

Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

**Generierung eines konditionalen Dimethylarginin-
Dimethylaminohydrolase-2-Knockout-Vektors**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

AREZOO ESLAMI AMIRABADI
aus Teheran

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 14.12.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer H. Böger

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Irmgard Hermans-Borgmeyer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Stephan Baldus

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Herzkreislauferkrankungen	1
1.2.	Endothelfunktion	1
1.3.	NO-Stoffwechsel	1
1.4.	Hemmung der NO-Synthese	3
1.5.	ADMA-Entstehung/Bildung	4
1.6.	ADMA-Stoffwechsel und Ausscheidung	5
1.7.	Die Rolle der DDAH	6
1.7.1.	Die Entdeckung der DDAH und ihre Verteilung in den unterschiedlichen Gewebe	6
1.7.2.	Chromosomale Lokalisation	7
1.7.3.	Lokalisation, Struktur und Katalyse des Proteins DDAH	7
1.7.4.	Bestimmung der DDAH-Aktivität	8
1.7.5.	Regulation der DDAH-1	8
1.7.6.	Regulation der DDAH-2	8
1.7.7.	Ursachen einer ADMA-Plasma-Erhöhung und die mögliche Therapie	9
1.8.	Knockout-Mäuse	10
1.9.	Theoretische Prinzip für den konditionalen K.O.	11
1.10.	Hypothese/Ziel	15
2.	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1.	Material	16
2.1.1.	Chemikalien und Enzyme	16
2.1.2.	Materialien für die Bakterienkultur	19
2.1.3.	Zellkulturmedien	20
2.1.4.	Chemikalien der Zellkultur	20
2.1.5.	Puffer und Lösungen	21
2.1.6.	Kits	23
2.1.7.	Geräte	23
2.1.8.	Zelllinien	24
2.1.9.	Programme	25
2.1.10.	Genehmigung für Tierversuche	25
2.2.	Methoden	25
2.2.1.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	25
2.2.2.	DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen	25
2.2.3.	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.4.	DNA-Gelextraktion/ Aufreinigung von DNA-Fragmenten	26
2.2.5.	Bestimmung der DNA-Konzentration mit Hilfe des UV-Spektrophotometer	27
2.2.6.	Linker-Herstellung	27
2.2.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.2.8.	Transformation	27
2.2.9.	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab	28
2.2.10.	DNA-Fällung mit Natrium Acetat	28

2.2.11.	Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.12.	Anlegen einer „Freezing Culture“	29
2.2.13.	Sequenzierung von DNA	30
2.2.14.	Überprüfung der Funktionalität der <i>loxP sites</i>	31
2.2.15.	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	31
2.2.16.	Verwendete und hergestellte Vektoren	32
2.2.17.	Zellkultur	32
2.2.17.1.	Kultur muriner, embryonaler Feederzellen (MEF)	32
2.2.17.2.	Kultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	33
2.2.17.3.	Elektroporation	34
2.2.18.	Aufbereitung der 5' bzw. 3'Sonde	36
2.2.19.	Southern Blot	37
2.2.20.	Injektion von ES-Zellen in Blastozysten	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1.	Design des Targeting-Vektors	40
3.2.	Kontrolle bereits vorliegender Vektorbestandteile	41
3.2.1.	Verifikation des 3'Arm-Vektors	41
3.2.2.	Verifikation des 5'Arm-Vektors	42
3.3.	Identifikation einer geeigneten Restriktionsschnittstelle für das Einbringen der <i>loxP site</i>	43
3.4.	Identifikation von Restriktionsenzymen für eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle im neuen Insert	48
3.5.	Design des neuen <i>loxP</i> -Inserts und Ligation in den 5'Arm	49
3.6.	In „silico“-Bestätigung der Vektorsequenzen	52
3.7.	Konstruktion des Targeting-Vektors	53
3.8.	Verifikation des Targeting-Vektors	54
3.9.	Überprüfung der Funktionalität der <i>loxP</i> -Sequenzen	56
3.10.	Homologe Rekombination in ES-Zellen	57
3.11.	Detektion der homologen Rekombination	58
3.12.	DDAH-2 Genotypisierungs-PCR	60
4.	DISKUSSION	63
4.1.	Auswahl eines geeigneten K.O.-Verfahrens und -Modells für die Generierung eines DDAH-2-K.O.	63
4.1.1.	<i>Gene Trap</i> versus Vektor basierter K.O.	64
4.1.2.	Konventionell K.O. versus konditional K.O.	65
4.1.3.	Eigenständiges Klonieren versus fertige Sequenz	66
4.1.4.	Bezug zu den experimentellen Ergebnissen	67
4.2.	Auswahl des K.O.-Zieles	67

4.3.	Alternativen zum K.O.-Verfahren	67
4.3.1.	Spezifische Inhibitoren	67
4.3.2.	Short/Small interfering (si) RNA und micro (mi)RNA	68
4.3.3.	K.O.-Verfahren versus Alternativen	69
4.4.	Erwarteter Phänotyp	70
4.4.1.	Rückschlüsse aus den Studien zur DDAH-Überexpression	70
4.4.2.	Beispiele für eine DDAH-Defizienz	72
4.4.3.	Der NOS-K.O. als Modell für den erwarteten Phänotyp des DDAH-K.O.	73
4.5.	Ausblick	75
4.5.1.	Messung der DDAH-Aktivität und NO-Aktivität	75
4.5.2.	Gewebsspezifische Untersuchung und therapeutische Konsequenz	75
4.5.3.	Fertilität und Langzeitüberleben	75
4.5.4.	NO-Expressionsmuster und Genpolymorphismen	76
4.5.5.	DDAH-K.O. in etablierten Mausmodellen	76
4.5.6.	DDAH und Tumorwachstum	76
4.5.7.	DDAH-1-K.O. und Doppel-K.O.	76
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN	79
7.	LITERATURVERZEICHNIS	81
8.	DANKSAGUNG	93
9.	LEBENS LAUF	94
10.	ERKLÄRUNG	95

1. Einleitung

1.1. Herz-Kreislaufkrankungen

Herz-Kreislaufkrankungen gehören in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter (Graham et al. 2007).

Aufgrund von atherosklerotisch verengten Herzkranzgefäßen und Thrombenbildung kommt es zu einer Mangeldurchblutung des Herzens, die zu einem Myokardinfarkt führen kann.

Mit zunehmendem Alter steigt die Häufigkeit der koronaren Herzkrankheit (KHK) stark an. Zu den Risikofaktoren, die diese Entwicklung unterstützen, gehören Bluthochdruck (Ceravolo et al. 2003), Hyperlipidämie (Berliner et al. 1995); v.a. hohe low density Lipoproteine (LDL, Witztum und Steinberg 1991), Nikotinkonsum (Weintraub et al. 1985), entzündliche Prozesse (Ross 1986, Ross 1999), Diabetes und Übergewicht (Mokdad et al. 2003). Bei vielen Patienten schreitet die Atherosklerose trotz maximaler medikamentöser Therapie voran, hier werden dringend alternative Therapieansätze benötigt. Um zu neuen Therapieansätzen zu gelangen, muss man allerdings erst einmal die zur Atherosklerose führenden Pathomechanismen besser verstehen (Revkin et al. 2007).

1.2. Endothelfunktion

Bei der Regulation des Gefäßtonus spielt das intakte Endothel eine wichtige Rolle (Furchgott und Zawadzki.1980). Es setzt diverse Substanzen, wie Endothelin, Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) frei. Eine Stimulation der Gefäßmuskelzell-Rezeptoren führt zu einer Vasokonstriktion, wobei die Stimulation von Endothel-Rezeptoren eine Vasodilatation zur Folge hat. Wenn ein Gleichgewicht zwischen vasodilatativen und vasokonstringierenden Substanzen besteht, kann eine Gefäß-Homeostase aufrechterhalten werden. Eine Endotheldysfunktion bezeichnet eine verminderte bzw. fehlende dilatative Antwort des Endothels auf einen ischämischen oder mechanischen Reiz und gilt als früher Indikator für eine Atherosklerose (Verma und Anderson. 2002).

Es wurde nachgewiesen, dass zahlreiche bekannte Risikofaktoren für Atherosklerose mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit am Endothel assoziiert sind (Böger et al. 1996). Die KHK geht mit einer gestörten Endothelfunktion einher.

1.3. NO-Stoffwechsel

Das von Furchgott entdeckte „Endothelium-derived relaxing factor“ wurde 1987 von Ignarro als NO identifiziert (Ignarro et al. 1987). NO ist ein Botenstoff mit einer kurzen Halbwertszeit, kann daher nicht gespeichert werden, sondern wird bei „Bedarf“ synthetisiert und diffundiert von den Endothelzellen durch die Zellwand zu den benachbarten Zellen. Dort aktiviert es die Guanylylzyklase (GC) (Förstermann et al. 1986). Das von der GC gebildete zyklische GMP dient als second messenger für zahlreiche Signaltransduktionskaskaden. Es senkt die Ca^{2+} -Freisetzung. Somit entspannt sich die glatte Muskelzelle, die Folge ist, dass sich das Gefäß erweitert.

NO wird von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) aus Arginin, einer Aminosäure, gebildet (Palmer et al. 1988, Schmidt et al. 1988) siehe Abbildung (Abb.) 1.

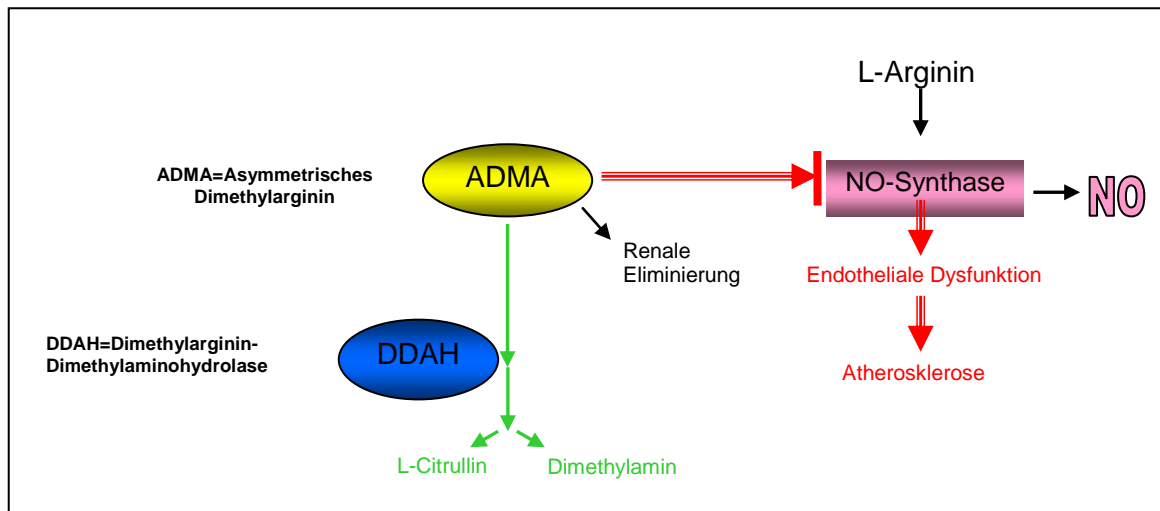


Abbildung 1: Schema der NO-Synthese und der inhibierende Faktor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA). L-Arginin dient als Ausgangssubstrat für die NO-Synthase (NOS) zur Synthese von NO. ADMA ist ein Inhibitor der NOS und führt zu endothelialer Dysfunktion mit der Folge von Atherosklerose. Es wird durch die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase zu L-Citrullin und Dimethylamin abgebaut.

Beim Menschen sind 3 wesentliche Isoformen der NOS beschrieben:

1. neuronale NOS (*nNOS*) in Nervenzellen,
2. induzierbare NOS (*iNOS*), die nach einer bestimmten Stimulierung durch z.B. Entzündungsmediatoren in Endothelzellen, Makrophagen und Herzmuskelzellen NO freisetzen und
3. endotheliale NOS (*eNOS*) in intakten Endothelzellen, also der Innenwand der Gefäße (Förstermann et al. 1993).

Die eNOS wird bei intaktem Endothel durch Acetylcholin (Furchgott und Zawadski.1980) und Bradykinin (Altura und Chand 1981), aber auch durch Scherkräfte (Malek et al. 1999) stimuliert/aktiviert.

Im Herzkreislaufsystem hat NO eine vasodilatierende Wirkung (Furchgott und Zawadski 1980, Förstermann et al. 1993) und moduliert den Blutfluss und den Blutdruck (Rees et. al. 1989). Zudem ist es noch an zahlreichen anderen Vorgängen im Herzkreislauf-System beteiligt (vgl. Abb. 2):

NO hemmt die Thrombozytenaggregation (Alheid et al. 1987). Diese antithrombotische Wirkung wird mit einer Erhöhung des intrazellulären cGMPs in Verbindung gebracht. Eine andere Wirkung, die auch cGMP vermittelt ist, besteht in der Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen (Garg und Hassid 1989). Zudem hemmt NO die Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel (Kubes et al. 1991). Auch Superoxidradikalbildung und Oxidation von LDL-Cholesterin werden ebenfalls durch NO vermindert (Rikitake et al 1998). Insgesamt wird NO deshalb auch als „endogenes anti-atherosklerotisches Molekül“ bezeichnet.

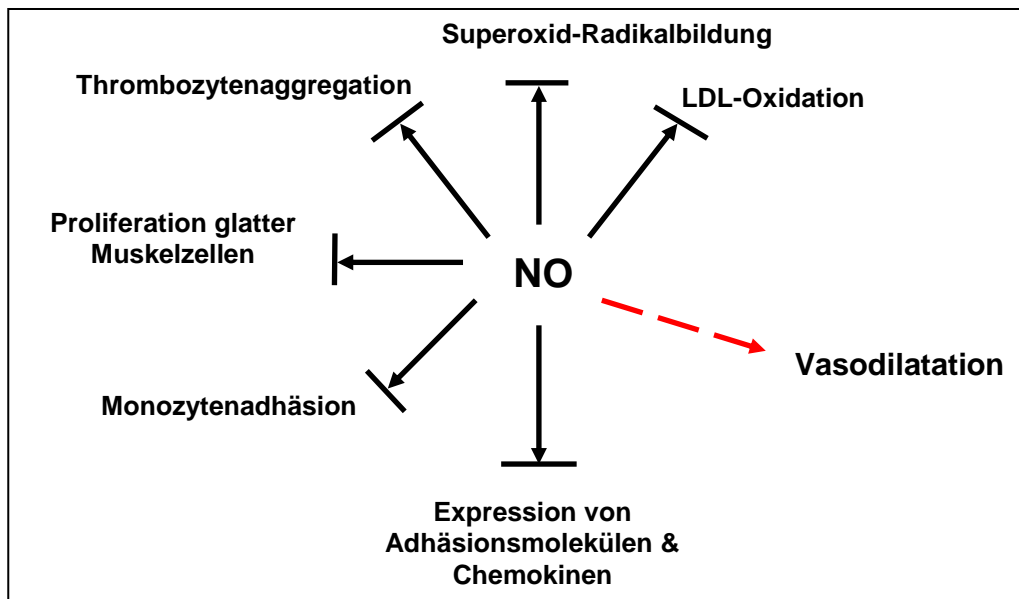


Abbildung 2: Schematische Darstellung der unterschiedlichen NO-Wirkungen. Die hemmenden Effekte sind mit einem Querbalken markiert. Die einzige nicht-inhibierende Wirkung (roter Pfeil) in diesem Schema ist die Vasodilatation (modifiziert nach Böger et al. 2003).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen aller drei Isoformen der NO-Synthese bei Mäusen zu einer schweren Atherosklerose und zu spontanen Myokardinfarkten führt (Nakata et al. 2008). Eine Störung der Synthese erhöht somit den Gefäßwiderstand. Die endotheliale Dysfunktion, die durch NO-Mangel mitverursacht wird, wird auch als frühes Stadium der Atherosklerose bezeichnet (Verma und Anderson 2002).

Durch die vielen verschiedenen Wirkungen, die NO ausübt, wird verständlich, dass es eine zentrale Rolle in der vaskulären Homöostase spielt.

Der Biosyntheseweg des NO ist somit mehr als 20 Jahre nach seiner Entdeckung immer noch eines der vielversprechendsten Ziele für therapeutische Interventionen.

1.4. Hemmung der NO-Synthese

Hibbs et al. stellten 1987 fest, dass zytotoxisch aktivierte Makrophagen, die zur Bildung von L-Citrullin und Nitriten in der Lage sind, von N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) gehemmt werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von L-NMMA dosisabhängig den Blutdruck bei Hasen erhöht und dass dieser Effekt durch die Infusion von L-Arginin (auch dosisabhängig) rückgängig gemacht werden kann (Rees et al. 1989).

1992 entdeckte die Arbeitsgruppe von Vallance in Zusammenhang mit chronischem Nierenversagen, dass durch die verminderte renale Eliminierung bei Patienten, die Plasma-Konzentration des endogenen asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA) steigt (Vallance et al. 1992) und, dass ADMA und L-NMMA kompetitive Inhibitoren der NOS sind. Sie konkurrieren mit dem Substrat L-Arginin. Für symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) ist nicht bekannt, dass es die NOS kompetitiv hemmt (Vallance et al 1992, Böger und Zoccali. 2003, Anthony et al. 2005).

In vivo schreibt man die hemmende Wirkung auf die NO-Synthese zum größten Teil ADMA zu, weil es in deutlich höheren Plasma-Konzentrationen als L-NMMA zu finden ist (Vallance et al 1992).

Zusammen mit SDMA, das biologisch weitgehend inaktiv ist, bilden L-NMMA und ADMA, ein Trio aus Guanidin-substituierten Arginin-Analoga (Anthony et al. 2005). Sie sind chemisch nahe Verwandte des L-Arginins (vgl. Abb. 3).

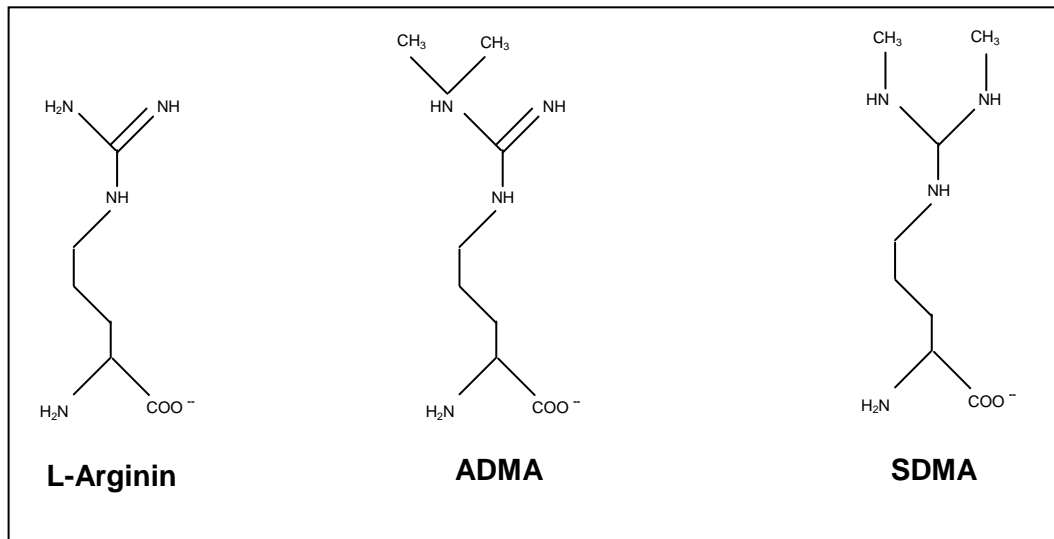


Abbildung 3: Strukturformeln von L-Arginin, asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA). L-Arginin stellt das natürliche Substrat der NOS dar, wohingegen ADMA ein kompetitiver Inhibitor ist. SDMA ist biologisch inaktiv (vgl. Anthony et al. 2005).

1.5. ADMA-Entstehung/Bildung

Kakimoto und Akazawa isolierten und identifizierten 1970 erstmals N^G-Methylarginin, N^G, N^G-Dimethylarginin (=ADMA) and N^G, N^G-Dimethylarginin (=SDMA) aus menschlichem Urin.

Durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs, Paik und Kim 1968), werden L-Argininreste in Proteinen methyliert und es entstehen ADMA und SDMA, gebunden an Proteinen (vgl. Abb. 4). Als Methylendonator fungiert S-Adenosylmethionin. Bisher wurden in Säugetieren über 7 verschiedene PRMTs beschrieben. Typ I katalysiert die Bildung von L-NMMA und ADMA und Typ II die Bildung von L-NMMA und SDMA. Durch proteolytische Spaltung der Proteine werden dann jeweils ADMA und SDMA frei (Anthony et al. 2005).

Die Methylierung kann durch Methionin oder Homocystein gesteigert und durch Hemmer der PRMT (S-adenosylhomocystein, Adenosindialdehyd oder Cycloleucin) gehemmt werden. Diese Regulierung ließ sich nur für ADMA, jedoch nicht für SDMA beobachten. Außerdem wird bei Anwesenheit von LDL die PRMT-Expression gesteigert, was eine Erklärung dafür wäre, dass erhöhte ADMA-Plasmakonzentrationen bei Hypercholesterinämie beschrieben wurden (Böger et al. 2000). Wahrscheinlich gibt es ein gemeinsames Y⁺ Transportsystem, durch das L-NMMA, ADMA und SDMA aus (und in) die Zellen ausgeschleust werden kann. Diese gehören zur Familie der kationischen Aminosäure-Transporter (Bogle et al. 1995). Obwohl SDMA keine intrinsische Aktivität auf die NOS hat, kann es trotzdem mit ADMA um die Aufnahme mittels Transporter konkurrieren. Es wurde sogar beobachtet, dass intrazelluläres L-

Arginin mit SDMA ausgetauscht wurde. So könnte SDMA einen indirekt inhibitorischen Effekt auf die NOS ausüben (Closs et al.1997).

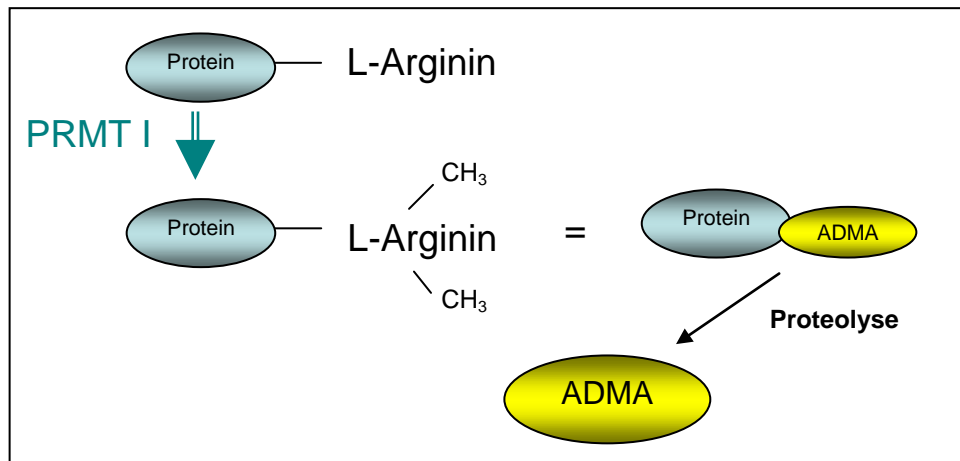


Abbildung 4: Schema der ADMA-Bildung durch Proteinmethyltransferasen (PRMT). L-Argininreste werden durch PRMTs methyliert. Das dabei entstehende ADMA ist zunächst am Protein gebunden. Nach proteolytischer Spaltung wird ADMA frei (modifiziert nach Böger und Zoccali 2003).

