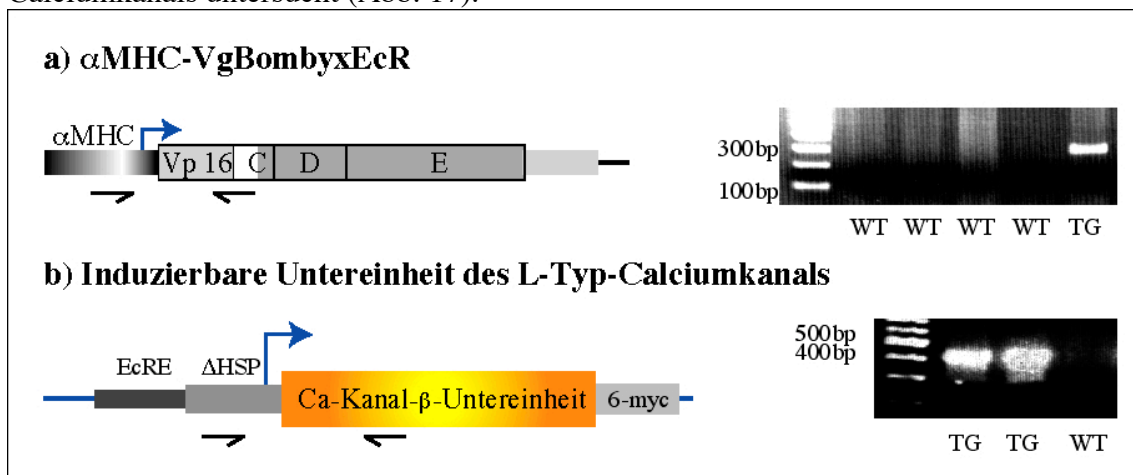


Abb. 17: Identifikation transgener Mäuse der F0- Generation durch PCR

a) Bombyx-Ecdysonrezeptor: Die Primer (Pfeile) lagen im α MHC-Promotor und im Ecdysonrezeptor und ergaben ein Produkt von 302 Basenpaaren Länge.

b) Induzierbare β_{2A} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals: Die Kombination eines Primers aus dem Minimalpromotor mit einem Antisenseprimer aus der Kanaluntereinheit ergab ein Produkt mit 436 bp Länge.

Die PCR-Produkte wurde im Agarosegel aufgetrennt und die DNA durch UV-Anregung des interkalierten Ethidiumbromids nachgewiesen.

Bei positivem Ergebnis wurde die Integration durch Southern Blot verifiziert (Abb. 18).

Wir erhielten drei Linien, in denen beide Gene auch in die nachfolgende F₁-Generation vererbt wurden.

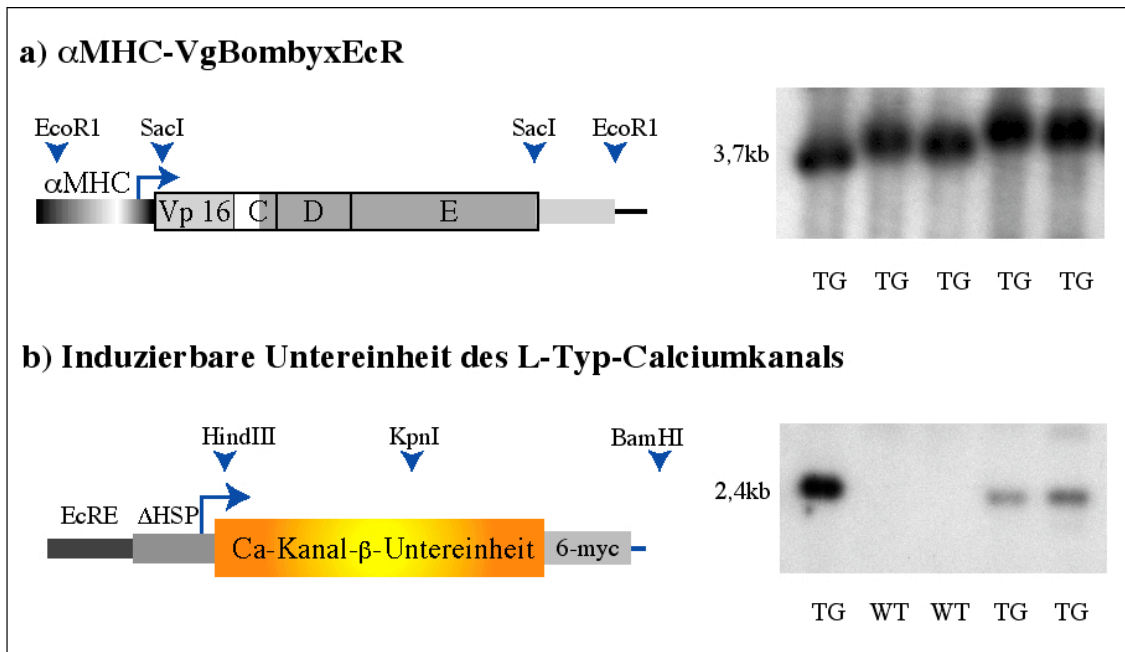


Abb. 18: Überprüfung pcr-positiver Tiere der F₀-Generation mit Southern-Blot
a) Bombyx-Ecdysonrezeptor: Als Sonde wurde ein Plasmidfragment nach Abbau mit SacI verwendet, die genomische DNA wurde mit EcoRI abgebaut. Transgene Tiere zeigen ein Signal bei 3,7 kB.
b) Induzierbare β _{2a}-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals: Das Plasmidfragment für die Sonde entstand nach Abbau mit HindIII und KpnI, der Abbau der genomischen DNA erfolgte mit HindIII und BamHI. Das Signal erscheint bei 2,4 kB.

3.4.2. Katheteruntersuchung der Herzfunktion transgener Mäuse

Das zweite Hauptziel dieser Arbeit war es, in vivo den Einfluß der β _{2A}-Untereinheit des Calciumkanals auf die Herzfunktion zu untersuchen. Dazu wurden Wildtyp- und transgene Mäuse für zwei bis 14 Tage mit Tebufenozid i.p. behandelt, um die induzierbare β _{2a}-Untereinheit herzspezifisch anzuschalten. Anschließend wurde die Herzfunktion der Tiere in Narkose mit einem Miniaturkatheter (1.4F Millar-Katheter) untersucht. Die basale Herzfrequenz unterschied sich nicht signifikant zwischen Wildtyp- und β _{2A}-transgenen Mäusen (Abb. 19). Auch nach Tebufenozidgabe für längere Zeit war die Herzfrequenz unverändert. Bei Induktionszeiten zwei Tagen konnten aber Effekte des induzierbaren Transgens auf den linksventrikulären Druck und die Kontraktilität festgestellt werden (Abb. 19).

