

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Elke Butt**

**Design und Klonierung eines Targeting Vektors zur  
Generierung von Plasmakallikrein-defizienten Mäusen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Robert Untucht**

**aus Heidelberg**

**Würzburg, Juli 2012**

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Michael Zimmer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2013

Der Promovend ist Arzt

Meinem Großvater

Dr. Erich Grau

1916-2011

## **Inhaltsverzeichnis**

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Plasmakallikrein .....	1
1.2	Plasmakallikrein-Defizienz beim Menschen .....	6
1.3	Knockout-Mäuse.....	7
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	Material .....	11
2.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	11
2.1.2	Biologisches Material .....	12
2.1.3	Kits.....	14
2.1.4	Geräte.....	14
2.2	Methoden .....	15
2.2.1	Polymerasekettenreaktion.....	15
2.2.1.1	Grundlagen .....	15
2.2.1.2	Primerauswahl .....	16
2.2.1.3	PCR für die lange Homologie.....	17
2.2.1.4	PCR für die kurze Homologie .....	18
2.2.1.5	PCR für die Sonde zum Nachweis der langen Homologie.....	19
2.2.1.6	PCR für die Sonde zum Nachweis der kurzen Homologie.....	19
2.2.1.7	PCR für die DNA-Sonde zur Genotypisierung der Stammzellen .....	20
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	21
2.2.3	Extraktion von DNA aus Elektrophoresegel .....	22

2.2.4	T/A-Klonierung .....	23
2.2.4.1	TOPO® TA Cloning® Kit .....	23
2.2.4.2	TOPO® XL Cloning® Kit .....	23
2.2.5	Transformation von Plasmiden in E. coli .....	24
2.2.6	Anlegen von Bakterien-Flüssigkulturen .....	24
2.2.7	Blau-weiß-Selektion von transformierten Bakterien .....	25
2.2.8	Plasmidpräparation .....	25
2.2.8.1	NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit .....	26
2.2.9	DNA-Schnitt durch Restriktionsendonukleasen .....	27
2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	28
2.2.11	DNA-Sequenzierung .....	28
2.2.12	Colony Lift .....	29
2.2.12.1	Grundlagen .....	29
2.2.12.2	Radioaktives Labeln der Sonde .....	30
2.2.12.3	Durchführung .....	30
3	ERGEBNISSE .....	33
3.1	Klonierung der kurzen Homologie .....	33
3.2	Klonierung der langen Homologie .....	34
3.3	Klonierung der Nachweissonden .....	36
3.3.1	Klonierung einer Sonde zum Nachweis der langen Homologie .....	36
3.3.2	Klonierung einer Sonde zum Nachweis der kurzen Homologie .....	37
3.3.3	Klonierung einer Sonde zum Nachweis transfizierter Stammzellen .....	37

3.4	Klonierung der langen Homologie in den pHM2-Vektor.....	39
3.5	Klonierung der kurzen Homologie in den Zwischenschrittvektor .....	41
4	DISKUSSION.....	43
4.1	Aufbau des Targeting Vektors .....	43
4.2	Vergleich Mausmodell und Mensch .....	44
4.3	Plasmakallikrein und Faktor XII .....	46
4.4	Plasmakallikrein-defiziente Mäuse und Ausblick .....	47
5.1	Zusammenfassung .....	51
5.2	Abstract.....	51
6	Literatur .....	52

Abkürzungen

Anhang

Sequenz des Targeting Vektors

Restriktionsverdaus zur Verifizierung des fertigen Targeting Vektors

Danksagung

Lebenslauf



# 1 Einleitung

## 1.1 Plasmakallikrein

Plasmakallikrein ist eine Serinprotease, die vor allem in der Blutgerinnung und im Kinin-System eine Rolle spielt. Die inaktive Vorstufe von Plasmakallikrein ist Plasma-Präkallikrein. Im Blut liegt Plasma-Präkallikrein größtenteils als Komplex mit High-Molecular-Weight-Kininogen (HMWK) im molekularen Verhältnis 1:1 vor.

Das für Plasma-Präkallikrein codierende Gen mit dem Namen *klkb1* liegt beim Menschen auf Chromosom 4 im Bereich 4q35.2, direkt neben dem für Faktor XI codierenden Gen. Bei der Maus ist dieses Gen auf Chromosom 8 im Bereich 8qB1.1 lokalisiert, ebenfalls neben dem Gen für Faktor XI. Die Gene beinhalten 15 Exons und 14 Introns. Beim murinen Gen beträgt die Länge von Exon 1 bis 15 ungefähr 25400 bp, das mRNA-Transkript hat eine Länge von 2496 Basen (NCBI Gene ID 3818 ; NCBI Gene ID 16621).

Die Nachbarschaft zu Faktor XI und die Ähnlichkeit von Gensequenz und Proteintertiärstruktur zwischen Plasma-Präkallikrein und Faktor XI sprechen für einen gemeinsamen genetischen Ursprung der beiden Proteine durch Genduplikation (Beaubien *et al.* 1991).

Nach der Synthese in der Leber wird Plasma-Präkallikrein unter Abspaltung eines 19 Aminosäuren langen Signalpeptids ins Blut sezerniert. Plasma-Präkallikrein hat eine Länge von 619 Aminosäuren bei einem relativen Molekulargewicht von 85 000 bis 88 000, wobei die unterschiedlichen Molekulargewichte auf unterschiedlich glykosylierte Leichtketten zurückgeführt werden (Mandle und Kaplan 1977; Chung *et al.* 1986).

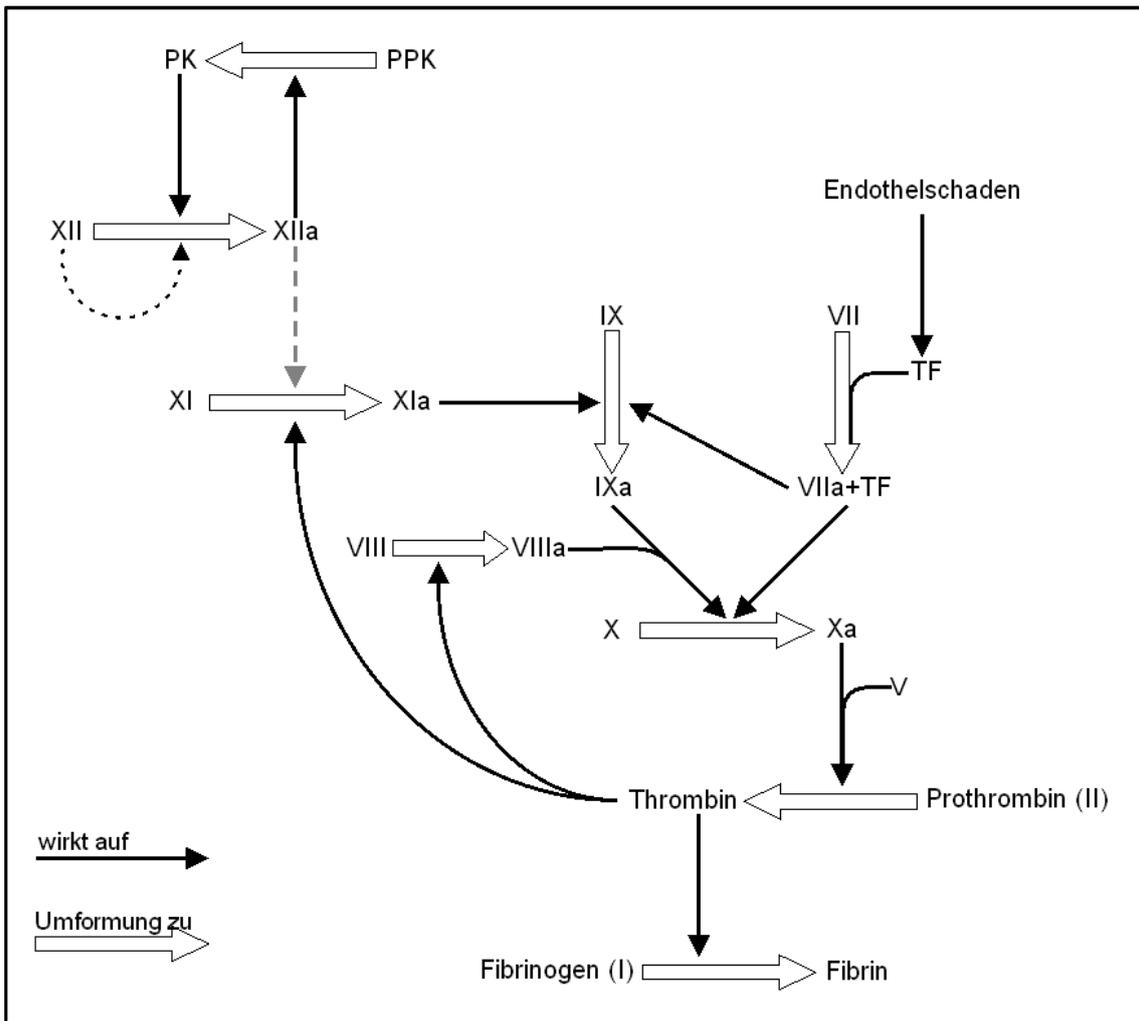
Die Aktivierung zu Plasmakallikrein erfolgt durch Spaltung einer internen Arginin-Isoleucin-Verbindung. Dabei entsteht eine schwere Kette aus den 371 aminoterminalen Aminosäuren, die durch eine Disulfidbrücke mit der leichten Kette aus den 248 carboxyterminalen Aminosäuren verbunden ist. Die schwere Kette enthält vier je 90-91 Aminosäuren lange sogenannte "apple domains" in Tandemanordnung, welche homolog zu einer entsprechenden Struktur des Faktor XI sind und die Bindungsstelle für HMWK

enthalten. Die leichte Kette ist homolog zur Trypsin-Familie der Serinproteasen, sie enthält das aktive Zentrum des Enzyms (Chung *et al.* 1986).

Die Aktivierung von Plasma-Präkallikrein zu Plasmakallikrein kann auf verschiedene Weise erfolgen: *In vitro*, auf künstlichen, negativ geladenen Oberflächen wie Kaolin, binden im ersten Schritt Faktor XII und Plasma-Präkallikrein aneinander. Es kommt zur Autoaktivierung von Faktor XII zu XIIa und dann zur Aktivierung von Plasma-Präkallikrein zu Plasmakallikrein. Plasmakallikrein wiederum kann Faktor XII aktivieren, was über die reziproke Verstärkung schnell zu einem hohen Level beider aktivierter Proteine führt (Cochrane *et al.* 1973). Inwiefern dieser Mechanismus *in vivo* eine Rolle spielt, ist unklar.

*In vivo* erfolgt die Aktivierung, wenn an HMWK gebundenes Plasma-Präkallikrein auf Endothelzellen gebunden wird. Aktivatoren sind die endotheliale Serinprotease Prolylcarboxypeptidase (PRCP) sowie das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90). Dieser Weg ist unabhängig von Faktor XII möglich. Das aktivierte Plasmakallikrein wird frei, nachdem es HMWK geschnitten hat (Motta *et al.* 1998; Røjkjaer *et al.* 1998; Joseph *et al.* 2002; Shariat-Madar *et al.* 2002).

So wie eine Aktivierung von Plasma-Präkallikrein zu Plasmakallikrein auf verschiedene Weise erfolgt, sind auch die Funktionen vielfältig. Die reziproke Aktivierung von Plasmakallikrein und Faktor XIIa ist der Initialschritt der intrinsischen Blutgerinnungskaskade, welche auch ohne Plasmakallikrein abläuft, dann jedoch deutlich langsamer. Der Beginn der intrinsischen Blutgerinnung wird wegen des notwendigen Kontaktes zu Oberflächen auch als Kontaktphasenaktivierung bezeichnet. Die Kontaktphasenproteine sind neben Plasmakallikrein und Faktor XII noch Faktor XI und HMWK. Die intrinsische Blutgerinnungskaskade verläuft über die Aktivierung von Faktor XI durch Faktor XIIa und über die darauf folgenden Gerinnungsfaktoren IX und VIII zum – auch über die extrinsische Blutgerinnungskaskade aktivierbaren – Faktor X. Dieser katalysiert zusammen mit Faktor V die Aktivierung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin, welches über die Aktivierung von Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin die Bildung von Thromben auslöst. Neben der Rolle in der Frühphase der Blutgerinnung zusammen mit Faktor XII kann Plasmakallikrein auch direkt Prothrombin zu Thrombin aktivieren (Davie und Ratnoff 1964; Wuepper 1973; Stief 2008).



**Abbildung 1: Reaktionsschema der Blutgerinnung, vereinfacht:**

PPK = Plasma-Präkallikrein, PK = Plasmakallikrein, TF = Tissue Factor. Römische Ziffern = Gerinnungsfaktoren. Schwarze gestrichelte Linie = Autoaktivierung von Faktor XII. Graue gestrichelte Linie = Physiologisch nachrangige Aktivierung von Faktor XI durch Faktor XIIa.

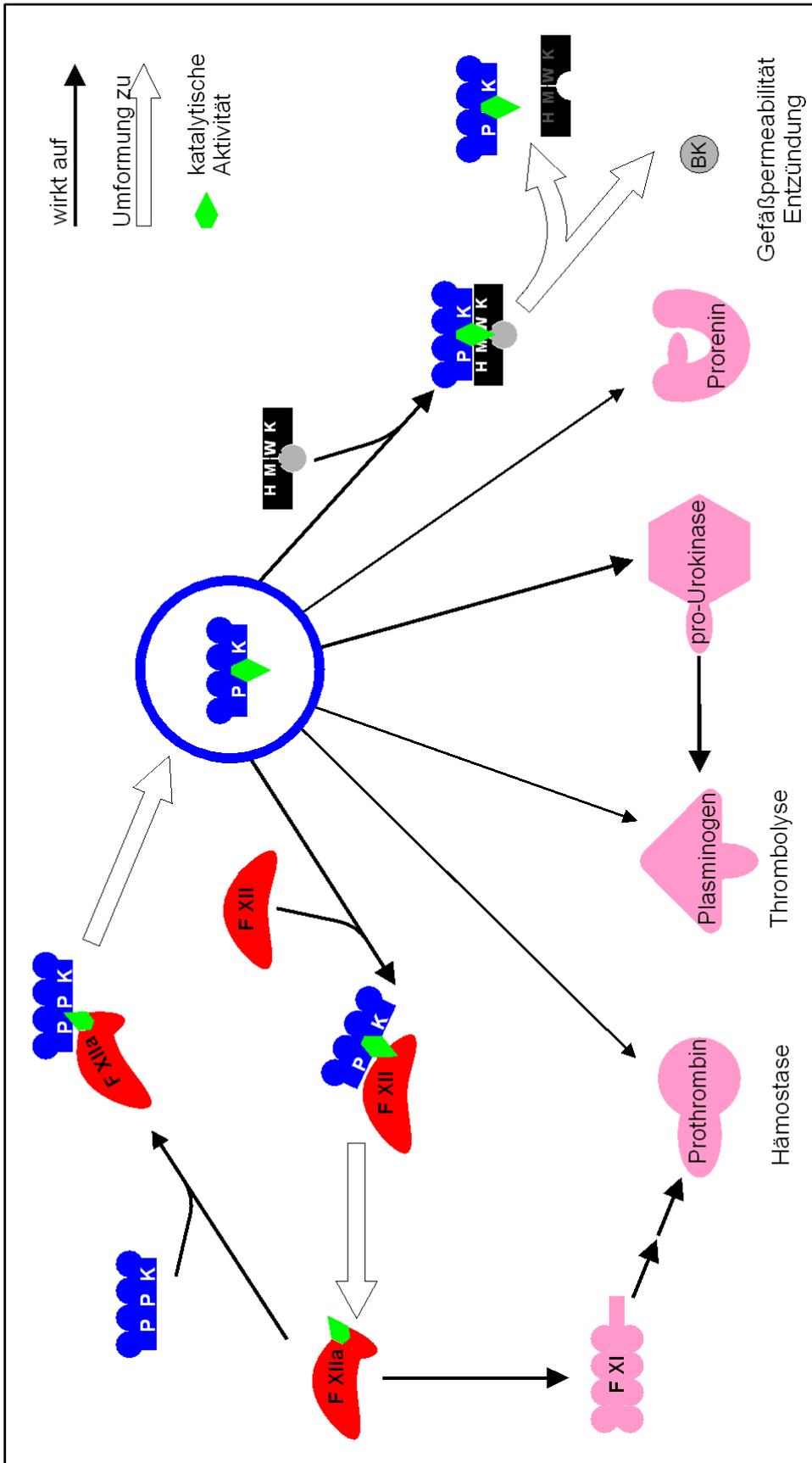
Als Reaktionspartner von Fibrinogen beziehungsweise Fibrin ist Plasmakallikrein auf zweierlei Art aktiv. Es wie oben beschrieben bei der Fibrinbildung aus Fibrinogen, aber auch – in deutlich geringerem Ausmaß – beim Fibrinabbau beteiligt. Einerseits wurde eine langsame direkte Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch Plasmakallikrein nachgewiesen, andererseits eine indirekte, bei der zunächst pro-Urokinase zu Urokinase aktiviert wird, welche wiederum Plasminogen aktiviert (Miles *et al.* 1983; Ichinose *et al.* 1986).

Eine Hauptwirkung von Plasmakallikrein ist die Freisetzung von Bradykinin. Das im Komplex mit Plasma-Präkallikrein zirkulierende HMWK wird durch Plasmakallikrein gespalten, wobei das Spaltprodukt Bradykinin freigesetzt wird. Bradykinin ist ein Nonapeptid, das unter anderem bei der Entzündungsmediation eine Rolle spielt. Neben einer Vasodilatation und der daraus folgenden Blutdrucksenkung steigert es die Gefäßpermeabilität und fördert die Schmerzentstehung. Desweiteren führt Bradykinin zu einer Kontraktion nicht-endothelialer glatter Muskelzellen in Bronchien, Darm und Uterus (Maurer *et al.* 2011).

Über die Bradykinin-vermittelte indirekte Wirkung hinaus ist Plasmakallikrein auch auf andere Weise an Entzündungsvorgängen beteiligt. Es wirkt sowohl chemotaktisch als auch aggregierend auf neutrophile Granulozyten und löst die Freisetzung von Elastase aus selbigen aus (Kaplan *et al.* 1972; Schapira *et al.* 1982; Wachtfogel *et al.* 1983).

Plasmakallikrein kann Prorenin zu Renin aktivieren. Eine auf diese Weise den arteriellen Blutdruck anhebende Funktion fällt jedoch aufgrund der über Bradykinin vermittelten Blutdrucksenkung nicht ins Gewicht (Derkx *et al.* 1979).

Eine Hemmung der Wirkung von Plasmakallikrein erfolgt vor allem durch C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) und in geringerem Maße auch durch  $\alpha$ 2-Makroglobulin sowie  $\alpha$ 1-Antitrypsin (Fritz *et al.* 1969; Harpel 1970; Harpel *et al.* 1985). Ein Mangel an C1-INH oder der Funktionsverlust dieses Proteins führen durch übermäßige Bradykininbildung zum klinischen Bild des hereditären Angioödems (HAE = Hereditary AngioEdema) (Osler 1888; Becker und Kagen 1964). Es wurden drei Typen des HAE beschrieben, die durch autosomal-dominante Mutationen ausgelöst werden: Typ I wird durch einen verminderten C1-INH-Spiegel verursacht, beim Typ II liegt ein funktionsunfähiger C1-INH mit normalem Plasmaspiegeln vor (Cicardi *et al.* 1982; Bowen *et al.* 2001). Typ III wird durch eine Mutation im Gen für Faktor XII ausgelöst, welche zu einer erhöhten Aktivität von Faktor XII führt. Durch die östrogenabhängige Transkription von Faktor XII tritt HAE Typ III vor allem in Frauen auf mit einer Attackenhäufung bei erhöhten Östrogenspiegeln (Bork *et al.* 2000; Cichon *et al.* 2006).



**Abbildung 2: Funktionen von Plasmakallikrein:**

Die verschiedenen Reaktionspartner von Plasmakallikrein. PPK = Plasma-Präkallikrein, PK = Plasmakallikrein, F = Faktor, HMWK = high-molecular-weight-Kininogen, BK = Bradykinin.

## 1.2 Plasmakallikrein-Defizienz beim Menschen

Plasmakallikrein-Defizienz ist ein sehr seltener autosomal-rezessiv vererbter Zustand, zur Prävalenz liegen keine belastbaren Daten vor. Die wissenschaftliche Erstbeschreibung erfolgte 1965, nachdem bei der Routine-Blutuntersuchung einer Patientin eine Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) aufgefallen war. Der fehlende Blutgerinnungsfaktor wurde nach dem Familiennamen der betroffenen Familie Fletcher-Faktor genannt. 1973 wurde der Fletcher-Faktor als Plasmakallikrein identifiziert (Hathaway *et al.* 1965; Wuepper 1973).