Erhöhte Plasma-Konzentrationen von ADMA sind als unabhängiger Risikomarker mit einem gesteigertem Risiko für Tod (Zoccali et al. 2001) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Lu et al. 2003, Schnabel et al. 2005, Valkonen et al. 2001) assoziiert. In klinischen Studien hat sich gezeigt, dass sich erhöhte ADMA-Plasma-Konzentrationen bei Patienten mit Nierenversagen (Vallance et al. 1992, Kielstein et al. 1999), bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Valkonen et al. 2001), linksventrikulärer Hypertrophie bei Hämodialyse-Patienten (Zoccali et al. 2002), bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (Böger et al. 1997), Herzinsuffizienz (Kielstein et al. 2003 a), Insulinresistenz (Stühlinger et al. 2002) bzw. Typ 2 Diabetes mellitus (Abbasi et al. 2001), nach cerebrovaskulärem Ereignis (Yoo und Lee 2001) bei Personen mit Hypercholesterinämie (Böger et al. 1998), erhöhtem low density Lipoprotein (LDL) (Ito et al. 1999), Hyperhomocysteinämie (Stühlinger et al. 2001) und Bluthochdruck (Kielstein et al. 2003 b) finden lassen.

Miyazaki et al. stellten 1999 in ihrer Studie bei asymptomatischen Patienten fest, dass es eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten ADMA-Plasma-Konzentrationen und einigen Risikofaktoren für Atherosklerose, wie Alter, Hypertension, Diabetes und sogar einen positiven Zusammenhang zur Intima-Media-Dicke der A. carotis communis gibt.

1.6. ADMA-Stoffwechsel und Ausscheidung

Abbildung 5 zeigt schematisch den ADMA-Stoffwechsel. ADMA kann über die Niere ausgeschieden werden (McDermott. 1976), aber der größte Teil wird mit Hilfe des Enzyms Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) zu Citrullin und Dimethylamin hydrolysiert (Ogawa et al. 1989, Kimoto et al. 1995, MacAllister et al. 1996, Achan et al. 2003).

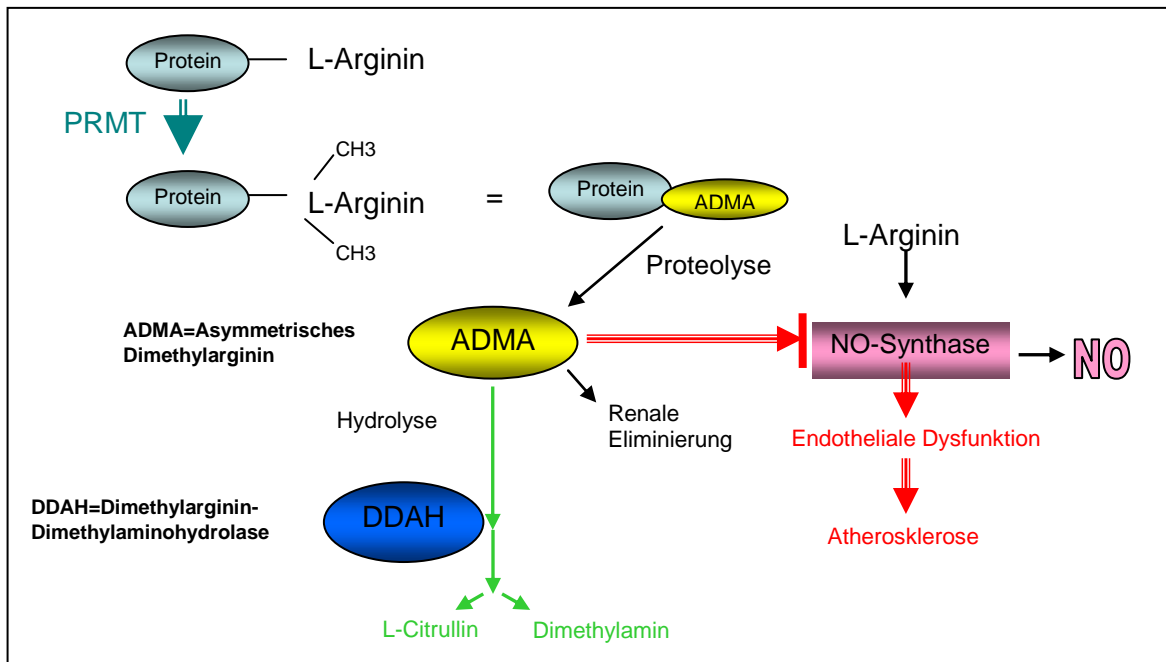


Abbildung 5: Schema des L-Arginin-Stoffwechsels und der NO-Synthese. L-Arginin ist das Ausgangssubstrat für die NO-Synthese. Die NOS (NO-Synthase) ist der Katalysator dieser Reaktion. L-Arginin wird durch Proteinmethyltransferasen (PRMT) methyliert. Bei folgender Proteolyse wird asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) frei, das wiederum die NOS inhibiert. Dies kann zu endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose führen. ADMA wird durch Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) zu L-Citrullin und Dimethylamin abgebaut oder direkt renal eliminiert (modifiziert nach Böger und Zoccali 2003).

Neuere Experimente bestätigen, dass auch die Leber eine große Rolle im ADMA-Stoffwechsel spielt und ihre Konzentration aus dem systemischen Kreislauf mitbeeinflusst (vgl. auch Abb. 6)

Somit stellt die DDAH eine Art Schlüsselenzym im ADMA-Stoffwechsel dar, das indirekt die NOS-Aktivität mitreguliert.

1.7. Die Rolle der DDAH

1.7.1. Die Entdeckung der DDAH und ihre Verteilung in den unterschiedlichen Gewebe

Ogawa et al. beschrieben 1987 als erste ein Enzym, das ADMA abbaut und seine maximale Aktivität bei einem pH von 6,5 und 55°C hat. (Ogawa et al. 1987, Ogawa et al. 1989). Bisher sind bei Mensch und Maus zwei Isoformen der DDAH beschrieben worden (Leiper et al. 1999). DDAH-1 findet sich überwiegend dort, wo auch die neuronale NO-Synthase exprimiert wird (Gehirn), aber auch in der Niere und der Leber (Nijveldt et al. 2003). DDAH-2 hingegen dominiert hauptsächlich in Geweben, die die endotheliale NO-Synthase exprimieren, so z.B. in den Gefäßen, der Plazenta und der Leber. Ein gewisser Anteil an DDAH-2 wird auch in der Milz, im Thymus, in peripheren Leukozyten, Lymphknoten und im Knochenmark exprimiert (Tran et al. 2000) Allerdings sind meist beide Isoformen in unterschiedlichen Anteilen exprimiert (vgl. Abb. 6).

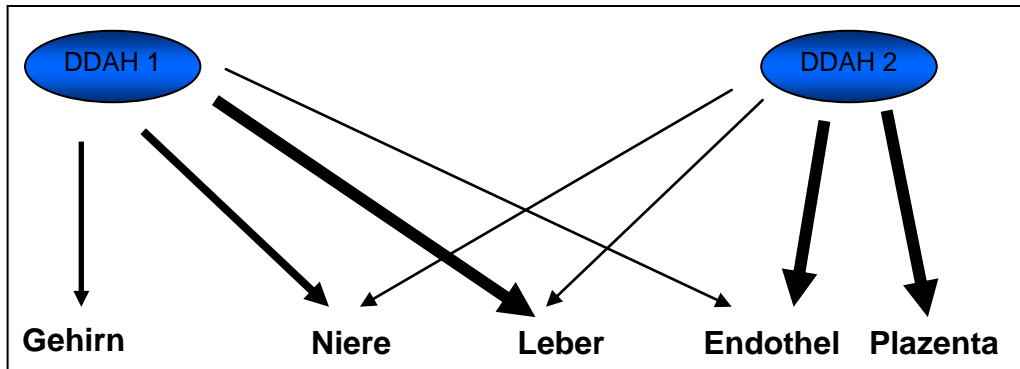


Abbildung 6: Übersicht über die Verteilung der beiden Isoformen der DDAH. DDAH-1 ist vorwiegend im Gehirn, in der Niere und in der Leber vorhanden, wohingegen DDAH-2 in Geweben zu finden ist, in denen die endotheliale NOS exprimiert wird. Aus der Abbildung wird auch ersichtlich, dass beide Isoformen in den unterschiedlichen Geweben zu unterschiedlichen Anteilen vorzufinden sind, nur mit einer jeweiligen Mehrheit für das spezifische Enzym.

1.7.2. Chromosomale Lokalisation

Die pathophysiologische Bedeutung der beiden Isoformen der DDAH *in vivo* ist aus dem obigen Grund kaum isoliert zu untersuchen, da ein geeignetes Tiermodell fehlt bzw. Zelllinien fehlen, die jeweils nur eine der beiden Isoformen exprimieren. Von Bedeutung ist hier, dass die Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind; DDAH-1 auf Chromosom 1p22 und DDAH-2 auf Chromosom 6p21.3. Der hohe Grad an Konservierung der DDAHs durch die Evolution könnte die Vermutung nahe legen, dass sie eine essentielle biologische Rolle haben (Tran et al. 2000). Frey et al. stellten sogar fest, dass Mäuse, Rinder und menschliche DDAH-1 eine 92%ige Übereinstimmung zeigen, während die DDAH-2 sogar eine 95%ige Übereinstimmung aufweist (Frey et al. 2006).

1.7.3. Lokalisation, Struktur und Katalyse des Proteins DDAH

Die intrazelluläre Lokalisation der beiden DDAH-Isoformen wurde 2000 durch konfokale Immunofluoreszenz von Birdsey et al. bestimmt.

Knipp et al. berichteten 2001, dass die DDAH-1 im Rinderhirn ein Zink-erhaltenes-Protein ist. Das Zink ist zwar nicht an der katalytischen Reaktion beteiligt, aber man geht von einer stabilisierenden Funktion aus. Sie konnten zeigen, dass endogen gebundenes Zink das Enzym hemmen kann. Verschiedene Verbindungen wie Phosphate und Imidazole können das Enzym durch die „Befreiung“ von Zink aktivieren und somit auch eine regulatorische Rolle für diesen Bereich der DDAH-1 spielen.

Murray-Rust et al. zeigten 2001, dass nur ADMA und L-NMMA Substrate der DDAH sind, nicht aber SDMA. DDAH katalysiert eine Reaktion, bei der Guanidin-Gruppen des Arginins im ADMA auf ein Substrat übertragen werden. Dabei spielt ein nukleophiler Angriff des Cysteinrestes auf dem Substrat eine Rolle. Bei den Resten, die direkt an dem katalytischen Mechanismus involviert sind, handelt es sich bei DDAH-1 um Cys 273, Asp 126, His 172 und bei DDAH-2 um Cys 276, Asp 125 und His 171 (Frey et al. 2006).

1.7.4. Bestimmung der DDAH-Aktivität

Wie in 1.6. schon beschrieben hydrolysiert DDAH ADMA oder L-NMMA zu L-Citrullin und Dimethylamin oder Monomethylamin. Die Bestimmung der DDAH-Aktivität basiert auf dem Nachweis des ADMA-Abbaus bzw. auf dem Nachweis der Produkte (Knipp und Vasák 2000, Maas et al. 2007). Einige Verbindungen wie p-Chlormercuribenzoate, HgCl_2 , sowie einige zweiwertige Kationen wie Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} haben einen inhibitorischen Effekt auf die DDAH (Ogawa et al. 1989). Diese Verbindungen können aber kaum zu Untersuchungen der DDAH genutzt werden, da sie viel zu unspezifisch sind und noch zahlreiche andere Enzyme beeinflussen. Fast alle Beobachtungen wurden *in vitro* durchgeführt. Es bleibt noch zu untersuchen, ob diese Effekte auf die DDAH-Aktivität *in vivo* übertragbar sind. Allgemein kann man sagen, dass hemmende Stimuli von oxidativem Stress begleitet sind, während aktivierende Stimuli eher antioxidativ wirken.

Insgesamt besteht eine differenzierte Regulation der beiden DDAH-Isoformen, die aber erst im Ansatz verstanden ist (Palm et al. 2007).

1.7.5. Regulation der DDAH-1

Ein Beispiel für eine Erhöhung der DDAH-1-Expression ist Interleukin-1 β . Man glaubt, dass die NO-Synthese hiermit auf zwei Wege gesteigert wird. Zum einen durch eine direkte Stimulation der iNOS, zum anderen indirekt durch Hochregulation der DDAH-1 und somit der Reduzierung von ADMA. Diese Wirkung kann durch 4124W (S-2-Amino-4 (3-Methylguanidin) Butansäure) aufgehoben werden (Ueda et al. 2003).

Oxidiertes LDL und Tumor-Nekrose-Faktor α können die DDAH-Aktivität reduzieren, greifen jedoch nicht auf Expressions-Ebene ein (Ito et al. 1999). Auch Stühlinger et al. beobachteten 2001, dass die DDAH-Aktivität durch Homocystein reduziert werden kann.

Erwähnenswert ist auch die Beobachtung von Wang et al. 2006 bei der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen ADMA, L-Arginin und DDAH in Leberzellen (HepG2). Es besteht eine Dosis-abhängige Regulierung des ADMA-Stoffwechsels durch L-Arginin, indem beide um die DDAH-Bindung konkurrieren. Wohingegen L-Arginin eher mit reversiblen Reaktionen und Verbesserung der Endothelfunktion in Verbindung gebracht wird (siehe 1.7.8.)

1.7.6. Regulation der DDAH-2

In Streptozotozin induzierte diabetische Ratten-Modelle beobachteten Onozato et al. 2008 eine Erhöhung der renalen Angiotensin II und ADMA-Spiegel, die sich nach zwei Wochen Behandlung mit Telmisartan, einem AT1-Antagonisten, normalisierten. Zunächst war die DDAH-1-Expression in der diabetischen Niere erniedrigt, während die DDAH-2-Expression gesteigert war. Dieses wurde durch die Telmisartan-Behandlung umgekehrt mit dem zusätzlichen Effekt einer reduzierten Expression der PRMT-1 und -5 (*ex vivo*). Zudem konnten sie die Lokalisation der DDAH-Isoformen zeigen. DDAH-1 ist vorwiegend im proximalen Tubulus lokalisiert, während die DDAH-2 in den Glomeruli, den afferenten Arteriolen, der Macula densa und im distalen Tubulus zu finden ist.

In Experimenten konnte festgestellt werden, dass die Expression der DDAH-2 durch All-trans-Retinsäure (Achan et al. 2002) und Estradiol (Monsalve et al. 2007) gesteigert werden kann. Achan et al. zeigten, dass die Ratio ADMA/SDMA im Kulturmedium reduziert und die NO-Synthese in den Endothelzellen ohne gesteigerte eNOS-Expression erhöht werden konnte. All-trans-Retinsäure hat eine hemmende Wirkung auf zelluläre Proliferation, fördert die vaskuläre Differenzierung und verzögert die Entwicklung einer Atherosklerose. Monsalve et al. demonstrierten 2007, dass durch oxidiertes LDL induzierte Effekte auf den DDAH-ADMA-NO-Stoffwechselweg mittels Estradiol komplett umkehrbar waren.

Als Gegenspieler dieser Substanzen, also diejenigen, die die DDAH-2-Expression dämpfen sind Coupling factor (CF) 6 (Tanaka et al. 2006) und oxidativer Stress (Sorrenti et al. 2006) beschrieben worden. CF6 ist ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen ATP-Synthase, die die Phospholipase A₂ hemmt, die Generierung des oxidativen Stresses (reactive oxidativ species=ROS) steigert und eine Vasokonstriktion induziert.

1.7.7. Ursachen einer ADMA-Plasma-Erhöhung und die mögliche Therapie

Die Bildung von Superoxidradikalen durch gesteigerten oxidativen Stress, kann durch eine Hemmung der Enzymaktivitäten auch zu einer erhöhten ADMA-Plasma-Konzentration führen. Hierbei ist an eine gesteigerte Aktivität der PRMTs und einer verminderten DDAH-Aktivität zu denken (Sydow und Münzel 2003, Böger et al. 2000, vgl. Abb. 7).

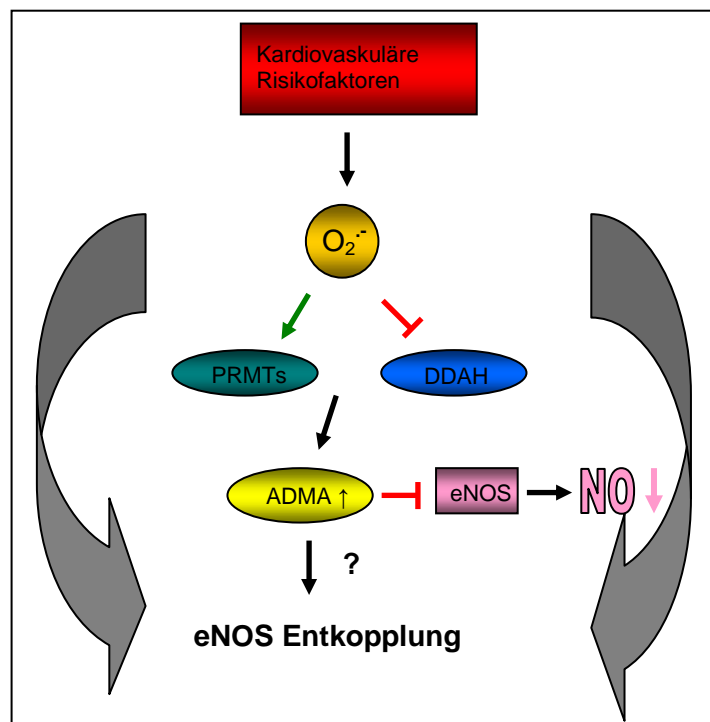


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mechanismen, die zu einer erhöhten ADMA-Bildung führen können. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie z.B. Hypercholesterinaämie, Hypertension, und Diabetes führen zu einer gesteigerten Superoxidradikal-Bildung. Dieses könnte durch die Hochregulation der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) oder einer Hemmung der DDAH-Aktivität zu einer gesteigerten ADMA-Konzentration führen. Als Folge ergibt sich eine verminderte NO-Synthese. Durch diesen Pfad, die Oxidation des Co-Faktors der BH₄ und die intrazellulär begrenzte L-Arginin-Verfügbarkeit könnte die eNOS ausgeschaltet werden und somit bei Patienten mit erhöhten kardiovaskulären Risikofaktoren zur endothelialen Dysfunktion führen (modifiziert nach Sydow und Münzel 2003).

Lin et al. 2002 zeigten im Tierexperiment, dass bei Diabetes mellitus Typ II die Aktivität der DDAH reduziert ist, jedoch nicht die Expression. Daraus folgten, wie zu erwarten war, auch erhöhte ADMA-Plasma-Konzentrationen (Lin et al 2002).

Interessanterweise beobachteten Weis et al. 2004, dass herztransplantierte Patienten, die sich mit dem Zytomegalie-Virus (ZMV) infizierten, höhere ADMA-Plasma-Konzentrationen aufwiesen. Der ZMV-induzierte gesteigerte oxidative Stress war mit einer Verminderung der DDAH-Aktivität und ADMA-Akkumulation assoziiert.

Dass die ADMA-Konzentration bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz erhöht ist, beobachteten schon Vallance et al 1992 und auch Kielstein et al. 1999. Dabei stellten sie zudem fest, dass die ADMA-Konzentration bei Hämodialyse-behandelten Patienten mit manifester Atherosklerose signifikant höher ist als die bei Hämodialyse-Patienten ohne Atherosklerose.

Durch Supplementierung von L-Arginin konnte die endothelabhängige Vasodilatation bei Hasen mit Hypercholesterinämie wieder verbessert werden (Cooke et al. 1991). Böger et. al konnten 2007 erstmals zeigen, dass die Gabe von L-Arginin bei Patienten mit Hypercholesterinämie bei Patienten mit einer erhöhten ADMA-Plasma-Konzentration zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führt.

Es gibt also verschiedene Möglichkeiten, die zu einer erhöhten ADMA-Plasma-Konzentration führen können, zum einen kann es eine Dysregulation der DDAH, eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz oder eine Steigerung der PRMT-Aktivität sein. Durch diese komplex ineinander greifenden Regulationsvorgänge wird deutlich, dass nur für die weitere Aufklärung des komplexen ADMA-L-Arginin-NO Stoffwechsels hochspezifische Inhibitoren der beteiligten Enzyme oder isoenzymspezifische Knockout-Mäuse benötigt werden.

1.8. Knockout-Mäuse

Definition von Knockout-Mäusen

Unter einer Knockout-Maus versteht man eine Maus, bei der durch genetische Manipulation gezielt ein oder mehrere Gene ausgeschaltet wurden. Diese Manipulation wird an embryonalen Stammzellen von Mäusen durchgeführt, die dann in die Keimbahn von einer Maus eingebracht werden. Durch diese genetisch veränderten Tiere können biologische Mechanismen genauer untersucht werden, sie können als Modelle für menschliche Erkrankungen oder pharmakologische Fragestellungen dienen.

Um die Funktion eines Gens zu erforschen wird es häufig experimentell inaktiviert und der daraus resultierende Phänotyp (Knockout=K.O.) analysiert. Es gibt verschiedene Wege transgene Tiere herzustellen:

1. Wenn DNA in den Vorkern befruchteter Oozyten injiziert wird, dann findet ein zufälliger Einbau des fremden genetischen Materials ins Genom statt. Mit Hilfe regulatorischer Sequenzen kann die Expressionsstärke und Gewebespezifität

im gewissen Umfang reguliert werden. Dieses Verfahren kann eingesetzt werden, um Tiere mit wirtschaftlich nutzbaren Vorteilen zu erzeugen (analoges Verfahren mit *Cre/loxP*-System (siehe unten) angewendet von Araki et al. 1995).

2. Gezielte Veränderungen der Wirts-DNA durch ein Transgen stellen weitere Möglichkeiten dar. Dabei kann ein Gen inaktiviert werden (Knockout), gegen ein anderes ausgetauscht werden oder durch gezieltes Manipulieren (Mutationen) das kodierte Protein in seinen Eigenschaften verändert werden. Hierbei wird es z.B. möglich Tiermodelle für humane Erkrankungen gezielt zu erzeugen, um die molekularen Defekte zu analysieren.

1.9. Theoretische Prinzip für den konditionalen K.O.

Seit ca. 1998 ist bekannt, dass die Cre (**c**auses **r**ecombination)-Rekombinase der P1-Bakteriophagen die Rekombination zwischen zwei *loxP* (locus of crossing over P1) *sites* in jeder Art von DNA katalysiert. *LoxP* ist eine 34 Basenpaare (bp) Konsensus-Sequenz mit acht bp, die das Mittelstück („core spacer sequence“) bilden und 13 palindromischen bp an jeder Seite des Mittelstücks (Nagy 2000, Babinet 2000).

Auf diese Weise wird es möglich, funktionelle DNA-Teile in das Mausgenom hinzuzufügen und mit Hilfe von embryonalen Stammzellen (ES) und homologer Rekombination kann man jedes mögliche Gen, das von *loxP sites* flankiert ist, aus dem Genom „ausknocken“ (Sauer 1998).

Der molekulare Mechanismus der Rekombination erklärt sich so, dass ein einzelnes Rekombinase-Molekül an die beiden pallindromischen Hälften einer *loxP site* bindet, es zu einer Tetramer-Bildung und Schlaufenbildung kommt, die zwei *loxP sites* zusammenbringt (Voziyanov et al. 1999).

Die Rekombination erfolgt in der so genannten „spacer area“ der *loxP site*. Die erzielten Ergebnisse, die durch die *Cre*-Rekombinase erzielt werden, hängen von der Lokalisation und der Orientierung der *loxP site* ab. Je nach dem, ob beide die gleiche Orientierung aufweisen (=Ausschneiden) oder in entgegengesetzter Orientierung (=Invertieren) sind, werden die Abschnitte anders behandelt (vgl. Abb. 8).

Die Rekombination ist auch notwendig für die Aktivierung der Expression eines positiven Selektionsmarkers.