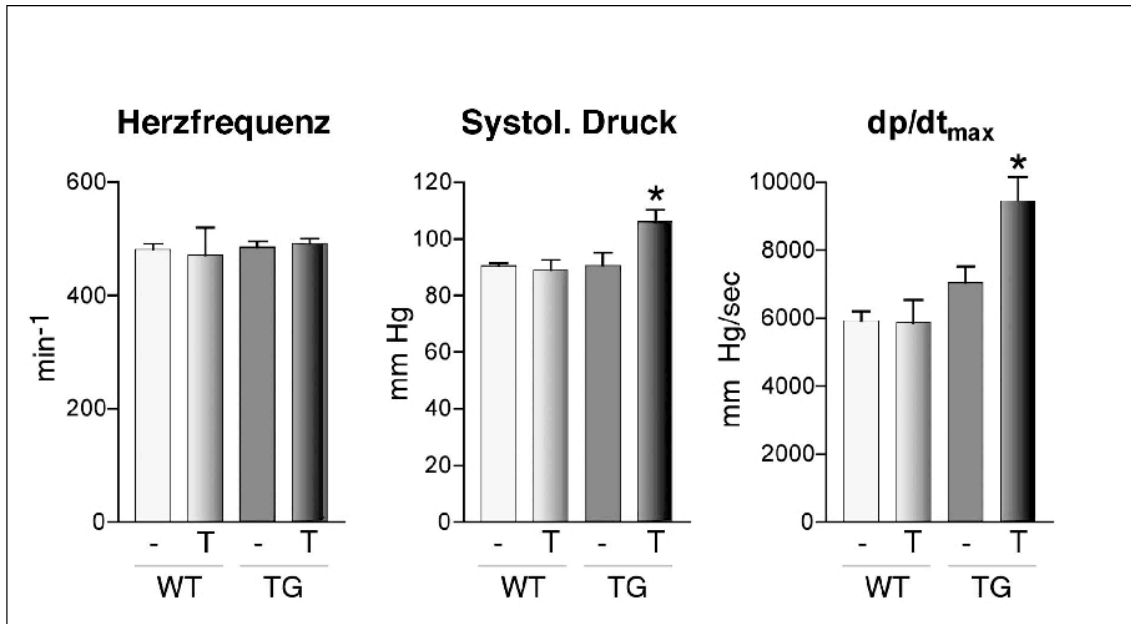


Abb. 19: Basale Herzfunktion

Herzkatheteruntersuchung bei Mäusen mit dem BombyxEcR und induzierbarer Ca-Kanal β 2a- Untereinheit. Wildtypmäusen und transgenen Mäusen wurde einmalig 9 mg Tebufenozid verabreicht (T). Nach zwei Tagen erfolgte eine Linksherzkatheteruntersuchung in Trimethanolnarkose. Als Kontrollen dienten unbehandelte Wildtyp (WT) und transgene (TG) Tiere. Die Herzfrequenz unterschied sich bei den vier Gruppen nicht. Tebufenozid führte bei den transgenen Tieren zu einem gesteigerten linksventrikulären Druck und zu einer Zunahme der Druckanstieggeschwindigkeit (dp/dt_{max}). n= 4-5 Tiere pro Gruppe.

Während transgene Mäuse und Kontrolltiere ohne Tebufenozid keine Unterschiede im maximalen systolischen Druck oder in der linksventrikulären Kontraktilität (dp/dt_{max}) zeigten, stiegen beide Parameter nach Tebufenozidgabe für zwei Tage bei transgenen Tieren signifikant an (Abb. 19). Um zu überprüfen, ob die gesteigerte basale Herzfunktion auch mit strukturellen Veränderungen im Herzen einherging, wurde das Herzgewicht bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Herzgewicht, im Körpergewicht oder im Verhältnis beider Größen vor und nach Tebufenozidgabe in den Wildtyp- und Transgenengruppen (Abb 20).

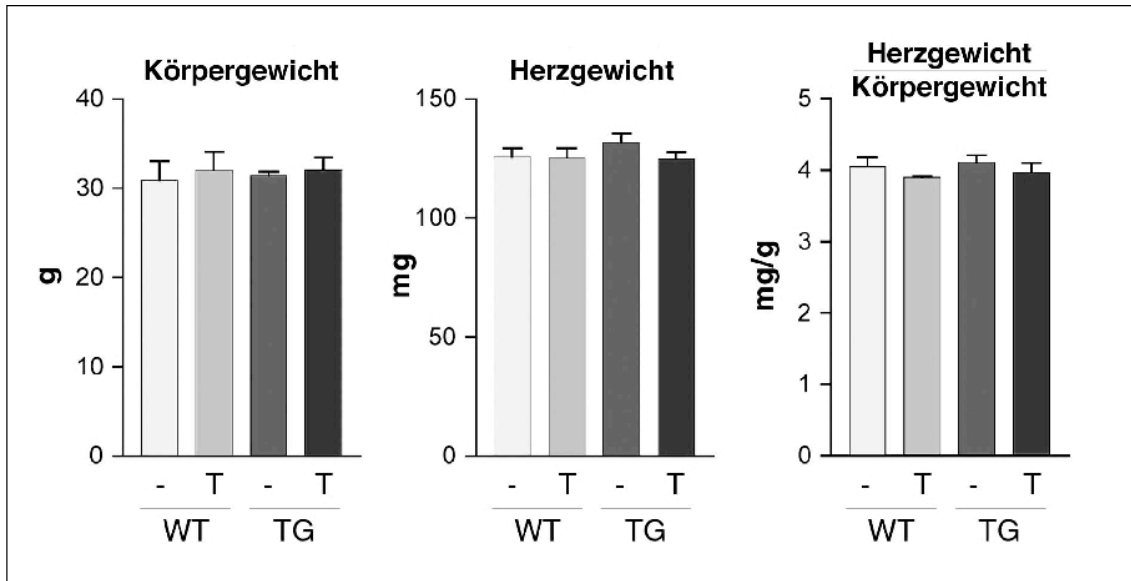


Abb. 20: Herz- und Körpergewicht vor und nach Induktion

Bei den in Abbildung 19 dargestellten Tieren wurden nach Beendigung der Untersuchung Herz- und Körpergewicht bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp (WT)- und transgenen (TG) Tieren oder zwischen tebufenozidbehandelten (T) und Kontrollmäusen.

Diese Befunde zeigen, daß das Ecdyson-Analog Tebufenozid spezifische Effekte bei transgenen, nicht aber bei nicht-transgenen Mäusen auslösen kann. Der beobachtete Anstieg der kardialen Kontraktilität und des systolischen Blutdrucks nach Tebufenozid-Applikation lassen annehmen, daß die Expression der β_{2a} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals tatsächlich in vivo angeschaltet werden kann.

4. Diskussion

Zur Induktion von neu in eine Zelle oder einen Organismus eingebrachten Genen stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde eine Variante des Ecdysonsystems auf seine Eigenschaften in der Zellkultur und seine Eignung zur herzspezifischen Genexpression bei transgenen Mäusen untersucht.

4.1. Modifikation des Ecdysonsystems und die Ergebnisse in der Zellkultur

Aus dem modifizierten Drosophila-Ecdysonrezeptor (EcR) zur induzierbaren Transgenexpression in Säugerzellen und dem Ecdysonrezeptor des Seidenspinners *Bombyx mori* wurde ein hybrider Rezeptor kloniert. Diesem Rezeptor wurden in der Literatur drei Vorteile zugeschrieben. Erstens soll er auch ohne Zugabe des Dimerisierungspartners RXR funktionieren. Zweitens soll er durch den nichtsteroidalen Liganden Tebufenozid stimulierbar sein und das drittens in noch stärkerem Maße als der ursprüngliche DrosophilaEcR durch Ponasteron (Suhr et al., 1998, Hoppe et al., 2000). So schien diese Variante in vielen Bereichen eine Verbesserung des Systems darzustellen: weniger einzubringende Gene, ein besser verfügbarer Ligand und eine bessere Induzierbarkeit des Systems.

