

Untersuchungen zur *in vivo* Funktion von Annexin VII
Etablierung einer transgenen Mauslinie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Claudia Herr
aus Wuppertal

Köln

2000

Berichtersteller: Frau Prof. Dr. A. A. Noegel
Frau Prof. Dr. M. Leptin

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2000

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1997 bis September 2000 am Biochemischen Institut I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Die Betreuung der Arbeit erfolgte unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel.

Meinen Eltern und Guido

Danksagung:

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel möchte ich besonders herzlich für die äußerst interessante Themenstellung, die Betreuung der Arbeit und die zahlreichen Tips und Anregungen sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft danken. Des weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit, mein Wissen auf Seminaren zu erweitern, bedanken.

Frau Prof. Dr. M. Leptin danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt

Herrn Dr. N. Smyth für die Generierung der Annexin VII-defizienten Mauslinie,

Frau Dr. S. Ullrich, Herrn Dr. B. Fleischmann und den Kollegen für die Unterstützung bei den Untersuchungen zur Insulinsekretion bzw. den physiologischen Experimenten an embryonalen Kardiozyten,

Frau Dr. K. Brixius für die Untersuchungen an Kardiozyten adulter Tiere,

Herrn Dr. R. Schröder (Universität Bonn) für die Unterstützung bei den Gefrierschnitten.

Frau Maria Stumpf, Frau Rosi Blau, Herrn Berthold Gaßen und Herrn Rolf Müller gilt mein Dank für die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Meinen Mitdoktoranden Frau Dipl. Chem. Monika Knuth, Frau Dipl. Biol. Tina Mohrs, Frau Dipl. Chem. C. Pikzack, Herrn cand. med. Christoph Clemen, Herrn Dipl. Biol. Michael Leichter und Herrn Dipl. Chem. T. Schreiner will ich herzlichst für die allseits freundliche Arbeitsatmosphäre und die immerwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Außerdem gilt mein Dank allen weiteren Kolleginnen und Kollegen unseres Arbeitskreises.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Maria Stumpf und Frau Heidrun Dislich für die freundschaftliche Unterstützung in beruflichen und privaten Belangen bedanken.

Allen Freunden, die nicht unmittelbar an meiner Arbeit beteiligt waren, danke ich für ihr Interesse und den Ausgleich, den sie zum Laboralltag geschaffen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt zuletzt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, und Guido Knetschowsky, der in diesen Jahren soviel Toleranz und Verständnis bewiesen hat.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Proteinfamilie der Annexine	1
1.1.1	Nomenklatur der Annexine	1
1.1.2	Allgemeine biochemische Eigenschaften der Annexine	2
1.1.3	Molekularstruktur der Annexine	2
1.1.4	Funktionen der Annexine	4
1.1.5	Annexin VII (Synexin)	9
1.2	Erstellung transgener Tiermodelle durch gene targeting	10
1.3	Aufgabenstellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	15
2.1.1	Enzyme, Inhibitoren und Antikörper	15
2.1.2	Reagenzien	16
2.1.3	Kits	17
2.1.4	Bakterienstämme	17
2.1.5	Vektoren	17
2.1.6	Oligonukleotide	17
2.1.7	Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen	18
2.1.8	Puffer und andere Lösungen	18
2.1.9	Labormaterial	19
2.1.10	Geräte	19
2.2	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
2.2.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel	20
2.2.3	Präparation chromosomaler DNA aus ES-Zellen	21
2.2.4	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien	21
2.2.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	22
2.2.6	Southern-Blot-Analyse	22
2.2.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Geweben	23
2.2.8	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.9	Northern-Blot	24
2.2.10	Radioaktive Markierung von DNA-Proben	24
2.2.11	Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden	24
2.2.12	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.2.13	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	25

2.2.14	<i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	26
2.2.14.1	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	26
2.2.14.2	Dephosphorylierung der 5´-Enden von linearisierten Vektoren	26
2.2.14.3	Bildung von glatten DNA-Doppelstrangenden	26
2.2.14.4	Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten	26
2.2.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.16	Reverse Transkriptase-Reaktion	28
2.2.17	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.2.17.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	28
2.2.17.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	28
2.2.17.3	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen	29
2.3	Proteinchemische und immunologische Methoden	29
2.3.1	Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine	29
2.3.2	Herstellung von Proteinhomogenaten aus Organen der Maus	29
2.3.3	Extraktion von Annexin-Proteinen	30
2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.3.6	Zweidimensionale Gelelektrophorese	31
2.3.7	Western Blot	33
2.3.8	Protein-Färbung	33
2.3.9	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose	34
2.3.10	Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen	34
2.3.11	Immunpräzipitation	35
2.4	Histologische und immunhistologische Methoden	36
2.4.1	Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten	36
2.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz	37
2.4.3	Mikroskopie	37
2.5	Methoden zum gene-targeting	38
2.5.1	Präparation von embryonalen Fibroblasten	38
2.5.2	Kultur von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus	38
2.5.3	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	38
2.5.4	Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	39
2.5.5	Mäusezucht und Haltung	39
2.5.6	Embryonenspender	39
2.5.7	Gewinnung und Injektion von Blastozysten	40
2.5.8	Reimplantation von Blastozysten in scheinsschwangere foster-Mütter	40
2.6	Methoden zur Insulin-Sekretion	41
2.6.1	Isolation von Langerhans´schen Inseln aus dem Pankreas	41
2.6.2	Messung des Insulingehaltes der Inseln	41
2.6.3	Perfusion von Langerhans´schen Inseln	41

2.7	Elektrophysiologische Methoden	42
2.7.1	Untersuchungen an embryonalen Kardiozyten	42
2.7.1.1	Zelldissoziation	42
2.7.1.2	Ca ²⁺ -Imaging	42
2.7.1.3	Patch-clamp Experimente	43
2.7.2	Messung der Zellverkürzung an isolierten Kardiomyozyten	44
2.7.2.1	Isolation von Kardiozyten	44
2.7.2.2	Messung der Zellverkürzung	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Generierung einer Annexin VII-defizienten Mauslinie	46
3.1.1	knockout targeting-Konstrukt	46
3.1.2	Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone	48
3.1.3	Etablierung der Anx7-defizienten Mauslinie	50
3.1.4	Genotypisierung der Anx7-defizienten Mauslinie	50
3.2	Analyse der Anx7^(-/-)-Mauslinie	52
3.2.1	Annexin VII-Expression auf RNA-Ebene	52
3.2.1.1	Northern Blot Analyse	52
3.2.1.2	RT-PCR	53
3.2.2	Untersuchungen zur Protein-Expression	56
3.2.2.1	Western Blot Analyse	56
3.2.2.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Charakterisierung des Mutantenproteins Anx7D aus Lebergewebe	58
3.2.2.3	Extraktion von Ca ²⁺ -bindenden Proteinen aus Leberhomogenaten	59
3.2.2.4	Immunpräzipitation	60
3.2.2.5	Expression von Annexinen	61
3.2.3	Phänotyp der Anx7-defizienten Mauslinie	62
3.2.4	Die Skelettmuskulatur in der transgenen Maus	63
3.2.4.1	Histologie	63
3.2.4.2	Immunhistologie	67
3.2.5	Physiologische Untersuchungen an embryonalen Kardiozyten	69
3.2.5.1	Ca ²⁺ -Imaging-Experimente	69
3.2.5.2	Elektrophysiologische Messungen	71
3.2.6	Kraft-Frequenz-Messungen an adulten isolierten Kardiomyozyten	73
3.2.6.1	Frequenz-aktivierte Zellverkürzung und -länge	73
3.2.6.2	Isoprenalin-stimulierte Kraft	74
3.2.7	Untersuchungen zur Insulinsekretion	76
3.2.7.1	Insulingehalt	76
3.2.7.2	Stimulation bzw. Hemmung der Insulinsekretion	77
3.2.7.3	Insulinsekretion als Antwort auf Carbachol	79
3.3	Lokalisation von Annexin VII in humanem Gewebe	80
3.3.1	Humanes Muskelgewebe	80
3.3.2	Humanes Gehirn	82

4	DISKUSSION	84
4.1	Generierung einer Annexin VII-defizienten Mauslinie	84
4.2	Charakterisierung der Anx7^(-/-)-Maus	85
4.3	Lokalisation von Annexin VII in humanen Geweben	93
4.4	Funktion von Annexin VII	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	SUMMARY	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	98

Abkürzungen

³² P	radioaktives Phosphoratom
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
cAMP	cyclisches AMP
cDNA	copy DNA (revers von mRNA transkribierte DNA)
Da	Dalton
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilo Dalton
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
Neo	Neomycin Phosphotranferase
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p.c.	post coitum
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PGK	3-Phosphoglyzeratkinase (Promotor)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
ÜK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit(s), Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp

Chemische Elemente und Verbindungen, physikalische Größen und Einheiten werden entsprechend den internationalen Richtlinien abgekürzt.

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Annexine

Annexine sind durch zwei Eigenschaften charakterisiert, (i) sie zeigen eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von bevorzugt sauren Phospholipiden und (ii) enthalten konservierte Sequenzelemente von ca. 70 Aminosäuren, die sich vier bzw. acht mal wiederholen. So bilden die Annexine eine Familie strukturell verwandter Proteine, die in so unterschiedlichen Organismen wie *Giardia lamblia* (Fiedler und Simons, 1995), *Hydra vulgaris* (Schlaepfer et al., 1992), *Dictyostelium discoideum* (Döring et al., 1991; Greenwood und Tsang, 1991), *Drosophila melanogaster* (Johnston et al., 1990), *Caenorhabditis elegans* (Creutz et al., 1996), in höheren Pflanzen (Smallwood et al., 1990) und in vielen Säugern nachgewiesen wurden.

1.1.1 Nomenklatur der Annexine

Die Namensgebung der Annexine war zunächst recht uneinheitlich und verwirrend, da die Benennung der Proteine gemäß dem physiologischen Kontext, in dessen Zusammenhang sie gefunden wurden, erfolgte. Mehrfachbenennungen desselben Proteins blieben daher nicht aus. Nach der Aufklärung der cDNA-Sequenzen konnten Identitäten zwischen verschieden benannten Proteinen festgestellt und eine systematische Benennung vorgenommen werden. 1990 wurde von Crumpton und Dedman für diese Proteinfamilie der einheitliche Begriff „Annexin“ eingeführt. In Tabelle 1.1 ist die von ihnen entworfene Nomenklatur zusammengefasst.

Annexin	Synonym
I	Lipocortin I, Calpactin II, p35, Chromobindin 9
II	Lipocortin II, Calpactin I, p36, Chromobindin 8, Protein I, PAP IV
III	Lipocortin III, 35- α -Calcimedien, PAP III
IV	Lipocortin IV, Endonexin I, Chromobindin 4, Protein II, 32,5 kDa Calelectrin, PAP II, 35- β -Calcimedien
V	Lipocortin V, Endonexin II, 35 kDa Calelectrin, PP 4, VA-a, 35- γ -Calcimedien, Calphobindin, Anchorin CII
VI	Lipocortin VI, Protein III, Chromobindin 20, 67 kDa Calcimedien, Calphobindin, p68, p70, 73k
VII	Synexin
VIII	VA- β
IX, X	<i>D. melanogaster</i> Annexin
XI	CAP-50
XII	<i>H. vulgaris</i> Annexin
XIII	Intestinal-spezifisches Annexin

Tab.1.1: Nomenklatur der Annexin-Familie (Crumpton und Dedman, 1990). Bei Annexinen, welche bisher nicht in Säugern gefunden wurden, ist die Spezies angegeben. PAP: Plazentales Antikoagulant Protein, VA: Vaskuläres Antikoagulans, CAP: Calcyclin-assoziiertes Annexin, PP: Plazentales Protein.

1.1.2 Allgemeine biochemische Eigenschaften der Annexine

Annexine sind Ca^{2+} -bindende Proteine. Allerdings zeigen sie im Gegensatz zu anderen Ca^{2+} -Bindeproteinen, wie z.B. den „EF-Hand“-Proteinen Calmodulin, Troponin C oder Protein-kinase C eine sehr niedrige Affinität zu Ca^{2+} ($K_d = 25\text{-}1000 \mu\text{M}$). Eine Ausnahme bildet Annexin VI mit einer Dissoziationskonstante von ca. $1 \mu\text{M}$. Die Anzahl der Bindungsstellen für Ca^{2+} liegt je nach Annexinmolekül zwischen zwei und vier. Annexine binden in Gegenwart von Ca^{2+} bevorzugt an saure bzw. anionische Phospholipide, wobei die Affinität zu Phospholipiden in folgender Reihenfolge sinkt: Phosphatidylsäure > Phosphatidylserin > Phosphatidylinositol. Bei dieser Bindung kann die Dissoziationskonstante abhängig von der Art der Phospholipide und den Bedingungen sogar im nanomolaren Bereich (Annexin I und II) liegen (Raynal und Pollard, 1994).

Die Bindung von ungeladenen Phospholipiden wie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin erfordert dagegen sehr hohe Konzentrationen von Ca^{2+} (Crumpton und Dedman, 1990; Gilmanishin et al., 1994; Junker und Creutz, 1994; de la Fuente und Parra, 1995). Daneben gibt es auch einige Annexine, z.B. Annexin II, V und VI, die nicht durch Ca^{2+} -Regulation mit biologischen Membranen assoziieren können (Berendes et al., 1993; Concha et al., 1993; Hoekstra et al., 1993; Lewit-Bentley et al., 1994). Annexine erlauben *in vitro* die Aggregation von Vesikeln. Die molekularen Mechanismen sind jedoch noch immer nicht geklärt. Verschiedene Lösungsansätze dazu wurden aufgezeigt, z.B. könnten zwei Phospholipid-Bindungsstellen pro Annexinmolekül, eine Genduplikation wie im Fall von Annexin VI, Dimerisierung oder cross linking über einen Protein-Liganden dies ermöglichen (Creutz, 1992; Meers et al., 1992; Raynal und Pollard, 1994; de la Fuente und Parra, 1995; Porte et al., 1996). Zusammenfassend zeigen alle Daten, daß die verschiedenen Annexine Ca^{2+} -abhängig Phospholipide binden, daß aber dabei große Unterschiede bezüglich des Ca^{2+} -Schwellenwertes und der Fähigkeit, Membranfusion zu katalysieren, bestehen.

1.1.3 Molekularstruktur der Annexine

Die Fähigkeit der Annexine, Ca^{2+} und Phospholipide zu binden, ist in ihrer Struktur begründet. Jedes Molekül besteht aus einer für jedes Annexin spezifischen N-terminalen Domäne, die ihm funktionale Diversität verleiht, und der konservierten C-terminalen Core-Domäne, die für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich ist (Abb. 1.1). Mit Ausnahme von Annexin VI besteht die Core-Domäne aus vier Wiederholungen von je 70-80 Aminosäuren, Annexin VI weist acht sich wiederholende Segmente im Core-Bereich auf.

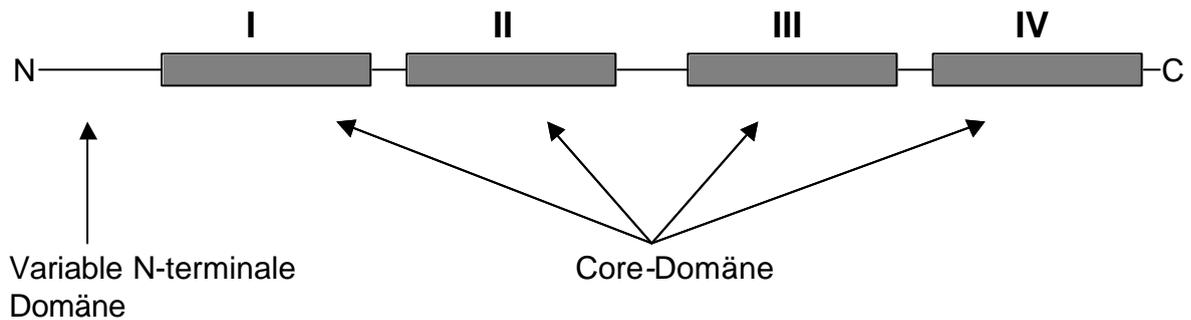


Abb. 1.1: Primärstruktur der Annexine. Die Core-Domäne besteht aus vier konservierten Segmenten, acht bei Annexin VI. Sie ist verantwortlich für die Ca^{2+} - und Phospholipidbindung. Zwischen unterschiedlichen Annexinen beträgt die Homologie im Core-Bereich 45-55 %, die N-terminalen Domänen sind variabel.

Mit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Annexin V (Huber et al., 1990; Lewit-Bentley et al., 1992), aber auch von Annexin IV und XII (Weng et al., 1993; Luecke et al., 1995; Burger et al., 1996; Favier-Perron et al., 1996; Kawasaki et al., 1996) konnte eine sehr charakteristische und homologe Faltung für die verschiedenen Annexin-Cores gezeigt werden, die als Muster für die ganze Familie gilt und so ein Annexin strukturell definieren kann. Jedes Segment des Core-Bereiches bildet eine kompakte Subdomäne aus hauptsächlich fünf α -Helices. Die vier Subdomänen sind symmetrisch um eine zentrale, hydrophile Pore angeordnet und orientieren sich mit einer konvexen Oberfläche in Richtung Membran.

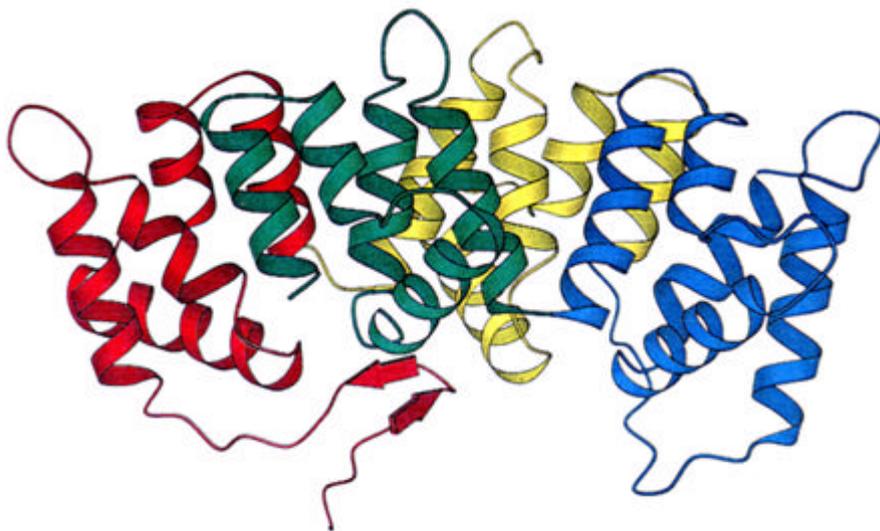


Abb. 1.2: Kristallstruktur der Annexin VII Core-Domäne aus seitlicher Sicht (schematische Darstellung). Die vier homologen Domänen sind farblich gekennzeichnet (Domäne I: rot; Domäne II: gelb; Domäne III: blau; Domäne IV: grün) (nach Liemann, 1996).

In der Regel finden sich die Ca^{2+} -Bindestellen auf der konvexen Seite der Core-Domäne, allerdings differieren sowohl die Anzahl als auch die exakte Lokalisation der Ca^{2+} -Bindestellen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Familie. Die Ca^{2+} -Bindestellen in Annexinen lassen sich strukturell prinzipiell von der Familie der „EF-Hand“-Proteine, die Ca^{2+} über ein als „Helix-Loop-Helix“-Struktur bekanntes Motiv binden, unterscheiden.

Die N-terminalen Domänen unterscheiden sich sowohl in der Sequenz als auch in der Länge. Annexin IV und V haben 12 bzw. 13 Aminosäuren lange N-Termini, bei Annexin VII umfassen sie mehr als 160 Aminosäuren. Den N-terminalen Domänen werden u.a. regulatorische Funktionen zugeordnet, da hier Stellen für Phosphorylierung, Proteolyse und Interaktion mit anderen Proteinen zu finden sind (Raynal und Pollard, 1994; Gerke und Moss, 1997). So erfolgt die „Dimerisierung“ von Annexin II über die Bindung eines 11 kDa Proteins (p11), das zur S100-Familie Ca^{2+} -bindender Proteine gehört, an seinen N-Terminus. Der entstandene 90 kDa-Komplex (Annexin II₂p11₂) zeigt eine gegenüber Annexin II deutlich gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität (Powell und Glenney, 1987). Die Phosphorylierung von Annexin I durch die EGF-Rezeptor-Kinase macht das in der Regel Ca^{2+} -unabhängige Protein empfindlicher gegen proteolytische Degradation und ändert im Gegenzug die Ca^{2+} /Phospholipid-bindenden und Vesikel aggregierenden Eigenschaften dahingehend, daß die phosphorylierte Form eine höhere Ca^{2+} -Konzentration zur Membranassoziiierung benötigt (Futter et al., 1993; Haigler und Schlaepfer, 1997).

Zusätzliche Polymorphismen innerhalb der Annexinfamilie können durch alternatives Spleißen der mRNA auftreten. Beobachtet wurde dieser Mechanismus für Annexin VI und VII. Bei der schweren Isoform von Annexin VI werden zu Beginn der siebten Sequenzwiederholung der Core-Domäne sechs zusätzliche Aminosäuren eingefügt (Moss und Crumpton, 1989). Die humanen und murinen Isoformen von Annexin VII unterscheiden sich durch eine 22 Aminosäuren lange Exonkassette am 3'-Ende der N-terminalen Domäne.

Aufgrund der konservierten Primärstruktur weisen Annexine untereinander einen hohen Grad an Homologien auf. Auch zwischen den Annexinen verschiedener Spezies treten kaum Unterschiede auf, so besteht für Annexin II von Mensch, Rind und Maus eine Homologie von 98 %.

1.1.4 Funktionen der Annexine

In über 20 Jahren Annexin-Forschung ist es gelungen, die strukturellen wie auch die biochemischen Eigenschaften der Annexine im wesentlichen aufzuklären. Über die Funktionen *in vivo* wird aber noch immer diskutiert, da bis heute keinem der zur Zeit bekannten Annexine eine spezifische Funktion zugeordnet wurde. Die meisten der vorgeschlagenen Funktionen stehen mit der Eigenschaft der Annexine in Zusammenhang, Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide zu binden. Im folgenden werden die wichtigsten

experimentellen Hinweise, die zu Hypothesen über die Funktion der Annexine Anlaß geben, kurz dargestellt.

Annexin-Funktion in Antiinflammation und Antikoagulation

Annexin I wird eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben, da Annexin I die Phospholipase A_2 (PLA_2) inhibiert, die aus Phospholipiden Arachidonsäure freisetzt. Arachidonsäure ist Ausgangssubstanz für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen (Rothhut et al., 1983). Es werden zwei Wege der antiinflammatorischen Wirkung von Annexin I propagiert, (i) die direkte spezifische Verbindung zwischen Annexin I und Phospholipase A_2 , die zu einer Inhibierung von PLA_2 führt (Kim et al., 1994), (ii) Annexin I kann mit seinem N-Terminus ähnlich wie Glukokortikoide die G-Protein-abhängige Aktivierung von PLA_2 inhibieren (Croxtall et al., 1995). Auch Annexin V wird eine regulatorische Wirkung in Entzündungsreaktionen zugeordnet, und zwar ebenfalls durch Inhibierung der PLA_2 (Chollet et al., 1992).

Eine ähnliche Situation, wie sie bei der antiinflammatorischen Wirkung der Annexine auftritt, scheint auch bei der für Annexine beobachteten Inhibition der Blutgerinnung vorzuliegen. Die Annexine II-VI wurden aus Blutplasma als Proteine mit antikoagulierender Wirkung und aus plazentalem Gewebe isoliert (Reutelingsperger et al., 1985; Funakoshi et al., 1987; Tait et al., 1988). Anionische Phospholipid-Oberflächen sind essentielle Komponenten in einigen Schlüsselreaktionen der Koagulations-Kaskade (Mann, 1984), und eine Besetzung dieser Oberflächen durch Annexine scheint daher der wahrscheinliche Mechanismus für ihre antikoagulierende Wirkung zu sein. Dabei besitzt Annexin V die höchste antikoagulierende Aktivität. Es wurde auch spekuliert, daß apoptotische Zellen Phospholipide wie Phosphatidylserin (PS) stark exponieren und so eine inflammatorische und koagulierende Aktivität zeigen. Annexin V soll dann an die PS-präsentierende, apoptotische Zelle binden und so die koagulierenden und inflammatorischen Eigenschaften der sterbenden Zelle inhibieren (Reutelingsperger und van Heerde, 1997).

Annexine als Zytoskelettkomponente

Die Annexine I-VI wurden aus Zytoskelett-Präparationen der Rinderlunge (Ikebuchi und Waisman, 1990), Annexin I und II aus dem Bürstensaumepithel des Darms isoliert (Gerke und Weber, 1984). In *in vitro*-Versuchen konnte Annexinen eine Aktin-modulierende Funktion zugewiesen werden (Burgoyne und Geisow, 1989). Für einige Annexine konnten Bindungspartner oder die Ca^{2+} -abhängigen Wirkmechanismen *in vitro* ermittelt werden, ihre physiologische Rolle bleibt aber noch immer unklar. Für Annexin II wurde gezeigt, daß der Annexin II_2p11_2 -Komplex Ca^{2+} -abhängig Zytoskelett-Moleküle wie F-Actin oder Spektrin bindet, und auch, daß der Annexin II_2p11_2 -Komplex gemeinsam mit dem S-100 Protein die

Bildung von GFAP (Glia fibrilläres saures Protein) reguliert (Thiel et al., 1992). Beide Proteine wirken gegensätzlich zueinander. Während das S-100 Protein die Polymerisation von GFAP inhibiert, hat der Annexin II₂p11₂-Komplex eine stimulierende Wirkung auf die GFAP-Bildung und somit Einfluß auf die inhibitorische Wirkung von S100-Protein. So regulieren beide Proteine die Ausbildung von glialen Intermediärfilamenten (Bianchi et al., 1995). Annexin VI hat einen ähnlichen Einfluß auf die Polymerisation von Desmin und GFAP zu Intermediärfilamenten, in dem es an S-100A und B-Proteine bindet und so deren inhibitorischen Effekt auf die Ausbildung dieser Intermediärfilamente unterbindet (Garbuglia et al., 1998). Annexin VI ist auch an der Bildung eines Membran-Zytoskelett-Komplexes in glatten Muskelzellen beteiligt. Dieser Komplex besteht aus Annexin II und VI, Actomyosin und caveolären Lipiden. Möglicherweise spielen so Annexine eine Rolle in der Regulation der sarcolemmalen Organisation während der Kontraktion glatter Muskulatur (Babiychuk et al., 1999). Auch Annexin I könnte durch seine Interaktion mit Profilin an der Regulation eines Membran-Zytoskelett-Komplexes beteiligt sein, indem es die hemmende Wirkung von Profilin auf die Polymerisierung von Aktin aufhebt. Gleichzeitig verhindert die Bindung an Profilin eine „Dimerisierung“ von Annexin I und vermindert die Bindung an Membranen (Alvarez-Martinez et al., 1996).

Annexine in Endo- und Exozytose

Für die meisten Annexine ist eine Förderung der Aggregation und Fusion von Liposomen oder sekretorischen Vesikeln nachgewiesen worden. Mit Ausnahme von Annexin I und II geschieht dies aber ausschließlich in Anwesenheit von unphysiologisch hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ($> 10 \text{ mM}$). Studien an permeabilisierten Zellen, in denen wegen der Verarmung an zytosolischen Proteinen eine Abnahme der Sekretion beobachtet wurde, legten eine Beteiligung von Annexinen an der Exozytose nahe. Die Fähigkeit zur Exozytose blieb den Zellen dagegen über einen längeren Zeitraum erhalten, wenn Annexine im Medium anwesend waren (Sarafian et al., 1987; Ali et al., 1989). Zaks und Creutz (1991) konnten an Membranen chromaffiner Granula zeigen, daß Annexin VII durch Ca^{2+} -induzierte Selbstaggregation zur Aneinanderlagerung dieser Vesikel führte. Eine Verschmelzung dieser chromaffinen Granula fand jedoch nur nach Zugabe von Arachidonsäure statt. Die physiologische Bedeutung dieser zusätzlich benötigten cis-ungesättigten Fettsäure ist unklar. Annexin VI wurde eine Beteiligung an der Endozytose zugeschrieben, da nach Präzipitation von Annexinen aus der zytosolischen Fraktion die Bildung von "Clathrin-ummantelten-Vesikeln" unterblieb. Diese Inhibierung konnte überwunden werden, wenn den immobilisierten Plasmamembranfragmenten gereinigtes Annexin VI zugefügt wurde (Lin et al., 1992). Gegen eine generelle Beteiligung von Annexin VI an endozytotischen Vorgängen sprechen aber Ergebnisse, die nach stabiler Transfektion von A431-Zellen erhalten wurden.

Zellen dieser epidermalen Karzinomzelllinie exprimieren unter natürlichen Bedingungen kein endogenes Annexin VI, und Transfektanten zeigten während der Expression von Annexin VI gegenüber Wildtyp-Zellen keine Veränderung in ihrem Endozytose-Verhalten (Smythe et al., 1994).

Annexine als Ionenkanal

Die Annexine I, II, III, V, VI und VII besitzen *in vitro* eine spannungsregulierte Ca^{2+} -Kanalaktivität. In Patch-clamp-Versuchen konnte gezeigt werden, daß sie sowohl Ca^{2+} - als auch spannungsabhängig an die Ziellmembran binden und später in diese eindringen, um einen Ionenkanal zu bilden, der spezifisch ist für Ca^{2+} und einige andere Kationen wie Ba^{2+} , Li^+ oder Cs^+ (Rojas et al., 1990).

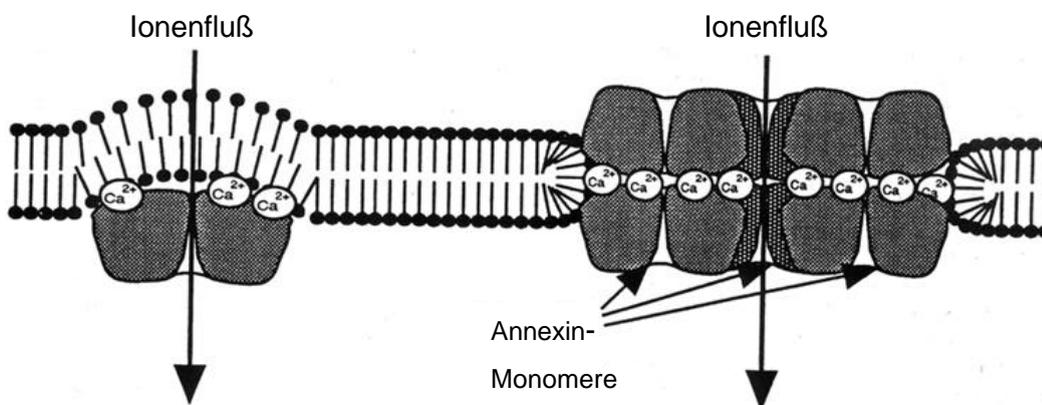


Abb. 1.3: Ionenleitung durch Annexin. Dargestellt sind zwei Modelle für Annexin-Ionenkanäle. Links: monomeres Annexin bindet Ca^{2+} -abhängig an die Innenseite der Plasmamembran. Die zentrale Pore dient als Ionenfilter. Rechts: hexameres Annexin bildet eine membrandurchspannende Struktur, wobei zwei Trimere Ca^{2+} -abhängig über ihre konvexen Seiten verbunden sind. Die Pore wird im Zentrum des Hexamers gebildet.

Mittlerweile sind die Strukturen der Annexine IVII und XII bekannt, so daß mit Hilfe gezielter Mutagenese die Aminosäuren identifiziert werden konnten, die für die Ionenleitung, Selektivität, Permeabilität und Spannungsmessung verantwortlich sind. Elektronenmikroskopische Messungen ergaben dagegen, daß Annexin V nicht die Membran penetriert, sondern sich außen anlagert. Wie das peripher gebundene Annexin V als Ionenkanal wirken kann, ist unklar (Demange et al., 1994). 1996 zeigten Kubista et al., daß Annexin V in Anwesenheit von Peroxid bei neutralem pH in die Membran von Phospholipid-Vesikeln inseriert. Zellen der von ihnen entwickelten Annexin V-defizienten DT40-Zelllinie (prä-B-Lymphozyten) zeigen zwar eine normale Ca^{2+} -Antwort auf, z.B. B-Zell-Rezeptorstimulation, aber keine anhaltende, späte Phase in der Anwesenheit von Peroxid. Diese späte Phase ist auf den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} zurückzuführen und zeigt, daß Annexin V einen Peroxid-induzierten Ca^{2+} -Einstrom vermittelt. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle von Annexin V entweder als pH-abhängiger Ca^{2+} -Kanal oder als Signalintermediat in

dem Peroxid-induzierten Ca^{2+} -influx-pathway. 1995 beschrieb die Gruppe von Haigler eine hexamere Form von Annexin XII (Lücke et al., 1995). Diese durchspannte in einer "sandwich-Form" von zwei Trimeren-Einheiten die Membran, wobei die konvexen, Ca^{2+} -bindenden Seiten nicht der Plasmamembran zugewandt sind, sondern sich intermolekular zwischen den Trimeren befinden (Abb. 1.3). Die sich bildende, zentrale Pore weist basische Aminosäuren auf, die eher auf einen Anionen- als einen Kationenkanal schließen lassen. Annexin V konnte als Trimer, nicht aber als Hexamer gezeigt werden (Pigault et al., 1994).

Regulation von Ionenkanälen

Zur Zeit werden vor allem Annexin IV und VI die Fähigkeit zur Regulation von Ionenkanälen zugeordnet. Kaetzel et al. (1994) konnten in einem Patch-Pipette-Experiment zeigen, daß exogen zugeführtes Annexin IV in der Colon Zelllinie T84 einen durch Ca^{2+} -induzierten Cl^- -Einstrom inhibiert. Dieser Effekt konnte sowohl durch Mikroinjektion von anti-Annexin IV-Antikörpern als auch durch entsprechende antisense-Oligonukleotide aufgehoben werden. Möglicherweise kann Annexin IV seinen inhibitorischen Einfluß auf den Ca^{2+} -induzierten Cl^- -Einstrom auch durch die Blockierung der Phosphorylierung des Cl^- -Kanals durch eine Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) ausüben (Chan et al., 1994).

Gunteski-Hamblin et al. etablierten 1996 transgene Mäuse, in denen Annexin VI im Herzen unter der Kontrolle des MHC-Promotors überexprimiert wurde. Diese Tiere wiesen vergrößerte, dilatierte Herzen und eine intrakardiale Fibrose auf. Isolierte Kardiomyozyten hatten einen niedrigeren Ca^{2+} -Ruhe-Wert und zeigten nach elektrischer Stimulation kleinere Ca^{2+} -Spikes. Die Wirkung von Annexin VI in Kardiomyozyten ist noch immer unklar, sollte jedoch Annexin VI die Ca^{2+} -Mobilisation unterdrücken, dann läge es nahe, daß Annexin VI auch die Exozytose in sekretorischen Zellen inhibiert oder die Wachstumsrate proliferierender Zellen verlangsamt. Annexin VI wird auch eine regulatorische Wirkung auf den Ryanodinrezeptor im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zugeschrieben. Beide Proteine kolokalisierten und die Messung der Kanalaktivität ergab bei Anwesenheit von Annexin VI eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit (ca. 3-fach) und eine verlängerte Öffnungszeit (ca. 80-fach) (Diaz-Munoz et al., 1990; Hazarika et al., 1991). Seit jedoch eine Ca^{2+} -Kanalaktivität für Annexin VI bekannt ist, wird dieser Effekt eher dieser Ionen-Kanalaktivität zugeschrieben, als der Interaktion zwischen Annexin VI und den Ca^{2+} -Kanälen des SR (Benz et al., 1996).

Erst kürzlich wurde eine Annexin VI-defiziente Mauslinie etabliert (Hawkins et al., 1999). Die Untersuchungen haben bis jetzt weder Störungen in der Entwicklung des Immunsystems, noch in kardiovaskulären Funktionen gezeigt.

1.1.5 Annexin VII (Synexin)

1978 wurde von Creutz et al. ein Protein entdeckt, das in Ca^{2+} -abhängiger Weise die Aggregation und Fusion isolierter chromaffiner Granula unterstützt. Aufgrund dieser Eigenschaft erhielt es den Namen Synexin (*synexis griech.* Treffen) und war somit das erste entdeckte Annexin. Als Annexin VII wurde es deshalb bezeichnet, da es als siebtes Mitglied der Familie kloniert und sequenziert wurde. Das Annexin VII-Gen (Anx7) ist beim Menschen auf Chromosom 10, bei der Maus auf Chromosom 14 lokalisiert. Es besteht aus 14 Exons und umspannt ca. 30 kb genomische DNA. Exon 2 bis 7 kodieren für die N-terminale Domäne, Exon 8 bis 13 für die Core-Region (Zhang-Keck et al., 1994). Mittlerweile konnte Annexin VII in den meisten Gewebstypen von Säugern nachgewiesen werden.

Das charakteristische Merkmal von Annexin VII ist sein ungewöhnlich langer N-Terminus mit 163 Aminosäuren (Mensch) bzw. 164 Aminosäuren (Maus). Neben der Länge ist auch die Zusammensetzung auffallend. Der N-Terminus enthält neben sich wiederholenden „GG“, „PP“ und „GP“-Paaren eine größere Anzahl von Motiven der Sequenz „GYP“. Ähnliche Sequenzen wurden auch in anderen membranassoziierten Proteinen wie dem *Octopus*-Rhodopsin (Ovchinnikov Yu et al., 1988), in Synaptophysin (Buckley et al., 1987; Leube et al., 1987; Sudhof et al., 1987), Annexin XI (Towle und Treadwell, 1992) und Comitin (p24) aus *D. discoideum* (Noegel et al., 1990) gefunden.

Für Annexin VII wurden sowohl im Menschen als auch in der Maus verschiedene Polymorphismen beschrieben. Durch alternatives Spleißen des Poly(A)-Signals der mRNA entstehen ein 2,0 und ein 2,4 kb Transkript. Gewebsspezifisches, alternatives Spleißen fügt am proximalen Ende der N-terminalen Domäne eine 66 Basenpaar Exonkassette (Exon 6) ein, was zur Inserierung von drei geladenen Aminosäuren in den sonst ungeladenen N-Terminus führt. Die kleinere der beiden Isoformen (47 kDa) findet sich in allen Geweben, die größere Isoform (51 kDa) wird in Gehirn, Herz und ausschließlich in der Skelettmuskulatur exprimiert (Magendzo et al., 1991). Während in undifferenzierten Myoblasten nur die kleine Isoform vorkommt, exprimieren differenzierte Myoblasten, die sich zu Myotuben fusioniert haben, beide Isoformen. Erst im Skelettmuskel findet sich ausschließlich die große Isoform (Selbert et al., 1995; Clemen et al., 1999).

Mögliche Funktionen für Annexin VII in der Ca^{2+} -abhängigen Aggregation von Phospholipidvesikeln und sekretorischen Granula, bei der Bildung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Pollard und Rojas, 1988; Pollard et al., 1991) und als Ca^{2+} /GTP-Sensor bei exozytotischer Sekretion (Caohuy et al., 1996; Pollard et al., 1990; Pollard et al., 1987) sind aus seinen *in vitro*-Aktivitäten abgeleitet worden. Einblicke in die *in vivo*-Funktionen von Annexin VII gab die Generierung einer für Annexin VII heterozygoten Mauslinie (Srivastava et al., 1999). Der Verlust des Anx7-Gens ist letal, und Anx7-defiziente Nachkommen dieser Mauslinie sterben *in utero* am 10. Tag ihrer Entwicklung. Die

heterozygoten Tiere zeigen einen ausgeprägten Phänotyp mit einem Defekt in der Ca^{2+} -Signaltransduktion und Insulinsekretion in den Langerhans-Inseln des Pankreas aufgrund einer verminderten Expression von IP_3 -Rezeptoren. Diese Defekte werden anscheinend kompensiert durch Insel-Hyperplasie und β -Zell-Hypertrophie, sowie einen erhöhten Insulingehalt in den sekretorischen Vesikeln der Inseln. Insel-Hyperplasie und β -Zell-Hyperplasie zeigen sich z.B. auch bei nicht Insulin-abhängigem Diabetes mellitus oder in der Schwangerschaft (Thomas et al., 1995). Allerdings scheinen diese Mechanismen nicht vergleichbar zu sein mit der Entstehung des Phänotyps der heterozygoten Annexin VII knock-out Maus. Vielmehr wurde spekuliert, daß Annexin VII die sekretorischen Prozesse in β -Zellen kontrolliert und somit ein bisher unbekannter zellulärer und molekularer Mechanismus für die Kontrolle der Ca^{2+} -Signaltransduktion und der Insulinsekretion in den Langerhans-Inseln besteht.

1.2 Erstellung transgener Tiermodelle durch gene targeting

Ein transgenes Tier enthält ein Segment Fremd-DNA, das sogenannte Transgen in seinem Genom. Befindet sich das Transgen stabil im Genom aller Zellen einschließlich der Keimbahn, so daß es an die Nachkommen weitervererbt werden kann, handelt es sich um eine transgene Zelllinie. Neben natürlich vorkommenden Mausmutanten bieten die in den letzten Jahren entwickelten Techniken zur gezielten Herstellung transgener Mausmodelle eine potente Strategie, Funktionen einzelner Gene *in vivo* zu untersuchen (Gordon und Ruddle, 1981). So können Auswirkungen noch unbekannter Gene aufgeklärt, Aspekte der Genexpression untersucht und neue Tiermodelle für menschliche Erbkrankheiten entwickelt werden. Grundlage der verschiedenen Methoden ist die DNA-Rekombination, durch die das eingeschleuste Transgen in das Genom einer Zelle integriert wird (Evans, 1989). Hierbei ist sowohl ein zufälliger (heterologer) Einbau, der durch Mikroinjektion in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle (Gordon und Ruddle, 1983; Palmiter und Brinster, 1985) oder retrovirale Infektion von Embryonen (Jaenisch et al., 1981; Lovell-Bedge, 1987) erreicht werden kann, als auch der Austausch der endogenen Sequenzen gegen die eingeführte Fremd-DNA im Bereich homologer Sequenzabschnitte möglich (gene targeting). Für diese homologe Rekombination ist ein doppeltes crossing over und eine Enzym-katalysierte Ausbildung einer Heteroduplex mit einer Holliday-Verbindung erforderlich (Capecchi, 1994; Haber, 1999; Holliday, 1964; Rafferty et al., 1996; Thomas und Capecchi, 1986a; Thomas et al., 1986). Bei diesem Verfahren werden homolog rekombinierte Stammzellen in Blastozysten injiziert, um transgene Tiere zu erzeugen (Gardner, 1968; Hogan et al., 1994). Gene targeting ermöglicht die gezielte und spezifische Modifikation der genetischen Information eines lebenden Organismus (Abb. 1.2). Dazu muß der Zielorganismus die transgene DNA aufnehmen und durch homologe Rekombination in sein Genom integrieren.