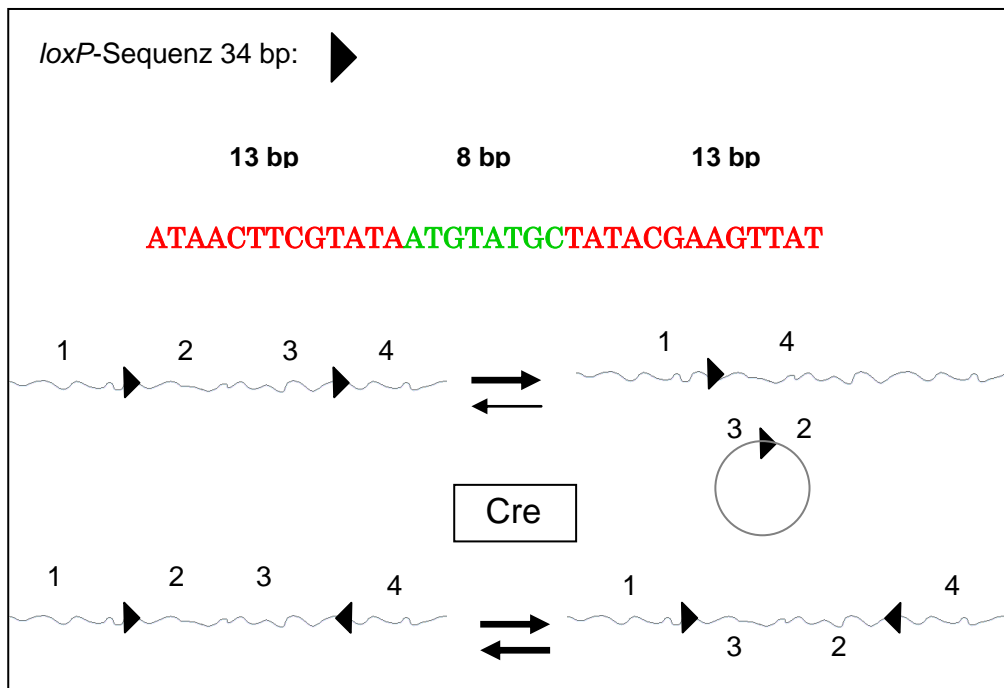


Abbildung 8: Schema des *Cre/loxP*-Systems. Ein Dreieck steht für eine *loxP* site. Diese besteht aus einer 34 Basenpaare (bp) Konsensus-Sequenz mit acht bp (grün), die das Mittelstück („core spacer sequence“) und 13 palindromischen bp an jeder Seite des Mittelstücks (rot). Die mit *loxP* begrenzten Areale können mit Hilfe der *Cre*-Rekombinase entweder „herausgeschnitten“ oder invertiert werden. Diese Reaktion ist abhängig von der Orientierung der *loxP*s (vgl. Dreieck-Richtungen). Wenn beide die gleiche Richtung aufweisen, kommt es zu einer Deletion (ausgeschnittener Kreis mit 2,3 und dem Dreieck), wenn sie entgegengesetzt sind, kommt es zu einer Invertierung (Reihenfolge 1,2,3,4 wird zu 1,3,2,4).

Konditionaler Knockout

Für die Herstellung einer konditionalen Knockout-Maus ist der erste Schritt, wie auch bei einem gewöhnlichen Knockout (K.O.), die Erzeugung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), in denen das Ziel-Gen inaktiviert ist (Nagy 2000). Hierfür verwendet man embryonale Stammzellen aus Maus-Blastozysten und transfiziert diese durch Elektroporation mit dem Targeting-Vektor. Dieser Vektor beinhaltet isogene DNA (DNA aus demselben Mausstamm wie die verwendeten ES-Zellen) mit zwei zum Ziel-Gen homologen Sequenzbereichen, (vgl. 3'Arm und 5'Arm im Ergebnis-Teil). Sie flankieren zusammen mit den eingebrachten *loxP* sites die sogenannte Neomycinresistenz-Kassette (Neo-Gen), die für eine Antibiotikaresistenz kodiert und somit einen positiven Selektionsmarker darstellt (Thomas und Capecchi 1987). Wenn der Vektor nicht in die genomische DNA der ES-Zellen eingebaut wird, sterben die Zellen in G418 haltigem Selektionsmedium ab, weil sie das Neo-Gen, was die G-418-Resistenz vermittelt, nicht exprimieren können. Diese sogenannte „Positiv-Selektion“ sagt aus, dass nur die Zellen, die das Neo-Gen exprimieren überleben.

Homologe Bereiche sollten auf der einen Seite ca. 0,5-2 kbp und auf der anderen Seite ca. 5-8 kbp groß sein. Außerdem befindet sich ein negativer Selektionsmarker, die Diphtherietoxin-Kassette (DT-Kassette) in dem Targeting-Vektor. Bei einem zufälligen Einbau des Targeting-Vektors werden außer dem Neo-Gen und die beiden homologen Bereiche auch noch die DT-Kassette in die

DNA eingebaut. Da diese Zellen das Neo-Gen exprimieren, würden sie in G-418 haltigem Medium überleben können. Bei Expression des Diphtherietoxin As würden aber diese Zellen absterben. Diese sogenannte „Negativ-Selektion“ beschreibt also die Tatsache, dass Zellen, die Diphtherietoxin exprimieren absterben.

In seltenen Fällen kommt es aber zu einem gezielten Austausch durch homologe Rekombination. Dabei ist das Neo-Gen im Ziel-Gen eingefügt. Die DT-Kassette wird hierbei jedoch nicht integriert, so dass nach Positiv- und Negativ-Selektion nur die richtigen Zellen als einzige überleben (Thomas und Capecchi 1986, Thomas und Capecchi 1987). Klone dieser gezielt veränderten ES-Zellen können dann angezchtet werden und durch PCR und Southern Blot auf molekularer Ebene analysiert werden. Für die Herstellung einer transgenen Maus werden diese transgenen ES-Zellen in Blastozysten injiziert, die dann in eine scheinchwangere Maus implantiert werden können (siehe Abb. 9).

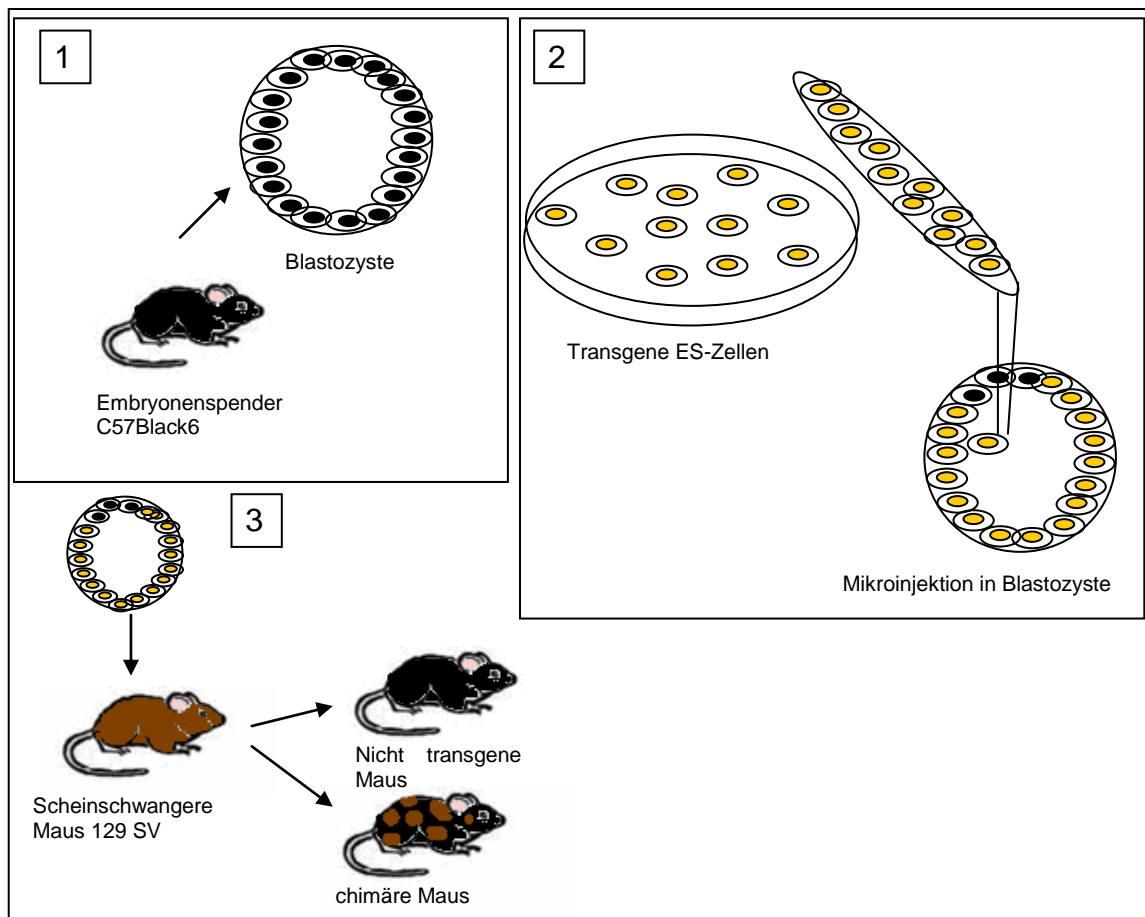


Abbildung 9: Darstellung der Arbeitsfolge zur Herstellung chimärer Tiere. Blastozystenentnahme von C57Black6-Mäusen ist im 1. Kasten dargestellt. Die ES-Zellen, die nach der Elektroporation transgen sind und überprüft worden sind, werden in die Blastozyste injiziert (2). Diese wird dann in eine scheinchwangere Maus implantiert. Die Nachkommen sind an der Fellfarbe zu erkennen; chimär oder nicht transgen.

Diese „geflochte“ Maus enthält ein vollständig intaktes Ziel-Gen, solange kein Cre-Enzym exprimiert wird. Eine normale Maus enthält diese nicht und somit besteht nicht die Gefahr, dass das Ziel-Gen vorzeitig verändert werden kann. Die chimären Tiere müssen nun miteinander gekreuzt werden, um homozygot

transgene Tiere zu erhalten. Die Idee ist nun, dass das Cre-Enzym in eine zweite transgene Maus eingebracht wird. Dabei kann man gewebsspezifische Promotor-Elemente mit einbeziehen. Nun können die homozygot „gefloxten“ und die homozygoten Cre-Mäuse miteinander gekreuzt werden. Die daraus entstehende Generation besitzt dann die aktive Rekombinase mit den *loxP sites*, die das Ziel-Gen und das Neo-Gen flankieren. Somit kann das Ziel-Gen im Nachhinein deletiert werden, also inaktiviert werden (siehe Abb. 10). Um eine gewisse Steuerbarkeit zu gewährleisten, können induzierbare oder gewebsspezifische Promotor-Elemente eingesetzt werden.

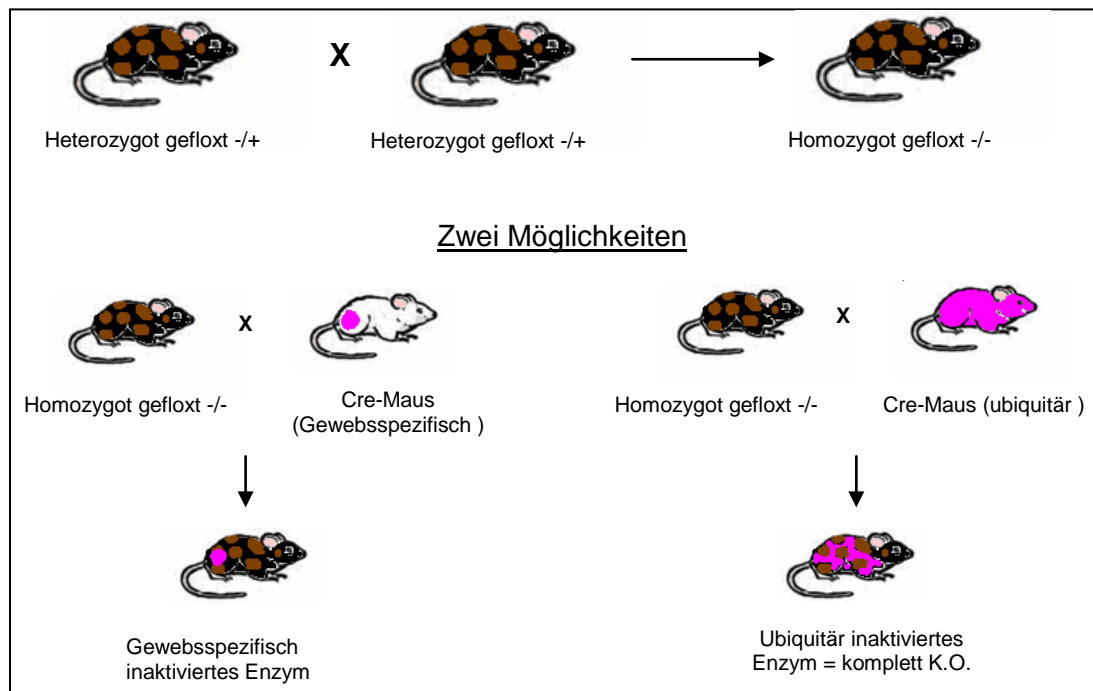


Abbildung 10: Darstellung der Verpaarungsstrategie „gefloxter“ Mäuse und Cre-Mäuse. Heterozygot „geflochte“ Mäuse müssen miteinander gekreuzt werden, so dass homozygot geflochte entstehen, entsprechend den Mendelschen Regeln 1:2:1 (nicht alle dargestellt). Anschließend gibt es zwei Möglichkeiten, um das gewünschte Enzym (DDAH-2) zu inaktivieren. Man verpaart die homozygot „gefloxten“ Tiere mit Cre-Mäusen, die gewebsspezifisch sind (linke Hälfte der Darstellung) und erhält gewebsspezifisch inaktivierte Mäuse oder mit Cre-Mäusen, die Cre ubiquitär exprimieren (rechte Hälfte der Darstellung) und erhält komplett K.O.-Tiere.

Eine andere Idee ist, ein Fusionsprotein aus Cre und Steroidhormonrezeptor-Liganden-Bindungsdomäne (LBD) herzustellen, so dass in Abwesenheit von Hormonen die Rekombinase nicht aktiv ist und erst durch Hormone aktiviert werden kann (Metzger et al 1995 (Östrogen-Rezeptor-LBD)). Die LBD-Fusionsproteine sind in Abwesenheit von Liganden an Hitzeschock-Proteine im Zytoplasma gebunden und werden erst nach entsprechender Ligandenbindung von diesem hemmenden Komplex befreit. Damit eine Kreuzreaktion mit endogenen Hormonen vermieden wird, muss die Hormon-Bindungsstelle so abgeändert werden, dass nur noch synthetische Hormone, die von Außen appliziert werden zu einer Aktivierung der Cre-Rekombinase führen (Feil et al. 1996 (mutierte Östrogen-LBD)). Abbildung 11 zeigt das Schema eines Cre-Fusionproteins und seiner Induzierbarkeit.

Die induzierbare Änderung der Genexpression ist ein sehr wichtiges Werkzeug, um Genfunktionen *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Außerdem ermöglicht sie

nicht nur die örtlich (verschiedene Gewebe), sondern auch eine zeitlich spezifische *Cre*-Aktivierung.

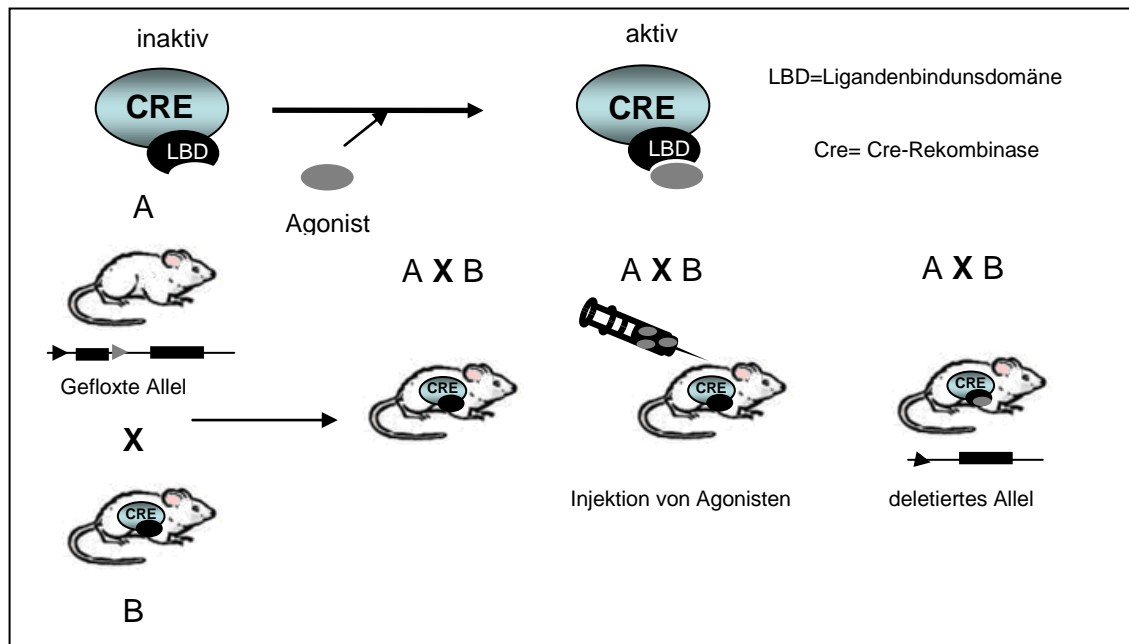


Abbildung 11: Schema eines *Cre*-Fusionproteins und seiner Induzierbarkeit. Notwendig sind eine „geflochte“ Maus, also eine Maus, in dem ein bestimmtes Gen mit *loxP sites* flankiert ist und eine weitere Maus, die *Cre* exprimiert. Die *Cre*-Rekombinase ist an eine Ligandenbindungsdomäne (LBD) gekoppelt. Die beiden transgenen Mäuse werden miteinander gekreuzt. Im ungebundenen Zustand der LBD ist die *Cre*-Rekombinase inaktiv und wird erst bei entsprechender Stimuluszugabe (z.B. Tamoxifen oder U 486) aktiviert. Nach der Injektion der Agonisten ist es also möglich das „geflochte“ Allel zu deletieren (modifiziert nach Babinet 2000).

1.10. Hypothese/Ziel

Die primäre Hypothese war, dass die DDAH-2 von fundamentaler physiologischer Bedeutung ist und eine Deletion des Gens zu einem kardiovaskulär geschädigtem Phänotyp führt und möglicherweise sogar letal ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen geeigneten konditionalen K.O.-Vektor für das komplette DDAH-2-Gen zu generieren, und damit die Grundlage für die Generierung von konditionalen und organspezifischen K.O.-Tieren zu schaffen. Hiermit sollte eine mögliche embryonale Letalität des DDAH-2-K.O.s umgangen werden. Prinzipiell wird erwartet, dass bei den DDAH-2-defizienten Tieren die ADMA-Plasma-Konzentration steigt und Folgeerscheinungen einer gestörten NO-Synthese zu beobachten sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Chemikalien, die hier nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) in zur Analyse-Qualität bezogen.

Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
T4-DNA-Ligase-Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Taq-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq-Polymerase	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Taq-Polymerase Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland
MgCl ₂	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase, DNase frei	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Deutschland
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Triple Master Enzym-Mix	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
R1 Genotyp-DNA	Präpariert durch Frau PD Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer (ZMNH)
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
NaCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Zahnstocher	Wenco, Essen, Deutschland
Whatman 3 MM Blotting Papier	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

ExpressHyb Solution	Bioscience, Clontech, Heidelberg, Deutschland
Geneticinsulfat (G418)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
GeneScreen plus Membran NEF 1017	NEN, Bosten, USA
Mineralöl, PCR-grade	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen Deutschland
Nitrozellulosemembran Protan BA85, 0,45 µm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Sephadex G-50 Spin Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Heringsperma-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
dNTPs	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Restriktionsenzyme und Primer:

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) erworben.

Avr II
Bam HI
Eco RI
Hind III
Kpn I
Nae I
Nco I
Nhe I
Not I
Pvu I
Pvu II
Sac I
Xho I

Liste verwendeter Oligonukleotide:

Alle Primer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

loxP Nae I 1:

5' CTAGGGCCGGCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATC 3'

loxP Nae I 2:

3' CCGGCCGTATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATAGGATC 5'

loxP Nco I 1:

5' CTAGGCCATGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATC 3'

loxP Nco I 2:

3' CGGTACCTATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATAGGATC 5'

Bei dem Design der Oligonukleotide, insbesondere des komplementären Stranges, müssen die Überhänge mitbedacht und überprüft werden. Bei der Bestellung ist darauf zu achten, dass von 5' nach 3'-Richtung bestellt wird (wichtig für den komplementären Strang)

Vektor Primer:

Vektor 1: 5' AGATCAGCAGCCTCTGTTCC 3'	LoxP 1 for, 3'Arm
Vektor 2: 3' TTGTCAACGCGTCGGACTTA 5'	rev 3'Arm
Vektor 3: 5' GCTGAGTGACGCCCTTTATA 3'	DT for
Vektor 4: 3' CTTCTGAGGCGGAAAGAACC 5'	loxP 2 rev
Vektor 5: 5' AGGTAGCCGGATCAAGCGTA 3'	for NEO
Vektor 6: 5' CCATCACATCCACACCGAAG 3'	loxP for 5'Arm
Vektor 7: 3' TCTCCCAAACACCTGTTGCC 5'	loxP rev 5'Arm
Vektor 8: 5' TGAGTCAGGTTTGACAAGCC 3'	loxP 2 for im Targeting-Vektor
Vektor 9: 5' AGGATCCAAGTCTTGTTCCC 3'	loxP for 5'Arm im Targeting-Vektor

Sonden-Primer:

Sonde 1: 5' AACTCTAGGCACAGGGTACATGTC 3'

Sonde 2: 5' CTTGTCCACTATCCTTTGCCTTATC 3'

PCR-Primer:

PCR 1: 5' GCAGTCTTCGAACTTTGAAATGAT 3' DDAH-2 geno 2 for

PCR 2: 3' AGAAATTGACGAAACAGGTGAATTA 5' DDAH-2 geno 2 rev

Cre exprimierende Bakterien Geschenk von Dr. Olaf Friese, UKE,
 Ursprungsstamm: 294-Cre von Francis
 Stewart (Buchholz et al. 1996 a & b)

2.1.3. Zellkulturmedien

MEF-Medium (Gibco/BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

DMEM (high glucose, no pyruvate, with glutamax)	500 ml
9% FCS	50 ml
1x MEM (non-essential amino acids 100x)	5,5 ml
1x Penicillin/Streptomycin (5000 IU Pen, 5000 µg Strep/ml, 100x)	5,5 ml

ES-Medium

DMEM (high glucose, no pyruvate, 25 mM HEPES)	500 ml
15% FCS	92 ml
1x Glutamin (200 mM, 100x)	6,2 ml
1x MEM (NEAA, non essential amino acids, 100x)	6,2 ml
1x Penicillin/Streptomycin (5000 IU Pen, 5000 µg Strep/ml, 100x)	6,2 ml
1x Nukleosidmix (100x)	6,2 ml
1x Natriumpyruvat	6,2 ml
2x 2-Mercaptoethanol (50 mM, 1000x)	1,24 ml
LIF=Leukemia inhibitory factor (10 ⁷ U/ml)	62 µl
G418 Zusatz bei Selektion (50 mg/ml)	4-6 µl/ml

2.1.4. Chemikalien der Zellkultur

0,1% Gelatine	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland 1 Tablette in 500 ml Aqua bidest lösen, autoklavieren
PBS/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	1 Tablette PBS mit 0,1 g Na-EDTA in 500 ml Aqua bidest lösen
Trypsin/EDTA für MEF-Zellen	0,05%, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA für ES-Zellen	0,25%, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland oder

2,5% Trypsin
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
 Deutschland
 1 ml lösen und mit 10% Hühnerserum
 und PBS versetzen

Nukleosidmix 100x
 Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen,
 Deutschland

Adenosin	80 mg	bei 37°C in 100 ml PBS lösen, steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern
Guanosin	85 mg	
Cytidin	73 mg	
Uridin	73 mg	
Thymidin	24 mg	

Elektroporationspuffer

20 mM Hepes
 137 mM NaCl
 5,0 mM KCl
 0,7 mM Na₂HPO₄
 6,0 mM Dextrose

2x Freeze-Lösung

FCS 80%
 DMSO 20%

Die Zellen werden im Verhältnis 1:1 mit Freeze-Lösung eingefroren.