In dieser Arbeit konnten diese Vorteile teilweise bestätigt werden. Der BombyxEcR konnte in transient transfizierten HEK293- und COS-Zellen durch den nichtsteroidalen Liganden Tebufenozid stärker als durch Ponasteron aktiviert werden, während der ursprüngliche DrosophilaEcR nur auf Ponasteron ansprach. Der BombyxEcR zeigte die gute Induktion des Reportergens auch ohne Transfektion des Retinoid-X-Rezeptors. Die Maximalaktivität ließ sich durch Zugabe von RXR allerdings deutlich steigern.

Der Faktor der Induktion der Reportergenaktivität, der erreicht wurde, blieb bei beiden Rezeptoren hinter publizierten Werten weit zurück. Dabei ist zu bedenken, daß dieser Faktor in der Literatur je nach verwendetem Reporter stark schwankt und daß die

Versuche in dieser Arbeit an transient transfizierten Zellen durchgeführt wurden. Hier ist mit einer erhöhten Basalaktivität zu rechnen, weil eine unphysiologisch hohe Genkopienzahl vorliegt, die zudem nicht in das Genom integriert ist. Im direkten Vergleich der Induktionsfaktoren ergaben sich in sich in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen *DrosophilaEcR* und *BombyxEcR*. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hoppe (2000), die im *Bombyx*system eine signifikant bessere Induzierbarkeit beschrieb.

Die Messung der Kinetik der Aktivierung und Deaktivierung der Zielgenexpression gestaltete sich im transient transfizierten System schwierig. Zwar erscheint das Anschalten beim *BombyxEcR* schneller, es ist jedoch nicht auszuschließen, daß das auf die höhere Agonistenkonzentration zurückzuführen ist. Andererseits wäre es möglich, daß die zusätzliche RXR-Produktion für den *DrosophilaEcR* mehr Zeit in Anspruch nimmt. Nach Entfernung des Agonisten zeigte sich beim *BombyxEcR* noch länger als beim *DrosophilaEcR* eine gesteigerte Reporteragenaktivität. Eine mögliche Erklärung wäre eine unterschiedliche Affinität der Agonisten Tebufenozid und Ponasteron zu den Rezeptoren. Um die Kinetiken genauer zu untersuchen, wären stabile Zelllinien und große Mengen an Ponasteron wünschenswert.

Die Funktionsfähigkeit des *BombyxEcR* in Herzmuskelzellen bei alleiniger Transfektion ohne RXR wurde in dieser Arbeit in der kardialen HL1-Zelllinie getestet. Der Rezeptor wurde unter dem CMV-Promotor exprimiert und konnte die Aktivität des Reportergens nach Zugabe von Tebufenozid induzieren. Es fand sich keine Basalaktivität. Allerdings war die Transfektionseffizienz sehr schlecht und weitere Versuche scheiterten daran. Diese Ergebnisse entsprechen denen in adenoviral transfizierten Herzzellen (Hoppe et al., 2000).

4.2. Der Bombyx-Ecdysonrezeptor im transgenen Mausmodell

Ein wichtiger Grund für die Modifikation des Ecdysonsystems mit der Ligandenbindedomäne von *Bombyx mori* war die Möglichkeit, diesen Rezeptor mit dem nichtsteroidalen Agonisten Tebufenozid zu stimulieren. In Form des Pflanzenschutzmittels Mimic® stand er in großer Menge, allerdings nicht in Reinsubstanz, zur Verfügung. Die Bioverfügbarkeit wurde nach intraperitonealer Gabe untersucht. Von den Mäusen wurde in unterschiedlichen Zeitabständen nach Injektion Serum gewonnen, das in der Zellkultur eine deutliche Induktion transient transfizierter HEK293-Zellen bewirkte. Damit ist anzunehmen, daß der Agonist auch das Herzgewebe in ausreichender Menge und über einen ausreichenden Zeitraum erreichen kann, um den BombyxEcR zu stimulieren. Injektionen. Auch nach anderen Untersuchungen (Rohm und Haas, 1999, 2000, Hoppe, 2000) kann man annehmen, daß die Tebufenozidgabe allein in verwendeter Dosis und Zeitraum auf Säuger keine schädlichen Wirkungen hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Pronukleusinjektion doppelt transgene Mauslinien erzeugt, die den hybriden BombyxEcR und die induzierbare β_{2A} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals im Genom tragen. Die Identifizierung erfolgte per PCR und Southern-Blot. Ein Weitergabe beider eingebrachter Gene an die Nachkommen der F_0 -Generation konnte bei drei von diesen Linien nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die β_{2A} -Untereinheit des Calciumkanals an transgenen Mäusen durch Tebufenozidgabe zu induzieren. Die Tiere wurden bis zu zwei Wochen behandelt. Der Nachweisversuch für das Protein erfolgte mit Western-Blot mit Antikörpern gegen den „Myc“-Epitop und gegen die Untereinheit selbst. Dieser Nachweis gelang jedoch nicht. Technische Schwierigkeiten ergaben sich daraus, daß die Anti-Myc-Antikörper auch mit anderen Bestandteilen des Herzgewebes reagierten und zu einer Reihe unspezifischer Banden führten. Sie konnten sie durch zusätzliche

Waschschritte vermindert werden. Im Western Blot mit Antikörpern gegen die β_{2A} -Untereinheit konnte eine Vermehrung dieses Proteins bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Herzfunktion wurden arterielle Herzkatheteruntersuchungen durchgeführt. Sie zeigten eine veränderte Funktion bei induzierten Transgenen im Vergleich zu Wildtyp und unbehandelten transgenen Tieren. Dies spricht für eine Veränderung auf Proteinebene und damit indirekt dafür, daß das Ecdysonrezeptorsystem eine Induktion des funktionellen Zielgens am Herzen steuern kann. Zum formalen Beweis müßte nun weiter versucht werden, eine erhöhte Expression der β_{2A} -Untereinheit des Calciumkanals nachzuweisen; entweder weiterhin immunologisch, z.B. auch an einzelnen Herzzellen oder aber über die mRNA-Expression.

4.3. Vergleich mit anderen Systemen zur induzierbaren Transgenexpression

Das Ecdysonsystem ist ein natürlich entwickeltes System zur schnellen und differenzierten Genexpression in Eukaryonten – es steuert den hochkomplexen Häutungsvorgang der Insekten. Nach relativ wenigen Optimierungsschritten finden sich hier sehr gute Induktionswerte. No (No et al., 1996) fand für den *Drosophila* EcR und RXR im Vergleich zum Tetracyclinsystem, sowohl tTA als auch rtTA, einen besseren Induktionsfaktor. Van Craenenbroeck (Van Craenenbroeck et al., 2001) beschrieb in Zellen zwar eine geringere absolute Genaktivität nach Aktivierung im Vergleich zum Tetracyclinsystem, aber einen höheren Induktionsfaktor durch deutlich geringere Basalwerte. Ebenso äußert sich Senner (Senner et al., 2001), der Systeme für die Geninduktion in Gliomzellen vergleicht und nur beim Rapamycinsystem eine noch präzisere Regulation findet. Im Gegensatz zu Suhr (1998) und Hoppe (2000) fand ich in dieser Arbeit in der Zellkultur keine bessere Regulation der Transgenexpression durch

den BombyxEcR als durch den DrosophilaEcR und RXR. Wie er sich jedoch im Verhältnis zu anderen Induktionssystemen verhält, wird zu überprüfen sein.

Die Basalaktivität bzw. der erreichbare Induktionsfaktor ist weiterhin von der verwendeten Transaktivierungsdomäne abhängig – hier könnten etwa beim Ecdysonsystem noch weitere, wie das Transaktivierungsprotein p65 (Burcin et al., 1999) untersucht werden.