Betroffene Individuen fallen zumeist bei Routineuntersuchungen durch eine Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) auf, welche die intrinsische Blutgerinnung abbildet. Die die extrinsische Blutgerinnung darstellende Thromboplastinzeit (Prothrombinzeit beziehungsweise Quick-Wert), die Blutungszeit, Anzahl und Funktion der Thrombozyten sowie der Rumpel-Leede-Test auf Kapillarstabilität (tourniquet test) zeigen keine Veränderungen (Hathaway *et al.* 1965).

Klinisch sind die meisten Patienten asymptomatisch. Eine bei einer Störung der Blutgerinnung zu erwartende Blutungsneigung wurde nur in Einzelfällen beschrieben. Bei einem nigerianischen Kleinkind traten rezidivierende schwere Blutungen auf, die anderen Beschreibungen betreffen rezidivierende Epistaxis oder Purpura. In keinem der Fälle lagen zusätzliche Risikofaktoren für eine erhöhte Blutungsneigung vor (Essien und Ebhota 1977; Raffoux *et al.* 1982; Dasanu und Alexandrescu 2009; Nagaya *et al.* 2009).

Häufiger als Blutungsereignisse treten thrombotische Ereignisse auf. In einer Analyse aller wissenschaftlich beschriebenen Fälle von Plasmakallikrein-Defizienz fanden Girolami *et al.* unter 75 Patienten neun mit thrombotischen Ereignissen. Von diesen neun Patienten zeigten fünf arterielle thrombotische Ereignisse wie Herzinfarkte und Schlaganfälle, drei zeigten venöse thrombotische Ereignisse wie tiefe Venenthrombosen und Lungenembolien, ein Patient sogar beides. Dies wird auf die Rolle von Plasmakallikrein bei der Fibrinolyse zurückgeführt (Übersicht in Girolami, Allemand, *et al.* 2010).

Es wurden vermehrte Schwangerschaftsverluste beschrieben, wobei jedoch nicht sicher ist, ob diese auf Thrombosen im Plazentarsystem oder auf andere Mechanismen zurückzuführen sind (Sugi und Makino 2000).

Die Bildung von Kininen wie Bradykinin ist bei vollständigem Fehlen von Plasmakallikrein-Aktivität nicht möglich (Wuepper 1973).

Schon bei den Erstbeschreibungen der Defizienz von Fletcher-Faktor und seiner Identifikation als Plasmakallikrein wurde festgestellt, dass die Transfusion von Vollblut, Blutplasma oder reinem Plasmakallikrein zu einer Normalisierung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit führt. Eine Plasmakallikrein-Aktivität von 2 % des Normwerts ist hierfür ausreichend (Hathaway *et al.* 1965; Wuepper 1973).

Es sind unterschiedliche Arten von Plasmakallikrein-Defizienz beschrieben. Neben einem funktionsunfähigen Plasma-Präkallikrein mit normalen Plasmaspiegeln gibt es auch ein völliges Fehlen des Proteins. (Saito *et al.* 1981; Bouma *et al.* 1986). Innerhalb dieser Hauptvarianten wurden mehrere unterschiedliche genetische Mutationen nachgewiesen: Die erste auf DNA-Ebene nachgewiesene Mutation beschreibt eine Punktmutation in Exon 11 mit daraus folgendem Aminosäureaustausch Gly401Glu in der katalytischen Domäne der leichten Kette (Shigekiyo *et al.* 2003). Die gemeinsam gefundenen Mutationen Gly104Arg und Asn124Ser in der zweiten Apple-Domäne der schweren Kette hemmen die Bindung an HMWK (Katsuda *et al.* 2007). Die kombinierte Heterozygotie von einer Insertion in Intron 7 kurz vor dem Start von Exon 8 in Verbindung mit einem Aminosäureaustausch Asp558Glu in Exon 15 wurde in einer italo-argentinischen Familie nachgewiesen (Girolami, Marun, *et al.* 2010). Eine Stop-Mutation Arg94Stop führte zu einem Fehlen des Plasmakallikrein-Proteins (Wynne Jones *et al.* 2004).

### **1.3 Knockout-Mäuse**

Diese Arbeit beschreibt die Erstellung eines sogenannten "Targeting Vektors" zur gezielten Manipulation des murinen Gens für Plasmakallikrein. Als Targeting Vektor wird ein Plasmid bezeichnet, das neben Strukturen zum gezielten Erkennen des Zielgens auch Gene sowohl zur Anreicherung als auch zur Identifikation erfolgreich transfizierter

Zellen enthält. Das Verfahren, mit dem gearbeitet wird, heißt im Englischen "gene targeting", da ein bestimmtes Gen gezielt verändert wird und ist eine von mehreren Möglichkeiten, sogenannte "Knockout Lebewesen" zu erstellen.

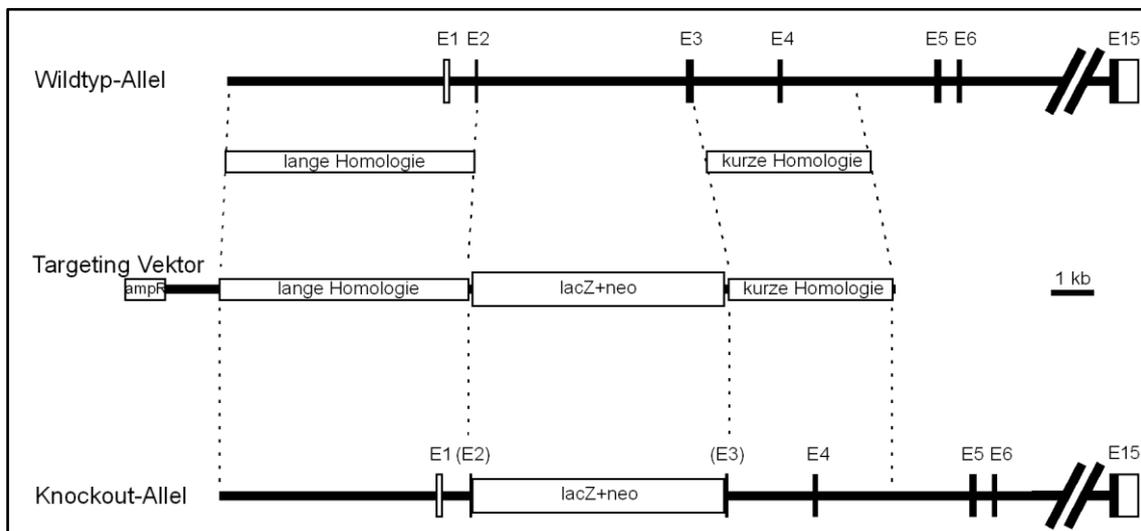
Mit dem Targeting Vektor kann ein bestimmtes Gen im Genom des Zielorganismus gezielt gefunden und verändert werden. Die Selektivität für eine bestimmte Stelle im Genom wird dadurch erreicht, dass der Vektor zwei zum Zielgen homologe Bereiche enthält. Diese führen bei der Transfektion der Zielzellen zur Anlagerung der homologen Sequenzen an die identischen Sequenzen im Chromosom. Die Homologien erhält man, indem man mit spezifischen PCR-Primern zwei Bereiche der genomischen DNA innerhalb des Zielgens, dessen Sequenz dafür bekannt sein muss, vervielfältigt. Diese Bereiche werden in ein bakterielles Plasmid kloniert (Thomas und Capecchi 1987). Dieses Plasmid muss zudem noch weitere Bestandteile beinhalten:

1. Ein Gen für bakterielle Antibiotikaresistenz. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Gen für  $\beta$ -Laktamase verwendet, welches Resistenz gegen Ampicillin bietet. Solange die das Plasmid enthaltenden Bakterien in einem mit dem Antibiotikum versehenen Nährmedium gehalten werden, sind sie durch das Resistenzgen vor dem Antibiotikum geschützt und vervielfältigen bei ihrem Wachstum das Plasmid (Kaestner *et al.* 1994).

2. Die den Targeting Vektor enthaltenden bakteriellen oder eukaryoten Zellen müssen von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden können. Dies wird durch ein Reportergen ermöglicht. Als solches hat sich das Gen *lacZ* bewährt, welches für  $\beta$ -Galaktosidase codiert und auch in dieser Arbeit verwendet wird. Mit einem geeigneten Substrat namens X-Gal lassen sich die Existenz und die Expression dieses Genes durch eine Blaufärbung nachweisen (Matsumoto *et al.* 1988; Mansour *et al.* 1990).

3. Der dritte wichtige Bestandteil eines Targeting Vektors dient der Selektion erfolgreich transfizierter embryonaler Stammzellen. Weit verbreitet und auch für diese Arbeit verwendet wurde eine Neomycin-Phosphotransferase, welche Resistenz gegen Neomycin verleiht. Neomycin ist ebenfalls ein Antibiotikum. Es hat wegen seiner relativ hohen Toxizität allerdings nur sehr eingeschränkte humanmedizinische Verwendung. Die Neomycin-Phosphotransferase bietet auch Schutz vor der dem Neomycin ähnlichen und für eukaryote Zellen noch stärker toxischen Substanz G418. Nach Transfektion des Targeting Vektors in embryonale Stammzellen können dank des Resistenzgens im Neomycin oder G418 enthaltenden Nährmedium nur die Zellen überleben, bei denen die Transfektion erfolgreich war. Dies erleichtert die Selektion

dieser Zellen bei Erfolgsraten von höchstens einigen Prozent erheblich (Gossler *et al.* 1986).



**Abbildung 3: Schema der Knockout-Strategie:**

Oben Aufbau des Wildtyp-Allels, darunter Markierung der homologen Bereiche. In der Mitte Aufbau des Targeting Vektors, unten Aufbau des Knockout-Allels. E = Exon, (E) = Rest eines Exons

Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen sind nicht mehr Teil dieser Arbeit. Der Vollständigkeit halber soll das weitere Vorgehen nach diesen Schritten noch erwähnt werden: Die transfizierten embryonalen Stammzellen werden in Blastozysten injiziert, welche scheinchwangeren Mäusen implantiert werden. Die Blastozysten, welche nun zwei verschiedene Zellpopulationen enthalten, wachsen zu chimären Mäusen heran. Wenn die Keimdrüsen dieser Chimären aus den manipulierten Stammzellen gebildet wurden, können in der nächsten Generation für das untersuchte Gen heterozygote Mäuse gezüchtet werden. Eine Generation später liegt dann die homozygote Knockout-Maus vor (Bradley *et al.* 1984).

Eine andere Methode zur Erstellung von Knockout-Lebewesen wird als "gene trapping" bezeichnet, auch diese Methode wird vor allem an Mäusen verwendet. Beim gene trapping ist jedoch nicht das gezielte Ausschalten eines bestimmten Gens möglich, sondern es wird ungezielt ein beliebiges Gen ausgeschaltet. Der Sinn dieser Methode ist es, auf einfache Weise eine Knockout-Maus zu erhalten, das ausgeschaltete Gen und seine Funktion können dann in weiteren Schritten genauer bestimmt und charakterisiert werden. Auch beim gene trapping wird ein Targeting Vektor verwendet. Dieser beinhaltet keine homologen Bereiche, sondern nur neben einer Splice-Akzeptor-

Sequenz und einem Reporter gen dahinter eine Stopsequenz, um die Transkription zu beenden. Wenn dieser Targeting Vektor in das Intron eines Gens inseriert, werden bei der mRNA-Bildung nach normaler Transkription der 5'-Anteile des Reporter gens und die Stopsequenz transkribiert. Statt des funktionsfähigen Proteins werden also ein potentiell funktionsloses Anfangsstück dieses Proteins sowie das Reporterprotein gebildet. Welches Gen ausgeschaltet wurde, kann nun durch Sequenzierung von der bekannten Targeting-Vektor-Sequenz aus bestimmt werden (Stanford *et al.* 2001).

Bei Genen, die schon früh in der Embryonalentwicklung aktiv sind, ist die Erstellung einer Knockout-Maus häufig dadurch erschwert, dass das Ausschalten solcher Gene zu einem Absterben des Embryos führt. Eine Möglichkeit, das Zielgen erst später in der Entwicklung auszuschalten, ist die Verwendung des Cre-*loxP*-Systems. *LoxP* ist der Name einer bestimmten, 34 bp langen Sequenz aus dem Bakteriophagen P1. Cre (Cyclization recombinase) ist eine DNA-Rekombinase, die in der Lage ist, zwei *loxP*-Sequenzen und die daran angrenzenden Sequenzen miteinander zu verknüpfen. Wenn nun ein Zielgen von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert ist, verknüpft Cre diese beiden Sequenzen und schneidet dabei das Zielgen aus. Je nachdem, wann und wie Cre aktiviert wird, kann man die Wildtyp-Maus in eine Knockout-Maus umwandeln. Zur Nutzung des Cre-*loxP*-Systems muss man durch Kreuzung einer Cre-Mauslinie mit einer Mauslinie, die das von *loxP* flankierte Zielgen enthält, beide Gene in einer Maus kombinieren. Verschiedene Manipulationsmöglichkeiten erhält man durch unterschiedliche Cre-Varianten. Neben gewebespezifischer Cre-Aktivität, die durch einen gewebespezifischen Promotor gesteuert wird, ist auch ein induzierbarer Promotor möglich, der Cre erst nach Gabe eines natürlicherweise nicht im Körper vorkommenden Stoffes aktiviert (Gu *et al.* 1994; Metzger und Chambon 2001).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Substanz	Hersteller
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$	PerkinElmer (Rodgau, Deutschland)
Agarose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agar-Pulver	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
(Bacto-)Trypton	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma (München, Deutschland)
H <sub>2</sub> O	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Aqua ad injectabilia	
Aqua ddest.	aus Universitätsklinikum-eigener Produktion
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycin	Sigma (München, Deutschland)
KCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB Broth (Lennox)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MgCl <sub>2</sub>	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MgSO <sub>4</sub>	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)	Sigma (München, Deutschland)

	Inhaltsstoffe	Herstellung / sonstiges
Agarosegel für Elektrophorese	20 ml 50x TAE 980 ml H <sub>2</sub> O 10 g Agarose 60 µl 1 % Ethidiumbromid	aufkochen und dann bei ungefähr 80 °C lagern
LB-Medium	20 g LB Broth (Lennox) H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	bei Verwendung als Bakteriennährlösung zusätzlich Zugabe von Ampicillin oder Kanamycin
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	Ziel-pH 6,7-7
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) 50x Grundlösung	242 g Tris 57,1 ml Eisessig (1 M) 100 ml EDTA (500 mM, pH 8) H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	
Bakteriennährböden (für 40 Petrischalen)	20 g LB-Broth (Lennox) 12 g Agar-Pulver (entspricht 1,5 %) 800 ml H <sub>2</sub> O	autoklavieren, bei einer Temperatur von ca. 40 °C 800 µl Ampicillin oder Kanamycin hinzugeben, steril in Petrischalen füllen, 20 ml pro Petrischale, festwerden lassen, dann im Kühlschrank lagern

### 2.1.2 Biologisches Material

Vektoren	Herkunft
pCR-2.1-TOPO® Vektor. Größe 3931 bp, enthält das <i>lacZ</i> -Gen sowie Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin	Invitrogen (inzwischen Life Technologies, Carlsbad, USA)
pCR-XL-TOPO® Vektor. Größe 3519 bp, enthält das <i>lacZ</i> -Gen sowie ein Resistenzgen gegen Kanamycin	Invitrogen (inzwischen Life Technologies, Carlsbad, USA)
pHM2 Vektor. Größe 8451 bp, enthält das <i>lacZ</i> -Gen sowie Resistenzgene gegen Ampicillin und Neomycin	beschrieben von Kaestner <i>et al.</i> 1994

Genomische Maus-DNA	Herkunft
Mausstamm 129/SV, DNA aus R1 ES-Zellen hergestellt	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Attila Braun, Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin (Würzburg, Deutschland)

Bakterien	Herkunft
chemisch kompetenter E. coli-Stamm OneShot® TOP10F'	Invitrogen (inzwischen Life Technologies, Carlsbad, USA)
ultrakompetenter E. coli-Stamm XL10-Gold®	Stratagene (Heidelberg, Deutschland; inzwischen Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Primer	Herkunft
Design	online mit dem Programm Primer3 ( <a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a> )
Synthese	TIB Molbiol (Berlin, Deutschland)

Größenmarker für Elektrophorese	Herkunft
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

DNA-Polymerase	Herkunft
Advantage 2 Polymerase Mix mit Advantage 2 SA PCR Buffer	Clontech (Takara Bio, ehemals BD Biosciences)

Restriktionsenzyme	Herkunft
EcoRI, NotI, SalI sowie passende Puffer "o" und "EcoRI-Puffer"	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
BglII, HindIII, MfeI, NotI, SacII, SmaI, SnaBI, XbaI sowie passende Puffer "2", "3" und "4"	NEB (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland)

### 2.1.3 Kits

	Kit	Hersteller
DNA-Extraktion aus Agarosegel	NucleoTrap® Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
DNA-Ligation	Quick Ligation Kit	NEB (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland)
T/A-Klonierung	TOPO® TA Cloning Kit sowie TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen (inzwischen Life Technologies, Carlsbad, USA)
Plasmidpräparation	NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit, NucleoSpin® Plasmid Kit, NucleoBond® AX Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
	PureYield Plasmid Midiprep System	Promega (Mannheim, Deutschland)
	QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Radioaktiv labeln	Prime-It® II Random Primer Labeling Kit	Stratagene (Heidelberg, Deutschland; inzwischen Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

### 2.1.4 Geräte

PCR-Thermocycler	Mastercycler® 5333	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Elektrophoresekammern		institutseigene Werkstatt sowie Biometra (Göttingen, Deutschland)
UV-Lampe	UV-Transilluminator UV-Star	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Brutschrank	BE 30	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Shaker	Certomat®	Braun Biotech (Melsungen, Deutschland)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Zentrifuge Super T21	Sorvall (Bad Homburg, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerasekettenreaktion

#### 2.2.1.1 Grundlagen

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie verwendet, um gezielt genomische DNA-Abschnitte für die homologen Bereiche sowie als Nachweissonden zu erhalten. Die Festlegung des gewünschten Abschnittes geschieht durch die Wahl der Primer.

Zur Durchführung der PCR wird zunächst ein Reaktionsansatz zusammengestellt. Dieser enthält:

- die Ausgangs-DNA (Template), aus der ein Abschnitt vervielfältigt werden soll
- spezifische Primer. Dies sind kurze (20-30 bp) Nukleotidstücke, die zum Anfang und zum Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes komplementär sind und als Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase dienen.
- einzelne freie Desoxyribonukleotide als Grundsubstanz für die Herstellung der Kopien
- eine DNA-Polymerase, die zu den vorhandenen DNA-Einzelsträngen den komplementären Gegenstrang synthetisiert. Die Polymerase muss hitzestabil sein, um die wiederholten Denaturierungsschritte zu überstehen. Meist wird daher Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet.
- einen Reaktionspuffer, um die für die DNA-Polymerase nötigen Umgebungsparameter, wie zum Beispiel Ionenkonzentration und pH-Wert, zu erreichen
- steriles und entionisiertes Wasser als Reaktionsmedium

Die Zusammenstellung erfolgt auf Eis, um eine vorzeitige Reaktion der Komponenten sowie mögliche Qualitätseinbußen zu verringern.

Die Polymerasekettenreaktion selbst wird heutzutage in Thermocyclern durchgeführt, die die folgenden Schritte nach einem vorher einprogrammierten Schema vollautomatisch durchführen.

Es wird mit einem einmaligen Initialisierungsschritt begonnen, der einem verlängerten Denaturierungsschritt entspricht. Die folgenden Schritte werden dann vielfach wiederholt:

1. Im Denaturierungsschritt kommt es durch Erhitzen des Reaktionsansatzes (auf meist 95 °C) zu einem Aufbrechen der DNA-Doppelstränge, so dass im Anschluss DNA-Einzelstränge vorliegen.
2. Während des Annealingschritts lagern sich die Oligonukleotidprimer an die DNA-Abschnitte auf den Einzelsträngen an (Primerhybridisierung), zu denen sie die komplementäre Sequenz enthalten. Die Temperatur dieses Schrittes hängt von Länge und Sequenz der eingesetzten Primer ab und liegt zwischen 58 und 70 °C.
3. Bei der Elongation, die im Temperaturoptimum der DNA-Polymerase (meist 68-70 °C) geschieht, bindet letztere zunächst an die mit dem DNA-Einzelstrang verbundenen Primer. Von diesen ausgehend wird nach der Sequenz der Original-DNA unter Verwendung der im Reaktionsmedium frei verfügbaren einzelnen Desoxyribonukleotide der DNA-Gegenstrang synthetisiert. Die zeitliche Länge dieses Reaktionsschritts muss der Länge des gesuchten DNA-Abschnitts entsprechen, um ein unvollständiges Kopieren zu verhindern.