Für die homologe Rekombination werden linearisierte DNA-Fragmente verwendet. Führt man diese DNA durch Elektroporation in Zellen ein, so baut ein großer Teil der Zellen sie in das Genom ein (Neumann et al., 1982). Auf eine heterologe Rekombination kommen dagegen nur 10^{-2} bis 10^{-5} Zellen, die die DNA am entsprechenden Genort (homolog) integriert haben (Thomas und Capecchi, 1986b). Von den gesamten Transfektanten zeigen schließlich 10^{-3} bis 10^{-7} ein homologes Rekombinationsereignis. Wichtig für ein effizientes gene targeting ist daher die Anreicherung genetisch veränderter Zellen mit Hilfe von Selektionsmarkern im targeting-Konstrukt. Bei Säugerzellen findet zur positiven Selektion häufig die Neomycin-Phosphotransferase (neo)-Gen Verwendung, das als Bestandteil des Transgens mit in das Genom der Zielzelle eingebaut wird und unter entsprechenden Kulturbedingungen einen Selektionsvorteil bietet. Der Einbau des Neo-Gens führt zu einer Resistenz gegenüber dem Neomycinderivat G418, das bei Eukaryonten analog zu Neomycin bei Bakterien die Translation hemmt. Zusätzlich kann auch ein negativer Selektionsmarker, wie das Herpesvirus-Thymidin-Kinase-Gen benutzt werden, der die Zellen gegenüber dem Guanosinanalogon Gancyclovir empfindlich macht. So kann eine Positiv-Negativ-Selektion durchgeführt werden (Mansour et al., 1988). Dabei enthält das targeting-Konstrukt den positiven Selektionsmarker innerhalb des auszutauschenden Genbereichs, so daß er wegen der flankierenden homologen Sequenzen bei homologer Rekombination integriert wird, was letztlich zu einer Zerstörung der Genfunktion in den null-allelischen Tieren führen sollte. Der Marker der negativen Selektion grenzt an den homologen Bereich und integriert nur bei heterologer Rekombination ins Genom. Diese Strategie führt zu einer Anreicherung homolog rekombinierter Zellklone. Dennoch ist ein weiteres Screening notwendig, um die sehr geringe Anzahl homolog Rekombinanter unter den zahlreichen heterologen Rekombinationsereignissen herauszufinden.

Untersuchungen an verschiedenen Vektorsystemen haben gezeigt, daß insgesamt mindestens 1,7 kb homologe Sequenz für eine erfolgreiche homologe Rekombination erforderlich sind, und daß die Wahrscheinlichkeit eines Rekombinationsereignisses mit zunehmender Länge des homologen Bereichs steigt (Hasty et al., 1991; Hasty et al., 1992). Des weiteren fördert die Verwendung von zur DNA der Zielzelle isogener DNA die homologe Rekombination (Deng und Capecchi, 1992; te Riele et al., 1992; van Deursen und Wieringa, 1992). Damit aus den rekombinanten Zellen ein transgenes Tier entstehen kann, benötigt man totipotente Zellen, d.h. Zellen, aus denen sich jedes Organ inklusive der Keimzellen des Organismus entwickeln kann. Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die aus der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten isoliert werden können, erfüllen diese Anforderungen (Gardner und Lyon, 1971; Gardner und Rossant, 1979; Hogan et al., 1994). Werden diese Zellen an ihrer Differenzierung gehindert und in gewünschter Weise genetisch verändert, so nehmen sie nach Transfer in die ICM einer Blastozyste an der Entwicklung des

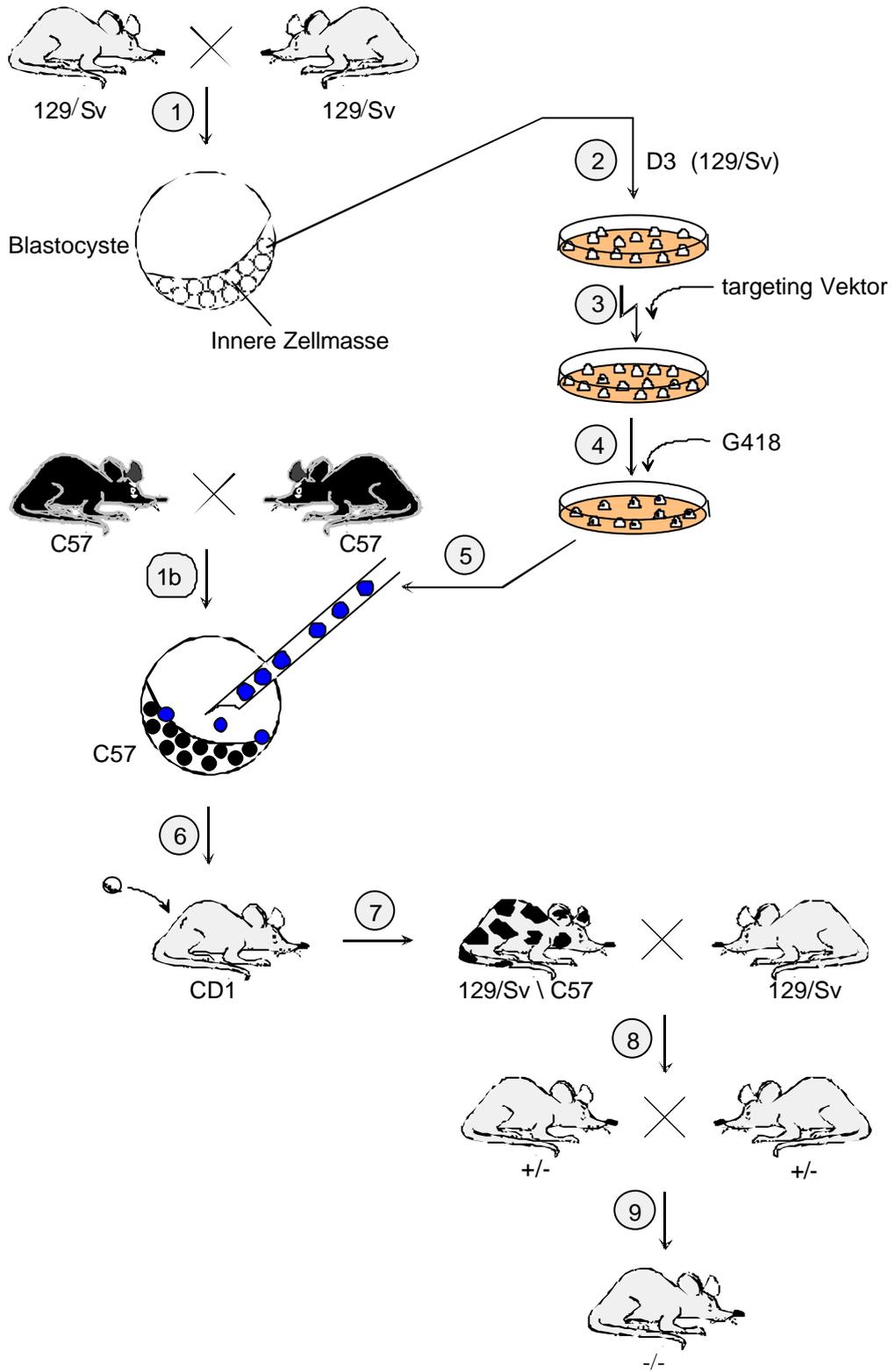
Embryos teil und können Vorläufer jeglicher Zellpopulation sein (Baribault und Kemler, 1989; Bradley, 1990). Neben der Wahl der geeigneten ES-Zellen, die möglichst wenig passagiert sein sollten, spielen für jeden ES-Zell-Typ spezifische Kultur- und Elektroporationsbedingungen eine wichtige Rolle (Brook und Gardner, 1997; Brown et al., 1992; Fedorov et al., 1997; Liu et al., 1997; Templeton et al., 1997).

Die 129er Mausstämmen, die zur Isolation von ES-Zellen verwendet werden, tragen mit dem dominanten agouti-Gen einen Fellmarker. Nach der gezielten Transfektion werden die rekombinanten ES-Zellen mit einem Mikromanipulator in Blastozysten injiziert. Dazu verwendet man in der Regel Blastozysten von Mäusen ohne agouti-Gen, z.B. von Albinos wie CD1 oder Balb/c, oder schwarzen Mäusen, wie C57Bl/6. Die veränderten Blastozysten werden dann in den Uterus scheinchwangerer Mäuse reimplantiert. Ein Teil der Nachkommen ist chimär, da er aus Körperzellen verschiedener Herkunft besteht und theoretisch zwei Elternpaare besitzt. Ein derart genetisches Mosaik kann an der gescheckten Fellfarbe erkannt werden. Ob die manipulierten Zellen auch an der Bildung der Keimbahn beteiligt sind, lässt sich durch Rückkreuzung ermitteln. Diese keimbahnchimären Tiere sind dann Ausgangspunkt für eine transgene Mauslinie und führen durch weitere Kreuzungen zu Tieren, die homozygot bezüglich ihrer Mutation sind (Abb. 1.4).

Sowohl die Annexin VI- als auch die Annexin VII-defizienten Mauslinien sind mit der Methode des gene targeting generiert worden.

Abb. 1.4 (Seite 13): Schematische Darstellung der zum gene targeting notwendigen Arbeitsschritte.

- 1) Isolation pluripotenter ES-Zellen aus der inneren Zellmasse der Blastozysten
- 1b) Isolation von Blastozysten für die Injektion von ES-Zell-Klonen
- 2) Kultivierung von ES-Zellen
- 3) Transfektion der ES-Zellen mit dem targeting-Vektor
- 4) Selektion homolog rekombinanter ES-Zell-Klone
- 5) Injektion der ES-Zellen in Blastozysten
- 6) Reimplantation in foster-Mütter
- 7) Analyse chimärer Nachkommen
- 8) Rückkreuzung chimärer Männchen mit Wildtyp-Weibchen



1.3 Aufgabenstellung

Untersuchungen zu Annexin VII haben gezeigt, daß die 51 kDa Isoform ausschließlich im adulten Skelettmuskel exprimiert wird. Im Laufe der Differenzierung der Myoblasten zu adultem Skelettmuskel findet sowohl eine Änderung in der Expression der Isoformen statt als auch eine Umlokalisierung des Annexin VII von membranösen Strukturen im Cytoplasma hin zur Plasmamembran. Ausgehend von diesen Beobachtungen scheint Annexin VII in der Myogenese eine wichtige Rolle zu spielen.

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung einer Annexin VII-defizienten Mauslinie durch gene targeting. Die Analyse dieser Mauslinie sollte Rückschlüsse auf die *in vivo* Funktion dieses Proteins ermöglichen. Dabei sollten vor allem die Skelettmuskulatur und das Herz auf mögliche Veränderungen untersucht werden. Eine verminderte Expression von Annexin VII in Annexin VII heterozygoten knock-out Mäusen führte im Pankreas zu einem Defekt in der Insulinsekretion (Srivastava et al., 1999). Aufgrund dieser Beobachtung wurden auch hier physiologische Messungen an isolierten Langerhans'schen Inseln vorgenommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme, Inhibitoren und Antikörper

Enzyme für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Polymerase I	Sigma
Klenow-Fragment	Life Technologies
DNase I (Desoxyribonuklease)	Sigma
Lysozym	Sigma
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Restriktionsendonukleasen	Life Technologies, Amersham
Ribonuklease A	Sigma
T4-DNA-Ligase	Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase	Roche

Antikörper

Primäre Antikörper:

Anti-Caveolin	Transduction Laboratories
Anti-Desmin-Antikörper	Sigma
Anti-Dystrophin-Antikörper	Sigma
Anti-Myosin-Antikörper	Sigma
Anti-Annexin I-Antikörper	wurden freundlicherweise von
Anti-Annexin II-Antikörper	Dr. V. Gerke zur Verfügung
Anti-Annexin IV-Antikörper	gestellt
Anti-Annexin VI-Antikörper	
Anti-Annexin V-Antikörper	wurde freundlicherweise von

Anti-Annexin VII-Antikörper mAk 203-80	unveröffentlicht
Anti-Annexin VII-Antikörper mAk 203-217	Selbert et al., 1995
Anti-Annexin VII-Antikörper mAk 204-289	Selbert et al., 1995
Anti-Annexin VII-Antikörper mAk 204-62	Selbert et al., 1995
Anti-Annexin VII-Antikörper (polyklonal)	diese Arbeit

Sekundäre Antikörper:

Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, TRITC-Konjugat	Sigma
Maus-anti-Ziege/Schaf-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma

Inhibitoren

Benzamidin	Sigma
DEP (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Ribonuklease-Inhibitor (RNAsin)	Promega
Complete [®] Inhibitoren-Cocktail	Roche

Antibiotika

Ampicillin	Grünenthal
Geneticin (G418)	Life Technologies
Mitomycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

2.1.2 Reagenzien

Acrylamid (Protogel: 30:0,8 AA/Bis-AA)	National Diagnostics
Agarose (electrophorese grade)	Life Technologies
Aceton p.a.	Riedel-de-Häen
Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton	Difco
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth
Chloroform p.a.	Riedel-de-Haen
Coomassie-Brilliant-Blau R 250	Serva
p-Cumarsäure	Fluka
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Biochrom
DMF (Dimethylformamid)	Riedel-de Haen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Gerbu
E64 (trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido (4-guanidino))-butan	Sigma
EDTA (Ethylendinitrotetraessigsäure)	Merck
EGTA (Ethylenglycolbis[2-aminoethylether]- N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma
Ethanol	Riedel-de-Haen
Ethidiumbromid	Sigma
FCS (Fötale Kälberserum)	Biochrom, Life Technologies
Fischgelatine	Sigma
Formamid	Merck
Formaldehyd	Sigma
Glycin	Degussa
Harnstoff (ultrapure)	Pharmacia
Hefeextrakt	Oxoid
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Sigma
Isopropanol	Merck
LIF ESGRO [®] (leukaemia inhibitory factor)	Life Technologies
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol p.a.	Riedel-de-Haen
Methylbenzoat	Fluka
Mineralöl	Pharmacia
MOPS ([Morpholino]propansulfonsäure)	Gerbu
Natriumazid	Merck
Nukleotide	Roche
NP-40 (Ethylphenylpolyethylenglycol)	Fluka
Paraformaldehyd	Sigma
Pepton	Roth
PEG 8000	Serva
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck
Tris (hydroxymethyl)aminomethan (ultrapure)	Sigma
Triton-X-100 (Octylphenylpoly(ethylenglycolether))	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-momolaurat)	Roth
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Roth
Xylol p.a.	Fluka

Radionuklide

α - ³² P-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (10 mCi/ml)	Amersham
α - ³² P-Desoxycytosin-5'-triphosphat (10 mCi/ml)	Amersham

Alle übrigen nicht aufgeführten Chemikalien in p.A. Qualität wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma, und Riedel-de-Haen bezogen.

2.1.3 Kits

Nucleobond PC 500	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plus	Macherey-Nagel
Stratagene Prime® It II	Stratagene
Original TA Cloning®	Invitrogen

2.1.4 Bakterienstämme

E. coli BL21 (DE)	Studier und Moffat, 1986
E. coli DH5 α	Hanahan, 1983
E. coli JM 38	Vieira und Messing, 1982
E. coli XL1 blue	Bullock et al., 1987

2.1.5 Vektoren

pBluescript SK	Stratagene
pGemTeasy	Kit: Promega
pM1P:BS	diese Arbeit
pPNT	
pUC19	Yanisch-Perron et al., 1985

2.1.6 Oligonukleotide

Die für Sequenzierungen oder die Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) eingesetzten Oligonukleotide sind von der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg bezogen worden.

Oligonukleotide für Annexin VII aus der Maus:

Ex5f:	5'-GGACAAGCTCCCTACCCTAG-3'
Ex5 rev:	5'-CTGTCCTCCAGAAAGCCAC-3'
Ex8rev:	5'-CTTGCCATACATGGTCTTAAAAG-3'
Ex9:	5'-GGAGCTTACGGAAGGCAATGCAG-3'
MSynS:	5'-ATGTCATACCCAGGCTAT-3'
Msynrev2:	5'-CCGAATCTGGCCAACGATGGC-3'
Syn3:	5'-GCTTAGCAAATCGCGATTAGCC-3'

Oligonukleotide für die Neomycin-Resistenzkassette:

Neo-uni:	5-AGGATCTCCTGTTCATCTCACCTTGCTCCTG-3'
Neo-rev:	5'-AAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG-3'
Neo-5' rev:	5'-CCTGCGTGCAATCCATTCTTGTTTC-3'

Oligonukleotide für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH):

GAPDH 5': 5'-GAAATTCACAAGGATCAACC-3'

GAPDH 3': 5'-GTCCATTAAGTGGCTATGC-3'

2.1.7 Medien für *E. coli*-Kulturen (Sambroock et al., 1989)

Die verwendeten Medien werden mit deionisiertem Wasser, das über eine Ionenaustauschanlage (Membrapure) gefiltert wird, angesetzt und bei 120 °C autoklaviert. Antibiotika werden nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50 °C zugegeben. Das Gießen der Platten erfolgt mit einer halbautomatischen Plattengießmaschine.

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

SOC-Medium:

20 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
20 mM Glucose
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

Für Agarplatten werden den Medien 0,9 % (w/v) Agar und bei Bedarf 100 mg/l Ampicillin zugesetzt. Für Farbindikatorplatten zur Blau/Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanten werden die fertigen Platten jeweils mit 50 µl 0,1 M IPTG-Lösung und 90 µl X-gal-Lösung (2 % in DMF) bestrichen.

2.1.8 Puffer und andere Lösungen

Puffer und Lösungen, die hier nicht verzeichnet sind, finden sich unter den jeweiligen Methoden.

100x Denhardt's Reagenz:

2 % Ficoll 400
2% Polyvinylpyrrolidon
2 % Rinderserumalbumin

1,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8):

1,2 M Na₂HPO₄ wurde mit 1,2 M NaH₂PO₄
in einem Verhältnis von 2:1 gemischt.

10 x MOPS (pH 7,0/ pH 8,0):

20 mM MOPS
50 mM Natriumacetatlösung
1 mM EDTA-Lösung

10x NCP-Puffer (pH 8,0):

100 mM Tris/HCl
1,5 M NaCl
5 ml Tween 20
2,0 g Natriumazid
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

PBS (pH 7,2):

10 mM KCl
10 mM NaCl
16 mM Na₂HPO₄
32 mM KH₂PO₄
auf 1 l mit Wasser auffüllen.

PBG (pH 7,4):

0,5 % BSA
0,045 % Fischgelatine
in 1 x PBS

Spannungsverstärker Power Pac 200 o. 300		Bio-Rad
Spektralphotometer	Typ Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Tischzentrifugen:	Kühlzentrifuge Biotech fresco	Heraeus Instruments
	Sigma	B. Braun Biotech Instruments
Ultra-Turrax		IKA Labortechnik
Ultrazentrifuge Optima TLX		Beckmann
UV-Aufflichtmonitor TFS-35 M		Faust
UV-Transilluminator		MWG-Biotech
Vortex REAX top		Heidolph
Wasserbäder		GFL
Zentrifugen:	Beckman Avanti J25	Beckman
	Sorvall RC 5C plus	Sorvall

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Holmes und Quigley, 1981)

STET-Puffer:

- 8 % Saccharose
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 50 mM EDTA
- 0,5 % Triton X-100

Diese Methode ist geeignet, eine große Anzahl von Versuchsansätzen parallel zu bearbeiten. Die Methode beruht darauf, daß Proteine, Zellwandmaterial und chromosomale DNA beim Erhitzen auf knapp 100 °C koagulieren und abzentrifugiert werden können, während RNA und Plasmid-DNA löslich sind und im Überstand bleiben.

1,5 ml einer Übernachtskultur (ÜK) wurden in 350 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 20 µl Lysozymlösung (20 mg/ml) für 5 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend 1 min auf 95 °C erhitzt und zentrifugiert (15 min, 13.000 UpM, RT). Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und 10 min bei 10.000 UpM pelletiert. Die DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, ca. 15 min bei RT getrocknet und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Die so erhaltene Plasmid-DNA konnte in Testrestriktionen und zur Transformation eingesetzt werden.

2.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mikromaßstab gemäß Macherey-Nagel

Um bis zu 40 µg saubere Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen zu gewinnen, wird das von der Firma Macherey-Nagel angebotene „NucleoSpin Plus“-Kit benutzt. Hierzu werden 5 bis 10 ml einer *E. coli*-ÜK in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthält, abzentrifugiert. Das Pellet wird dann mit 250 µl Lösung A1, die RNase enthält, versetzt. Danach werden 250 µl Lösung A2 zugegeben, drei- bis fünfmal geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Infolge der SDS- und Alkalibehandlung werden bei diesem Reaktionsschritt die Zellmembranen zerstört und durch die RNase die RNA verdaut. Anschließend erfolgt die Zugabe von 300 µl eiskalter Lösung A3 zur Reaktionsmischung, die dann gemischt und

5 min auf Eis inkubiert wird. Dadurch werden Proteine, chromosomale DNA und andere Zellbestandteile gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wird der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Es wird 1 min bei 18.000 x g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bindet. Anschließend wird die Säule zuerst mit 500 µl Puffer AW und dann mit 700 µl Puffer A4 gewaschen. Danach wird noch einmal ohne vorherige Pufferzugabe zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Zur Elution werden schließlich 50 µl Lösung AE auf die Säule gegeben, 1 min bei RT inkubiert und dann 1 min bei 18.000 x g zentrifugiert. Für größere Mengen sauberer Plasmid-DNA wurde das NukleoBond PC 500-Kit benutzt. Dieses Kit arbeitet nach dem gleichen Prinzip, ermöglicht aber die Aufreinigung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA.

2.2.3 Präparation chromosomaler DNA aus ES-Zellen (Hogan et al., 1994)

Lysis-Puffer:

- 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
- 5 mM EDTA
- 0,2 % SDS
- 200 mM NaCl
- 100 µg/ml Proteinase K

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden ES-Zellen auf gelatinierten 24-Lochplatten kultiviert. Nach Entfernen des Kulturmediums und Waschen mit 1 ml PBS wurden die Zellen mit 500 µl Lysis-Puffer versetzt und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Das Zell-Lysat wurde anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugieren (3 min, 3000 x g, RT) sedimentiert. Anschließend wurde die DNA mit 500 µl 70%igem EtOH gewaschen, bei RT getrocknet, in 40 µl TE (pH 8,0) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst. Von diesen DNA-Präparationen wurden 20 µl für einen Restriktionsverdau eingesetzt.

2.2.4 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien

Lysis-Puffer:

- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 100 mM EDTA (pH 8,0)
- 100 mM NaCl
- 1 % SDS
- 100 µg/ml Proteinase K

Die Bestimmung des Genotyps der Mäuse erfolgte mit genomischer DNA aus Schwanzspitzen (Hogan et al., 1994). 0,5-1 cm Schwanzspitze wurden in 500 µl Lysis-Puffer und 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55 °C über Nacht im Schüttler bei 850 UpM lysiert. Danach wurde die DNA mit Phenol (TE-gesättigt) und Chloroform extrahiert, außerdem wurden so restliche Proteine und RNA entfernt. Für die DNA-Präzipitation wurde der erhaltene Überstand mit 1 Vol Isopropanol versetzt. Die DNA wurde mit einem Glashaken

gefischt, mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und schließlich in 60 µl TE-Puffer (pH 8,0) über Nacht bei 4 °C gelöst. Von diesen DNA-Präparationen wurden 20 µl für eine Southern-Blot-Analyse eingesetzt.

2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

DNA-Probenpuffer:

40 % Saccharose
0,5 % SDS
0,25 % Bromphenolblau
in TE-Puffer

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA nach Restriktionen und PCR-Reaktionen, sowie der gezielten präparativen Isolierung von PCR-Produkten und einzelner DNA-Fragmente eingesetzt. Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgt aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix. Je nach Auftrennungsziel und Verwendung des Gels wurden 0,5 bis 2%ige Gele in TAE-Puffer als Gel- und Laufpuffer eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen verschiedener Größen (7,5 cm x 8 cm; 11,5 cm x 14 cm; 13 cm x 19 cm) in der Regel bei einer Spannung von 10 V/cm. Die Auftrennung von restringierter, genomischer DNA erfolgte in 0,5%iger Agarose bei 5 V/cm für 8 h. Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer zugesetzt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) enthielten die Agarose-Lösungen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein geeigneter Größenstandard zusätzlich aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren der mit UV-Licht bestrahlten Gele mit einem Videodokumentationssystem.

DNA-Größenstandards:

100 bp DNA Leiter (Life Technologies):	von 100-1500 bp in 100 bp-Schritten; 2072 bp
1 kb DNA Leiter (Life Technologies):	12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp
Hochmolekular-Standard (Life Technologies):	8,3; 8,6; 10,1; 12,2; 15,0; 17,1; 19,4; 22,6; 24,8; 29,9; 33,5; 38,4; 48,5 kb

2.2.6 Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975)

Denaturierungspuffer:

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Transferpuffer:

1,5 M NaCl
0,25 M NaOH

Das als Southern-Blot bezeichnete Verfahren dient dazu, die nach Größe aufgetrennte DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen zu transferieren. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Probe können spezifische Fragmente identifiziert werden. In

dieser Arbeit wurde ein alkalischer Transfer angewendet.

Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wurde gemeinsam mit einem angelegten Lineal bei einer Wellenlänge von 302 nm photographiert, um eine spätere Größenbestimmung der Signale zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel zunächst 10-20 min in 0,25 M HCl geschüttelt und dann 20 min in Denaturierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte in Transferpuffer über einen Zeitraum von 18 h aufgrund von Kapillarkräften. Dabei lag das Agarosegel auf zwei in Transferpuffer getränkten Whatman 3 MM Papier mit Kontakt zu einem 20 x SSC-Lösungsreservoir. Das Gel wurde mit der in Wasser befeuchteten Nylonmembran, mit drei feuchten Whatmann 3 MM Papieren und mit einem ca. 7 cm dicken Stapel von Saugpapier überschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC-Lösung inkubiert, luftgetrocknet und zur Fixierung 1 h bei 80 °C gebacken. Die Nylonmembran wurde bis zu ihrer Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Gewebe

Zum Schutz vor RNasen werden während des Arbeitens stets Handschuhe getragen. Außerdem werden nur sterile Plastikgefäße und Pipetten sowie autoklavierte Lösungen verwendet.

Lösung D:

- 4 M Guanidinium-Isothiocyanat
- 25 mM NaCitrat (pH 7,0)
- 0,5 % Sarcosyl
- 0,1 M 2-Mercaptoethanol

Gesamt-RNA wurde mit Trizol® (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers oder nach der Guanidinium-Isothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktionsmethode gewonnen (Chomczynski und Sacchi, 1987). Dazu wurden die Organe in Lösung D homogenisiert, und die RNA anschließend mit 0,2 M Natriumacetat (pH 3,2) und Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA wurde danach mit Isopropanol gefällt, mit 75%igem EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser aufgenommen. Aliquots wurden bei -80 °C aufbewahrt oder direkt gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.8 RNA-Agarose-Gelelektrophorese (Lehrach et al., 1977)

RNA-Puffer:

- 50 % Formamid
- 6 % Formaldehyd
- in MOPS-Puffer (pH 7,0)

RNA-Farbmarker:

- 50 % Saccharose
- 0,25 % Bromphenolblau
- in DEP-Wasser

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1% Agarose verwendet, und wie folgt hergestellt: 1,5 g Agarose wurde mit 15 ml 10 x MOPS-Puffer (pH 8,0) und 121 ml DEP-Wasser aufgeköcht und auf 60 °C

abgekühlt. Dann wurden 24 ml 36%ige Formaldehydlösung hinzugegeben, die Mischung in eine Flachbett-Gelapparatur (12,5 cm x 20 cm) gegossen und das Gel nach Erhärten mit MOPS-Puffer (pH 7,0) überschichtet. Die RNA wurde mit 1/3 Vol RNA-Puffer versetzt, 5 min bei 68 °C denaturiert und nach Zugabe von 2 µl RNA-Farbmarker sofort auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 2 V/cm.

2.2.9 Northern-Blot

Nach der Elektrophorese wurden die RNA-Gele zunächst 5 min in Wasser und anschließend 5 min in 20 x SSC-Lösung gewaschen. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht in 20 x SSC Lösung analog zum Southern-Blot (2.2.6). Die Membranen wurden nach dem Transfer in 2 x SSC-Lösung gewaschen, kurz getrocknet und im UV-Crosslinker bestrahlt.

2.2.10 Radioaktive Markierung von DNA-Proben mit dem Stratagene Prime^â It II-Kit

Die zur Markierung verwendete DNA wurde mit Restriktionsenzymen aus Plasmiden geschnitten oder durch PCR-Reaktion (2.2.15) gewonnen. Es wurden ungefähr 25 ng DNA mit Wasser zu einem Endvolumen von 24 µl aufgefüllt und mit 10 µl random-oligonucleotide-primer versetzt. Die Probe wurde 5 min auf 92 °C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 10 µl 5 x Primer-Puffer, 5 µl α -³²P-dATP (50 µCi) und 2 U Klenow-Enzym versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Zentrifugation (3.000 UpM, 2 min) über eine 1 ml Sephadex G-50-Säule in TE-Puffer abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde vor ihrem Einsatz im Southern- oder Northern-Blot bei 100 °C für 10 min denaturiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt.

2.2.11 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden

Für Nylonmembranen nach Southern-Transfer:

Church-Puffer:

0,5 M NaPO₄ (pH 7,15)
7 % SDS
1 mM EDTA
1 % BSA

Church-Waschpuffer:

40 mM NaPO₄ (pH 7,15)
1 % SDS
1 mM EDTA

Die mit 2 x SSC-Lösung angefeuchtete Nylonmembran wurde in einer Hybridisierungsröhre für 1 h mit 10 ml Church-Puffer bei 65 °C vorhybridisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der radioaktiven Sonde an die Membran wurde während der Vorhybridisierung 100 µl denaturiertes Heringssperma (10 mg/ml; Sigma) zur Lösung gegeben. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Probe zur Vorhybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung für 18 h bei 65 °C. Danach wurde die radioaktive Probe abgegossen und die Membran zweimal für 15-20 min bei 37 °C mit Church-Waschpuffer gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die

Membran in Polyethylen-Folie eingepackt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -70 °C exponiert.

Für Nylonmembranen nach Northern-Transfer:

Hybridisierungspuffer (pH 7,15):

50 % Formamid
1 % Natriumlaurylsarcosinat
2 mM EDTA (pH 7,2)
0,2 % SDS
0,12 M Phosphatpuffer (pH 6,8)
in 2 x SSC
4 x Denhardt's Reagenz

Waschpuffer (pH 7,15):

Hybridisierungspuffer
ohne 4x Denhardts Reagenz

Die hier angeführten Hybridisierungsbedingungen sind eine Abwandlung der von Mehdy et al. (1983) veröffentlichten Technik. Die Methode entspricht der für den Southern-Transfer beschriebenen Vorgehensweise. Allerdings erfolgte die Hybridisierung mit Hybridisierungspuffer und die Waschschrte mit Waschpuffer bei 37 °C.

2.2.12 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Firma Macherey-Nagel.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zu je 100 mg Agarosegel wurden jeweils 300 µl Puffer NT 1 pipettiert. Die Probe wurde 10 min auf 50 °C erwärmt, zwischendurch geschüttelt und anschließend auf eine NucleoSpin-Säule geladen. Die Säule wurde zentrifugiert (6.000 x g, 1 min) und der Durchfluß verworfen. Es folgten 2 Waschschrte mit je 700 µl Puffer NT3 und Zentrifugation (10.000 x g, 1 min). Nach erneuter Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ohne Zugabe des Puffers NT3 wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Elution mit 50 µl Puffer NE.

2.2.13 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch mit TE-Puffer oder Wasser. als Referenz bestimmt. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm entspricht eine OD von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, bzw. 40 µg/ml RNA (Sambrook et al., 1989). Über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen läßt sich mit Hilfe des Quotienten OD_{260}/OD_{280} eine Aussage machen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung als rein angesehen werden.

2.2.14 In vitro-Rekombination von DNA

2.2.14.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem und unter den empfohlenen Temperaturbedingungen. Pro μg DNA wurden 2 bis 10 Enzymeinheiten (U) eingesetzt. Plasmid-DNA wurde 1-2 h, chromosomale DNA mindestens 12 h verdaut. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert.

2.2.14.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden von linearisierten Vektoren

10 x CIAP-Puffer (pH 9,0):

- 0,5 M Tris/HCl
- 10 mM MgCl_2
- 1 mM ZnCl_2
- 10 mM Spermidin

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden endständige 5'-Phosphat-Gruppen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) entfernt.

Linearisierte Vektor-DNA (5-10 μg) wurde in einem 50 μl Ansatz mit 3 U alkalischer Phosphatase in CIAP-Puffer bei 37 °C für 30 min dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C (10 min) gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der linearisierte Vektor wurde mit dem „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert.

2.2.14.3 Bildung von glatten DNA-Doppelstrangenden

Mit Hilfe der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) können überhängende 3'-Enden der DNA abgebaut werden. Das Klenow-Fragment enthält eine 3'-Exonukleaseaktivität, die einzelsträngige DNA vom 3'-Ende her abbauen kann, so daß glatte DNA-Doppelstrangenden entstehen.

Der Abbau erfolgte in 50 μl Ansätzen, wobei pro 1 μg DNA 5 U Klenow-Enzym hinzugefügt wurden. Die Ansätze wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert und das Klenow-Enzym durch Inkubation für 20 min bei 68 °C inaktiviert. Die DNA wurde nach Zugabe des DNA-Probenpuffers in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Kit der Fa. Macherey-Nagel aus dem Gel isoliert.

2.2.14.4 Ligation von Vektor- und DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysierter Vektor-DNA.

Zur Verbindung glatter Enden wurde 24 h bei 21 °C, zur Verbindung überhängender Enden 12-16 Stunden bei 8 °C im vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer inkubiert. Für die

Ligation kleiner Fragmente (< 1000 Bp) wurde ein etwa 10fach molarer Überschuß des Fragments eingesetzt, große Fragmente (> 3000 Bp) wurden mit der halben Menge Vektor ligiert. Die verwendeten Vektoren waren in der Regel dephosphoryliert.

2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR kann bei Wahl geeigneter Oligonukleotide zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden (Saiki et al., 1985). Dazu werden eine doppelsträngige DNA-Vorlage (template-DNA) und zwei begrenzende Oligonukleotide (Primer) einer kontinuierlich aufeinanderfolgenden Reihe von Denaturierungen, Primer-Hybridisierungen (Annealing) und DNA-Polymerisierungen (Extension) in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und hitzeresistenter *Taq*-DNA-Polymerase (Chien et al., 1976) ausgesetzt. Die Oligonukleotide haben unter Umständen an den Enden einen Überhang von nicht hybridisierenden Nukleotiden, mit deren Hilfe andere Sequenzen, wie z. B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, eingeführt werden können.

Um die template-DNA zu Beginn der Reaktion vollständig zu denaturieren, wurde eine initiale Denaturierung von 5 min bei 94 °C gewählt. Für den letzten Zyklus wurde eine Polymerisationsdauer von 10 min benutzt, um vollständig polymerisierte Endprodukte zu erhalten. Die Annealing-Temperatur (T_H) eines bestimmten Oligonukleotids wurde anhand seiner Basenzusammensetzung folgendermaßen abgeschätzt (Suggs et al., 1981):

$$T_H = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2$$

Mit einem programmierbaren „Thermocycler“ werden die Zyklen automatisch gesteuert. Die DNA kann aus Agarosegelen isoliert werden.

Reaktionsansatz:

- x µl template-DNA (100 ng cDNA, 100 ng Plasmid-DNA)
- 1 µl Oligonukleotid A (10 pmol/ml)
- 1 µl Oligonukleotid B (10 pmol/ml)
- 1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
- 5 µl 10 x PCR -Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 8,3;) 500 mM KCl; 20 mM MgCl₂)
- 1 µl *Taq*-Polymerase (3-4 U)
- mit Wasser. auf 50 µl auffüllen.

Die Reaktionsparameter (Temperaturen, Zeiten) wurden den jeweiligen Bedingungen angepaßt. Die Annealing-Temperatur wurde so gewählt, daß sie etwa 2 °C unter der geschätzten Schmelztemperatur der Primer lag. Das Standard-PCR-Programm umfaßte folgende Schritte:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| I. Initiale Denaturierung: | 94 °C, 5 min |
| II. Temperaturzyklus (25-35 Zyklen): | Denaturierung (94 °C, 1 min)
Primer-Annealing (58-64 °C, 1 min)
Primer-Extension (72 °C, 30-120 sek) |
| III. Terminale Verlängerung: | 72 °C, 10 min |
| IV. Kühlung auf 4 °C | |

2.2.16 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA in DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA verwendet. Für die Umschreibung in cDNA wurden Hexanukleotide ($p(dN)_6$) gewählt, die während der Reaktion an beliebigen Stellen der RNA binden und so die Synthese vieler cDNA-Stränge ermöglichen.

Für die RT-Reaktion wurden 400 ng Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem folgenden Protokoll in cDNA umgeschrieben:

- 0,5 μ l 10 mM dNTP-Mix
- 1 μ l 50 μ M $p(dN)_6$
- 0,5 μ l M-MLV-Transkriptase (Promega)
- 2 μ l 5 x RT-Puffer
- 0,5 μ l RNAsin (40 U/ μ l; Promega)
- 400 ng Gesamt-RNA
- Wasser auf 10 μ l
- 1 h Inkubation bei 37 °C

Die Ansätze wurden anschließend zur PCR eingesetzt.

Die PCR-Produkte wurden in Agarosegelen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel eluiert. Die Amplifikate wurden in den Vektor pGemTeasy nach Angaben des Herstellers (Promega) ligiert.

2.2.17 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.2.17.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

1 l LB-Medium wurde mit 5 ml einer ÜK angeimpft und bei 37 °C mit 250 UpM kultiviert, bis eine OD_{600} von 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und dann abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit insgesamt 1 l autoklaviertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ml 15%igem autoklaviertem Glycerin resuspendiert und bei 3.000 x g und 4 °C pelletiert. Nach erneutem Resuspendieren in 1 bis 2 ml 15%igem Glycerin wurden 50 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.17.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

Zur Transformation wurden die Zellen (50 μ l) auf Eis aufgetaut und 1 μ g Plasmid-DNA oder ein Drittel eines gefällten und in Wasser aufgenommenen Ligationsansatzes zupipettiert. Nach 10 min wurde das Zell-Plasmid-Gemisch in eine eiskalte Elektroporationsküvette gefüllt und die Zellen bei 200 Ω , 2,5 kV und 25 μ F transformiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium (Sambrook et al., 1989) aufgenommen, 45 min bei 37 °C inkubiert und 10 und 100 μ l Aliquots auf die entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert.

2.2.17.3 *E. coli*-Dauerkulturen

Wichtige Transformanten werden als Dauerkultur konserviert. Dazu wurden diese als ÜK in LB-Selektions-Medium angezogen und mit 10 % DMSO bei -80 °C aufbewahrt.

2.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.3.1 Induktion und Extraktion rekombinanter Proteine

TEDABP-Puffer:

- 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 1 mM DTT
- 1 mM EGTA
- 0,02 % Natriumazid
- 1 mM Benzamidin
- 0,5 mM PMSF

Für die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren ϕ T7 p -Promotors wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet.

ÜK's der entsprechenden Transformanten wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt, und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 unter Schütteln (250 UpM) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) induziert, die Zellen wurden anschließend weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt und nach der Ernte durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min) in TEDABP-Puffer resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

Der Aufschluß der *E. coli* Zellen erfolgte entweder durch Ultraschall (4 x 10 s, höchste Stufe), oder nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 0,1 mg/ml) durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen. Das Zellhomogenat wurde 20 min bei 30.000 x g zentrifugiert und der Überstand analysiert.

2.3.2 Herstellung von Proteinhomogenaten aus Organen der Maus

Die Organe wurden durch zervikale Dislokation getöteten Tieren entnommen und entweder sofort weiterverarbeitet oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf wurde schockgefrorenes Gewebe lyophilisiert.

100 mg Organgewebe wurde mit 6 Vol kaltem TEDABP-Puffer (2.3.1) versetzt, mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (30.000 x g, 20 min) und Überstand und Pellet analysiert bzw. bei -80 °C gelagert. Um mehrmaliges Auftauen zu vermeiden, wurde das Homogenat aliquotiert.

2.3.3 Extraktion von Annexin-Proteinen (Gerke und Weber, 1984)

Um Annexine aus einem Proteinhomogenat anzureichern, macht man sich ihre Legenschaft zu nutzen in Gegenwart von Ca^{2+} an Phospholipide zu binden. In einem Zellysat werden Annexine in Gegenwart von Ca^{2+} an Zellmembranfragmente gebunden und mit diesen pelletiert. Waschschriffe mit einem Ca^{2+} -haltigen Puffer folgen, um hauptsächlich die Annexin-Membran-Komplexe im Pellet zu erhalten. Anschließend werden die Annexine in Gegenwart von EGTA von den Membranen gelöst.

Puffer A:

20 mM Tris-HCl (pH 7,7)
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
1 mM DTT
0,25 mM PMSF

Puffer B:

50 mM Imidazol
150 mM NaCl
0,5 mM EGTA

Organgewebe wurde in 10 Vol Puffer A mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde mit E64 und CaCl_2 (Endkonzentration 5 μM , bzw. 5 mM) versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (25.000 x g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 Vol Puffer A mit E64 und CaCl_2 (Endkonzentration 5 μM , bzw. 2 mM) resuspendiert und danach wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschschriff wurde noch zweimal wiederholt. Abschließend wurde das Pellet in 34 Vol Puffer A mit 10 mM EGTA (pH 7,5) resuspendiert und für 20 min unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert. Der Proteinextrakt wurde ultrazentrifugiert (100.000 x g, 1 h, 4 °C), der Überstand bei -20 °C gelagert, das Pellet in 200 μl Puffer A aufgenommen und über Nacht gegen Puffer B dialysiert. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden für eine Western-Blot-Analyse eingesetzt.

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung des Bradford-Reagenz (Sigma) nach der Methode von Bradford et al. (1976) bestimmt.

Sowohl für die Probe als auch für den Standard wurden für jeden Ansatz 33 μl Proteinlösung mit 33 μl Wasser versetzt. Anschließend wurde 1 ml Bradford-Reagenz hinzugegeben. Nach 5 min wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich der Extinktionswerte mit BSA-Standards (1-20 μg) ermittelt.