Mitomycin C

Zur mitotischen Inaktivierung von MEF
 2 mg Mitomycin C (lyophilisiert) in 2 ml PBS resuspendieren, in Aliquots zu je
 150 µl aliquotieren und bei -80°C lichtgeschützt aufbewahren. Für eine 15-cm-
 Schale mit 15 ml MEF-Medium sind 150 µl ausreichend. Dabei beträgt die
 Konzentration 10 µg/ml.

2.1.5. Puffer und Lösungen

Lysozym 10 g
 10 mg Lysozym in 1 ml H₂O lösen und
 bei -20°C lagern
 Serva Electrophoresis GmbH,
 Heidelberg, Deutschland

Agarose Electrophoresis Grade
 Invitrogen, GmbH, Karlsruhe,
 Deutschland

20x SSC-Puffer
 175,3 g NaCl
 88,2 g Na₃-Citrat
 ad 1 Liter
 pH 7,0

STET
 8% Saccharose
 5% Triton x 100
 50 mM EDTA

	50 mM Tris-HCl pH 8
SDS Gelladepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 6.8 100 mM DTT 2% SDS 0,1% Bromphenolblau 10% Glycerin
1x TAE- Puffer	40 mM Tris-Acetat 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7,5
50x Stock solution;	Tris-Base (242 g) und EDTA in einen 500 ml Messkolben einwiegen und bis zur Hälfte mit MilliQ Wasser auffüllen. Anschließend die Essigsäure (57,1 ml) hinzufügen und das ganze mit einem Rührmagneten durchmischen. Nach vollständiger Auflösung den Rest MilliQ Wasser hinzufügen und erneut vermischen. Um einen 1x Puffer herzustellen werden 100 ml der Stock Solution auf 5 L mit MiliQ Wasser aufgefüllt, das z.B. zur Agarose-Gelherstellung benutzt werden kann.
TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8
low TE	5 mM Tris-HCl 0,5 mM EDTA pH 8
RF I	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, bei 4°C lagern
RF II	10 mM MOPS(Morpholinopropansulfonsäure) 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15% Glycerin pH 6,8 mit Essigsäure einstellen, bei 4°C lagern

Trypsin-Lösung	0,05% Trypsin 0,02% EDTA in PBS, pH 7,3
2-Propanol 2,5 L	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 2,5 L	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
2.1.6. Kits	
Qiagen Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaex II Gel Extraction Kit (150)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Nucleo Spin Extract Kit	Clontech, Californien, USA
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
ABI PRISM BigDye™ Terminator V1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystem, Californien, USA
Rediprime II Random Prime Labelling System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
pGEM-T easy Vektor System 1	Promega, Mannheim
2.1.7. Geräte	
Eppendorfpipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Bio Rad Power Pac Basic (Spannungsgerät für Elektrophorese)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Deutschland
Biometra Standard Power Pack P25 (Spannungsgerät für Elektrophorese)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Eppendorf Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sarstedt MC 6 (kleine PCR-Zentrifuge)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

Heidolph REAX top (Vortex-Gerät)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG Schwabach, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ROTINA 35 R, Hettich Zentrifugen	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Sartorius Laborwaage CP 225 D	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Sartorius Laborwaage BP 3100 S	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
ACCU jet Brand (Pipettierhelfer)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
C25 Incubator Shaker Classic Series (Schüttelinkubator 37° C)	New Brunswick Scientific GmbH Nürtingen Deutschland
Heraeus B 5050 E(Brutschrank 37° C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Fireboy (Bunsenbrenner)	Tecnomara AG, Zürich, Schweiz
Sharp R-212 Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
Scotsman AF-10 (Eismaschine)	MET Mack Eistechnik GmbH, Maintal, Deutschland
Milli Q-Plus (aufgereinigtes Wasser)	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Varioklav Dampfsterilisator H+P	Thermo Electron GmbH Oberschleißheim, Deutschland
Genius ² Bio imaging System	Syngene advision of the Synoptics groupe, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Smartspec 3000 (Spektrophotometer)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
3100 Genetic Analyser (Sequenzierer)	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt

2.1.8. Zelllinien

Murine embryonale Feederzellen (MEF) und murine embryonale Stammzellen (MES) wurden von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg zur Verfügung gestellt.

2.1.9. Programme

Homologievergleiche von Sequenzdaten wurden in den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) und der Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org>) des Sanger Institute und des European Bioinformatics Institute durchgeführt. Weiterhin wurden Sequenzvergleiche und Sequenzformatierungen mit dem Programm *Bioedit* (T.A. Hall Software), *Finch TV* (Internet basiertes Programm) bzw. *Multalign* (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) erstellt.

Vektor *NTI 9.0* von Informax wurde als Sequenzprogramm verwendet.

Tabellenkalkulationen und Abbildungen wurden mit Hilfe des MS-Office Pakets von Microsoft und dem Adobe Photoshop erstellt.

2.1.10. Genehmigung für Tierversuche

Für die Generierung und Untersuchungen an Geweben von DDAH-defizienten Mäusen liegt eine Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen und Organentnahmen bei Wirbeltieren gemäß Tierschutzgesetz vor (Nr. 66/04).

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien werden 100 ml LB-Medium mit 100 µl Streptomycin versetzt und mit 50 µl E.coli DH10B Bakterienstamm aus einer "Freezing"-Kultur angeimpft. Entsprechend einer OD_{600nm} von 0,6 werden die Bakterien auf eine Zelldichte von $4-7 \times 10^7$ Zellen/ml bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die angesetzte Kultur wird auf zwei Kulturröhrchen verteilt und für 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend folgt der Zentrifugationsschritt bei 1000 g und 4°C für 15 Minuten.

Das Zellpellet wird in 16,7 ml kaltem RF I-Puffer resuspendiert und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 1000 g und 4°C wird das Zellpellet in 4 ml kaltem RF II-Puffer resuspendiert und wiederum für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien werden in 200 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt. Es erfolgt ein Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff und eine Lagerung bei -80°C.

2.2.2. DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionen werden nach Herstellerangaben durchgeführt. 1-5 µg Vektor-DNA wird mit Wasser, Enzym und Enzympuffer versetzt und für ca. 3 Stunden oder evt. über Nacht verdaut. Hierbei ist zu beachten, dass die zugegebene Puffermenge 1/10 des Endvolumens ausmacht. Bei einem Übernachtverdau wurde darauf geachtet, dass der Verdau nicht länger als 12 Stunden dauert, weil die Restriktionsendonukleasen dann unspezifisch schneiden.

Die Auswahl der entsprechenden Enzyme wird vor Durchführung mit Hilfe der Vorberechnung bzw. der zu erwartenden Fragmentgrößen mittels Vektor NTI 9.0 getroffen. Dabei werden von allen möglichen Enzymen die ausgewählt, die gut unterscheidbare und gut darstellbare Fragmentgrößen ergeben.

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Um geschnittene DNA-Fragmente oder PCR-Produkte aufzutrennen, wird die horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Der Gelträger wird zunächst mit einem speziellen Klebestreifen straff abgeklebt und der geeignete Kamm mit der gewünschten Anzahl an Taschen reingestellt.

0,5 g Agarose werden in 50 ml 1x TAE-Puffer so lange in der Mikrowelle aufgekocht und gerührt bis keine Schlieren zu sehen sind und die Lösung vollkommen durchsichtig erscheint. Nach anschließendem Abkühlen wird die Lösung mit 2-3 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt und in den vorbereiteten Gelträger gegossen.

Dabei muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen an den Taschen vorhanden sind, ggf. müssen diese mit einer Pipettenspitze entfernt werden.

Das Ethidiumbromid lagert sich an die DNA und kann durch Fluoreszenzanregung sichtbar gemacht werden.

Nach vollständigem Aushärten des Gels wird der Gelträger in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer eingelegt, ggf. wird mit Puffer-Lösung aufgefüllt bis das Gel mit der Puffer-Lösung bedeckt ist. Anschließend wird der Kamm entfernt. Die aufzutragenden Proben werden mit 3 µl Loading Dye, einem Ladepuffer, versetzt und in die Taschen aufgetragen. Parallel zu diesen Proben wird ein Längenstandard (DNA-Ladder-Mix) aufgetragen, der es später ermöglicht die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen.

Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 80-90 Volt durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass der Strom von der Kathode (-) zur Anode (+) läuft.

2.2.4. DNA-Gelextraktion/ Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des Nucleo Spin Extract Kits werden enzymatisch geschnittene DNA-Fragmente oder PCR-amplifizierte DNA-Fragmente aus dem Gel aufgereinigt.

Die Fragmente werden auf einem 1-2%igem Agarosegel der Größe nach elektrophoretisch getrennt.

Ein leeres 1,5 ml Eppendorfgefäß wird zunächst gewogen und das Gewicht notiert.

Anschließend wird auf dem UV-Tisch das gewünschte DNA-Fragment bzw. die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in das leere Eppendorfgefäß überführt. Das Gewicht des Gelstücks wird ermittelt. Für große DNA-Ausbeute sollte das Gelstück möglichst klein sein. Pro 100 mg Gel werden 300 µl Puffer QX1 und 200 µl Wasser hinzugegeben. Nach 30 Sekunden Vortexen werden 20 µl Quiaex II zugegeben. Die Agarose wird 10 Minuten bei 50°C unter leichtem Vortexen gelöst. Die Lösung wird anschließend bei 13.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge). Der Überstand wird mit einer Pipette entfernt, das Pellet mit 500 µl Puffer QX1 gewaschen, vermischt und anschließend wieder für 30 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der nun die Agarosereste enthält, wird verworfen. Danach wird zweimal hintereinander mit 500 µl Puffer PE gewaschen, gevortexet und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Bei diesem Schritt werden die Restsalze und Verschmutzungen entfernt. Das Pellet wird für 10-15 Minuten oder bis es weißlich erscheint, getrocknet. Anschließend erfolgte die Eluierung mit 20 µl sterilem Wasser, Vortexen und eine Inkubation von 5 Minuten bei 50°C. Die Reinheit der DNA wird durch Dichtebestimmung am Photometer festgestellt.

2.2.5. Bestimmung der DNA-Konzentration mit Hilfe des UV-Spektrophotometer

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wird mit einem UV-Spektrophotometer (Smartspec 3000) durchgeführt. Nach Herstelleranweisung werden die Voreinstellungen am Gerät vorgenommen (RNA/DNA-Auswahl, Dilutionsfaktor, etc.). Zunächst wird die dafür geeignete Quarzküvette zweimal mit Wasser gespült, anschließend erfolgt eine Nullwert-Bestimmung mit 2 µl des Lösungsmittels der DNA-Probe in 98 µl Wasser. Danach werden 2 µl der DNA-Probe mit 98 µl Wasser in die Küvette gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die optische Dichte für diese Probe wird nach Einlegen der Küvette in die dafür vorgesehene Stelle und Drücken der Taste Sample bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm.

Der Reinheitsgrad der DNA-Lösung lässt sich durch den Quotienten der gemessenen Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm bestimmen. Dieser Wert sollte um 1,8 liegen. Bei geringeren Werten ist von Verunreinigung mit Proteinen auszugehen.

2.2.6. Linker-Herstellung

Da die bei MWG bestellten Oligonukleotide als Einzelstrang vorliegen, müssen sie aneinander angelagert werden. Hierfür werden 60 µl TE Puffer und je 40 µl der Oligonukleotide in ein 1,5 Eppendorfgefäß pipettiert.

Eine quadratische 7 cm x 7 cm x 5 mm Styroporplatte wird mit einem ca. 1 cm großen Loch im Zentrum versehen. Wasser wird in einem 1-Liter-Becherglas in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und in eine verschließbare Styroporkiste gestellt. Mit dem Thermometer wird die Temperatur kontrolliert. Erst bei 87-90°C wird das Eppendorfgefäß in dem Loch der Styroporplatte angebracht und über Nacht auf dem Wasser schwimmen gelassen. Am nächsten Morgen soll zunächst die Temperatur gemessen werden, bei < 40°C ist der Linker einsatzfähig für weitere Klonierungsschritte und kann bei -20°C gelagert werden.

2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente (Inserts/Linker) werden in ein bis dreifach molarem Überschuss mit 5 µg linearisiertem DNA-Vektor unter Verwendung von 1 µl (30 Einheiten) T4-DNA-Ligase und 1 µl 1x Ligasepuffer in einem Endvolumen von 10 µl über Nacht bei 17°C inkubiert. Hierfür muss der Heizblock frühzeitig in den Kühlraum platziert und das Eppendorfgefäß nach Temperatureinstellung hineingestellt werden. Die Ligationsproben werden bis zur Transformation bei 4°C aufbewahrt. Nach Gebrauch wird der Überschuss der Ligation bei -20°C gelagert.

2.2.8. Transformation

Die Transformation erfolgt nach dem Verfahren von Hanahan (Hanahan 1983). 200 µl chemisch kompetenter DH10B E.coli-Bakterien (Lagerung der Aliquots bei -80°C) werden bei Raumtemperatur aufgetaut und auf Eis gestellt. Der Ligationsansatz (5 µl) oder die Plasmid-DNA werden zu den kompetenten Bakterien gegeben, kurz geschüttelt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt

ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Anschließend werden die Bakterien für einige Minuten wieder auf Eis gestellt. Zu der Zellsuspension werden 400 µl auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben und für 1-1½ Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert, auf LB-Ampicillin-Agarplatten aufgetragen und über Nacht (zwischen 12-16 Stunden) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Eindiffundieren der ausgestrichenen Flüssigkeit werden die Platten im Brutschrank so übereinander gestapelt, dass der Agar sich oben befindet. So wird einer späteren Schimmelbildung durch Kondenswasser vorgebeugt.

2.2.9. Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA, der sogenannten „Boiling Prep“- Methode erfolgt nach einem abgewandelten Verfahren von Holmes und Quigley (Holmes und Quigley 1981). Diese Methode eignet sich zur DNA-Isolierung für viele E.coli-Laborstämme und bietet Vorteile wie die schnelle Durchführung und die hohe Qualität der gewonnenen DNA.

2 ml LB-Medium werden mit 2 µl Ampicillin (50 mg/ml) und einer E.coli-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Kulturröhrchen geschüttelt. Dieser Schritt kann für mehrere E.coli-Kolonien parallel durchgeführt werden.

Die Übernachtskultur wird einzeln in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 5.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge). Der Überstand wird dekantiert und das Pellet mit 500 µl STET-Puffer durch Vortexen wieder resuspendiert. Dies dient der Stabilisierung der DNA im weiteren Verlauf. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym (10 mg/ml) wird jedes Eppendorfgefäß vier bis sechs Mal invertiert und 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird die Inkubation für 90 Sekunden im Heizblock bei 95°C fortgesetzt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet, was den Zelldetritus enthält, wird mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nach Zugabe von 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat (pH 7,5) und 500 µl Isopropanol wird die Lösung vier bis sechs Mal invertiert und die Plasmid-DNA durch 10 Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C präzipitiert. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet nach Lufttrocknung je nach Größe in 30-50 µl H₂O aufgenommen. Die so gewonnene DNA kann für einen anschließenden Restriktionsverdau genutzt werden.

2.2.10. DNA-Fällung mit Natrium Acetat

In einem 2 ml Eppendorfgefäß werden zur DNA-Lösung und Wasser 1/10 Volumen 3 M NaAc Lösung, pH von 5,2 gegeben. Anschließend wird kurz gevortext. Danach werden 2-2,5 Volumen kaltes absolutes Ethanol hinzugefügt und erneut kurz gevortext. Das Eppendorfgefäß wird für 5 Minuten auf Eis gestellt oder alternativ 30 Minuten bei 21°C gelagert. Als nächstes erfolgt für 30 Minuten ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 rpm. Der Überstand wird verworfen. Anschließend wird das Pellet mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und erneut bei 4°C und 13.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das Eppendorfgefäß mit dem Pellet über Kopf getrocknet bis kein Ethanol mehr wahrnehmbar ist. Danach kann es in Wasser aufgenommen werden.

2.2.11. Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde das Maxi Kit von Qiagen verwendet. Es werden jeweils 2 ml LB-Medium mit 2 µl Ampicillin und einer E.coli-Kolonie angeimpft und im Kulturröhrchen bei 37°C für 3-4 Stunden geschüttelt. Es ist auch möglich das LB-Medium mit einem kleinen Teil eines Glycerolstocks anzupfen. Mit dieser Bakteriensuspension werden 250 ml Übernachtskultur (enthält LB-Medium und 250 µl Ampicillin) angeimpft. Dabei werden autoklavierte Erlenmeyerkolben benutzt. Aus der 250 ml Übernachtskultur werden 850 µl für eine „Freezing-Culture“ (siehe 2.2.12.) abgenommen. Der Rest wird in zwei große abschließbare Zentrifugationsbecher halbiert überführt und bei 6.500 rpm für 15 Minuten bei 4°C in der Beckmann-Zentrifuge (mit dem Einsatz JA-14) pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Im anschließenden Schritt wird das Pellet mit 10 ml P1-Puffer versetzt und mit Hilfe der Accujet-Pipettierhilfe vollständig resuspendiert. Der P1-Puffer enthält RNase A, so dass es im Kühlschrank aufbewahrt werden muss und auch während der Arbeit es auf Eis gestellt sein muss. Zu dieser Suspension werden 10 ml P2-Puffer gegeben und das ganze vorsichtig sechs- bis achtmal invertiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Zur Neutralisation werden 10 ml kaltes Qiagen P3-Puffer zugegeben und sofort vorsichtig sechs- bis achtmal invertiert bis eine homogene Suspension entsteht. Nach Inkubation für 20 Minuten auf Eis wird die Suspension für weitere 30 Minuten bei 11.500 rpm zentrifugiert. In den letzten 10 Minuten der Zentrifugation wird die Equilibration der Qiagen Säule mit 10 ml QBT-Puffer eingeleitet. Die Säule wird zuvor mit einem speziellen Halter über einem 200 ml Kolben platziert.

Anschließend wird das Lysat durch eine Gaze in die Säule laufengelassen, so dass die ausgefällten Proteine darin zurückgehalten werden können. Das Lysat tropft mit Hilfe der Schwerkraft durch die Säule durch. Bei diesem Bindungsschritt wird das „gesäuberte“ Lysat an die Säule gebunden. Anschließend erfolgt das 2-malige *Waschen* der Säule mit je 30 ml Qiagen QC-Puffer, um Kohlenhydrate zu entfernen. Für die Eluierung der Plasmid-DNA wird die Säule schließlich mit dem speziellen Halter über ein steriles neues Kulturröhrchen gestellt und mit 15 ml Qiagen eluiert. Die DNA im Eluat wird mit 10,5 ml ungekühltem Isopropanol gefällt, vorsichtig einige Male invertiert und bei 4°C und 15.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Alternativ kann auch bei 4°C und 5.000 rpm für 1 Stunde zentrifugiert (ROTINA 35 R) werden. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 5 ml 70%igem ungekühltem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Vortexen, wird die Suspension für 30 Minuten bei 4°C und 5.000 rpm zentrifugiert. Nach Abkippen des Ethanols erfolgt eine Lufttrocknung über Kopf für 5-10 Minuten. Je nach Größe der Pellets wird die DNA in 200 -500 µl H₂O aufgenommen. Anschließend wird die in Wasser aufgenommene DNA in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß umpipettiert, photometerisch bestimmt und bei -20°C gelagert.

2.2.12. Anlegen einer „Freezing Culture“

Mehrere 2 ml Eppendorfgefäße werden mit 0,15 ml Glycerol (100%) befüllt und autoklaviert. Nach der Übernachtskultur einer Bakteriensuspension werden 0,85 ml abgenommen und in ein Aliquot überführt. Das Eppendorfgefäß wird anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Es ist wichtig zu beachten, dass die „Freezing Culture“ nie ganz auftauen darf. Für weitere Nutzung reicht es aus, die Oberfläche anzukratzen und entsprechend vorbereitetes LB-Medium zu beimpfen (siehe 2.2.11.)

2.2.13. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung mit Big Dye-Terminatoren basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode (auch Kettenabbruch-Synthese genannt) nach Sanger et al. (1977).

In diesem Verfahren wird zunächst die zu bestimmende DNA denaturiert und dann als Kopiervorlage für die Synthese des Komplementärstranges eingesetzt. Die Synthese startet an einem zugefügten, markierten Primer und wird durch die DNA-Polymerase katalysiert. Die Synthese erfolgt in vier verschiedenen Reaktionsgefäßen, die neben den vier Desoxynucleotid-Triphosphaten (dNTPs) auch jeweils eines von vier Abbruchnucleotiden, Didesoxynucleosid-Triphosphat (ddNTPs) enthalten. Zur Markierung werden farbig fluoreszierende dd-Nucleotide verwendet.

In einem Ansatz werden also alle möglichen DNA-Fragmente, die immer mit der gleichen Base enden, komplementär synthetisiert.

Die so entstandenen Oligonucleotide können in einem Sequenziergel mit Hilfe eines Detektors identifiziert und die Sequenz abgelesen werden.

Für die Sequenzierung werden zunächst passende Primer (for und rev) gesucht.

Zum Einsatz kommen dann 200 ng Plasmid-DNA oder 100 bis 400 ng gereinigtes PCR-Produkt, 1 µl Primer und 2 µl Big Dye-Terminator-Ready-Reaction-Mix und 6 µl Big Dye Puffer und kleine PCR-Eppendorfgefäße.

Der Ansatz wird mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wird in einem Thermocycler (Eppendorf AG) durchgeführt. Das Sequenzierprogramm sieht wie folgt aus: Zunächst wird 1 Minute bei 96°C denaturiert, anschließend folgen 25 Sequenzierzyklen. Jeder Zyklus umfasst 30 Sekunden Denaturierung bei 96°C, 15 Sekunden Annealing bei 50°C und 4 Minuten Elongation bei 60°C. Die Annealing-Temperatur ist aber abhängig vom verwendeten Primer und sollte individuell variiert werden.

Die mit dem Ansatz gefüllten PCR-Eppendorfgefäße werden in den Thermocycler eingesetzt, die vier Ecken werden durch zusätzliche PCR-Eppendorfgefäße bestückt, der Deckel verschlossen und das oben genannte Programm gestartet.

Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 180 µl Wasser und 400 µl absolutes Ethanol versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und mit 13.000 rpm für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt, das Pellet luftgetrocknet und im Servicelabor des Instituts für Pathologie (UKE, Hamburg) analysiert. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten Dye-Terminatoren erfolgt dort auf einem Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser Sequencer. Auf diese Weise werden Fragmente von bis zu 600 bp sequenziert. Die per email erhaltenen Sequenzdaten werden in Textformat gespeichert und für Homologievergleiche in der Datenbank des National Centers for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), der Datenbank Ensembl des Sanger Institute und des European Bioinformatics Institute (<http://www.ensembl.org>) oder Multalign (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) genutzt.

2.2.14. Überprüfung der Funktionalität der *loxP sites*

Damit die Funktionalität der *loxP sites* innerhalb des Targeting-Vektors untersucht werden kann, werden stabil *Cre*-Rekombinase exprimierende *E. coli*-Bakterien (294-*Cre*) genutzt (Buchholz et al. 1996 a und b).

Ein temperatursensitiver Promoter, der bei 37°C aktiv ist, reguliert die *Cre*-Expression der *E. coli*-Bakterien. Nach der Transformation (siehe 2.2.8) der *Cre*-exprimierenden Bakterien mit dem Targeting-Plasmid werden sie ausplattiert. Einige ampicillinresistente Klone werden über Nacht in LB-Medium aufgenommen und bei 37°C kultiviert. Nach der Mini-Präparation (2.2.9.) der Plasmid-DNA wird ein Restriktionsverdau mit Not I den Vektor linearisieren.

Aus dem insgesamt 13,6 kbp großen Targeting-Vektor wird der Bereich zwischen dem ersten und der dritten *loxP site* deletiert (ca. 5,8 kbp).

In Abhängigkeit zu der *Cre*-Expression in den Zellen erfolgt auch die Deletion.

Nach *Cre*-vermittelter Deletion liegt also eine kleinere Fragmentgröße von 7,8 kbp vor. Das beweist, dass die Funktion der äußeren *loxP sites* innerhalb des Targeting-Vektors intakt ist (vgl. Abb. 35 im Ergebnis-Teil).