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation werden in dieser Reihenfolge 30-40 mal wiederholt. Bei jeder Wiederholung verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Stränge, so dass beim nächsten Durchgang doppelt so viele Ausgangseinzelstränge vorliegen, die kopiert werden können. Die Gesamtzahl der DNA-Stränge beträgt somit  $2^{(\text{Anzahl der Durchgänge})}$  mal Anzahl der Ausgangsstränge. Nach 30 Durchgängen werden aus jedem Ausgangsstrang etwas mehr als eine Milliarde ( $2^{30}$ ) Stränge.

Abschließend wird der Reaktionsansatz auf 4-8 °C herunter gekühlt, um weitere unerwünschte Reaktionen zu verringern.

### **2.2.1.2 Primerauswahl**

Die für eine erfolgreiche PCR notwendige Voraussetzung ist die Auswahl geeigneter Primer. Primer sind künstlich hergestellte Oligonukleotide einer Länge von 20-30 bp, die komplementär zu den an den Enden des gewünschten DNA-Abschnittes gelegenen

Basensequenzen sind. Die Primer dienen als Ansatzpunkt für DNA-Polymerasen, die von den Primern aus den Komplementärstrang synthetisieren.

Es ist darauf zu achten, dass die von einem Primer erkannte Sequenz innerhalb der eingesetzten Template-DNA nur einmalig vorkommt, um die Vervielfältigung eines falschen DNA-Abschnittes zu verhindern. In der Primersequenz selbst dürfen keine zueinander komplementären Sequenzen vorliegen, da die Primer sonst untereinander hybridisieren. Außerdem sollten beide in einer PCR eingesetzten Primer eine ähnliche Schmelztemperatur haben, damit sie gleichmäßig gut an die DNA binden. Die Schmelztemperatur eines Primers ist von seiner Länge und dem Verhältnis der Nukleobasen Guanin und Cytosin zu Thymin und Adenin abhängig.

Die für die Polymerasekettenreaktionen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3 designt (Rozen und Skaletsky 2000). Zusätzlich wurden am 5'-Ende der Primer Schnittstellen für Restriktionsenzyme hinzugefügt, die späteren Umklonierungen dienen sollen. Die so gewählten Primer wurde von einem kommerziellen Hersteller (TIB Molbiol) bezogen und lagen als Stammlösung in einer Konzentration von 100 pmol/μl (0,03 μg/μl) vor.

### **2.2.1.3 PCR für die lange Homologie**

Primer PK\_KH\_fw9: 5'-CCgCgg-AgAAAgAAggATAgAAgCgTTgC-3' die ersten 6 Basenpaare dienen zum Einfügen einer SacII-Schnittstelle

Primer PKKH\_BglRv: 5'-TACgTAgAT-CTCTCggTTgAATAAAATCATCC-3' die ersten 9 Basenpaare dienen zum Einfügen einer SnaBI- sowie einer BglIII-Schnittstelle

Reaktionsansatz:

1 μl (= 0,25 μg) Template-DNA (Maus, Stamm 129/SV)

2 μl (= 0,2 nmol) Primer PK\_KH\_fw9

2 μl (= 0,2 nmol) Primer PKKH\_BglRv

1 μl dNTP-Nukleotid-Mix

1 μl Advantage 2 Polymerase Mix

5 μl 10-fach Advantage 2 SA PCR Buffer

H<sub>2</sub>O ad 50 μl (38 μl)

Amplifikationsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung	95 °C	1 Minute	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	30
Annealing	60 °C	30 Sekunden	
Elongation	68 °C	10 Minuten	
finale Elongation	68 °C	3 Minuten	1

#### 2.2.1.4 PCR für die kurze Homologie

Primer PK\_LH\_fw1: 5'-gTCgACACgTg-ACTCCACCCAAAgAgACCAA-3', die ersten 11 Basenpaare dienen zum Einfügen von Schnittstellen für SalI und PmlI

Primer PKLH\_rev11: 5'-CCAggAAAggTTATAACATTTgAAATg-3', die für die Umklonierung benötigte NotI-Schnittstelle liegt im Vektor pCR-XL-TOPO® 30 bp von der Insertionsstelle entfernt

Reaktionsansatz:

1 µl (= 0,25 µg) Template-DNA (Maus, Stamm 129/SV )

2 µl (= 0,2 nmol) PKLH\_fw1

2 µl (= 0,2 nmol) PKLH\_rev11

1 µl dNTP-Nukleotid-Mix

1 µl Advantage 2 Polymerase Mix

5 µl 10-fach Advantage 2 SA PCR Buffer

H<sub>2</sub>O ad 50 µl (38 µl)

Amplifikationsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung	95 °C	1 Minute	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	35
Annealing	60 °C	1 Minute	
Elongation	68 °C	3 Minuten	
finale Elongation	68 °C	3 Minuten	1

### 2.2.1.5 PCR für die Sonde zum Nachweis der langen Homologie

Primer PK\_KH\_fw: 5'-CCgCgg-CATCTTCATgTgAAgACTCCC-3' , die ersten 6 Basenpaare dienen zum Einfügen einer SacII-Schnittstelle

Primer PK\_KH\_rev: 5'-TACgTA-CACTCggTTgAATAAAATCATCC-3', die ersten 6 Basenpaare dienen zum Einfügen einer SnaBI-Schnittstelle

Reaktionsansatz:

2 µl (= 0,5 µg) Template-DNA (Maus, Stamm 129/SV)

2 µl (= 0,2 nmol) PK\_KH\_fw

2 µl (= 0,2 nmol) PK\_KH\_rev

1 µl dNTP-Nukleotid-Mix

1 µl Advantage 2 Polymerase Mix

5 µl 10-fach Advantage 2 SA PCR Buffer

H<sub>2</sub>O ad 50 µl (37 µl)

Amplifikationsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung	95 °C	1 Minute	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	30
Annealing	60 °C	1 Minute	
Elongation	68 °C	1 Minute	
finale Elongation	68 °C	1 Minute	1

### 2.2.1.6 PCR für die Sonde zum Nachweis der kurzen Homologie

Primer PKLH\_BglF1: 5'-TgTTTTTACgTCCTTCATTCCgTAg-3'

Primer PKLH\_rev11: 5'-CCAaggAAAaggTTATAACATTTgAAATg-3'

Reaktionsansatz:

0,2 µl (= 0,5 µg) Template-DNA (Maus, Stamm 129/SV)

2 µl (= 0,2 nmol) PKLH\_BglF1

2 µl (= 0,2 nmol) PKLH\_rev11

1 µl dNTP-Nukleotid-Mix

1 µl Advantage 2 Polymerase Mix  
 5 µl 10-fach Advantage 2 SA PCR Buffer  
 H<sub>2</sub>O ad 50 µl (38,8 µl)

Amplifikationsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung	95 °C	1 Minute	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	30
Annealing	60 °C	1 Minute	
Elongation	68 °C	1 Minute	
finale Elongation	68 °C	1 Minute	1

2.2.1.7 PCR für die DNA-Sonde zur Genotypisierung der Stammzellen

Primer PK\_KH\_fw10: 5'-AAgTACTgCTCTACAaggATggAAAgAC-3'

Primer PKXPKH\_rv9: 5'-ACATgAAgCCAAAATgTCAgTACATAA-3'

Reaktionsansatz:

1 µl (= 0,25 µg) Template-DNA (Maus, Stamm 129/SV)  
 2 µl (= 0,2 nmol) PK\_KH\_fw10  
 2 µl (= 0,2 nmol) PKXPKH\_rv9  
 1 µl dNTP-Nukleotid-Mix  
 1 µl Advantage 2 Polymerase Mix  
 5 µl 10-fach Advantage 2 SA PCR Buffer  
 H<sub>2</sub>O ad 50 µl (35 µl)

Amplifikationsprotokoll:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialisierung	95 °C	1 Minute	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	30
Annealing	58 °C	30 Sekunden	
Elongation	68 °C	1 Minute	
finale Elongation	68 °C	1 Minute	1

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese dient der Auftrennung von unterschiedlich geladenen elektrischen Teilchen. In einem für die zu untersuchenden Stoffe teildurchlässigen Trägermaterial (Gelmatrix) bewegen sich unterschiedlich geladene und unterschiedlich große Teilchen unterschiedlich schnell entlang eines elektrischen Feldes. Je nach Molekülgröße der zu untersuchenden Stoffe stehen verschiedene Trägermaterialien mit unterschiedlicher Porengröße zur Verfügung. Für DNA-Auftrennungen wird zumeist Agarose-Gel verwendet. Die negativ geladenen DNA-Stücke bewegen sich entlang des elektrischen Feldes in Richtung auf die positive Anode. Kürzere DNA-Stücke bewegen sich schneller voran, da sie die Poren der Gelmatrix leichter durchdringen können als große DNA-Stücke. Alle DNA-Stücke gleicher Größe wandern mit der gleichen Geschwindigkeit, so dass sich im Verlauf der Elektrophorese eng begrenzte Banden entlang der Laufrichtung bilden, die sich von den DNA-Stücken anderer Größe und somit unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit deutlich abheben. Je höher die Spannung des angelegten elektrischen Feldes ist, desto schneller wandert die DNA durch das Feld, gleichzeitig nimmt jedoch die Unschärfe der einzelnen Banden durch Erhitzung des Gels und dadurch entstehende Inhomogenitäten der Matrix zu.

Eine Elektrophoresekammer besteht aus einer mit Pufferlösung gefüllten Wanne, in der die Gelmatrix mit den zu untersuchenden Stoffen liegt.

Die Gelmatrix besteht aus Pufferlösung, welches mit Agarose aufgekocht wird. Beim Erkalten bildet sich das halbfeste Gel. Zusätzlich wird Ethidiumbromid hinzugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Stränge und führt zu einem Aufleuchten unter ultraviolettem Licht. Beim Gießen des Agarosegels werden Formen verwendet, die an einer Seite des Gels Vertiefungen zum Einbringen der aufzutrennenden DNA hinterlassen.

Nachdem die DNA-Gemische in die Vertiefungen des Gels eingebracht wurden, wird das elektrische Feld angelegt. Nach Ablauf der vorgegebenen Zeit wird das Gel unter ultraviolettem Licht betrachtet. Das im Gel vorhandene Ethidiumbromid macht die DNA-Banden sichtbar.

Durch parallele Elektrophorese eines Gemisches aus DNA-Stücken bekannter Größe lässt sich die Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente abschätzen. Diese Elektrophorese-Marker-Gemische sind kommerziell erhältlich.

Verwendete Parameter in dieser Arbeit:

Pufferlösung: Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

Agarosekonzentration im Gel: 1 % Agarose

Spannung des elektrischen Feldes: 10-70 V

Dauer der Elektrophorese: je nach Spannung 1 Stunde bis 11 Stunden

### **2.2.3 Extraktion von DNA aus Elektrophoresegel**

Um die durch Gelelektrophorese aufgetrennten und nach Größe identifizierten DNA-Stücke weiterverarbeiten zu können, ist eine Extraktion derselben aus dem Agarosegel notwendig.

Zunächst wird der Gelabschnitt mit der gewünschten Bande mit einem sauberen Skalpell möglichst genau aus dem gesamten Gel ausgeschnitten. Zur weiteren Extraktion wird das kommerziell erhältliche NucleoTrap© Kit verwendet, dessen Protokoll hier wiedergegeben wird:

Nach Wiegen des Gelstücks wird dies in einem Mikro-Reaktionsgefäß in eine gewichtsadaptierte Menge NT1-Lösung eingebracht. Nach gründlichem Mischen wird NucleoTrap© suspension hinzugefügt. Bei 50 °C löst sich das Gel innerhalb von 5-10 Minuten bei gelegentlichem Mischen auf. Nach der Zentrifugation bei 10000 g für 30 Sekunden wird der Überstand verworfen. Im folgenden ersten Waschschrift wird Puffer NT2 hinzugefügt, das Niederschlagspellet wird durch Mischen gelöst und es wird wieder bei 10000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Wieder wird der Überstand verworfen und der Waschschrift wird zweimal mit dem Puffer NT3 wiederholt. Nach dem Verwerfen des letzten Überstands lässt man den Niederschlag bei Raumtemperatur trocknen. Das trockene Pellet wird im Elutionspuffer NE gelöst und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10000 g ist die DNA im Überstand enthalten und wird in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen.

#### **2.2.4 T/A-Klonierung**

Die durch PCR gewonnenen DNA-Fragmente müssen in ein Vektorplasmid kloniert werden, damit eine Transformation in Bakterien und eine Vervielfältigung des DNA-Materials erfolgen kann. Die bei der PCR verwendete Taq-Polymerase fügt am Schluss des Replikationsvorgangs ein einzelnes Adenin an das 3'-Ende des neuen Strangs an. Diese A-Überhänge an beiden Enden des DNA-Fragments können mit Thymin an den 3'-Überhängen linearisierter spezieller T/A-Klonierungs-Vektoren hybridisieren. Nach einem Ligationsschritt ist somit die gewünschte DNA in den Vektor inseriert. Im Anschluss daran sollte direkt die Transformation in Bakterien erfolgen. Die beiden verwendeten Kits werden im Folgenden beschrieben:

##### **2.2.4.1 TOPO® TA Cloning® Kit**

Dieses Kit ist für kleinere DNA-Fragmente geeignet. 4 µl des PCR-Produkts werden mit 1 µl salt solution und 1 µl des Vektors pCR-2.1-TOPO® gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Insertion des DNA-Fragments in den linearisierten T/A-Vektor zu erreichen. Die Ligation der überhängenden Enden wird durch eine an den TOPO-Vektor gebundene DNA-Topoisomerase I erreicht. Danach wird das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt.

##### **2.2.4.2 TOPO® XL Cloning® Kit**

Dieses Kit ist für größere DNA-Fragmente geeignet. 4 µl des PCR-Produkts werden mit 1 µl des Vektors pCR-XL-TOPO® gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier wird die Ligation durch eine an den Vektor gebundene DNA-Topoisomerase I erreicht. Nach der Inkubationszeit wird 1 µl stop solution hinzu gemischt und das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt.

### **2.2.5 Transformation von Plasmiden in E. coli**

Die Eigenschaft einiger Bakterienarten, fremde DNA, wie zum Beispiel ein Vektorplasmid, aus ihrer Umgebung aufzunehmen, wird als Kompetenz bezeichnet. Escherichia coli ist nicht natürlich kompetent, kann jedoch durch eine Behandlung mit Calciumchlorid oder Magnesiumchlorid und einen anschließenden Hitzeschock kurzzeitig kompetent gemacht werden.

Zunächst werden die zu transformierenden Bakterien auf Eis aufgetaut. Beim Stamm XL10-Gold® werden die Bakterien zunächst mit 4 µl β-Mercaptoethanol pro 100 µl Bakterien für 10 Minuten auf Eis inkubiert, beim Stamm TOP10F' ist dies nicht nötig. Nach Hinzu mischen des Vektors wird weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock in 42 °C warmem Wasser für 30 Sekunden und weiteren 2 Minuten auf Eis. Das Bakterienmedium wird mit vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und man lässt dies für eine Stunde bei 37 °C schütteln. Nach Auftragen auf einen Nährboden lässt man die Bakterien bei 37 °C 8-10 Stunden inkubieren, um eine Koloniebildung zu erreichen.

### **2.2.6 Anlegen von Bakterien-Flüssigkulturen**

Zum Anlegen von Bakterienreinkulturen werden monoklonale Kolonien mit einer frischen Pipettenspitze von einem Nährboden aufgenommen und in Falcon Tubes verbracht, die mit 2-5 ml Nährlösung gefüllt sind. Zusätzlich wird der Nährlösung zum Unterdrücken des Wachstums unerwünschter Bakterienstämme ein Antibiotikum zugegeben, gegen das die Bakterien mit transformiertem Vektorplasmid resistent sind. Nach dem Schütteln über 6-8 Stunden bei 37 °C kann entweder eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (miniprep) angeschlossen werden oder die vermehrten Bakterien werden in ein größeres Volumen von 50-500 ml Nährlösung übertragen und wieder für 6-8 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert, um eine Plasmidpräparation in größerem Maßstab (midiprep oder maxiprep) durchzuführen.

### **2.2.7 Blau-weiß-Selektion von transformierten Bakterien**

Die blau-weiß-Selektion dient zur Beurteilung des Erfolgs von TOPO-Ligation und Transformation. Die transformierten TOPO-Vektoren enthalten Gene für Antibiotikaresistenz, so dass Bakterien ohne Vektor auf einem mit Antibiotikum versetzten Nährboden nicht wachsen können. Zusätzlich enthalten die TOPO-Vektoren das für  $\beta$ -Galaktosidase kodierende *lacZ*-Gen. Da die Insertionsstelle für das DNA-Fragment innerhalb des *lacZ*-Gens liegt, wird dieses bei erfolgreicher Insertion zerstört. Bakterien, die nur einen leeren TOPO-Vektor enthalten, können durch ein funktionsfähiges *lacZ*-Gen  $\beta$ -Galaktosidase bilden, wenn die Transkription des Gens durch IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert wird.  $\beta$ -Galaktosidase setzt in Anwesenheit von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) dieses in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol um.

Zur blau-weiß-Selektion werden die transformierten Bakterien auf Nährböden ausgestrichen, auf die zuvor IPTG (10  $\mu$ l entsprechend 2 mg), X-Gal (100  $\mu$ l entsprechend 2 mg) sowie ein zum Vektor passendes Antibiotikum aufgetragen wurde. Bakterien ohne Vektor können durch das Antibiotikum nicht wachsen, wohingegen Bakterien mit leerem TOPO-Vektor durch die auf diesem kodierte Antibiotikaresistenz wachsen, jedoch durch X-Gal-Umsetzung eine Blaufärbung ihrer Kolonien zeigen. Bakterien, die einen TOPO-Vektor mit erfolgreicher Insertion beinhalten, gedeihen dank Antibiotikaresistenz. Durch Zerstörung des *lacZ*-Gens wird X-Gal jedoch nicht umgesetzt und die Kolonien behalten die natürliche weißliche Farbe.

Somit müssen nur die weißen Kolonien weiter untersucht werden.

### **2.2.8 Plasmidpräparation**

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung der Vektorplasmide aus den Bakterien. Sie kann in verschiedenen Größenordnungen durchgeführt werden, die als Minipräparation, Midipräparation oder Maxipräparation (miniprep, midiprep, maxiprep) bezeichnet werden. Je nach Technik wird mit Zentrifugation, Schwerkraft oder Druck gearbeitet und die zeitliche Dauer der einzelnen Schritte variiert, die Grundabläufe sind jedoch identisch.

Zunächst wird die flüssige Bakterienkultur abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von alkalischem Lysepuffer werden die Puffer sanft durchmischt. Dann wird die Mischung bei Raumtemperatur einige Minuten inkubiert. Es kommt zur Lyse der Bakterien. Neutralisationspuffer wird hinzugefügt, nach sanftem Mischen fallen die meisten Bakterienbestandteile aus, die Plasmide bleiben in Lösung.

Die Lösung wird auf eine Bindungssäule gegeben. Die Vektoren binden an die Säule, der Durchfluss wird verworfen. Mittels Waschpuffer werden Säule und Vektor ein- oder mehrmals gewaschen und anschließend getrocknet.

Die Bindungssäule wird mit Elutionspuffer inkubiert und schließlich abzentrifugiert. Der Durchfluss enthält die Vektoren, deren Konzentration je nach Elutionspuffer direkt oder nach erneuter Zentrifugation und Lösen des Pellets in Wasser photometrisch bestimmt werden kann.

#### **2.2.8.1 NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit**

Zunächst werden 1-3 ml der flüssigen Bakterienkultur bei 11000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in Resuspensionspuffer durch Mischen resuspendiert. Nach Zugabe von alkalischem Lysepuffer werden die Puffer sanft durchmischt, dann wird die Mischung bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Es kommt zur Lyse der Bakterien. Neutralisationspuffer wird hinzugefügt und nach sanftem Mischen folgt eine 5-minütige Zentrifugation bei 11000 g. Die Plasmide bleiben in Lösung, die übrigen Bakterienbestandteile fallen aus.

Der Überstand wird auf eine in einem Sammelröhrchen stehende Bindungssäule gegeben. Bei einer Zentrifugation bei 11000 g für 1 Minute binden die Vektoren an die Säule, der Durchfluss wird verworfen. Mittels Waschpuffer werden Säule und Vektor durch 3-minütige Zentrifugation bei 11000 g gewaschen und getrocknet.

Die Bindungssäule wird in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben, mit Elutionspuffer bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert und schließlich für eine Minute bei 11000 g abzentrifugiert. Der Durchfluss enthält die Vektoren, deren Konzentration photometrisch bestimmt werden kann.