2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

	Trenngel ¹			Sammelgel ¹
	10 %	12 %	15 %	5 %
Acrylamid ¹ 30:0,8 (ml)	19,7	23,6	30	
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (ml)	16	16	16	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (ml)				2
10 % SDS (µl)	590	590	590	200
TEMED (µl)	23	23	23	8
10 % APS (µl)	165	165	165	80
Wasser (ml)	23,5	19,6	13,2	14,3

1) Mengenangaben für 12 Minigele; 2) Acrylamid : Bisacrylamid

5 x SDS-Probenpuffer:

2,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,5
 4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat
 2,0 ml Glycerin
 1,0 ml 14,3 M β-Mercaptoethanol
 200 µl 10 % Bromphenolblau

10 x SDS-PAGE-Laufpuffer:

0,25 M Tris
 1,9 M Glycin
 1 % Natriumdodecylsulfat

Molekülmassenstandard:

LMW-Marker (Pharmacia) (kDa):

94; 67; 43; 30; 24; 20,1; 14,4

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurden 10 bis 15%ige Trenngele in einer Größe von 7,5 cm x 10 cm x 0,05 cm mit 5 %igem Sammelgel verwendet. Die aufzutrennende Proteinlösung wurde je nach Bedarf mit unterschiedlichen Mengen SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 9-15 V/cm in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer. Als Molekülmassenstandard wurde ein Proteinmarker parallel behandelt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder durch Semi-Dry-Transfer auf Nitrocellulose übertragen.

2.3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Rehydrationspuffer:

8 M Harnstoff
 2% Triton X-100
 0,5 % IPG-Puffer
 wenige Körnchen Bromphenolblau
 zugeben; bei -20 °C aufbewahren;
 2 mg/ml DTT wurden frisch zugegeben.

Protein-Lysispuffer:

8 M Harnstoff
 4 % Triton X-100
 0,5 % IPG-Puffer
 40 mM Tris
 wenige Körnchen Bromphenolblau
 zugeben; bei -20 °C aufbewahren;
 5 mg/ml DTT wurden frisch zugegeben.

Äquilibriumspuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,8)
 6 M Harnstoff
 30 % (v/v) Glycerin
 2 % SDS
 wenige Körnchen Bromphenolblau
 zugeben; bei -20 °C aufbewahren.

Puffer A:

10 ml Äquilibriumspuffer
 mit 100 mg DTT

Puffer B:

10 ml Äquilibriumspuffer
 mit 250 mg Iodacetamid

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine aus einem Proteingemisch zunächst über eine isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) nach ihrem pI-Wert und anschließend auf einer SDS-PAGE (zweite Dimension) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die erste Dimension wurde auf immobilisierten linearen pH Gradienten (Immobiline DryStrip, Pharmacia) mit pH 3-10 und pH 4-7 durchgeführt. Die gefriergetrockneten DryStrips (flache Acrylamid-Gelstreifen auf einer Trägerfolie) wurden über Nacht in einer "reswelling-Kammer" rehydriert.

Proteinextrakte wurden entweder in Protein-Lysispuffer oder in Rehydrationspuffer, je nach Applikation, wie folgt hergestellt: 10 mg Organgewebe oder lyophilisiertes Gewebe wurde in 1 ml Puffer mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und dann für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend folgte eine Ultrazentrifugation (100.000 x g, 60 min, 4 °C) und der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Applikation der Proteinproben wurde entweder über "sample cups" oder über eine „In-Gel“-Rehydration durchgeführt, bei der eine Proteinmenge bis zu 200 µg bei der Rehydration auf den DryStrip geladen wird. Für die anodische Applikation wurden die Proteinproben (mind. 10 µg aufgereinigtes Protein oder 30 µg Protein als Zellhomogenat) mit 2 Volumen Proteinprobenpuffer bis max. 100 µl versetzt und in die auf den DryStrips anodisch applizierten "sample cups" eingefüllt. Die isoelektrische Fokussierung wurde auf einer gekühlten (15 °C) Multiphor II Elektrophorese-Apparatur durchgeführt. Die Fokussierung begann mit 150 V (2 mA, 5W), nach 45 min wurde die Spannung über eine Dauer von 45 min auf 2000 V erhöht und blieb für 7 h konstant. Nach dem Lauf konnten die nicht verwendeten DryStrips bei -80 °C für einige Wochen gelagert werden. Die DryStrips wurden direkt nach dem Lauf (oder dem Auftauen) einzeln zuerst mit je 5 ml Äquilibriumspuffer A 15 min und anschließend für weitere 15 min mit Äquilibriumspuffer B in einem 15 ml Röhrchen mit Drehverschlußdeckel auf einem Schüttler inkubiert. Die DryStrips wurden dann kurz mit Whatman-Papier von der Seite getrocknet und auf das Trenngel gelegt. Für die SDS-PAGE wurden Gele von 1 mm Dicke gegossen. Die DryStrips wurden mit 0,5 % Agarose-Lösung (Agarose in SDS-Laufpuffer) fixiert. Die Elektrophorese wurde dann unter Standardbedingungen durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde die Lage der sauren und der basischen Seite des Gradienten markiert, und die Gele wurden entweder mit Silber gefärbt oder für einen Western-Blot eingesetzt. Zur Kalibrierung der ersten Dimension wurde der Marker Servalyl® Precotes® 3-10 verwendet (Serva), dazu wurde der DryStrip nach der ersten Dimension mit Coomassie-Blau gefärbt.

Marker pI: 3,5; 4,2; 4,5; 5,2; 5,3; 6,0; 6,9; 7,4; 7,8; 8,0; 8,3; 9,5; 10,7

2.3.7 Western Blot

Western-Transfer-Puffer:

25 mM Tris/HCl (pH 8,5)
 190 mM Glycin
 20 % Methanol
 0,02 % SDS

Mit Hilfe des Semi-Dry-Transfer-Verfahrens (Kyhse-Andersen, 1984) werden Proteine aus Polyacrylamidgelen auf Membranen übertragen. Diese Methode zeichnet sich durch eine relativ kurze Transferdauer, hohe Transfereffizienz und geringen Pufferverbrauch aus.

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel kurz in Western-Transfer-Puffer inkubiert. Die Übertragung der Proteine erfolgte auf eine Nitrozellulosemembran bei 10 V für 45 min. Der Transfer wurde durch Ponceau S-Färbung überprüft.

2.3.8 Protein-Färbung

Coomassie-Blau-Färbung:

Färbelösung:

0,1 % Coomassie-Brilliant-Blau R 250
 50 % Ethanol
 10 % Essigsäure
 vor Gebrauch filtrieren.

Entfärber:

10 % Ethanol
 7 % Essigsäure

Die Gele wurden mindestens 15 Min in Färbelösung geschüttelt. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend durch Schütteln in einer Entfärberlösung ausgewaschen.

Silberfärbung:

Fixierlösung:

10 % Ethanol
 7 % Essigsäure

Entwicklerlösung (50 ml):

3 g Natriumcarbonat
 1 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,2 g/l)
 100 μl Formaldehyd
 immer frisch herstellen

Das Polyacrylamidgel wurde je 20 min in Fixierlösung und in 50 % EtOH und dann 1 min in 0,02 % Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) inkubiert. Anschließend wurde das Gel 3 x 20 sek in Wasser gewaschen, dann 20 min in 0,2%iger Silbernitratlösung mit 50 μl Formaldehyd inkubiert, wieder 3 x 20 sek in Wasser gewaschen und anschließend in Entwicklerlösung entwickelt. Die Färbereaktion wurde nach 10-20 min mit Fixierlösung gestoppt. Pro Gel wurden 20 ml der Lösungen verwendet.

Ponceau S-Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose:

Färbelösung:

2 g Ponceau S-Farbstoff (Sigma) gelöst in
100 ml 3 %ige Trichloressigsäure

Die Nitrozellulosemembran wurden nach beendetem Protein-Transfer für eine Minute in der Färbelösung inkubiert und anschließend kurz in Wasser geschüttelt bis die Proteinbanden sichtbar waren. Die Entfärbung erfolgte durch kurzes Waschen mit Wasser, gefolgt von Inkubation mit NCP-Puffer.

2.3.9 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose

Luminol:

2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)
200 µl (0,25 M in DMSO) 3-Aminonaphthylhydrazid
89 µl (0,1 M in DMSO) p-Cumarsäure
18 ml Wasser
6,1 µl 30%ige H₂O₂-Lösung

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Protein-Transfer für mindestens 2 h, meistens jedoch über Nacht, mit NCP-Puffer abgesättigt, bevor sie mit Hybridomaüberständen oder aufgereinigten Antikörpern für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran einmal kurz, dann zweimal 10 min mit NCP-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 1 h mit einem sekundären Antikörper, der an Peroxidase gekoppelt war. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch 30minütiges Waschen in NCP (5-6 x Pufferwechsel) entfernt. Die Immunmarkierung wurde mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dabei oxidiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase Luminol, was zu einer Lichtreaktion bei 430 nm führt. Dies verursacht eine Schwärzung des Röntgenfilms. Die Membran wurde kurz in der Luminollösung inkubiert und ein Röntgenfilm für 5 sek bis 30 min exponiert.

2.3.10 Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Kulturüberständen

Wasch-Puffer:

0,1 M Tris-HCl (pH 8,9)
3 M NaCl

Zur Aufreinigung der Antikörper wurden zunächst 400 ml Hybridomaüberstand auf 3,3 M NaCl eingestellt, anschließend auf eine mit Natriumphosphat-Puffer (pH 8,0) äquilibrierte Protein-A-Sepharose Säule (5 ml Protein A-Sepharose CL4B, Pharmacia) gegeben und für 24-36 h rezirkuliert. Die Säule wurde dann mit Wasch-Puffer gewaschen, bis das Eluat eine OD₂₈₀ < 0,01 aufwies. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit 0,1 M Zitronensäure (pH 3,5). Das Eluat wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen, in

welchen jeweils 50 µl 2 M Tris (pH 9,0) vorgelegt worden war. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm identifiziert und gegen PBS über Nacht dialysiert. Zirkulation, Waschschritt und Elution wurden an einem Pumpensystem mit Fraktionssammler (BioRad) durchgeführt.

Die Protein A-Säule wurde mit 0,1 M Zitronensäure (pH 3,0) regeneriert und mit Wasch-Puffer äquilibriert. Eine Säule konnte mehrmals für denselben Antikörper verwendet werden und wurde in Wasch-Puffer mit 0,1 % Na-Azid bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.11 Immunpräzipitation

Dialysepuffer:

0,1 M NaHCO₃
0,5 M NaCl

Lysispuffer:

1 % Triton X-100
1 mM PMSF
5 mM Iodacetamid
Aprotinin (0,2 U/ml)
in TSA-Lösung

TSA-Lösung:

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
0,14 M NaCl
0,025 % Na-Azid

Präparation der Antikörper-Sepharose:

Aufgereinigter Antikörper (5-10 mg) wurde zunächst gegen Dialysepuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert und dann ultrazentrifugiert (100.000 x g, 1 h, 4°C). Die Antikörperkonzentration sollte 1-3 mg/ml betragen. Die CNBr-Sepharose (Pharmacia) wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet und in Dialysepuffer äquilibriert. 1 ml Sepharose-Lösung wurde mit 1 ml Antikörper-Lösung gemischt und mind. 2 h bei 4 °C gerührt. Um ungebundene reaktive Gruppen der Sepharose abzusättigen, wurde die Lösung auf 0,1 M Tris (pH 8,0) eingestellt. Dann wurde die Sepharose in TSA-Lösung überführt und aufbewahrt.

Immunpräzipitation:

10-50 mg Gewebe wurde in 1 ml Lysispuffer mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und 1 h auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde erst bei 3.000 x g für 15 min zentrifugiert, um Zellkerne zu entfernen, und der Überstand nochmals bei 100.000 x g für 1 h zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 50 µl aktivierter CNBr-Sepharose 1 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln vorgeklärt, dann zentrifugiert (200 x g, 5 min) und das Lysat abgenommen. Das Lysat wurde dann mit 50 µl der Antikörper-Sepharose versetzt und 1 h bei 4 °C durch Inversion gemischt. Anschließend wurde die Antikörper-Sepharose zentrifugiert (200 x g, 5 min, 4 °C) und in folgenden Schritten gewaschen: erster und zweiter Waschschritt in 0,1 % Triton X-100 in TSA-Lösung, dritter Waschschritt in TSA-Lösung, vierter Schritt in 0,05 M Tris-HCl (pH 6,8). Nach jedem Schritt wurde wie oben zentrifugiert. Die Elution des Antigens von der Sepharose erfolgte mit 20-50 µl SDS-Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol. Die

Sepharose wurde 5 min auf 95 °C erhitzt und kurz anzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 5 % β -Mercaptoethanol für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse.

2.4 Histologische und immunhistologische Methoden

2.4.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten

Wildtyp und Anx7-defiziente Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet.

Die Organe wurden entnommen und für Gefrierschnitte in Tissue-Tek-Einbettmedium (Sekura) auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren. Für Paraffinschnitte wurden die Gewebe je nach Dicke für 10 min bis 2 Stunden in 4 % Paraformaldehyd inkubiert.

Paraffineinbettung:

Für morphologische Untersuchungen wurden die Organe in Paraffin (SherwoodMedical) eingebettet und die Paraffinblöcke anschließend mit einem Mikrotom (Leica) geschnitten. Nach der Fixierung in 4 % Paraformaldehyd wurden die Gewebeprobe 10 min in PBS gewaschen und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 80, 90, 3 x 100 % EtOH, je 30-60 min) entwässert. Anschließend kamen die Gewebeprobe in ein EtOH/Methylbenzoat-Gemisch (1:1), noch je zweimal für mind. 1 h in Methylbenzoat und dann über Nacht in Xylol. Das Lösungsmittel wurde dann gegen Paraffin ausgetauscht. Die Infiltration mit Paraffin erfolgte in einem Heizofen bei 60 °C. Um eine vollständige Infiltration der Organe zu ermöglichen und auszuschließen, daß nach dem Einbetten noch Lösungsmittel im Gewebe verblieben ist, wurde mind. 5 mal das Paraffin nach je 38 Stunden gewechselt. Zum Abschluß wurden die Organe mit Paraffin in Formschälchen (Roth) eingebettet. Die Blöcke wurden vor dem Schneiden über Nacht bei 4 °C gekühlt.

Entparaffinieren von Paraffinschnitten:

Nach dem Schneiden an einem Leica Paraffinmikrotom wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C getrocknet. Nicht bearbeitete Schnitte wurden bei 4 °C gelagert. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zuerst über 3 x 2 min Xylolbad und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (3 x 100, 80, 70, 50, 30 % EtOH je 1-2 min) geführt. Bevor die Gewebe mit 4 % Paraformaldehyd nachfixiert wurden, kam noch ein kurzer Schritt in Wasser. Anschließend konnte histologisch gefärbt werden.

2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Gelvatol:

20 g Gelvatol 20-30
in 1x PBS in PBS 16 Stunden rühren,
40 ml Glycerin zugeben, 16 Stunden rühren,
15 min bei 12.000 x g zentrifugieren,
25 ng/ml DABCO zum Überstand geben,
aliquotiert in Spritzen bei -20 °C lagern.

Zum Nachweis der intrazellulären Verteilung von Proteinen wurden die Gewebe fixiert, mit monoklonalen Antikörpern markiert und die Verteilung des ersten Antikörpers mit einem fluoreszierenden zweiten Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörper sichtbar gemacht.

Für die Immunfluoreszenz wurden zunächst Gefrierschnitte mit einer Dicke von 7 bis 10 µm, je nach Gewebe, angefertigt und mind. 2h oder über Nacht bei RT luftgetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebeschnitte bei -80 °C gelagert.

Da die Bindung der primären Antikörper auch von der Fixierung abhängig ist, wurden die Gewebeschnitte für die Hybridomaüberstände oder gereinigte Antikörper 10 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Für käuflich erworbene Antikörper wurden die Gewebeschnitte 20 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und dann luftgetrocknet.

Im Anschluß an die Fixierung wurden die Gewebeschnitte 10 min. mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 1 h mit PBG bei RT geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nicht gebundene Antikörper wurden durch 5 x 5 min waschen mit PBG entfernt, bevor der fluoreszenzmarkierte, sekundäre Antikörper (Cy3 markierter Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper, 1:1000 in PBG, oder FITC-markierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper, 1:1000 in PBG verdünnt) für 1 h zugegeben wurde. Nach 3 x Waschen mit PBG, 3 x in PBS und kurzem Eintauchen in Wasser. wurden die Gewebeschnitte in Gelvatol eingebettet (Langanger et al., 1983) und die Präparate zum Aushärten über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Die Fluoreszenz wurde beim Mikroskopieren mit 546 nm (Grünlicht) oder 643 nm (Blaulicht) angeregt.

2.4.3 Mikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das von der Fa. Leica entwickelte CLSM-SP-Mikroskop benutzt, das optische Schnittebenen durch die Präparate erlaubt. Die Präparate können bei 63-facher Vergrößerung (PI APO 63x/1,32-0,6/ Öl) betrachtet werden. Das Gerät ist mit einem Krypton- und einem Argonlaser ausgestattet und ermöglicht elektronische Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Der Emissionsbereich des zu empfangenden Signals kann durch die Software eingegrenzt werden, so daß Kreuzanregungen durch die beiden Laser verhindert werden. Die Daten werden mit dem begleitenden Bildverarbeitungssystem der Fa. Leica weiterverarbeitet.

2.5 Methoden zum gene targeting

2.5.1 Präparation von embryonalen Fibroblasten

EF-Medium:

- DMEM (high glucose)
- 10 % FCS
- 2 mM Glutamin

Embryonen eines Neomycin-resistenten Mausstammes wurden zwischen Tag 13 und Tag 15 p.c. aus dem Uterus entnommen. Nach Entfernung von Kopf und Eingeweiden wurden die Zellen der Embryonen durch Rühren mit Glaskugeln 20 min bei 37 °C in 0,05 % Trypsin vereinzelt und anschließend in EF-Medium kultiviert. Durch Zugabe von Mitomycin C (100 µg/150 mm Kulturschale/ 20 ml EF-Medium) und Inkubation für 2,5 h bei 37 °C erfolgte die Mitose-Inaktivierung der Zellen. Die Zellen wurden anschließend 3 x mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/90 mm Schale ausplattiert. Die so behandelten Zellen können 14 Tage verwendet werden.

2.5.2 Kultur von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus

ES-Zell-Kulturmedium

- DMEM (high glucose)
- 15 % FCS
- 1 mM β -Mercaptoethanol
- 1 % 100 x MEM (non essential aminoacids; Biochrom)
- 1 mM Na-Pyruvat
- 2 mM Glutamin
- 2000 U/ml LIF
- 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

ES-Zellen der D3-Linie (Doetschmann et al., 1985) wurden auf Neomycin-resistenten, Mitose-inaktivierten embryonalen Fibroblasten (4×10^6 /90 mm Kulturschale) in Wasser gesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37 °C mit modifiziertem DMEM-Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die ES-Zellen 3 x mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml/90 mm Schale 0,05 % Trypsin abgelöst (ca. 5 min bei 37 °C), durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette vereinzelt, gesplittet und schließlich in frischem Medium ausplattiert (ca. 10^6 Zellen/90 mm Kulturschale). Für die Präparation genomischer DNA wurden die ES-Zellen auf gelatinisierten Kulturschalen mit LIF-freiem Medium kultiviert.

2.5.3 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Die Transfektion der embryonalen Stammzellen erfolgte nach einem Protokoll von Mansouri. ES-Zellen wurden zwei Tage nach einer Passagierung elektroporiert. Ca. 4 h vor der Elektroporation wurde ein Mediumwechsel der ES-Zell-Kulturen und der embryonalen

Fibroblasten durchgeführt. ES-Zellen wurden trypsinisiert, 5 min bei 200 x g abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und dann ausgezählt. $1-2 \times 10^7$ ES-Zellen wurden in 960 μ l kaltem PBS resuspendiert und davon 160 μ l zur Kontrolle der G418-Selektion ausplattiert. Die verbleibende ES-Zell-Suspension wurde mit 25-80 μ g linearisierter Vektor-DNA versetzt und in einer Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,4 cm, Bio-Rad) 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Elektroporation mit 500 μ F und 250 V in einem GenePulser (Bio-Rad) durchgeführt und weitere 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach Resuspendieren in ES-Kulturmedium wurden die ES-Zellen auf fünf mit embryonalen Fibroblasten beschichteten Kulturschalen (90 mm) verteilt. 24 h nach der Elektroporation wurde das ES-Medium gegen Selektionsmedium (ES-Medium mit 350 μ g/ml G418) ausgetauscht. Auch die nicht elektroporierten ES-Zellen wurden mit dem Selektionsmedium kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach 8-10 Tagen wurden G418 resistente ES-Zellklone in PBS unter einem Mikroskop mit einer Eppendorf-Pipette isoliert, auf 96-Lochplatten 5 min in 100 μ l Trypsinlösung inkubiert und nach Resuspendieren auf 24-Lochplatten in 1 ml ES-Medium auf embryonalen Fibroblasten bei reduzierter G418-Konzentration (150 μ g/ml) kultiviert. Nach 2-3 Tagen wurden die Klone 1:1 auf 24-Lochplatten gesplittet. Dabei wurde jeweils eine Hälfte der ES-Zellen zur DNA-Präparation auf Gelatine, die andere Hälfte für die Kryokonservierung auf embryonalen Fibroblasten kultiviert (ca. 2 Tage).

2.5.4 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

Einfriermedium

- DMEM (high glucose)
- 20 % FCS
- 10 % DMSO

ES-Zellen in 24-Loch-Kulturschalen wurden in Einfriermedium bei -70 °C nach Chan und Evans (1991) eingefroren. Das Einfrieren von Zellen in Cryo-Tubes erfolgte in Einfriermedium bei -70 °C oder in flüssigem Stickstoff (Mansouri). Aufgetaut wurden die ES-Zellen zügig bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen sofort in ES-Medium gegeben.

2.5.5 Mäusezucht und Haltung

Für die beschriebenen Experimente wurden BL6 (outbred) Mäuse gezüchtet. Die Mäuse wurden in einem künstlichen Tag-Nacht Rhythmus gehalten: Beleuchtung von 5:00 bis 17:00 Uhr, Dunkelheit von 17:00 bis 5:00 Uhr.

2.5.6 Embryonenspender

Als Embryonenspender wurden 5-7 Wochen alte C57BL/6 Weibchen (Charles River) verwendet, die zwei Tage vor der Verpaarung mit 5 U Gonadotropin (Sigma) und 48 h später mit 5 U humanem Chorion-Gonadotropin (Sigma) intraperitoneal zur Induktion einer

Superovulation injiziert wurden. Alternativ wurden die Weibchen durch visuelle Überprüfung des Östrus auf Empfängnisbereitschaft ausgewählt. 12-18 h nach der Verpaarung wurden die Weibchen auf Vaginalplugs selektioniert.

2.5.7 Gewinnung und Injektion von Blastozysten (Hogan et al. 1994)

DFH-Medium:

DMEM (high glucose)
10 % FCS
20 mM HEPES

DF-Medium:

DMEM (high glucose)
10 % FCS

Die Mäuse wurden nach 3,5 Tagen p.c. durch cervikale Dislokation getötet, und die Blastozysten mit DFH-Medium aus den präparierten Uteri gespült. Die isolierten Blastozysten wurden in DF-Medium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Injektion von jeweils 15-20 ES-Zellen auf die innere Zellmasse der Blastozysten erfolgte in DFH-Medium. Die hier eingesetzte Injektionsapparatur besteht aus einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 10) und einem Mikromanipulator (Leitz) zur Steuerung von Halte- und Injektionskapillaren. Das System für die Druckregulation der Haltekapillare ist mit Mineralöl gefüllt, das der Injektionskapillare mit Luft und einem kleinen Volumen Mineralöl oberhalb des Mediums. Halte- (GC 120 T-10, Clark) und Injektionskapillare (GC 100 T-10, Clark) wurden mit einem Pipett-Puller (Kopf Modell 720) gezogen. Bei den Haltekapillaren wurde für die angelegte Spannung (increase) der Wert 18 und für den Magneten der Wert 0 gewählt. Für die Injektionskapillaren wurde der Wert für den Magneten auf 3 eingestellt. Die Haltekapillaren wurden plan geschliffen und gesintert. Die Injektionskapillaren wurden in einem Winkel von ca. 50° angeschliffen und so eine scharfe Spitze erzeugt. Die Spitzen (3-5 mm) beider Kapillaren wurden durch Anschmelzen um 30-40° gebogen. Die Kammer enthielt DFH-Medium, eine frischpräparierte Einzelzellsuspension, sowie bereits inkubierte Blastozysten. Zur Injektion wurde jeweils eine Blastozyste mit der Haltekapillare fixiert. Mit der Injektionskapillare wurden 15-20 ausgesuchte ES-Zellen auf die innere Zellmasse abgelegt. Erfolgreich injizierte Blastozysten wurden mind. 1 h in M16-Medium (Sigma) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor sie in scheinchwangere foster-Mütter reimplantiert wurden.

2.5.8 Reimplantation von Blastozysten in scheinchwangere foster-Mütter

24 h nach Verpaarung der Blastozystenspender wurden C57BL/6-Weibchen mit vasktomierten Männchen verpaart um scheinchwangere Leihmütter zu erhalten. Der Transfer der Blastozysten im Stadium 3,5 zurück in den Uterus erfolgte daher in Weibchen am Tage 2,5 p.c., um den Blastozysten die Möglichkeit zu geben, in der Entwicklung aufzuholen und erfolgreich zu nidieren. Der Transfer injizierter und nach Inkubation wieder expandierter Blastozysten erfolgte wie bei Hogan et al. (1994) beschrieben. Je 5-10 Blastozysten wurden in M16-Medium (Sigma) in ein Uterushorn einer scheinchwangeren foster-Maus eingeführt. Mindestens zwei Monate alte C57BL/6-Männchen wurden vasktomiert und nach einer Ruhephase von etwa zwei Wochen zu Paarungen eingesetzt.

2.6 Methoden zur Insulin-Sekretion

2.6.1 Isolation von Langerhans'schen Inseln aus dem Pankreas

Hanks-Puffer:

137 mM NaCl
5,4 mM KCl
1,25 mM CaCl₂
0,8 mM MgSO₄
0,42 mM Na₂HPO₄
0,44 mM KH₂PO₄
4,2 mM NaHCO₃
10 mM HEPES (pH7,25)
3,5 g/l BSA

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach Abbinden des Gallengangs wurden 3 ml eiskalte Kollagenaselösung (1 mg/ml, Serva) durch den Pankreasgang in den Pankreas injiziert, dieser entnommen und für 10 min bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde das verdaute Gewebe 3 x mit Hanks-Puffer gewaschen. Die Inseln wurden aus dem exokrinen Gewebe unter einem Mikroskop mit einer Pipette gesammelt.

2.6.2 Messung des Insulingehaltes der Inseln

Inkubationspuffer

140 mM NaCl
5,6 mM KCl
1,2 mM MgCl₂
2,6 mM CaCl₂
2,8 mM Glukose
10 mM HEPES (pH 7,4)
5 g/l BSA

Die gesammelten und gereinigten Inseln wurden bei 37 °C in Inkubationspuffer vorinkubiert. Je fünf Inseln wurden in 0,5 ml Inkubationspuffer mit entsprechender Testsubstanz (16,7 mM Glukose, 5 µM Forskolin oder 100 µM Tolbutamid) weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt. In den Überstand sezerniertes Insulin und der Insulingehalt der Inseln nach einer sauren Ethanol-Extraktion (1,5 % HCl/75 % Ethanol (v/v)) wurden in einem Radioimmunoassay (RIA; Herbert et al., 1965) mit ¹²⁵I-Insulin (DiaSorin) und Kaninchen-anti-Insulin Schweine-Serum (Calbiochem) gemessen. Als Standard diente Ratten-Insulin (Novo Nordisk).

2.6.3 Perfusion von Langerhans'schen Inseln

Für Perfusionsexperimente wurden ca. 100 Inseln auf eine Säule gegeben, die aus 200 mg Biogel P-2 (Bio-Rad) bestand. Die Inseln wurden dann mit einem Durchfluß von 0,7 ml/min

für 1 h bei 37 °C mit Inkubationspuffer, der mit 2,8 mM Glukose versetzt war, perfundiert. Nach diesem Vorlauf wurden über 30 min Fraktionen von 1 ml gesammelt. Dem Inkubationspuffer wurden zu entsprechenden Zeiten Testsubstanzen zugefügt. Sezerniertes Insulin wurde in einem RIA gemessen.

2.7 Elektrophysiologische Methoden

2.7.1 Untersuchungen an embryonalen Kardiozyten

2.7.1.1 Zeldissoziation

Kollagenaselösung (pH 8,9):

120 mM NaCl
5,4 mM KCl
5 mM Na-Pyruvat
20 mM Taurin
10 mM HEPES
1mg/ml Kollagenase B

DMEM-Medium:

DMEM-Medium
15 % FCS
2 mM Glutamin
1 % 100x MEM

Embryonale Kardiozyten wurden aus 11,5 Tagen alten Mausembryonen gewonnen, in dem die Herzen entnommen und einem Kollagenaseverdau unterzogen wurden (Isenberg und Klockner, 1982) Das dissoziierte Zellgemisch wurde auf Gelatine-beschichtete Deckgläsern plattiert und in DMEM-Medium bei 37 °C inkubiert. Innerhalb der ersten 12 h haften die Zellen an den Deckgläsern und starten mit spontanen Kontraktionen.

2.7.1.2 Ca²⁺-Imaging

Extrazellular-Lösung (pH 7,4):

140 mM NaCl
5 mM KCl
2 mM MgSO₄
2 mM CaCl₂
5 mM HEPES
10 mM Glukose

Kalium-Lösung (pH 7,4):

5 mM NaCl
140 mM KCl
2 mM MgSO₄
2 mM CaCl₂
5 mM HEPES
10 mM Glukose

Test Substanzen:

Nifedipine (Bayer AG) in Ethanol gelöst (Enkonzentration 0,1%)

Thapsigargin (Molecular Probes) in DMSO gelöst (Enkonzentration 0,1%)

Die Experimente erfolgten mit den auf den Deckgläsern haftenden embryonalen Kardiozyten in einer temperaturkontrollierten Aufnahme-Kammer bei 37 °C. Die Zellen wurden in Extrazellular-Lösung gehalten und für 12 min mit dem zellpermeablen Farbstoff Fura-2AM (2 µM, Molecular probes) beladen. Vor den Messungen wurden die Zellen dann 5 min mit der Extrazellular-Lösung gewaschen. Die Lösungen wurden per Schwerkraft in einem Durchflußvolumen von 1 ml/min zugeführt. Ein 90%iger Volumenaustausch wurde nach ca.

10 sek erreicht. Nur spontan schlagende Kardiomyozyten wurden für die Experimente gesammelt.

Eine Lichtanregung (340, 380 nm) erfolgte mit einem computer-kontrollierten Monochromator (TILL Photonics), der über eine kleine Quarz-Licht-Führung mit der Epifluoreszenz-Verbindung eines Invert-Mikroskops (Zeiss, 135TV) verbunden war. Die Lichtanregung in der Frequenz von 25 Hz wurde über einen dichroischen Spiegel (TILL Photonics) durch ein Objektiv geführt (40x, Zeiss). Die Kontraktionen der Kardiozyten wurden mit einer zusätzlichen computer-gesteuerten LED während der Experimente beobachtet. Die emittierte Fluoreszenz der Fura-2AM markierten Zellen und die Transmissionsbilder wurden durch einen 470 nm Interferenzfilter mit einer an das Mikroskop angeschlossenen gekühlten digitalen CCD Kamera (TILL Photonics) sichtbar gemacht.

Die Daten wurden mit Vison Software (TILL Photonics) erhalten. Das Verhältnis markierter Zellen bei beiden Wellenlängen wurde jeweils nach Abzug der Hintergrundintensitäten kalkuliert. Daten erscheinen als 340/380-Verhältnis.

2.7.1.3 Patch-clamp Experimente

Für "current-clamp" Aufnahmen:

Interne Lösung (pH 7,4):

50 mM KCl
80 mM K-Aspartat
1 mM MgCl₂
3 mM MgATP
10 mM EGTA
10 mM HEPES
pH mit KOH einstellen.

Externe Lösung (pH 7,4):

140 mM NaCl
5,4 mM KCl
3,6 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
10 mM Hepes
10 mM Glukose
pH mit NaOH einstellen.

Für "voltage-clamp" Aufnahmen:

Interne Lösung (pH 7,4):

120 mM CsCl
3 mM MgCl₂
5 mM MgATP
10 mM EGTA
5 mM HEPES
pH mit CsOH einstellen

Externe Lösung (pH 7,4):

120 mM NaCl
5 mM KCl
3,6 mM CaCl₂
20 mM TEA-Cl,
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES
pH mit TEAOH einstellen.

Für die Patch-clamp Versuche wurden nur spontan kontrahierende embryonale Kardiomyozyten ausgewählt, und nach der "whole-cell" Variation der Patch-clamp Technik verfahren (Hamill und Marty et al., 1981). Die Zellen wurden mit einem EPC-9 Amplifier (Heka) im "voltage-clamp" oder "current-clamp" Modus gehalten.

Wenn die Zellen in der "whole-cell" Anordnung eingerichtet waren, begann die Messung für den Ca²⁺-Strom (beim Zeitpunkt t = 0). Für die Aufnahme von I_{Ca} wurden "voltage-clamp"

Zellen bei -50 mV gehalten, und dann Reihen von depolarisierenden Pulsen mit einer Dauer von 20 ms appliziert um ein Potential von 0 V bei einer Frequenz von 0,2 Hz zu testen. Das "Current/Voltage" (I/V)-Verhältnis wurde bestimmt, in dem 150 ms andauernde depolarisierende Test-Potentiale von -40 mV bis 40 mV in 10 mV Schritten gegeben wurden. Die Membrankapazität wurde mit einem Pulse acquisition software Programm (Heka) bestimmt. Die Daten wurden bei einer sampling rate von 10 Hz, gefiltert bei 1 Hz, erhalten und offline mit der Pulse-Fit analysis software (Heka) analysiert. Statistische Analysen wurden mit dem "Student's T-test" durchgeführt, und ein Wert von $p > 0,05$ nach der Bonferroni Korrektur wurde als signifikant bewertet. Testsubstanzen wurden nur zugegeben, wenn sich stabile Ströme eingestellt hatten. Patch-Pipetten (2-4 M Ω Widerstand) aus Borosilikat-Glas (Hilgenberg oder Clark, Electromedical Instruments) wurden mit einem Zeitz Pipetten-Puller (DMZ) gezogen.

2.7.2 Messung der Zellverkürzung an isolierten Kardiomyozyten

Bei der Messung der Zellverkürzung von isolierten, elektrisch stimulierten Kardiomyozyten wird die Differenz des Abstands der Zellenden während dem relaxierten und dem kontrahierten Zustand mit einer Hochgeschwindigkeitskamera gemessen (Schwinger et al., 1998).

2.7.2.1 Isolation von Kardiomyozyten

Ca²⁺-freie Tyrode-Lösung (pH 7,1):

140 mM NaCl
11,1 mM Glukose
10 mM HEPES-NaOH
5,8 mM KCl
0,9 mM MgSO₄
0,4 mM NaH₂PO₄
0,5 mM KH₂PO₄

Glutamat-Lösung (pH 7,3):

30 mM KCl
30 mM KH₂PO₄
50 mM Glutamat
20 mM Taurin
10 mM Glukose
0,5 mM EGTA
3 mM MgSO₄

Ventrikuläre Kardiomyozyten wurden aus den Herzen von 10-12 Wochen alten Mäusen präpariert und isoliert. Das Herz wurde schnell entnommen und mit Ca²⁺-freier Tyrode-Lösung (37 °C) perfundiert. Nach 10 min wurde Kollagenase I (1 mg/ml; Sigma) zugefügt und 15-25 min weiter perfundiert. Während dieser Zeit wurde der Lösung alle 3-5 min Ca²⁺ bis zu einer Endkonzentration von 100 μ mol/l zugeführt. Um die Kollagenase auszuwaschen, wurden die Herzen 10 min mit der Glutamat-Lösung perfundiert. Nach dem Abtrennen der Vorhöfe wurden die Ventrikel in ca. 1 mm³ große Stücke zerschnitten, die einzelnen ventrikulären Kardiomyozyten durch vorsichtiges Schwenken in der Glutamat-Lösung aus dem Zellverband gelöst und durch ein Nylonnetz von groben Gewebeteilen getrennt. Nach passivem Absetzen der Zellen für 30 min bei RT wurde Ca²⁺ auf eine Endkonzentration von 2 mM zugegeben und die Zellen bis zu den Messungen bei RT aufbewahrt. Die Ausbeute stäbchenförmiger, nicht spontan schlagender Zellen, die eine typische Querstreifung aufwiesen, betrug durchschnittlich 30-40 %.

2.7.2.2 Messung der Zellverkürzung

Tyrode-Lösung (pH 7,4):

2 mM CaCl_2
120 mM NaCl
5,4 mM KCl
1 mM MgCl_2
22,6 mM NaHCO_3
0,42 mM NaH_2PO_4
5 mM Glukose
0,3 mM Ascorbinsäure
0,05 mM EDTA
pH durch Carbogen-Begasung einstellen.

Für die Messung der Zellverkürzung wurden nur Zellen ohne ein Anzeichen von Granulation herangezogen, die keine Spontankontraktionen zeigten und bei elektrischer Stimulation in einer Linie mit ihrer Längsachse kontrahierten. Alle Experimente wurden bei 32 °C in Tyrode-Lösung durchgeführt. 400 µl der Zellsuspension wurden in einer Kammer (Durchmesser 12 mm) auf Laminin-beschichtete (Coll. Biomedical) Deckgläser gegeben. Dort hafteten die Zellen spontan an. Nach 5 min wurden die Zellen mit der vorgewärmten Tyrode-Lösung (32 °C) kontinuierlich umspült. Die elektrische Stimulation erfolgte über Feldstimulation mit Platinelektroden, die parallel in den Deckel der Kammer eingelassen waren. Die Reizstärke lag 10 % über dem Schwellenwert bei einer Reizdauer von 25 ms und einer basalen Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz. Für die Messung wurde eine kontrahierende Kardiomyozyte mit Hilfe der Videokamera und des Monitors derart eingestellt, daß die einzelnen Kontraktionen der Zelle mit einer eindimensionalen Zeilenkamera mit einer Zeitauflösung von 4 ms detektiert und aufgezeichnet werden konnten. Die Zellverkürzungen während einer Kontraktionssequenz wurden über den Computer mit spezieller Software (Scientific Instruments) gemittelt und ausgewertet. Als Kontraktionsparameter wurden maximale Zellkontraktion (L_{max} in µm) und diastolische Länge (L_{dia} in µm) bestimmt. Die Messungen erfolgten jeweils beim Erreichen des maximalen inotropen Effekts. Statistische Analysen wurden mit dem "Student's T-test" durchgeführt, und ein Wert von $p > 0,05$ nach der Bonferroni Korrektur wurde als signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung einer Annexin VII-defizienten Mauslinie

Die generelle Strategie zur Generierung von transgenen Nullmutanten sieht einen Austausch einer Gensequenz gegen einen geeigneten *in vitro* mutierten Genabschnitt vor. Dadurch wird eine korrekte Transkription und anschließende Translation unterbunden. Hierzu werden in der Regel bakterielle Antibiotika-Resistenz-Gene verwendet, die so als Selektionsmarker in Transfektionsvektoren kloniert werden, daß bei homologer Rekombination entscheidende Gensegmente unterbrochen oder ausgetauscht werden. Gleichzeitig ermöglicht die Antibiotika-Resistenz eine Identifizierung transfizierter Klone. Das häufig genutzte Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Neo-Gen) verleiht eine Resistenz gegenüber Neomycin und seinen Derivaten, z.B. G418.

Ein Vektor für die homologe Rekombination wird so konstruiert, daß er neben dem beschriebenen Marker ausreichend lange homologe Sequenz-Bereiche für die Rekombination und geeignete Möglichkeiten zur Kontrolle des korrekten Einbaus beinhaltet. Der Nachweis erfolgt entweder unter Verwendung spezifischer Primer mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder durch Southern Blot Analyse. Dazu müssen im targeting-Konstrukt geeignete Restriktionsschnittstellen vorhanden sein, um durch enzymatische Reaktion und anschließende Hybridisierungsanalyse einen Restriktionspolymorphismus zwischen Wildtyp-Sequenz und homolog rekombinierter Sequenz detektieren zu können.

3.1.1 knockout targeting-Konstrukt

Das Annexin VII-Gen (Anx7-Gen) ist auf Chromosom 14 lokalisiert und umfaßt mit 14 Exons ca. 30 kb genomische Sequenz (Zhang-Keck et al., 1994). Das Startcodon findet sich in Exon 2, der N-terminale Bereich wird von Exon 2-7 kodiert, in der Mitte von Exon 7 beginnt die C-terminale Domäne. Exon 14 kodiert für die Polyadenylierungsstelle und den 3'-untranslatierten Bereich. Ausgangspunkt für die Klonierung des targeting-Vektors war ein 15 kb Sall-Fragment aus dem Phagen-Klon EMBL3 11-2-3, das die kodierenden Bereiche von Exon 4-13 enthielt (Abb. 31 A). Da bis dahin nur die Sequenzen der Exons und der unmittelbar angrenzenden Bereiche bekannt waren, wurde dieses Fragment für eine weitere Charakterisierung in die Sall-Schnittstelle des Vektors pUC19 kloniert. Eine ausführliche Kartierung des Fragments erfolgte mit Restriktionsenzymen, die nur einmal in der Sequenz der cDNA schnitten oder aus der multiple cloning site des Vektors stammten. Für die Einführung des Selektionsmarkers in die genomische Sequenz wurde eine singuläre Restriktionsschnittstelle gesucht, die innerhalb der kodierenden Sequenz lag. Da keine

solche Restriktionserkennungsstelle gefunden werden konnte, wurde beschlossen, eine MnlI-Schnittstellen zu verwenden. MnlI spaltet zweimal in dem Fragment. Eine Schnittstelle liegt in Exon 8, in der cDNA entspricht das dem Basenpaar 611, und die andere in Intron 4. Zunächst wurde die in Intron 4 liegende MnlI-Schnittstelle durch partielle Restriktion, Verdau der überhängenden Enden mit dem Klenow-Enzym und blunt end Religation zerstört. Ein entsprechender Klon wurde identifiziert und das Neo-Gen aus dem Vektor pPNT inseriert. Dabei war das Neo-Gen entgegen der Leserichtung orientiert (Abb. 3.1 B). Dies sollte zu einem nonsense-Transkript des rekombinanten Allels führen, das entweder durch Instabilität frühzeitig abgebaut oder zu einem nicht-funktionalen Protein translatiert wird. Da dieser Vektor keine geeignete Restriktionsschnittstelle für eine Linearisierung des Plasmids bot, wurde das komplette, nun ca. 16,6 kb große Sall-Fragment in die Sall-Schnittstelle des Vektors pBlueskript SK+ kloniert. Hier war die ClaI-Schnittstelle in der multiple cloning site des Vektors für eine Linearisierung geeignet. Das resultierende targeting-Konstrukt pM1P:BS hat eine Länge von ca. 19 kb. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Das in antisense-Orientierung inserierte Neo-Gen wird am 5'-Ende von 5 kb, am 3'-Ende durch 10 kb homologe genomische Sequenz flankiert. Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des Genlokus, des targeting-Konstrukts, des homologen Rekombinationsereignisses und die zur Identifizierung verwendeten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP). Die homologe Integration des Neo-Gens führt zu einem EcoRI-RFLP, der den spezifischen Nachweis des rekombinanten Allels durch Southern Blot Analyse mit der externen 5'-Probe ex2/3 ermöglicht, und vergrößert das entsprechende Wildtyp-Fragment um 1,6 kb von ursprünglich 13,4 kb DNA auf 15 kb vergrößert.