Für die regulierte Transgenexpression bei der transgenen Maus sind von den anderen in der Einleitung beschriebenen Systemen bisher nur das Tetracyclin- und das Progesteronsystem getestet. Das tTA-System zeigte dabei in den publizierten Experimenten eine so gute Steuerbarkeit, daß auch die Expression toxischer Proteine, etwa des Prionproteins im zentralen Nervensystem möglich war (Tremblay et al., 1998). Beim Progesteronsystem wurde eine präzise Regulation des menschlichen Wachstumshormons beschrieben (Tsai et al., 1998). Induzierbare Transgenexpression am Herzen gibt es bis heute nur mit dem Tetracyclinsystem. Induktion führte zu inhomogener Expression des Reportergens β -Galaktosidase (Furth et al., 1994). An transgenen Mäusen liessen sich durch gesteuerte Überexpression eines G_i -gekoppelten Rezeptors Erregungsleitungsstörungen und eine Kardiomyopathie hervorrufen, die teilweise nach Abschaltung des Gens reversibel war (Redfern et al., 2000).

Von überragender Bedeutung bei der Beurteilung eines Induktionssystems ist der Agonist. Das gilt insbesondere für die Verwendbarkeit im transgenen Tier. Der Agonist soll sämtliche Gewebe erreichen, eine starke, spezifische und reversible Wirkung auf den Transkriptionsfaktor aber sonst keine Wirkungen auf den Organismus haben.

Im tTA-System muß Doxycyclin zur Unterdrückung der Transgenaktivität dauerhaft von Beginn der Embryonalentwicklung an gegeben werden, allerdings in Dosen, die weit unter dem therapeutischen Bereich liegen. Nebenwirkungen des Antibiotikums, u.a. die

Einlagerung in wachsende Knochen und Zähne, sind aus der breiten klinischen Anwendung gut bekannt. Auch wenn man eine schwere Schädigung für unwahrscheinlich hält, ergibt sich aus der Dauergabe eine Limitierung der Anschaltkinetik. Im neuesten System dauert es immer noch sieben Tage bis zu vollen Aktivierung der Transgenexpression (Hasan et al., 2001).

Bei den Steroidhormonderivaten Tamoxifen und Mifepriston ergibt sich schon aus ihren klinischen Anwendungen eine gravierende Wirkung auf den Organismus. Bei Versuchen mit dem modifizierten Östrogenrezeptor in adenoviral transfizierten Mäusen starben 14 von 24 Tieren, bei denen die Tamoxifendosis mit 500 µg/kg i.p. zehnfach über der sonst gewählten Aktivierungskonzentration lag (Xu et al., 2001). Im Progesteronsystem wurde Mifepriston (RU486) in einer Konzentration von 250 µg/kg verwendet, der Effekt war bei einer Verdopplung der Dosis noch steigerungsfähig. Trächtigkeiten blieben bis 100 µg/kg erhalten (Tsai et al., 1998).

Beim Rapamycinsystem, das in seiner klassischen Form stark in den Zellzyklus eingreift und vor allem immunsuppressiv wirkt, stellt sich ebenfalls das Problem der Interaktion des Induktors mit körpereigenen Signalwegen. Zwar gibt es jetzt eine modifizierte Variante, bei der sowohl Induktor als auch seine Rezeptoren in einer Weise verändert sind, daß sie spezifisch miteinander reagieren und keine Interaktion mehr mit dem Zellzyklus stattfinden soll (Liberles et al., 1997). Zur Zeit ist dieses System frei verfügbar, jedoch nur bei Einräumung von Rechten an die vertreibende Firma, so daß sich für eine längerfristige Anwendung, z. B. für transgene Mäuse die Frage der Zuverlässigkeit und bei Funktionieren der weiteren Bezahlbarkeit stellt, die ja auch schon das Hauptproblem des ursprünglichen Ecdysonsystems war.

Beim Drosophila-Ecdysonsystem sind die Agonisten pflanzliche Ecdysonanaloga, nach deren Applikation klinisch keine Wirkung am Säugetierorganismus beobachtet wurde. Das Bisazylhydrazin Tebufenozid, das in dieser Arbeit zur Induktion des BombyxEcR verwendet wurde, wurde vor seinem Einsatz als Pflanzenschutzmittel umfangreichen

toxikologischen Tests unterzogen (Rohm, 1999, 2000). Bei Ratten ergab sich nach Langzeitfütterung über mehrere Generationen keine kanzerogene oder fertilitätsmindernde Wirkung. Nur bei extrem hohen Dosen von 5g/kg Körpergewicht wurde eine Fertilitätsminderung berichtet. Das entspräche ca. 125 mg pro Maus. Bei der von uns verwendeten Dosen von 4,5 mg und 9 mg i.p. wurden im Versuchszeitraum keine Nebenwirkungen beobachtet, ähnliches beschrieb Hoppe (Hoppe et al., 2000). Im Hinblick auf die Konkurrenzsysteme wären aber Untersuchungen zur Langzeitwirkung auch bei der Maus wünschenswert.

Diese Arbeit liefert einen ersten Hinweis darauf, daß das BombyxEcR-System im Pronukleus-transgenen Tier funktionsfähig ist und in vivo die Genexpression regulieren kann. Nach mündlicher Mitteilung ist eine transgene Maus, die die β_{2a} -Untereinheit konstitutiv kardial überexprimiert, embryonal nicht überlebensfähig (D.T.Yue). Damit wäre auch ein Hinweis für eine sehr präzise Regulation des Zielgens durch den BombyxEcR erbracht. Durch die Entwicklung des BombyxEcR, das einen bezahlbaren Agonisten verwendet und weniger in den endogenen RXR-Signalweg eingreift, könnte das Ecdysonsystem eine lohnende Alternative oder zumindest eine Ergänzung zum Tetracyclinsystem werden. Es wäre dann von Vorteil, wenn man ein Gen schnell an- und ausschalten will, man eine dauerhafte Tetracyclingabe vermeiden will oder wenn zwei Gene unabhängig voneinander reguliert werden sollen.

Eine interessante Perspektive ergibt sich darüberhinaus mit Blick auf andere Insektenhormone wie das Juvenilhormon und ihre Rezeptoren, die vielleicht ebenfalls für die Genregulation in Säugetierzellen optimiert werden könnten.

4.4. Die Modulation des L-Typ-Calciumkanals am Herzen durch die β_{2a} -Untereinheit

Das Verhalten der Calciumkanäle wird durch Überexpression der β_{2a} -Untereinheit in der Zellkultur dramatisch verändert. Sie führt zu einer erhöhten Stromdichte bei

verminderter spannungsvermittelter Inaktivierung, wie man sie sonst nach exogener Stimulation, etwa über adrenerge Rezeptoren, erwarten würde. Damit scheint diese Untereinheit ein wichtiger limitierender Faktor im Calciumhaushalt der Herzzellen zu sein (Wei et al., 2000). Auf Grund dieser und weiterer Daten aus heterologen Expressionssystemen in vitro hatten wir eine Steigerung der Kontraktilität des Herzmuskels bei Überexpression der β_{2a} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals erwartet.

Zur Untersuchung der Herzfunktion wurden arterielle Herzkatheterisierungen durchgeführt. Bei kurzen Induktionszeiten von zwei Tagen waren auch tatsächlich sowohl der basale systolische Druck als auch die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit bei transgenen Mäusen signifikant erhöht. Nichtinduzierte Transgene und Kontrolltiere mit normalem Genotyp mit und ohne Tebufenozidgabe unterschieden sich dagegen nicht.