### 2.2.9 DNA-Schnitt durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen oder Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die spezifische Nukleotidsequenzen eines DNA-Stranges erkennen und schneiden können. Diese meist 4-8 bp umfassenden Sequenzen sind palindromisch angeordnet und kommen im Genom des jeweiligen Bakteriums nicht vor, so dass die Restriktionsenzyme zur Abwehr von Viren dienen.

Verschiedene Restriktionsenzyme erkennen unterschiedliche Sequenzen und schneiden die beiden DNA-Stränge entweder an der gleichen Stelle, so dass ein glattes Ende (blunt end) entsteht, oder leicht versetzt, so dass ein 3'- oder 5'-Überhang von wenigen Basen entsteht (sticky end). Bei zumindest teilweise bekannter Sequenz des DNA-Stücks können gezielt Restriktionsenzyme ausgewählt werden, die an bestimmten Stellen schneiden. Dieses gezielte Schneiden der DNA wird oft als (Restriktions-)Verdau bezeichnet.

Die zu schneidende DNA wird zusammen mit dem Restriktionsenzym in einen die Funktion des Restriktionsenzym optimierenden Puffer gegeben und, meist bei 37 °C, eine ausreichende Zeit inkubiert.

Falls die von einem bestimmten Restriktionsenzym erkannte Sequenz innerhalb eines DNA-Stückes mehrfach vorkommt oder mehrere Restriktionsenzyme verwendet werden, entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese können durch Elektrophorese getrennt und nachgewiesen werden. Bei Darstellung von Banden in der aufgrund der bekannten Sequenz erwarteten Länge ist eine Identifikation der Fragmente beziehungsweise der Nachweis des Erfolges eines vorangegangenen DNA-Manipulationsschritts möglich.

Enden verschiedener DNA-Fragmente, die den gleichen Überhang haben, können miteinander ligiert werden. Dadurch ist die gezielte Zusammenstellung von DNA-Strängen möglich.

### **2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

Als Ligation wird die durch das Enzym Ligase katalysierte Verknüpfung zweier DNA-Stücke bezeichnet. Diese müssen vorher durch einen Restriktionsverdau linearisiert werden, damit freie Enden für die Reaktion vorliegen. Sowohl DNA-Stücke mit glattem Ende als auch Stücke mit zueinander komplementären überhängenden Enden können ligiert werden.

Der Reaktionsansatz besteht aus einem für die Funktion der Ligase optimierten Puffer, in dem neben der Ligase noch die beiden DNA-Stücke vorhanden sind. Je nach Art der Ligase wird die Ligation bei Raumtemperatur, 37 °C oder anderen Temperaturen durchgeführt, auch die Reaktionsdauer ist unterschiedlich.

Bei der Quick-Ligation wird sogenannte QuickLigase im korrespondierenden QuickLigase-Puffer verwendet, die Reaktionsdauer beträgt lediglich 5 Minuten bei Raumtemperatur.

### **2.2.11 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung dient der genauen Analyse der Nukleotidsequenz eines DNA-Strangs. Im Rahmen dieser Arbeit dient sie der Verifikation von Klonierungsschritten sowie der Feststellung von im Rahmen der Klonierungen aufgetretenen Mutationen.

Die verbreitetste Methode zur DNA-Sequenzierung ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger von 1977. Dabei wird aus der zu untersuchenden DNA zunächst eine PCR mit nur einem einzelnen Primer durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für den neusynthetisierten DNA-Strang liegen die vier Nukleotide (dNTP, Desoxyribonukleotidtriphosphat) vor, zusätzlich wird jedoch in vier verschiedenen Ansätzen jeweils eine geringe Menge der didesoxy-Form (ddNTP, Didesoxyribonukleotidtriphosphat) eines der Nukleotide hinzugegeben. Die Didesoxyribonukleotide besitzen im Vergleich zu den Desoxyribonukleotiden keine Hydroxylgruppe an der 3'-Position. Da diese die Bindungsstelle für das nächste Nukleotid eines DNA-Strangs ist, kommt es beim Einbau eines ddNTP zum Abbruch der synthetisierten Kette.

Im Rahmen der Sequenzierungs-PCR wird also für jede der vier Nukleobasen ein eigener Ansatz benötigt. Bei jedem Kettenverlängerungs-Einzelschritt für das betreffende Nukleotid kann statistisch zufällig statt einem Desoxyribonukleotid das jeweils zugegebene Didesoxyribonukleotid eingebaut werden. Dies führt zum Kettenabbruch, der an jeder Stelle erfolgen kann, an der das betreffende Nukleotid im Ausgangsstrang vorkommt. Es entsteht ein Gemisch aus DNA-Fragmenten, die unterschiedlich lang sind, aber innerhalb eines Ansatzes immer mit dem selben Nukleotid enden. Primer oder ddNTP sind radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch parallele Elektrophorese aller vier Ansätze entsteht durch die Fraktionen unterschiedlich langer DNA-Stücke innerhalb jedes Ansatzes ein Muster, das der Basensequenz der Ursprungs-DNA entspricht und abgelesen werden kann.

Durch die statistische Verteilung des ddNTP-Einbaus und die begrenzte Polymerisationslänge im Rahmen der PCR nimmt die Qualität der Sequenzierung nach mehreren hundert Basenpaaren ab. Zum Sequenzieren längerer DNA-Stränge wird daher ein – zu einem im noch qualitativ sicher sequenzierten Bereich komplementärer – neuer Primer synthetisiert, von dem aus eine Sequenzierung des nächsten Abschnittes erfolgen kann. Da die Sequenzierung des gesamten DNA-Strangs dabei schrittweise statt kontinuierlich erfolgt, wird diese Methode als primer walking bezeichnet.

## **2.2.12 Colony Lift**

### **2.2.12.1 Grundlagen**

Mit Hilfe eines Colony Lifts ist in einem Schritt die Untersuchung einer kompletten, mit vielen Bakterienkolonien bewachsenen Agarplatte auf das Vorhandensein von Klonen mit einer bestimmten DNA-Sequenz möglich. Zunächst werden die Bakterienkolonien ohne Veränderung ihrer Positionen zueinander auf ein Filterpapier übertragen, danach werden die Bakterien zur Freilegung der DNA lysiert. Eine zu der gesuchten Sequenz komplementäre, radioaktiv oder durch Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA-Sonde wird hinzugegeben und hybridisiert nur in den Kolonien, die die gesuchte Sequenz enthalten. Durch Sichtbarmachung der Sonde ist eine Identifizierung von positiv transformierten Kolonien möglich, die dann weiter kultiviert und manipuliert werden können.

### **2.2.12.2 Radioaktives Labeln der Sonde**

5 µl DNA + 10 µl random primers + 19 µl H<sub>2</sub>O werden für 5 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, danach abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Es werden 10 µl 5-fach \*dCTP primer buffer (bestehend aus dATP, dGTP und dTTP), 5 µl [alpha-<sup>32</sup>P]-dCTP sowie 1 µl ExoKlenow-Fragment hinzugegeben und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Mit 2 µl Stop Mix wird die Reaktion gestoppt.

Die Lösung wird durch Zentrifugation über eine Säule (1500 rpm, 3 Minuten bei 65 °C) gesäubert.

### **2.2.12.3 Durchführung**

Auf eine frisch bebrütete Agarplatte mit sichtbaren Bakterienkolonien wird ein Nitrozellulosefilter gelegt, die Lage des Filters wird durch asymmetrisch angeordnete Nadelstiche durch den Filter in den Agar markiert. Der Filter wird wieder abgezogen und die Agarplatte wird ein weiteres Mal inkubiert, um ein Nachwachsen der Bakterienkolonien zu erreichen.

Der Nitrozellulosefilter wird für 5 Minuten auf ein mit einer Denaturierungslösung (0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl) gesättigtes Whatman 3 mm-Papier gelegt, dann für weitere 5 Minuten auf ein mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl + 0,5 M TrisCl, pH 7,4) gesättigtes Whatman 3 mm-Papier. Nachfolgend wird der Filter für wiederum 5 Minuten auf in 2-fach SSC gesättigtes Whatman 3 mm-Papier gelegt und anschließend auf trockenem Whatman 3 mm-Papier bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wird der Filter zwischen zwei trockenen Whatman 3 mm-Papieren für 1-2 Stunden bei 80 °C im Ofen erhitzt.

Der Nitrozellulosefilter wird für 15 Minuten in Church-Puffer geschwenkt und danach für 8-10 Stunden bei 65 °C in mit der radioaktiv markierten Sonde versetztem Church-Puffer geschwenkt.

Die sondenhaltige Flüssigkeit wird abgeschüttet (und der enthaltenen Radioaktivität entsprechend entsorgt), dann folgen zwei Waschschrte für je 30 Minuten in je 30 ml 2-fach SSC.

Die Filtermembran wird trocken gelassen. Dann wird sie auf Whatman-Papier aufgeklebt und für 12 Stunden wird damit ein Film belichtet.

Nach Entwicklung des Filmes können anhand der Markierungen die einer erfolgreichen Hybridisierung und damit einem positiven Bakterienklon entsprechenden Signale den jeweiligen auf der Agarplatte wachsenden Bakterienkolonien zugeordnet werden.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung der kurzen Homologie

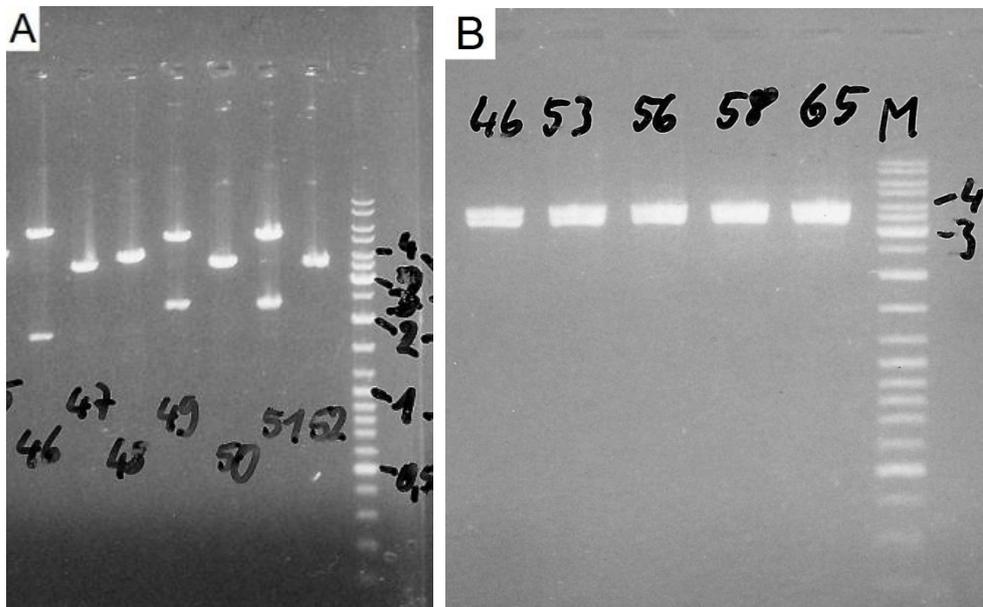
Zunächst wurden anhand der bekannten Sequenz des für Plasmakallikrein codierenden Genes *klkb1* mit Hilfe des Programms Primer3 Primer designt und bei einem kommerziellen Anbieter (TIB Molbiol) bestellt und erworben. Nach 24 erfolglosen Versuchen mit unterschiedlichen Primern und variierenden PCR-Parametern erbrachte die Primerkombination PK\_LH\_fw1 mit PKLH\_rev11 ein positives Ergebnis. Die Gelelektrophorese (Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 11 Stunden über Nacht bei 10 V) zeigte eine einzelne Bande bei ungefähr 4000 bp, passend zur erwarteten Länge von 3834 bp.

Die T/A-Klonierung des DNA-Fragments in den Vektor pCR-XL-TOPO® erfolgte direkt mit 4 µl des PCR-Ansatzes, die Vektoren wurden in *E. coli* des Stammes XL10-Gold® transformiert und auf Agar-Nährböden ausgestrichen. Diese Nährböden waren bereits mit Kanamycin versetzt, zusätzlich wurde vor dem Ausstreichen der Bakterien IPTG und X-Gal hinzugefügt. Die Bebrütung über Nacht bei 37 °C ergab eine große Anzahl von Bakterienkolonien, sowohl blau als auch weiß gefärbt.

Von den weißen Kolonien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten insgesamt mehrere Dutzend ausgewählt und einzeln in je 3 ml mit Kanamycin versetzter LB-Lösung über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die so vermehrten Vektorplasmide wurden durch Minipräparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit isoliert und mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. Nach der aus der Datenbank (NCBI gene) bekannten Gensequenz und der Sequenz des verwendeten Topo-Vektors sollte sowohl im Vektor als auch im Insert jeweils eine Schnittstelle für HindIII vorliegen. Als Zeichen für eine erfolgreiche T/A-Klonierung mit Einbau des DNA-Fragments in der gewünschten Orientierung wurden nach Elektrophorese Banden in den Höhen 1680 bp und 5680 bp erwartet.

In der vierten Analyserunde fanden sich schließlich mehrere Klone mit Banden in diesen Größen. Von diesen wurden zur Kontrolle der eingefügten Restriktionsschnittstellen noch Restriktionsverdaus mit den Enzymen SalI und NotI durchgeführt. Auch diese ergaben das erwartete Ergebnis. Daraufhin wurden zwei der Klone zur Sequenzierung an einen kommerziellen Dienstleister (MWG) geschickt. Klon

Nummer 46 wurde nach Analyse der Sequenziererergebnisse weiter verwendet, da der andere sequenzierte Klon ungünstige Mutationen vorwies.



**Abbildung 4: Restriktionsverdau der kurzen Homologie im Topo-Vektor:**

A: Verdau der Klone 46 bis 52 jeweils mit HindIII; Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

B: Verdau verschiedener Klone jeweils mit SalI+NotI; Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

### 3.2 Klonierung der langen Homologie

Die Primer für die lange Homologie wurden mit dem Programm Primer3 designt und beim kommerziellen Anbieter TIB Molbiol erworben. Der sechste PCR-Versuch war erfolgreich. Mit den Primern PK\_KH\_fw9 und PKKH\_BglRv zeigte sich nach Elektrophorese (Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix) eine einzelne Bande bei ungefähr 6000 bp, passend zur erwarteten Länge des Fragments von 5836 bp.

Die DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem NucleoTrap Kit aus dem Gel extrahiert. Zur T/A-Klonierung wurde der Vektor pCR-XL-TOPO® verwendet. Nach Transformation in *E. coli* vom Stamm XL10-Gold® wurden die transformierten Bakterien auf Kanamycin beinhaltende und mit IPTG sowie X-Gal bestrichene Agarplatten ausgestrichen. Inkubation bei 37 °C für 8 Stunden führte zu einem Wachstum vieler blau oder weiß gefärbter Bakterienkolonien.

Es wurden von einigen der ungefärbten Kolonien Flüssigkulturen zu je 3 ml mit Kanamycin-versetztem LB-Medium angelegt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Minipräparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit und Restriktionsverdau mit HindIII

folgten. Da die HindIII-Schnittstelle im Topo-Vektor einmal und im Insert zweimal vorliegen sollte, waren im Elektrophoresegel nach dem Restriktionsverdau drei Banden zu erwarten. Beim Klon Nummer 14 zeigten sich Banden in den Höhen von ungefähr 800, 2000 und etwas unterhalb von 8000 Basenpaaren. Die theoretischen Größen bei rückwärtiger Insertion des Homologiebereiches in den Topovektor betragen 753 bp, 1905 bp und 6714 bp.



**Abbildung 5: Restriktionsverdaus der langen Homologie im Topo-Vektor:**

Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Verdau von Klon 13 sowie Klon 14 jeweils mit HindIII.

Aus der übriggebliebenen Flüssigkultur des gefundenen Klones wurden großvolumige Kulturen angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Maxipräparation wurde eine größere Menge DNA gewonnen. Mit dieser wurden die für die Umklonierung in den Vektor pHM2 benötigten Restriktionsschnittstellen SacII und SnaBI überprüft.

### **3.3 Klonierung der Nachweissonden**

#### **3.3.1 Klonierung einer Sonde zum Nachweis der langen Homologie**

Ursprünglich war diese Sonde als kurze Homologie geplant und auch mit diesem Ziel kloniert worden. Als nach Generierung eines ersten Targeting Vektors dieser nicht den für die Stammzelltransfektion nötigen Spezifikationen entsprach, wurde der erste Targeting Vektor verworfen. Die bisherige kurze Homologie wurde deutlich verlängert und somit zur neuen langen Homologie, die alte lange Homologie wurde als neue kurze Homologie weiterverwendet. Dies ist der Grund dafür, dass in den die lange Homologie betreffenden Abkürzungen meist KH für "kurze Homologie" vorkommt und umgekehrt. Die schon klonierte ehemalige kurze Homologie wurde aufgrund der für eine Hybridisierung günstigen Größe als Sonde zum Nachweis der nun langen Homologie verwendet. Die Sonde umfasst die ersten 686 bp der 5836 bp großen langen Homologie.

Als ich zu Beginn meiner Doktorarbeit das hier vorgestellte Thema übernahm, waren als Vorarbeit von Melanie Ullrich bereits Primer für diesen Genabschnitt ausgewählt und erworben worden. Nach PCR und Elektrophorese (1 Stunde bei 60 V) zeigte sich eine einzelne Bande bei knapp 700 bp, erwartet wurde eine Länge von 686 bp. 4 µl des PCR-Produkts wurden ohne weiteren Aufreinigungsschritt mit dem TOPO® TA Cloning® Kit in den Vektor pCR-2.1-TOPO® kloniert und in E. coli des Stammes OneShot® TOP10F' transformiert. Diese Bakterien wurden auf mit IPTG sowie X-Gal bestrichene und Ampicillin beinhaltende Agar-Nährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

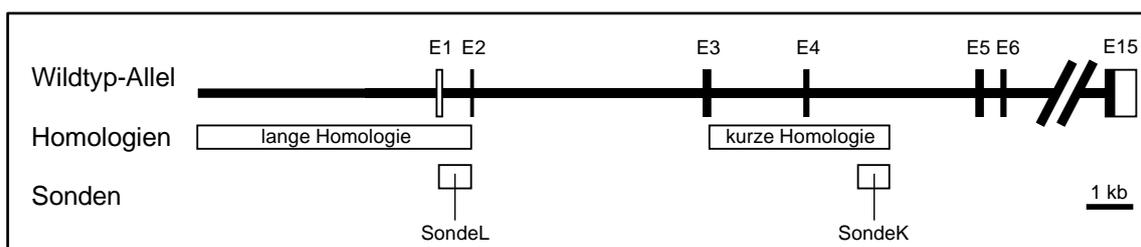
Am Folgetag waren sowohl weiße als auch blaue Kolonien sichtbar, zwölf der weißen Kolonien wurden isoliert und in je 3 ml mit Ampicillin versetztem LB-Medium wiederum bei 37 °C über Nacht inkubiert. Es folgte eine Minipräparation mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit. Ein Teil der gewonnenen Plasmide wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Zwei Schnittstellen für EcoRI flankieren im pCR-2.1-TOPO® Vektor die T/A-Klonierungsstelle, so dass ein gezieltes Ausschneiden des Inserts möglich ist. Die Agarose-Gelelektrophorese zeigte einen erfolgreichen Einbau in 9 der 12 untersuchten Klone, zwei davon wurden von Sabine Herterich aus unserem Institut sequenziert. Bei Klon Nummer 3 waren sowohl die zur weiteren

Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen als auch die fast vollständig sequenzierte Basensequenz fehlerfrei.

Für die Verwendung als Nachweissonde war eine radioaktive Markierung notwendig. Bei der Erstellung der radioaktiven Sonde wurde  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  verwendet. Die Halbwertszeit des  $\beta$ -strahlenden  $^{32}\text{P}$  liegt bei 14,3 Tagen, so dass mehrere Colony Lifts innerhalb weniger Wochen durchgeführt werden konnten.

### 3.3.2 Klonierung einer Sonde zum Nachweis der kurzen Homologie

Aus der Menge der im Rahmen der Klonierung der kurzen Homologie erworbenen Primer wurden die Primer PKLH\_BglF1 und PKLH\_rev11 ausgewählt, die zusammen ein 667 bp langes Fragment ergeben sollten. Im Anschluss an die PCR wurde eine Bande dieser Größe elektrophoretisch nachgewiesen, die aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert wurde. Nach T/A-Klonierung des DNA-Fragments in den Vektor pCR-XL-TOPO® und Transformation in *E. coli* wurden die Bakterien mit IPTG und X-Gal auf Kanamycin-haltige Nährböden ausgestrichen. Die in der blau-weiß-Selektion positiven Klone wurden in Kanamycin-haltigem LB-Medium vermehrt und nach Plasmidpräparation auf positive Insertion der Sondensequenz untersucht. Die aus diesem Klon gewonnene DNA wurde radioaktiv mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  markiert, um als Nachweissonde eingesetzt zu werden.