2.2.15. Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR bietet die Möglichkeit einen DNA-Abschnitt in kürzester Zeit zu amplifizieren. Zunächst muss die DNA isoliert und in einen Reaktionsansatz gebracht werden. Dieser besteht aus Puffer, Nucleotide, zwei verschiedene Primer (Diese sind kurze einzelsträngige DNA-Stücke, die aus ca. 25 Nucleotiden synthetisiert werden und der DNA-Polymerase als Startersequenz dienen.) und die thermostabile Taq-Polymerase. Die beiden Primer (forward und reverse) passen jeweils komplementär an eine ganz bestimmte Stelle der Ziel-DNA, die vorher denaturiert wurde. In aufeinander folgenden thermozyklischen Reaktionen wird die DNA jedes Mal verdoppelt.

Der PCR-Reaktionsansatz enthält 1 µl dNTPs (10 mmol), 1 µl DNA-Vorlage, je 0,5 µl Forward- und Reverse-Primer (100 pmol/ µl), 0,2 µl Taq-Polymerase, 2,5 µl Taq-Polymerase Puffer, 2,5 µl MgCl₂ und wird auf ein Gesamtvolumen von 25 µl mit Wasser aufgefüllt.

Bei der Verwendung des Triple Master PCR System werden zwei Mastermixe angesetzt. Bei einem Gesamtvolumen von 10 µl enthält eines 1 µl DNA, je 0,5 µl Forward- und Reverse-Primer, das mit 8 µl Wasser aufgefüllt wird.

Der zweite Mastermix enthält 2 µl Eppendorf Tuning Buffer (1/10 des Reaktionsansatzes), 0,2 µl Triple Master Enzym und 1 µl dNTPs, das mit 11,3 µl Wasser versetzt wird

Das Temperaturprogramm für die Amplifikation sieht wie folgt aus:

Denaturierung:	1x	5 Minuten bei 95°C
Zyklusbeginn:	30x	1 Minute bei 95°C (Denaturierung) 1 Minute bei 57°C (Annealing) 1 Minute bei 68°C (Elongation)
Finale Elongation:	1x	4 Minuten bei 68°C

Um herauszufinden, bei welchen Temperaturen man die besten PCR-Produkte erhält, bietet es sich an, im Thermocycler für die Annealing-Temperatur zunächst einen Gradienten von +/- 7°C einzustellen.

Nach dem letzten Reaktionszyklus wird eine finale Elongation durchgeführt, damit alle PCR-Produkte durch die Polymerase vervollständigt werden.

Um unspezifische und störende Reaktionen zu vermeiden, empfiehlt es sich den Reaktionsansatz anschließend auf 4°C abzukühlen.

2.2.16. Verwendete und hergestellte Vektoren

ploxNeoCDT1 stellte Dr. Olaf Friese, UKE, Hamburg, zur Verfügung.
6181 bp, Plasmid mit einer Neo- und DT-Kassette

pGEM t-easy: 3015 bp, Promega, Mannheim, Deutschland

ploxmit3'XhoArm+DT+loxP SEQ: 8621 bp, Plasmid bestehend aus ploxNeoCDT1, Neo- und DT-Kassette und 3'Arm (homologer DNA-Bereich im 3'Bereich des DDAH2-Gens)

pGEM-teasymitDDAH2-5'Arm@12@7: 7944 bp, Plasmid bestehend aus pGEM t-easy und 5'Arm (homologer DNA-Bereich im 5'Bereich des DDAH2-Gens)

5'Arm+loxP+NcoI neu1: 7990 bp, Plasmid bestehend aus pGEM-teasymitDDAH2-5'Arm@12@7 und einem Insert (46 bp)

Targeting-Vektor 1: 13626 bp, Plasmid bestehend aus ploxmit3'XhoArm+DT+loxP SEQ und dem 5'Arm aus 5'Arm+loxP+NcoI neu1

2.2.17. Zellkultur

Die Arbeiten an MEF-Zellen und MES-Zellen erfolgten in Zusammenarbeit und unter Anleitung durch PD Dr. Irmgard Hermans-Borgmeyer am ZMNH und Dr. Nicole Lüneburg, Institut für Klinische Pharmakologie.

Die Zellkulturarbeiten werden an sterilen Werkbänken mit vertikalem Luftstrom ausgeführt. Mithilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss) wird das Zellwachstum überprüft. Für die Kultivierung der Zellen wird ein Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5% CO₂-Atmosphäre genutzt.

2.2.17.1. Kultur muriner, embryonaler Feederzellen (MEF)

Für die Kultivierung von murinen, embryonalen Feederzellen (MEF) werden ca. 2×10^6 Zellen schnell in einem Wasserbad von 37°C aufgetaut und auf eine 15-cm-Zellkulturschale, die mit 25 ml MEF-Medium gefüllt ist, gegeben. Die Zellen wachsen in dieser Schale drei Tage lang bis sie konfluent sind. Für die Vorbereitung des Splitvorgangs der Zellen werden 3 bzw. 4 (abhängig davon, ob im Verhältnis 1:3 oder 1:4 gesplittet werden soll) neue 15-cm-Zellkulturschalen mit je 20 ml MEF-Medium gefüllt und beschriftet. Anschließend wird das Medium der MEF-Zellen abgesaugt und mit 25 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS erfolgt das Übersichten der Zellen mit 3 ml Trypsin für 3-7 Minuten bei 37°C. Nach dem Trypsinieren werden die Zellen mit Zugabe von 5 ml MEF-Medium (stoppt nun die Trypsinwirkung) wieder resuspendiert, mehrfach pipettiert und der Erfolg der

Trennung unter dem Mikroskop kontrolliert. Danach können die Zellen gleichmäßig auf die neuen Platten verteilt werden, wo sie wieder drei Tage wachsen bis sie konfluent sind. Anschließend ist es möglich, die Zellen wieder zu splitten, mit Mitomycin C zu inaktivieren, um sie auf die entsprechenden Platten für die ES-Zellkultivierung zu verteilen oder inaktiviert wegzufrieren. Mitomycin C stoppt durch Quervernetzung der DNA den Zellzyklus.

Für die Inaktivierung wird von einer 15-cm-Zellkulturschale das Medium abgesaugt und 15 ml frisches MEF-Medium hinzugegeben, das mit 150 µl Mitomycin C-Lösung versetzt ist. Durch leichtes Bewegen der Schale wird eine Durchmischung erreicht, danach folgt eine Inkubation für zwei bis drei Stunden bei 37°C. Nach anschließendem Absaugen des Mediums werden die Zellen zweimal mit 25 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin für 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale ablösen. Mit 7 ml Medium werden die Zellen vollständig von der Platte gespült und in einem Kulturröhrchen gesammelt.

Anschließend wird die Zellzahl bestimmt. Auf einer konfluenten 15-cm-Zellkulturschale wachsen etwa $1-1,5 \times 10^7$ Zellen. Nun können die MEF-Zellen auf die entsprechend gelatinisierten Zellkulturschalen ausgesät werden oder aber auch mit „Freeze“-Lösung eingefroren werden.

Tab. 1. Übersicht der benötigten MEF für die ES-Zell-Kultivierung

Schale	Fläche	Zellzahl	Gesamtvolumen
92 mm	57 cm ²	$2-2,5 \times 10^6$	10 ml
58 mm	21 cm ²	1×10^6	5 ml
40 mm	9 cm ²	5×10^5	2 ml
6-well	9,6 cm ² /well	5×10^5	2,5 ml
24-well	2 cm ² /well	1×10^5	1 ml
96-well (flacher Boden)	0,32 cm ² /well	$1,6 \times 10^4$	200 µl

Eine Vertiefung in der Zellkulturplatte entspricht einem *well*.

2.2.17.2. Kultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

Die ES-Zellen werden schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 5 ml Medium im Kulturröhrchen aufgenommen. Anschließend folgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm. Das entstehende Pellet wird in Medium aufgenommen, homogenisiert und auf die entsprechend vorbereiteten gelatinisierten Feederzellplatten (enthalten Mitomycin C inaktivierte MEF-Zellen) ausplatiert.

Allgemeine Hinweise bei der Arbeit mit ES-Zellen:

- *Bei ES-Zellen wird generell jeden Tag das Medium etwa zur gleichen Zeit gewechselt.*
- *In der Regel sind die Zellen alle zwei Tage konfluent und werden im Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet. Bei schlecht wachsenden Zellen ist auch ein 1:1-Verhältnis denkbar.*
- *Generell ist zu bedenken, dass die Zellen langsam weggefroren, aber schnell aufgetaut werden.*

- *Zwei Stunden vor dem Einfrieren, der Elektroporieren und vor der Blastozysteninjektion sollte das Medium gewechselt werden.*

Für den Splitvorgang der konfluent gewachsenen ES-Zellen wird zunächst das Medium abgesaugt. Anschließend erfolgt das Waschen mit 1x PBS/EDTA. Darauf folgt die Trypsinierung mit etwa 1/5 des Volumens mit Trypsin/EDTA für 3-5 Minuten bei 37°C. Die Zellen werden mit etwa der doppelten Menge ES-Zellmedium resuspendiert bis sie vereinzelt sind. Dies wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Zellen werden in einem Kulturröhrchen mit vorgelegtem Medium aufgenommen, bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und auf neue Schalen verteilt.

Tab. 2. Übersicht der PBS/EDTA bzw. Trypsin Volumina in Abhängigkeit zur Größe der Zellkulturplatte

Schale	Fläche	PBS/EDTA Volumen	Trypsin Volumen
92 mm	57 cm ²	10 ml	2,5 ml
58 mm	21 cm ²	5 ml	1 ml
6-well	9,6 cm ² /well	3 ml	500 µl
24-well	2 cm ² /well	1 ml	150 µl
96-well (flacher Boden)	0,32 cm ² /well	200 µl	40 µl

2.2.17.3. Elektroporation

Als Vorbereitung für die Elektroporation werden 2×10^6 Zellen auf eine 6-cm-Zellkulturschale ausgesät. Nach zwei Tagen Kultivierung werden die Stammzellen auf zwei 10-cm-Platten gesplittet. Pro Elektroporationsansatz wird eine 10-cm-Platte benötigt. Die zu transformierenden Zellen werden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wirken 2 bis 3 ml 0,25%iges Trypsin für 3-5 Minuten auf die Zellen ein. Diese werden in 7 ml vorgelegtem Medium im Kulturröhrchen aufgenommen, bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in 10 ml Elektroporationspuffer oder PBS aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren wird das Pellet in 800 µl Elektroporationspuffer gelöst und in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette gegeben. Anschließend wird 25 bis 80 µg linearisierte DNA hinzu gegeben. Nach dem die entsprechenden Einstellungen am Elektroporator vorgenommen worden sind, erfolgt die Elektroporation.

Biorad Elektroporator: 240 V, 500 µF

Doppelpuls: 800 µl, 3 µF und 240 V, 500 µF

Schwacher Puls: 800 V, 3 µF

Nach dem erfolgten Puls, wird die Küvette für einige Minuten stehengelassen und hinterher im Kulturröhrchen mit 10 ml Medium aufgenommen, homogenisiert und dann auf 10-cm-Zellkulturschalen verteilt. Das Medium der Schalen wird jeden Tag gewechselt. Für die positive Selektion, die nach einem Tag begonnen werden kann, werden für mindestens 7 Tage 200 bis 300 µg G418 hinzugegeben. Bei einer Diphterietoxin-A Kassette wird kein Substratzusatz benötigt. Nach einer Woche kann mit dem Separieren begonnen werden. Hierfür wird zunächst eine 10-cm-Platte mit je zweimal PBS gewaschen. Unter dem Binokular werden einzelne ES-Zellklone mit runder, glatter, nicht allzu flacher Oberfläche, die scharf begrenzt sind, mit einer 20 µl

Pipette aufgenommen. In eine 96-*well*-Platte mit rundem Boden werden 40 µl Trypsin vorgelegt und jede einzelne Kolonie in ein *well* überführt. Es folgt eine Inkubation bei 37°C für 3-5 Minuten. Während dessen wird in einer 96-*well*-Feederzellplatte das Medium abgesaugt und pro *well* 200 µl frisches Medium hinzugefügt. Nach der Inkubation erfolgt eine gute Durchmischung der trypsinisierten Zellen mittels Hoch- und Runterpipettieren. Anschließend wird mit dem Mikroskop kontrolliert, ob Einzelzellen vorliegen. Die Trypsinierung wird mit 100 µl ES-Zellmedium gestoppt, die Zellen resuspendiert und es folgt eine Überführung auf eine 96-*well*-Feederzellplatte. Nach 2-3 Tagen kann das Splitten der konfluent gewachsenen 96-*well*-Platte erfolgen. Nachdem das Medium abgesaugt ist, wird die Platte mit 200 µl PBS/EDTA gewaschen. Jedes *well* wird mit 40 µl Trypsin behandelt und für 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird mit 80 µl ES-Zellmedium die Trypsinierung gestoppt. Es wird 1:4 gesplittet, auf zwei 96-*well*-Platten mit inaktivierten MEF-Zellen und auf zwei gelatinisierten 96-*well*-Platten für die danach folgende DNA-Präparation. Bei den ES-Zellplatten, die weggefroren werden sollen, muss das Medium täglich gewechselt werden. Nach zwei bis drei Tagen sind die Zellen auf den Platten erneut konfluent gewachsen und können eingefroren werden.

Um die 96-*well*-Platten einzufrieren werden die Zellen mit 200 µl PBS/EDTA gewaschen, mit 40 µl Trypsin trypsinisiert, für 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert, resuspendiert, mit 60 µl ES-Zellmedium verdünnt und erneut resuspendiert. Danach werden die 96-*well*-Platten auf Eis gestellt, mit 100 µl 2x Freeze-Lösung (80% FCS und 20% DMSO) versetzt, vermischt und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Anschließend wird es mit Klebeband zugeklebt und in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Nach zwei Tagen kann die Platte aus der Box entfernt werden und bei -80°C gelagert werden.

Für die *DNA-Präparation* müssen die Zellen auf einer 96-*well*-Platte ohne MEF-Zellen vollkommen konfluent gewachsen sein. Hierfür genügt es das Medium alle zwei Tage zu wechseln. Das Medium wird abgekippt und mit PBS gewaschen. Nach erneutem Abkippen werden 100 µl Lysispuffer zugegeben und über Nacht bei 55°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

10 ml Lysispuffer enthält:	0,1% SDS
	300 µl Proteinase K (10 mg/ml)
	100 µl RNase A (10 mg/ml)

Danach erfolgt die Zugabe von 10 µl (1/10 Volumen) 8 M LiCl und 100 µl Isopropanol mit einer über Nacht Inkubation auf einem Schüttler bei 4°C. Die DNA-Ausbeute kann durch längere Inkubationszeit erhöht werden. Es folgen 30 Minuten Zentrifugation bei 3800 rpm. Nachdem auf dem Boden der Platte nun weiße Schlieren zu beobachten sind, wird der Überstand verworfen. Es wird mit 100 µl kaltem Ethanol gewaschen, erneut für 20 Minuten bei 3800 rpm zentrifugiert, der Überstand erneut abgekippt und die Platte bei 55°C für ca. 10 Minuten getrocknet. Abschließend wird die DNA in einer feuchten Kammer in 50 µl TE oder 100 µl low TE über Nacht auf einem Schüttler gelöst.

Für die Vorbereitung des Restriktionsverdauens mit anschließender Southern Blot-Analyse ist es notwendig 10-15 µg DNA mit 20-50 Einheiten Enzym und 1 µl RNase (10 mg/ml) zu versetzen, auf 100 µl aufzufüllen und über Nacht verdauen zu lassen. Für die Reduzierung des Volumens wird die DNA danach gefällt.

2.2.18. Aufbereitung der 5' bzw. 3'Sonde

Für die 5'-Sonde werden zunächst passende Primer gesucht. Durch eine PCR-Reaktion mit der R1-DNA, wird die 5'-Sonde vorbereitet. Das zu erwartende PCR-Produkt soll eine Länge von ca. 600 bp haben. Um die optimale Temperatur der beiden Primer und die dazu passende Reaktion der Taq-Polymerase zu gewährleisten, wird ein Gradient von $\pm 7^{\circ}\text{C}$ im Thermocycler eingestellt (vgl. Abb. 12). Nach anschließender Elektrophorese wird das PCR-Produkt ausgewählt, dass die beste Darstellung bietet. Der Versuch wird mit der nun so optimalen Temperatur wiederholt, aus dem Gel extrahiert und das schließlich gewonnene Produkt in (4ng/ μl) low TE gelöst und bei 4°C aufbewahrt, um für die Southern Blot-Analyse genutzt zu werden

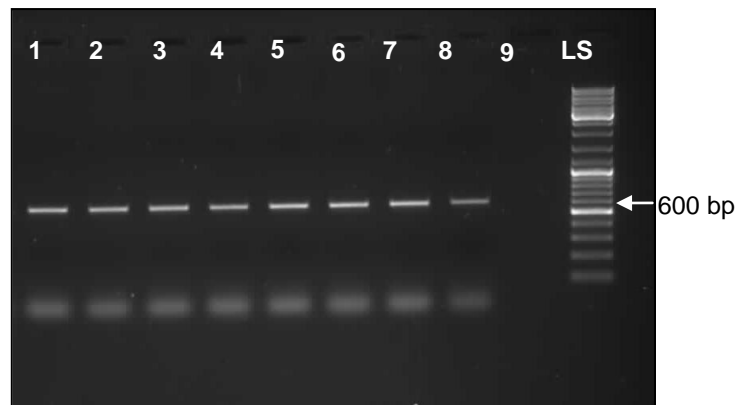


Abbildung 12: PCR-Produkt der 5'Sonde für die Southern Blot-Analyse. Die erwartete Größe beträgt 600 bp. Mit LS ist ein Längenstandard markiert, der eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglicht. Für eine optimale Temperatureinstellung der Primer und der Taq-Polymerase wird zunächst ein Gradient von $\pm 7^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Die beste Darstellung bietet Probe Nummer 5, dessen Temperatureinstellung für eine erneute PCR genutzt wird, um nach einer Gel-Elektrophorese das PCR-Produkt durch Extraktion für die Southern Blot-Analyse zu gewinnen. Nummer 9 ist eine mitgelaufene Wasserprobe.

Die 3'-Southern-Sonde war bereits in den pGEM t easy-Vektor kloniert. Nach Transformation und Selektion werden die positiven E.coli-Klone vermehrt und daraus die DNA präpariert. Anschließend ist es möglich die 3'-Sonde mit Hilfe von Eco RI, einem Restriktionsenzym, aus dem Plasmid auszuschneiden. Anschließende Elektrophorese ermöglicht die Trennung der ca. 1kbp Bande und durch darauf folgende Gelextraktion wird die 3'Sonde schließlich in einer Endkonzentration von (4ng/ μl) in low TE gelöst und bei 4°C aufbewahrt bis zur Southern Blot-Analyse.

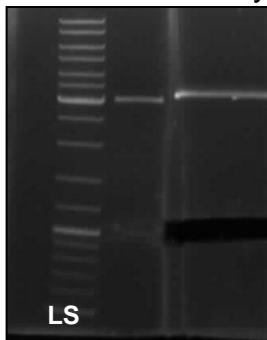


Abbildung 13: Gelexzision der 3'Sonde. Links ist ein Längenstandard (LS), der es erlaubt die Fragmentgrößen zu bestimmen. Die zu sehenden Banden in der ersten Spur liegen bei ca. 3 kbp (pGEM teasy-Vektor) und 1 kbp (3'-Sonde). In der zweiten Spur ist die Bande bei 1 kbp ausgeschnitten und für die Gelextraktion verwendet worden, um die 3'Sonde zu isolieren und für eine Southern Blot-Analyse zu nutzen.

2.2.19. Southern Blot

Die Southern Blot-Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Nicole Lüneburg, Institut für Klinische Pharmakologie durchgeführt.

Die Arbeiten mit radioaktivem Material dürfen nur in speziell dafür ausgewiesene Labore durchgeführt werden.

Das Prinzip des Southern Blots beruht darauf, die zu untersuchende DNA mit einem oder mehreren Restriktionsendonukleasen zu schneiden und die entstandenen Fragmente mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufzutrennen. Anschließend wird das entstandene Trennmuster auf eine Polyamidmembran geblottet (transferiert) Mit radioaktiv markierter Sonde (einzelsträngige DNA, die komplementär zur gesuchten Sequenz ist) wird die Membran behandelt. Ist die Sequenz auf der Membran vorhanden, bindet die Sonde daran (=Hybridisierungsvorgang). Im darauf folgenden Waschschrift werden alle unspezifischen Bindungen ausgewaschen.

Die Auswertung des Blots erfolgt mit Hilfe des Phospho-Imagers. Von der aufgereinigten hochmolekularen DNA werden 10 µg mit 2 µl des Restriktionspuffers für Nco I, 0,5 µl TE/RNase (10 µg/ml) sowie 50 Einheiten des Nco I-Enzyms versetzt und in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Danach werden 5 µl 6x Ladepuffer zur DNA gegeben und in einem 0,8-1,2 % igen TAE-Agarosegel aufgetragen. Hierbei ist zu beachten, dass die visköse DNA-Lösung gut durchmischt wird. Es erfolgt die Auftrennung in der Elektrophorese.

Die Polyamidmembran und vier Whatman-Papiere werden auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Aus einer übereinander gelegten Strecke Frischhaltefolie wird mit einem Skalpell eine Öffnung so groß wie das Gel ausgeschnitten.

Anschließend wird das Gel in einer Schale mit 0,25 M HCl inkubiert bis der Indikator einen Farbumschlag nach gelb aufweist, der wichtig für eine ausreichende Zerlegung der DNA-Fragmente ist und somit eine bessere Übertragung gewährleistet. Nach 10-15 Minuten wird die Salzsäure abgegossen und das Gel mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgt das Äquilibrieren für 15 Minuten in 0,4 M Natronlauge (NaOH). Die positiv geladene Polyamidmembran wird mit Wasser befeuchtet und in 0,4 M Natronlauge äquilibriert.

In eine große Schale wird ein umgedrehter Gelschlitten gelegt, der mit einem Whatman-Papier-Streifen überspannt ist. Das Papier wird vorsichtig mit 0,4 M NaOH befeuchtet, sind Luftblasen über dem Gelträger vorhanden, müssen sie mit Hilfe einer Glaspipette vorsichtig herausgerollt werden. Nun wird die vorbereitete Frischhaltefolie zum Bespannen benutzt. Eventuelle Luftblasen müssen auch hier weggerollt werden. In die Folienöffnung werden zwei auf Gelbreite zugeschnittene in 0,4 M NaOH befeuchtete Whatman-Papiere eingelegt. Nach dem Glattrollen, wird das äquilibrierte Gel mit der Unterseite nach oben gelegt und die Membran luftblasenfrei darauf geschichtet. Zusätzlich zu zwei auf die Gelbreite zugeschnittene in 0,4 M NaOH befeuchtete Whatman-Papiere werden ein Stapel Zellulosetücher auf die Membran gelegt. Zum Beschweren kann schließlich über eine Glasplatte noch ein Gewicht auf den Stapel gelegt werden (vgl. Abb. 14). Über Nacht kann die Übertragung durch Kapillarkräfte stattfinden.