Dieser Befund stimmt mit dem erwarteten Effekt aus Zellkulturversuchen überein (Wei et al. 2000). Ob allerdings tatsächlich die β_{2a} -Untereinheit durch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der kardialen Calcium-Kanäle diesen Effekt auslöst, muß noch durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Insbesondere muß zunächst der Nachweis erbracht werden, daß die Induktion mit Tebufenozid bei den transgenen Mäusen die Expression der β_{2a} -Untereinheit auf mRNA- und auf Proteinebene steigert. Aus der Zellkultur allein läßt sich die Rolle der β_{2a} -Untereinheit im Herzen im Zusammenspiel aus Erregungsbildung, -leitung und Kontraktion und ihr Einfluß auf das Verhalten des Herzens bei kurzfristigem Streß oder unter dauerhafter Belastung nicht beurteilen. Als Bindeglied im Signalweg vom Rezeptor über die Proteinkinase A zum Calciumkanal könnte sie ein interessantes Zielprotein für die Erforschung und im weiteren vielleicht auch Behandlung der Progression einer Herzinsuffizienz sein. Eine transgene Mauslinie mit konstitutiver Überexpression dieses Proteins konnte bisher nicht erzeugt werden. Für die Untersuchung dieser Fragen ist also ein induzierbares

Transgenen notwendig. Eine Methode dazu ist das Bombyx-Ecdysonrezeptorsystem zur induzierbaren Transgenexpression, das sich allerdings selbst noch im Erprobungsstadium befindet.

4.5. Perspektiven

Durch transgene Tiermodelle konnten viele Erkenntnisse über die Funktion einzelner Gene, auch in der Herz-Kreislaufforschung, gewonnen werden. Die Zahl der existierenden Linien ist mittlerweile kaum noch überschaubar. Diese Keimbahntransgenen können gute Modelle für die Pathogenese von Krankheiten beim Menschen darstellen, entweder, weil sie von sich aus einen Phänotyp entwickeln, wie z.B. die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei β_1 -Rezeptor überexprimierenden Mäusen (Engelhardt et al., 1999) oder weil sie auf Eingriffe von außen empfindlicher reagieren wie z.B. α_{2A} - und α_{2C} -adrenerge-Rezeptor-Knockoutmäuse (Brede et al. 2001). Allerdings wird vor allem aus der Grundlagenforschung der Wunsch nach zeitlich und im Ausmaß genau definierter, nach Möglichkeit reversibler Regulation dieser Veränderungen laut (Chien, 2001). Auch aus klinischer Sicht ist eine solche Steuerbarkeit wünschenswert, obwohl sich die genetische Ausstattung der einzelnen Patienten im Laufe des Lebens nicht ändert. So ließe sich aber die Rolle eines einzelnen Gens im Organismus z.B. in der akuten Antwort auf eine Belastung durch Verletzung oder Infektion unter genau definierten Bedingungen am Tiermodell untersuchen. Zudem ermöglicht steuerbare Transgenexpression (bzw. ein steuerbarer Knockout) die Untersuchung vieler Gene, deren Überexpression (bzw. Ausfall) embryonal letal ist– von denen aber beim Menschen vielleicht Mutationen mit geringeren Auswirkungen eine klinische Bedeutung haben. Induzierbare Genexpression (bzw. induzierbare Gendeletion) stellen also eine wichtige Verfeinerung des Modells „transgenes Tier“ dar und werden die Möglichkeiten der experimentellen biomedizinischen Forschung erweitern.

Langfristig ist die Gentherapie eine weitere Anwendungsmöglichkeit des Werkzeugs „induzierbare Genexpression“. Heute ist zwar ihr Hauptproblem, einen ungefährlichen und gleichzeitig nicht immunogenen Vektor für den Gentransfer zu finden, doch ergibt sich im weiteren Verlauf auch die Frage der Steuerbarkeit des eingebrachten Gens. Eine Expression hinter einem zelltypspezifischen Promotor kann die Expression des eingebrachten Gens auf einen Gewebetyp beschränken. Um die Genexpression situationsabhängig zu steuern, sind Induktionssysteme notwendig. Folgende Forderungen sind an sie zu stellen: Um überhaupt eingebracht werden zu können, müssen sie mit relativ wenig genetischer Information auskommen und die von ihnen benötigten Moleküle– sowohl die Transkriptionsfaktoren als auch die Liganden– dürfen nicht immunogen sein. Die Wirkung soll schnell und über einen großen Bereich durch einen nach Möglichkeit oral zuführbaren Liganden steuerbar sein. Schließlich sollen Liganden und Transkriptionsfaktoren keine anderen Proteine oder Rezeptorbindedomänen auf der DNA binden können, damit andere Zellvorgänge nicht gestört werden (unerwünschte Wirkungen und Toxizität). Damit ist ein Idealbild als Gerüst für die Bewertung der Induktionssysteme skizziert.

Bis heute gibt es noch kein System, das ohne weitere Entwicklungsanstrengungen zur Anwendung bereitstünde (Jaisser, 2000), auch wenn manche schon sehr weit optimiert worden sind. Damit ist die Weiterentwicklung und der Vergleich verschiedener Varianten in der Zellkultur und beim transgenen Tier eine wichtige Aufgabe, um die Methoden für eine präzisere Erforschung von Genfunktionen ebenso wie für die Steuerung therapeutischer Gene zu verbessern.

5. Zusammenfassung

Systeme zur induzierbaren Transgenexpression sind wichtige Werkzeuge, um die Funktion einzelner Gene *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Sie bestehen aus drei Grundkomponenten, einem zu regulierenden Zielgen, einem „Schalter“ und einem Liganden, der diesen Schalter bedient. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen am Ecdysons system durchgeführt, das als Schalter den Insektensteroidhormonrezeptor für das Verpuppungshormon Ecdyson verwendet. Zunächst wurde ein neuer Rezeptor mit der Ligandenbindedomäne des Ecdysonrezeptors (EcR) des Seidenspinners *Bombyx mori* konstruiert, dessen Eigenschaften in der Zellkultur mit einem *Drosophila*EcR-Konstrukt, das für mammalische Expression optimiert ist, verglichen wurden. Mit dem *Bombyx*EcR konnte die Transgenexpression durch den nichtsteroidalen Liganden Tebufenozid gesteuert werden, was beim *Drosophila*EcR nicht möglich war. Damit ist man in diesem Expressionssystem nicht wie beim *Drosophila*EcR auf teure steroidale Liganden wie Ponasteron angewiesen. Außerdem mußte beim *Bombyx*EcR der Heterodimerisierungspartner RXR nicht kotransfiziert werden. In Bezug auf erreichbaren Induktionsfaktor und Kinetik der Genexpression zeigten sich für die beiden Systeme vergleichbare Ergebnisse.

Weiterhin wurden durch Pronukleusinjektion transgene Mäuse erzeugt, die den *Bombyx*EcR unter einem herzspezifischen Promotor (α MHC) exprimieren. Als Zielgen wurde die β_{2a} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals eingebracht, die mit dem neuen Schaltsystem herzspezifisch gesteuert werden sollte. Die Bioverfügbarkeit des Agonisten Tebufenozid nach intraperitonealer Injektion wurde in einem *in-vitro* Assay in HEK293-Zellen überprüft. Es ergaben sich hinreichende Wirkstoffspiegel im Serum der Mäuse, um das Reportergen zu induzieren.