**Abbildung 6: Position der Nachweissonden in Gen und Homologien:**

SondeL = Sonde in der langen Homologie; SondeK = Sonde in der kurzen Homologie.

### 3.3.3 Klonierung einer Sonde zum Nachweis transfizierter Stammzellen

Die Stammzellen, mit denen eine Transfektion mit dem Targeting Vektor versucht wurde, müssen auf den Erfolg der Transfektion überprüft werden, um positive Stammzellklone zu identifizieren.

Die genomische DNA der Stammzelle wird mit einem Restriktionsenzym verdaut. Durch die veränderte Gensequenz des manipulierten Genes bei erfolgreicher Transfektion ändert sich in diesem Bereich die Länge der beim Restriktionsverdau entstehenden Fragmente. Durch eine Nachweissonde, die sowohl mit dem wildtyp-Gen als auch dem knockout-Gen hybridisiert, kann eines der auf diese Weise veränderten Fragmente sichtbar gemacht werden. Die Sonde muss dazu in dem Bereich des Gens hybridisieren, der an die Homologiebereiche anschließt. Bei größerem Abstand der Hybridisierungsstelle zum Homologiebereich steigt die Gefahr, dass durch eine unerwartete Restriktionsschnittstelle eine Unterscheidung von wildtyp und knockout nicht mehr möglich ist. Eine Hybridisierung in der Homologie würde auch bei einem fehlerhaften Einbau des Targeting Vektors in einem anderen Bereich des Genoms zu einem Signal führen. Eine Hybridisierung zwischen den Homologien könnte das knockout-Gen nicht nachweisen, da dieser Genabschnitt durch die neo-Kassette des Targeting Vektors ersetzt wird. Die außerhalb des Rekombinationsbereichs liegende Restriktionsschnittstelle ist für wildtyp-Allel und knockout-Allel identisch. Die zweite Restriktionsschnittstelle muss bei einem der beiden Allele im Bereich zwischen den Homologien liegen. Beim anderen der Allele darf diese zweite Schnittstelle nicht genauso weit von der ersten Schnittstelle entfernt liegen. Durch die unterschiedliche Lage der Restriktionsschnittstelle zwischen wildtyp-Allel und knockout-Allel bindet die Nachweissonde je nach vorhandenem Allel an unterschiedlich große Fragmente. Bei einer Elektrophorese des mit der Sonde hybridisierten Genoms sind bei heterozygoten Stammzellen zwei Banden zu erkennen, bei homozygoten nur eine einzige.

Die für dieses Projekt gewählte Sonde liegt 84 bp von der langen Homologie entfernt an deren 5'-Ende, also außerhalb des homologen Bereiches. Als Restriktionsenzym für den Nachweis wurde BglII ausgewählt. Die gemeinsame Restriktionsschnittstelle für beide Allele liegt 887 bp von der langen Homologie entfernt an deren 5'-Ende, dies entspricht 173 bp außerhalb der Sondenbindungsstelle. Im knockout-Allel ist die nächste Schnittstelle am 3'-Ende der langen Homologie, wo sie über den bei der PCR verwendeten Primer eingefügt wurde, sie ist 5835 bp vom 5'-Ende entfernt. Im wildtyp-Allel liegt die Schnittstelle zwischen den Homologien, 3976 bp (je nach verwendeter Datenbank auch 4940 bp) vom 3'-Ende der langen Homologie entfernt. Somit beträgt die Länge des Restriktionsfragments beim wildtyp-Allel 10697 bp (oder 11668 bp), beim knockout-Allel 6722 bp.

Bei der Suche nach erfolgreich transfizierten Stammzellen wird also nach einem Stammzellklon gesucht, der bei Restriktionsverdau mit BglIII und nachfolgender Hybridisierung mit der radioaktiv oder fluoreszierend markierten Sonde Banden sowohl bei 10697 bp als auch bei 6722 bp zeigt. Wildtyp-Stammzellen zeigen eine einzelne Bande bei 10697 bp. Im Fall eines knockouts beider Allele einer Stammzelle ist nur eine einzelne Bande bei 6722 bp nachweisbar, dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich.

Nach der Auswahl für die Genotypisierung günstiger Restriktionsschnittstellen wurden entsprechende Primer für diese vor der langen Homologie liegende Sonde erstellt und erworben. Die PCR mit den Primern PK\_KH\_fw10 und PKXPKH\_rv9 sollte ein Fragment mit der Länge 631 bp ergeben, im Agarosegel zeigte sich nach Elektrophorese eine passende Bande oberhalb von 600 bp. Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert, dann in den Topovektor pCR-2.1-TOPO kloniert und in *E. coli* des Stammes XL10-Gold transformiert. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-haltige und mit IPTG und X-Gal versetzte Agarböden ausgestrichen, wo nach Wachstum bei 37 °C viele Kolonien wuchsen. Nach der Inkubation in Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37 °C, Plasmidextraktion sowie Restriktionsverdau mit HindIII zeigten 3 der untersuchten Klone das erwartete Bandenmuster. Einer der positiven Klone wurde in einem größeren Volumen Kanamycin-haltigen LB-Mediums weiter inkubiert und als maxiprep plasmidextrahiert.

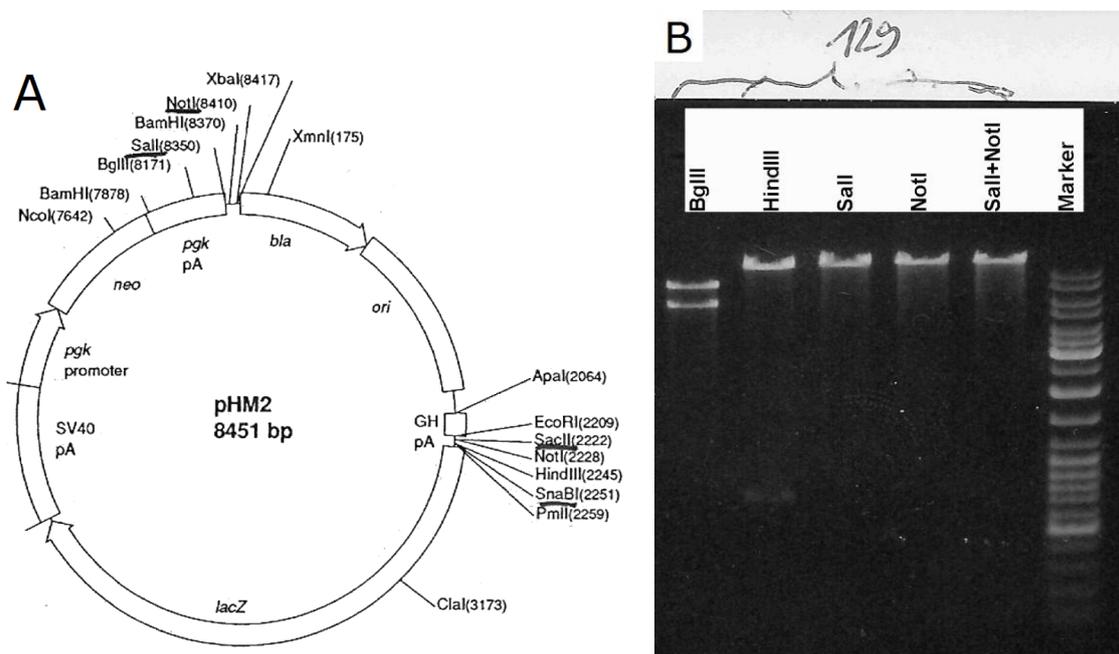
### **3.4 Klonierung der langen Homologie in den pHM2-Vektor**

Als Grundgerüst für den Targeting Vektor wurde der Vektor pHM2 ausgewählt. Dieser hat eine Größe von 8451 bp und enthält neben dem für  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden *lacZ*-Gen Resistenzgene gegen Ampicillin und Neomycin. Die Ampicillinresistenz dient der positiven Selektion von erfolgreich transfizierten Bakterien, die Neomycinresistenz der Stammzellselektion (Kaestner *et al.* 1994).

Jeweils 5  $\mu$ g des Vektors pHM2 sowie des die lange Homologie beinhaltenden Topovektors wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym SacII geschnitten (20 u, Puffer "4", 6 Stunden bei 37 °C), anschließend wurde dem Ansatz SnaBI (10 u) hinzugefügt. Die DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese aufgetrennt. Die lange Homologie mit ungefähr 5850 bp sowie der auf diese Weise linearisierte Vektor pHM2 mit

ungefähr 8420 bp wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eluiert. Durch Quick-Ligation bei Raumtemperatur für 5 Minuten wurden die beiden DNA-Stücke verknüpft, direkt im Anschluss folgte eine Transformation in *E. coli* vom Stamm XL10-Gold®. Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin-haltige Agarnährböden ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet.

Da aufgrund der Fragmentgrößen von einer sehr niedrigen Erfolgsquote von Ligation und Transformation auszugehen war und eine blau-weiß-Selektion nicht möglich war, wurden nach erfolgloser Analyse mehrerer Dutzend Klone zur weiteren Identifizierung positiver Klone Colony Lifts durchgeführt. Es wurde die Sonde für die lange Homologie verwendet. Dabei waren im dritten Durchgang auf den Analysefilmen einige möglicherweise erfolgreich behandelte Klone festzustellen, die nach Plasmidpräparation mit dem Restriktionsenzym BglII geschnitten waren. Drei der Klone zeigten auch nach Verdau mit HindIII, Sall, NotI sowie der Kombination Sall+NotI die erwarteten Bandenmuster, so dass von einer erfolgreichen Klonierung der langen Homologie in den pHM2-Vektor auszugehen war.



**Abbildung 7:**

**A: Ausgangsvektor pHM2**

In dieser Arbeit verwendete Restriktionsschnittstellen unterstrichen. Abbildung aus Kaestner *et al.* 1994.

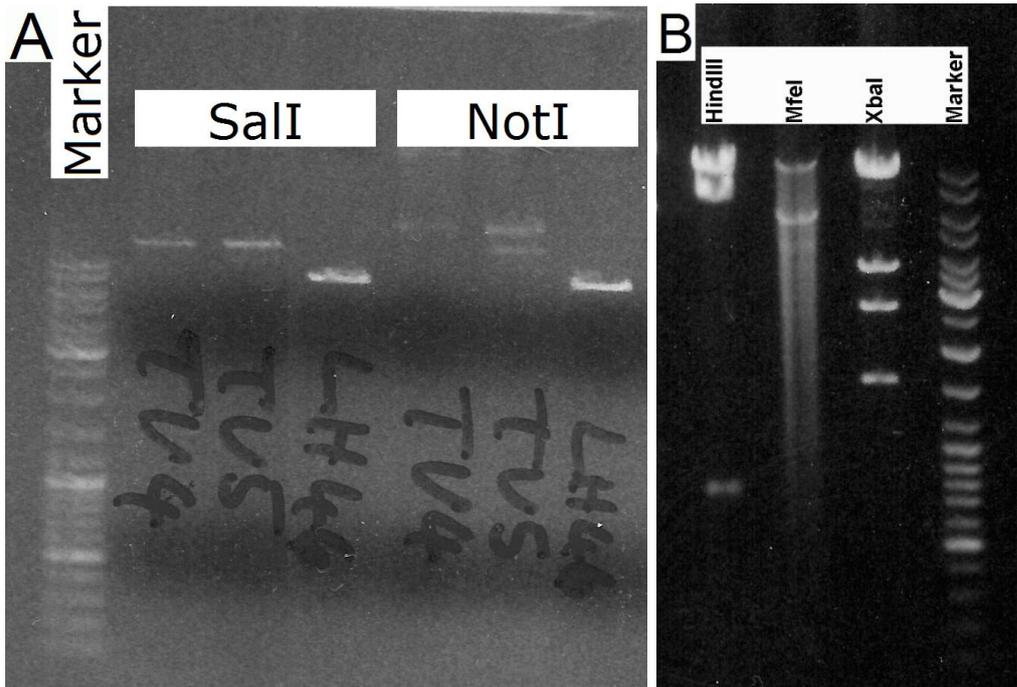
**B: Restriktionsverdau des pHM2-Vektors mit eingebauter langer Homologie, Klon 129:**

Verdau mit BglII, mit HindIII, mit Sall, mit NotI, mit Sall+NotI, Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

### 3.5 Klonierung der kurzen Homologie in den Zwischenschrittvektor

Der im vorherigen Schritt durch Einklonieren der langen Homologie in den Vektor pHM2 geschaffene Zwischenschrittvektor hatte den internen Namen pHM2KH9. Der Name beruht auf dem Grundvektor pHM2 und der internen Abkürzung KH9 für die lange Homologie, die wie in Kapitel 3.3.1 berichtet eigentlich als kurze Homologie geplant war.

Durch Kultivierung der pHM2KH9 enthaltenden Bakterien bei 37 °C in 500 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium und anschließender Plasmidpräparation als maxiprep wurden von zwei Klonen des Vektors 150 beziehungsweise 330 µg Vektor hergestellt. 10 µg von diesem Vektor sowie eine 3 µg der kurzen Homologie entsprechende Menge des die kurze Homologie enthaltenden Vektors wurden mit den Restriktionsenzymen SalI und NotI (Puffer "o", 3 h bei 37 °C) geschnitten. Da die kurze Homologie und der Rest des Vektors ähnliche Größen hatten und so durch Gelelektrophorese nicht sicher getrennt werden konnten, wurde dem Ansatz mit der kurzen Homologie anschließend für weitere 3 Stunden die Restriktionsendonuklease SmaI hinzugefügt, welche den Vektor in zwei kleinere Stücke schnitt. Die Banden mit der kurzen Homologie und dem pHM2KH9-Vektor wurden nach einer Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Es folgten eine QuickLigation der beiden Fragmente sowie eine Transformation in *E. coli*, welche auf Ampicillin-haltige Agarnährböden ausgestrichen wurden. Zur Identifizierung erfolgreich klonierter Bakterienklone wurde ein Colony Lift durchgeführt, bei dem die Sonde für die kurze Homologie verwendet wurde. Die sechs dabei auf dem Röntgenfilm eine Markierung hinterlassenden Klone wurden vereinzelt kultiviert, ein Restriktionsverdau mit SalI und NotI nach Plasmidisolation ergab für die Klone Nummer 4 und 5 das gewünschte Ergebnis. Eine Plasmidpräparation im maxi-Maßstab ergab ungefähr 300 µg Plasmid. Nach Kontrolle durch weitere Restriktionsverdau (HindIII, MfeI, XbaI) wurden beide Klone zum Sequenzieren zu einem kommerziellen Dienstleister geschickt. Bei beiden Klonen wurden nur minimale Abweichungen zur Datenbanksequenz festgestellt, so dass keine Bedenken gegen eine damit durchzuführende Stammzelltransfektion bestehen.



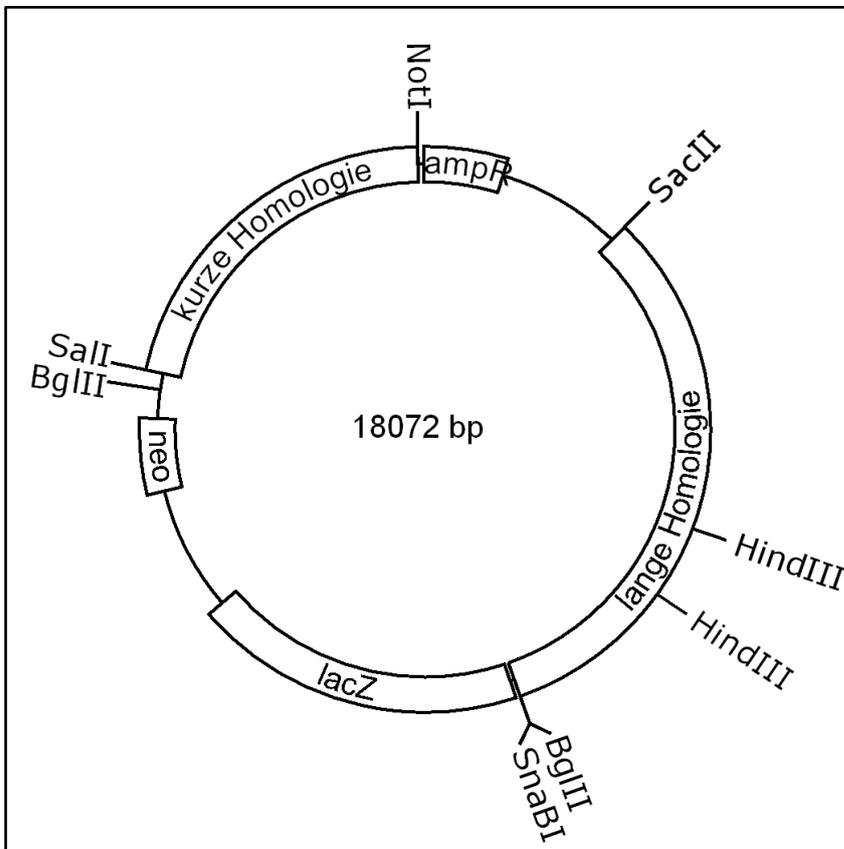
**Abbildung 8: Restriktionsverdau des fertigen Targeting Vektors:**

A: Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Verdau von Targeting Vektor Klon 4, Targeting Vektor Klon 5 und kurzer Homologie jeweils mit SalI und mit NotI.

B: Verdau von Targeting Vektor Klon 4 mit HindIII, MfeI beziehungsweise XbaI, Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

## 4 Diskussion

### 4.1 Aufbau des Targeting Vektors



**Abbildung 9: Aufbau des Targeting Vektors für murines Plasmakallikrein:**

ampR = Ampicillinresistenz, neo = Neomycin-Phosphotransferase, lacZ =  $\beta$ -Galaktosidase, sonstige Abkürzungen = Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

Der im Rahmen dieser Arbeit erstellte Targeting Vektor hat folgenden Aufbau: Er ist im Grundzustand wie jedes Plasmid zirkulär, für die Stammzelltransfektion kann er durch Restriktionsverdau mit NotI linearisiert werden. Eine lange Homologie von 5836 bp Länge und eine kurze Homologie von 3834 bp Länge umfassen die exogene DNA, die in das *klkb1*-Gen inseriert werden soll. Der exogene Abschnitt enthält das *lacZ*-Gen für  $\beta$ -Galaktosidase zur Identifikation und das Gen für Neomycin-Phosphotransferase zur Stammzellselektion. Zwischen kurzer und langer Homologie – also im linearisierten Vektor randständig – ist das  $\beta$ -Laktamase-Gen. Da die dadurch verliehene Ampicillinresistenz nur während der Klonierung des Targeting Vektors benötigt wird, soll das Gen für Ampicillinresistenz nicht in die embryonale Stammzelle inseriert werden. Die randständige Position im linearisierten Vektor führt dazu, dass der betreffende Abschnitt mangels homologer Struktur nicht an die genomische DNA

anlagert und daher während der Insertion nicht mit eingebaut wird. Der Targeting Vektor für murines Plasmakallikrein hat eine Gesamtgröße von 18072 bp. Dabei stehen dem zentralen exogenen DNA-Abschnitt von 6108 bp homologe Bereiche von 9670 bp gegenüber. Die Transfektion embryonaler Stammzellen ist um so erfolgreicher, je größer der homologe Anteil ist (Thomas und Capecchi 1987).

Die homologen Bereiche wurden so gewählt, dass der N-Terminus des Plasmakallikrein-Proteins fehlerhaft ist. Die lange Homologie umfasst den Anfang des Plasmakallikrein-Gens und endet im zweiten Exon. Die kurze Homologie beginnt am Ende des dritten Exons und reicht ins Intron 4/5. Im Targeting Vektor und somit auch im Knockout-Allel fehlen 39 der 59 bp von Exon 2 und 133 der 169 bp von Exon 3, also insgesamt 172 bp. Da der Translationsstart im Exon 2 liegt, fehlen im Knockout-Allel die für Aminosäuren codierenden Basenpaare 20 bis 191. Auf Proteinebene entspricht dies den Aminosäuren 7 bis 64. Da die Aminosäuren 1-19 für das Signalpeptid und die Aminosäuren 21-104 für die erste apple-Domäne codieren, fehlen im Knockout-Allel zwei Drittel des Signalpeptids und eine halbe apple-Domäne. Somit wird erwartet, dass die Translation – falls sie überhaupt startet – nach den ersten sechs Aminosäuren des Signalpeptids abbricht oder in eine funktionslose Sequenz übergeht.