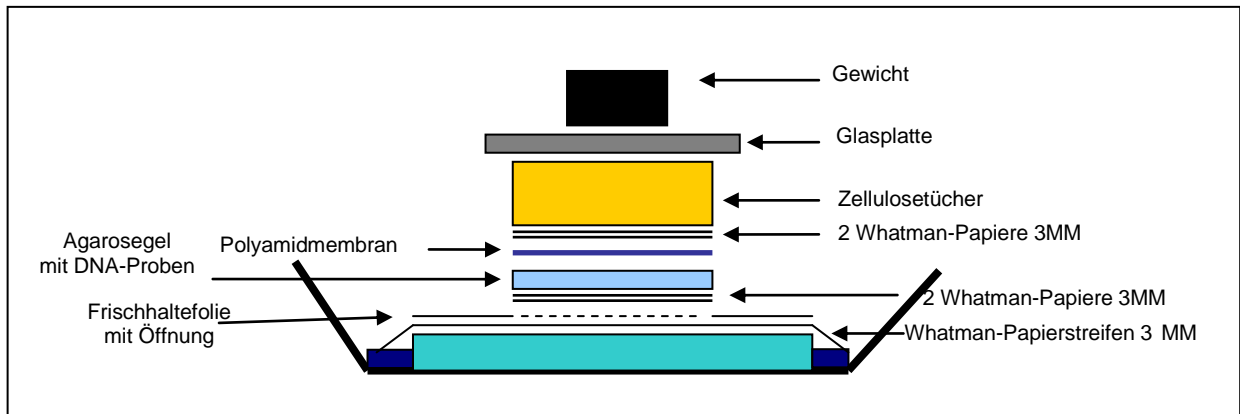


Abbildung 14: Aufbau des Southern Transfers für die Southern Blot-Analyse

Am folgenden Tag wird der Aufbau schichtweise abgebaut und die Membran in Frischhaltefolie bei 4°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

Radioaktive Markierung mit „Rediprime DNA Labelling System“

Mit Hilfe des Kits wird das radioaktive Markieren der Sonde mit $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten dNTPs durchgeführt. In einem Eppendorfgefäß werden 10-25 ng DNA-Sonde in einem Endvolumen von 45 μl TE bei 100°C für 10 Minuten denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wird der Ansatz in den Labelling Mix (Rediprime TM II von Amersham) pipettiert und vermischt. Dann werden 5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (spez. Aktivität 3000 Ci /mmol) zugegeben und es erfolgt eine Inkubation für mindestens 10 Minuten bei 37°C. Durch Zugabe von 5 μl 0,2 M EDTA kann die Reaktion gestoppt werden. Die nicht eingebauten Nukleotide werden über eine Sephadex-G 50 Säule abgetrennt. Die Probe wird 5 Minuten bei 100°C denaturiert und danach auf Eis gestellt. Anschließend bestimmt man die Aktivität der Sonde im Szintillationszähler.

Hybridisierungslösung: ExpressHyb Solution, Bioscience, Clontech, Heidelberg, Deutschland

Waschlösung 1 2x SSC; 0,5% SDS

Waschlösung 2 0,1x SSC; 0,1% SDS

5 ml der Hybridisierungslösung werden in ein Glasröhrchen für den Hybridisierungssofen gefüllt und die Membran so eingerollt, dass die mit DNA beladene Seite nach Innen liegt. Es ist zu beachten, dass die Membran nicht verletzt wird und keine Luftblasen zwischen Membranrückseite und Glaswand bestehen.

Die Prähybridisierung erfolgt unter Rotation im Hybridisierungsröhrchen bei 60°C. Nach 30 Minuten werden 40 μl Heringsperma DNA (10 mg/ml) zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten wird die vorher markierte Sonde zugegeben und die Membran mit der Sonde über Nacht bei 60°C hybridisiert.

Am folgenden Tag wird der Röhrcheninhalt in den radioaktiven Abfall entleert. Die Membran wird vorsichtig entnommen und mit 10 ml der Waschlösung 1 bei 60°C im Hybridisierungssofen für 5 Minuten gewaschen. Die Waschlösung wird im radioaktiven Flüssigkeitsabfall entsorgt. Nun folgt der nächste Waschschrift

mit 10 ml der Waschlösung 2, der mindestens zwei Mal durchgeführt werden soll. Auch diese Waschlösung ist im radioaktiven Flüssigkeitsabfall zu entsorgen. Die verbleibende Aktivität sollte 100-400 Zerfälle/Sekunde betragen. Anschließend wird die Membran vorsichtig aus dem Gefäß genommen, um in Frischhaltefolie eingeschlagen und über Nacht auf einer Phospho-Imager-Platte in einer Radioaktivitätskassette exponiert zu werden. Durch das Trocknen der Membran entsteht eine irreversible Bindung und somit wird nachträgliches Waschen und Rehybridisieren unmöglich.

Nach 1-2 Tagen wird der Film aus der Kassette entnommen und am Phospho-Imager detektiert. Das gescannte Bild kann dann am Computer bearbeitet und gespeichert werden.

2.2.20. Injektion von ES-Zellen in Blastozysten

Die Gewinnung von Blastozysten (C57Black6 Mäuse) und die Bereitstellung von pseudo-schwangeren Mäusen erfolgte durch PD Dr. Irmgard Hermans-Borgmeyer, ZMNH.

Gekühlte Blastozysten werden unter dem Injektor mit 12-15 runden, homogenen ES-Zellen injiziert. Nach dem Transfer wird aus den Blastozysten etwas Flüssigkeit abgesaugt, damit gewährleistet wird, dass die ES-Zellen in diesen verbleiben. Es werden pro Amme ca. 10-12 Blastozysten injiziert.

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit war die Herstellung eines konditionalen DDAH-2-K.O.-Vektors und die Überprüfung nach homologer Rekombination. Eine geeignete Vektorkarte ist in Abb. 15¶ dargestellt.

Zunächst wurde die Identität bereits vorhandener Vektorbestandteile überprüft. Anschließend erfolgten das Vektordesign und die Klonierung der noch notwendigen Bestandteile des Targeting-Vektors. Nach homologer Rekombination des Targeting-Vektors wurde eine ES-Zelllinie generiert, die als Ergebnis ein korrekt eingebautes Allel aufwies. Die erfolgreiche Rekombination musste noch mittels Southern Blot-Analyse und PCR überprüft werden und die anschließende Injektion in Blastozysten in scheinchwangere Weibchen konnte erfolgen.

3.1. Design des Targeting-Vektors

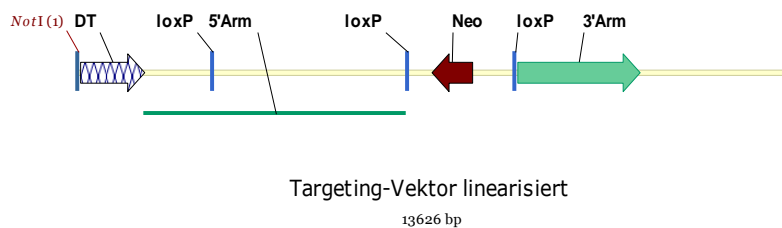


Abbildung 15: Vektorkarte des Targeting-Vektors. Die Karte enthält die Diphtherietoxin-Kassette (DT) zur negativen Selektion, die Neomycinresistenz-Kassette (Neo) als positiven Selektionsmarker, den 3'Arm (homologer Bereich, der im 3' Bereich des DDAH-2-Gens liegt, ca. 2,4 kbp) und den 5'Arm (enthält homologen Bereich im 5' Bereich einschließlich des DDAH-2-Gens, ca. 4,9 kbp). Als Balken sind die drei *loxP sites* eingezeichnet. Außerdem hat das Plasmid eine singuläre Not I-Schnittstelle, die auf der Karte an der Position 1 eingezeichnet ist. Der Gesamtvektor hat eine Größe von ca.13,6 kbp.

Zur Herstellung einer DDAH-2-K.O.-Maus muss die funktionelle Region ab dem Bereich des Exon 2 des DDAH-2-Gens bis zum Ende des Gens, flankiert durch 2 *loxP sites*, durch deren Einbringen deletiert werden, so dass nach *Cre*-Expression die DDAH-2 Expression supprimiert werden kann (vgl. Erklärung in der Einleitung). Durch das Verpaaren mit *Cre*-exprimierenden Mäusen kann dieses System das manipulierte Gen zellspezifisch oder zu einem bestimmten Zeitpunkt ausschalten. Die *loxP sites* befinden sich nicht in funktionellen Bereichen, so dass die mRNA- und Proteinsynthese vor *Cre*-Rekombination *in vivo* nicht beeinträchtigt wird.

Die Neomycinresistenz-Kassette (Neo-Kassette) dient als positiver Selektionsmarker, der ebenfalls von zwei *loxP sites* flankiert ist. Der Targeting-Vektor verfügt mit dem 3' bzw. 5'Arm, die die Neo-Kassette flankieren, über homologe Bereiche zu der genomischen Sequenz, was eine hohe Rate an homologen Rekombinationen in ES-Zellen zur Folge hat. Der 3'Arm enthält den homologen Bereich im 3' Bereich des DDAH-2-Gens (ca. 2,4 kbp), der 5'Arm den homologen Bereich im 5' Bereich (ca. 4,9 kbp), einschließlich des DDAH-2-

Gens. Auf diese Weise sind sowohl das DDAH-2-Gen als auch die Neo-Kassette von insgesamt 3 *loxP sites* gleicher Orientierung umrahmt. Die Cre-Rekombinase unterscheidet nicht zwischen den drei *loxP sites*. Die Diphtherietoxin A-Kassette (DT-Kassette) dient der negativen Selektion und wird bei homologer Rekombination nicht mitintegriert. Die Expression des Toxins wirkt jedoch bei zufälliger Integration im Genom tödlich.

3.2. Kontrolle bereits vorliegender Vektorbestandteile

Aus einem vorangehendem Projekt lagen bereits 2 Vektoren vor, die DDAH-2 spezifische Segmente enthielten (den 3' bzw. 5'Arm, die den homologen DNA-Bereichen im 3'Bereich bzw. im 5'Beriech des DDAH-2-Gens entsprechen). Diese dienten als Grundlage für den im folgenden generierten konditionalen DDAH-2-Knockout-Vektor.

Es wurde deshalb die Identität dieser Segmente mittels Restriktionsverdau der entsprechenden Ausgangsvektoren verifiziert.

3.2.1. Verifikation des 3'Arm-Vektors

Als erstes wurde das entsprechende Vektor-Material für den 3'Arm aus einem Glycerolstock für die Mini-Präration und auch für die Maxi-Präparation genutzt (siehe 2.2.9. bzw. 2.2.11.). Nach der Plasmid-Isolierung wurde ein Restriktionsverdau (siehe 2.2.2) mit verschiedenen Enzymen durchgeführt (vgl. Abb.17) Dieser Vektor enthielt die DT-Kassette, die Neo-Kassette flankiert von zwei *loxP sites* und den 3'Arm (vgl. Abb. 16). Im Folgenden wird dieser Vektor 3'Arm-Vektor genannt.

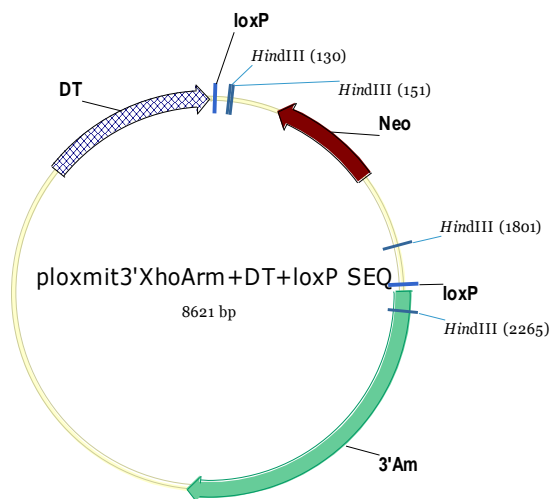


Abbildung 16: Vektorkarte des 3'Arms mit zwei *loxP sites* (als Balken dargestellt), der DT-Kassette zur negativen Selektion und der Neo-Kassette als positiven Selektionsmarker (als Pfeile dargestellt). Zur vereinfachten Darstellung sind die Restriktionsschnittstellen für Hind III, einer Restriktionsendonuklease, beispielhaft in diesem Vektor dargestellt. Mit Hilfe dieser Karte wurden weitere geeignete Restriktionsenzyme für den folgenden Restriktionsverdau ausgewählt. Im folgenden wird dieser Vektor als 3'Arm-Vektor bezeichnet.

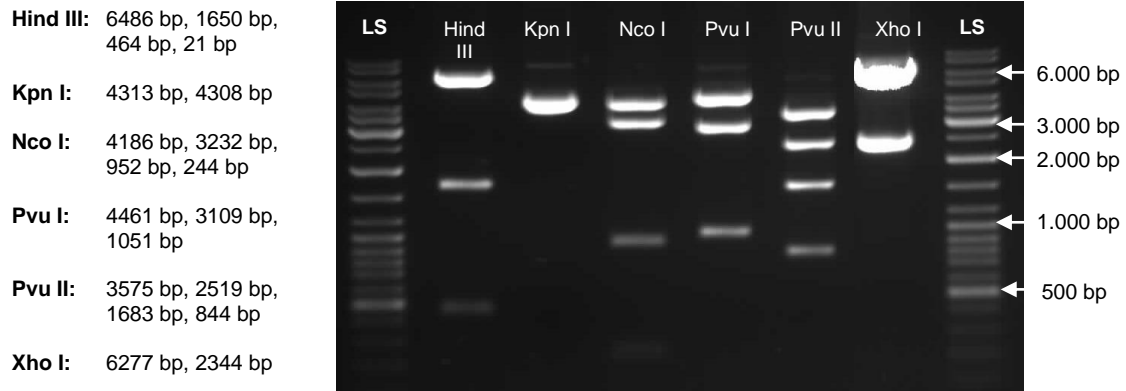


Abbildung 17: Überprüfung der Identität des 3'Arm-Vektors mit verschiedenen Restriktionsenzymen. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Die Enzymnamen sind über den jeweiligen Spuren gekennzeichnet. Die erwarteten Fragmente sind für jedes Enzym tabellarisch daneben aufgelistet.

Ergebnis der Überprüfung:

Die anhand der Vektorkarten errechneten Fragmentgrößen wurden durch den Restriktionsverdau bestätigt (vgl. Abb.17)

Mittels Sequenzierung wurden die wichtigsten Bestandteile dieses Vektors (DT-Kassette, Neo-Kassette, *loxP sites*, 3'Arm) verifiziert.

3.2.2. Verifikation des 5'Arm-Vektors

In analoger Weise wurde der Vektor mit Bestandteilen des 5'Armes einem Kontrollverdau unterzogen. Dieser Vektor enthielt den 5' homologen Bereich mit dem DDAH-2-Gen integriert in pGEM teasy. Dieser Vektor wird folgend als 5'Arm-Vektor bezeichnet.

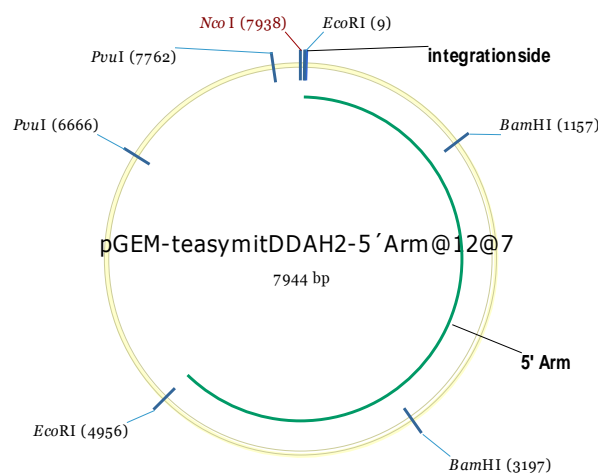


Abbildung 18: Vektorkarte mit dem 5'Arm (5' homologer Bereich mit dem DDAH-2-Gen) in pGEM teasy. Dargestellt sind die Restriktionsschnittstellen für ausgewählte Enzyme. Nco I hat eine singuläre Schnittstelle an der Position 7938, Bam HI, Eco RI und Pvu I haben zwei. Die Integrationsseite markiert die Stelle, an der der 5'Arm mit Hilfe der Eco RI-Schnittstelle eingebracht wurde. Im folgenden wird dieser Vektor 5'Arm-Vektor genannt.

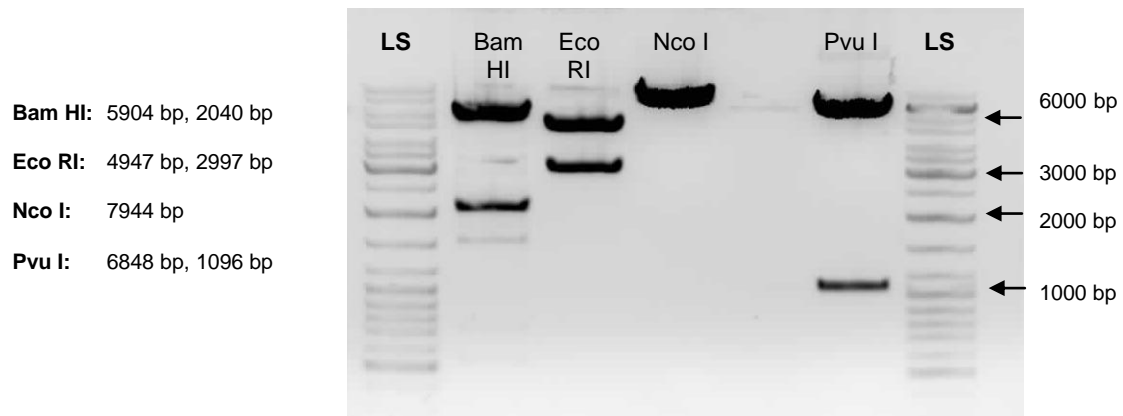


Abbildung 19: Überprüfung der Identität des 5'Arm-Vektors mit verschiedenen Restriktionsenzymen. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Die Enzymnamen sind über den jeweiligen Spuren gekennzeichnet. Die erwarteten Fragmente sind für jedes Enzym tabellarisch daneben aufgelistet.

Ergebnis der Überprüfung:

Auch hier konnte anhand des Musters der Fragmente aus dem Restriktionsverdau die Identität des Vektors bestätigt werden (vgl. Abb. 19).

Zur Generierung des 5'Armes für den konditionalen Knockout-Vektor fehlt nun im 5'Arm-Vektor die dritte *loxP site*.

3.3. Identifikation einer geeigneten Restriktionsschnittstelle für das Einbringen der *loxP site*

In der DDAH-2-Sequenz der NCBI- Datenbank wurde der jeweilige *branch point* ermittelt (Gooding et al. 2006, Tsai et al.2007). Das Ergebnis ist in Abb. 20 dargestellt

Da der kodierende Bereich in Exon 2 beginnt, muss die dritte *loxP site* in dem ersten Intron eingebracht werden.

Für das Einbringen der dritten *loxP site* in den Bereich zwischen Exon 1 und 2 wurden verschiedene Möglichkeiten evaluiert.

1. Möglichkeit:

Aus einem bereits existierenden Targeting-Vektor die *loxP*-Sequenz mit einem gewissen Abstand mittels zweier Primer und PCR herauskopieren. Hierbei ist zu beachten, dass der Anfang und das Ende des „Primer-Stranges“ zu dem Strang passen, wo die *loxP*-Sequenz integriert werden soll. Dabei werden ca. 100 bp in das Intron 1 ligiert. Kritisch zu betrachten ist hierbei die Tatsache, dass mit der *loxP*-Sequenz auch Fremd-DNA mit integriert werden würde. Durch die Gefahr der Mutation könnten neue Splice-Stellen entstehen und dies könnte eventuell zu weiteren unerwünschten Komplikationen führen. Deswegen wurde dieser Weg nicht eingeschlagen.

Ddah2

cgccccgccccatcgtcgtacgtgagctcgcctaccctgggaaccctcaaaagcccagctatccgtctctcc
agcttgaggactcagactcccacatcttcattaactctctcctctggtggggtggggccaaggctgaaatcacaaggct
gcaggagtggagggtggccgctggtgagctctgaagagggggctgtctccgaaacgggatggggagactggagtttg
ggggtgctgcatacgtccctgcaccggacggagtggtgcaataacctgcacttggggaagagctgggcggggta
gactttagaagatggacaggggtacggagttctgaagcctggagtggtccacgcgcgcgccctccccgtttct
ccgcctccagatttcgtttaagacctctccagctcctccgggactaagtctggtttgtactgggtcgtcgaag
ggcagcgtgacgaccggggtggagagagaggatgcttaactccttagattctagttcctcgggtttgcgcccgt
ttccctttctccttcgagcatacgggacttcacacccaggctcctgattcaccacccagttttctttccagctcc
tataacctctgcgggtccctggcaggactttgggtccctcctcgtcgcgagcagctgaggggtaagggggcggggc
cgccgcatttttggggagtgagcgcacccctagcggctgccaggagggggcgggggcagggaacctagcggagcccc
gagcaggggcaacaggtgtttgggagattaaggatccaagcttggttcccttggggcctcttaaagcagatccc
cggtgaaaggaggctgagcggggtccacagagccagaaggtttggaggggggtggggcagagtgaggaggggcgct
ggagatggcaggaggaagacctaggagcttttaaacactaccctctctcttttgcagtgtctttctcttctacc
cccacccctttctgtttctctcttagaccagtgaagtcaagagaaaaacaaaacagcttggctggaaggggct
tcggtgtggatgtgatggggacgcgggggaggggctgggtcgttggttcccatgccctgatccgggggtgtccccg
agagcttggcatccgggaaggtgctggcgtggctctccggctctggacctggctaaagctcaaagggagcatg
gagtagtaggagtaaaactgaggcaacgactagggtgcagctgcttgaactgcctcctgaggagctcactgccgc
tgggaccactgcttggtgacacggctgtgatccaaggagacacggccctaatcacaaggccctggagcccagcac
gtaggcctgaggtgaggaccgggtgcgggtgtgttggagaacaggattgcgcgggggtggggtggaagaaggctc
aggggaggaggctggatgtctgggattggcagaaaataggagtgaggatgtctctgcctgctctctctctccca
aggttgatggagtgcgtaaagccctccaggacttgggactccgaattgtggagatgggggatgagaatgcgacgc
tggacggcaccgacgtcctcttcaccgggtgaggcaacggatggctcagcacctatgtgggcttggcaaggggaagca
gagtttgggagactaggagatctcaggtcttgactccaaactcactctggccttcaaaccttcgcacccctcccg
gattcaggccgggagttttctgtaggctctccaagtggaccaatcatcgaggagctgagatcgtggcagacacg
ttccgggtgaggaaccagagaagtttggagaatgagtgcgcccaatagccagagggcttgacctgtgctcctta
cgcaccttaaatcctcctgctcttctaggaactctgctgtctcaacgggtaccggctcaggctcctcgcacctgc
cgccctctgtggtgggggacctcgcaccgtgggtggctggaagcagcagggctgcccaaaaagcagtcaggg
tgaggcgggtcagggctatggtgaaggcgtggtcaacaaagtggcggtggttttagggcacagaagttgcctagct
ctgggaattgcccaacccttgtcttactaagatgttcagctaatacaaaaggacaccctagtaatgatgggg
tacagaagaacaagagtaggggaggggttgcaaaaggcagcggtagctaaagtgcctgagacgactgtgtctgt
cacagcaggcattatatacttgtgtcattatctcaaaaagtaacccttaccccaagatcttactttgtggtag
gtcaggcactactcagctgtggagacctcaatgccctcttctctctccaggcaatggcagcgtgactgatcacc
cctacgcctctctgacctcccagatgatgcagctagtactgtctcttctctgctcctgggttgctgctgcca
caccttctcctcgcaccgagggtggggacctgcccaacagccaggaggtgagggaggggaaaaaccgccccac
caaccagagaaagcagctctgtcttccagtggggagaaaggagggggccatcctcagaagcctgggtgggaccca
ctgggaactggctagaggggggttgtggctctgttatcaaaacatccttggggctcctccctgcaggctctgcaga
agctctctgatgtcaccctggtacctgtgtcctgctcagaactggagaaggctggagctggcctcagctccctct
gctggtgctcagcacacgccccactgctgagggcctggatttggggatcccactggttaggaatagagctgta
tagtgggtagaatcagctaataagaggtgggtagttgtggggagatgccccaggataggggaaggacttagtggtg
aaaagaatagaagccattgggtgagtcctctctgtcaaaaccaataaaaataaaattgaccttttagataa

gt donor site

ag acceptor site

Polypyrimidintrakt

eventueller branch point

Abbildung 20: Dargestellt ist die Sequenz des DDAH-2-Gens. Nach Gooding et al. 2006 wurden die entsprechenden Stellen farbig markiert. Die drei Elemente am Ende des 3'Endes humaner Introns beinhalten den branch point, den Polypyrimidintrakt und die AG-Dinukleotid-Acceptor site. Diese drei befinden sich üblicherweise innerhalb der letzten 40 Nukleotide des Introns.