Auch wenn bei der transgenen Maus nach der Induktion mit Tebufenozid kein immunologischer Nachweis erhöhter Expression der β_{2a} -Untereinheit gelang, konnte

doch in Herzkatheteruntersuchungen eine veränderte Herzfunktion nachgewiesen werden. Bei transgenen Mäusen führte die intraperitoneale Applikation von Tebufenozid für bis zu sieben Tage zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks und der maximalen linksventrikulären Kontraktionsgeschwindigkeit, der bei nicht-transgenen Kontrolltieren nicht beobachtet wurde. Diese Befunde deuten erstmals in vivo darauf hin, daß die β_{2a} -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals am Herzen eine positiv inotrope Wirkung vermitteln kann.

Systeme zur induzierbaren Genexpression müssen weiterentwickelt werden, um die Ideale der präzisen Steuerung ohne Nebenwirkungen sowohl für die Grundlagenforschung als auch für eine in weiterer Zukunft liegende Verwendung in der Gentherapie zu erreichen.

6. Literaturverzeichnis

1. Albanese C, Reutens AT, Bouzahzah B, Fu M, D'Amico M, Link T, Nicholson R, Depinho RA, Pestell RG (2000) Sustained mammary gland-directed, ponasterone A-inducible expression in transgenic mice. *Faseb J*, **14**, 877-884.
2. Antoniewski C, Laval M, Lepesant JA (1993) Structural features critical to the activity of an ecdysone receptor binding site. *Insect Biochem Mol Biol*, **23**, 105-114.
3. Arbeitman MN, Hogness DS (2000) Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell*, **101**, 67-77.
4. Ashburner M, Chihara C, Meltzer P, Richards G (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **38**, 655-662.
5. Baim SB, Labow MA, Levine AJ, Shenk T (1991) A chimeric mammalian transactivator based on the lac repressor that is regulated by temperature and isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5072-5076.
6. Baron U, Gossen M, Bujard H (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2723-2729.
7. Baron U, Schnappinger D, Helbl V, Gossen M, Hillen W, Bujard H (1999) Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1013-1018.
8. Bers DM (2000) Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res*, **87**, 275-281.
9. Biel M, Hullin R, Freundner S, Singer D, Dascal N, Flockerzi V, Hofmann F (1991) Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur J Biochem*, **200**, 81-88.
10. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, **309**, 255-256.
11. Braselmann S, Graninger P, Busslinger M (1993) A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1657-1661.

12. Brede M, Hadamek K, Meinel L, Wiesmann F, Peters J, Engelhardt S, Simm A, Haase A, Lohse MJ, Hein L (2001) Vascular hypertrophy and increased P70S6 kinase in mice lacking the angiotensin II AT(2) receptor. *Circulation*, **104**, 2602-2607.
13. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, **27**, 223-231.
14. Brocard J, Feil R, Chambon P, Metzger D (1998) A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4086-4090.
15. Bunemann M, Gerhardstein BL, Gao T, Hosey MM (1999) Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J Biol Chem*, **274**, 33851-33854.
16. Burcin MM, Schiedner G, Kochanek S, Tsai SY, O'Malley BW (1999) Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 355-360.
17. Cens T, Dalle C, Charnet P (1998) Expression of beta subunit modulates surface potential sensing by calcium channels. *Pflugers Arch*, **435**, 865-867.
18. Cens T, Restituito S, Vallentin A, Charnet P (1998) Promotion and inhibition of L-type Ca²⁺ channel facilitation by distinct domains of the subunit. *J Biol Chem*, **273**, 18308-18315.
19. Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-2752.
20. Chien AJ, Carr KM, Shirokov RE, Rios E, Hosey MM (1996) Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem*, **271**, 26465-26468.
21. Chien AJ, Gao T, Perez-Reyes E, Hosey MM (1998) Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the beta2a subunit. *J Biol Chem*, **273**, 23590-23597.
22. Chien AJ, Hosey MM (1998) Post-translational modifications of beta subunits of voltage-dependent calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, **30**, 377-386.

23. Chien KR (2001) To Cre or not to Cre: the next generation of mouse models of human cardiac diseases. *Circ Res*, **88**, 546-549.
24. Christopherson KS, Mark MR, Bajaj V, Godowski PJ (1992) Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6314-6318.
25. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, Jr. (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2979-2984.
26. Colbert MC, Hall DG, Kimball TR, Witt SA, Lorenz JN, Kirby ML, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J (1997) Cardiac compartment-specific overexpression of a modified retinoic acid receptor produces dilated cardiomyopathy and congestive heart failure in transgenic mice. *J Clin Invest*, **100**, 1958-1968.
27. Colecraft H, Alseikhan B, Takahashi S, Chaudhuri D, Mittman S, Yegnasubramanian V, Alvania R, Johns D, Marban E, Yue D (2002) Novel functional properties of Ca channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Phys*, **541**, 435-452.
28. Collin T, Wang JJ, Nargeot J, Schwartz A (1993) Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel beta subunit from normal human heart. *Circ Res*, **72**, 1337-1344.
29. Crispi S, Giordano E, D'Avino PP, Peluso I, Furia M (2001) Functional analysis of regulatory elements controlling the expression of the ecdysone-regulated *Drosophila* *ng-1* gene. *Mech Dev*, **100**, 25-35.
30. Dai S, Klugbauer N, Zong X, Seisenberger C, Hofmann F (1999) The role of subunit composition on prepulse facilitation of the cardiac L-type calcium channel. *FEBS Lett*, **442**, 70-74.
31. De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M, Catterall WA (1996) Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry*, **35**, 10392-10402.
32. Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu Rev Entomol*, **43**, 545-569.

33. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7059-7064.
34. Fishman GI (1998) Timing is everything in life: conditional transgene expression in the cardiovascular system. *Circ Res*, **82**, 837-844.
35. Freise D, Himmerkus N, Schroth G, Trost C, Weissgerber P, Freichel M, Flockerzi V (1999) Mutations of calcium channel beta subunit genes in mice. *Biol Chem*, **380**, 897-902.
36. Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H, Hennighausen L (1994) Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9302-9306.
37. Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron*, **19**, 185-196.
38. Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM (1999) Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, **38**, 10361-10370.
39. Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.
40. Gordon JW, Ruddle FH (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, **214**, 1244-1246.
41. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 7380-7384.
42. Gorman C, Bullock C (2000) Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol*, **11**, 455-460.
43. Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.

44. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
45. Haase H, Bartel S, Karczewski P, Morano I, Krause EG (1996) In-vivo phosphorylation of the cardiac L-type calcium channel beta- subunit in response to catecholamines. *Mol Cell Biochem*, **163-164**, 99-106.
46. Haase H, Kresse A, Hohaus A, Schulte HD, Maier M, Osterziel KJ, Lange PE, Morano I (1996) Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium. *J Mol Med*, **74**, 99-104.
47. Hasan MT, Schonig K, Berger S, Graewe W, Bujard H (2001) Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis*, **29**, 116-122.
48. Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ (1997) Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6391-6396.
49. Ho SN, Biggar SR, Spencer DM, Schreiber SL, Crabtree GR (1996) Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. *Nature*, **382**, 822-826.
50. Hoppe UC, Marban E, Johns DC (2000) Adenovirus-mediated inducible gene expression in vivo by a hybrid ecdysone receptor. *Mol Ther*, **1**, 159-164.
51. Hoppe UC, Marban E, Johns DC (2000) Molecular dissection of cardiac repolarization by in vivo Kv4.3 gene transfer. *J Clin Invest*, **105**, 1077-1084.
52. Horodyski FM, Ewer J, Riddiford LM, Truman JW (1993) Isolation, characterization and expression of the eclosion hormone gene of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem*, **215**, 221-228.
53. Hosey MM, DebBurman SK, Pals-Rylaarsdam R, Richardson RM, Benovic JL (1996) The role of G-protein coupled receptor kinases in the regulation of muscarinic cholinergic receptors. *Prog Brain Res*, **109**, 169-179.
54. Hullin R, Asmus F, Ludwig A, Hersel J, Boekstegers P (1999) Subunit expression of the cardiac L-type calcium channel is differentially regulated in diastolic heart failure of the cardiac allograft. *Circulation*, **100**, 155-163.