## **4.2 Vergleich Mausmodell und Mensch**

Mit dieser Arbeit wird ein Mausmodell vorbereitet, das nicht nur zur Untersuchung von Funktionsmechanismen des Zielproteins Plasmakallikrein, sondern auch des beim Menschen vorkommenden Zustands der Plasmakallikrein-Defizienz dienen soll. Wie bei jedem solchen Mausmodell ist es daher notwendig, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Spezies zu beachten. Für mehrere Reaktionspartner von Plasmakallikrein existieren bereits Mausmodelle:

Für Faktor XII defiziente Mäuse wurden 2004 erstmals veröffentlicht, sie sind fruchtbar und phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit ist wie bei Faktor XII-defizienten Menschen verlängert und es liegt keine erhöhte Blutungsneigung vor (Pauer *et al.* 2004). Bei betroffenen Menschen wurde eine erhöhte Neigung zu thrombotischen Ereignissen beobachtet. Bei einer nicht genauer bekannten Prävalenz der Faktor XII-Defizienz ist zum jetzigen Zeitpunkt

allerdings nicht beurteilbar, ob es sich wirklich um eine erhöhte Inzidenz der thrombotischen Ereignisse handelt: Die venösen Thrombosen waren in fast allen beschriebenen Fällen auch durch zusätzlich vorliegende weitere Risikofaktoren erklärbar. Das selbe gilt in etwas geringerem Maße auch für die beschriebenen arteriellen thrombotischen Ereignisse. Solche Ereignisse, namentlich Herzinfarkte und Schlaganfälle, treten allerdings auch in der Gesamtbevölkerung sehr häufig auf (Girolami *et al.* 2004; Girolami *et al.* 2011). Überraschenderweise wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass bei Faktor XII-Defizienz die Entstehung arterieller Thromben gestört ist, was ischämische Schlaganfälle zwar nicht verhindert, jedoch zu einem geringeren Infarktareal und einem besseren klinischen Ergebnis führt (Renné *et al.* 2005; Kleinschnitz *et al.* 2006).

Der in der Blutgerinnungskaskade auf Plasmakallikrein und Faktor XII folgende Faktor XI kann ebenfalls genetisch fehlen. Beim Menschen sind mehrere hundert Fälle beschrieben. Die meisten betroffenen Personen gehören zu den Aschkenasim, Juden mit mittel- oder osteuropäischer Herkunft. Der genetische Defekt wurde aber auch in vielen anderen Populationen nachgewiesen (Seligsohn 2009). Faktor XI-defiziente Mäuse existieren seit 1997 (Gailani *et al.* 1997). Sowohl Menschen als auch Mäuse zeigen keine spontanen Krankheitsbilder. Im Gegensatz zur Faktor XII-Defizienz kann man eine leicht erhöhte Blutungsneigung bei Verletzungen und operativen Eingriffen nachweisen. Es besteht durch eine herabgesetzte Thrombusbildung ein gewisser Schutz vor Schlaganfällen bei Menschen und Mäusen (Seligsohn 2009). Im Mausmodell wurde zusätzlich ein besseres Überleben bei Sepsis nachgewiesen (Wang *et al.* 2006; Tucker *et al.* 2008).

Auch für die Bildung von Bradykinin existiert ein Mausmodell. Kininogen wird in der Maus durch zwei verschiedene Gene codiert. Das der Funktion beim Menschen näher stehende Gen *mKng1* wird in der Leber exprimiert, *mKng2* in der Niere. Für *mKng1* defiziente Mäuse wurden 2008 erstellt und sind lebensfähig, es ist weder niedrig- (LMWK) noch hochmolekulares Kininogen nachweisbar und Bradykinin kann von diesen Tieren nicht gebildet werden. Sie weisen eine verlängerte Verschlusszeit bei arteriellen Thromboseversuchen auf, was zu einem verbesserten Überleben im Vergleich zum Wildtyp führt (Merkulov *et al.* 2008). Beim Menschen wurden 1975 unabhängig voneinander drei Patienten beschrieben und bis heute ist nur eine geringe Anzahl vom betroffenen Personen bekannt, denen teilweise nur HMWK (Fitzgerald-

Erkrankung), teilweise HMWK und LMWK (Flaujeac- sowie Williams-Erkrankung) fehlen. Diese Menschen zeigten wie die Mäuse weder Bradykininbildung noch eine erhöhte Blutungsneigung, bei der geringen Personenzahl sind jedoch keine belastbaren Aussagen zu einer vermehrten Erkrankungshäufigkeit möglich (Colman *et al.* 1975; Lacombe *et al.* 1975; Saito *et al.* 1975; Saito 1987).

Dass der bei Kininogen-defizienten Mäusen beobachtete Schutz vor Schlaganfällen tatsächlich auf die fehlende Wirkung von Bradykinin zurückzuführen ist, zeigten Versuche an Mäusen, denen der Bradykinin-2-Rezeptor fehlt. Diese hatten nach künstlichem Verschluss von Hirnarterien im Vergleich zum Wildtyp kleinere Schlaganfallvolumina, weniger motorische Ausfälle und eine höhere Überlebenschance. Auch das sich im Verlauf eines ischämischen Schlaganfalls entwickelnde Hirnödem war bei diesen Mäusen durch die verringerte Gefäßpermeabilität weniger ausgeprägt (Gröger *et al.* 2005).

Diese für die Reaktionspartner des Plasmakallikreins bereits vorliegenden Mausmodelle stimmen also gut mit den entsprechenden Daten von Menschen überein, denen das jeweilige Protein fehlt. Da für Plasmakallikrein nur geringe molekulare Unterschiede zwischen Maus und Mensch bestehen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass eine für Plasmakallikrein defiziente Mauslinie ein geeignetes Modell für menschliche Plasmakallikrein-Defizienz bietet.

### **4.3 Plasmakallikrein und Faktor XII**

Dass Plasmakallikrein und Faktor XII eine gemeinsame Rolle im Organismus spielen, ist an ihrer gegenseitigen Aktivierung gut zu erkennen. Dass diese gemeinsame Aktivierung für die beiden Proteine zu unterschiedlichen Funktionswegen führt – bei Faktor XII Hämostase via Faktor XI, bei Plasmakallikrein Bradykininbildung – wurde bereits genannt. Die Bradykininbildung ist eine nur durch Plasmakallikrein katalysierte Reaktion, die auch ohne Faktor XII abläuft. Aber welche Bedeutung hat die gemeinsame Aktivierung für die Blutgerinnung?

In den letzten Jahren wurden immer mehr Hinweise darauf gefunden, dass die Kontaktphasenaktivierung für die Blutgerinnung nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Statt dessen ist die extrinsische Blutgerinnungskaskade der hauptsächliche Weg zur Fibrinbildung (Maas *et al.* 2011). Da bei Plasmakallikrein-Defizienz der intrinsische Blutgerinnungsweg kaum und bei Faktor XII-Defizienz überhaupt nicht in Gang kommt, müsste man eine erhöhte Blutungsneigung erwarten, was für beide Proteine nicht der Fall ist (Lämmle *et al.* 1991). Da Faktor XI auch über das auf anderem Wege gebildete Thrombin aktiviert werden kann, außerdem Faktor IX vom Tissue Factor-Faktor VII-Komplex, wird im weiteren Verlauf der Gerinnungskaskade ausreichend Substrat für eine Blutstillung gebildet (Gailani und Broze 1991; Kravtsov *et al.* 2009).

Somit muss die Hauptwirkung der beiden Proteine im Organismus außerhalb der Hämostase liegen.

Die gelegentlich beobachteten thrombotischen Ereignisse bei Faktor XII-Defizienz wurden eher anderen Risikofaktoren zugeschrieben. Für Plasmakallikrein-Defizienz liegen zu wenige Fälle vor, um von einem pro- oder antithrombotischen Zustand sprechen zu können (Girolami *et al.* 2011). Die Versuche an Faktor XII-defizienten Mäusen wiederum ergaben einen gewissen Schutz vor arteriellen thrombotischen Ereignissen. Dies entspricht den neueren Erkenntnissen zum Unterschied zwischen Hämostase und Thrombusbildung: Während bei der Hämostase die über Tissue Factor und Faktor VII verlaufende und an subendothelialen Strukturen stattfindende extrinsische Blutgerinnungskaskade ohne Beteiligung von Faktor XII und Plasmakallikrein abläuft, ist beim Größenwachstum von Thromben an Thrombozyten oder Endothel das Kontaktphasensystem mit Plasmakallikrein und Faktor XII notwendig. (Kleinschnitz *et al.* 2006; Gailani und Renné 2007). Somit lautet die vereinfachte Regel "ohne Kontaktphase weniger Thromben". Neben dem schon gezeigten "ohne Faktor XII weniger Thromben" wird erwartet, dass für Plasmakallikrein eine entsprechende Regel "ohne Plasmakallikrein weniger Thromben" besteht.

#### **4.4 Plasmakallikrein-defiziente Mäuse und Ausblick**

In dieser Arbeit wird die Erstellung eines Targeting Vektors für Plasmakallikrein beschrieben, der zur Generierung von Plasmakallikrein-defizienten Mäusen führen soll. Das Mausmodell soll dann zur weiteren Erforschung der Funktionen von

Plasmakallikrein dienen. Mehrere der Plasmakallikrein-defizienten Menschen haben sich bereit erklärt, Blut für wissenschaftliche Untersuchungen zu spenden, doch sind damit nur *in vitro* Studien möglich. Für die medizinisch relevanteren *in vivo* Untersuchungen ist ein Mausmodell nötig. Zunächst sind die schon für die Faktoren XI und XII, Kininogen und Bradykinin durchgeführten (Gröger *et al.* 2005; Renné *et al.* 2005; Kleinschnitz *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006; Merkulov *et al.* 2008) Versuche zur Thrombusbildung und Fibrinolyse im venösen und vor allem im arteriellen System interessant, wo die beiden häufigen Erkrankungen Herzinfarkt und ischämischer Schlaganfall viele Opfer fordern.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Revenko *et al.* bietet einen ersten Ausblick auf die zu erwartenden Ergebnisse: Durch subkutane Injektion von antisense-Oligonukleotiden gegen die mRNA von Plasma-Präkallikrein konnten der mRNA-Spiegel sowie die Plasmakallikreinbildung der behandelten Mäuse um bis zu 92 % gegenüber dem Normalwert gesenkt werden. Diese Mäuse zeigten eine verminderte Thrombusbildung in Vena cava und Arteria mesenterica, jedoch keine verlängerte Blutungszeit bei Schwanzkupierung, also eine Hemmung der Thrombusbildung ohne Beeinträchtigung der Hämostase (Revenko *et al.* 2011).

Da durch die antisense-Oligonukleotide in der genannten Studie nur eine unvollständige Plasmakallikreininhibition erreicht wurde, kann die verwendete Methode ein vollständig defizientes Mausmodell nicht ersetzen.

2011 und 2012 – also nach dem Abschluss der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente – wurden von zwei Arbeitsgruppen Ergebnisse veröffentlicht, die an Plasmakallikrein-defizienten Mäusen generiert wurden. Beide Arbeitsgruppen hatten ihre Knockout-Mäuse unabhängig von dieser Arbeit erstellt.

Die Gruppe von Liu *et al.* untersuchte die Ausdehnung von Hirnblutungen in Abhängigkeit von künstlich induziertem Diabetes mellitus an Ratten und Mäusen. Sie fand heraus, dass die bei Hyperglykämie im Vergleich zu Normoglykämie größere Ausdehnung von Hirnblutungen auf eine von Plasmakallikrein und Bradykinin beeinflusste Hemmung der Plättchenaggregation zurückgeht. Die Knockout-Mäuse wurden vom Texas Institute for Genomic Medicine bezogen, zur Knockout-Strategie liegen keine Angaben vor. Plasmakallikrein konnte in diesen Mäusen weder als mRNA

noch als Protein nachgewiesen werden, wie beim Menschen war die aPTT verlängert im Vergleich zum Wildtyp. Die nur einen geringen Teil der Veröffentlichung umfassenden Versuche ergaben bei diabetischen Plasmakallikrein-defizienten Mäusen eine signifikant geringere Ausdehnung der intracerebralen Hämatomme im Vergleich zu diabetischen Wildtyp-Mäusen (Liu *et al.* 2011).

Bird *et al.* führten eine umfangreiche Charakterisierung von Plasmakallikrein-defizienten Mäusen durch. Die Knockout-Mäuse zeigten keine Auffälligkeiten von Körpergewicht, Blutdruck, Herzfrequenz, Fertilität und solchen Blutanalysen, die außerhalb der Blutgerinnung lagen. Die Prothrombinzeit war wie erwartet normal, die aPTT im Vergleich zum Wildtyp dreifach verlängert. Die Blutungszeit bei Schwanzkupierung war ungefähr verdoppelt, bei künstlich induzierten Nierenblutungen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei Versuchen zur venösen Thrombusbildung betrug das Thrombusgewicht in Knockout-Mäusen nur 53 % im Vergleich zum Wildtyp. Die Untersuchungen zu arteriellen Verschlüssen zeigten die stärksten Unterschiede: Während die Wildtyp-Tiere durch Gabe von 3,5 % FeCl<sub>3</sub> höchstgradige Verschlüsse der A. carotis erlitten, blieb der Blutfluss in den Gefäßen aller Plasmakallikrein-defizienter Tiere normal. Bei Verwendung von fünfprozentigem FeCl<sub>3</sub> war der Unterschied geringer ausgeprägt, jedoch ebenfalls hoch signifikant.

Die Knockout-Strategie von Bird *et al.* bestand aus einem "gene targeting" mit Cre-*lox*-System in mehreren Zwischenschritten. Die mit Hilfe eines Targeting Vektors ersetzten Bereiche umfassen nach Angabe der Autoren die zweite Hälfte von Exon 3 und das Exon 4, da die Zählung der Exons auf einer anderen Datenbank beruht entspricht das in dieser Arbeit den Exons 1 und 2. Dieser Bereich umfasst den Start der Translation des Plasmapräkallikrein-Proteins und die Aminosäuren des Signalpeptids, die für das sezernierte Protein kodierenden Bereiche werden nicht beeinflusst (Bird *et al.* 2012).

Somit liegen nun die ersten Daten an Plasmakallikrein-defizienten Mäusen vor und es sind in näherer Zukunft weitere Ergebnisse zu erwarten. Auch wenn dies für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn sehr erfreulich ist, ist es für die vorliegende Arbeit eher negativ zu werten. Der von Bird *et al.* ausgeschaltete Genbereich von Exon 1 bis 2 liegt nahe dem in dieser Arbeit angegangenen Bereich von Exon 2 bis 3. Beim Fortführen dieser Arbeit ist daher in der Knockout-Maus ein sehr ähnlicher Genotyp zu erwarten, ein den Aufwand rechtfertigender Vorteil ist bislang nicht zu erkennen.

Weitere Untersuchungen an Plasmakallikrein-defizienten Mäusen können Hinweise darauf geben, wie weiteres Wissen über die Rolle von Plasmakallikrein in der Thrombusbildung auch klinische Relevanz erlangen könnte. Idealerweise könnte die Entwicklung und der Einsatz von Substanzen, die die Funktion von Plasmakallikrein beeinflussen, in Prävention und/oder Therapie von Herzinfarkten und Schlaganfällen für Patienten von Nutzen sein.

## 5.1 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Erstellung eines sogenannten "Targeting Vektors" zur gezielten Ausschaltung des Gens für Plasmakallikrein in der Maus, als Vorbereitung zur Schaffung einer Plasmakallikrein-defizienten Mauslinie. Plasmakallikrein ist eine im Blut zirkulierende Serinprotease, die Funktionen in Hämostase, Thrombusbildung und Fibrinolyse hat sowie sowohl direkt als auch indirekt mittels Bradykinin an Entzündungsvorgängen beteiligt ist.

Zwei 5836 und 3834 bp lange Abschnitte aus dem murinen Plasmakallikrein-Gen wurden durch PCR isoliert und in ein Plasmid kloniert, das neben Resistenzgenen gegen Ampicillin und Neomycin auch das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion enthält. Der so entstandene "Targeting Vektor" hat eine Gesamtgröße von 18072 bp, die Basensequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert. Der Vektor soll im Plasmakallikrein-Gen einen Teil der Exons 2 und 3 und damit einen Großteil des Signalpeptids und der ersten Proteindomäne funktionsunfähig machen. An den mit dieser Methode erstellten Knockout-Mäusen können die Funktionen von Plasmakallikrein genauer untersucht werden.

## 5.2 Abstract

This thesis describes the cloning of a targeting vector in the gene targeting strategy for a murine plasma kallikrein (PK) knock-out. PK is a serine protease found in blood which has functions in hemostasis, thrombus formation, fibrinolysis and – both directly and indirectly via bradykinin – inflammation.

Two fragments of the murine PK gene with respective lengths of 5836 and 3834 bp were isolated by PCR and cloned into a plasmid containing resistance genes against both ampicillin and neomycin and the  $\beta$ -galactosidase gene for the detection of transfected cells. The targeting vector has a total size of 18072 bp and was verified by sequencing. The vector should destroy parts of the exons 2 and 3 in the gene for PK and thus the greater part of the signal peptide and the first protein domain. With the knock-out mice created by this means the function of PK can be investigated more thoroughly.

## 6 Literatur

- Beaubien, G., I. Rosinski-Chupin, M. G. Mattei *et al.* (1991). "Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein." Biochemistry **30**(6): 1628-1635.
- Becker, E. L. und L. Kagen (1964). "The Permeability Globulins of Human Serum and the Biochemical Mechanism of Hereditary Angioneurotic Edema." Ann N Y Acad Sci **116**: 866-873.
- Bird, J. E., P. L. Smith, X. Wang *et al.* (2012). "Effects of plasma kallikrein deficiency on haemostasis and thrombosis in mice: Murine Ortholog of the Fletcher Trait." Thromb Haemost **107**(5).
- Bork, K., S. E. Barnstedt, P. Koch *et al.* (2000). "Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women." Lancet **356**(9225): 213-217.
- Bouma, B. N., D. M. Kerbiriou, J. Baker *et al.* (1986). "Characterization of a variant prekallikrein, prekallikrein Long Beach, from a family with mixed cross-reacting material-positive and cross-reacting material-negative prekallikrein deficiency." J Clin Invest **78**(1): 170-176.
- Bowen, B., J. J. Hawk, S. Sibunka *et al.* (2001). "A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations." Clin Immunol **98**(2): 157-163.
- Bradley, A., M. Evans, M. H. Kaufman *et al.* (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature **309**(5965): 255-256.
- Chung, D. W., K. Fujikawa, B. A. McMullen *et al.* (1986). "Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats." Biochemistry **25**(9): 2410-2417.
- Cicardi, M., L. Bergamaschini, B. Marasini *et al.* (1982). "Hereditary angioedema: an appraisal of 104 cases." Am J Med Sci **284**(1): 2-9.
- Cichon, S., L. Martin, H. C. Hennies *et al.* (2006). "Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III." Am J Hum Genet **79**(6): 1098-1104.
- Cochrane, C. G., S. D. Revak und K. D. Wuepper (1973). "Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein." J Exp Med **138**(6): 1564-1583.
- Colman, R. W., A. Bagdasarian, R. C. Talamo *et al.* (1975). "Williams trait. Human kininogen deficiency with diminished levels of plasminogen proactivator and prekallikrein associated with abnormalities of the Hageman factor-dependent pathways." J Clin Invest **56**(6): 1650-1662.
- Dasanu, C. A. und D. T. Alexandrescu (2009). "A case of prekallikrein deficiency resulting in severe recurrent mucosal hemorrhage." Am J Med Sci **338**(5): 429-430.
- Davie, E. W. und O. D. Ratnoff (1964). "Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting." Science **145**(3638): 1310-1312.
- Derkx, F. H., H. L. Tan-Tjong, A. J. Man in 't Veld *et al.* (1979). "Activation of inactive plasma renin by plasma and tissue kallikreins." Clin Sci (Lond) **57**(4): 351-357.