2. Möglichkeit:

Die ausgewählte Sequenz beinhaltete die erste Hälfte des Bereiches zwischen Exon 1 und 2 und wurde auf der Internetseite <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> eingegeben. Die 37 vorgeschlagenen Restriktionsenzyme, die in dem vorgegebenem Bereich einmal schneiden, wurden in Vektor NTI 9.0 einzeln kontrolliert, wie oft sie im 5'Arm-Vektor bzw. im Targeting-Vektor schneiden. Vieler dieser Restriktionsenzyme hatten viel zu viele Schnittstellen (bis zu 35) im gesamten 5'Arm-Vektor, so dass sie für eine Schnittstelle zum Einbringen der *loxP* nicht geeignet waren.

Der ausgewählte Bereich für die *loxP*-Integration wurde erweitert und die Suche nach entsprechend einmal schneidenden Restriktionsenzymen dieses Mal auf der Internetseite <http://www.restrictionmapper.org/> erneut gesucht.

Bei dieser Suche ergaben sich einige Restriktionsenzyme, die aufgrund ihrer Restriktionsschnittstellen im gesamten Vektor in Frage kamen. Dazu gehörten Bcg I, Ahd I, Sse 8647 I, Avr II (vgl. auch Abb. 21).

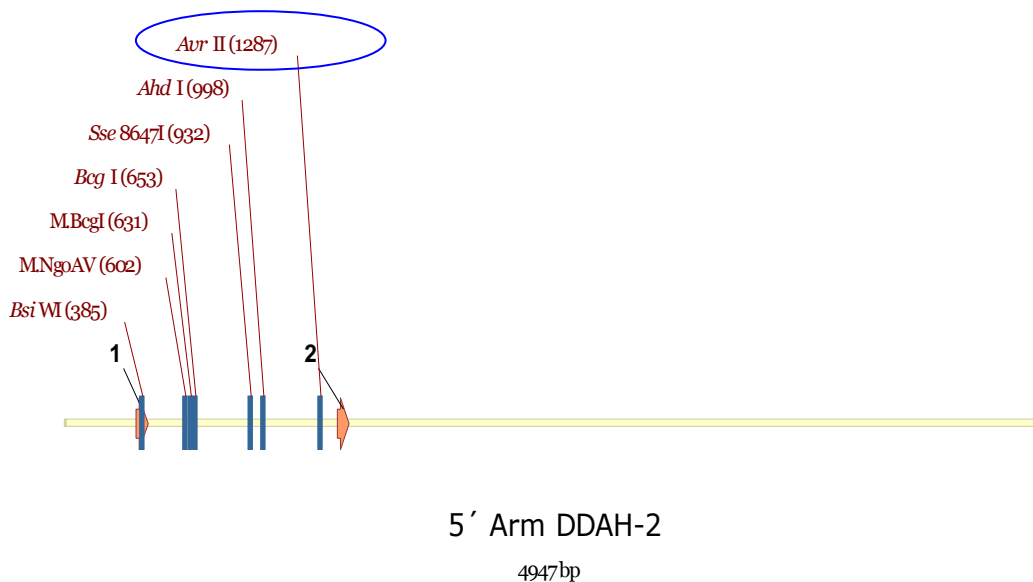


Abbildung 21: Dargestellt ist der 5'Arm homologer Bereich des 5'Arm-Vektors. Es sind die Restriktionsschnittstellen im Bereich zwischen Exon 1 (1) und 2 (2) des DDAH-2-Gens eingezeichnet, die für die *loxP* site-Integration in Frage kommen. Die Avr II-Schnittstelle ist die Restriktionsschnittstelle, die für die Weiterarbeit genutzt wurde. Zur Verdeutlichung ist diese eingekreist.

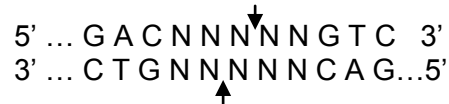
Bei näherer Betrachtung konnten wiederum einige Enzyme ausgeschlossen werden.

Bcg I hat folgende Erkennungssequenz:

$$\begin{array}{ccccccc}
 5' & \downarrow & \dots & {}_{10}(\text{N}) & \text{C G A} & (\text{N})_6 & \text{T G C} & (\text{N})_{12} & \downarrow & 3' \\
 3' & \dots & {}_{12}(\text{N}) & \text{G C T} & (\text{N})_6 & \text{A C G} & (\text{N})_{10} & \uparrow & & 5'
 \end{array}$$

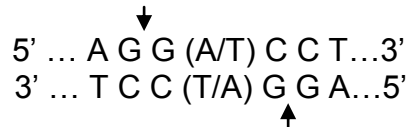
Wie man daran sehen kann, schneidet dieses Enzym sehr unspezifisch und außerdem ohne Überhänge. Zudem ist es methylierungssensitiv.

Ahd I (= Eam 1105 I) hat folgende Erkennungssequenz:



Auch hier besteht das Problem des unspezifischen Schneidens, was für die Weiterarbeit nicht förderlich ist. Dieses Enzym ist aber nicht methylierungssensitiv.

Sse 8647 I hat folgende Erkennungssequenz:



Dieses Enzym ist aber nicht in den üblichen Katalogen vorhanden, so dass weitere Recherchen notwendig wurden. Es stellte sich heraus, dass Sse 8647 I ein relativ neues Enzym ist, das ein pH-Optimum von 9 und ein Temperatur-Optimum bei 30°C hat. Bei den üblichen 37°C zeigt dieses Enzym eine Aktivität von nur 20% (vgl. Ishino et al. 1995).

Als weiteres Kriterium stellte sich heraus, dass dieses Enzym gar nicht käuflich zu erwerben ist.

Aufgrund der etwas spezifischeren Restriktionsschnittellen - im Vergleich zu den vorherigen - wurde nach Isoschizomeren gesucht.

Dabei ergaben sich folgende Isoschizomere:

Sau 96 I = Cfr 13I



Ppu M I = Psp 5 II



Eco 0109 I



Ava II = Eco 47 I



Leider schneiden diese Enzyme viel zu oft im 5'Arm-Vektor. Zudem gibt es auch unspezifische Restriktionsschnittstellen.

Avr II = Xma JI



Dieses Enzym hat eine einzige Schnittstelle kurz vor dem Exon 2, aber dieser ist noch vor dem *branch point* (vgl. Abb. 20).

Dieses Enzym arbeitet bei einer Inkubationstemperatur von 37°C und weist keine kritischen Besonderheiten auf.

In einem Probeverlauf bestätigte sich, dass XmaJI tatsächlich auch nur einmal im 5'Arm-Vektor schneidet (vgl. Abb. 22).

Somit wurde dieses Restriktionsenzym für das Einbringen der *loxP* site und zur Weiterarbeit ausgewählt.

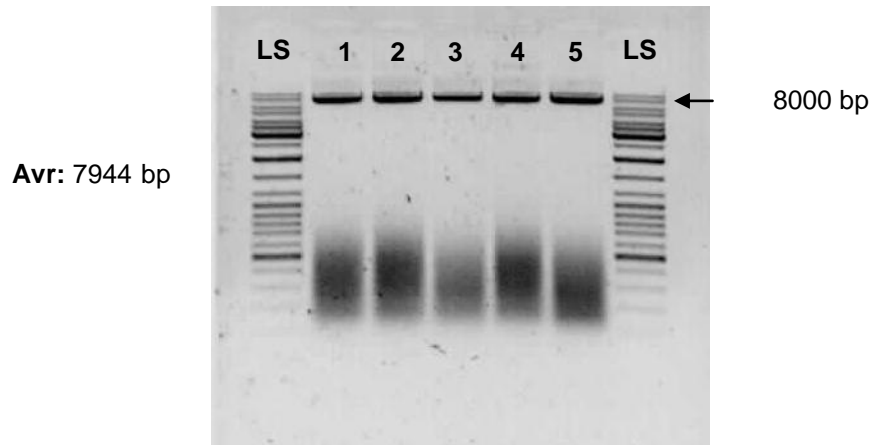


Abbildung 22: Restriktionsverdau des 5'Arm-Vektors mit Avr II/XmaJI. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Mehrere 5'Arm-Klone des 5'Arm-Vektors sind mit Avr II verdaut bzw. linearisiert worden und in den 5 Taschen aufgetragen.

Hierbei steht der Gedanke im Vordergrund mit Avr II einen Restriktionsverdau durchzuführen, um ein Insert zu integrieren, das aus der *loxP*-Sequenz und den auf beiden Seiten ergänzenden Avr II-Schnittstellen besteht (siehe Abb. 23). Aus einer Avr II-Schnittstelle werden somit zwei, dazwischen liegt die *loxP*-Sequenz.

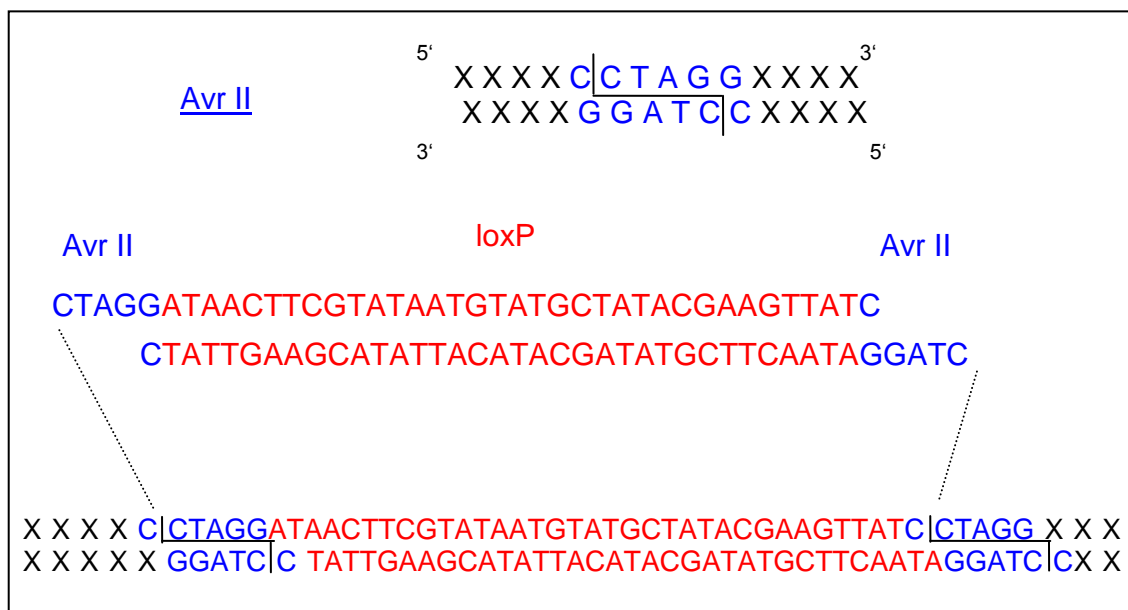


Abbildung 23: Schematische Darstellung einer Avr II-Restriktionsschnittstelle (blau) im oberen Teil der Abbildung. Die *loxP* site-Sequenz (rot) ist in einem schematisch entworfenen Insert mit den auf beiden Seiten ergänzenden Avr II-Schnittstellen-Überhängen in der Mitte dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Situation nach Einbau des Inserts, bei der eine

Restriktionsschnittstelle für Avr II auf beiden Seiten ergänzt und verdoppelt wird, dazwischen liegt dann die *loxP site*.

Da die *loxP site*-Sequenz nur aus 34 Basen besteht, kann man nach einer Ligation mit dem obig beschriebenen Insert nicht durch Restriktionsverdau mit Avr II überprüfen, ob eine Integration stattgefunden hat. Deshalb wurde nach einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle gesucht, die mit der *loxP site*-Sequenz mit eingeführt werden konnte und die es ermöglichte, nach der Ligation mittels Restriktionsverdau zu überprüfen, ob ein Einbau stattgefunden hat.

Für dieses zusätzliche Restriktionsschnittstelle war von Bedeutung, wie oft sie im 5'Arm-Vektor und wie oft sie dann im Targeting-Vektor vorhanden ist.

3.4. Identifikation von Restriktionsenzymen für eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle im neuen Insert

Um eine *loxP site* in den Vektor einzubringen, ist es sinnvoll in diesem Insert eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle einzufügen, mit deren Hilfe hinterher überprüft werden kann, ob das Insert eingebaut worden ist.

Mittels Vektor NTI 9.0 wurden Restriktionsenzyme identifiziert, die eine oder zwei Restriktionsschnittstellen im 5'Arm-Vektor besitzen und gleichzeitig im Targeting-Vektor Fragmentgrößen bieten, die gut zu unterscheiden und darzustellen sind. **Nae I** und **Nco I** erfüllten diese Bedingungen und gehören außerdem zu den gängigen Restriktionsenzymen.

Nach erfolgter homologer Rekombination wird diese zusätzliche Restriktionsschnittstelle zudem noch von Bedeutung für die Detektion bei einer Southern Blot-Analyse sein, die eine Unterscheidung zum Wildtyp ermöglicht.

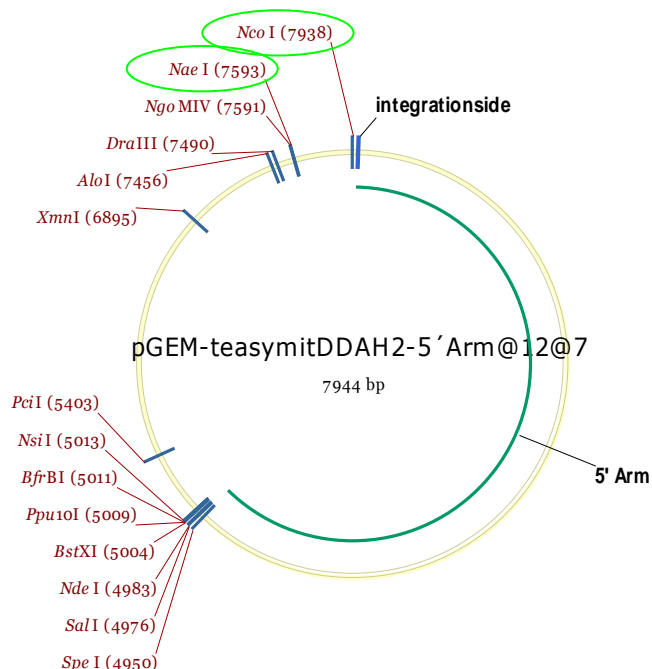


Abbildung 24: 5'Arm-Vektor mit eingetragenen Restriktionsenzymen, die für eine zusätzlich eingeführte Schnittstelle in Frage kommen könnten. Die günstigsten Restriktionsenzyme sind Nco I und Nae I, die beide in der Abbildung eingekreist sind. Die Integrationside kennzeichnet die Stelle, an der der 5'Arm integriert wurde.

Die beiden geeigneten Restriktionsenzyme ergeben in beiden Vektoren unterscheidbare Fragmente:

Nae I

Zu erwartende Fragmente im 5'Arm: 6299 bp, 1645 bp

Zu erwartende Fragmente im Targeting-Vektor: 5113 bp, 4340 bp,
2714 bp, 1459 bp

Nco I

Zu erwartende Fragmente im 5'Arm: 4306 bp, 3684 bp

Zu erwartende Fragmente im Targeting-Vektor: 4400 bp, 4186 bp,
3232bp, 1564bp, 244 bp

Zunächst wurde mit Nae I als zusätzliche Schnittstelle gearbeitet. Aber als die Ligationen erfolglos blieben, wurde auf die Alternativ-Schnittstelle Nco I zurückgegriffen.

3.5. Design des neuen *loxP*-Inserts und Ligation in den 5'Arm

Das neue Insert muss also außer der *loxP*-Sequenz noch die Sequenz einer zusätzlichen Schnittstelle (Nco I oder Nae I) haben um aus der einfach vorhandenen Avr II-Schnittstelle, die zum Einbringen genutzt wird, zwei zu komplettieren (vgl. hierfür auch Abb. 26). Entsprechend der Abb. 25 wurden zwei einzelne Oligonukleotid-Stränge designt, die bei MWG bestellt wurden. Diese mussten zunächst einmal zum überhängenden Doppelstrang angelagert werden (siehe 2.2.6).

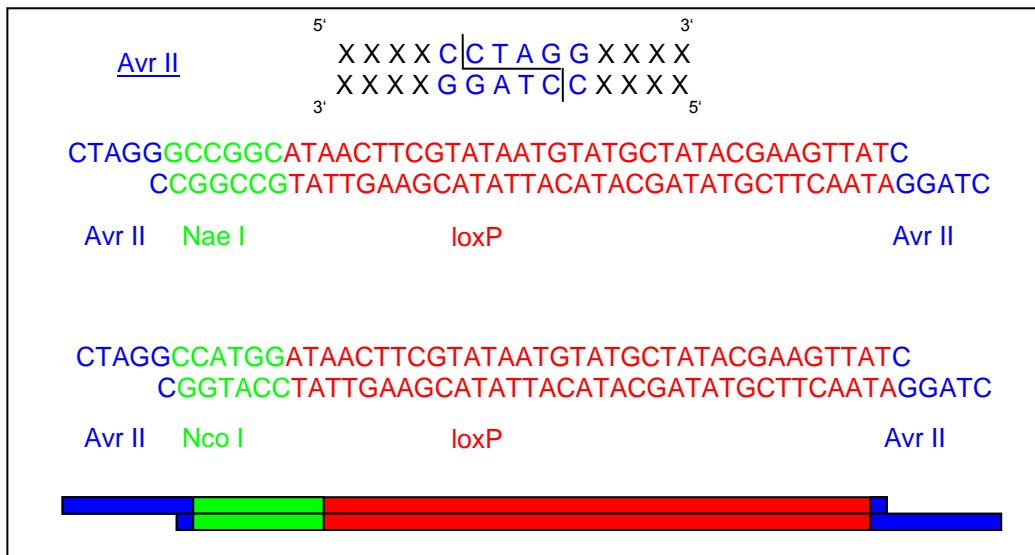


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer Avr II-Restriktionsschnittstelle (blau) im oberen Teil der Abbildung. Neues Insert bestehend aus zwei zu komplettierenden Avr II-Schnittstellen mit Überhängen an beiden Enden, eine zusätzliche Nco I/Nae I-Restriktionsschnittstelle (grün) und der *loxP*-Sequenz dazwischen (rot).

Zur Weiterarbeit wurde die Sequenz von Nco I für das Einbringen einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle ausgewählt.

In Abbildung 26 sieht man den schematischen Ablauf der Versuchsdurchführung. Nach der Linearisierung des 5'Arm-Vektors mit Avr II, wird eine Ligation mit dem neu designtem Insert (Avr II - Nco I - loxP site - Avr II) durchgeführt.

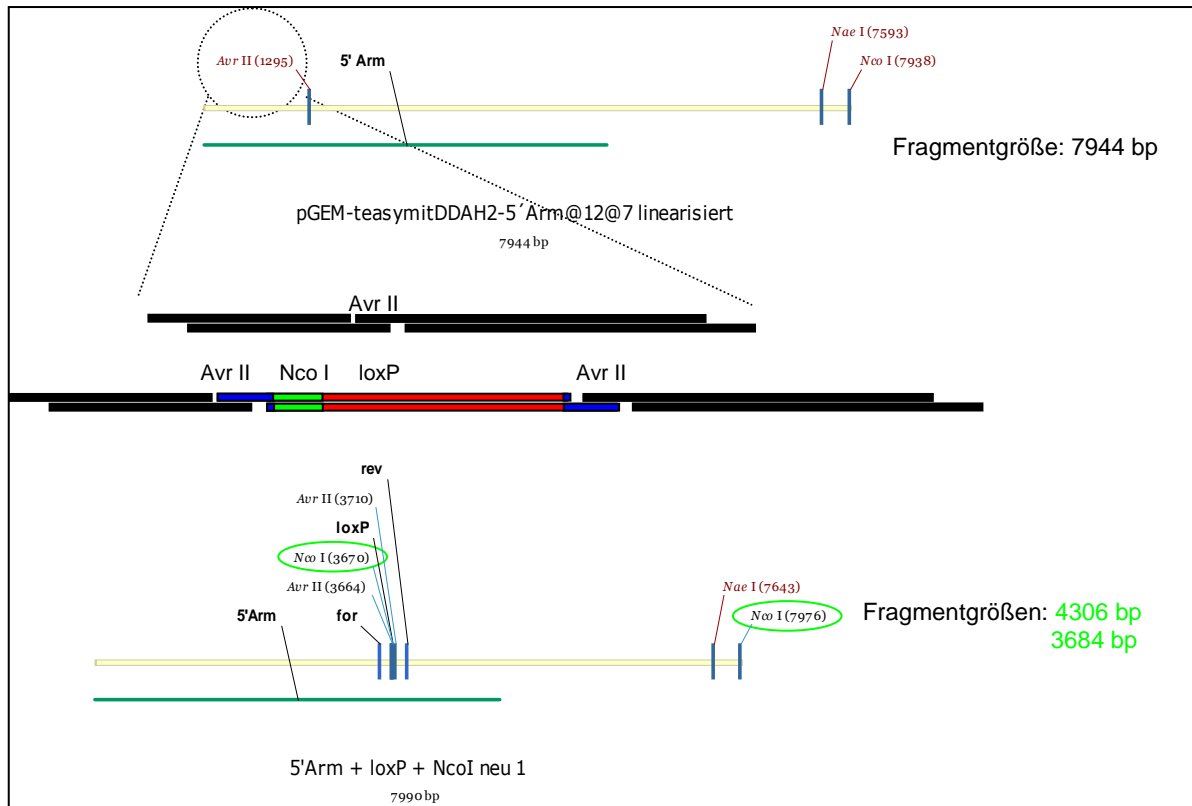


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Restriktionsverdau und der anschließenden Ligation mit dem designten Insert. Der 5'Arm-Vektor ist im oberen Abschnitt linearisiert dargestellt und die Restriktionsschnittstellen für Avr II, Nco I und Nae I sind durch Balken markiert. Angenommen es findet ein Restriktionsverdau mit Avr II statt. Dann ergibt sich das Bild, was aus dem Kreis in der Mitte der Abbildung als Vergrößerung dargestellt ist. Das neue Insert wird in die überhängenden Enden des linearisierten Vektors ligiert. Schließlich sind aus einer Avr II und Nco I-Restriktionsschnittstelle zwei geworden und die loxP site befindet sich dazwischen. Die zu erwarteten Fragmentgrößen sind am rechten Rand gekennzeichnet.

Das Ergebnis dieser Ligation (siehe 2.2.7) ist, dass aus einer Schnittstelle für Nco I zwei entstanden sind. Dies beweist, dass das Insert mit den Überhängen eingebaut worden ist. Diese Tatsache wurde durch ein Restriktionsverdau mit Nco I verifiziert (siehe Abb. 27).

Die in Frage kommenden Klone sind in Abb. 27 oval markiert. Nun wurde anhand der Doppelbande festgestellt, dass das Insert eingebaut wurde, aber nicht in welcher Orientierung.

Da die Avr II-Schnittstelle im Insert palindromisch ist, kann sie so eingebaut werden, dass es zwei verschiedene Reihenfolgen gibt.

Entweder

Avr II- Schnittstelle (SSt) - Nco I-SSt - loxP site - Avr II-SSt

oder

Avr II-SSt - loxP site - Nco I-SSt - Avr II-SSt.



Abbildung 27: Überprüfung der Integration des neuen überhängenden Inserts nach Ligation in den 5'Arm-Vektor durch Restriktionsverdau mit *Nco* I. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Verschiedene Klone, deren DNA nach der Ligation überprüft wurde, sind mit 1-12 gekennzeichnet. Die erwarteten Fragmente sind links aufgelistet. Das Insert wurde in den oval markierten Spuren (2, 6, 8, 9), die Doppelbanden zeigen, eingebaut, bei den restlichen Klone wurde der 5'Arm nur linearisiert, somit wurde das Insert dort nicht eingebaut.

Mittels Sequenzierung (2.2.13) wurde die Orientierung der *loxP* site in den in Frage kommenden Klone nach der Ligation zweifelsfrei bestätigt (Abb. 28).