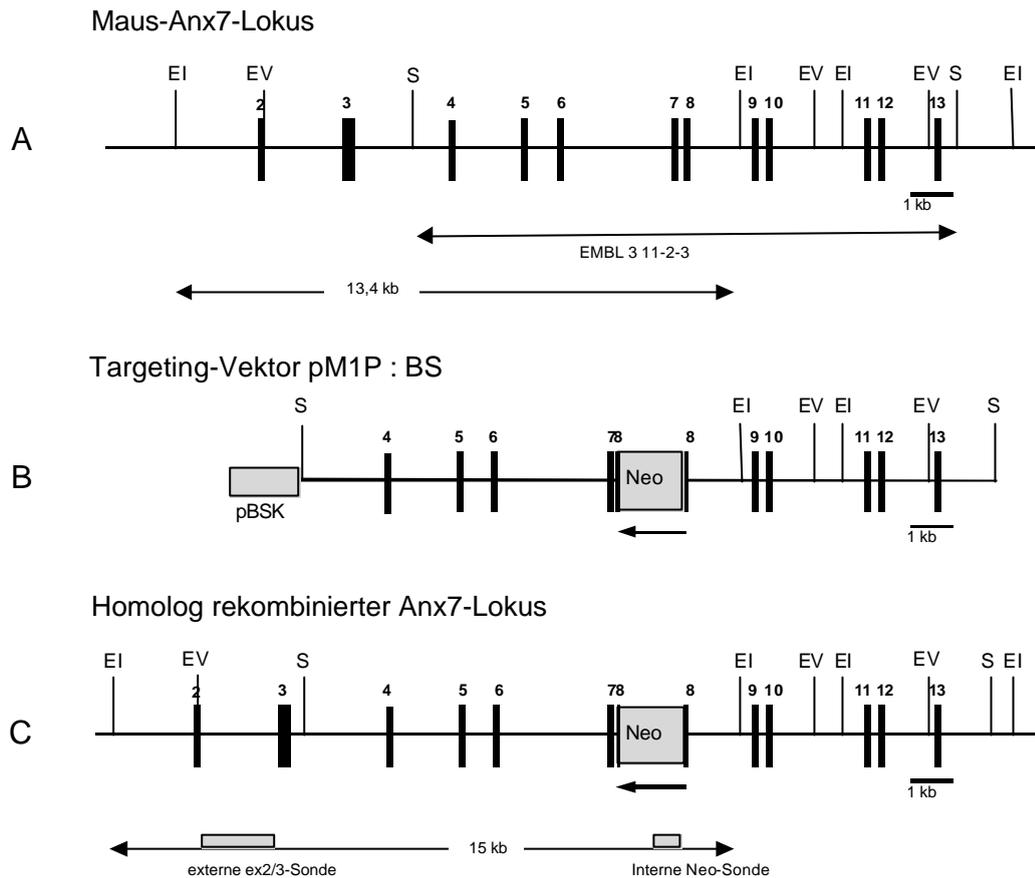


Abb. 3.1: **A)** Organisation des Anx7-Gens der Maus. **B)** Targeting Vektor pM1P:BS mit der eingefügten Neo-Kassette als Selektionsmarker und zur Unterbrechung des Transkriptionsprodukts. **C)** Homolog rekombinierter Anx7-Lokus mit Darstellung der für die Charakterisierung verwendeten Hybridisierungsproben. Durchgezogene Linien entsprechen den genomischen Anx7-Sequenzen. Exons sind als dicke schwarze senkrechte Striche, das Neo-Gen als graue Box dargestellt. Der Pfeil zeigt die Orientierung des Neo-Gens an. Aufgeführte Endonukleasen: EI: EcoRI; EV: EcoRV; S: Sall.

3.1.2 Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone

Die Einführung fremder DNA in ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierbei wird die Zellmembran der Empfängerzellen durch kurze elektrische Impulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht. Die embryonalen Stammzellen befinden sich in einem undifferenzierten Zustand, so daß sie nach der Injektion in die Blastozysten zu jeder Art von Gewebe, einschließlich Keimbahngewebe, entwickeln können.

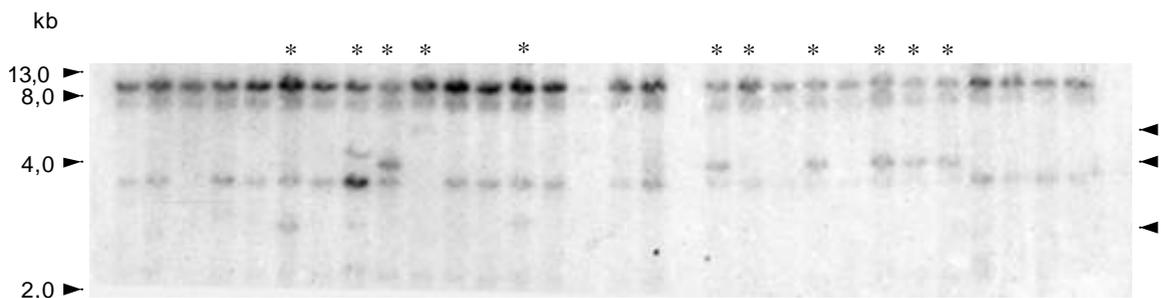
Es sind mehrere Zelllinien gebräuchlich, die größtenteils männlich (X/Y) sind, da dieser Karyotyp stabiler zu sein scheint als der (X/X)-Karyotyp. Von ES-Zellen abstammende männliche Individuen liefern mehr Nachkommen als weibliche. Außerdem scheinen X/Y-ES-Zellen die Fähigkeit zur sex-conversion zu besitzen, so daß ursprüngliche XX-Blastozysten unter Einfluß von XY-ES-Zellen zu XY-Blastozysten werden können.

In dieser Arbeit wurde die ES-Zelllinie D3 (129/Sv) (Doetschmann et al., 1985) verwendet. Für eine Elektroporation wurden $1,25 \times 10^7$ ES-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit 25 μ g des mit ClaI linearisierten targeting-Vektors pM1P:BS in M15 Kulturmedium einem

elektrischen Feld ausgesetzt und anschließend 812 Tage unter selektiven Bedingungen kultiviert.

Neo-resistente Zellklone wurden isoliert und expandiert. Nach Splitten der ES-Zellklone wurde eine Hälfte eingefroren, die andere zur Isolierung genomischer DNA verwendet. Nach einer EcoRV-Spaltung und anschließender Southern Blot Analyse mit der externen ex2/3-Probe zeigten alle Klone die charakteristischen Wildtypbanden. Einige Klone wiesen eine zusätzliche Bande bei ca. drei, vier oder sechs kb auf (Abb. 3.2 A). Der veränderte EcoRV-RFLP dieser Klone wurde mit einer Restriktion durch EcoRI überprüft. Es folgte eine erneute Southern Blot Analyse, um eine homologe Rekombination in den entsprechenden Klonen zu identifizieren. Als Probe wurde die vollständige Anx7 cDNA verwendet (Abb. 3.2 B). Die homologe Integration der Neomycin-Kassette führt zu einem Shift eines 13,4 kb Wildtyp-Fragments auf 15 kb. Der Exon 2-3 umfassende Sequenzbereich ist nicht auf dem targeting-Vektor pM1P:BS enthalten. Das Vorkommen des 15 kb EcoRI-Fragmentes ist somit ausschließlich auf homologe Rekombination zurückzuführen.

A



B

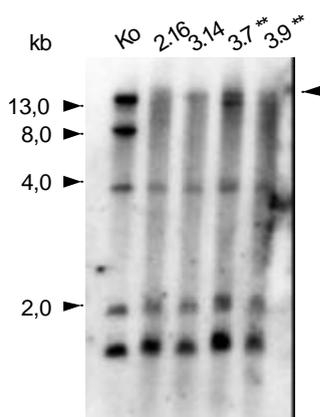


Abb. 3.2: DNA-Analyse von ES-Zellklonen. **A)** Die genomische DNA von ES-Zellklonen wurde mit EcoRV restringiert und in der Southern Blot Analyse mit der externen ex2/3 Probe hybridisiert. Die mit Sternchen gekennzeichneten Klone zeigten zusätzliche Fragmente bei drei, vier oder sechs kb (Pfeile) und wurden weiteren Southern Blot Analysen unterzogen. **B)** Southern Blot Analyse ausgewählter ES-Zellklone. Die genomische DNA wurde mit EcoRI restringiert, homolog rekombinierte Klone (**) zeigten eine zusätzliche Bande bei 15 kb (Pfeil). Die Hybridisierung der DNA erfolgte mit der Anx7 cDNA als Sonde. Ko: heterolog rekombinierter Kontrollklon.

In Tabelle 3.1 ist das Ergebnis der Elektroporation zusammengefaßt. Von 700 analysierten ES-Zell Klonen wurden 9 homolog rekombinierte Klone isoliert und wie beschrieben charakterisiert. Für die Embryonenmanipulation wurden die Klone D3/2.19, D3/3.4 und D3/3.7 verwendet.

ES-Zellen	analysierte Klone	homol. rekomb. Klone	rel. Frequenz
D3	700	9	1/77

Tab. 3.1: Elektroporation der ES-Zelllinie D3 mit dem targeting-Vektor pM1P:BS. Analysierte Klone: Anzahl der analysierten Klone; homol. rekomb. Klone: Anzahl der homolog rekombinanten Klone; rel. Frequenz: relative Frequenz, Verhältnis der Anzahl homolog rekombinierter zu analysierten Klonen

3.1.3 Etablierung der Anx7-defizienten Mauslinie

Zur Herstellung chimärer Mäuse wurde die Methode der Blastozysteninjektion angewandt. Als Spender-Mäuse für Blastozysten wurde der Inzuchtstamm C57BL/6 (schwarz) verwendet. Die Blastozysten wurden am Tag 3,5 p.c. aus den Uteri schwangerer Spender-Mäuse isoliert. Mit Hilfe eines Mikroinjektionsapparats wurden 10-15 ES-Zellen pro Blastozyste nach Möglichkeit unmittelbar auf die innere Zellmasse injiziert, und diese dann für mind. 1,5 Stunden inkubiert. Je 5-10 intakte Blastozysten wurden anschließend in ein Uterushorn scheinchwangerer (Tag 2,5 p.c.) CD1-Mäuse (foster) reimplantiert. Die verwendete ES-Zelllinie trägt den agouti-Pigmentierungslocus, so daß chimäre Tiere anhand ihrer Fellfarbe (Fellchimärität) erkennbar waren. Aufgrund des XY-Genotyps der injizierten ES-Zellen waren nur männliche chimäre Nachkommen von Interesse. Die Ergebnisse der Blastozysteninjektionen von drei D3-ES-Zell-Klonen sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

ES-Zell-Klon	Anzahl reimplantierter Blastozysten	Nachkommen	Chimäre			Keimbahnchimäre Männchen
			M	W	Σ	
D3/2.19	35	9 (25,7 %)	3 (8,6 %)	0	3	1 (2,8 %)
D3/3.4	173	62 (35,8 %)	9 (5,2 %)	5	14	0
D3/3.7	159	56 (35,2 %)	12 (7,5 %)	4	16	1 (0,6 %)

Tab. 3.2: Zusammenstellung der Blastozysteninjektionen. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Anzahl der reimplantierten Blastozysten. M: Männchen; W: Weibchen.

3.1.4 Genotypisierung der Anx7-defizienten Mauslinie

Fellchimäre Männchen wurden durch Rückkreuzung mit C57BL/6-Weibchen auf eine Keimbahneteiligung ihrer ES-Zellen getestet. Durch die Rückkreuzung wurden zwei chimäre Männchen D3/2.19/4 und D3/3.7/2 identifiziert, die sich auch durch eine Fellchimärität von 60 bzw. 70 % auszeichneten. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Nachkommen des keimbahnchimären Männchens D3/3.7/2 gearbeitet.

Er wurde durch die Injektion der homolog rekombinierten ES-Zelllinie D3/3.7 erhalten. Die Rückkreuzung mit C57BL/6-Weibchen erbrachte 87 Nachkommen von denen 18 % heterozygot für das *Anx7*-Gen waren. Für den Nachweis des Genotyps der transgenen Tiere wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien präpariert und einer zu den ES-Zellklonen analogen Southern Blot Analyse mit der externen *ex2/3* Probe und der *Anx7* cDNA Probe unterzogen (Abb. 3.3). Durch Rehybridisierung der Southern Blots mit der internen Neo-Gen-Probe konnte eine heterologe Integration des targeting-Vektors ausgeschlossen werden.

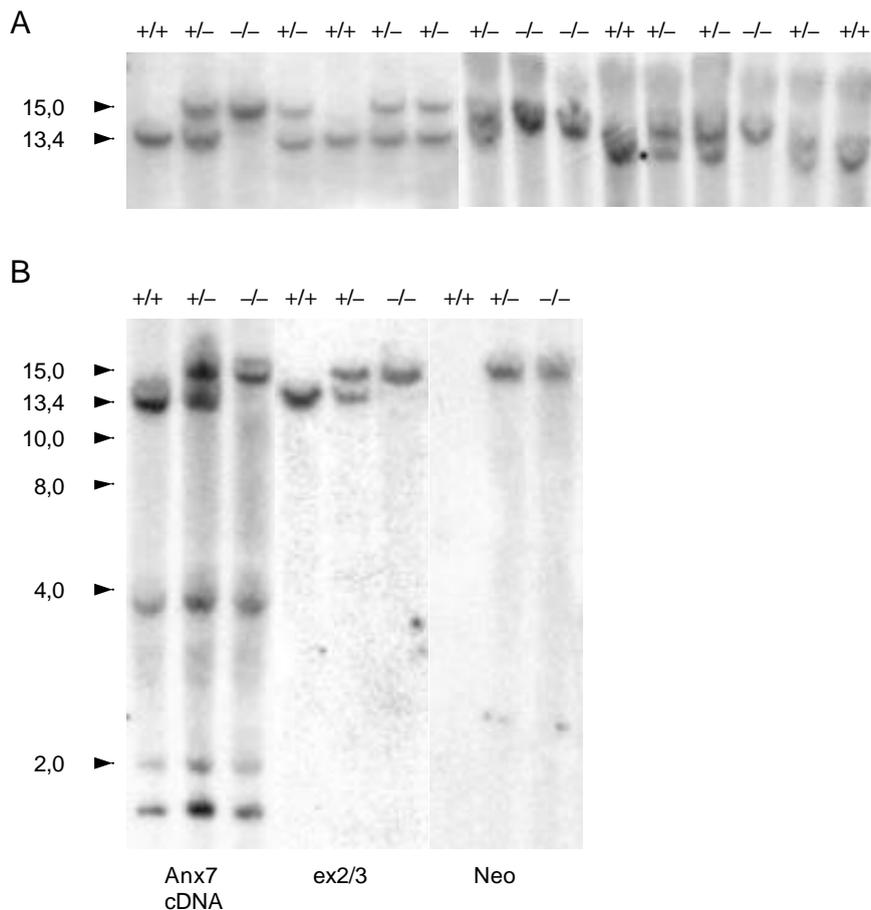


Abb. 3.3: Southern Blot Analyse genomischer Mausschwanz DNA der transgenen *Anx7*-Genotypen in der F2-Generation. **A)** Analyse eines Wurfes mit der *ex2/3*-Probe. **B)** Exemplarische Darstellung der unterschiedlichen Hybridisierungsmuster mit der *Anx7* cDNA-, der *ex2/3*- und der Neo-Gen-Probe (Neo). Wildtyp = +/+, heterozygot = +/-, homozygot = -/-.

Das Vererbungsschema des mutanten *Anx7*-Genlokus folgte annähernd den Mendelschen Regeln mit einem Verhältnis von 28:48:24 (Wildtyp : heterozygot : homozygot). Die Annexin VII-defizienten (*Anx7*^{-/-}) Mäuse waren überlebensfähig, fertil und wiesen keine erkennbaren Abnormalitäten auf.

3.2 Analyse der Anx7^(-/-)-Mauslinie

3.2.1 Annexin VII-Expression auf RNA-Ebene

3.2.1.1 Northern Blot Analyse

Die Transkription des Wildtyp- und des homolog rekombinierten Anx7-Allels wurde durch Northern Blot Analyse und RT-PCR getestet. Im Wildtyp wurden zwei Transkripte von ca. 2,4 und 1,8 kb beobachtet, die auf unterschiedliche Längen im untranslatierten 3'-Bereich zurückzuführen sind (Magendzo et al., 1993). Ein frühzeitiger Abbruch der Transkription, aufgrund der Insertion des Neo-Gens sollte zu einem Ausfall der mRNA führen oder zumindest eine verkürzte mRNA ergeben. Bei einem möglichen read-through über das Neo-Gen hinweg addieren sich die Sequenzen des Anx7- und des Neo-Gens theoretisch zu ca. 4 bzw. 3,4 kb mRNA.

Für die Analyse der Annexin VII-Expression wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen von 8-12 Wochen alten Wildtyp- und Anx7^(-/-)-Mäusen gewonnen. Nach einer Quantifizierung wurden vergleichbare Mengen RNA (30 µg) in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und im Northern Blot analysiert. Zur Kontrolle wurden einige der Membranen mit der β-Actin-Sonde hybridisiert, die eine 2,0 kb-RNA markiert. Als Probe wurde die Anx7 cDNA, eine Nterminale (bp 1-546), eine C-terminale (bp 547-1378) und die Neo-Gen Probe verwendet. In RNA aus allen Organen erkannte die Anx7 cDNA-Sonde im Wildtyp zwei RNA-Spezies von 2,4 und 1,8 kb, in RNA aus Organen der Mutante wurden Transkripte von 1,9 und 1,4 kb detektiert. Diese Transkripte wurden auch von der C-terminalen Probe erkannt. Die N-terminale Probe erkannte dagegen schwach ein 1,2 kb großes Transkript. Durch nachfolgende Hybridisierung mit einer für das Neo-Gen spezifischen Sonde wurde dieses Signal als Transkript des Neomycin-Gens identifiziert (Abb. 3.4). Die Erkennung dieser RNA durch die N-terminale Sonde weist auf eine Hybrid-RNA aus Neomycin-Gen und 5'-terminaler Annexin VII-Sequenz, die in antisense-Orientierung abgelesen werden müssen, hin. Die beiden Annexin VII-RNA-Spezies im Wildtyp besitzen unterschiedlich lange 3'-Enden. Das Vorhandensein von Transkripten, die nur C-terminale Sequenzen enthalten, war überraschend. Möglicherweise entstehen sie durch interne Promotor-ähnliche Sequenzen. Alternativ könnte ein Splicing-Ereignis bei Verwendung des Annexin VII-Promotors zu diesen Transkripten führen.

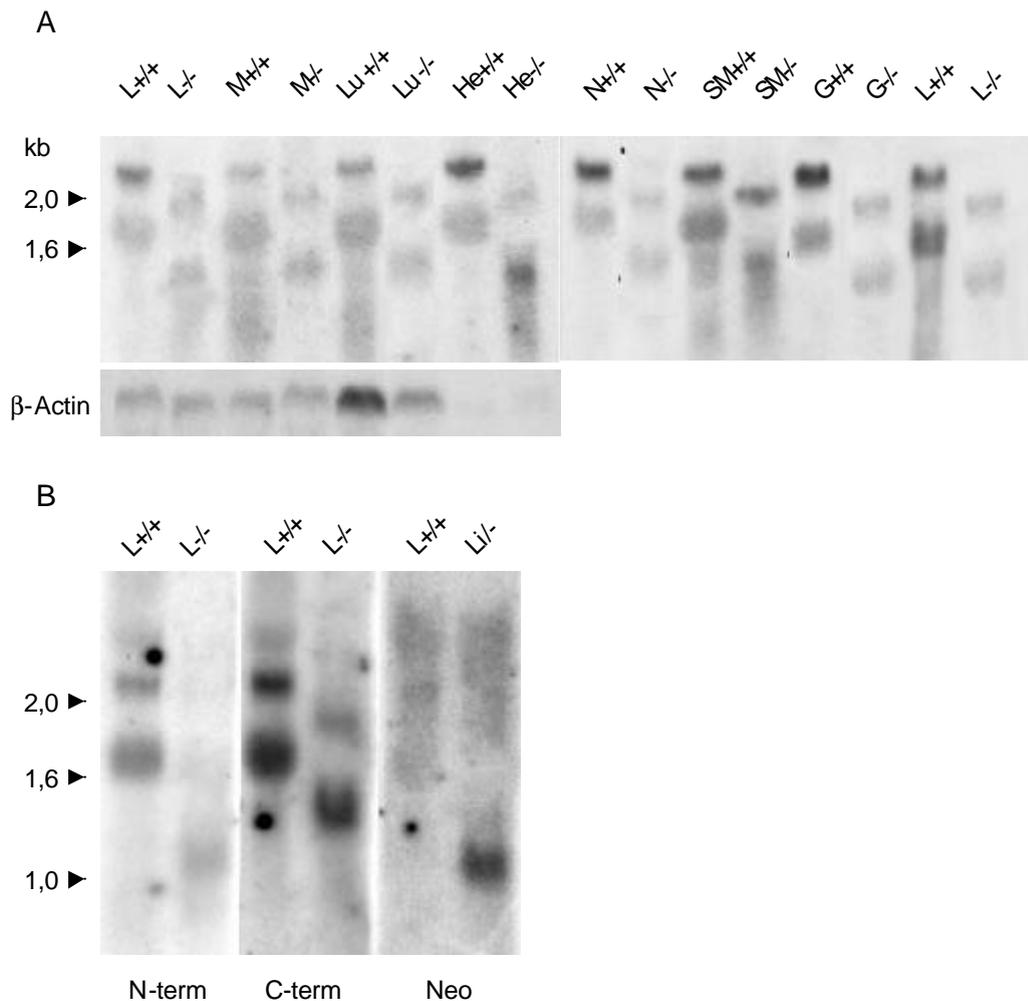


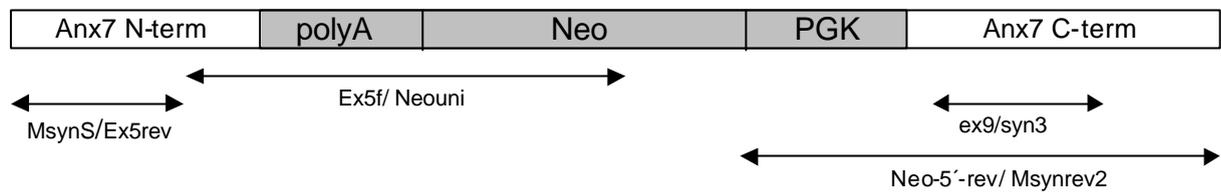
Abb.: 3.4: Northern Blot Analyse mit Gewebe-Gesamt-RNA von Wildtyp und Annexin-defizienten Mäusen. **A)** Hybridisierung mit der Anx7 cDNA-Probe. Zur Kontrolle wurde die Membran mit der β -Actin-Sonde hybridisiert. G: Gehirn; H: Herz; L: Leber; Lu: Lunge; M: Milz; N: Niere; SM: Skelettmuskel. **B)** Hybridisierung von Leber-Gesamt-RNA mit der N-terminalen Sonde (N-term), der C-terminalen (C-term) und der Neo-Gen-Sonde (Neo). +/+ : Wildtyp; -/-: homozygot.

3.2.1.2 RT-PCR

Eine weitere Identifizierung der Transkripte in der $Anx7^{(-/-)}$ -Maus wurde durch RT-PCR-Experimente mit nachfolgender Sequenzierung der Produkte angestrebt. Mit einem im Neo-Gen lokalisierten Primer (Neo-uni) und dem Annexin VII-spezifischen Primer Ex5f, der der Position 402-423 der cDNA entspricht, konnte ein 645 bp großes Fragment isoliert werden. Es stellt eine Hybrid-cDNA dar, bestehend aus Exon 5-7 gefolgt von 13 Nukleotiden nicht homologer Sequenz und 500 bp des Neomycinresistenzgens. In dieser cDNA fehlen die ersten 16 Basen von Exon 8 und das Polyadenylierungssignal des Neo-Gens. Mit dem Primerpaar MsynS und Ex5rev konnte für Wildtyp und $Anx7^{(-/-)}$ -RNA ein Exon 2-5 umfassendes Fragment, somit der größte Teil des N-Terminus, amplifiziert werden (Abb. 3.5). Ein mögliches Translationsprodukt, das in der $Anx7^{(-/-)}$ -Maus gebildet werden könnte und aus Annexin VII 5'-Sequenzen und Bereichen der Neomycin-Resistenzkassette

besteht, ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Es hat eine molekulare Masse von 28.700 und einen pI von 6,01. Weitere RT-PCR-Analysen mit unterschiedlichen Primer-Paaren aus der Core-Region (Exon 8-13) führten nicht zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Abb. 3.5).

A



B

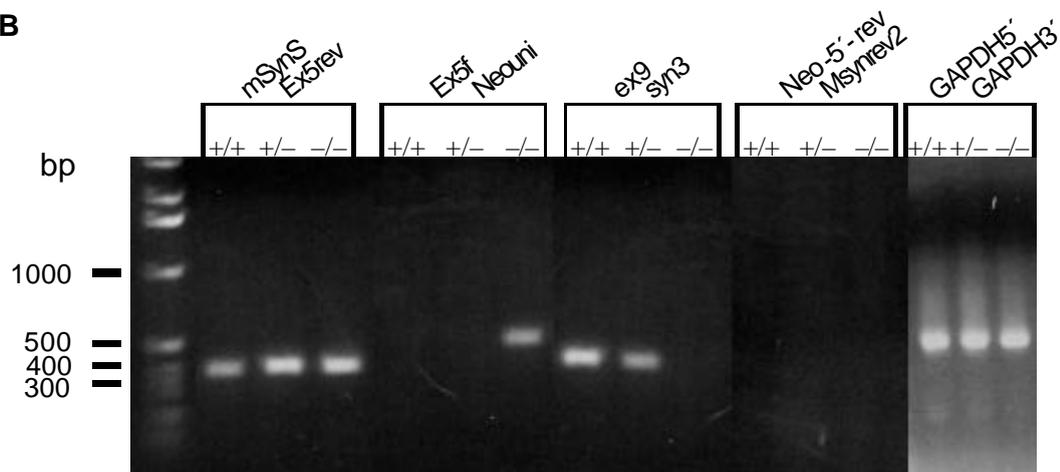


Abb. 3.5: RT-PCR-Experimente. **A)** Theoretische, vollständige Anx7-Neo-Gen-Hybrid DNA mit Lokalisation der verwendeten Primerpaare. **B)** Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR mit Gesamt-RNA aus der Leber von Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen. Die unterschiedlichen Primerpaare sind angegeben.

3.2.2 Untersuchungen zur Protein-Expression

3.2.2.1 Western Blot Analyse

Nach den Ergebnissen der RNA-Analyse war die Untersuchung auf mögliche Translationsprodukte des rekombinanten Allels von fundamentaler Bedeutung für die weitere Analyse der Mausmutanten. Western Blot Analysen von Gewebehomogenaten sollten darüber Aufschluß geben, ob verkürzte Annexin VII-Genprodukte vorliegen, die zu einer Beeinflussung eines charakteristischen Phänotyps führen könnten.

Für die Western Blot Analysen wurden Proteinextrakte aus verschiedenen Geweben 8-10 Wochen alter Wildtyp- und Anx7^(-/-)-Mäusen gewonnen. Je ca. 20 µg Gesamt-Protein wurden in einem 12%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es wurden zehn verschiedene monoklonale Anti-Annexin VII-Antikörper und ein polyklonaler Antikörper (pAnx7) verwendet (Tab. 3.3).

Antikörper	Reaktion mit Annexin VII Protein			Antikörper	Reaktion mit Annexin VII Protein		
	47 kDa	51 kDa	Anx7D		47 kDa	51 kDa	Anx7D
203-217	+++	++	++	204-204	++	++	-
203-80	+++	++	-	204-33	++	++	+
203-17	+	++	+	204-456	+	++	+
204-62 ¹	-	++	-	242-128 ²	++	++	+
204-289 ¹	+++	+++	++	242-45 ²	++	+	-
pAnx7	++	++	++				

Tab.3.3: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Western Blot Analyse. Angegeben ist, mit welchen Isoformen die Antikörper in Gewebehomogenaten reagieren, sowie die Detektion des Mutantenproteins Anx7D aus der Leber. +: positive Reaktion (die Anzahl der Pluszeichen zeigt die Stärke der Reaktion); -: negative Reaktion. ¹ Selbert et al., 1995; ² Anti-human-Annexin VII-Antikörper, zeigt gute Kreuzreaktion mit Maus-Annexin VII.

Als Antigene für die Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) dienten zwei Proteinfragmente aus Annexin VII (Abb.3.7). Für die mAK mit der Fusionsnummer 203 wurde ein 22 kDa Protein verwendet, das bis auf wenige Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich die Core-Region bis zum Ende der zweiten Domäne umfaßte. Das Proteinfragment für die mAK der Reihe 204 begann im N-terminalen Bereich mit den letzten Aminosäuren aus Exon 5, enthielt zusätzlich die Aminosäuren von Exon 6 und endete ebenfalls in der Core-Region in der zweiten Domäne. Aus dieser Fusion resultierten deswegen Antikörper, die spezifisch nur die große Isoform erkannten (Selbert, 1995). Für die Produktion des polyklonalen Antikörpers wurde die 47 kDa Isoform verwendet. In allen weiteren Versuchen wurden bevorzugt die monoklonalen Antikörper 203-217, 203-80, 204-289 und der polyklonale Antikörper pAnx7 verwendet.

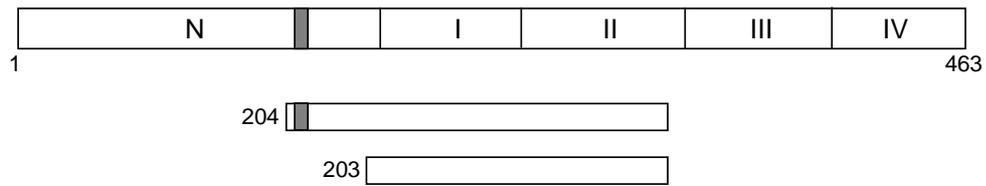


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Proteinfragmente zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Annexin VII. Die Struktur des Annexins ist in eine N-terminale und vier C-terminale Domänen untergliedert. Die zusätzliche Exonkassette 6 ist grau markiert. Der Bereich, den die Proteinfragmente für die Herstellung der Antikörper-Reihe 203 und 204 einnehmen, ist gekennzeichnet.

In Skelettmuskel, Gehirn, Herz, Milz, Niere, Lunge und Pankreas der Nullmutanten konnte weder mit den monoklonalen noch dem polyklonalen Antikörper Annexin VII nachgewiesen werden. Dagegen fand sich in der Leber der $Anx7^{(-/-)}$ -Mäuse ein Protein mit einer molekularen Masse von 47 kDa, das jedoch nur von sechs der neun monoklonalen und dem polyklonalen Antikörper detektiert wurde (Tab. 3.3, Abb. 3.8).

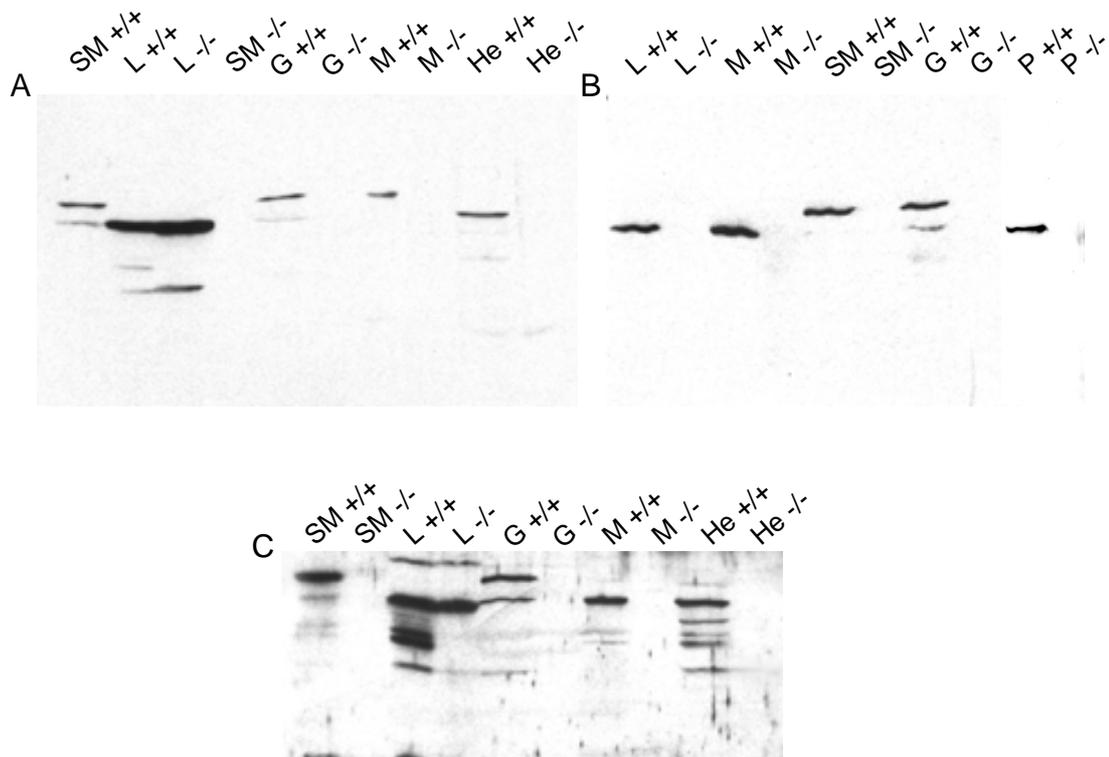


Abb. 3.8: Western Blot Analyse verschiedener Gewebehomogenate von Wildtyp- (+/+) und $Anx7^{(-/-)}$ -Maus (-/-). Getestet wurden die monoklonalen Antikörper 203-217 (A), 203-80 (B) und der polyklonale Antikörper pAnx7 (C). G: Gehirn; He: Herz; L: Leber; M: Milz, P: Pankreas; SM: Skelettmuskel.

3.2.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Charakterisierung des Mutantenproteins Anx7D aus Lebergewebe

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension in einem pH-Gradienten-Gelstreifen nach ihrem pI-Wert aufgetrennt. In der zweiten Dimension folgt die Trennung nach ihrem Molekulargewicht in einem herkömmlichen SDS-PAGE-Gel. Mit dieser Methode kann jedem Protein sowohl ein Molekulargewicht als auch ein pI-Wert zugeordnet werden. Sie wurde genutzt, um das Annexin VII-Mutanten-Protein (Anx7D) aus der Leber zu charakterisieren. Um den pI-Wert zu bestimmen, wurde eine Western Blot Analyse (2D-Analyse) durchgeführt. Das Wildtyp-Annexin VII-Protein hat einen theoretischen pI von 5,9. Würde es sich bei dem Protein Anx7D um ein Hybridprotein oder ein leberspezifisches Protein handeln, das mit dem Antikörper kreuzreagiert, so sollte bei gleichem Molekulargewicht jedoch der pI-Wert verschieden sein. Für die 2D-Analyse wurde der Überstand von ultrazentrifugiertem Leberhomogenat (10mg Protein/ml) von Wildtyp- und Anx7^(-/-)-Mäusen eingesetzt. Für das Wildtyp-Annexin konnte der pI-Wert von 5,8 sowohl in einem pH-Gradienten von 4-7 als auch von 3-10 bestätigt werden. Hier detektierten die Antikörper 204-289 und 203-80 jeweils ein Protein mit einem Molekulargewicht von 47 kDa. Das Mutantenprotein wurde mit dem Antikörper 204-289 bei einem pI von 8,9 detektiert. Nach der Fokussierung bei pH 4-7 zeigte sich erwartungsgemäß mit diesem Antikörper kein Signal in der 2D-Analyse (Abb. 3.9).

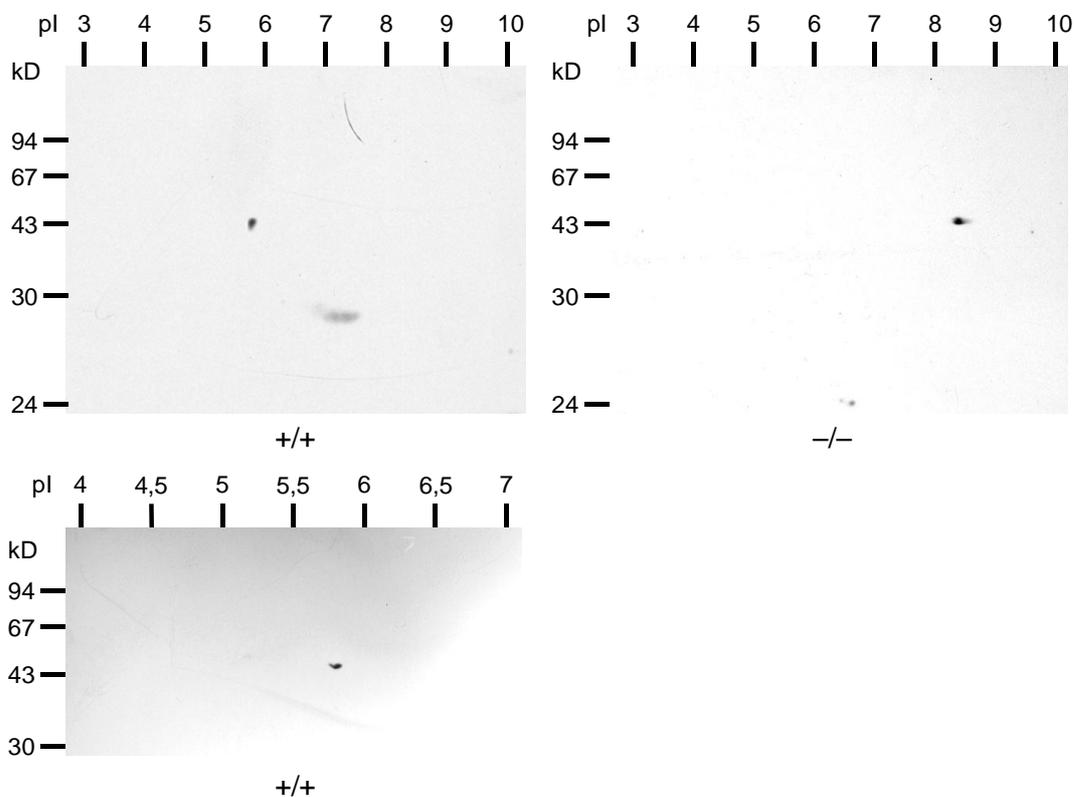


Abb. 3.9: Zweidimensionale Gelelektrophorese und 2D-Analyse mit Leberhomogenaten von Wildtyp (+/+)- und Anx7^(-/-)-Maus (-/-). Verwendet wurde der Antikörper 204-289. pI-Bereich und Molekulargewicht sind angegeben.

3.2.2.3 Extraktion von Ca²⁺-bindenden Proteinen aus Leberhomogenaten

Die Ca²⁺-abhängige Bindung von Annexinen an Membranen bzw. Phospholipiden kann zu einer Anreicherung von Annexinen genutzt werden. Nach Zell-Lyse und anschließender Pelletierung der Membranfraktionen bei 100.000 x g erscheinen Annexine bei Anwesenheit von Ca²⁺ im Pellet, da die Annexine unter diesen Bedingungen an die Membranphospholipide binden. Werden anschließend die Ca²⁺-Ionen durch EGTA gebunden, lösen sich die Annexine von den Membranfragmenten und verbleiben im Zentrifugationsüberstand (Gerke und Weber, 1984). Hier wurde diese Methode genutzt, um zu testen, ob das Mutantenprotein Anx7D aus einem Leberhomogenat Phospholipid- und Ca²⁺-bindende Eigenschaften besitzt und sich mit EGTA extrahieren läßt.

Nach Zell-Lyse, Ca²⁺-Zugabe, Zentrifugation der Membranen und ihrer Extraktion mit EGTA wurden der Extraktionsüberstand und das Pellet im Western Blot analysiert, um extrahierte Annexine im Wildtypextrakt und im Mutantenextrakt nachzuweisen. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen Annexin VI und Annexin VII (203-289) getestet. Annexin VI war sowohl im Überstand, als auch im Pellet von Wildtyp und Nullmutante zu finden. Das Protein Anx7D konnte dagegen nur im Überstand nach der Zell-Lyse detektiert werden und war nach der Extraktion weder im Überstand, noch im Pellet nachweisbar (Abb. 3.10). Es ist also davon auszugehen, daß es nicht in Abhängigkeit von Ca²⁺ an Membranen binden kann.

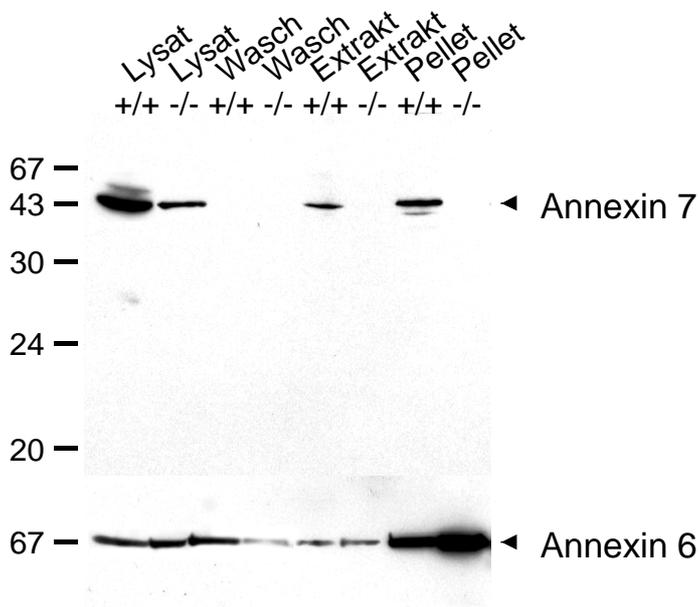


Abb. 3.10: Extraktion von Annexinen aus Leberhomogenat von Wildtyp (+/+)- und Anx7^(-/-)-Maus (-/-). Aliquots von dem Ursprungslisat nach Zugabe von Ca²⁺ (Lysat), von einem Waschschrift (Wasch) mit Ca²⁺, von dem Extraktionsüberstand (Extrakt) nach Zugabe von EGTA und dem Extraktionspellet (Pellet) wurden in der Western Blot Analyse auf das Vorhandensein von Annexin VI und Annexin VII untersucht.