- Essien, E. M. und M. I. Ebhota (1977). "Fletcher factor deficiency--detection of a severe case in a population survey." Acta Haematol **58**(6): 353-358.
- Fritz, H., B. Brey, A. Schmal *et al.* (1969). "Zur Identität des Progressiv-Antikallikreins mit alpha1-Antitrypsin aus Humanserum." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **350**(12): 1551-1555.
- Gailani, D. und G. J. Broze, Jr. (1991). "Factor XI activation in a revised model of blood coagulation." Science **253**(5022): 909-912.
- Gailani, D., N. M. Lasky und G. J. Broze, Jr. (1997). "A murine model of factor XI deficiency." Blood Coagul Fibrinolysis **8**(2): 134-144.
- Gailani, D. und T. Renné (2007). "Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(12): 2507-2513.
- Girolami, A., E. Allemand, I. Bertozzi *et al.* (2010). "Thrombotic events in patients with congenital prekallikrein deficiency: a critical evaluation of all reported cases." Acta Haematol **123**(4): 210-214.
- Girolami, A., N. Candeo, G. B. De Marinis *et al.* (2011). "Comparative incidence of thrombosis in reported cases of deficiencies of factors of the contact phase of blood coagulation." J Thromb Thrombolysis **31**(1): 57-63.
- Girolami, A., S. Marun, S. Vettore *et al.* (2010). "A large family from Argentina with prekallikrein deficiency due to a compound heterozygosis (T insertion in intron 7 and Asp558Glu in exon 15): prekallikrein Cordoba." Am J Hematol **85**(5): 363-366.
- Girolami, A., M. L. Randi, S. Gavasso *et al.* (2004). "The occasional venous thromboses seen in patients with severe (homozygous) FXII deficiency are probably due to associated risk factors: a study of prevalence in 21 patients and review of the literature." J Thromb Thrombolysis **17**(2): 139-143.
- Gossler, A., T. Doetschman, R. Korn *et al.* (1986). "Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 9065-9069.
- Gröger, M., D. Lebesgue, D. Pruneau *et al.* (2005). "Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab **25**(8): 978-989.
- Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban *et al.* (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." Science **265**(5168): 103-106.
- Harpel, P. C. (1970). "Human plasma alpha 2-macroglobulin. An inhibitor of plasma kallikrein." J Exp Med **132**(2): 329-352.
- Harpel, P. C., M. F. Lewin und A. P. Kaplan (1985). "Distribution of plasma kallikrein between C-1 inactivator and alpha 2-macroglobulin in plasma utilizing a new assay for alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes." J Biol Chem **260**(7): 4257-4263.
- Hathaway, W. E., L. P. Belhasen und H. S. Hathaway (1965). "Evidence for a new plasma thromboplastin factor. I. Case report, coagulation studies and physicochemical properties." Blood **26**(5): 521-532.
- Ichinose, A., K. Fujikawa und T. Suyama (1986). "The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin." J Biol Chem **261**(8): 3486-3489.

- Joseph, K., B. G. Tholanikunnel und A. P. Kaplan (2002). "Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 896-900.
- Kaestner, K. H., L. Montoliu, H. Kern *et al.* (1994). "Universal beta-galactosidase cloning vectors for promoter analysis and gene targeting." Gene **148**(1): 67-70.
- Kaplan, A. P., A. B. Kay und K. F. Austen (1972). "A prealbumin activator of prekallikrein. 3. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein." J Exp Med **135**(1): 81-97.
- Katsuda, I., F. Maruyama, K. Ezaki *et al.* (2007). "A new type of plasma prekallikrein deficiency associated with homozygosity for Gly104Arg and Asn124Ser in apple domain 2 of the heavy-chain region." Eur J Haematol **79**(1): 59-68.
- Kleinschnitz, C., G. Stoll, M. Bendszus *et al.* (2006). "Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis." J Exp Med **203**(3): 513-518.
- Kravtsov, D. V., A. Matafonov, E. I. Tucker *et al.* (2009). "Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of factor XII." Blood **114**(2): 452-458.
- Lacombe, M. J., B. Varet und J. P. Levy (1975). "A hitherto undescribed plasma factor acting at the contact phase of blood coagulation (Flaujeac factor): case report and coagulation studies." Blood **46**(5): 761-768.
- Lämmle, B., W. A. Wuillemin, I. Huber *et al.* (1991). "Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency--a study on 74 subjects from 14 Swiss families." Thromb Haemost **65**(2): 117-121.
- Liu, J., B. B. Gao, A. C. Clermont *et al.* (2011). "Hyperglycemia-induced cerebral hematoma expansion is mediated by plasma kallikrein." Nat Med **17**(2): 206-210.
- Maas, C., C. Oschatz und T. Renne (2011). "The plasma contact system 2.0." Semin Thromb Hemost **37**(4): 375-381.
- Mandle, R., Jr. und A. P. Kaplan (1977). "Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in hageman factor-dependent fibrinolysis." J Biol Chem **252**(17): 6097-6104.
- Mansour, S. L., K. R. Thomas, C. X. Deng *et al.* (1990). "Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7688-7692.
- Matsumoto, S., I. Takebe und Y. Machida (1988). "Escherichia coli lacZ gene as a biochemical and histochemical marker in plant cells." Gene **66**(1): 19-29.
- Maurer, M., M. Bader, M. Bas *et al.* (2011). "New topics in bradykinin research." Allergy **66**(11): 1397-1406.
- Merkulov, S., W. M. Zhang, A. A. Komar *et al.* (2008). "Deletion of murine kininogen gene 1 (mKng1) causes loss of plasma kininogen and delays thrombosis." Blood **111**(3): 1274-1281.
- Metzger, D. und P. Chambon (2001). "Site- and time-specific gene targeting in the mouse." Methods **24**(1): 71-80.

- Miles, L. A., J. S. Greengard und J. H. Griffin (1983). "A comparison of the abilities of plasma kallikrein, beta-Factor XIIa, Factor XIa and urokinase to activate plasminogen." Thromb Res **29**(4): 407-417.
- Motta, G., R. Røjkjaer, A. A. Hasan *et al.* (1998). "High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation." Blood **91**(2): 516-528.
- Nagaya, S., E. Morishita, A. Takami *et al.* (2009). "[An elderly case of congenital prekallikrein deficiency]." Nihon Ronen Igakkai Zasshi **46**(4): 348-351.
- NCBI BLAST. "NCBI nucleotide blast." from <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- NCBI Gene ID 3818. (10.03.2012). "Homo sapiens plasma kallikrein gene (klkb1)." from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3818>.
- NCBI Gene ID 16621. (02.03.2012). "Mus musculus plasma kallikrein gene (klkb1)." from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16621>.
- Osler, W. (1888). "Hereditary angio-neurotic oedema." Am J Med Sci **95**: 362-367.
- Pauer, H. U., T. Renné, B. Hemmerlein *et al.* (2004). "Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo." Thromb Haemost **92**(3): 503-508.
- Raffoux, C., P. Alexandre, P. Perrier *et al.* (1982). "HLA typing in a new family with Fletcher factor deficiency." Hum Genet **60**(1): 71-73.
- Renné, T., M. Pozgajova, S. Gruner *et al.* (2005). "Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII." J Exp Med **202**(2): 271-281.
- Revenko, A. S., D. Gao, J. R. Crosby *et al.* (2011). "Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding." Blood **118**(19): 5302-5311.
- Røjkjaer, R., A. A. Hasan, G. Motta *et al.* (1998). "Factor XII does not initiate prekallikrein activation on endothelial cells." Thromb Haemost **80**(1): 74-81.
- Rozen, S. und H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-386.
- Saito, H. (1987). "Contact factors in health and disease." Semin Thromb Hemost **13**(1): 36-49.
- Saito, H., L. T. Goodnough, J. Soria *et al.* (1981). "Heterogeneity of human prekallikrein deficiency (Fletcher trait): evidence that five of 18 cases are positive for cross-reacting material." N Engl J Med **305**(16): 910-914.
- Saito, H., O. D. Ratnoff, R. Waldmann *et al.* (1975). "Fitzgerald Trait: Deficiency of a Hitherto Unrecognized Agent, Fitzgerald Factor, Participating in Surface-Mediated Reactions of Clotting, Fibrinolysis, Generation of Kinins, and the Property of Diluted Plasma Enhancing Vascular Permeability (PF/Dil)." J Clin Invest **55**(5): 1082-1089.
- Schapira, M., E. Despland, C. F. Scott *et al.* (1982). "Purified human plasma kallikrein aggregates human blood neutrophils." J Clin Invest **69**(5): 1199-1202.
- Seligsohn, U. (2009). "Factor XI deficiency in humans." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 84-87.

- Shariat-Madar, Z., F. Mahdi und A. H. Schmaier (2002). "Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator." J Biol Chem **277**(20): 17962-17969.
- Shigekiyo, T., O. Fujino, Y. Kanagawa *et al.* (2003). "Prekallikrein (PK) Tokushima: PK deficiency caused by a Gly401-->Glu mutation." J Thromb Haemost **1**(6): 1314-1316.
- Stanford, W. L., J. B. Cohn und S. P. Cordes (2001). "Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond." Nat Rev Genet **2**(10): 756-768.
- Stief, T. W. (2008). "Kallikrein activates prothrombin." Clin Appl Thromb Hemost **14**(1): 97-98.
- Sugi, T. und T. Makino (2000). "Plasma contact system, kallikrein-kinin system and antiphospholipid-protein antibodies in thrombosis and pregnancy." J Reprod Immunol **47**(2): 169-184.
- Thomas, K. R. und M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell **51**(3): 503-512.
- Tucker, E. I., D. Gailani, S. Hurst *et al.* (2008). "Survival advantage of coagulation factor XI-deficient mice during peritoneal sepsis." J Infect Dis **198**(2): 271-274.
- Wachtfogel, Y. T., U. Kucich, H. L. James *et al.* (1983). "Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation." J Clin Invest **72**(5): 1672-1677.
- Wang, X., P. L. Smith, M. Y. Hsu *et al.* (2006). "Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice." J Thromb Haemost **4**(9): 1982-1988.
- Wuepper, K. D. (1973). "Prekallikrein deficiency in man." J Exp Med **138**(6): 1345-1355.
- Wynne Jones, D., G. Russell, S. L. Allford *et al.* (2004). "Severe prekallikrein deficiency associated with homozygosity for an Arg94Stop nonsense mutation." Br J Haematol **127**(2): 220-223.

## Abkürzungen

Abkürzung	Langform	Erläuterung
BK	<u>B</u> rad <u>y</u> kinin	Spaltprodukt aus HMWK
bp	<u>b</u> ase <u>p</u> air(s) (engl.), Basenpaar(e)	Einheit für die Länge von DNA-Stücken
C1-INH	<u>C</u> 1-Esterase- <u>I</u> nhibitor	Wichtigster Inhibitor des Plasmakallikreins
Cre	<u>C</u> yclization <u>r</u> ecombinase (engl.), Zyklisierungsrekombinase	Enzym, das zwei <i>loxP</i> -DNA-Sequenzen miteinander verknüpft
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (engl.), Desoxyribonukleinsäure	Trägermolekül der Erbinformation
HAE	<u>h</u> ereditary <u>a</u> ngio <u>e</u> dema (engl.), hereditäres Angioödem	Autosomal-rezessive Erkrankung mit akuten Gewebsschwellungen durch Mutationen in den Genen von C1-INH beziehungsweise Faktor XII
HMWK	<u>h</u> igh- <u>m</u> olecular- <u>w</u> eight <u>k</u> ininogen (engl.), hochmolekulares Kininogen	Bindungspartner und Substrat des Plasmakallikreins
Hsp90	<u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein <u>90</u> (engl.), Hitzeschockprotein 90	Aktivator des Plasmakallikreins, cytosolisch
IPTG	<u>I</u> sopropyl- $\beta$ -D- <u>t</u> hiogalactopyranosid	Induktor des <i>lacZ</i> -Gens
<i>klkb1</i>	Kallikrein B (Plasma) 1	Für Plasma-Präkallikrein kodierendes Gen
<i>lacZ</i>	lactose operon, part Z (engl.)	Gen für $\beta$ -Galactosidase aus <i>E. coli</i>
<i>loxP</i>	<u>l</u> ocus of <u>c</u> rossover <u>P</u> 1	34 bp lange DNA-Sequenz aus dem Bakteriophagen P1, wird von Cre erkannt
<i>mKngl</i>	murine kininogen gene 1 (engl.)	eines der für Kininogen codierenden Gene der Maus
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (engl.), Polymerasekettenreaktion	Methode zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
PK	<u>P</u> lasma <u>k</u> allikrein	Zentrales Protein dieser Arbeit
PPK	<u>P</u> lasma- <u>P</u> rä <u>k</u> allikrein	Inaktive Vorstufe von Plasmakallikrein
PRCP	<u>P</u> rolyl <u>c</u> arboxypeptidase	Aktivator des Plasmakallikreins, membranständig am Endothel
TF	<u>T</u> issue <u>F</u> actor (engl.), Gewebsthrombokinase	Membranprotein von Zellen ohne physiologischen Kontakt zu Blut, auch in Thrombozyten vorkommend. Wichtigster Aktivator der Blutgerinnung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D- <u>g</u> alactopyranosid	führt bei Umsetzung durch $\beta$ -Galactosidase zu einer Blaufärbung

## Anhang

### Sequenz des Targeting Vektors

In dieser Darstellung der Sequenzierergergebnisse des Targeting Vektors ist in der mit "Theor." bezeichneten Zeile jeweils die theoretische Sequenz des Vektors dargestellt, wie dieser laut zugrunde liegendem Vektor pHM2 und inklonierten murinen Genanteilen von *klkb1* aufgebaut sein müsste. Die mit LHBglf, KH-f1, XPKHr4, KH-f0, NEO-r1 und NEO-f1 bezeichneten Zeilen zeigen die tatsächlichen Sequenzierergergebnisse, die mit den gleichnamigen Primern erhalten wurden. Die dazwischen liegende Zeile enthält ein "|" bei identischer Sequenz, ein " " bei einer Abweichung, wie vom NCBI nucleotide BLAST ausgegeben. Die einzelnen BLASTs wurden manuell kombiniert (NCBI BLAST)

```
LHBglf 416  ATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACC 475
|
Theor. 1    ATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACC 60

LHBglf 476  CAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACA 535
|
Theor. 61   CAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACA 120

LHBglf 536  TCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTC 595
|
Theor. 121  TCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTC 180

LHBglf 596  CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCG 655
|
Theor. 181  CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCG 240

LHBglf 656  GGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAC 715
|
Theor. 241  GGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAC 300

LHBglf 716  CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCA 775
|
Theor. 301  CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCA 360

LHBglf 776  TAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG 835
|
Theor. 361  TAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG 420

LHBglf 836  AGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAAC 895
|
Theor. 421  AGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAAC 480

LHBglf 896  CGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGG 955
|
Theor. 481  CGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGG 540

LHBglf 956  CAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAAT 1015
|
Theor. 541  CAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAAT 600

LHBglf 1016 TAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC-TTCCGG 1074
|
Theor. 601  TAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC-TTCCGG 660
```



Theor.            TTGTCCTAATAAAAATTAAGTTGCATC

KH-f1    11    ATTTTGTCTGACTAGGTGTCCCTTCTATAATATCGAATTCCCCACCGGGAGAAAGAAGGA    70  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2176    ATTTTGTCTGACTAGGTGTCCCTTCTATAATATCGAATTCCCCACCGGGAGAAAGAAGGA    2235

KH-f1    71    TAGAAGCGTTGCgggggggtggggggTTGACTTTTTTACTCTGATTTCTTCTTCTTGCTTC    130  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2236    TAGAAGCGTTGCGGGGGGTGGGGGGTTGACTTTTTTACTCTGATTTCTTCTTCTTGCTTC    2295

KH-f1    131    CTTTTTGAGCATGAGGTACTACCAAACCTCAACCAACTCCTTGAATGACCAACAGCTACC    190  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2296    CTTTTTGAGCATGAGGTACTACCAAACCTCAACCAACTCCTTGAATGACCAACAGCTACC    2355

KH-f1    191    TATACTACTTCTGGGGACCCTCACCTTTACAATGCTCTGTAAAGTCCAGAATTCCAGA    250  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2356    TATACTACTTCTGGGGACCCTCACCTTTACAATGCTCTGTAAAGTCCAGAATTCCAGA    2415

KH-f1    251    CATCACACAATCACAGAAACTATCTGCAGCTGGCAAACCATGTCTCTGCTAGCTCATGA    310  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2416    CATCACACAATCACAGAAACTATCTGCAGCTGGCAAACCATGTCTCTGCTAGCTCATGA    2475

KH-f1    311    GGTAATAATGACTAGTTGCTTTGAAGCAGCTCAATATCCCCACACTTACGATTATAACA    370  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2476    GGTAATAATGACTAGTTGCTTTGAAGCAGCTCAATATCCCCACACTTACGATTATAACA    2535

KH-f1    371    AAAACATATTCTTACAGTGTCTGTGTTTTTTAAAGAACTAAAATTCTAGAATTTTCA    430  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2536    AAAACATATTCTTACAGTGTCTGTGTTTTTTAAAGAACTAAAATTCTAGAATTTTCA    2595

KH-f1    431    CTATAACTTCGGACTCATTTTAACTCCACTGACCAACTCCCTCTCTAAGCAACAATAGTT    490  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2596    CTATAACTTCGGACTCATTTTAACTCCACTGACCAACTCCCTCTCTAAGCAACAATAGTT    2655

KH-f1    491    ACCCAAAGTGTAGTGCCTGTCCCTAACAAACAGAAAGAACAGATGAGTTTGGTTGGCTAGA    550  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2656    ACCCAAAGTGTAGTGCCTGTCCCTAACAAACAGAAAGAACAGATGAGTTTGGTTGGCTAGA    2715

KH-f1    551    CAGAAAACCTTACATTCAATGTCAGCTGATAATGATGGAACACTTGGGGAAGTCCCTAATC    610  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2716    CAGAAAACCTTACATTCAATGTCAGCTGATAATGATGGAACACTTGGGGAAGTCCCTAATC    2775

KH-f1    611    CCTGAGTTCCGATTGGTGGAAATTATAACTGTAACCTTGGCTCAGATACTGGCAGATTATG    670  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2776    CCTGAGTTCCGATTGGTGGAAATTATAACTGTAACCTTGGCTCAGATACTGGCAGATTATG    2835

KH-f1    671    TGCTTATAAATCTGCTTCAGCTCCTATTTGGGGCTGCCAGAAGAAACAAGGCTCCCAAG    730  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2836    TGCTTATAAATCTGCTTCAGCTCCTATTTGGGGCTGCCAGAAGAAACAAGGCTCCCAAG    2895

KH-f1    731    TCCTTGTCTGGTGGCCCTGGTTGGTCAGTGACTTTGCTTGTATGGCGGAAGAATAAAAAG    790  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2896    TCCTTGTCTGGTGGCCCTGGTTGGTCAGTGACTTTGCTTGTATGGCGGAAGAATAAAAAG    2955

KH-f1    791    ATTGTGCTGTTCCATGAGCCCAGTGGTGCTTTCTCCTCTTTGTCAAGACTCACAGAAG    850  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    2956    ATTGTGCTGTTCCATGAGCCCAGTGGTGCTTTCTCCTCTTTGTCAAGACTCACAGAAG    3015

KH-f1    851    ACATGGTGTAACAGAAGTATTATTCAAGTTCTTATGTTGAATCAAGCATCTTACAAACT    910  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    3016    ACATGGTGTAACAGAAGTATTATTCAAGTTCTTATGTTGAATCAAGCATCTTACAAACT    3075

KH-f1    911    GTTGACCTCTTCAGATGGTCATGATTTAGCACTGTAGATCATAGATTCCTAGAAATTTGT    970  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    3076    GTTGACCTCTTCAGATGGTCATGATTTAGCACTGTAGATCATAGATTCCTAGAAATTTGT    3135

KH-f1    971    TAACTTATTCTATCTAATTTGTTGAGATAATTTTTT-GCAGGGATCTCATATTTCTATTT    1029  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Theor.    3136    TAACTTATTCTATCTAATTTGTTGAGATAATTTTTTGCAGGGATCTCATATTTCTATTT    3195