55. Hullin R, Khan I, Wirtz S, Mohacsi P, Varadi G, Schwartz A, Herzig S (2003) Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J Biol Chem*, **278**, 21623-21630.
56. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen- inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res*, **27**, 4324-4327.
57. Jaisser F (2000) Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*, **11 Suppl 16**, S95-S100.
58. Jones SN, Jones PG, Ibarguen H, Caskey CT, Craigen WJ (1991) Induction of the Cyp1a-1 dioxin-responsive enhancer in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6547-6551.
59. Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM (2000) Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther*, **1**, 516-521.
60. Kamimura M, Tomita S, Kiuchi M, Fujiwara H (1997) Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms -- ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *Eur J Biochem*, **248**, 786-793.
61. Kamp TJ, Hell JW (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res*, **87**, 1095-1102.
62. Kamp TJ, Hu H, Marban E (2000) Voltage-dependent facilitation of cardiac L-type Ca channels expressed in HEK-293 cells requires beta-subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H126-136.
63. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M (1999) TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol*, **276**, G1059-1068.
64. Karns LR, Kisielewski A, Gulding KM, Seraj JM, Theodorescu D (2001) Manipulation of gene expression by an ecdysone-inducible gene switch in tumor xenografts. *BMC Biotechnol*, **1**, 11.

65. Kellendonk C, Tronche F, Casanova E, Anlag K, Opherk C, Schutz G (1999) Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol*, **285**, 175-182.
66. Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, **67**, 59-77.
67. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science*, **269**, 1427-1429.
68. Kumar MB, Fujimoto T, Potter DW, Deng Q, Palli SR (2002) A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: implications for gene switch applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14710-14715.
69. Kumar R, Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, **64**, 310-319.
70. Lee F, Mulligan R, Berg P, Ringold G (1981) Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimaeric plasmids. *Nature*, **294**, 228-232.
71. Li M, Indra AK, Warot X, Brocard J, Messaddeq N, Kato S, Metzger D, Chambon P (2000) Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis. *Nature*, **407**, 633-636.
72. Liberles SD, Diver ST, Austin DJ, Schreiber SL (1997) Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7825-7830.
73. Lutz R, Bujard H (1997) Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, **25**, 1203-1210.
74. Mansuy IM, Bujard H (2000) Tetracycline-regulated gene expression in the brain. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 593-596.
75. Martinez A, Sparks C, Hart CA, Thompson J, Jepson I (1999) Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. *Plant J*, **19**, 97-106.
76. Metzger D, Feil R (1999) Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 470-476.

77. Minamino T, Gaussin V, DeMayo FJ, Schneider MD (2001) Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein. *Circ Res*, **88**, 587-592.
78. Mukherjee R, Spinale FG (1998) L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. *J Mol Cell Cardiol*, **30**, 1899-1916.
79. Niedziela-Majka A, Kochman M, Ozyhar A (2000) Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the hsp27 gene promoter. *Eur J Biochem*, **267**, 507-519.
80. No D, Yao TP, Evans RM (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3346-3351.
81. Palli SR, Kapitskaya MZ, Kumar MB, Cress DE (2003) Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem*, **270**, 1308-1315.
82. Palmiter RD, Norstedt G, Gelinis RE, Hammer RE, Brinster RL (1983) Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, **222**, 809-814.
83. Passman RS, Fishman GI (1994) Regulated expression of foreign genes in vivo after germline transfer. *J Clin Invest*, **94**, 2421-2425.
84. Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR, Riesco AM, Hoppe UC, Marban E, Gonzalez C, Johns DC (2000) Viral gene transfer of dominant-negative Kv4 construct suppresses an O₂-sensitive K⁺ current in chemoreceptor cells. *J Neurosci*, **20**, 5689-5695.
85. Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda AE, Wei XY, Birnbaumer L (1992) Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem*, **267**, 1792-1797.
86. Putzer BM, Stiewe T, Crespo F, Esche H (2000) Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther*, **7**, 1317-1325.

87. Rahn KH, Reuter H (1966) [On the relations of effects of adrenaline, a beta-adrenolytic and quinidine on the contraction power and calcium metabolism of the guinea pig atrium]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, **252**, 444-451.
88. Redfern CH, Coward P, Degtyarev MY, Lee EK, Kwa AT, Hennighausen L, Bujard H, Fishman GI, Conklin BR (1999) Conditional expression and signaling of a specifically designed Gi- coupled receptor in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, **17**, 165-169.
89. Redfern CH, Degtyarev MY, Kwa AT, Salomonis N, Cotte N, Nanevicz T, Fidelman N, Desai K, Vranizan K, Lee EK, Coward P, Shah N, Warrington JA, Fishman GI, Bernstein D, Baker AJ, Conklin BR (2000) Conditional expression of a Gi-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4826-4831.
90. Restituto S, Cens T, Barrere C, Geib S, Galas S, De Waard M, Charnet P (2000) The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca²⁺ channel inactivation gate. *J Neurosci*, **20**, 9046-9052.
91. Retnakaran A, Gelbic I, Sundaram M, Tomkins W, Ladd T, Primavera M, Feng Q, Arif B, Palli R, Krell P (2001) Mode of action of the ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992), and an exclusion mechanism to explain resistance to it. *Pest Manag Sci*, **57**, 951-957.
92. Reuter H, Scholz H (1977) The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. *J Physiol*, **264**, 49-62.
93. Riddiford LM (1993) Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor*, **3**, 203-209.
94. Rivera VM, Clackson T, Natesan S, Pollock R, Amara JF, Keenan T, Magari SR, Phillips T, Courage NL, Cerasoli F, Jr., Holt DA, Gilman M (1996) A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med*, **2**, 1028-1032.
95. Rivera VM, Ye X, Courage NL, Sachar J, Cerasoli F, Jr., Wilson JM, Gilman M (1999) Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8657-8662.
96. Rohm , Haas , *MIMIC*® LV2, *The mimic manual*. 1999, 2000.

97. Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, **245**, 1115-1118.
98. Ryding AD, Sharp MG, Mullins JJ (2001) Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol*, **171**, 1-14.
99. Saez E, Nelson MC, Eshelman B, Banayo E, Koder A, Cho GJ, Evans RM (2000) Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14512-14517.
100. Sambrook F, Maniatis, *Molecular Cloning - a laboratory manual*. 2nd edition ed. Cold spring harbour laboratory press. 1989.
101. Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5166-5170.
102. Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J, Herzig S (1998) Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation*, **98**, 969-976.
103. Sculptoreanu A, Rotman E, Takahashi M, Scheuer T, Catterall WA (1993) Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel alpha 1 subunits due to phosphorylation by cAMP- dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10135-10139.
104. Senner V, Sotoodeh A, Paulus W (2001) Regulated gene expression in glioma cells: a comparison of three inducible systems. *Neurochem Res*, **26**, 521-524.
105. Serikov V, Bodi I, Koch S, Muth J, Mikala G, Martinov S, Haase H, A. S (2002) Mice with cardiac -specific sequestration of the beta subunit of the L-type calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 1405-1411.
106. Shockett PE, Schatz DG (1996) Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5173-5176.
107. Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*, **253**, 1553-1557.

108. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, Penninger JM, Molkenstein JD (2001) Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res*, **89**, 20-25.
109. St-Onge L, Furth PA, Gruss P (1996) Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3875-3877.
110. Striessnig J (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem*, **9**, 242-269.
111. Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*, **266**, 24613-24620.
112. Suhr ST, Gil EB, Senut MC, Gage FH (1998) High level transactivation by a modified Bombyx ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7999-8004.
113. Swevers L, Drevet JR, Lunke MD, Iatrou K (1995) The silkworm homolog of the Drosophila ecdysone receptor (B1 isoform): cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. *Insect Biochem Mol Biol*, **25**, 857-866.
114. Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS (1993) Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, **73**, 1323-1337.
115. Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF (1993) Heterodimerization of the Drosophila ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature*, **362**, 471-475.
116. Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, **56**, 313-321.
117. Thummel CS (1995) From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of Drosophila nuclear receptor superfamily members. *Cell*, **83**, 871-877.
118. Tremblay P, Meiner Z, Galou M, Heinrich C, Petromilli C, Lisse T, Cayetano J, Torchia M, Mobley W, Bujard H, DeArmond SJ, Prusiner SB (1998) Doxycycline

control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12580-12585.

119. Tsai SY, O'Malley BW, DeMayo FJ, Wang Y, Chua SS (1998) A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes. *Adv Drug Deliv Rev*, **30**, 23-31.

120. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7963-7968.

121. Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Leysen JE, Haegeman G (2001) Evaluation of the tetracycline- and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. *Eur J Neurosci*, **14**, 968-976.

122. Walker D, De Waard M (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci*, **21**, 148-154.

123. Wang Y, DeMayo FJ, Tsai SY, O'Malley BW (1997) Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, **15**, 239-243.

124. Wang Y, O'Malley BW, Jr., Tsai SY, O'Malley BW (1994) A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8180-8184.

125. Wei SK, Colecraft HM, DeMaria CD, Peterson BZ, Zhang R, Kohout TA, Rogers TB, Yue DT (2000) Ca(2+) channel modulation by recombinant auxiliary beta subunits expressed in young adult heart cells. *Circ Res*, **86**, 175-184.

126. Wing KD (1988) RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on a *Drosophila* cell line. *Science*, **241**, 467-469.

127. Wurm FM, Gwinn KA, Kingston RE (1986) Inducible overproduction of the mouse c-myc protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5414-5418.

128. Wurtz JM, Guillot B, Fagart J, Moras D, Tietjen K, Schindler M (2000) A new model for 20-hydroxyecdysone and dibenzoylhydrazine binding: a homology modeling and docking approach. *Protein Sci*, **9**, 1073-1084.

129. Xu L, Zerby D, Huang Y, Ji H, Nyanguile OF, de los Angeles JE, Kadan MJ (2001) A versatile framework for the design of ligand-dependent, transgene-specific transcription factors. *Mol Ther*, **3**, 262-273.
130. Yamada Y, Nagashima M, Tsutsuura M, Kobayashi T, Seki S, Makita N, Horio Y, Tohse N (2001) cloning of a functional splice variant of L-type calcium channel beta2 subunit from rat heart. *J Biol Chem*, **276**, 47163-47170.
131. Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, **366**, 476-479.
132. Yao TP, Seagraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, **71**, 63-72.
133. Ye X, Rivera VM, Zoltick P, Cerasoli F, Jr., Schnell MA, Gao G, Hughes JV, Gilman M, Wilson JM (1999) Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science*, **283**, 88-91.
134. Yu Z, Redfern CS, Fishman GI (1996) Conditional transgene expression in the heart. *Circ Res*, **79**, 691-697.
135. Zhu Z, Ma B, Homer RJ, Zheng T, Elias JA (2001) Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J Biol Chem*, **276**, 25222-25229.

7. Abkürzungen

A	Adenin
α MHC	Schwere Kette des α Myosin
B.m.	Bombyx mori, der Seidenspinner
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca	Calcium
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
Cl	Chlor
CMV	Promotor des Zytomegalievirus
COS- Zellen	Mit dem Simian virus 40 transformierte CV1-Zelllinie
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EcR	Ecdysonrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA (Titrplex®)	Bis-(aminoethyl)-glycoether-N,N,N,N',-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	(1) Gramm, (2) Erdbeschleunigung
Gal-4	DNA-Bindedomäne aus Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
G _i	Die Adenylylcyclase hemmendes G-Protein
G _s	Die Adenylylcyclase stimulierendes G-Protein
H	Wasserstoff

h	Stunde(n)
HEK- Zellen	„human embryonic kidney cells“ – humane Zelllinie
HEPES	(N-2-Hydroxyethyl-piperazin) N‘2-Ethan-Sulfonsäure
i.p.	intraperitoneal
K	Kalium
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	Molar
Mg	Magnesium
min	Minute
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NP40	Non idet NP-40
O	Sauerstoff
P	Phosphor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
pVgBmEcR	hybrider EcR des Seidenspinners
pVgRXR	hybrider Drosophilaecdysone-rezeptor und RXR
RNA	Ribonukleinsäure
rtTA	reverser tetracyclinaktivierter Transkriptionsaktivator
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S	Schwefel
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

T	Thymin
TET	Tetracyclinsystem zur induzierbaren Genexpression
TG	Transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
tTA	tetracyclinaktivierter Transkriptionsaktivator
U	Internationale Einheiten
usp	ultraspiracle Genprodukt, Insektenanalogon zum RXR
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen auf Volumen
Vp16	Transaktivierungsdomäne aus dem Protein 16 des Herpesvirus
w/v	Gewicht auf Volumen
WT	Wildtyp

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Sibylle von Vietinghoff
Geburtsdatum und -ort	25.11.1977 in Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1984-1988	Grundschulen in Hannover
1988-1990	Orientierungsstufe Luerstraße in Hannover
1990-1996	Kaiser-Wilhelm-Gymnasium, Hannover, und Abitur

Studium:

10/1996- 9/1999	Medizinstudium an der Universität Göttingen.
8/1998	Ärztliche Vorprüfung
9/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1999- 7/2000	Medizinstudium an der University of Aberdeen, UK
8/2000-5/2003	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
3/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Würzburg, Juni 2003

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Lohse und Herrn Prof. Dr. L. Hein angefertigt.

Hiermit möchte ich auch in schriftlicher Form allen danken, die mir die Anfertigung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben und dabei behilflich waren.

Herrn Professor Lohse danke ich für die Betreuung als Doktorvater und die Möglichkeit, mein Projekt im Laborseminar sowie 2000 auf dem örtlichen Kongreß für medizinische Doktorarbeiten (Promomed) zu präsentieren. Während meiner Zeit am Institut habe ich außerdem gern das umfangreiche Programm an wissenschaftlichen Vorträgen und Tagungen z.B. im Rahmen der Sonderforschungsbereichen wahrgenommen.

Herrn Professor Hein danke ich für die tägliche Zusammenarbeit, intensive Diskussionen über Projekt und Methoden und vielfältige praktische Hilfe. Auch für die Durchführung der Herzkatheterexperimente möchte ich ihm danken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau K. Hadamek für den geduligen und hilfreichen Unterricht in vielen Methoden.

Außerdem möchte ich Frau Dr. E. Schmitteckert für die Durchführung der Pronukleusinjektionen danken.

Auch allen anderen im Labor, die mir mit Rat, Versuchsprotokollen und praktischer Hilfe zur Seite gestanden haben und die für Aufmunterung und Motivation sorgten, sei herzlich gedankt !

„ Experience is what you get after you needed it...“