3.2.2.4 Immunpräzipitation

Eine weitere Möglichkeit, die Identität des Proteins aus der Leber der *Anx7^(-/-)*-Maus zu klären, sollte eine Immunpräzipitation bieten, mit geplanter nachfolgender Charakterisierung des Proteins. Hier sollte unter Standardbedingungen Annexin VII aus Wildtyp und Anx7D aus der Nullmutante mit den Antikörpern mAK 204-289 und 203-217 aus Leberhomogenaten immunpräzipitiert werden. Dazu wurden die Antikörper jeweils an Sepharose A gekoppelt und die Immunpräzipitation im Batchverfahren durchgeführt. Mit den Eluaten erfolgte eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse, da hier zunächst nur im Mikromaßstab gearbeitet wurde und die Menge an immunpräzipitiertem Annexin VII auf einem SDS-PAGE-Gel nach Silberfärbung nicht sichtbar war. Abbildung 3.11 zeigt, daß aus Wildtypextrakt Annexin VII erfolgreich immunpräzipitiert werden konnte. Der Antikörper war aber unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage, das Mutantenprotein Anx7D zu binden. Eine Immunpräzipitation konnte für Anx7D mit keinem der verwendeten Antikörper nachgewiesen werden.

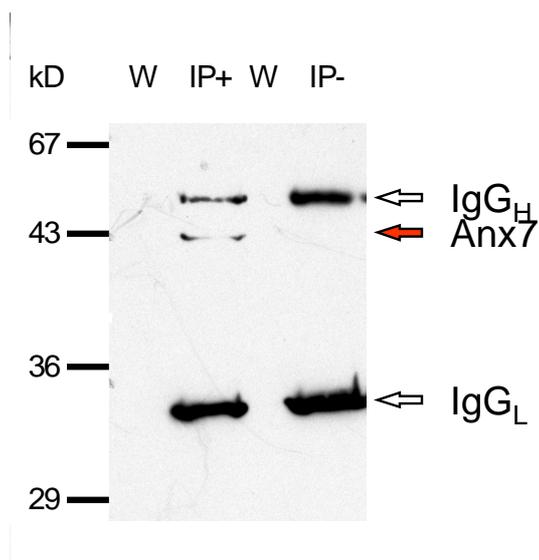


Abb. 3.11: Immunpräzipitation von Annexin VII. Mit Leberextrakten von Wildtyp (IP+)- und *Anx7^(-/-)* Mäusen (IP-) erfolgte eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper 204-289. Dabei konnte unter Standardbedingungen nur aus dem Wildtyp-Leberextrakt Annexin VII immunpräzipitiert werden (grauer Pfeil). Bei 25 und 50 kDa zeigen sich die schwere (IgG_H) und die leichte (IgG_L) Kette des Immunglobulins IgG. IP: Immunpräzipitat; W: Waschschrift.

Zusammengefaßt weisen alle proteinchemischen Versuche zur Charakterisierung des 47 kDa Proteins Anx7D in der Leber von *Anx7*-defizienten Mäusen darauf hin, daß dieses Protein in der *Anx^(-/-)*-Maus nicht identisch ist mit Annexin VII aus der Wildtyp-Maus, da wichtige Eigenschaften des Wildtypproteins, wie pI-Wert und Ca^{2+} -abhängige Bindung an Membranen nicht demonstriert werden konnten. Möglicherweise kreuzreagieren die monoklonalen Anti-Annexin VII-Antikörper mit einem leberspezifischen Protein, das in der *Anx7^(-/-)*-Maus hochreguliert wird. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr identifiziert werden.

3.2.2.5 Expression von Annexinen

Ruft der Ausfall eines Proteins Funktionsstörungen hervor, so wird der Organismus einen Ausgleich des Defekts anstreben. Je größer das Potential einer Zelle ist, viele Funktionen auszuüben, desto wahrscheinlicher kann die Zelle den Defekt kompensieren. Dieses Potential ist in den pluripotenten Zellen am Anfang der Entwicklung des Organismus am größten, im Laufe der Differenzierung nimmt es ab. Bei der Anx7-Defizienz, die von Beginn an bei homozygot mutanten Mäusen besteht, könnte es sein, daß ein möglicher Defekt kompensiert wird. Naheliegend ist dabei die Expression von Proteinen mit ähnlicher Funktion. Aus diesem Grund wurde in Gewebehomogenaten das Vorhandensein weiterer Annexine getestet (Abb. 3.12). Für die Western Blot Analyse wurden Antikörper gegen Annexin I, II, IV, V und VI verwendet. Diese Annexine werden wie Annexin VII in zahlreichen Organen exprimiert.

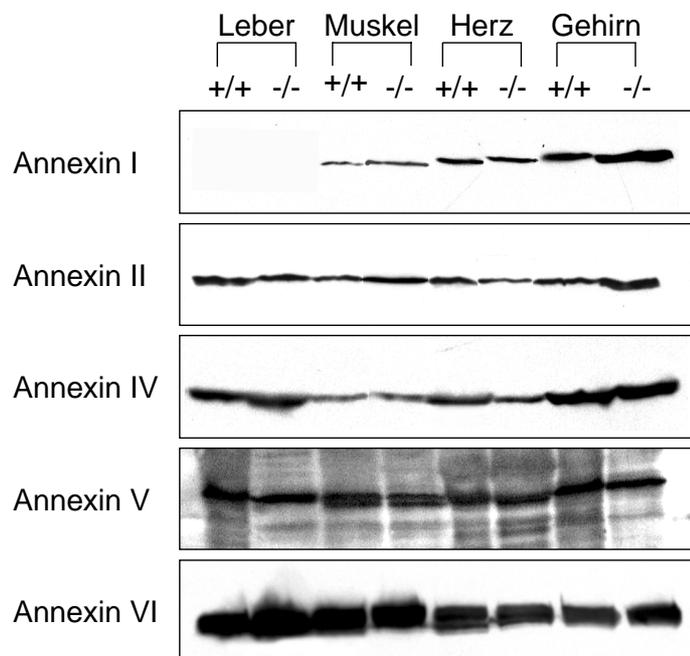


Abb. 3.12: Expression von verschiedenen Annexinen in Geweben von Wildtyp (+/+)- und Anx7^(-/-)-defizienter Maus (-/-).

Der Vergleich der Mengen dieser Annexine in Wildtyp- und Mutantengewebe ergab keine Hinweise auf große Veränderungen in Anx7-defizienten- versus Wildtyp-Mäusen. Eine mögliche Kompensation durch erhöhte Expression anderer Annexine ist daher nicht erkennbar.

3.2.3 Phänotyp der Anx7-defizienten Mauslinie

In ihrem allgemeinen Erscheinungsbild lassen sich die transgenen Tiere nicht von den Wildtyptieren unterscheiden. Hetero- und homozygote Tiere sind vital und fertil. Die Anx7^(-/-)-Mäuse zeigen im adulten Stadium in Körperform und -größe sowie in der Fellbeschaffenheit keine Unterschiede zu Wildtypmäusen. Auch in ihrer Bewegung und Aktivität sind sie Annexin VII exprimierenden Tieren ähnlich. Das Sozial-, Paarungs- und Aufzuchtverhalten ist ebenfalls nicht von Wildtypmäusen abzugrenzen. Während ihrer juvenilen Entwicklung haben die Anx7^(-/-)-Tiere allerdings ein bis zu 10 % reduziertes Gewicht im Vergleich zu Wildtyp- und heterozygoten Mäusen (Abb. 3.13). Verglichen wurde das Gewicht von Tieren aus fünf Würfen über sechs Wochen. In der anfänglichen Entwicklung hatte das Geschlecht keinen Einfluß auf das Gewicht, erst nach ca. vier Wochen wurde zwischen männlichen und weiblichen Tieren unterschieden. Die Messungen erfolgten drei Wochen nach der Geburt, da erst ab dieser Zeit die Tiere markiert und genotypisiert werden konnten. Nach ca. sechs bis acht Wochen zeigte sich für beide Geschlechter eine Angleichung des Gewichts Anx7^(-/-)-Tiere (knock-out) an das der Wildtypmäuse. Diese Beobachtung, daß Gewicht und Körpergröße im juvenilen Alter zwischen Wildtyp- und knock-out Mäusen divergieren und sich erst im adulten Stadium mit Erreichen der Geschlechtsreife angleichen, wurde schon des öfteren beobachtet. Eine grundlegende Erklärung für dieses Phänomen wurde jedoch bisher nicht veröffentlicht (N. Smyth, mündliche Mitteilung).

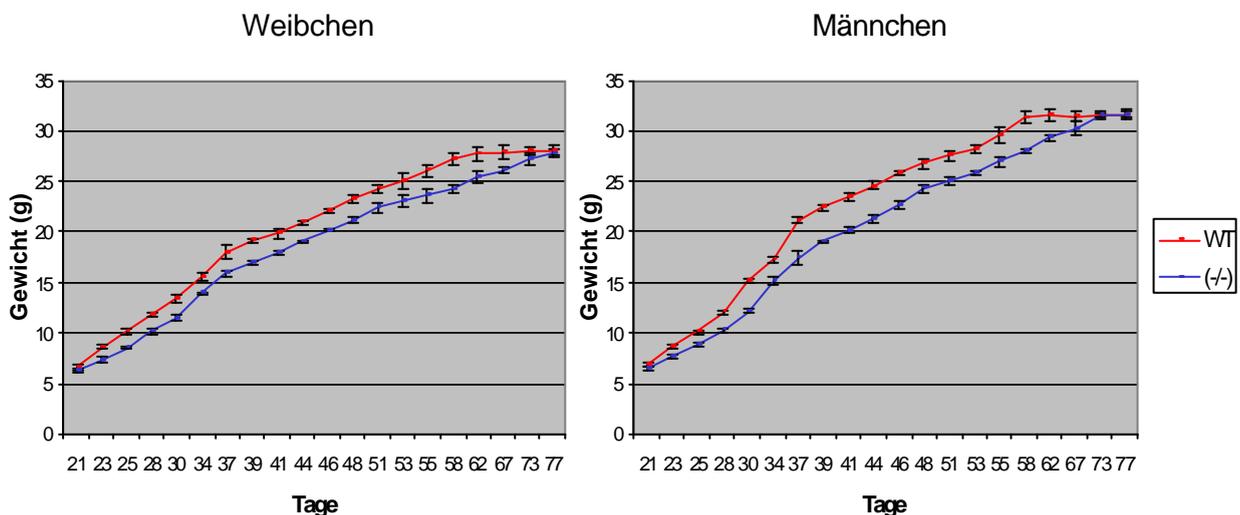


Abb. 3.13: Gewichtsvergleich von Wildtyp (WT)-und Anx7^(-/-)-Mäusen (-/-) im juvenilen Stadium (Alter: drei bis acht Wochen).

3.2.4 Die Skelettmuskulatur in der transgenen Maus

Der Skelettmuskel ist das einzige Organ, in dem ausschließlich die große Isoform (51 kDa) von Annexin VII exprimiert wird. *In vitro*-Versuche haben gezeigt, daß im Laufe der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben die Expression der 51 kDa Isoform kurz nach beginnender Differenzierung einsetzt (Selbert et al., 1995; Clemen et al., 1999). Differenzierte Myotuben exprimieren somit beide Isoformen. Wann die Expression der 47 kDa Isoform im weiteren Verlauf der Myogenese abgeschaltet wird, ist unklar. Die Ca^{2+} -abhängige, membranaggregierende Funktion von Annexin VII und seine Lokalisation vornehmlich am Sarkolemma der Muskelfasern hatten zu dem Vorschlag geführt, daß Annexin VII an der Verschmelzung von Muskelzellen zu Muskelfasern beteiligt sein könnte (Selbert, 1995).

Die Annahme war, daß der Verlust von Annexin VII zu einem Defekt in der Entwicklung und im Aufbau der Skelettmuskulatur und somit möglicherweise zu einem dystrophen Phänotyp in der Anx7-defizienten Maus führen könnte. Rein äußerlich ließ sich bei den Anx7^(-/-)-Tieren jedoch kein entsprechender Phänotyp feststellen. Anx7^(-/-)-Tiere zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keine Veränderung in der Haltung der Extremitäten oder im Gang, wie z.B. Dystrophin-Utrophin-defiziente Tiere (Deconinck et al., 1997).

3.2.4.1 Histologie

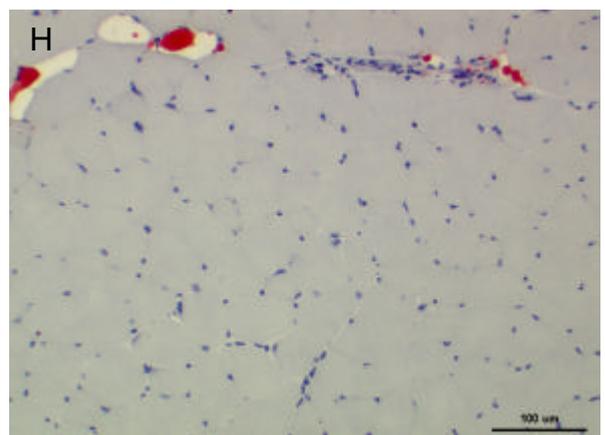
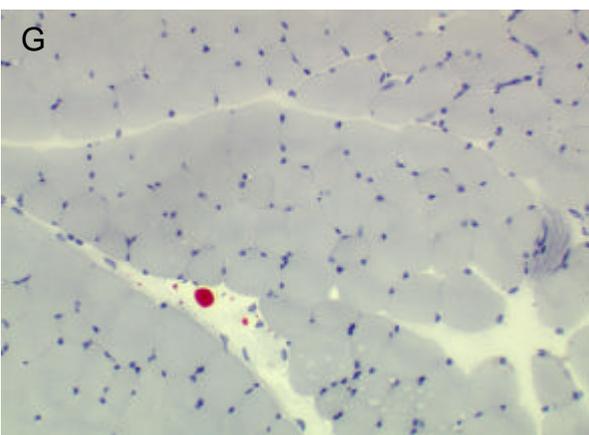
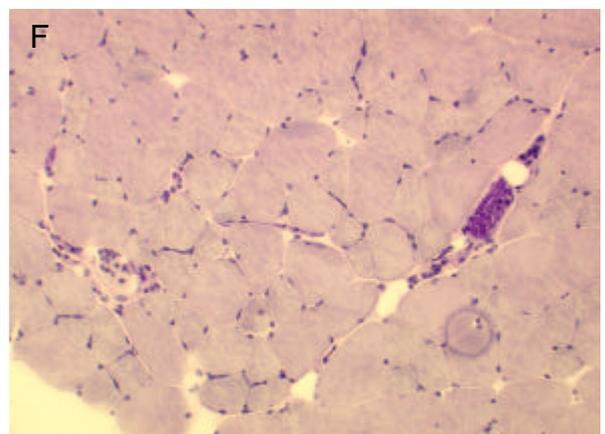
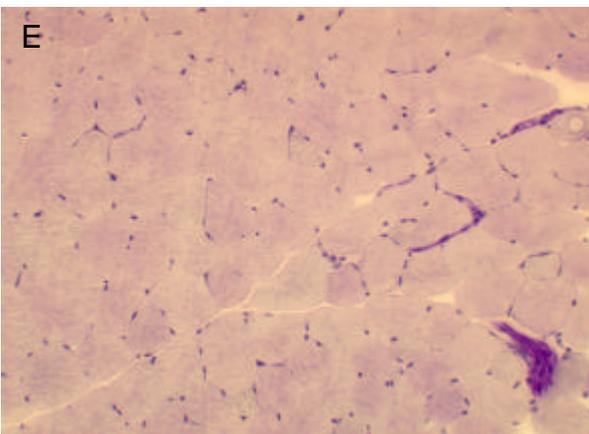
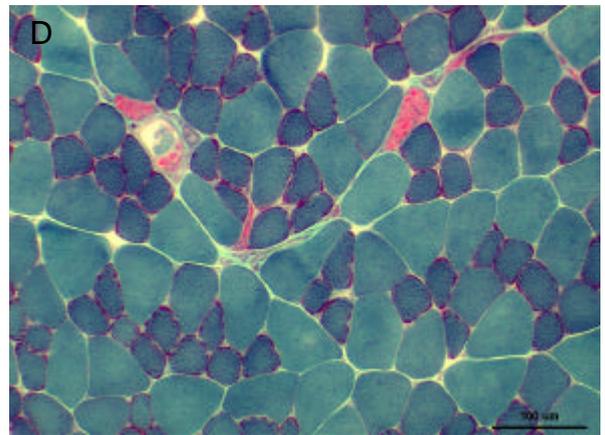
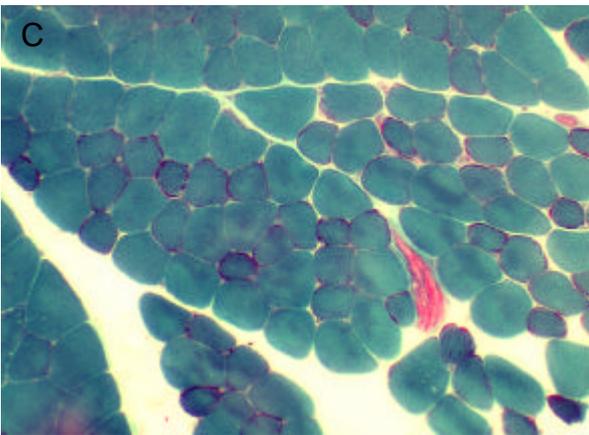
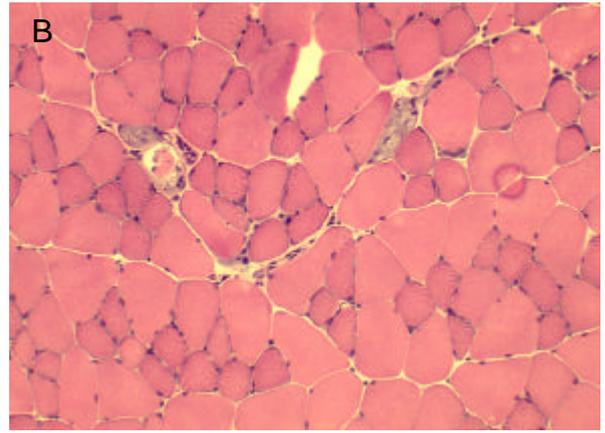
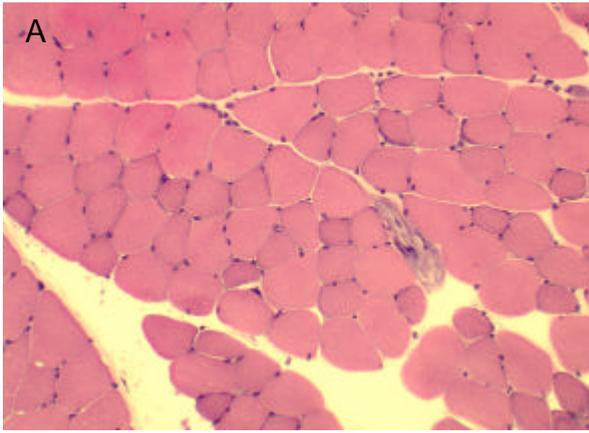
Für eine histologische Analyse der Skelettmuskulatur wurden freundlicherweise im Labor von Dr. R. Schröder (Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Bonn) Gefrierschnitte von Wildtyp- und Anx7^(-/-)-Mäusen verschiedenen histologischen Färbungen unterzogen. Mit den ausgewählten Färbemethoden können mögliche pathologische Veränderung der Skelettmuskeln schon morpho-histologisch erkannt werden. Untersucht wurden die Muskeln der Vorder- und Hinterextremitäten beider Mauslinien im Alter von 6 Monaten. Mehrere Muskeln enthaltende Gewebestücke wurden aus den einzelnen Extremitäten präpariert und für die Gefrierschnitttechnik eingefroren. Die Lage der entnommenen Muskelbiopsien war bei beiden Mauslinien gleich. Abgebildet sind hier nur Gewebeschnitte aus der linken Hinterextremität. Eine lichtmikroskopische Betrachtung der Präparate zeigte keine Veränderung der Morphologie der Skelettmuskulatur von Anx7^(-/-)-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abb. 3.14). HE-Färbung (Abb. 3.14 A und B) und Trichrom-Färbung nach Gomori (Abb. 3.14 C und D) vermitteln eine allgemeine Übersicht über den morphologischen Zustand der Skelettmuskulatur. Bei der HE-Färbung stellen sich die Muskelfasern rot, die randständigen Kerne blau dar. Bei der Trichrom-Färbung wird zusätzlich Bindegewebe angefärbt, das sich hier, wie auch die Kerne, rot darstellt, während die Muskelfasern grün erscheinen. Um funktionelle Störungen auszuschließen, wurden auch einige Enzyme und Speicherstoffe in den Muskelfasern angefärbt. Glykogen wird mit der PAS-Färbung (periodic-

acidic Schiff-reaction; Abb. 3.14 E und F) und Fette mit der Öl-Rot-Färbung dargestellt (Abb. 3.14 G und H). Vermehrte Speicherung von Glykogen oder Lipiden würde jeweils durch eine starke Rotfärbung angezeigt werden und wäre ein Hinweis auf einen Defekt im Stoffwechsel der Muskulatur. Zu den Enzym-Färbungen, die Veränderungen im Metabolismus anzeigen können, gehören die Cytochrom C- (Abb. 3.14 I und J), die NADH-Reduktase- (Abb. 3.14 K und L) und die Succinat-Dehydrogenase-Färbung (SDH; Abb. 3.14 M und N). Stärker angefärbte Muskelfasern (langsame Fasern, Typ I) weisen einen stark aeroben, schwach angefärbte Fasern (schnelle Fasern, Typ II) einen schwach aeroben Metabolismus auf. So wird die mitochondriale Aktivität der Enzyme und die Verteilung von schnellen und langsamen Fasern dargestellt. Die saure Phosphatase ist ein lysosomales Markerenzym und kann ebenfalls spezifisch angefärbt werden. Eine hohe Aktivität der sauren Phosphatase ist z.B. bei Speicherkrankheiten oder Entzündungen zu beobachten und würde sich durch eine verstärkte Rotfärbung auszeichnen. Die morphologische und histochemische Beurteilung der Muskelpräparate ergab bei den $Anx7^{(-/-)}$ -Mäusen keinen Hinweis auf einen myopathologischen oder neurodegenerativen Defekt. Desweiteren konnten Speicherkrankheiten und mitochondriale Dysfunktionen ausgeschlossen werden.

Abb. 3.14 (Seite 65 und 66): Transversale Gewebeschnitte der Skelettmuskulatur (Hinterlauf). A, B: HE-Färbung; C, D: Trichrom-Färbung nach Gomori; E, F: PAS-Färbung; G, H: Öl-Rot-Färbung; I, J: Cytochrom-C-Oxidase; K, L: NADH-Reduktase; M, N: Succinat-Dehydrogenase; O, P: saure Phosphatase; +/-: Wildtyp; -/-: $Anx7^{(-/-)}$ -Maus.

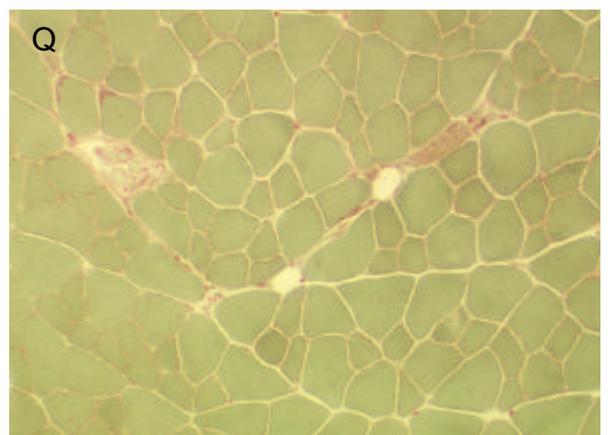
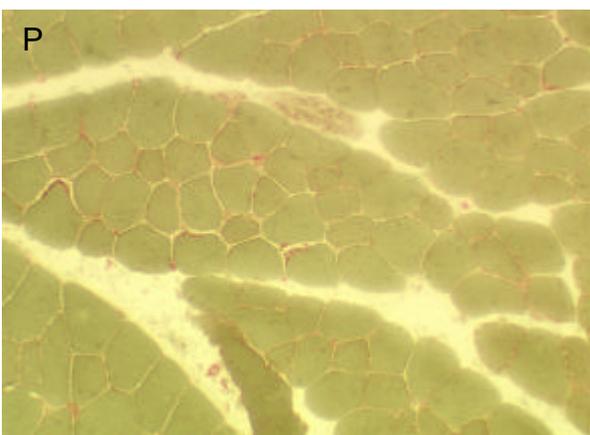
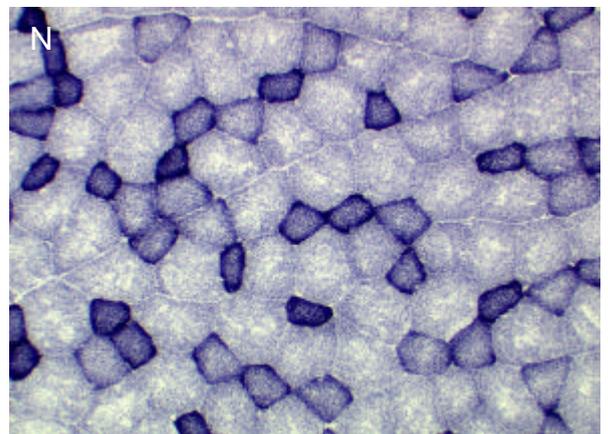
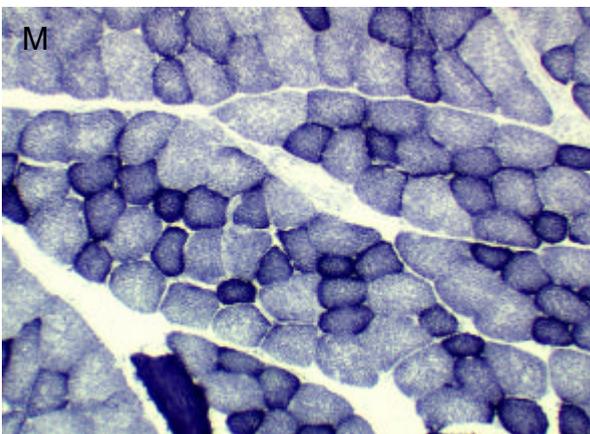
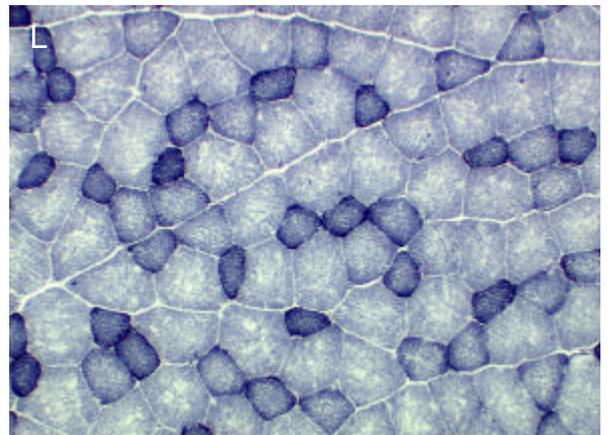
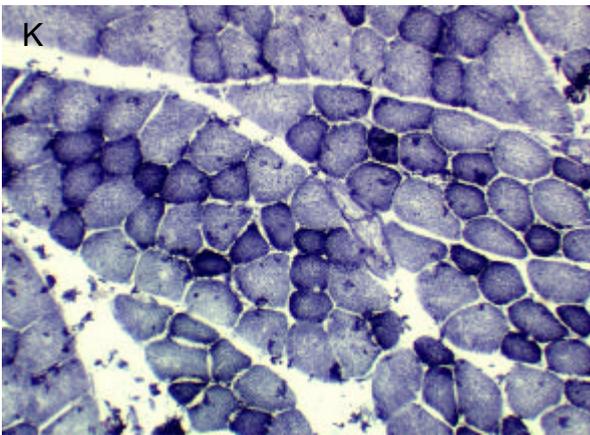
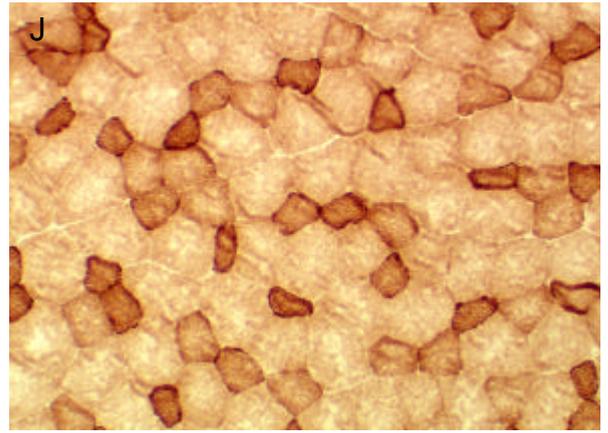
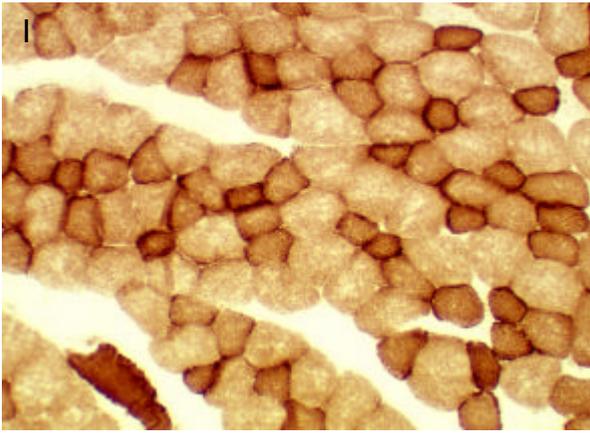
+/+

-/-



+/+

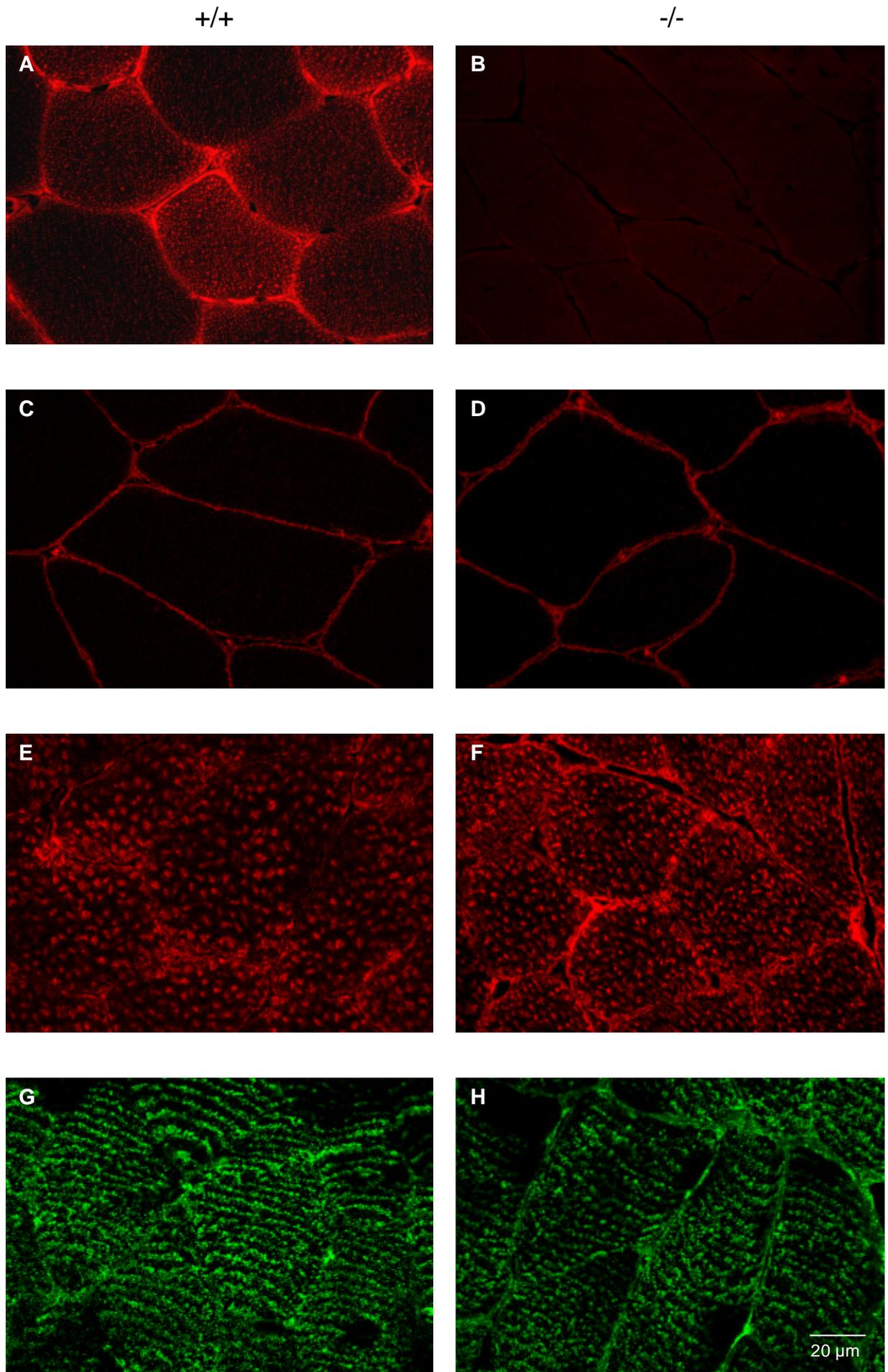
-/-



3.2.4.2 Immunhistologie

Immunhistochemische Untersuchungen ermöglichen die Analyse einer Proteinexpression im Gewebeschnitt. Die genaue Lokalisation eines Proteins und seine Assoziierung mit anderen Proteinen kann dargestellt werden.

Nachdem die Western Blot Analyse bereits das Fehlen von Annexin VII im Skelettmuskel von $Anx7^{(-/-)}$ -Mäusen gezeigt hat, wurde dieses Ergebnis mit der Immunhistochemie nochmals bestätigt. Zusätzlich wurden in der Immunfluoreszenz noch Myosin als Mikrofilament, Desmin als Intermediärfilamentprotein und Caveolin 3 auf ihre Verteilung im Muskel der $Anx7^{(-/-)}$ -Mäuse untersucht (Abb. 3.15). Eine Veränderung in der Verteilung von Proteinen, die am Aufbau des kontraktiven Apparates involviert sind, könnte auf eine Beteiligung von Annexin VII am Zytoskelett hinweisen. Myosin als wichtiges Motorprotein bildet dicke Filamente aus, die mit Aktinfilamenten interagieren. Diese beiden Filamente sind wichtige Strukturen in der kontraktiven Einheit (Sarkomer) des Muskels. Intermediärfilamente sind kräftige Polymere aus faserigen Polypeptiden, die Zugkräften widerstehen und für Struktur und mechanische Belastbarkeit der Zellen von großer Bedeutung sind. Desmin findet man vorwiegend in Muskelzellen, wo es die benachbarten Myofibrillen verbindet (Lazarides, 1980; Ngai et al., 1985). Caveolin 3 als integrales Membranprotein wird ebenfalls hauptsächlich in der Muskulatur exprimiert. Dort findet es sich vorwiegend an caveolären Membranen (Plasmamembran), aber auch an Membrankompartimenten in der Zelle (Tang et al., 1996). Es wurden Tiere im Alter von 10 Wochen bzw. 10 Monaten (hier gezeigt) untersucht. Annexin VII konnte in der Skelettmuskulatur von $Anx7^{(-/-)}$ -Tieren nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B). Ferner zeigten Myosin, Desmin und Caveolin 3 in ihrer Lokalisation unabhängig vom Alter der Tiere keine Abweichung im Vergleich zu den Wildtyptieren (Abb. 3.15 C-H).



3.2.5 Physiologische Untersuchungen an embryonalen Kardiozyten

3.2.5.1 Ca²⁺-Imaging-Experimente

Im Herzen werden beide Isoformen von Annexin VII exprimiert. Funktionen wurden bisher für Annexin VII im Herzen jedoch noch nicht propagiert. Für Annexin VI wird eine Funktion als Regulator von z.B. Pumpen oder Austauschern in der Membran von Kardiozyten vermutet (Gunteski-Hamblin et al., 1996;). Sollte Annexin VII eine Rolle als Ca²⁺-Kanal oder Regulator von Ionen-Kanälen übernehmen, so könnte sich sein Verlust auf die Ca²⁺-Homöostase oder auf die Funktion solcher Kanäle auswirken. Um mögliche Kompensationsmechanismen zu umgehen, wurden die Experimente während der frühen embryonalen Entwicklung (E11,5/E12,5) an isolierten embryonalen Kardiozyten durchgeführt. Die Annexin VII-Expression in embryonalen Kardiozyten ist sehr wahrscheinlich, da in Embryoid bodies Annexin VII mRNA nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Embryoid bodies bilden während ihrer Entwicklung im frühen Stadium Kardiozyten und später auch Myozyten und Myotuben aus (Doetschmann et al., 1985)

Um zu testen ob der Verlust von Annexin VII einen Einfluß auf die Ca²⁺-Homöostase hat, wurden zunächst Ca²⁺-Imaging-Experimente an isolierten embryonalen Kardiozyten (EK) durchgeführt. Ein Charakteristikum früher EK ist die Fähigkeit zur spontanen Kontraktion, die von einem intrazellulären Ca²⁺-Transienten begleitet wird (Takeshima et al., 1998; Viatchenko-Karpinski et al., 1999). Es wird vermutet, daß diese spontanen Kontraktionen durch das Öffnen von L-Typ Ca²⁺-Kanälen (VDCC) getriggert sind. Diese typische Eigenschaft wurde auch in EK's der Anx7^(-/-)-Maus beobachtet. Die Wildtyp-EK's zeigten in der Ruhephase eine Ratio (340/380 nm) von $0,94 \pm 0,02$ und Anx7^(-/-)-EK's eine Ratio von $0,78 \pm 0,02$, die sich nicht auffallend unterschied. Die Erhöhung des cytosolischen Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) erfolgte in regelmäßigen Abständen, was erkennen läßt, daß VDCC funktionell exprimiert sind und die zellulären Mechanismen der Erregungs-Kontraktionskopplung intakt sind. Dies wird dadurch untermauert, daß die Ratio während der Kontraktionsphase in Anx7^(-/-)- sowie in Wildtyp-Kardiozyten signifikant ansteigt (Wildtyp: $1,63 \pm 0,057$; Anx7^(-/-): $1,28 \pm 0,047$; Abb. 3.16 A). Ferner kann aufgrund des normalen Ruhe-Ca²⁺ eine Veränderung in der Expression und/oder der Aktivität von intrazellulären Ca²⁺-Speichern und Pumpensystemen wie z.B. der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher, die Ca²⁺-ATPase oder SERCA2, die eine wichtige Rolle in der Ca²⁺-Homöostase spielen, ausgeschlossen werden. Wurde das Membranpotential durch eine Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration von 5 auf 140 mM depolarisiert, kam es zu einem signifikanten Ca²⁺-Anstieg, was erneut die funktionelle Expression der VDCC nachweist (Abb. 3.16 B).

Ein entscheidender Mechanismus für die kardiale Erregbarkeit ist der sogenannte "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release" (CIRC) Mechanismus, bei dem durch das Öffnen von VDCC das über

die Zellmembran einströmende Ca^{2+} die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Aktivierung des Ryanodinrezeptors triggert. In der Tat reicht unter physiologischen Bedingungen der durch das Öffnen der VDCC verursachte intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg für die zelluläre Kontraktion der Kardiocyte nicht aus und erfordert unbedingt den CIRC (Bers, 1991). Um zu überprüfen, ob der Verlust von Annexin VII zu einer Beeinträchtigung des Ryanodin-SR-Komplexes führt, wurde dessen qualitative sowie quantitative Integrität unter Verwendung des Ryanodinrezeptor-Agonisten Koffein (10 mM) getestet. In den $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Kardiocyten wurde durch Koffein ein Ca^{2+} -Transient mit der gleichen Amplitude ($1,69 \pm 0,132$) wie für die Wildtyp-Kardiocyten ($1,7 \pm 0,136$) induziert (Abb. 3.16 C). Diese Daten weisen auf eine intakte Expression und Funktionalität dieser Systeme in den $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Kardiocyten hin.

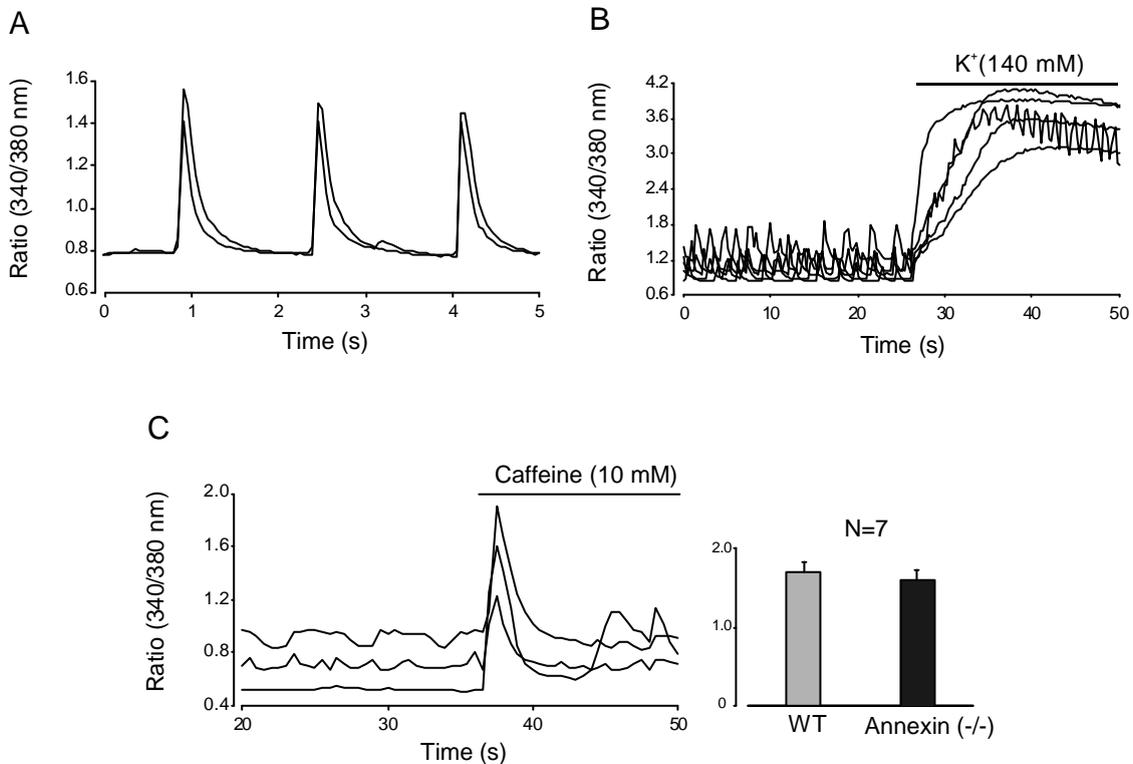


Abb. 3.16: Ca^{2+} -imaging Experimente an embryonalen $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Kardiocyten (EK). **A)** Die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in regelmäßigen Abständen zeigt die Fähigkeit zur spontanen Kontraktion der EK. Dargestellt sind die Ratios von zwei isolierten Kardiocyten. **B)** Die Erhöhung von extrazellulärem K^+ führt zu einem signifikanten Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$; Dargestellt sind die Messungen an fünf isolierten EK. **C)** Der CIRC-Mechanismus kann durch den Ryanodinrezeptor-Agonisten Koffein stimuliert werden. Abgebildet sind die Ratios von drei isolierten EK. CIRC: " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release".