XPKHr4 774 ATATCTAGGTTTCATATTGATGTGTGTAGAGAGATGTGCTTAGTAGACTCACTTGATGTGA 833  
 Theor. 4185 ATATCTAGGTTTCATATTGATGTGTGTAGAGAGATGTGCTTAGTAGACTCACTTGATGTGA 4244  
 XPKHr4 834 ATCCGCTGGAAGTTGACTTCGCTTGAATATGTGATCTGTCCTAGTGTACTCCCCATTGGT 893  
 Theor. 4245 ATCCGCTGGAAGTTGACTTCGCTTGAATATGTGATCTGTCCTAGTGTACTCCCCATTGGT 4304  
 XPKHr4 894 TCTACACCCGGTGTGTGTTCTGTTGCTGCAACAATGCTCTGAGCATGCGTGGAAATGTTT 953  
 Theor. 4305 TCTACACCCGGTGTGTGTTCTGTTGCTGCAACAATGCTCTGAGCATGCGTGGAAATGTTT 4364  
 XPKHr4 954 TATGTGTGCACTGGAGGGCAGTGCTATCAAACGCTTGTGTTATTTATCCGTGTCTGGGTG 1013  
 Theor. 4365 TATGTGTGCACTGGAGGGCAGTGCTATCAAACGCTTGTGTTATTTATCCGTGTCTGGGTG 4424  
 XPKHr4 1014 ATGTATCTGTGTTGATAGTCTACTGCAATCTACCTCTCCCTTCAACACTGTTAATATTTT 1073  
 Theor. 4425 ATGTATCTGTGTTGATAGTCTACTGCAATCTACCTCTCCCTTCAACACTGTTAATATTTT 4484  
 XPKHr4 1074 CTTTATGAATTTAGCATTGGGTTGATTGCATCCATATAAATAGCTGATCAGTCTTCTTGA 1133  
 Theor. 4485 CTTTATGAATTTAGCATTGGGTTGATTGCATCCATATAAATAGCTGATCAGTCTTCTTGA 4544  
 XPKHr4 1134 TCAACAGCCCATTCTATCATTATATACAAGAGCCCCCTTTTTCACAGAGGTCACTTCTTAA 1193  
 Theor. 4545 TCAACAGCCCATTCTATCATTATATACAAGAGCCCCCTTTTTCACAGAGGTCACTTCTTAA 4604  
 XPKHr4 1194 GATCCTCAGTGGGTGCTTGAAACTCAGACAGCCCTGGACTCCATGGATAC-GA-CAC-AG 1250  
 Theor. 4605 GATCCTCAGTGGGTGCTTGAAACTCAGACAGCCCTGGACTCCATGGATACTGAACACTAG 4664  
 XPKHr4 1251 G 1251  
 Theor. 4665 GAGGCCATGATCATTGGTTTGGTAGCAGAGAAAACCACTGACTGAATGTGGGTGGTGCGC 4724  
 Theor. ACAGCGAGAGTGTGTTGTACAAAAGGGTGATTCGTGTGGCAAAGAACAAGCTGGTGTAGG  
 Theor. AAGGAGTTCAGCCAGCCAGCCACTCTATGGCTTTTGATTGAGAAATCTATGTATTAACA  
 Theor. TTTCATGGTAACAAAGCATCGGTTACTTTATTATAATCATTATTTTATGGATGGATCTT  
 Theor. TTTTCTTCATATTTTATGTGATTTCAAGTTTCTTTATGGTTATTATAATGCATGCATA  
 Theor. AGTCATTTCAACTGTTACAACGAAAAACCATCTACACTTAAACCAATTGTACCATCCT  
 Theor. GGATTGCAAACTTCTGCTAAGAACTGTTAATAGTCTTATGCACTTCTCTTGTATGTGAA  
 Theor. CAGCTGCATTTTTTCTCCTGCTGTTTCTGAATGCAATGTGCGTTGATGAGACGGTCTTTC  
 Theor. CACCTCTTTATCTGGATAACCATCTTATTCACCATCTTTAAGGAGTCTTTTGGTTTGTGA  
 Theor. GGTCTCAAAGTTTTCTTCCAATTCTTCTACCTTCATTTATTTAAGATCACATATAAGTT  
 Theor. CCTAACTTTTTTCTTTTGGTGATTTGGGGGGGTGGGGCTTTGTTTTGTGTGTGTGTGTG  
 Theor. TG  
 Theor. GAGAAGTTATTTTAAATTTAATTTTTTAAAGTTTATTTATTCACCCCTTGCCACGCTCTC  
 Theor. CAGTCGAGTCAGTTTGACAAGCAGAAGCTTGAAGCTGGCCGTGAGGAAAAGAGTTTCAT

Theor. GGAAGCTCCCTCCTGGAGTCTGGCACTCTCTTTAATCTCTTTAACCCATACATTAATTTT  
Theor. CCACTCCCATGTTAGTCTAGTGTATGGATCCACGTGCCCTCTATTAAGCATTACCTATT  
Theor. ATAAGTGCCATTTAAGATTGAATTCTGACATAGCTAAAGCCTCTCCCAGTGTCCAAGAT  
Theor. CCCAGTTTACAGCAAGGTAGTTTAACTATTTCAGTAACTAATTAAGCATTACAATAGACA  
Theor. GAGCCATTAACTCAGTTGTCTGCAGAAAGAGCCTGGGAATCTCACTGAGATAGAAATCTT  
Theor. TACTACAGGCTACATTCCATGCCAAGAGCAAGTTGATATACTATACTGATATATGGGGAA  
Theor. TTCTTCAGACAAGATAAGATTTTACAAGACCTAGGAATTTAGGGGTCCATGACACTACAT  
Theor. TATTCTTGAGGCCTGTCAAGAGTTAAAACCCCCTGGTGCTATTAACACTAAAGTGTGAAA  
Theor. CTCTTGCCCTGGCATTAGCCTGATCCTAGGCAGGGCTGGTAATTTCTATTGTAAACATTTA  
Theor. TCTAGTTCCTGCAAATTCCTTTCTGCTTGTATCTGGTAAATTTCACTGTACCTTGTCTT  
Theor. ATTGTGATTTGTAGCTCCTGATAATTCGTTGTAATATAAAAATAGTCTAATGTTCCACCAG  
Theor. AGATTACATTCAGATTCAACACCTCTCTTGTGTGCATCTGTTTGTCAATTTAATCCTAAG  
Theor. CTTTGCCACCTACTCTAGAGACCCGTTCTACACAGACACAGGGACCCAGAGGGTCTGCA  
Theor. GCAACCTCTTGCATGGTTATGTGTGCACACACAGAAGAAGTATAGGTGTGGTGGTCAAAG  
Theor. GACACTTTTAGGGGGTTGCCTTACTCCCTCCACTGTGCAGGTTCTGGGGATAGAACTCCA  
Theor. GTCATTAGGCTTGACAGTAAATGCCTTTGACCCCTGAGATATCCTGCAAGCTCCACCAT  
Theor. GATTTTAGGCTTTAAAAACATGCAAACCTATTAGTCATTTATCTCTTCAATAGATTCTGG  
Theor. GTTAGCCAACGTGCAGTTAGAGTTGAATGTGCAAGGCTGTTTGAATCTCGGGTCCATAG  
Theor. AAAATAGCCTGGCATCAGGGTCCATTGCAATTACATTGATGATTGAGTCCCTGGGCTCAT  
Theor. GCTTGATACCCAGTTCAATGGGGCCAGTATCTTATGATCGAGGACTGGCTTAAAGTGCA  
Theor. GATGTTGAAATGAGCCTAGAACTGAGCCTCCAGAGGCAATGTCCAAACTCAAGCCCACG  
Theor. GGCATGAGTTTGTCCCAAATCTACAATTACAGTCTTGAAAAGATTCTACGGGGTAGT  
Theor. AGACCCGGTGACTGGCCTGAGGTTAACATCCTGGAGCCTGGGTCTGCAGGGTCTGGCCG  
Theor. GATACTGGAATTTCTGGGATGGGCTTGTTTTAGACCCGTGAAAAGTAATGTTTACATC  
Theor. ACTCTTCTTCATGCATTTGGAACACATCTCCTTGCTGCGCTGCTTAGGATTGGTAGGAGG  
Theor. GTTTCACGGTTAATGTGAAAAGTCTAACATTCCTCAATGCATATTCCTAGGTCCACATT  
Theor. TTCAACCGGGGTGGGGGGTGCAACCTATCATCTGGATTCTTAACAACCTCGGAAGGCAT  
Theor. TTTTTTTTGTGCACAGAGAATTGTTCCCATGGATTCTTCTGCAAAGGGACCCATTTTGA

Theor. GCCTCCAGCTCTGTCATCGTGTATATGACTTCTTGAAATTGGTAACATATTAAGTAGC

Theor. TGAACCTGGACTGGGATGTCCGTGGACTATATTGACAGGTTAAACAGTTGAAACTGATGC

Theor. CAGAAACCCAGTGTAACACTGGAGCCAAGCAAAGACCGCCCTCGGTGCCATATTCAGAG

Theor. GGCTTGAAGACCATCTTCATGTGAAGACTCCCTCTCCTCCAGAAC

KH-f0 10 CACAACGTGACCATCCTTCCAGGTAGCTGCTTTCTACCGGTCTTGTATTTCCTGTGTCT 69  
 Theor. 7410 CACAACGTGACCATCCTTCCAGGTAGCTGCTTTCTACCGGTCTTGTATTTCCTGTGTCT 7469

KH-f0 70 TGGGttttttttttCAATATAACTATTTCTGCATGAACAAAAGCTCACTGGTATAATGC 129  
 Theor. 7470 TGGGTTTTTTTTTCAATATAACTATTTCTGCATGAACAAAAGCTCACTGGTATAATGC 7529

KH-f0 130 ACTAATTTCTGAGTTTTTAGAAAATCTACAAGGAGTTGTTTTCTTTCTATACAAATAT 189  
 Theor. 7530 ACTAATTTCTGAGTTTTTAGAAAATCTACAAGGAGTTGTTTTCTTTCTATACAAATAT 7589

KH-f0 190 ATTAATGTAAAATATTTTAAAACCAAGAATAAGTTTTTGATTCTTTCAAAGATGTCCTT 249  
 Theor. 7590 ATTAATGTAAAATATTTTAAAACCAAGAATAAGTTTTTGATTCTTTCAAAGATGTCCTT 7649

KH-f0 250 TCTGTGAAGGTTGTGGGTGATATTATTGTCCTTATTCATAATAATTTGCATTAATCTGG 309  
 Theor. 7650 TCTGTGAAGGTTGTGGGTGATATTATTGTCCTTATTCATAATAATTTGCATTAATCTGG 7709

KH-f0 310 AAATTTAATAAGTGTTTTTAATTATTTGTATTAACCTTTACAAAATTATTAGAAATAAA 369  
 Theor. 7710 AAATTTAATAAGTGTTTTTAATTATTTGTATTAACCTTTACAAAATTATTAGAAATAAA 7769

KH-f0 370 TCTTCAAAATTAACAATAAATACACTAATACACACTGATAGTAATCTAGAGGTCTCAATT 429  
 Theor. 7770 TCTTCAAAATTAACAATAAATACACTAATACACACTGATAGTAATCTAGAGGTCTCAATT 7829

KH-f0 430 TGGATCTTGGGAAGCATGATAAATATTTAATTTCTATATACAAAATATCCCACAGCCA 489  
 Theor. 7830 TGGATCTTGGGAAGCATGATAAATATTTAATTTCTATATACAAAATATCCCACAGCCA 7889

KH-f0 490 AATCTTCTTCTCCTGGTGATTATGTGCTGTGATTGCAACTTAGACATTTATCAAAAAG 549  
 Theor. 7890 AATCTTCTTCTCCTGGTGATTATGTGCTGTGATTGCAACTTAGACATTTATCAAAAAG 7949

KH-f0 550 GTGAAGTCTACATGAAGTTAAATTGTCTATTAATAACATGGTAAACATGATCTCAACCTA 609  
 Theor. 7950 GTGAAGTCTACATGAAGTTAAATTGTCTATTAATAACATGGTAAACATGATCTCAACCTA 8009

KH-f0 610 GTAGTTATATGTATAtttttttCTTCAAAGGATGATTTTATTCAACCGAGATCTACGTA 669  
 Theor. 8010 GTAGTTATATGTATATTTTTTTCTTCAAAGGATGATTTTATTCAACCGAGATCTACGTA 8069

KH-f0 670 CCACGTGACCATGTCGTTTACTTTGACCAACAAGAACGTGATTTTCGTTGCCGGTCTGGG 729  
 Theor. 8070 -CACGTGACCATGTCGTTTACTTTGACCAACAAGAACGTGATTTTCGTTGCCGGTCTGGG 8128

KH-f0 730 AGGCATTGGTCTGGACACCAGCAAGGAGCTGCTCAAGCGGATCCCGTCGTTTTACAACG 789  
 Theor. 8129 AGGCATTGGTCTGGACACCAGCAAGGAGCTGCTCAAGCGGATCCCGTCGTTTTACAACG 8188

KH-f0 790 TCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTT 849  
 Theor. 8189 TCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTT 8248

KH-f0 850 CGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAG 909  
 Theor. 8249 CGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAG 8308

KH-f0 910 CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGAAAGCTG 969  
 Theor. 8309 CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGAAAGCTG 8368  
 KH-f0 970 GCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACTGTGTCGTCCCTCAAAGTGGCAGATGCA 1029  
 Theor. 8369 GCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACTGTGTCGTCCCTCAAAGTGGCAGATGCA 8428  
 KH-f0 1030 CGGTTACGATGCGCCCATCTACAC-A-CGTGACCTATCCCATTACGGTCA-TC-GC-GTT 1084  
 Theor. 8429 CGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTT 8488  
 KH-f0 1085 TGT-CCCACG-AGA-TCCGACGGTGGT-ACTCGCTCACATT-A-TGT-GATGAA-GCTG 1136  
 Theor. 8489 TGTTCACCGGAGAAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTG 8548  
 KH-f0 1137 CCTACAG-A-G-C-AGACGCGA-TTATTTTGGATGGCAT-A-CTCG-CGTT-CATCTGTG 1187  
 Theor. 8549 GCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTTATTTTGGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTG 8608  
 KH-f0 1188 G-GCA-CGG-C-CTGA-TCG-TTACG-C-AG-ACAGTCGTT-GCGCTCTGGATTGGACCT 1237  
 Theor. 8609 GTGCAACGGGCGCTGGGTTCGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGGCGTCTGAATTTGACCT 8668  
 KH-f0 1238 GAG 1240  
 Theor. 8669 GAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGTGCGTTGGAGTGA 8728  
 Theor. CGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTC  
 Theor. GTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATGA  
 Theor. TGATTTTACGCCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTA  
 Theor. CCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCC  
 Theor. TTTCCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGTCT  
 Theor. GAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGT  
 Theor. TGAAGTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTGCGTTTCCG  
 Theor. CGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTGAGG  
 Theor. CGTTAACCGTCACGAGCATCATCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGT  
 Theor. GCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACCTTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGATTATCC  
 Theor. GAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGC  
 Theor. CAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCT  
 Theor. ACCGGCGATGAGCGAACCGGTAACCGAATGGTGCAGCGGATCGTAATCACCCGAGTGT  
 Theor. GATCATCTGGTTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCG  
 Theor. CTGGATCAAATCTGTCGATCTTCCC GCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACAC  
 Theor. CACGGCCACCGATATTATTTGCCGATGTACGCGCGGTGGATGAAGACCAGCCCTCCC  
 Theor. GGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCT

Theor. GATCCTTTGCGAATACGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTG

Theor. GCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCA

Theor. GTCGCTGATTAATATGATGAAAACGGCAACCCGTTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGG

Theor. CGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCC

Theor. GCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGG

Theor. GCAAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCA

Theor. CTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCCG

Theor. TCCACAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCA

Theor. ACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCA

Theor. CATCAGCGCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCG

Theor. GTCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAA

Theor. TAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATAA

Theor. AAAACAACCTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACAT

Theor. TGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTGGGTGCAACGCTGGAAGGCGGC

Theor. GGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGC

Theor. GGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCG

Theor. GAAAACCTACCGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGC

Theor. GAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGA

Theor. GCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCTTACTGCCGC

Theor. CTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAG

Theor. CGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCAATTGAATTATGGCCCACACCAGTGGCGCGG

Theor. CGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCG

Theor. CCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGAT

Theor. TGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTACAGCTGAGCGCCGGTCCG

Theor. CTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCAGGGCAGGCCATGTCTGCC

Theor. CGTATTTTCGCGTAAGGAAATCCATTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTT

Theor. CGGTTTATTCTTTTCTTTTACTTTTTTATCATGGGAGCCTACTTCCCGTTTTTCCCGAT

Theor. TTGGCTACATGACATCAACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCCGCTAT

Theor. TTCTCTGTTCTCGCTATTATTCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCGGCCT

Theor. CGACTCTAGGCGGCCATCGAATTCTCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACAT

Theor. AATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAAGTG

Theor. TATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAA

Theor. CTGATGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAG

Theor. AAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAA

Theor. AGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTC

Theor. ATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAG

Theor. CTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATATCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATA

Theor. ACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTA

Theor. TTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATA

Theor. AGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTA

Theor. GAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATG

Theor. AATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAAT

Theor. AGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC

Theor. AAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCATCGATGGTACAATCTACCAGGTAGGGGA

Theor. GCGCCTTTTCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTsGCAGCCCCGCTGGCACTTGGCGC

Theor. TACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGCGCCAACCGGCTC

Theor. CGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCC

Theor. CCGCCCCGAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTC

Theor. TCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCC

Theor. AATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGTCCGGGG

Theor. GCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGGAAGGTCTCCGGAGCCCCGCAT

Theor. TCTGCACGCTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTCCTCATCTCCGGGCC

Theor. TTTCGAC

NEO-r1 37 CTGCAGCCAT-T--GATC-GCCATTG-ACAAGATGGAATGGCACGCA-G-TCT-CGG-CG 87  
 ||||| | | ||| | ||||| ||||| || | ||||| | || | || |  
 Theor. 12876 CTGCAGCCATATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGG-ATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCG 12934











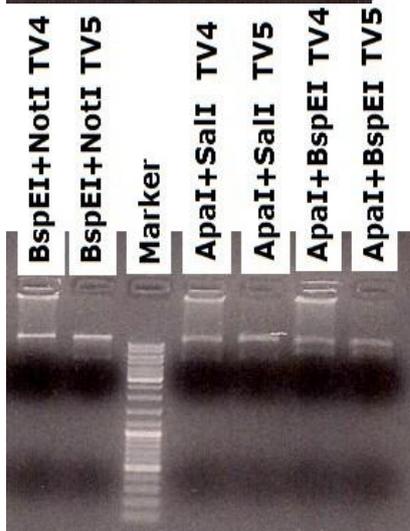
## Restriktionsverdau zur Verifizierung des fertigen Targeting Vektors



**Abbildung 10: Restriktionsverdau des fertigen Targeting Vektors:**

Verdau von zwei verschiedenen Maxipreps des Targeting Vektors Klon 5 mit Sali und NotI beziehungsweise BgIII; Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

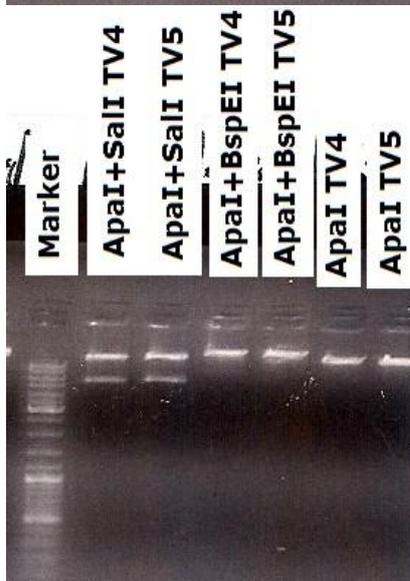
Der jeweils links aufgetragene Maxiprep schlug fehl und wurde verworfen, der rechte zeigt die korrekten Banden.



**Abbildung 11: Restriktionsverdau des fertigen Targeting Vektors:**

Verdau der Klone 4 und 5 des Targeting Vektors jeweils mit BspEI und NotI; Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Verdau mit ApaI und Sali sowie mit ApaI+BspEI.

Klon 5 ist jeweils deutlich sauberer dargestellt als Klon 4.



**Abbildung 12: Restriktionsverdau des fertigen Targeting Vektors:**

Verdau der Klone 4 und 5 des Targeting Vektors jeweils mit ApaI und Sali, mit ApaI und BspEI sowie mit ApaI allein. Links Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Die 7300 bp-Bande des mittleren Verdau ist schlecht zu erkennen, aber vorhanden.

## **Danksagung**

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Ulrich Walter danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen.

Ich danke meinem Betreuer Prof. Dr. Dr. Thomas Renné für die Aufnahme in seine Nachwuchsgruppe und die Vergabe des Themas dieser Arbeit, für die Betreuung während der Arbeit, die rasche Beantwortung aller offenen Fragen zu jedem Zeitpunkt und die vielen Erklärungen.

Prof. Dr. Kai Schuh verdanke ich viele hilfreiche Tipps zu den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden und Versuchen, außerdem danke ich ihm für die spontane Übernahme der Promotortätigkeit und die konstruktive Kritik an den ersten Versionen dieses Schriftstücks.

Meinen lieben Mitdoktoranden Constanze, Julia, Melanie und Peter danke ich dafür, dass sie einem ahnungslosen und begriffsstutzigen Medizinstudenten so geduldig die wissenschaftlichen Methoden der Labortätigkeit erklärt haben und ihm auch sonst jederzeit hilfreich beiseite standen.

Ich danke unserer technischen Assistentin Elfi Walter für das Besorgen und Bereitstellen von Materialien, Silvia Schüle für organisatorische Hilfestellungen und Prof. Dr. Michael Zimmer für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Meinen Freunden, die nicht nur zu Beginn meiner Doktorandenarbeit, sondern auch in den frustrierenden Phasen zwischendurch und während des mühevollen Schreibprozesses immer für mich da waren, danke ich für ihre andauernde Freundschaft und Unterstützung. Ihr bedeutet mir mehr, als Ihr Euch vorstellen könnt.

Zuletzt geht ein ganz besonders großer Dank an meine Eltern, die mich nicht nur während dieser Arbeit, sondern mein ganzes Leben lang immer unterstützt haben und die immer daran geglaubt haben, dass ich diese Arbeit doch noch erfolgreich beenden werde.