3.2.5.2 Elektrophysiologische Messungen

Die Ergebnisse der Ca^{2+} -Messungen haben gezeigt, daß die Ca^{2+} -Homöostase in den EK der $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Maus normal ist. Elektrophysiologische Messungen können weiterhin Aufschluß darüber geben, ob Annexin VII einen Einfluß auf die Expression und Aktivität von Ca^{2+} -, Na^+ - oder K^+ -Kanälen hat.

In Current-Clamp Experimenten zeigte sich, daß $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -EK normale Aktionspotentiale (AP; APD_{90} $247,7 \pm 43,7$) mit einem maximalen diastolischen Potential von $56,8 \pm 1,7$ mV aufweisen (Abb. 3.17 A). Hierbei handelt es sich um typische ventrikuläre AP im frühembryonalen Herz (E11,5-E12,5). Bereits diese Befunde deuten auf eine normale Expression der wichtigsten Ionenkanalkomponenten in den $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -EK hin. Dies wurde in Voltage-Clamp-Messungen bestätigt, wo die funktionelle Expression des einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanals ($I_{\text{K-in}}$), von I_{Na} (Na^+ -Kanal), $I_{\text{Ca-L}}$ (L-Typ Ca^{2+} -Kanal) sowie $I_{\text{K-out}}$ (auswärtsgerichteter K^+ -Kanal) in Spannungsrampen (von -100 mV auf 50 mV, 150 ms) beobachtet wurde (Abb. 3.17 B). Die Untersuchungen belegten in Einklang mit den Ca^{2+} -Imaging Experimenten eindeutig, daß sich die $I_{\text{Ca-L}}$ Stromdichte in Wildtyp- und $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Kardiozyten nicht unterscheidet und somit die Dichte der Ca^{2+} -Kanäle auf der Oberfläche der einzelnen Zellen unabhängig von der Größe gleich ist (WT-EK: $14,1 \pm 2,5$ pA/pF; $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -EK: $17,4 \pm 2$ pA/pF; Abb. 3.17 C).

Die Funktion des Herzens ist weiterhin maßgeblich durch das autonome Nervensystem moduliert, hierbei ist besonders die Regulation von $I_{\text{Ca-L}}$ zu erwähnen. Deshalb wurde die Etablierung der muskarinergen Signalkaskade, die in frühembryonalen Kardiozyten im Gegensatz zu adulten Zellen stark ausgebildet ist, in den $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -EK untersucht (Maltsev et al., 1999; Jie et al., 1999). Identisch zu den Befunden in Wildtyp-EK (Reduktion um $51,7 \pm 8$ %) konnte eine starke Hemmung des basalen $I_{\text{Ca-L}}$ nach Gabe des muskarinergen Rezeptoragonisten Carbachol in den $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -EK ($47,3 \pm 6$ %) beobachtet werden (Abb. 3.17 D). Diese Befunde untermauern, daß die komplexe Signaltransduktionskette ausgehend vom M2-Rezeptor bis zur Phosphorylierungsstelle des Ca^{2+} -Kanals bzw. eines assoziierten Proteins intakt ist. Diese Beobachtungen wurden in der Spannungsklemme bestätigt, wo Carbachol einen ausgeprägten negativ chronotropen Effekt hatte (Abb. 3.17 F). Da keine Hyperpolarisation des Membranpotentials sondern eine Depolarisation zu beobachten war, beruht dieser Effekt nicht auf der Aktivierung des Acetylcholin-aktivierten K^+ -Kanals sondern wenigstens auf der nachgewiesenen Hemmung von $I_{\text{Ca-L}}$. Der Carbachol-Effekt konnte wie erwartet ausgewaschen werden. Diese Befunde belegen, daß die Etablierung intrazellulärer Signalkaskaden neben der normalen Expression der Ionenkanäle in den $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -EK intakt bleibt.

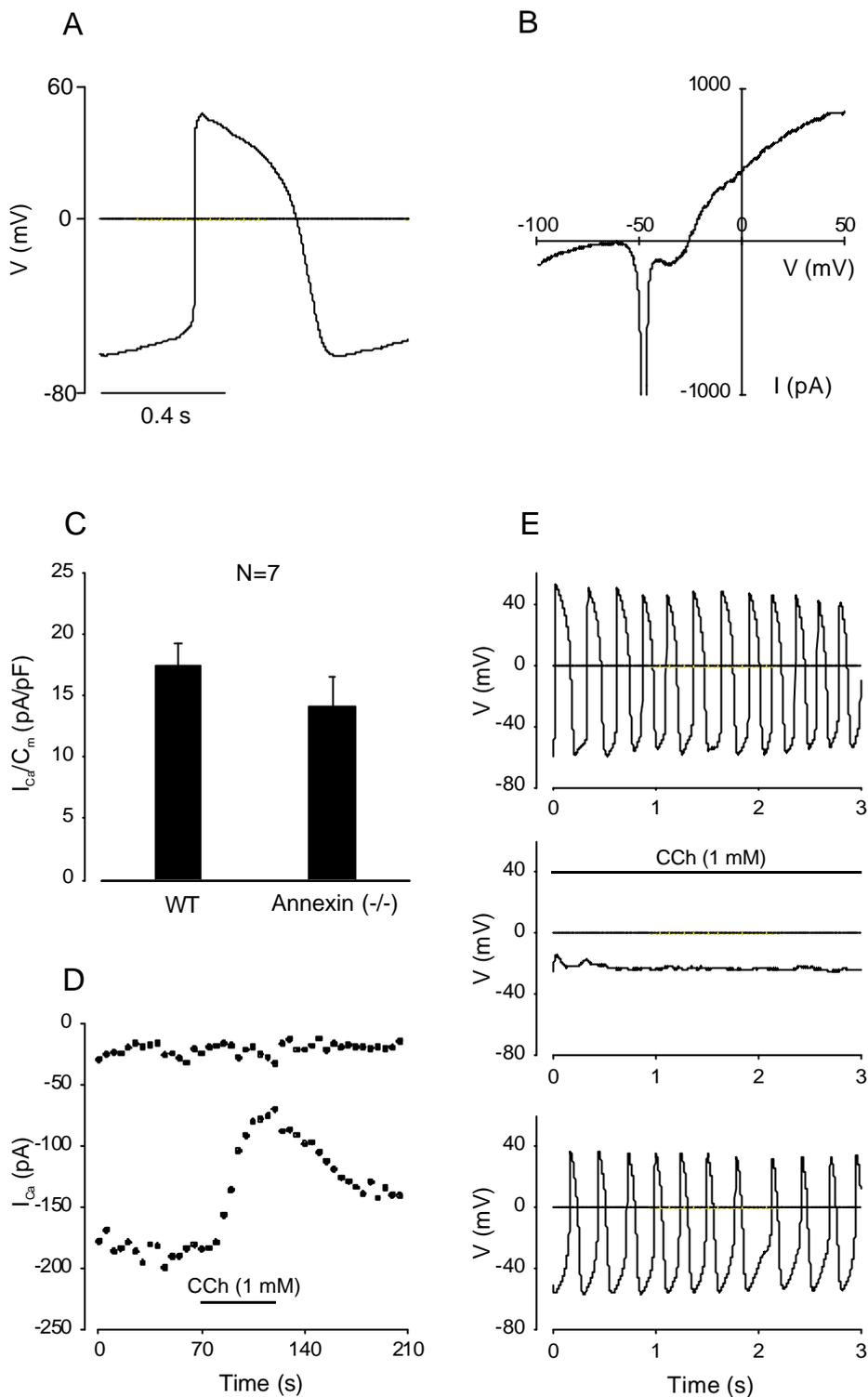


Abb.3.17: Elektrophysiologische Messungen an isolierten $Anx7^{(-/-)}$ -Kardiozyten. **A)** Ventrikuläres Aktionspotential einer spontan kontrahierenden EK im current-clamp-Modus. **B)** Voltage-clamp-Messung der an dem Aktionspotential beteiligten Ströme. **C)** Stromdichte der Ca^{2+} -Kanäle von Wildtyp (WT)- und $Anx7^{(-/-)}$ -EK. **D)** Einfluß des muskarinergen Rezeptoragonisten Carbachol auf den basalen Ca^{2+} -Strom. Jeder Punkt entspricht der maximalen Amplitude des Ca^{2+} -Stroms zum entsprechenden Zeitpunkt. Die obere Punktreihe repräsentiert den Haltestrom. **E)** Carbachol zeigt einen negativen chronotropen Effekt, der sich auswaschen läßt.

3.2.6 Kraft-Frequenz-Messungen an adulten isolierten Kardiomyozyten

Obwohl in embryonalen Kardiomyozyten keine Veränderungen durch den Verlust von Annexin VII aufgetreten sind, wurde das adulte Herz auf mögliche veränderte Mechanismen untersucht. Die mechanische und elektrophysiologische Beanspruchung an adulte Kardiomyozyten ist deutlich verstärkt und die Mechanismen für Kontraktion und Reizleitung haben sich weiter differenziert.

Bei den meisten Säugetieren, so auch bei der Maus, führt eine Erhöhung der Herzfrequenz zu einer Zunahme der Kontraktionskraft (positive Kraft-Frequenz-Beziehung, positives Treppen-Phänomen; Bowditch, 1871; Buckley et al., 1972). Die Erhöhung der Kontraktionskraft bei erhöhter Stimulationsfrequenz wird unter anderem auf eine frequenz-bedingte Erhöhung der systolischen Ca^{2+} -Konzentration, z.B. über eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum oder einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom über die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Piot et al. 1996) zurückgeführt. Veränderungen in der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase oder der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente können daher durch Erhöhung der Stimulationsfrequenz untersucht werden.

3.2.6.1 Frequenz-aktivierte Zellverkürzung und -länge

Die Herzen von $\text{Anx7}^{(-/-)}$ - und Wildtyp-Mäusen (Kontrolltiere, WT) unterschieden sich weder morphologisch noch in ihrer Größe voneinander. Das Herz-Körpergewicht-Verhältnis war für beide Tiergruppen mit 0,65 bzw. 0,67 % gleich. Eine Degeneration oder Fibrose des Myokardiums war weder bei jungen (8-10 Wochen) noch bei älteren (bis zu 12 Monaten) knock-out-Tieren zu erkennen.

Um zu untersuchen, welche funktionelle Bedeutung Annexin VII auf die kardiale Kontraktion hat, wurde an isolierten Kardiomyozyten (KM) unter basalen Bedingungen (0,5 Hz, 32 °C, 2 mM Ca^{2+}) sowie nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz die Zellverkürzung gemessen.

Unter Basalbedingungen bestand bei beiden Kardiomyozyten-Typen kein Unterschied in der diastolischen Zelllänge (WT: $114 \pm 8 \mu\text{m}$; $\text{Anx7}^{(-/-)}$: $85 \pm 6 \mu\text{m}$) oder der maximalen Zellverkürzung (WT: $1,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$, n=15 von 3 Mäusen; $\text{Anx7}^{(-/-)}$: $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$, n=14 von 6 Mäusen).

Zur Untersuchung von Frequenz-induzierten Veränderungen in der Verkürzung-Frequenz-Beziehung wurde die Zellverkürzung an isolierten ventrikulären Myozyten aus Wildtyp- und $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Tieren nach der Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0,5 auf 5 Hz in fünf Frequenzintervallen gemessen (Abb. 3.18). Die Myozyten der Kontrolltiere zeigten die erwartete Zunahme der Zellverkürzung von $2,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ auf $7,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$ bei Steigerung der Stimulationsfrequenz. Im Gegensatz dazu stellte sich bei den Myozyten der $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Tiere eine Abnahme der Zellverkürzung von $2,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ auf $0,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ein. Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz hatte in beiden Versuchsgruppen keinen Einfluß auf die diastolische

Zelllänge (WT: $127 \pm 10 \mu\text{m}$; $Anx7^{(-/-)}$: $107 \pm 14 \mu\text{m}$). Während in den Wildtyp-Zellen eine positive Zellverkürzungs-Frequenz-Beziehung gezeigt werden konnte, weist die kontinuierliche Abnahme der Zellverkürzung in den $Anx7^{(-/-)}$ -Zellen auf eine Störung in der Kraft-Frequenz-Beziehung und somit auf eine mögliche Beeinträchtigung der Herzfunktion hin.

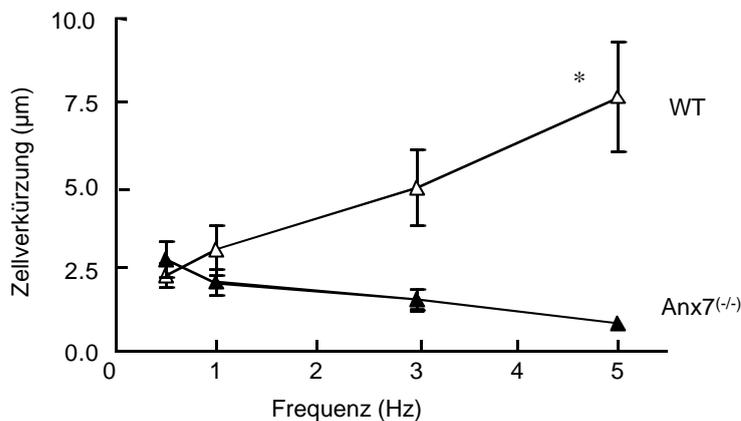


Abb. 3.18: Verkürzungs-Frequenz-Beziehung gemessen an isolierten ventrikulären Myozyten von Wildtyp (WT)- und $Anx7^{(-/-)}$ -Mäusen. Die Erhöhung der Stimulationsfrequenz führt zu einer Abnahme der Zellverkürzung bei den knock-out Tieren.

3.2.6.2 Isoprenalin-stimulierte Kraft

Die Schlagstärke oder Kontraktionskraft des Herzmuskels kann durch verschiedene Substanzen wie Hormone oder auch das Digitalisgift beeinflusst werden. Bei einem positiv inotropen Effekt wirkt die entsprechende Substanz steigernd auf die Kontraktionskraft des Herzens und das Schlagvolumen wird vergrößert. Isoprenalin ist ein Sympathikomimetikum, eine adrenalinverwandte Standardsubstanz. Im Gegensatz zu Adrenalin wirkt Isoprenalin nur auf β -adrenerge Rezeptoren und beeinflusst so die Kontraktion des Herzens. Eine chronische Beeinträchtigung der Herzfunktion führt jedoch zu einer Abnahme der β -Rezeptoren.

Um zu untersuchen, ob eine mögliche Herzinsuffizienz und daraus resultierend eine Abnahme der β -Rezeptoren bei den $Anx7^{(-/-)}$ -Tieren vorliegt, wurde die Zellverkürzung unter Steigerung der Isoprenalinkonzentration gemessen. Dazu wurden isolierte ventrikulierte Myozyten beider Mauslinien elektrisch stimuliert (0,5 Hz) und die Isoprenalin-Konzentration während dieser Messungen schrittweise von 0,1 auf 3 μM erhöht. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse zusammengefaßt und in Abb. 3.19 graphisch dargestellt.

	Maximale Isoprenalin-induzierte EC (μm)	EC ₅₀ Iso (μM)	Diastolische ZL (μm)	
			0	Iso (3 μM)
Wildtyp	+2.6±1.2	0.142±0.129	92±10	86±8
Anx7 ^(-/-)	+2.7±0.7*	0.031±0.004	74±10	73±10

Tab. 3.4: Einfluß von Isoprenalin auf die Zellverkürzung (EC) und die diastolische Zelllänge (ZL) an isolierten Kardiomyozyten von Wildtyp- und Anx7^(-/-)-Mäusen. EC₅₀ Iso: Isoprenalinkonzentration, bei der eine 50%ige Zellverkürzung erreicht wird.

Es zeigte sich kein Unterschied in der durch Isoprenalin induzierten maximalen Zellverkürzung zwischen Kontroll- und Anx7^(-/-)-Tieren. Die Isoprenalin-Sensitivität, ausgehend von der Konzentration, die benötigt wird, um eine 50%ige Verstärkung (EC₅₀ Iso) der Zellverkürzung zu erreichen, scheint nur sehr leicht, aber nicht signifikant bei den Anx7^(-/-)-Tieren verstärkt zu sein. Auch die diastolische Zelllänge war in beiden Tier-Gruppen stabil. Somit ist davon auszugehen, daß eine Annexin VII-Deletion keine Änderung des β -adrenergen Signaltransduktionsweges auszulösen scheint.

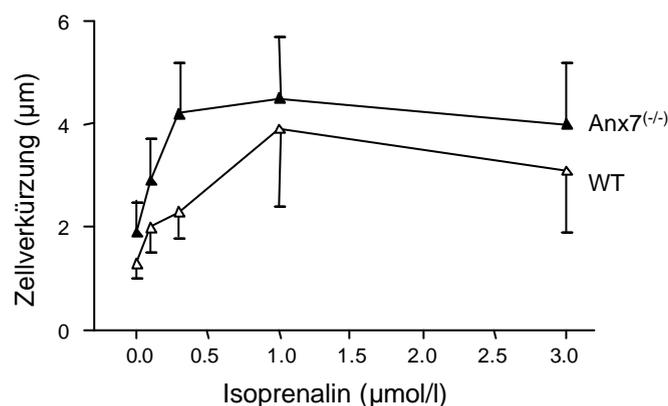


Abb. 3.19: Zellverkürzung gemessen in Abhängigkeit von der Isoprenalinkonzentration an isolierten ventrikulären Myozyten von Wildtyp (WT)- und Anx7^(-/-)-Mäusen. Eine signifikante Abnahme der Zellverkürzung bei den knock-out Tieren liegt nicht vor.

3.2.7 Untersuchungen zur Insulinsekretion

Die Insulinsekretion ist ein streng regulierter Prozeß zur Aufrechterhaltung einer konstanten Blutzucker-Konzentration und wird durch das Zusammenspiel von Nährstoffen, Hormonen und Neurotransmittern beeinflusst. Glukose ist der Hauptstimulus der Insulinsekretion. Der wichtigste Signalweg, den Glukose aktiviert, umfaßt die Öffnung von Spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen resultierend aus einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Hellman, 1986; Wolf et al., 1988). Diese Ca^{2+} -induzierte Insulin Sekretion wird durch eine Reihe von anderen Signalfaktoren moduliert. Verstärkend auf die Sekretion wirken die Freilassung von Ca^{2+} aus IP_3 -sensitiven, intrazellulären Speichern z.B. durch Acetylcholin, die Bereitstellung von cAMP durch Stimulation der Adenylatzyklase z.B. durch Glucagon und die Aktivierung der Protein Kinase C durch Diacylglycerin (DAG), die auf Ca^{2+} -unabhängige Weise die Insulinsekretion stimulieren kann.

Annexin VII soll eine entscheidende regulierende Rolle bei Sekretionsmechanismen, insbesondere bei der Exozytose spielen und dabei die Ca^{2+} und GTP-induzierte Sekretion vermitteln (Caohuy et al., 1996). Da es bekannt ist, daß Insulin über einen Ca^{2+} - und GTP-aktivierbaren Exozytosemechanismus ausgeschüttet wird, wurde mit den folgenden Experimenten untersucht, inwieweit die Funktionsfähigkeit der Langerhans'schen Inseln des Pankreas in den Anx7-defizienten Mäusen verändert ist. Die in dieser Arbeit zusammengefaßte Studie umfaßt einen Vergleich des Insulingehalts isolierter Inseln aus Wildtyp- und Anx^(-/-)-Mäusen, die Messung der Insulinsekretion nach Erhöhung der Glukosekonzentration, sowie nach Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration anhand direkter Stimulation der Adenylatzyklase durch Forskolin, als auch nach Gabe von Carbachol.

3.2.7.1. Insulingehalt

Für die Messung des Insulingehaltes der Langerhans'schen Inseln wurden die Inseln aus dem Pankreas von Wildtyp- und Anx^(-/-)-Mäusen isoliert. Der Gehalt wurde aus fünf bis zehn Inseln nach Extraktion in saurem Ethanol mittels eines Radioimmunassays (RIA) bestimmt. Der durchschnittliche Insulingehalt der Wildtyp-Inseln von $118,8 \pm 15,9$ ng/Insel im Vergleich mit dem der Anx^(-/-)-Inseln von $129,3 \pm 14,7$ ng/Insel ($n = 16$ unabhängige Bestimmungen) differierte nicht signifikant (Abb. 3.20 A). Der Insulingehalt verschiedener Inselpräparationen variierte jedoch beträchtlich (zwischen 40 und 200 ng/Insel). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Befunden von Srivastava et al. (1999), deren Anx^(+/-)-Tiere mit ca. 1600-2000 ng/Insel einen 810-fach höheren Insulingehalt als ihre Kontrolltiere aufwiesen. Mit jeweils 40 Inseln von beiden Mauslinien wurde zusätzlich eine Western Blot Analyse mit dem Antikörper 203-217 durchgeführt, um zu bestätigen, daß die Inseln der knock-out Tiere frei von Annexin VII sind (Abb. 3.20 B).

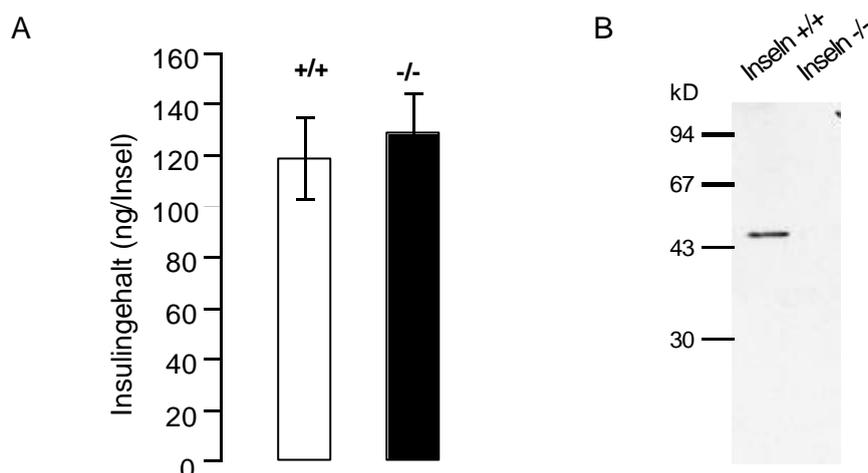


Abb.3.20: A) Insulingehalt der Langerhans'schen Inseln aus Wildtyp (+/+)- und $Anx7^{-/-}$ -Maus (-/-). **B)** Western Blot Analyse mit Inseln aus beiden Mauslinien.

3.2.7.2 Stimulation bzw. Hemmung der Insulinsekretion

Die Insulinsekretion kann durch verschiedene Stoffe stimuliert werden. Hier wurden Glukose, Forskolin und Tolbutamide in ihrer Wirkung auf die Stimulation der Insulinsekretion isolierter Langerhans-Inseln getestet. Glukose ist der typische metabolische Stimulator des Pankreas, Forskolin ist ein Aktivator der Adenylatzyklase. Tolbutamid, ein Sulfonylharnstoff, wirkt auf ATP-abhängige K^+ -Kanäle, die bei Verschluss zur Depolarisation der Zellmembran führen. Dadurch werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ geöffnet, wodurch es zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom kommt. Adrenalin kann die Glukose-induzierte Sekretion hemmen, in dem es an spezifische Membranrezeptoren bindet, die an G-Proteine ($G_{i/o}$) gekoppelt sind. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Hemmung der Adenylatzyklase und damit zur Erniedrigung der intrazellulären cAMP Konzentration (Katada und Ui, 1981). Der Einfluß von Glukose (16,7 mmol/l), Forskolin (5 μ mol/l) und Tolbutamid (100 μ mol/l) wurde an jeweils fünf Inseln in einer 30 minütigen statischen Inkubation untersucht (Abb. 3.21). Eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Medium von 2,8 mmol/l (Basalwert) auf 16,7 mmol/l führte zu einer 3-fachen Erhöhung der Sekretion in Wildtyp-Inseln und einer 8-fach erhöhten Sekretion in Inseln der $Anx7^{-/-}$ -Tiere. Der Einfluß von Forskolin wurde bei einem Glukosegehalt im Medium von 2,8 und 16,7 mmol/l Glukose getestet. Bei niedriger Glukosekonzentration hat Forskolin keinen Einfluß auf die Insulinsekretion, während bei bereits durch erhöhte Glukose stimulierte Inseln durch Forskolin die Glukose-induzierte Insulinsekretion in Wildtyp- bzw. $Anx7^{-/-}$ -Inseln um das 3- bzw. 2,5-fache potenziert werden konnte. Eine erhöhte Sekretion mit Tolbutamid bei 2,8 mmol/l Glukose konnte für keinen der Insel-Typen gezeigt werden. Somit zeigen die isolierten Inseln aus $Anx7$ -defizienten Tieren keine Veränderung in der durch Glukose induzierten Sekretion und der durch den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin oder Tolbutamid induzierten Sekretion. Letzteres beeinflusst hauptsächlich die Sekretion über die Aktivierung des direkten Ca^{2+} -Einstroms.

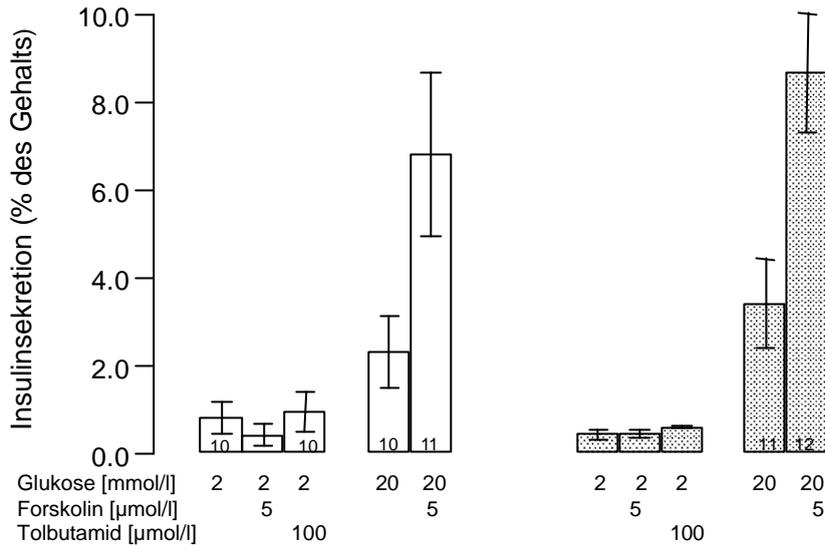


Abb. 3.21: Einfluß von Glukose, Forskolin und Tolbutamid auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhans'schen Inseln von Wildtyp- (weiße Säulen) und Anx7^(-/-)-Mäusen (graue Säulen). Die Substanzen wurden wie unter den Säulen angegeben dem Medium zugefügt. Für Glukose weichen die Angaben ab, es gilt 2,8 mmol/l und 16,7 mmol/l In den Säulen ist die Anzahl der Messungen angegeben. Bei fehlenden Angaben entspricht n=11.

Die Hemmung der Sekretionsantwort durch Adrenalin verhält sich bei den Anx7^(-/-)-Inseln ebenfalls normal. Hier wurde zunächst die Glukose-induzierte Sekretion durch Forskolin noch verstärkt. Nach Zugabe von Adrenalin fällt jedoch die Menge des sezernierten Insulins wieder auf den Basalwert der Sekretion ab (Abb. 3.22). Die Signalwirkung von Adrenalin bleibt somit durch den Verlust von Annexin VII unbeeinflusst.

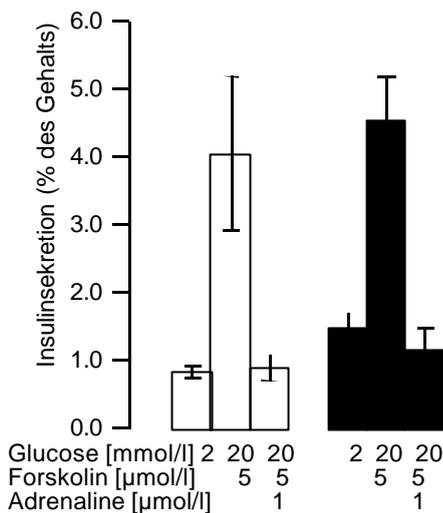


Abb. 3.22: Effekt von Adrenalin auf die durch Glukose und Forskolin stimulierte Sekretion. Weiße Säule: Wildtyp-Inseln, schwarze Säulen: Anx7^(-/-)-Inseln.

3.2.7.3 Insulinsekretion als Antwort auf Carbachol

Eine weitere Möglichkeit, die Insulinsekretion zu stimulieren, verläuft über die Aktivierung der Phospholipase C, die die Bildung von Inositol-3-Phosphat (IP₃) katalysiert. IP₃ mobilisiert über den IP₃-Rezeptor Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum, das dann zu einer Verstärkung der Insulinsekretion führt. Carbachol ist ein Agens, welches Phospholipase C stimuliert und so eine IP₃-Rezeptor vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aktiviert.

Der Effekt von Carbachol auf die Insulinsekretion wurde während einer Perifusion der Inseln gemessen, um evtl. dynamische Veränderungen der Sekretion zu analysieren. Bei Inseln aus Wildtyp-Mäusen verstärkt die Zugabe von Carbachol zu einer Glukosekonzentration von 16,7 mmol/l den Stimulationseffekt (Zawalich et al., 1997). Wildtyp- und Anx7^(-/-)-Inseln wurden zunächst mit einer Glukosekonzentration von 2,8 mmol/l 30 min umspült, beide Ansätze wurden parallel behandelt. Anschließend wurde die Konzentration auf 16,7 mmol/l erhöht. Nach wenigen Minuten stieg die Sekretion vom Basalwert 0,3 ng/min Insulin bei Wildtyp- und 0,5 ng/min Insulin bei Anx7^(-/-)-Inseln auf 2,7 bzw. 1,9 ng/min an. Kurz nach der Erhöhung der Glukosekonzentration sank jedoch die Menge des sezernierten Insulins der Anx7^(-/-)-Inseln wieder und näherte sich erneut dem Basalwert. Die Zugabe von Carbachol nach 20 min führte in den Wildtyp-Inseln sofort zu einer starken Erhöhung der Sekretion um das 18-fache, während die Verstärkung der Sekretion der Anx7^(-/-)-Inseln verzögert einsetzte und sich nur um das ca. 10-fache erhöhte. Bei den Wildtyp-Inseln war die erhöhte Sekretion zusätzlich auch andauernder als bei den Anx7^(-/-)-Inseln, bei denen sich schon nach kurzer Zeit die Sekretion um mehr als die Hälfte reduzierte. Die Carbachol-induzierte Sekretion ist bei Wildtyp-Inseln somit ausgeprägter als bei Inseln der Anx7^(-/-)-Tiere (Abb. 3.23).

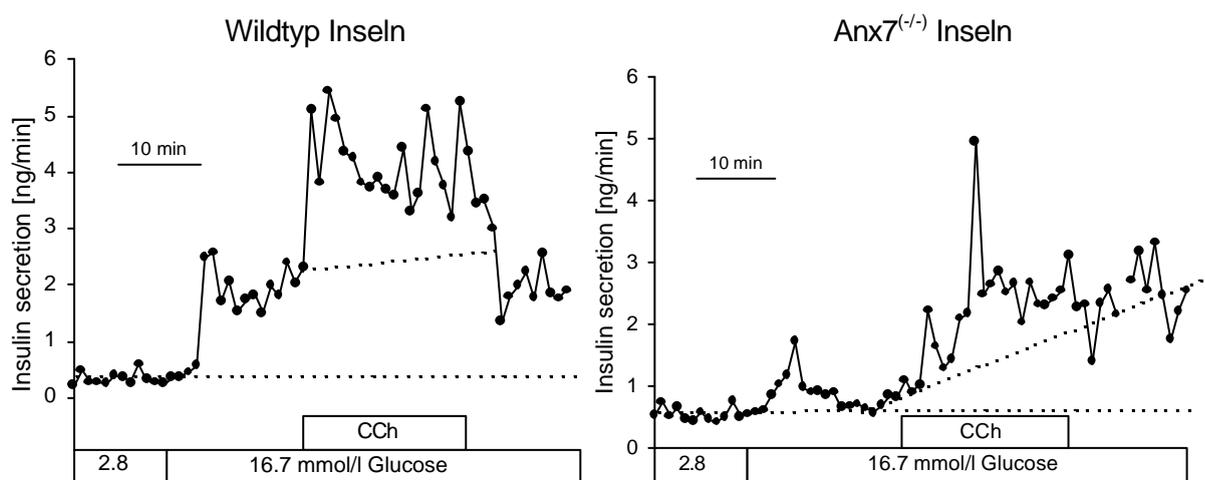


Abb. 3.23: Der Effekt von Carbachol auf die Glukose-induzierte Sekretion von Insulin in isolierten Wildtyp- und Anx7^(-/-)-Inseln. Der Zeitpunkt der Erhöhung der Glukose-Konzentration und der Zugabe von Carbachol ist angegeben.

3.3 Lokalisation von Annexin VII in humanem Gewebe

3.3.1 Humanes Muskelgewebe

Bisher ist über die Lokalisation von Annexin VII in anderen Organen als dem Skelettmuskel nichts bekannt. Hier bindet Annexin VII an die Plasmamembran und die Membranen des T-tubulären Systems (Selbert et al., 1995). In ultradünnen humanen Herzmuskelschnitten (freundlicherweise von Dr. A. Dräger, Universität Zürich, zur Verfügung gestellt) zeigte Annexin VII die bekannte subzelluläre Verteilung. Eine Lokalisation an der Plasmamembran, wie bei Caveolin 3, konnte nicht gezeigt werden (Abb. 3.24 A und B). Desweiteren bestand kein Unterschied zwischen kontrahierten und relaxierten Herzmuskelzellen. An ultradünnen humanen Skelettmuskelschnitten eines 5 Tage alten Säuglings konnte eine unterschiedliche Lokalisation von Annexin VII je nach Zustand des Muskels beobachtet werden. Im relaxierten Zustand zeigt sich nur eine subzelluläre Verteilung von Annexin VII in den einzelnen Fasern. Im kontrahierten Muskel bindet Annexin VII auch zusätzlich an die Plasmamembran (Abb. 3.24 D-F). Das weist darauf hin, daß die Lokalisation von Annexin VII an der Plasmamembran von der Ca^{2+} -Konzentration in der Muskelfaser abhängig ist. Im kontrahierten Zustand wird Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in die Faser entlassen, so daß die Konzentration sich erhöht und ausreichend scheint, damit sich Annexin VII an die Plasmamembran umlagert. Im relaxierten Zustand, wenn Ca^{2+} wieder zurück in das SR gepumpt wird, zeigt sich wieder die subzelluläre Verteilung von Annexin VII in der Faser. Die zytosolische Verteilung im kontrahierten Muskel eines Neugeborenen könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Entwicklung der Muskulatur noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Die Lokalisation von Caveolin 3 an der Plasmamembran zeigte sich unabhängig vom Zustand der Muskulatur.

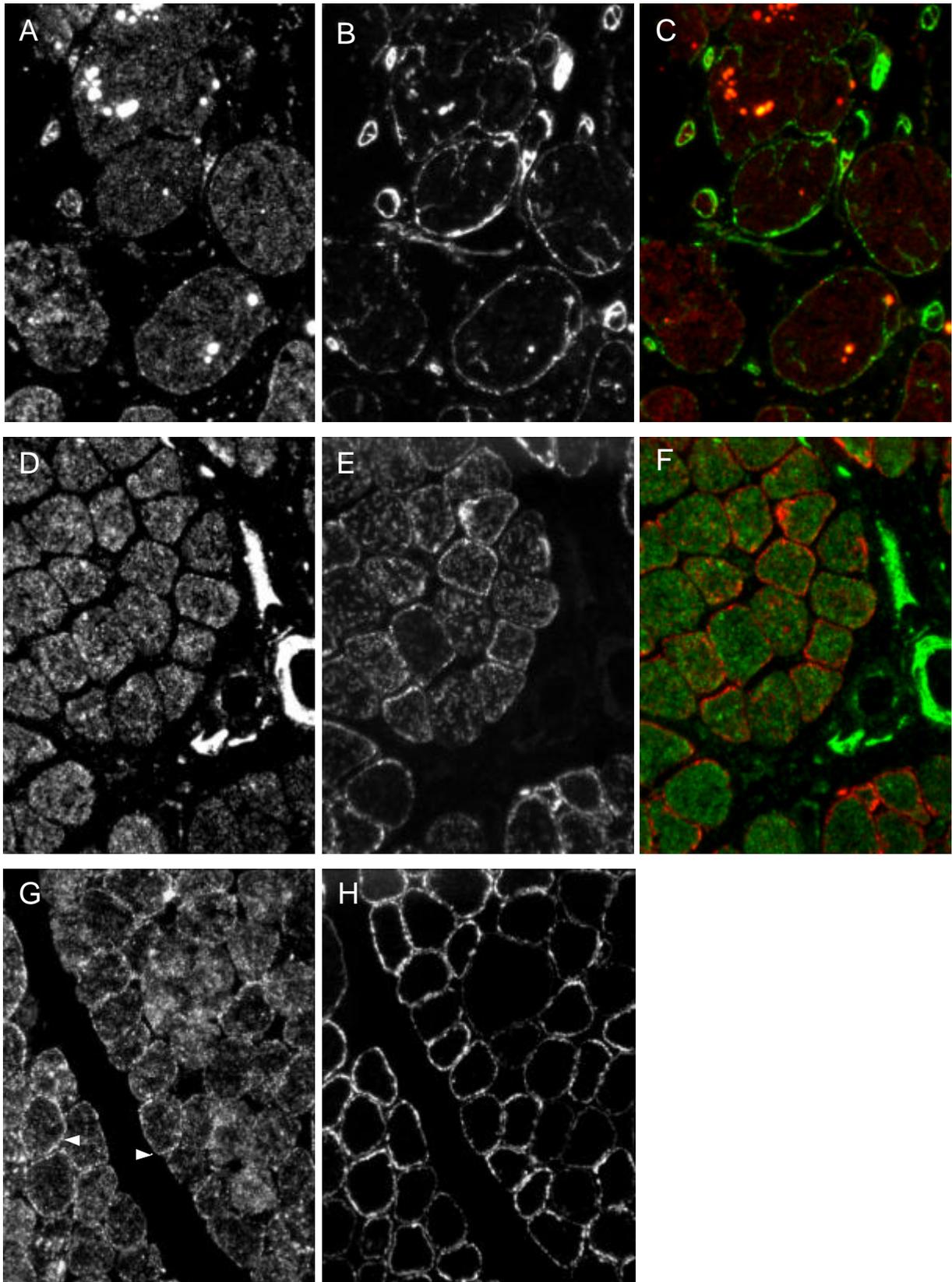


Abb. 3.24: Lokalisation von Annexin VII im humanen Herzen (A-C) und im relaxierten (D-F) und im kontrahierten Skelettmuskel (G,H) eines Neugeborenen. Gegenfärbungen mit Caveolin 3 sind in B, E und H dargestellt. C und F zeigen die entsprechenden Overlays. Die weißen Pfeile weisen auf die Membranlokalisation von Annexin VII hin. Vergrößerung: 160-fach.

3.3.2 Humanes Gehirn

Im Gehirn konnte schon eine Reihe von Annexinen nachgewiesen werden. Die Expression der Annexine I, II, IV, V und VI ist dort auf unterschiedliche Zelltypen beschränkt und unterliegt während der Gehirnentwicklung verschiedenen Regulationsmechanismen (Reeves et al., 1992; Giambanco et al., 1993; Eberhard et al., 1994). Für Annexin VI sind bereits einige Hirn-spezifische Bindungsproteine wie das F-Aktin-assoziierte Synapsin I und Calspectin bekannt. Es wird vermutet, daß Annexin VI deren Funktion in Ca^{2+} - und Phospholipid-abhängiger Weise moduliert. Die Interaktion mit Calspectin führt zu der Annahme, daß Annexin VI an der Regulation des Membranskeletts neuronaler Zellen beteiligt sein könnte (Inui et al., 1994; Watanabe et al., 1994). Annexin VII wird ebenfalls im Gehirn mit beiden Isoformen exprimiert. Über seine Lokalisation oder eine mögliche Funktion ist bisher jedoch nichts bekannt.

Immunfluoreszenzstudien an humanen Gehirnschnitten (hier ein Bereich aus dem Temporallappen) zeigten eine distinkte Lokalisation von Annexin VII (Abb. 3.25 A). Die angefärbten Zellen konnten durch ihre GFAP-Aktivität als astrogliale Zellen identifiziert werden (Abb. 3.25 B). GFAP (Glia fibrillary acidic protein) als Intermediärfilament ist ein wichtiges Zytoskelettprotein in Astrozyten und gilt als spezifischer Marker. GFAP wird im adulten Gehirn in protoplastischen Astrozyten der grauen Substanz, in fibrösen Astrozyten der weißen Substanz, in Bergmann Glia und in subependymalen Astrozyten am Rand der cerebralen Ventrikel exprimiert (McLendon und Bigner 1994). Die exakt gleiche Lokalisation von Annexin VII und GFAP weist auf eine direkte Interaktion beider Proteine hin.

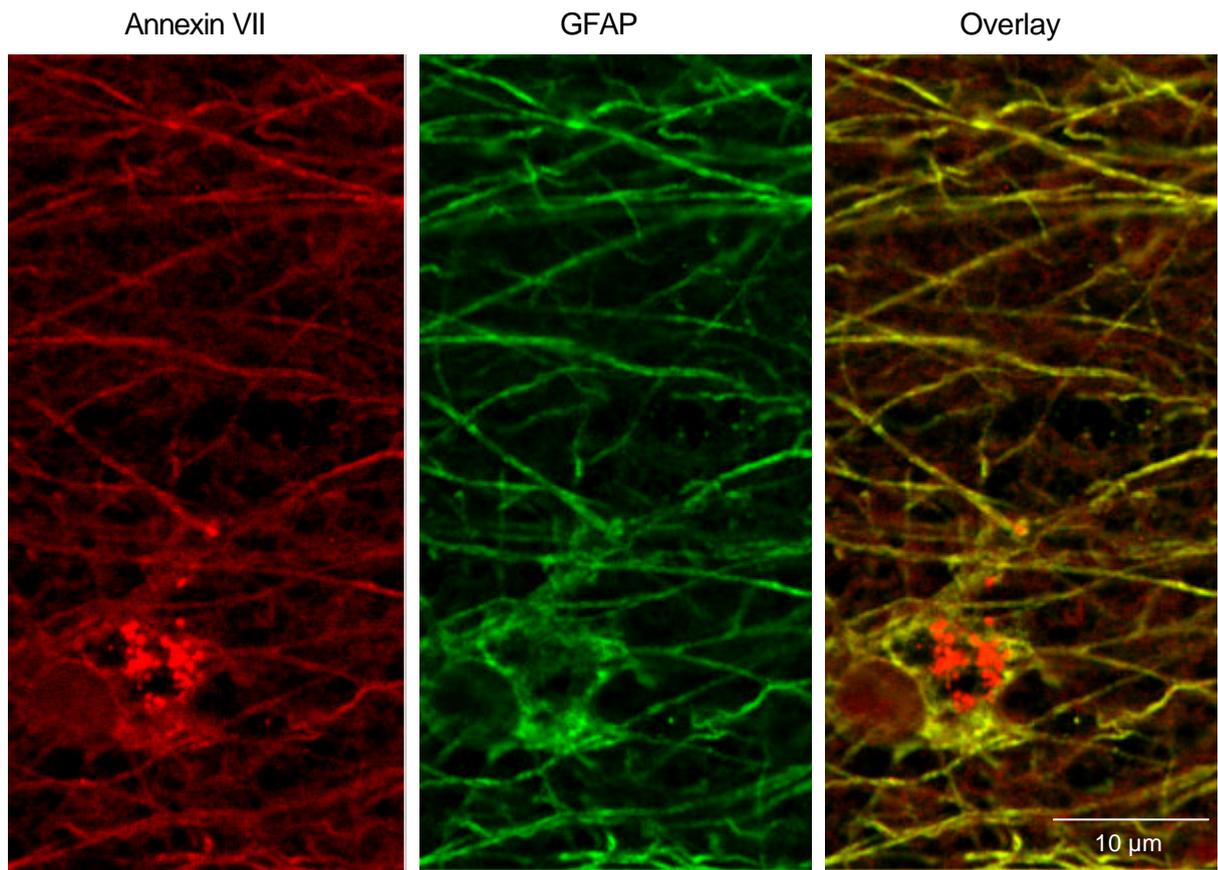


Abb. 3.25: Lokalisation von Annexin VII im humanen Gehirn. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Temporallappen. Annexin VII-Markierung, GFAP-Markierung; Overlay.

4 Diskussion

4.1 Generierung einer Annexin VII-defizienten Mauslinie

Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ist es gelungen, mittels eines Targeting-Vektors eine Nullmutation im Annexin VII-Gen der Maus zu erzeugen. Das mutierte Anx7-Gen mit dem entgegen der Leserichtung inserierten Neo-Gen in Exon 8 wurde durch Injektion homolog rekombinierter ES-Zellen in Blastozysten in die Keimbahn der Maus eingebracht. Aus der Injektion von 469 Blastozysten mit homologen Klonen der D3-Linie resultierten 24 männliche Chimäre, von denen zwei keimbahngängig waren. Die Rückkreuzung der keimbahnchimären Männchen mit C57BL/6- und 129Sv-Weibchen ermöglichte die Etablierung einer 129Sv/C57BL/6-Hybrid-Mauslinie, einer C57BL/6-Mauslinie und einer 129Sv-Mauslinie. Dies ermöglicht, den Verlust von Annexin VII in genetisch unterschiedlichen Mausstämmen zu untersuchen. So hat sich gezeigt, daß Verhaltensstudien bevorzugt mit genetisch reinen Tieren der C57BL/-Linie durchgeführt werden. Des weiteren können gene targeting Experimente in verschiedenen Mausstämmen zu unterschiedlichen Ergebnissen v.a. bei Verhaltensexperimenten führen (Gerlai et al., 1996).

Die Analyse der RNA aus verschiedenen Organen transgener Mäuse zeigte, daß die Insertion des Neo-Gens in Exon 8 nicht oder nur unvollständig zum beabsichtigten frühzeitigen Abbruch der Transkription des rekombinanten Allels führte. Die Sequenzierung von RT-PCR-Produkten ergab eine Hybrid-cDNA bestehend aus N-terminaler Anx7-Sequenz bis einschließlich Exon 7 und dem entgegen der Leserichtung orientierten Neo-Gen. Die ersten 18 bp von Exon 8 zusammen mit dem Polyadenylierungssignal des Neo-Gens waren nicht mehr vorhanden. Weitere RT-PCRs mit im Neo-Gen oder in der Core-Region gelegenen Primern gaben keinen weiteren Aufschluß über die Größe und die Zusammensetzung der Hybrid-mRNA. Die Hybridisierung mit einer Sonde aus der Core-Region von Annexin VII weist darauf hin, daß die Transkription über das Neo-Gen hinaus gehen muß, da in diesem Fall durch die unterschiedlich langen untranslatierten 3'-Bereiche von Annexin VII zwei Transkripte entstanden sind. Diese Transkripte könnten aber auch dadurch entstanden sein, daß interne Sequenzelemente aus dem Neo-Gen als Promotorelemente dienen. So ließe sich erklären, warum diese Transkripte nur mit der 3'-Sonde, nicht aber mit der 5'- oder der Neo-Gen-Sonde nachweisbar waren. Mit der Sonde aus dem N-terminalen Bereich wurde nur ein Transkript mit einer Länge von ca. 1,2 kb detektiert, das auch mit der Neo-Gen-Sonde detektierbar war. Hierbei sollte es sich um das in der RT-PCR gefundene Hybridtranskript handeln. Das sequenzierte Fragment mit einer Länge von 1055 bp könnte um den Rest des Neo-Gen-Leserahmens verlängert sein. Danach könnte es zu einem Trankriptionsabbruch kommen. Die Aminosäuresequenz des Hybrid-Proteins weist in allen

drei Leserahmen ein Stopcodon auf, so daß ein translatiertes Protein maximal ein Molekulargewicht von 32 kDa erreichen würde. Auch die mit der 3'-Sonde detektierte, verkürzte mRNA sollte nach der Translation kein Protein mit einer Größe von 47 kDa ergeben.

Auf Proteinebene wurde in den untersuchten Organen Gehirn, Herz, Milz, Lunge, Niere, Pankreas und Skelettmuskulatur mit einer Reihe von monoklonalen und einem polyklonalen Antikörper kein Protein nachgewiesen. Die in das Anx7-Gen eingeführte Mutation bewirkt also die vollständige Anx7-Defizienz auf Proteinebene, obwohl verschiedene mRNAs nachweisbar sind. Das Fehlen von Translationsprodukten könnte dadurch erklärt werden, daß die modifizierten Anx7-Transkripte nicht translatierbar sind oder daß eventuelle Translationsprodukte sehr schnell degradiert werden (Stracke, 2000).

In der Leber wurde dagegen mit sieben von zehn monoklonalen Antikörpern und dem polyklonalen Antikörper ein Protein detektiert, das das gleiche Molekulargewicht aufwies wie Annexin VII. Die Versuche, dieses Protein zu charakterisieren weisen darauf hin, daß es sich möglicherweise um ein leberspezifisches Protein handelt, das mit den Antikörpern kreuzreagiert. Seine Identifizierung ist noch nicht gelungen. Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese könnte es ermöglichen, mit neu entwickelten pH-Gradienten von 611 (Pharmacia), dieses Protein zu detektieren und direkt aus dem Gel oder von einer Membran zu sequenzieren.

4.2 Charakterisierung der Anx7^(-/-)-Maus

Vitalität kontra Letalität

Der Anteil homozygoter Nachkommen aus den Kreuzungen heterozygoter Mäuse entsprach mit ca. 25 % den Mendelschen Regeln. Dies zeigt, daß Annexin VII für die Embryonalentwicklung nicht essentiell ist. Die hier beschriebenen Anx7-defizienten Mäuse sind lebensfähig, fertil und erscheinen gesund. Die in der Zwischenzeit veröffentlichten Daten zu einer Annexin VII-knock-out Maus der Gruppe um Pollard (Srivastava et al., 1999) weichen von unseren Ergebnissen ab. Im Gegensatz zu dem hier gewählten Insertions-Vektor wurde von dieser Gruppe ein Replacement-Vektor konstruiert und in entsprechende ES-Zellen transfiziert. In diesem Vektor wurden die Sequenz von Intron 5 bis zum 3'-Bereich von Intron 6 einschließlich Exon 6 deletiert und durch die Neo-Gen-Kassette mit PGK-Promotor und polyA-Signal in Leserichtung ersetzt. Ein so mutiertes Annexin VII-Gen erwies sich als letal. Kreuzungen von für Annexin VII heterozygoten Mäusen führten nicht zu homozygoten Annexin VII-defizienten Nachkommen. Diese starben als Embryonen am Tag 10 ihrer Entwicklung vermutlich durch den Verlust von kardiovaskulärer Integrität. Dagegen führte die Generierung von Annexin VI-defizienten Mäusen mit einem Insertions-Vektor, in dem

ebenfalls die Neo-Kassette in einer zum Annexin entgegengesetzten Leserichtung eingebaut war, zu vitalen und fertilen homozygoten Tieren (Hawkins et al., 1999). Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, daß weitere Rekombinationsereignisse dazu führen, daß sich in gegebenem Fall keine homozygoten Tiere entwickeln können. Bei der Generierung einer MRF4-defizienten Maus haben drei Gruppen unabhängig voneinander verschiedene Phänotypen beschrieben. MRF4 gehört wie *myf5*, Myogenin und MyoD zu der Familie der "myogenic regulatory factor genes". Diese Gene sind myogene Transkriptionsfaktoren, die in nicht-Muskelzellen die Myogenese anschalten können (Buckingham, 1992). In einem Fall waren die MRF4-defizienten Tiere überlebensfähig (Hasty et al., 1993). Bei den anderen generierten Mauslinien starben die homozygoten Nachkommen bei der Geburt mit starken Veränderungen an Skelett und Muskulatur (Braun and Arnold, 1995; Patapoutian et al., 1995). Die von der Gruppe um Arnold generierte Maus zeigte den gleichen Phänotyp wie die *myf5*-defiziente Maus (Braun et al., 1992; 1994). Dieses Phänomen konnte nach genauerer Untersuchung auf ein Rekombinationsereignis zurückgeführt werden, wo neben MRF4 der direkt benachbarte Transkriptionsfaktor *myf5* verloren ging. Die anderen Mauslinien wiesen ebenfalls unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen auf, die sich jedoch nicht genau erklären ließen (Olson et al., 1996). Des weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, daß die embryonale Letalität durch die veränderte Expression eines völlig anderen Gens verursacht wird. Diese könnte durch den PGK-Promotor der Neo-Box hervorgerufen werden. Untersuchungen haben gezeigt, daß durch den Einbau der PGK-Neo-Kassette die Expression mehrerer benachbarter Gene beeinflußt werden kann und so unerwartet phänotypische Effekte auftreten (Pham et al., 1996). Diese Gene können bis zu 100 kb von der Mutation entfernt liegen. Ähnliches zeigte sich auch bei der 5'HS2-knock-out Maus (5' DNase hypersensitive site 2 der locus control region des β -Globin Lokus), die nach der konventionellen Methode veränderte Effekte in der Globinexpression aufwies. Nach der Entfernung der PGK-Neo-Kassette, blieb zwar ein mutiertes Allel zurück, aber der Phänotyp verhielt sich normal. Auch hier wurden die transkriptionalen Effekte durch den PGK-Promotor ausgelöst und nicht durch die Deletion des Allels selbst (Fiering et al., 1995).

Untersuchungen zur *in vivo*-Funktion

Annexin VII wurde ursprünglich als ein Protein identifiziert, welches Ca^{2+} -abhängig die Aggregation und Fusion chromaffiner Granula unterstützt (Creutz et al., 1978). Später wurde die Fähigkeit beschrieben, daß es sowohl in artifiziellen als auch in natürlichen Membranen spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle ausbilden kann (Pollard und Rojas, 1988). Eine Beteiligung an der Sekretion/Exozytose von chromaffiner Granula wird schon lange

propagiert und neuere Studien deuten auf eine Ca^{2+} /GTP-regulierte Exozytose hin (Kuijpers et al., 1992; Caohuy et al., 1996; Pollard et al., 1998).

In *Dictyostelium discoideum* führte das Ausschalten des Annexin VII Gens unter normalen Laborbedingungen nicht zu Veränderungen in Wachstum, Pino- Phago- und Exozytose, Chemotaxis und Motilität (Döring et al., 1995). Veränderte Eigenschaften der Annexin VII Minusmutante (SYN⁻) wurden erst bei Wachstum unter verminderten extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen offensichtlich, bei dem Abnormitäten in allen oben genannten Ca^{2+} -regulierten Prozessen auftraten. Dies läßt vermuten, daß Annexin VII neben Membranfusions-Vorgängen auch an der Regulation der zellulären Ca^{2+} -Homöostase beteiligt ist. Die Studien von Selbert et al. (1995) legen ebenfalls eine Beteiligung von Annexin VII an der Ca^{2+} -Homöostase in Muskelzellen nahe. Um Hinweise auf eine dieser Funktionen *in vivo* zu bekommen, wurde die Skelettmuskulatur zunächst auf morphologische Veränderungen, Kardiozyten auf physiologische Änderungen und die Sekretion im Pankreas genauer untersucht.

Morphologie der Skelettmuskulatur

Die histologische Analyse der Skelettmuskulatur von $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Mäusen hat jedoch keinen Hinweis auf eine pathologische Auswirkung durch den Verlust von Annexin VII ergeben. Die Morphologie der Skelettmuskulatur ist vollkommen normal, und mit differenzierten histologischen Färbemethoden konnten Glykogen- oder Fettspeicherkrankheiten ebenso ausgeschlossen werden wie mitochondriale Dysfunktionen oder neurodegenerative Defekte. Der Verlust von Annexin VII wirkt sich auch nicht auf die Expression und Lokalisation von Caveolin 3, wichtigen Mikrofilamentproteinen wie Myosin oder Intermediärfilamenten wie Desmin aus. Ein direkter Einfluß auf das Zytoskelett und die Vermutung, der Verlust von Annexin VII könnte zu einem dystrophen Phänotyp führen, können so ausgeschlossen werden. Anders verhält es sich bei dem Verlust der Zytoskelettproteine Dystrophin und Utrophin. Hier zeigen Doppel-knock-out Tiere Myopathien in Skelett- und Herzmuskel und eine Veränderung in der Expression von Proteinen aus dem Dystrophin-assoziierten Komplex wie z.B. β -Dystroglykan (Deconinck et al., 1997; Grady et al., 1997). Das Fehlen von Desmin hat wiederum keinen Einfluß auf die Expression und Lokalisation von Proteinen des kontraktiven Apparates, obwohl die Maus in allen Formen der Muskulatur Defekte aufweist (Li et al., 1996; Milner et al., 1996; Thornell et al., 1997).

Physiologie früher embryonaler Kardiozyten

Detailliertes Wissen über frühe embryonale Kardiozyten (EK) ist von großer Bedeutung, seit in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, daß Kardiomyozyten aus erkrankten

Herzen die Tendenz aufweisen, sich in Richtung des embryonalen Phänotyps zurück zu differenzieren (Townsend et al., 1995). Die Untersuchungen auf Auswirkungen durch den Verlust von Annexin VII an embryonalen Kardiozyten ergaben keine weiteren Hinweise auf mögliche *in vivo*-Funktionen im frühen embryonalen Herzen. Die Experimente wurden an frühen EK durchgeführt, um mögliche Kompensationsmechanismen zu umgehen. Morphologisch war kein Unterschied festzustellen. Ca^{2+} -Imaging-Experimente und anschließende elektrophysiologische Messungen haben gezeigt, daß die zellulären Mechanismen der Erregungs-Kontraktionskopplung (EC) intakt sind. Das normale Aktionspotential an der einzelnen Zelle weist darauf hin, daß alle beteiligten Ionen-Kanäle exprimiert werden und aktiv sind. Sollte Annexin VII eine Funktion als Ca^{2+} -Kanal übernehmen, dann scheint sie jedoch eher eine untergeordnete bzw. unbedeutende Rolle zu spielen. Ebenso wird der Ryanodinrezeptor (RyR), ein wichtiger Ca^{2+} -Kanal für den " Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release"-Mechanismus und Analogon zum IP_3 -Rezeptor voll funktionsfähig exprimiert. So ist auch eine Reduktion des RyR durch den Verlust von Annexin VII auszuschließen, wie sie entsprechend für den IP_3 -Rezeptor bei Srivastava et al. beschrieben wurde.

Für alle drei Typen des RyR existiert eine knockout-Mauslinie. RyR Typ 1 wird stark im Skelettmuskel exprimiert. Der Verlust führt zum perinatalen Tod, und die Muskelzellen geben auf elektrische Stimulation keine Kontraktionsantwort. Das bedeutet, daß der Typ1-Rezeptor den Ca^{2+} -Einstrom während der EC-Kopplung vermittelt (Takeshima et al., 1994). RyR Typ 2-defiziente Embryonen sterben pränatal am Tag 10. Der Herzbeutel ist morphologisch stark verändert, das sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist mit großen Vakuolen durchzogen und die mitochondriale Struktur ist verändert. Am Tag 9,5 zeigen die Herzen jedoch noch spontane Kontraktionen. Es wird angenommen, daß hier der RyR Typ 2 nicht an der EC-Kopplung beteiligt ist, sondern vielmehr als Ca^{2+} -leak-Kanal für die Ca^{2+} -Homöostase während der Entwicklung des SR essentiell ist (Takeshima et al., 1998). RyR Typ 3 defiziente Mäuse entwickeln sich fast normal. Neugeborene Tiere zeigen zwar eine normale EC-Kopplung, sie haben jedoch eine verminderte Kontraktionsantwort (Takeshima et al., 1996; Bertocchini et al., 1997). Allerdings scheint der Typ 3-Rezeptor auch eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase von neuronalen Zellen des ZNS zu spielen, da die Tiere stark in ihrer Bewegungsaktivität eingeschränkt sind. Hätte der Verlust einen Einfluß auf die Expression des RyR, dann hätte man eine eventuell mildere Form eines der beschriebenen Phänotypen erwarten können.

Während die genaue Lokalisation von Annexin VII im Herzen noch nicht determiniert ist, ist für Annexin VI eine sarkoplasmatische Verteilung beschrieben (Hazarika et al., 1991). Die beschriebene regulatorische Wirkung auf den RyR ist jedoch umstritten, da ein solcher Einfluß auch auf die Ca^{2+} -Kanalaktivität von Annexin VI zurückzuführen sein könnte (Diaz-Munoz, et al., 1990; Hazarika et al., 1991; Benz et al., 1996). Weitere *in vitro*-Studien weisen

auf Annexin VI als Regulator des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers hin und haben gezeigt, daß Annexin V und VI mit atrialen sekretorischen Granula assoziiert sind (Sobota et al., 1990; Doubel et al., 1991). In einer transgenen Annexin VI-Mauslinie führt dessen Überexpression unter anderem zu einem um 40 % erniedrigten Ruhe- Ca^{2+} und nach der Stimulation ist die maximale Amplitude des Ca^{2+} -Signals signifikant niedriger im Vergleich zu Kontrolltieren. Ursache dafür könnte der positiv aktivierende Effekt von Annexin VI auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder eine Ca^{2+} -Pumpe sein. Bei Annexin V wird eine enge Assoziation mit SERCA II (Sarkoendoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase) im Herzen vermutet, da die Zugabe von Annexin V-Antikörper zu SR-Vesikeln die Ca^{2+} -abhängige ATPase Aktivität des SR hemmt (Moraru et al., 1998). In den $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -EK kann aufgrund des normalen Ruhe- Ca^{2+} eine Veränderung in der Expression und/oder der Aktivität von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und Pumpensystemen wie z.B. der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die Ca^{2+} -ATPase oder SERCA II, die eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase spielen, ausgeschlossen werden. Somit scheint Annexin VII nicht in deren Regulation involviert zu sein und keine entscheidende Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase von frühen embryonalen Kardiozyten zu spielen.

Physiologie adulter Kardiozyten

Nach den Untersuchungen an embryonalen Kardiozyten, die unter basalen Bedingungen keine Veränderung durch den Verlust von Annexin VII zeigten, war es überraschend, daß adulte Kardiozyten eine Beeinträchtigung der frequenz-induzierten Zunahme der Zellverkürzung aufwiesen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß es in Situationen mit hohen systolischen Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer Beeinträchtigung der Regulation der elektromechanischen Kopplung bei Anx7 -defizienten Kardiomyozyten kommt. Dies könnte sowohl auf Veränderungen in der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase beruhen, als auch auf funktionellen Veränderungen des kontraktiven Apparates. Eine Verbindung zu Myofilamenten wurde bisher jedoch noch für kein Annexin gezeigt. Da Annexin VII an Sorcin bindet kann dies als Hinweis gewertet werden, daß Annexin an der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase beteiligt ist (Brownawell und Creutz, 1997). Sorcin ist ein "EF-Hand"-Protein, das in Kardiozyten an den T-Tubuli und am sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und Ca^{2+} -abhängig eine inhibitorische Wirkung auf den Ryanodinrezeptor ausübt (Lokuta et al., 1997; Meyers et al., 1995). Da der Effekt der Zunahme der Zellverkürzung jedoch nur im hohen Frequenzbereich (5 Hz) auftrat, erweist er sich nicht als letal und hat auch anderweitig keine offensichtliche Auswirkung auf die Lebensqualität der Tiere. Am nicht insuffizienten Herzen ist die Erhöhung der Herzfrequenz ein wichtiger kontraktionskraftsteigernder Mechanismus (Buckley et al., 1972). Dieser Zusammenhang wurde erstmalig durch Bowditch (1871) als "positive Treppe" beschrieben,

und gewinnt physiologisch besonders unter körperlicher Belastung an Bedeutung. Am wahrscheinlichsten liegt diesem Phänomen ein erhöhter transsarkolemmaler Ca^{2+} -Einstrom bei höheren Stimulationsfrequenzen zugrunde. Bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz verlängert sich der Zustand der systolischen Depolarisation der Zellmembran pro Zeiteinheit, ein Erregungszustand, der den Einstrom extrazellulären Ca^{2+} über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal des Sarkolemm ermöglicht. Die L-Typ- Ca^{2+} -Ströme nehmen durch eine Erhöhung der Frequenz zu (Piot et al., 1996). Das führt über eine Anreicherung in intrazellulären Ca^{2+} -Speichern bei erneuter Depolarisation zu einer Erhöhung des systolischen Ca^{2+} -Spiegels im Cytosol und folglich zu einer Steigerung der Kontraktionskraft (Wier und Yue, 1986). Auch die intrazelluläre Na^+ -Konzentration steigt nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz an. Dadurch wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher gehemmt und Ca^{2+} nicht mehr aus der Zelle gepumpt. Dem daraus resultierenden Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration folgt wiederum ein Anstieg der Kontraktionskraft nach Erhöhung der Schlagfrequenz (Cohen et al., 1982; Frampton et al., 1991). Im Gegensatz dazu ist z.B. bei Herzinsuffizienz die Kontraktionskraft bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz vermindert. Hier zeigte sich unter anderem eine reduzierte SERCA II-Aktivität bei unveränderter Proteinexpression und eine damit verbundene Ca^{2+} -Sequestrierung (Limas et al., 1987; Schwinger et al., 1995). Neben dem Einfluß des SR auf die Kraft-Frequenz-Beziehung und ihre Veränderung am insuffizienten Myokard kommt auch dem transsarkolemmalen Ca^{2+} -Einstrom über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal große Bedeutung zu. Der frequenzabhängige Kontraktionskraftanstieg am nicht insuffizienten Myokard steht im direkten Zusammenhang mit einer Erhöhung der maximalen Amplitude, gefolgt von einem verlangsamten Abfall des Ca^{2+} -Einstroms über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (Lee et al., 1985; Schouten und Morat, 1989).

Eine Störung in der Ca^{2+} -Homöostase wurde im embryonalen Herzen der $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Maus bereits nahezu ausgeschlossen. Allerdings sind die Mechanismen der Signaltransduktion in embryonalem und adultem Gewebe von unterschiedlichen Faktoren abhängig und machen auch eine regulative Entwicklung durch (Viragh und Challice, 1973). Somit könnte eine Veränderung in der Ca^{2+} -Homöostase in adulten Kardiomyozyten trotzdem in Betracht kommen. Allerdings ist zu beachten, daß die β -adrenozeptor-vermittelte Zellverkürzung $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Tieren nicht verändert ist. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Zunahme der myokardialen Kontraktionskraft durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems über eine Stimulation kardialer β_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren (Bristow et al., 1986; Packer, 1988), die über eine heterotrimeres G-Protein an die Adenylatcyclase koppeln und so die Bildung von cAMP bewirken. Im Vergleich dazu zeigt sich, daß bei einer terminalen Herzinsuffizienz die Effektivität der cAMP-abhängigen inotropen Stimulation über β -Adrenorezeptoren vermindert ist. Durch die permanente Stimulation zur Aufrechterhaltung der Herzfunktion kann es über Sequestrierung und Abbau von Rezeptoren zu einer

quantitativen Abnahme der β -Adrenorezeptoren und anderer Proteine kommen (Bristow et al., 1982; Brodde et al., 1991). Ein Sympathikomimetikum wie Isoprenalin hätte dann keine Auswirkung mehr auf die Kontraktionskraft der Zellen. In den $Anx7^{(-/-)}$ -Tieren scheinen die β -Adrenorezeptoren funktionsfähig exprimiert zu werden. Weitere Experimente sollten folgen, bei denen simultane Messungen des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten und der Zellverkürzung nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz vorgenommen werden. Wir werden auch testen, ob die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente im Herzen der Annexin VII Knockout Tiere verändert ist. Diese Experimente können weiteren Aufschluß darauf geben, welche Aufgabe Annexin VII für die kardiale Kontraktionskopplung hat.

Insulinsekretion

Um die Rolle von Annexin VII bei der Exozytose zu untersuchen, wurde die Sekretion von Insulin getestet. Diese Analysen haben gezeigt, daß der Insulingehalt von isolierten Inseln der $Anx7^{(-/-)}$ -Maus nicht signifikant von dem der Wildtyp-Inseln abweicht. Die Größe der Langerhans'schen Inseln war im Wildtyp und im $Anx7^{(-/-)}$ -Tier sehr variabel. In der Arbeit von Srivastava et al. (1999) wurde eine Insel-Hyperplasie in den $Anx7^{(+/-)}$ -Tieren gezeigt. Diese Hyperplasie bildete sich aber erst ab einem Alter von 6 Wochen aus. Bei den hier durchgeführten Sekretions-Untersuchungen wirkte Glukose als natürlicher Hauptstimulator auf die Insulinsekretion von $Anx7^{(-/-)}$ -Inseln genauso wie bei Wildtyp-Inseln (Wollheim und Sharp, 1981; Hellman, 1986). Forskolin, ein direkter Aktivator der Adenylatzyklase (Ullrich et al., 1984; Zawalich et al., 1984), potenzierte die Glukose-induzierte Insulinsekretion, hatte aber keinen Effekt auf die Sekretion bei basaler Glukose-Konzentration. Da diese Stimuli normal auf die Sekretion von $Anx7^{(-/-)}$ -Inseln wirken, scheint es unwahrscheinlich, daß Annexin VII eine essentielle Rolle in der Exozytose selber spielt. Durch einen verstärkten Glukose-Matabolismus in den Zellen erhöht sich die Konzentration von ATP, was zu einer Schließung ATP-abhängige K^+ -Kanäle und der Zelldepolarisation führt. Dadurch werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und K^+ -Kanäle aktiviert, die Aktionspotentiale produzieren und einen Ca^{2+} -Einstrom ermöglichen (Ashcroft und Rorsman, 1990). Die intakte Glukose-induzierte Insulinsekretion läßt somit den Schluß zu, daß diese Ionenkanäle funktionell exprimiert werden. Des weiteren wurde untersucht, ob der Effekt von Rezeptoragonisten durch den Verlust von Annexin VII beeinflusst wird. Getestet wurde Carbachol als Stimulator der Sekretion und Adrenalin als typischer Inhibitor. Adrenalin hatte den gleichen hemmenden Effekt auf die stimulierte Sekretion wie in Kontroll-Präparationen. Adrenalin bindet an α_2 -Adrenorezeptoren und hemmt darüber die Adenylatzyklase, sowie Ca^{2+} -Kanäle, aktiviert K^+ -Kanäle und hemmt so die Insulinsekretion (Katada und Ui, 1981; Aminranoff et al., 1988; Lehr et al., 1997).

Der Effekt von Carbachol wurde in einer Perifusion an isolierten Inseln getestet, so daß dynamische Veränderungen in der Sekretion erkennbar werden. Hier zeigte sich eine stärkere Carbachol-induzierte Sekretion in den Wildtyp- im Vergleich zu den $Anx7^{(-/-)}$ -Inseln. Carbachol aktiviert die Phospholipase C, welche wiederum zur Generierung von IP_3 und Diacylglycerol (DAG) führt. In der heterozygoten Annexin VII^(+/-)-Maus (Srivastava et al., 1999) wurde ein Defekt in insulinsezernierenden β -Zellen beschrieben. Isolierte Langerhans'schen Inseln der $Anx7^{(+/-)}$ -Maus enthalten zehnmal mehr Insulin, exprimieren um ein zehnfaches weniger den IP_3R und antworten auf Carbachol-Stimulation mit einer niedrigeren und langsameren Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als isolierte Inseln von Wildtypmäusen. Die Glukose-induzierte Sekretion und die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle verhielten sich jedoch normal. Eine durch Agonisten vermittelte Sekretion wurde nicht untersucht. Die verzögerte und verminderte Antwort auf die Carbachol-Stimulation der $Anx7^{(-/-)}$ -Inseln könnte die Folge einer verminderten Expression von IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) sein wie von Srivastava et al. vorgeschlagen.

IP_3 -Rezeptoren wurden nicht nur auf dem Endoplasmatischen Retikulum, sondern auch auf sekretorischen Vesikeln gefunden (Yoo und Lewis, 1994). Es gibt drei Typen von IP_3R , die gewebespezifisch exprimiert werden. Typ 3 ist der am häufigsten exprimierte und kommt vor allem im Pankreas vor (Blondel et al., 1993). Eine Aktivierung von IP_3R führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern der β -Zellen des Pankreas (Wolf et al., 1985; Wollheim et al., 1986). Ein knock-out Mausmodell ist für diesen Rezeptor-Typ bisher nicht etabliert worden. IP_3R -Typ 1 wird sehr stark im Cerebellum exprimiert (Matsumoto et al., 1996) und eine IP_3R -Typ 1 defiziente Mauslinie weist erhebliche neuronale Symptome auf. In Glomeruli der Niere führt der Verlust von IP_3R -Typ 1 dazu, daß eine hormonelle Stimulation durch Phospholipase C Aktivatoren nur ungenügend beantwortet wird. Eine leichte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts wird durch den IP_3R Typ 3 aufrecht erhalten, der jedoch nicht hochreguliert wird (Hayashi et al., 1999). Somit sollte ein Einfluß von Annexin VII auf den IP_3 -Rezeptor oder eine Interaktion auf sekretorischen Vesikeln nicht ausgeschlossen werden, denn ein IP_3 -induzierter Ca^{2+} -Einstrom könnte die Ca^{2+} -induzierte und durch Annexin VII vermittelte Membranaggregation und -fusion der Vesikel fördern. Unklar ist jedoch, über welchen Mechanismus eine verminderte oder fehlende Expression von Annexin VII zu einer reduzierten Bildung von IP_3R im Pankreas führt, da IP_3R bisher weder als direkter Bindungspartner bekannt noch über andere Proteine mit Annexin VII assoziiert ist.

In β -Zellen von Ratten konnten auch Annexin I und II nachgewiesen werden (Ohnishi et al., 1994), und Annexin XI wurde eine mögliche Funktion in der Ca^{2+} - oder $GTP\gamma S$ -induzierten Insulinsekretion zugeschrieben (Iino et al., 2000). Annexin I ist auf den Membranen der

Insulin-Granula lokalisiert und es konnte gezeigt werden, daß seine Phosphorylierung durch Glukose induziert wird. Für Annexin I wird angenommen, daß es nach der Phosphorylierung an der Regulation der Glukose-induzierten Insulinsekretion beteiligt ist (Ohnishi et al., 1995). Dieser Sekretionsweg scheint allerdings von Annexin VII unbeeinflusst. Annexin XI wurde im Zytoplasma von endokrinen Zellen und in den β -Zellen des Pankreas nachgewiesen. Hier findet es sich vor allem in den Insulin-Granula. Experimente mit permeabilisierte Zellen, die mit Anti-Annexin XI-Antikörpern inkubiert wurden, lassen vermuten, daß die Ca^{2+} - und $GTP\gamma S$ -induzierte Insulinsekretion durch die Blockierung von Annexin XI verstärkt inhibiert wird. Die Sekretion ist nicht beeinträchtigt, wenn sie durch Proteinkinase C aktivierende Phorbol ester aktiviert wird (Iino et al., 2000). Die Stimulation durch $GTP\gamma S$ ist jedoch unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Somit könnte Annexin XI auf zwei verschiedenen Wegen die Insulinsekretion beeinflussen.

An chromaffinen Granula konnte gezeigt werden, daß Annexin VII eine Ca^{2+} - und $GTP\gamma S$ -induzierte Membranfusion beschleunigt (Caohuy et al., 1997). Möglicherweise haben Annexin VII und Annexin XI die gleiche Funktion in chromaffinen und in β -Zellen, und es ergibt sich ein kompensatorischer Effekt bei Verlust eines der Annexine auch ohne daß die Expression signifikant verändert werden muß.

4.3 Lokalisation von Annexin VII in humanen Geweben

Während in den letzten 20 Jahren Annexin VII viele biochemische Eigenschaften zumindest *in vitro* zugeordnet werden konnten, ist über seine Lokalisation in verschiedenen Organen mit Ausnahme des Skelettmuskels und den hier vorgestellten Daten für Hirn und Herz wenig bekannt. Für die Annexine II, VI, V und VI gibt einige Untersuchungen zur Lokalisation in Herzen von verschiedenen Säugern (Luckuck et al., 1998; Trouve et al., 1999; Matteo und Moravec, 2000; Benevolensky et al., 2000). Während Annexin II hauptsächlich im Interstitium zu finden ist, zeigt Annexin IV eine zytoplasmatische Verteilung, Annexin V ist an der Z-Linie und an Lipofuscin-Vesikeln und Annexin VI am Sarkolemma und an den Glanzstreifen lokalisiert. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Gewebeschnitten handelt es sich jedoch um Transversalschnitte, die eine Zuordnung an bestimmte subzelluläre Kompartimente erschweren. Für die Bestimmung der Lokalisation besser geeignet sind daher Longitudinal-schnitte an denen die Querstreifung und die Glanzstreifen gut zu erkennen sind. Außerdem sollten für eine genauere Bestimmung auch markerspezifische Antikörper genutzt werden.

Die Lokalisation von Annexin VII im humanen Gehirn konnte mit Hilfe eines GFAP-Antikörpers eindeutig einem speziellen Zelltyp, der Astroglia zugeordnet werden. Eine spezifische subzelluläre Verteilung ist nicht erkennbar. Bisher war bekannt, daß beide Isoformen von Annexin VII im Gehirn exprimiert sind und in verschiedenen funktionellen

Bereichen vorkommen (Magendzo et al., 1991; Clemen et al., 2000). Für die Annexine II und VI konnte eine funktionelle Verbindung mit GFAP gezeigt werden. Beide Annexine sind an der Regulation der Polymerisation von GFAP-Filamenten beteiligt (Thiel et al., 1992; Bianchi et al., 1995). Expressions- und Lokalisationsstudien zeigen, daß die Expression von Annexin I, II, IV, V und VI auf unterschiedliche Zelltypen beschränkt ist und während der Gehirnentwicklung verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegen (Reeves et al., 1992; Giambanco et al., 1993; Eberhard et al., 1994; Gotow et al., 1996). Die Bindung von Annexin VI an Calspektin, einem F-Aktin bindenden Protein, legt die Vermutung nahe, daß Annexin VI an der Ca^{2+} -abhängigen Regulation des submembranären Zytoskeletts beteiligt sein könnte (Watanabe et al., 1994).

4.4 Funktion von Annexin VII

Die in dieser Arbeit etablierte $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Mauslinie hat keine offensichtlichen Defekte. Das Fehlen von erkennbaren pathologischen Symptomen steht in eindeutigem Gegensatz zu Daten, die mit einer $\text{Anx7}^{(+/-)}$ -Maus erzielt wurden, bei der schon eine reduzierte Expression von Annexin VII einen Defekt in der Insulinsekretion bewirkt. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund sind Kompensationsmechanismen bei der $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Maus. Aufgrund der hohen Homologien zwischen den einzelnen Annexinen wäre eine Kompensation durch verstärkte Expression eines oder mehrerer Annexine denkbar. Dies wurde jedoch auf Proteinebene nicht beobachtet. Auch bei der $\text{Anx6}^{(-/-)}$ -Maus, die keine offensichtlichen Veränderungen zeigt, ist kein Kompensationseffekt durch andere Annexine gefunden worden (Hawkins et al., 1999). Nicht auszuschließen ist jedoch eine Kompensation durch andere Ca^{2+} -bindende Proteine, die die Ca^{2+} -abhängigen Eigenschaften und Funktionen der Zelle aufrechterhalten. Die Funktionen der individuellen N-Termini bleiben dabei weiterhin ungeklärt. Denkbar ist auch, daß die Annexin VII-Defizienz nur unter bestimmten Streßbedingungen sichtbar wird. Möglicherweise verhält sich bei einer Hyper- oder Hypoglykämie die Insulinsekretion der knock-out Tiere anders im Vergleich zu Kontrolltieren. Durch pharmakologische Beeinflussung könnte das Herz in einen pathologischen Zustand versetzt werden, so daß nach einem induzierten Infarkt der Verlust von Annexin VII auffällig wird. Eine weitere Methode zur Analyse von Annexin VII und Annexinen allgemein besteht darin, mehrfach mutante Mäuse zu generieren. Es bleibt auch abzuwarten, ob weitere Annexin-defiziente Mäuse generiert werden und ob sie sich ähnlich verhalten wie die bereits existierende $\text{Anx7}^{(+/-)}$ -Maus von Srivastava et al. Solche im heterozygoten Zustand auftretenden Phänotypen finden sich sehr häufig bei Wachstumsfaktor-defizienten Tieren, wie z.B. bei den "insulin-like growth factor" I und II (IGF-I und IGF-II) oder dem "vascular endothelial growth factor" (VEGF), da hier die Entwicklung der entsprechenden Organe sehr stark von der

Konzentration der Hormone abhängig ist (DeChiara et al., 1990; Powell-Braxton et al., 1993; Haigh et al., 2000; Holzenberger et al., 2000). Von Mausmodellen, denen z.B. membran-assoziierte Proteine oder Membranproteine fehlen sind solche ausgeprägten Phänotypen in heterozygoten Tieren kaum bekannt.

5 Zusammenfassung

Annexin VII ist ein Ca^{2+} - und Phospholipid-bindendes Protein, für das verschiedene Funktionen vorgeschlagen wurden, wie die Fusion von Membranen, Beteiligung an exozytotischen/sekretorischen Vorgängen und der Aufbau von Ca^{2+} -Kanälen. Die physiologische Rolle von Annexin VII in der Zelle ist jedoch noch nicht geklärt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde durch konventionelles gene targeting eine Annexin VII-defiziente Mauslinie generiert. Mit einem targeting-Vektor zur Einführung der Nullmutation in den Annexin VII-Genlocus wurden embryonale Stammzellen der Maus transfiziert. Durch DNA-Analyse konnten neun homolog rekombinante ES-Zell-Klone identifiziert werden. Blastozysteninjektion und -implantation führte zu zwei keimbahnchimären Männchen, wovon zunächst eines für die Generierung der $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Mauslinie eingesetzt wurde. Die Kreuzung der $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Nachkommen erlaubte die Etablierung einer transgenen 129Sv/C57BL/6-Hybrid-Mauslinie, einer 129Sv-Mauslinie und einer C57BL/6-Mauslinie.

Die Analyse der transgenen Mauslinie zeigte auf RNA-Ebene das Vorkommen verschiedener verkürzter Transkripte, die vermutlich nicht translatiert werden oder zu verkürzten, nicht funktionsfähigen Proteinen führen. Auf Protein-Ebene wurde in der Leber ein 47 kDa Protein detektiert, das sowohl von monoklonalen als auch polyklonalen Anti-Annexin VII-Antikörpern erkannt wurde. Proteinchemische Analysen lassen jedoch den Schluß zu, daß es sich hierbei nicht um Annexin VII handelt. In allen anderen untersuchten Organen konnte kein Annexin VII-Protein nachgewiesen werden.

Trotz der Annexin VII-Defizienz haben die Tiere keinen auffälligen Phänotyp ausgebildet. Im histologischen Befund waren Anomalien makroskopisch nicht erkennbar. Die Skelettmuskulatur ist normal entwickelt und zeigte keine pathologische Veränderung. Aufgrund seiner Funktion wurde der Verlust von Annexin VII vor allem in Bezug auf Ca^{2+} -Homöostase in Kardiozyten und Sekretion im Pankreas hin untersucht. Embryonale Kardiozyten hatten die gleiche Fähigkeit zur spontanen Kontraktion und wiesen vergleichbare Aktionspotentiale auf wie die Kardiozyten aus Wildtyp-Tieren. Die Ca^{2+} -Homöostase sowie die Expression und Regulation von Ionen-Kanälen in embryonalen Kardiozyten scheinen somit durch den Verlust von Annexin VII unbeeinflusst. Die Mäuse weisen auch keinen Defekt in der Insulinsekretion wie bei Srivastava et al. (1999) auf. Es zeigte sich zwar eine leicht verminderte Antwort auf die Carbachol-stimulierte Sekretion, aber bisher konnte dieser Effekt noch nicht mit der Reduktion von IP_3 -Rezeptoren oder anderen Mechanismen in Zusammenhang gebracht werden. Einen ersten Anhaltspunkt auf eine Veränderung durch den Verlust von Annexin VII lieferte die negative Zellverkürzungs-Frequenz-Beziehung gemessen an isolierten Kardio-myozyten adulter $\text{Anx7}^{(-/-)}$ -Tiere. Hier deutet sich ein Defekt in der Ca^{2+} -Homöostase an. Zu beachten ist dabei allerdings, daß ein signifikanter Unterschied erst in einem hohen Frequenzbereich auftrat, und daß in den knock-out Tieren eine Veränderung in der β -Adrenorezeptor-vermittelten Zellverkürzung, nicht beobachtet wurde.

Die Lokalisation von Annexin VII wurde auch in humanem Herz und Gehirn untersucht. Dabei zeigte sich eine subzelluläre Verteilung in Herzmuskelfasern. Im Gehirn kommt Annexin VII in glialen Zellen vor, die mit einer GFAP-Markierung als Astrozyten charakterisiert wurden.

6 Summary

Annexin VII is a Ca^{2+} - and phospholipid binding protein. Many functions have been proposed including membrane fusion, involvement in exocytosis/secretion and regulation of ion-channels but the physiological function in vivo remains to be determined.

To gain insight into the in vivo function of annexin VII, we performed targeted disruption of its gene in mice. Embryonic stem cells were electroporated with a targeting vector introducing a neomycin-resistance cassette into the annexin VII locus. ES cell clones underwent homologous recombination at the annexin VII locus as determined by Southern blot analysis. Targeted clones were injected into host blastocysts, and the blastocysts were transferred to uteri of pseudopregnant females. Germline transmission of the mutant allele was achieved for two chimeric males. Interbreeding of heterozygous animals permitted the establishment of a transgenic 129Sv/C57BL/6-hybrid mouse strain, a 129Sv and a C57BL/6 strain.

By northern blot analysis we detected mRNA transcripts, of smaller size, which may be not translated or lead to a non-functional protein. By western blot analysis we detected a 47 kDa protein in liver. Biochemical studies indicated that the protein does not behave like a typical annexin. All other tissues were free of annexin VII immunoreactivity.

To exclude morphological abnormalities in organs of Anx7-null mice, histological analyses of various tissues were performed. None of the organs tested showed obvious abnormalities. The more detailed analyses of skeletal muscle with different functional stainings revealed also no differences between the wildtype and the transgenic line. Referring to the proposed functions of annexin VII, secretion in pancreas and Ca^{2+} -homeostasis in cardiomyocytes were examined in Anx7^(-/-) animals. Mutant embryonic cardiomyocytes featured spontaneous contraction and typical action potentials like control animals, showing that Ca^{2+} -homeostasis, and expression and regulation of ion channels is not affected. A defect in insulin secretion as previously described by Srivastava et al. (1999) was not observed. A first alteration due to the loss of annexin VII is an impaired shortening-frequency-relationship of ventricular myocytes of adult animals. In contrast to the results with embryonic cardiomyocytes this effect could be due to a disturbance in Ca^{2+} -homeostasis. However, this effect appeared only at high stimulation frequencies, and β -adrenoreceptor-mediated cell shortening was not altered.

The localization of annexin VII was examined in human heart and brain. In the heart there is a subcellular distribution in the muscle fibers, which was not further determined. In the brain, annexin VII is expressed exclusively in glial cells, which could be identified as astrocytes by labeling with GFAP (glia fibrillary acidic protein).

7 Literatur

- Ali, S. M., M. J. Geisow, and R. D. Burgoyne. 1989. A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin. *Nature*. **340**:313-5.
- Alvarez-Martinez, M. T., J. C. Mani, F. Porte, C. Faivre-Sarrailh, J. P. Liautard, and J. Sri Widada. 1996. Characterization of the interaction between annexin I and profilin. *Eur J Biochem*. **238**:777-84.
- Amiranoff, B., A. M. Lorinet, I. Lagny-Pourmir, and M. Laburthe. 1988. Mechanism of galanin-inhibited insulin release. Occurrence of a pertussis-toxin-sensitive inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem*. **177**:147-52.
- Ashcroft, F. M., and P. Rorsman. 1990. ATP-sensitive K⁺-channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans*. **18**:109-11.
- Babiychuk, E. B., R. J. Palstra, J. Schaller, U. Kampfner, and A. Draeger. 1999. Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. *J Biol Chem*. **274**:35191-5.
- Baribault, H., and R. Kemler. 1989. Embryonic stem cell culture and gene targeting in transgenic mice. *Mol Biol Med*. **6**:481-92.
- Benevolensky, D., Y. Belikova, R. Mohammadzadeh, P. Trouve, F. Marotte, F. Russo-Marie, J. L. Samuel, and D. Charlemagne. 2000. Expression and localization of the annexins II, V, and VI in myocardium. *Lab Invest*. **80**:123-33.
- Benz, J., A. Bergner, A. Hofmann, P. Demange, P. Gottig, S. Liemann, R. Huber, and D. Voges. 1996. The structure of recombinant human annexin VI in crystals and membrane-bound. *J Mol Biol*. **260**:638-43.
- Berendes, R., A. Burger, D. Voges, P. Demange, and R. Huber. 1993. Calcium influx through annexin V ion channels into large unilamellar. *FEBS Lett*. **317**:131-4.
- Bers, D. M., W. J. Lederer, and J. R. Berlin. 1990. Intracellular Ca transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *Am J Physiol*. **258**:C944-54.
- Bertocchini, F., C. E. Ovitt, A. Conti, V. Barone, H. R. Scholer, R. Bottinelli, C. Reggiani, and V. Sorrentino. 1997. Requirement for the ryanodine receptor type 3 for efficient contraction in neonatal skeletal muscles. *Embo J*. **16**:6956-63.
- Bianchi, R., M. Garbuglia, M. Verzini, I. Giambanco, A. Spreca, and R. Donato. 1995. S-100 protein and annexin II2-p11(2) (calpactin I) act in concert to regulate the state of assembly of GFAP intermediate filaments. *Biochem Biophys Res Commun*. **208**:910-8.
- Blondel, O., J. Takeda, H. Janssen, S. Seino, and G. I. Bell. 1993. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in

- pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem.* **268**:11356-63.
- Bowditch, H. P. 1871. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sächs Ges (Akad) Wiss*:652-689.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-54.
- Bradley, A. 1990. Embryonic stem cells: proliferation and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* **2**:1013-7.
- Braun, T., M. A. Rudnicki, H. H. Arnold, and R. Jaenisch. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell.* **71**:369-82.
- Braun, T., E. Bober, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch, and H. H. Arnold. 1994. MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development.* **120**:3083-92.
- Braun, T., and H. H. Arnold. 1995. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *Embo J.* **14**:1176-86.
- Bristow, M. R., R. Ginsburg, W. Minobe, R. S. Cubicciotti, W. S. Sageman, K. Lurie, M. E. Billingham, D. C. Harrison, and E. B. Stinson. 1982. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* **307**:205-11.
- Bristow, M. R., R. Ginsburg, V. Umans, M. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen, P. Zera, R. Menlove, P. Shah, S. Jamieson, and et al. 1986. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res.* **59**:297-309.
- Brodde, O. E. 1991. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev.* **43**:203-42.
- Brook, F. A., and R. L. Gardner. 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:5709-12.
- Brown, D. G., M. A. Willington, I. Findlay, and A. L. Muggleton-Harris. 1992. Criteria that optimize the potential of murine embryonic stem cells for in vitro and in vivo developmental studies. *In Vitro Cell Dev Biol.* **28A**:773-8.
- Buckingham, M. 1992. Making muscle in mammals. *Trends Genet.* **8**:144-8.
- Buckley, K. M., E. Floor, and R. B. Kelly. 1987. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding p38, a major synaptic vesicle protein. *J Cell Biol.* **105**:2447-56.
- Buckley, N. M., Z. J. Penefsky, and R. S. Litwak. 1972. Comparative force-frequency relationships in human and other mammalian ventricular myocardium. *Pflugers Arch.* **332**:259-70.

- Bullock, W. O. 1987. *BioTechniques*. **5**:376-378.
- Burger, A., R. Berendes, S. Liemann, J. Benz, A. Hofmann, P. Gottig, R. Huber, V. Gerke, C. Thiel, J. Romisch, and K. Weber. 1996. The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a. *J Mol Biol*. **257**:839-47.
- Burgoyne, R. D., and M. J. Geisow. 1989. The annexin family of calcium-binding proteins. Review article. *Cell Calcium*. **10**:1-10.
- Caohuy, H., M. Srivastava, and H. B. Pollard. 1996. Membrane fusion protein synexin (annexin VII) as a Ca^{2+} /GTP sensor in exocytotic secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**:10797-802.
- Capecchi, M. R. 1994. Targeted gene replacement. *Sci Am*. **270**:52-9.
- Chan, H. C., M. A. Kaetzel, A. L. Gotter, J. R. Dedman, and D. J. Nelson. 1994. Annexin IV inhibits calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance. A novel mechanism for ion channel regulation. *J Biol Chem*. **269**:32464-8.
- Chan, S. Y., and M. J. Evans. 1991. In situ freezing of embryonic stem cells in multiwell plates. *Trends Genet*. **7**:76.
- Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*. **127**:1550-7.
- Chollet, P., F. Malecaze, F. Hullin, P. Raynal, J. L. Arne, V. Pagot, J. Ragab-Thomas, and H. Chap. 1992. Inhibition of intraocular fibrin formation with annexin V. *Br J Ophthalmol*. **76**:450-2.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. **162**:156-9.
- Clemen, C. S., A. Hofmann, C. Zamparelli, and A. A. Noegel. 1999. Expression and localisation of annexin VII (synexin) isoforms in differentiating myoblasts. *J Muscle Res Cell Motil*. **20**:669-79.
- Clemen, C. S., C. Herr, A. A. Lie, I. N. Blümcke, A.A., and R. Schröder. 2000. Annexin VII in the human CNS: an astroglial protein with a role in intracellular calcium homeostasis. *J Neurosci* (submitted).
- Cohen C. J., H. A. Fozzard and S. S. Sheu. 1982. Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circ Res* **50**:651-62.
- Concha, N. O., J. F. Head, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, and B. A. Seaton. 1993. Rat annexin V crystal structure: Ca^{2+} -induced conformational changes. *Science*. **261**:1321-4.
- Creutz, C. E. 1992. The annexins and exocytosis. *Science*. **258**:924-31.
- Creutz, C. E., C. J. Pazoles, and H. B. Pollard. 1978. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem*. **253**:2858-66.
- Creutz, C. E., S. L. Snyder, S. N. Daigle, and J. Redick. 1996. Identification, localization, and functional implications of an abundant nematode annexin. *J Cell Biol*. **132**:1079-92.

- Croxtall, J. D., Q. Choudhury, H. Tokumoto, and R. J. Flower. 1995. Lipocortin-1 and the control of arachidonic acid release in cell signalling. Glucocorticoids (changed from glucocorticoids) inhibit G protein-dependent activation of cPLA2 activity. *Biochem Pharmacol.* **50**:465-74.
- Crumpton, M. J., and J. R. Dedman. 1990. Protein terminology tangle. *Nature.* **345**:212.
- de la Fuente, M., and A. V. Parra. 1995. Vesicle aggregation by annexin I: role of a secondary membrane binding. *Biochemistry.* **34**:10393-9.
- DeChiara, T. M., A. Efstratiadis, and E. J. Robertson. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* **345**:78-80.
- Deconinck, A. E., J. A. Rafael, J. A. Skinner, S. C. Brown, A. C. Potter, L. Metzinger, D. J. Watt, J. G. Dickson, J. M. Tinsley, and K. E. Davies. 1997. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* **90**:717-27.
- Demange, P., D. Voges, J. Benz, S. Liemann, P. Gottig, R. Berendes, A. Burger, and R. Huber. 1994. Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage. *Trends Biochem Sci.* **19**:272-6.
- Deng, C., and M. R. Capecchi. 1992. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the targeted locus. *Mol Cell Biol.* **12**:3365-71.
- Diaz-Munoz, M., S. L. Hamilton, M. A. Kaetzel, P. Hazarika, and J. R. Dedman. 1990. Modulation of Ca²⁺ release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedlin). *J Biol Chem.* **265**:15894-9.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kemler. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* **87**:27-45.
- Doetschman, T., A. Gossler, E. Serfling, W. Schaffner, K. Marcu, L. Stanton, and R. Kemler. 1986. Introduction of genes into mouse embryonic stem cells. *Prog Clin Biol Res.* **217A**:47-50.
- Döring, V., M. Schleicher, and A. A. Noegel. 1991. Dictyostelium annexin VII (synexin). cDNA sequence and isolation of a gene disruption mutant. *J Biol Chem.* **266**:17509-15.
- Döring, V., F. Veretout, R. Albrecht, B. Muhlbauer, C. Schlatterer, M. Schleicher, and A. A. Noegel. 1995. The in vivo role of annexin VII (synexin): characterization of an annexin VII-deficient Dictyostelium mutant indicates an involvement in Ca²⁺-regulated processes. *J Cell Sci.* **108**:2065-76.
- Doubell, A. F., A. J. Bester, and G. Thibault. 1991. Annexins V and VI: major calcium-dependent atrial secretory. *Hypertension.* **18**:648-56.
- Eberhard, D. A., M. D. Brown, and S. R. VandenBerg. 1994. Alterations of annexin expression in pathological neuronal and glial. *Am J Pathol.* **145**:640-9.

- Evans, M. J. 1989. Potential for genetic manipulation of mammals. *Mol Biol Med.* **6**:557-65.
- Favier-Perron, B., A. Lewit-Bentley, and F. Russo-Marie. 1996. The high-resolution crystal structure of human annexin III shows subtle differences with annexin V. *Biochemistry.* **35**:1740-4.
- Fedorov, L. M., H. Haegel-Kronenberger, and J. Hirchenhain. 1997. A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res.* **6**:223-31.
- Fiedler, K., and K. Simons. 1995. Annexin homologues in *Giardia lamblia*. *Trends Biochem Sci.* **20**:177-8.
- Fiering, S., E. Epner, K. Robinson, Y. Zhuang, A. Telling, M. Hu, D. I. Martin, T. Enver, T. J. Ley, and M. Groudine. 1995. Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* **9**:2203-13.
- Frampton, J. E., S. M. Harrison, M. R. Boyett, and C. H. Orchard. 1991. Ca^{2+} and Na^{+} in rat myocytes showing different force-frequency relationships. *Am J Physiol.* **261**:C739-50.
- Funakoshi, T., L. E. Hendrickson, B. A. McMullen, and K. Fujikawa. 1987. Primary structure of human placental anticoagulant protein. *Biochemistry.* **26**:8087-92.
- Futter, C. E., S. Felder, J. Schlessinger, A. Ullrich, and C. R. Hopkins. 1993. Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* **120**:77-83.
- Garbuglia, M., M. Verzini, and R. Donato. 1998. Annexin VI binds S100A1 and S100B and blocks the ability of S100A1 and S100B to inhibit desmin and GFAP assemblies into intermediate filaments. *Cell Calcium.* **24**:177-91.
- Gardner, R. L. 1968. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature.* **220**:596-7.
- Gardner, R. L., and M. F. Lyon. 1971. X chromosome inactivation studied by injection of a single cell into the. *Nature.* **231**:385-6.
- Gardner, R. L., and J. Rossant. 1979. Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass. *J Embryol Exp Morphol.* **52**:141-52.
- Gerke, V., and K. Weber. 1984. Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *Embo J.* **3**:227-33.
- Gerke, V., and S. E. Moss. 1997. Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta.* **1357**:129-54.
- Gerlai, R. 1996. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype. *Trends Neurosci.* **19**:177-81.
- Giambanco, I., M. Verzini, and R. Donato. 1993. Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development. *Biochem Biophys Res Commun.* **196**:1221-6.

- Gilmanshin, R., C. E. Creutz, and L. K. Tamm. 1994. Annexin IV reduces the rate of lateral lipid diffusion and changes the fluid phase structure of the lipid bilayer when it binds to negatively charged membranes in the presence of calcium. *Biochemistry*. **33**:8225-32.
- Gordon, J. W., and F. H. Ruddle. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. **214**:1244-6.
- Gordon, J. W., and F. H. Ruddle. 1983. Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by by pronuclear injection. *Methods Enzymol*. **101**:411-33.
- Gotow, T., M. Sakata, T. Funakoshi, and Y. Uchiyama. 1996. Preferential localization of annexin V to the axon terminal. *Neuroscience*. **75**:507-21.
- Grady, R. M., H. Teng, M. C. Nichol, J. C. Cunningham, R. S. Wilkinson, and J. R. Sanes. 1997. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. **90**:729-38.
- Greenwood, M., and A. Tsang. 1991. Sequence and expression of annexin VII of *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta*. **1088**:429-32.
- Gunteski-Hamblin, A. M., G. Song, R. A. Walsh, M. Frenzke, G. P. Boivin, G. W. Dorn, 2nd, M. A. Kaetzel, N. D. Horseman, and J. R. Dedman. 1996. Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function. *Am J Physiol*. **270**:H1091-100.
- Haber, J. E. 1999. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci*. **24**:271-5.
- Haigler, H. T., and D. D. Schlaepfer. 1997. The Annexins. In *The Annexins*. M. SE, editor, London.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. **391**:85-100.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **166**:557-80.
- Harding, S. E., G. Vescovo, S. M. Jones, P. O'Gara, and P. A. Poole-Wilson. 1989. Beta-adrenoceptor desensitisation in single ventricular cells isolated from failing human hearts. *Circulation*. **80**:II-440.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, C. Chang, and A. Bradley. 1991. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. **11**:4509-17.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley. 1992. The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. **12**:2464-74.
- Hasty, P., A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson, and W. H. Klein. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. **364**:501-6.

- Hawkins, T. E., J. Roes, D. Rees, J. Monkhouse, and S. E. Moss. 1999. Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Mol Cell Biol.* **19**:8028-32.
- Hayashi, M., T. Monkawa, T. Yoshida, H. Sasamura, M. Matsumoto, T. Inoue, K. Mikoshiba, and T. Saruta. 1999. Intracellular calcium concentration in the inositol trisphosphate receptor type 1 knockout mouse. *J Am Soc Nephrol.* **10**:2094-101.
- Hazarika, P., M. A. Kaetzel, A. Sheldon, N. J. Karin, S. Fleischer, T. E. Nelson, and J. R. Dedman. 1991. Annexin VI is associated with calcium-sequestering organelles. *J Cell Biochem.* **46**:78-85.
- Hellman, B. 1986. Calcium transport in pancreatic beta-cells: implications for glucose regulation of insulin release. *Diabetes Metab Rev.* **2**:215-41.
- Herbert, V., K. S. Lau, C. W. Gottlieb, and S. J. Bleicher. 1965. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* **25**:1375-84.
- Hoekstra, D., R. Buist-Arkema, K. Klappe, and C. P. Reutelingsperger. 1993. Interaction of annexins with membranes: the N-terminus as a governing. *Biochemistry.* **32**:14194-202.
- Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, and E. Lacy. 1994. Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual. Cold spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Holliday, R. 1964. *Genet Res.* **5**:282.
- Holmes, D. S., and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* **114**:193-7.
- Holzenberger, M., P. Leneuve, G. Hamard, B. Ducos, L. Perin, M. Binoux, and Y. Le Bouc. 2000. A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit. *Endocrinology.* **141**:2557-66.
- Huber, R., J. Romisch, and E. P. Paques. 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant that binds to calcium and membranes. *Embo J.* **9**:3867-74.
- Iino, S., T. Sudo, T. Niwa, T. Fukasawa, H. Hidaka, and I. Niki. 2000. Annexin XI may be involved in Ca²⁺- or GTPγS-induced insulin secretion in the pancreatic beta-cell. *Febs.* **479**:46-50
- Ikebuchi, N. W., and D. M. Waisman. 1990. Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85. *J Biol Chem.* **265**:3392-400.
- Inui, M., T. Watanabe, and K. Sobue. 1994. Annexin VI binds to a synaptic vesicle protein, synapsin I. *J Neurochem.* **63**:1917-23.
- Isenberg, G., and U. Klockner. 1982. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflugers Arch.* **395**:30-41.
- Jaenisch, R., D. Jahner, P. Nobis, I. Simon, J. Lohler, K. Harbers, and D. Grotkopp. 1981. Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice. *Cell.* **24**:519-29.

- Ji, G. J., B. K. Fleischmann, W. Bloch, M. Feelisch, C. Andressen, K. Addicks, and J. Hescheler. 1999. Regulation of the L-type Ca^{2+} channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *Faseb J.* **13**:313-24.
- Johnston, P. A., M. S. Perin, G. A. Reynolds, S. A. Wasserman, and T. C. Sudhof. 1990. Two novel annexins from *Drosophila melanogaster*. Cloning, characterization, and differential expression in development. *J Biol Chem.* **265**:11382-8.
- Junker, M., and C. E. Creutz. 1994. Ca^{2+} -dependent binding of endonexin (annexin IV) to membranes: analysis. *Biochemistry.* **33**:8930-40.
- Kaetzel, M. A., H. C. Chan, W. P. Dubinsky, J. R. Dedman, and D. J. Nelson. 1994. A role for annexin IV in epithelial cell function. Inhibition of calcium-activated chloride conductance. *J Biol Chem.* **269**:5297-302.
- Katada, T., and M. Ui. 1981. Islet-activating protein. A modifier of receptor-mediated regulation of rat islet adenylate cyclase. *J Biol Chem.* **256**:8310-7.
- Kawasaki, H., A. Avila-Sakar, C. E. Creutz, and R. H. Kretsinger. 1996. The crystal structure of annexin VI indicates relative rotation of the two lobes upon membrane binding. *Biochim Biophys Acta.* **1313**:277-82.
- Kim, K. M., D. K. Kim, Y. M. Park, C. K. Kim, and D. S. Na. 1994. Annexin-I inhibits phospholipase A2 by specific interaction, not by substrate depletion. *FEBS Lett.* **343**:251-5.
- Kubista, H., T. E. Hawkins, D. R. Patel, H. T. Haigler, and S. E. Moss. 1999. Annexin 5 mediates a peroxide-induced Ca^{2+} influx in B cells. *Curr Biol.* **9**:1403-6.
- Kuijpers, G. A., G. Lee, and H. B. Pollard. 1992. Immunolocalization of synexin (annexin VII) in adrenal chromaffin granules. *Cell Tissue Res.* **269**:323-30.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* **10**:203-9.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
- Lazarides, E. 1980. Desmin and intermediate filaments in muscle cells. *Results Probl Cell Differ.* **11**:124-31.
- Lee, K. S., E. Marban, and R. W. Tsien. 1985. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol (Lond).* **364**:395-411.
- Lehrach, H., D. Diamond, J. M. Wozney, and H. Boedtker. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* **16**:4743-51.

- Leube, R. E., P. Kaiser, A. Seiter, R. Zimbelmann, W. W. Franke, H. Rehm, P. Knaus, P. Prior, H. Betz, H. Reinke, and et al. 1987. Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *Embo J.* **6**:3261-8.
- Lewit-Bentley, A., S. Morera, R. Huber, and G. Bodo. 1992. The effect of metal binding on the structure of annexin V and implications for membrane binding. *Eur J Biochem.* **210**:73-7.
- Lewit-Bentley, A., G. A. Bentley, B. Favier, L. H. G, and M. Renouard. 1994. The interaction of metal ions with annexin V: a crystallographic study. *FEBS Lett.* **345**:38-42.
- Li, Z., M. Mericskay, O. Agbulut, G. Butler-Browne, L. Carlsson, L. E. Thornell, C. Babinet, and D. Paulin. 1997. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol.* **139**:129-44.
- Liemann, S. 1996. Herstellung ,Reinigung und strukturelle Charakterisierung von Mutanten des humanen Annxin V; ESR-Spektroskopische Untersuchung des Annexin V-Membran-Komplexes; Reinigung und Kristallstruktur des Rekombinanten N-terminal verkürzten Annexin VII aus *Dictyostelium discoideum*. Dissertation. Universität München.
- Limas, C. J., M. T. Olivari, I. F. Goldenberg, T. B. Levine, D. G. Benditt, and A. Simon. 1987. Calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in human dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* **21**:601-5.
- Lin, H. C., T. C. Sudhof, and R. G. Anderson. 1992. Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. *Cell.* **70**:283-91.
- Liu, X., H. Wu, J. Loring, S. Hormuzdi, C. M. Disteché, P. Bornstein, and R. Jaenisch. 1997. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with gemline transmission. *Dev Dyn.* **209**:85-91.
- Lovell-Bedge, R. H. 1987. Introduction of DNA into embryonic stemcells. *In* Teratocarcinomas and Embryonic stem Cells: a practical approach. E. J. Robertson, editor. IRL, Press, Oxford. 113-151.
- Luckcuck, T., P. J. Trotter, and J. H. Walker. 1998. Localization of annexin VI in the adult and neonatal heart. *Cell Biol Int.* **22**:199-205.
- Luecke, H., B. T. Chang, W. S. Mailliard, D. D. Schlaepfer, and H. T. Haigler. 1995. Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature.* **378**:512-5.
- Magendzo, K., A. Shirvan, C. Cultraro, M. Srivastava, H. B. Pollard, and A. L. Burns. 1991. Alternative splicing of human synexin mRNA in brain, cardiac, and skeletal muscle alters the unique N-terminal domain. *J Biol Chem.* **266**:3228-32.
- Maltsev, V. A., G. J. Ji, A. M. Wobus, B. K. Fleischmann, and J. Hescheler. 1999. Establishment of beta-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ current in the early stages of cardiomyocyte development. *Circ Res.* **84**:136-45.

- Mann, K. G. 1984. Membrane bound enzyme complexes in blood coagulation. *Prog Hemostasis Thromb.* **7**:1-24.
- Mansour, S. L., K. R. Thomas, and M. R. Capecchi. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature.* **336**:348-52.
- Mansouri. A homologues recombination in ebrionic stem cells. MPI für biophysikalische Chemie, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Göttingen, Germany.
- Matsumoto, M., T. Nakagawa, T. Inoue, E. Nagata, K. Tanaka, H. Takano, O. Minowa, J. Kuno, S. Sakakibara, M. Yamada, H. Yoneshima, A. Miyawaki, Y. Fukuuchi, T. Furuichi, H. Okano, K. Mikoshiba, and T. Noda. 1996. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature.* **379**:168-71.
- Matteo, R. G., and C. S. Moravec. 2000. Immunolocalization of annexins IV, V and VI in the failing and non-failing. *Cardiovasc Res.* **45**:961-70.
- McLendon, R. E., and D. D. Bigner. 1994. Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic protein: basic and applied considerations. *Brain Pathol.* **4**:221-8.
- Meers, P., T. Mealy, N. Pavlotsky, and A. I. Tauber. 1992. Annexin I-mediated vesicular aggregation: mechanism and role in human. *Biochemistry.* **31**:6372-82.
- Mehdy, M. C., D. Ratner, and R. A. Firtel. 1983. Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell.* **32**:763-71.
- Milner, D. J., G. Weitzer, D. Tran, A. Bradley, and Y. Capetanaki. 1996. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol.* **134**:1255-70.
- Moraru, II, S. Syrbu, N. Zecevic, W. D. Hager, J. Watras, and F. Messineo. 1998. An antibody to annexin V blocks Ca²⁺-dependent ATPase activity of sarcoplasmic reticulum in human failing hearts. *Ann N Y Acad Sci.* **853**:333-7.
- Moss, S. E., and M. J. Crumpton. 1989. Alternative splicing or cloning artefact?. *Trends Biochem Sci.* **14**:325.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J.* **1**:841-5.
- Ngai, J., Y. G. Capetanaki, and E. Lazarides. 1985. Expression of the genes coding for the intermediate filament proteins vimentin and desmin. *Ann N Y Acad Sci.* **455**:144-57.
- Noegel, A. A., G. Gerisch, F. Lottspeich, and M. Schleicher. 1990. A protein with homology to the C-terminal repeat sequence of Octopus rhodopsin and synaptophysin is a member of a multigene family in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* **266**:118-22.
- Ohnishi, M., M. Tokuda, T. Masaki, T. Fujimura, Y. Tai, T. Itano, H. Matsui, T. Ishida, R. Konishi, J. Takahara, and et al. 1995. Involvement of annexin-I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology.* **136**:2421-6.

- Ohnishi, M., M. Tokuda, T. Masaki, T. Fujimura, Y. Tai, H. Matsui, T. Itano, T. Ishida, J. Takahara, R. Konishi, and et al. 1994. Changes in annexin I and II levels during the postnatal development of rat pancreatic islets. *J Cell Sci.* **107**:2117-25.
- Olson, E. N., H. H. Arnold, P. W. Rigby, and B. J. Wold. 1996. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell.* **85**:1-4.
- Ovchinnikov Yu, A., N. G. Abdulaev, A. S. Zolotarev, I. D. Artamonov, I. A. Bespalov, A. E. Dergachev, and M. Tsuda. 1988. Octopus rhodopsin. Amino acid sequence deduced from cDNA. *FEBS Lett.* **232**:69-72.
- Packer, M. 1988. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation.* **77**:721-30.
- Palmiter, R. D., and R. L. Brinster. 1985. Transgenic mice. *Cell.* **41**:343-5.
- Patapoutian, A., J. K. Yoon, J. H. Miner, S. Wang, K. Stark, and B. Wold. 1995. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development.* **121**:3347-58.
- Pham, C. T., D. M. MacIvor, B. A. Hug, J. W. Heusel, and T. J. Ley. 1996. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:13090-5.
- Pigault, C., A. Follenius-Wund, M. Schmutz, J. M. Freyssinet, and A. Brisson. 1994. Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol.* **236**:199-208.
- Piot, C., S. Lemaire, B. Albat, J. Seguin, J. Nargeot, and S. Richard. 1996. High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation.* **93**:120-8.
- Pollard, H. B., E. Rojas, and A. L. Burns. 1987. Synexin and chromaffin granule membrane fusion. A novel "hydrophobic bridge" hypothesis for the driving and directing of the fusion process. *Ann N Y Acad Sci.* **493**:524-41.
- Pollard, H. B., and E. Rojas. 1988. Ca²⁺-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca²⁺-channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:2974-8.
- Pollard, H. B., A. L. Burns, and E. Rojas. 1990. Synexin, a new member of the annexin gene family, is a calcium channel and membrane fusion protein. *Prog Clin Biol Res.* **349**:159-72.
- Pollard, H. B., E. Rojas, R. W. Pastor, E. M. Rojas, H. R. Guy, and A. L. Burns. 1991. Synexin: molecular mechanism of calcium-dependent membrane fusion and voltage-dependent calcium-channel activity. Evidence in support of the "hydrophobic bridge hypothesis" for exocytotic membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci.* **635**:328-51.
- Pollard, H. B., H. Caohuy, A. P. Minton, and M. Srivastava. 1998. Synexin (annexin VII) hypothesis for Ca²⁺/GTP-regulated exocytosis. *Adv Pharmacol.* **42**:81-7.

- Porte, F., P. de Santa Barbara, S. Phalipou, J. P. Liautard, and J. S. Widada. 1996. Change in the N-terminal domain conformation of annexin I that correlates. *Biochim Biophys Acta*. **1293**:177-84.
- Powell, M. A., and J. R. Glenney. 1987. Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain. *Biochem J*. **247**:321-8.
- Powell-Braxton, L., P. Hollingshead, D. Giltinan, S. Pitts-Meek, and T. Stewart. 1993. Inactivation of the IGF-I gene in mice results in perinatal lethality. *Ann N Y Acad Sci*. **692**:300-1.
- Rafferty, J. B., S. E. Sedelnikova, D. Hargreaves, P. J. Artymiuk, P. J. Baker, G. J. Sharples, A. A. Mahdi, R. G. Lloyd, and D. W. Rice. 1996. Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science*. **274**:415-21.
- Raynal, P., and H. B. Pollard. 1994. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family. *Biochim Biophys Acta*. **1197**:63-93.
- Reeves, S. A., C. Chavez-Kappel, R. Davis, M. Rosenblum, and M. A. Israel. 1992. Developmental regulation of annexin II (Lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma. *Cancer Res*. **52**:6871-6.
- Reutelingsperger, C. P., G. Hornstra, and H. C. Hemker. 1985. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries. *Eur J Biochem*. **151**:625-9.
- Reutelingsperger, C. P., and W. L. van Heerde. 1997. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. **53**:527-32.
- Rojas, E., H. B. Pollard, H. T. Haigler, C. Parra, and A. L. Burns. 1990. Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem*. **265**:21207-15.
- Rothhut, B., F. Russo-Marie, J. Wood, M. Di Rosa, and R. J. Flower. 1983. Further characterization of the glucocorticoid-induced antiphospholipase. *Biochem Biophys Res Commun*. **117**:878-84.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. **230**:1350-4.
- Sambrook, J., E. F. Fritch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual., Cold Spring Harbour Laboratory , Cold Spring, NY.
- Sarafian, T., D. Aunis, and M. F. Bader. 1987. Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*. **262**:16671-6.
- Schlaepfer, D. D., D. A. Fisher, M. E. Brandt, H. R. Bode, J. M. Jones, and H. T. Haigler. 1992. Identification of a novel annexin in *Hydra vulgaris*. Characterization, cDNA cloning, and protein kinase C phosphorylation of annexin XII. *J Biol Chem*. **267**:9529-39.

- Schouten, V. J., and M. Morad. 1989. Regulation of Ca^{2+} current in frog ventricular myocytes by the holding potential, cAMP and frequency. *Pflugers Arch.* **415**:1-11.
- Schwinger, R. H., M. Bohm, U. Schmidt, P. Karczewski, U. Bavendiek, M. Flesch, E. G. Krause, and E. Erdmann. 1995. Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation.* **92**:3220-8.
- Selbert, S. 1995. Vorkommen und Verteilung von Annexin VII (Synexin) in Muskelzellen. Dissertation. Universität Freiburg.
- Selbert, S., P. Fischer, D. Pongratz, M. Stewart, and A. A. Noegel. 1995. Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *J Cell Sci.* **108**:85-95.
- Smallwood, M., J. N. Keen, and D. J. Bowles. 1990. Purification and partial sequence analysis of plant annexins. *Biochem J.* **270**:157-61.
- Smythe, E., P. D. Smith, S. M. Jacob, J. Theobald, and S. E. Moss. 1994. Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. *J Cell Biol.* **124**:301-6.
- Sobota, A., F. Cusinato, and S. Luciani. 1990. Identification and purification of calpactins from cardiac muscle and their effect on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **172**:1067-72.
- Sobota, A., F. Cusinato, and S. Luciani. 1990. Identification and purification of calpactins from cardiac muscle and their effect on $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **172**:1067-72.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**:503-17.
- Srivastava, M., I. Atwater, M. Glasman, X. Leighton, G. Goping, H. Caohuy, G. Miller, J. Pichel, H. Westphal, D. Mears, E. Rojas, and H. B. Pollard. 1999. Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca^{2+} signaling, and insulin secretion in the *anx7(+/-)* knockout mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:13783-8.
- Stracke, J. 2000. Null-Mutanten in der Funktionsanalyse von Myelin-spezifischen Proteinen. Dissertation. Universität zu Köln.
- Studier, F. W., and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189**:113-30.
- Sudhof, T. C., F. Lottspeich, P. Greengard, E. Mehl, and R. Jahn. 1987. The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin. *Nucleic Acids Res.* **15**:9607.
- Suggs, S. V., T. Hirose, T. Miyake, E. H. Kawashima, m. J. Johnson, K. Itakura, and W. R.B. 1981. Use of synthetic oligodesoxy-ribonucleotides for the isolation of specified cloned DNA sequences using purified genes. *In Developmental Biology.* D. D. Brown and C. F. Fox, editors, Academic Press NY. 683-693.

- Tait, J. F., M. Sakata, B. A. McMullen, C. H. Miao, T. Funakoshi, L. E. Hendrickson, and K. Fujikawa. 1988. Placental anticoagulant proteins: isolation and comparative characterization four members of the lipocortin family. *Biochemistry*. **27**:6268-76.
- Takekura, H., M. Iino, H. Takekura, M. Nishi, J. Kuno, O. Minowa, H. Takano, and T. Noda. 1994. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature*. **369**:556-9.
- Takekura, H., T. Ikemoto, M. Nishi, N. Nishiyama, M. Shimuta, Y. Sugitani, J. Kuno, I. Saito, H. Saito, M. Endo, M. Iino, and T. Noda. 1996. Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J Biol Chem*. **271**:19649-52.
- Takekura, H., S. Komazaki, K. Hirose, M. Nishi, T. Noda, and M. Iino. 1998. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *Embo J*. **17**:3309-16.
- Tang, Z., P. E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D. S. Kohtz, I. Nishimoto, H. F. Lodish, and M. P. Lisanti. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem*. **271**:2255-61.
- te Riele, H., E. R. Maandag, and A. Berns. 1992. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:5128-32.
- Templeton, N. S., D. D. Roberts, and B. Safer. 1997. Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther*. **4**:700-9.
- Thiel, C., M. Osborn, and V. Gerke. 1992. The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca²⁺-binding sites. *J Cell Sci*. **103**:733-42.
- Thomas, K. R., and M. R. Capecchi. 1986a. Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature*. **324**:34-8.
- Thomas, K. R., and M. R. Capecchi. 1986b. Targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **51 Pt 2**:1101-13.
- Thomas, K. R., K. R. Folger, and M. R. Capecchi. 1986. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian. *Cell*. **44**:419-28.
- Thomas, P. M., G. J. Cote, N. Wohlk, B. Haddad, P. M. Mathew, W. Rabl, L. Aguilar-Bryan, R. F. Gagel, and J. Bryan. 1995. Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science*. **268**:426-9.
- Thornell, L., L. Carlsson, Z. Li, M. Mericskay, and D. Paulin. 1997. Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. **29**:2107-24.
- Towle, C. A., and B. V. Treadwell. 1992. Identification of a novel mammalian annexin. *J Biol Chem*. **267**:5416-23.

- Townsend, P. J., P. J. Barton, M. H. Yacoub, and H. Farza. 1995. Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: expression in developing and failing heart. *J Mol Cell Cardiol.* **27**:2223-36.
- Trouve, P., S. Legot, I. Belikova, F. Marotte, D. Benevolensky, F. Russo-Marie, J. L. Samuel, and D. Charlemagne. 1999. Localization and quantitation of cardiac annexins II, V, and VI in. *Am J Physiol.* **276**:H1159-66.
- Ullrich, S., and C. B. Wollheim. 1984. Islet cyclic AMP levels are not lowered during alpha 2-adrenergic inhibition of insulin release. *J Biol Chem.* **259**:4111-5.
- van Deursen, J., and B. Wieringa. 1992. Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors. *Nucleic Acids Res.* **20**:3815-20.
- Viatchenko-Karpinski, S., B. K. Fleischmann, Q. Liu, H. Sauer, O. Gryshchenko, G. J. Ji, and J. Hescheler. 1999. Intracellular Ca²⁺ oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:8259-64.
- Vieira, J., and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**:259-68.
- Viragh, S., and C. E. Challice. 1973. Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *J Ultrastruct Res.* **42**:1-24.
- Watanabe, T., M. Inui, B. Y. Chen, M. Iga, and K. Sobue. 1994. Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a. *J Biol Chem.* **269**:17656-62.
- Weng, X., H. Luecke, I. S. Song, D. S. Kang, S. H. Kim, and R. Huber. 1993. Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci.* **2**:448-58.
- Wier W. G. and D. T. Yue. 1986. Intracellular calcium transients underlying the short-term force-interval relationship in ferret ventricular myocardium. *J Physiol.* **376**:507-30.
- Wolf, B. A., J. R. Colca, J. Turk, J. Florholmen, and M. L. McDaniel. 1988. Regulation of Ca²⁺ homeostasis by islet endoplasmic reticulum and its role in insulin secretion. *Am J Physiol.* **254**:E121-36.
- Wolf, B. A., P. G. Comens, K. E. Ackermann, W. R. Sherman, and M. L. McDaniel. 1985. The digitonin-permeabilized pancreatic islet model. Effect of myo-inositol 1,4,5-trisphosphate on Ca²⁺ mobilization. *Biochem J.* **227**:965-9.
- Wollheim, C. B., T. J. Biden, P. D. Lew, and W. Schlegel. 1986. Calcium mobilization by inositol 1,4,5-trisphosphate during activation of islet, pituitary, and myeloid cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* **8**: S65-70.
- Wollheim, C. B., and G. W. Sharp. 1981. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev.* **61**:914-73.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences. *Gene.* **33**:103-19.

- Yoo, S. H., and M. S. Lewis. 1994. pH-dependent interaction of an intraluminal loop of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor with chromogranin a. *FEBS Lett.* **341**:28-32.
- Zaks, W. J., and C. E. Creutz. 1991. Ca²⁺-dependent annexin self-association on membrane surfaces. *Biochemistry.* **30**:9607-15.
- Zawalich, W., K. Zawalich, and H. Rasmussen. 1984. Insulin secretion: combined tolbutamide, forskolin and TPA mimic action of glucose. *Cell Calcium.* **5**:551-8.
- Zawalich, W. S., M. Bonnet-Eymard, and K. C. Zawalich. 1997. Signal transduction in pancreatic beta-cells: Regulation of insulin secretion by information flow in the phospholipase C/Protein kinase C pathway. *Front Biosci.* **2**:d160-72.
- Zhang-Keck, Z. Y., M. Srivastava, C. A. Kozak, H. Caohuy, A. Shirvan, A. L. Burns, and H. B. Pollard. 1994. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse synexin gene. *Biochem J.* **301**:835-45.

Lebenslauf

Name	Claudia Herr
Geburtsdatum	05.02.1969
Geburtsort	Wuppertal
Schulbildung	
1975-1979	Grundschule Reichsgrafenstraße, Wuppertal
1979-1989	Carl-Duisberg-Gymnasium, Wuppertal
05.1989	Abitur
Berufsausbildung	
01.1990-12.1991	Staatl. Lehranstalt für med.-tech. Assistenten, Wuppertal staatl. Examen für MTA (Labor)
Studium	
10.1991-12.1995	Biologie (Diplom), Ruhr-Universität Bochum 09/93 Diplom-Vorprüfung 12/95 Diplom-Hauptprüfung
02.1996-02.1997	Diplomarbeit an der Gesamthochschule-Universität Wuppertal Lehrstuhl für Chem. Mikrobiologie, Prof. W. Piepersberg Thema: "Versuche zur Expression und Funktionszuordnung der Amidino-transferase-Gene <i>strB1</i> und <i>strB2</i> sowie der postulierten Phosphotransferase-Gene <i>strN</i> und <i>stsE</i> aus <i>Streptomyces griseus</i> N2-3-11"
Promotionsstudium	
05.1997-12.2000	Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln Betreuerin: Frau Prof. Dr. A. A. Noegel Thema: "Untersuchung zur <i>in vivo</i> Funktion von Annexin VII Etablierung einer transgenen Mauslinie"