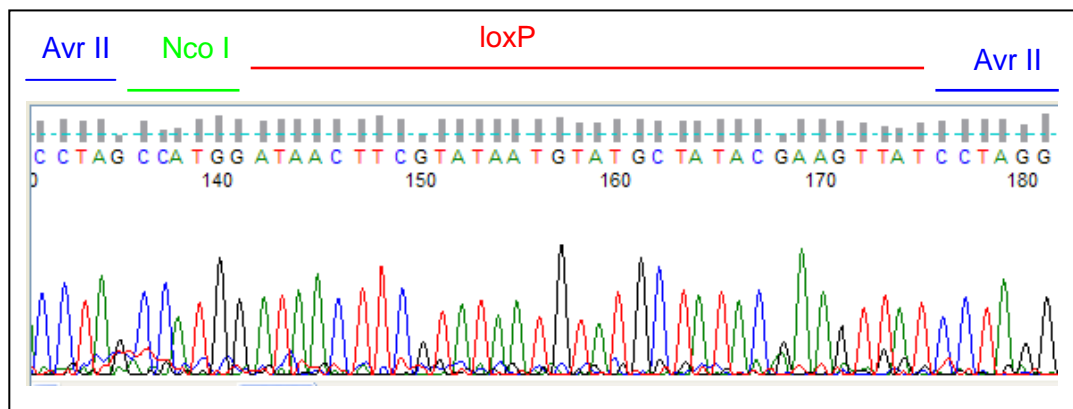


Abbildung 28: Chromatogramm der Sequenzierung eines richtig eingebauten Inserts. Im oberen Abschnitt ist der Bereich mit einem farbigen Strich gekennzeichnet, der die *Avr* II-Schnittstelle (blau), die *Nco* I-Schnittstelle (grün) und die *loxP* site (rot) darstellt. Im unteren Abschnitt sind die 4 verschiedenen Basen je nach Detektion in ihrer jeweiligen Farbe dargestellt. Je stärker das Signal ausfällt, desto besser kann eine Base zugeordnet werden.

3.6. In „silico“-Bestätigung der Vektorsequenzen

Schließlich wurden die zum Mausgenom homologen Bereiche (3' bzw. 5'Arm) mittels Doppelblast-Suche in der ncbi-Datenbank mit dem Mausgenom verglichen. Das Ergebnis ist in Abb. 29 dargestellt und bestätigt die Lokalisation der Arme.

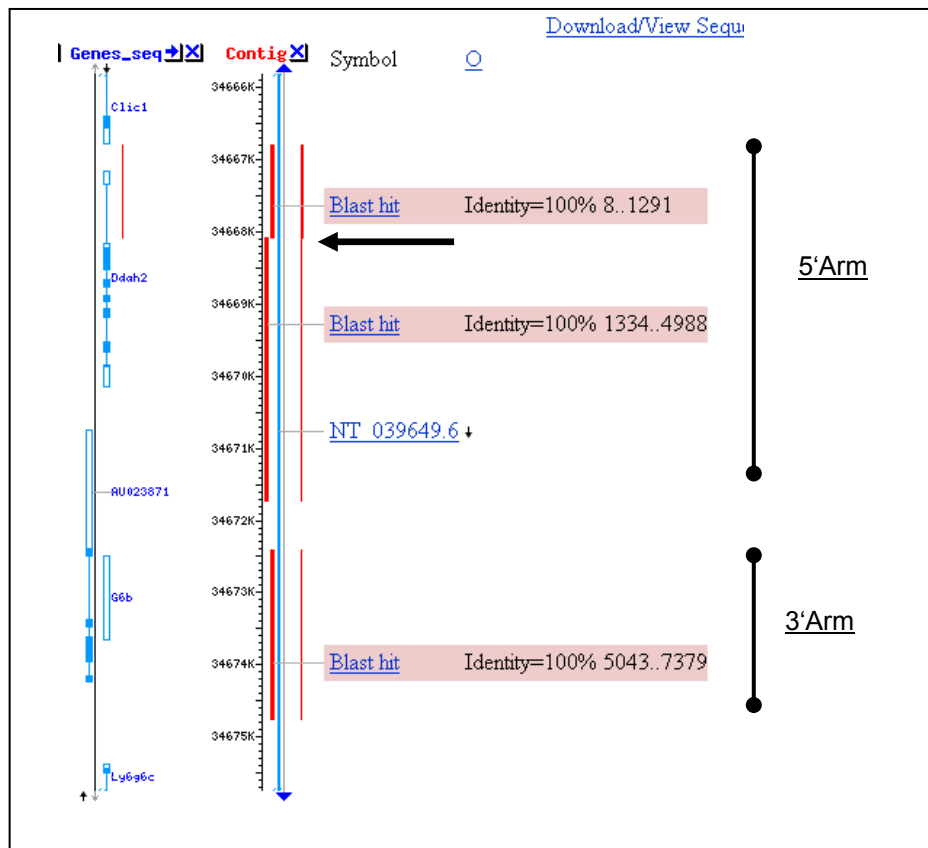


Abbildung 29: Doppelblast-Suche der homologen Bereiche (3'Arm, 5'Arm) und Vergleich mit dem Mausgenom, im DDAH-2-Gen-Bereich. Der kleine Knick im 5'Arm, der mit einem schwarzem Pfeil gekennzeichnet ist, bezeichnet die Stelle, in der die *loxP* site integriert wurde, die im Wildtyp-Genom natürlich nicht vorkommt.

Nach eindeutiger Identifikation der abzuklärenden Elemente, wurde der Targeting-Vektor konstruiert.

3.7. Konstruktion des Targeting-Vektors

Für die Konstruktion des Targeting-Vektors mussten beide Vektoren einem Restriktionsverdau unterzogen werden. Der 5'Arm wurde mit Eco RI aus dem pGEM teasy-Vektor isoliert und in den 3'Arm-Vektor ligiert.

Zunächst wurde der 3'Arm-Vektor mit Eco RI linearisiert (siehe Abb. 30).

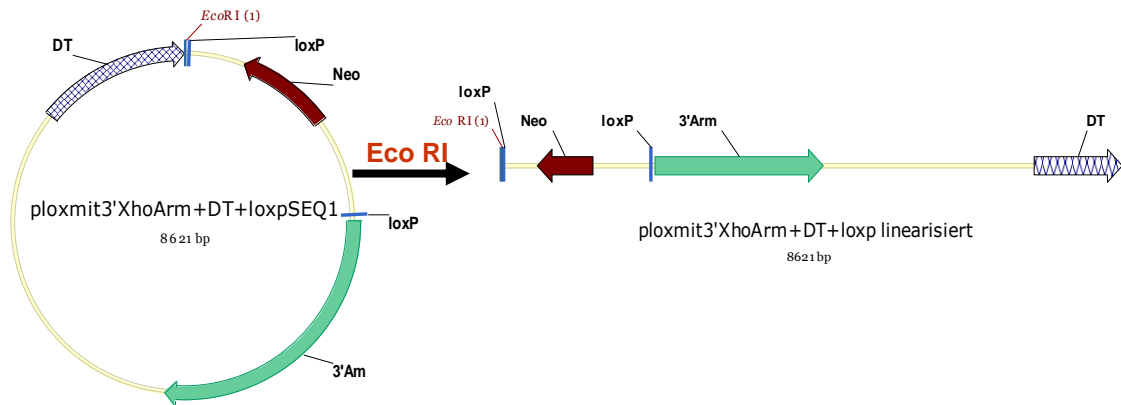


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Linearisierung des 3'Arm-Vektors durch Eco RI. Links ist der Vektor zirkulär mit den entsprechenden Elementen dargestellt: die DT-Kassette zur negativen Selektion, die Neo-Kassette als positiven Selektionsmarker, der 3'Arm als homologen Bereich (alle als Pfeile dargestellt), die beiden *loxP sites* und die singuläre Eco RI-Schnittstelle sind als Balken gekennzeichnet. Nach Restriktionsverdau mit diesem wird der Vektor linearisiert und es entsteht der rechte Abschnitt der Abbildung.

Analog hierzu wurde der 5'Arm-Vektor auch mit Eco RI verdaut (erwartete Fragmentgrößen: 5005 bp, 2985 bp) und auf ein Gel aufgetragen, um nach einer Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion nur mit der 5005 bp langen Bande (modifizierter 5'Arm) weiterzuarbeiten

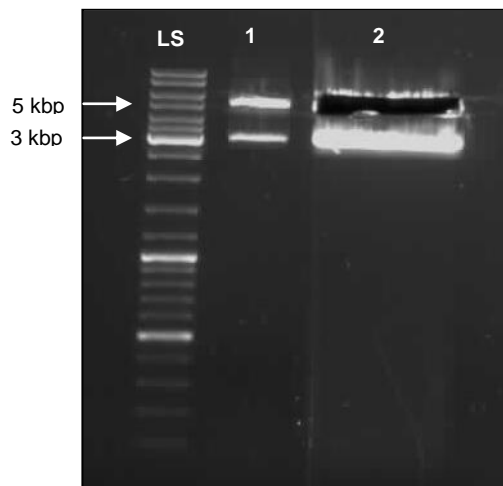


Abbildung 31: Gelexzision des 5'Arm-Vektors. Links ist ein Längenstandard (LS), der es erlaubt die Fragmentgrößen zu bestimmen. Die zu sehenden Banden in der ersten Spur liegen bei ca. 5 kbp (modifizierter 5'Arm) und 3 kbp (pGEM teasy-Vektor). In der zweiten Spur ist die Bande bei 5 kbp ausgeschnitten und für die Gelextraktion verwendet worden, um den 5'Arm zu isolieren und für eine Ligation zu nutzen.

Abbildung 32 zeigt den schematischen Ablauf der Ligation von den 5'Arm- und 3'Arm-Elementen, die zum Produkt des Targeting-Vektors führen.

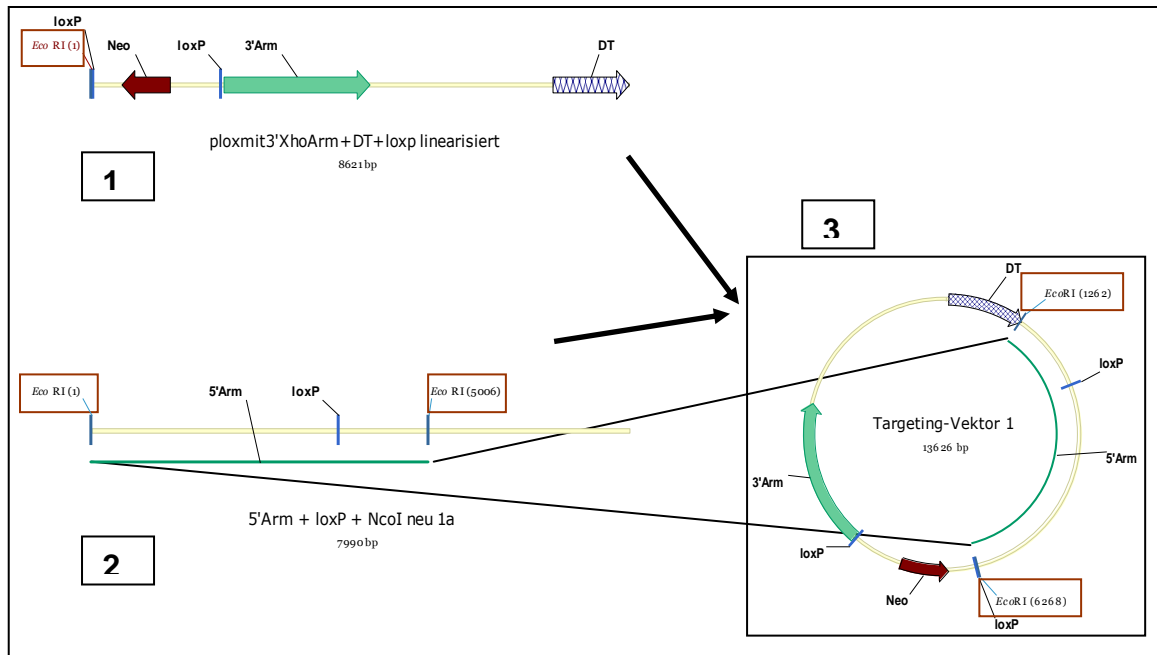
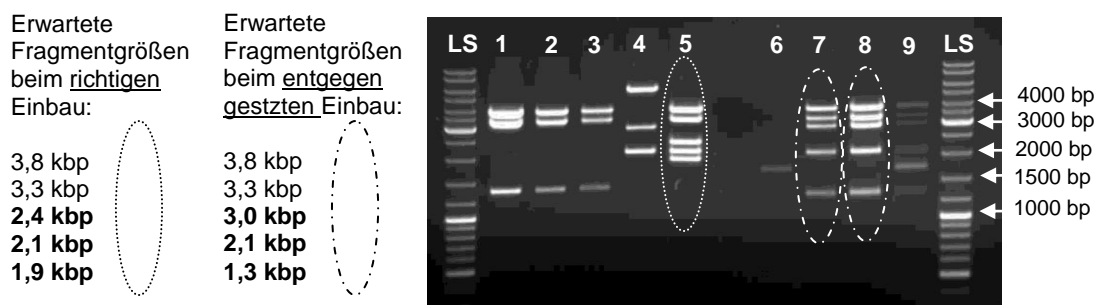


Abbildung 32: Schematische Abbildung über die Ligation des Targeting-Vektors. Der 3'Arm-Vektor (1) liegt mit seinen Elementen (DT-Kassette, Neo-Kassette, 3'Arm und den zwei loxP sites) linearisiert durch Eco RI vor. Der 5'Arm-Vektor (2) mit der dritten loxP site wurde auch einem Eco RI-Restriktionsverdau unterzogen. Das ca. 5 kbp entstehende lange Fragment wird für die Ligation benötigt. Das restliche ca. 3 kbp Fragment ist nicht Bestandteil des Targeting-Vektors. Für eine eindeutige Auswahl wurde der Restriktionsverdau auf einem Gel elektrophoretisch getrennt, extrahiert und ausschließlich mit der ca. 5 kbp-Bande weitergearbeitet. In 3 schließlich ist der Targeting-Vektor mit allen Elementen (DT-Kassette, Neo-Kassette, 5'Arm, 3'Arm und die drei loxP sites) dargestellt. Es ist anzumerken, dass aus der ursprünglich singulären Restriktionsschnittstelle für Eco RI im 3'Arm-Vektor aufgrund der Ligation mit einem Eco RI-Überhang eine weitere hinzugetreten ist, die als Balken in 3 gekennzeichnet ist.

3.8. Verifikation des Targeting-Vektors

Die Überprüfung des neu ligierten Targeting-Vektors wurde durch ein „Screenings-Restriktionsverdau“ mit Bam HI und vorausgegangener Berechnung der zu erwartenden Fragmentgrößen durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Abb. 33 dargestellt. Dabei wurden drei Klone identifiziert, von denen einer den richtigen Einbau zeigt.



Restriktionsverdau mit Bam HI

Abbildung 33: Restriktionsverdau der Targeting-Vektor-Ligation mit Bam HI. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Verschiedene Klone, deren DNA

nach der Ligation überprüft wurde, sind mit 1-9 gekennzeichnet. Die erwarteten Fragmente sind links aufgelistet. Klon Nr. 5 zeigt die erwarteten Fragmente bei einem korrekten Einbau (gepunktet). Klon Nr. 7 und 8 haben den manipulierten 5'Arm auch integriert, allerdings in entgegengesetzter Form (gestrichelt).

Die Identität des vorangehend identifizierten Targeting-Vektors wurde durch einen erweiterten Restriktionsverdau mit anderen Restriktionsenzymen bestätigt (siehe Abb. 34).

Schließlich wurden noch alle wichtigen Elemente des Targeting-Vektors (DT-Kassette, Neo-Kassette, *loxP sites*) mittels Sequenzierung überprüft, die zu einer korrekten Bestätigung der jeweiligen Elemente führte.

Somit bestätigte sich nun, dass der für die homologe Rekombination benötigte Targeting-Vektor vorlag.

Bam HI:	3,8 kbp, 3,3 kbp, 2,4 kbp, 2,1 kbp, 1,9 kbp
Eco RI:	8,6 kbp, 5 kbp
Hind III:	10 kbp, 1,6 kbp, 1,3 kbp, 0,4 kbp
Kpn I:	6,5 kbp, 4,3 kbp, 2 kbp, 0,8 kbp
Nco I:	4,4 kbp, 4,2 kbp, 3,2 kbp, 1,6 kbp
Not I:	13,6 kbp
Pvu I:	8,1 kbp, 4,4 kbp, 1 kbp
Xho I:	11,3 kbp, 2,3 kbp

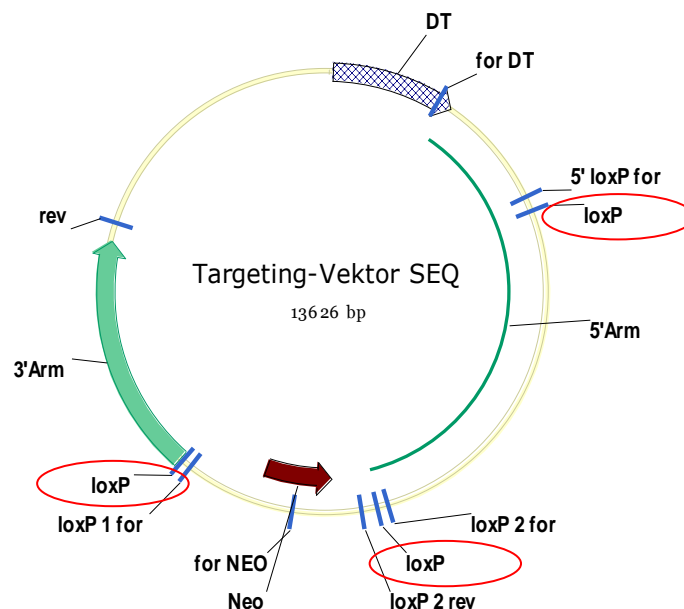
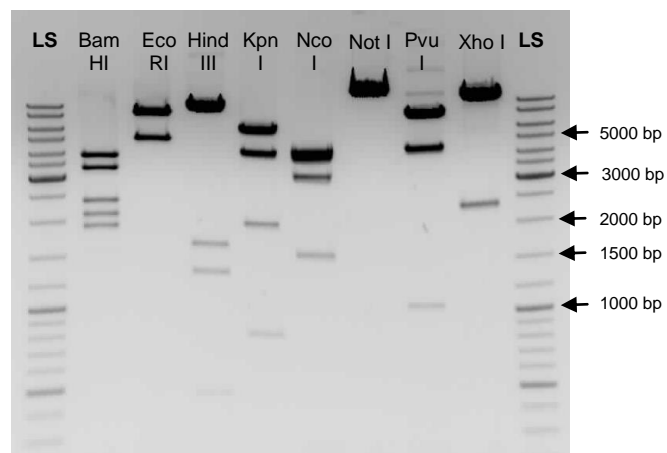


Abbildung 34: Im oberen Abschnitt: Restriktionsverdau des Targeting-Vektors mit verschiedenen Enzymen. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Die Restriktionsenzymnamen sind über den Spuren gekennzeichnet. Die erwarteten Fragmente sind links gerundet aufgelistet. Im unteren Abschnitt ist die Vektorkarte des Targeting-Vektors mit den wichtigen Elementen (DT-Kassette, 5'Arm, die drei *loxP sites*, Neo-Kassette, 3'Arm)

und den dazugehörigen Primern (für die Sequenzierung) eingezeichnet. Die drei *loxP sites* sind rot umkreist.

3.9. Überprüfung der Funktionalität der *loxP*-Sequenzen

Wesentlich für den Erfolg der späteren konditionalen Knockout-Maus ist die Funktionalität der *loxP sites*. Diese sollte vor der eigentlichen Elektroporation des Vektors in embryonale Stammzellen überprüft werden. Hierzu wurden *Cre*-Rekombinase exprimierende *E.coli*-Bakterien eingesetzt, die die *loxP sites* flankierenden Bereiche spezifisch erkennen und durch das *Cre/loxP*-System deletieren. Bei funktionellen *loxP sites* wird erwartet, dass nach Restriktionsverdau mit *Not I* im DNA-Gel neben dem linearisierten Targeting-Vektor bei 13,6 kbp eine weitere Bande bei 7,8 kbp auftritt, die den verkürzten Vektor nach erfolgreicher Exzision, entspricht.

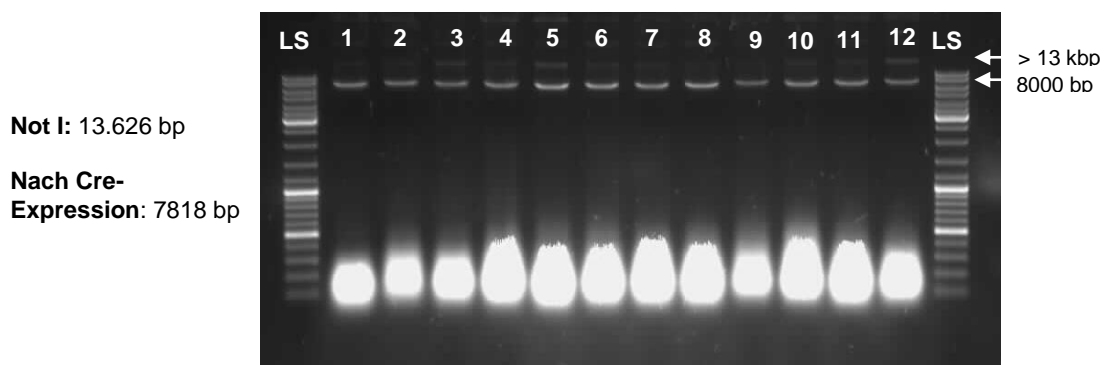


Abbildung 35: Restriktionsverdau des Targeting-Vektors mit *Not I* aus den Plasmidisolierungen (1-12) *Cre*-exprimierender *E.coli*-Bakterien. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Die Bande über 13,6 kbp stellt den linearisierten Targeting-Vektor dar, die Bande bei ca. 8 kbp bestätigt die Funktionalität der *loxP sites*, denn die deletierte Größe (ca. 5 kbp) entspricht dem von den *loxP sites* eingerahmten Bereich

Somit ist das anfangs beschriebene Ziel, einen konditionalen K.O.-Vektor zu generieren, erreicht worden (vgl. Abb.35 und 36).

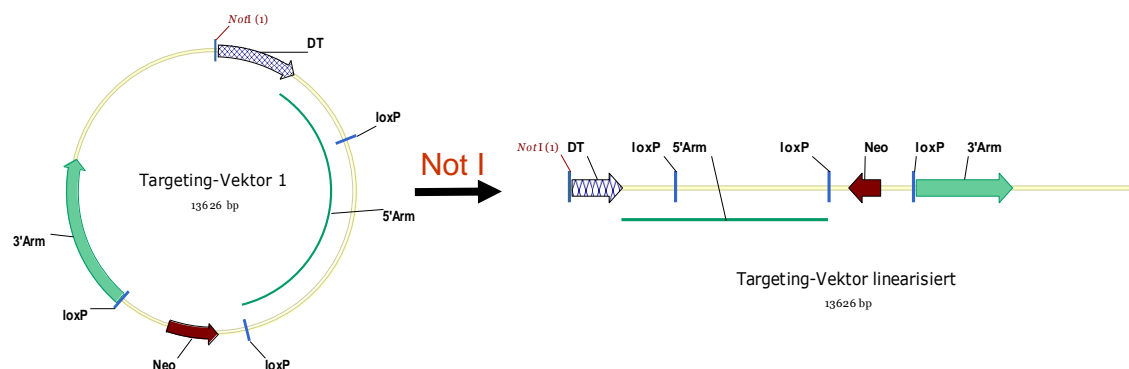


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Linearisierung des endgültigen Targeting-Vektors durch *Not I*. Links ist der Vektor mit seinen wichtigen Elementen (DT-Kassette, die drei *loxP sites*, 5'Arm, Neo-Kassette, 3'Arm) dargestellt. Die singuläre *Not I*-Restriktionsschnittstelle (Position 1) und die *loxP sites* sind als Balken eingezeichnet. Rechts liegt der Targeting-Vektor schematisch linearisiert vor und zeigt das anfangs beschriebene Ziel.

3.10. Homologe Rekombination in ES-Zellen

Im Nächsten Schritt erfolgte das Einbringen des linearisierten Targeting-Vektors in ES-Zellen. Um die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination zu steigern, wurde in diesem Projekt mit genomischer DNA gearbeitet, die von den später benutzten ES-Zellen (R1) stammt.

Bei der Elektroporation von R1-Zellen wurden folgende Rekombinationsereignisse erwartet.

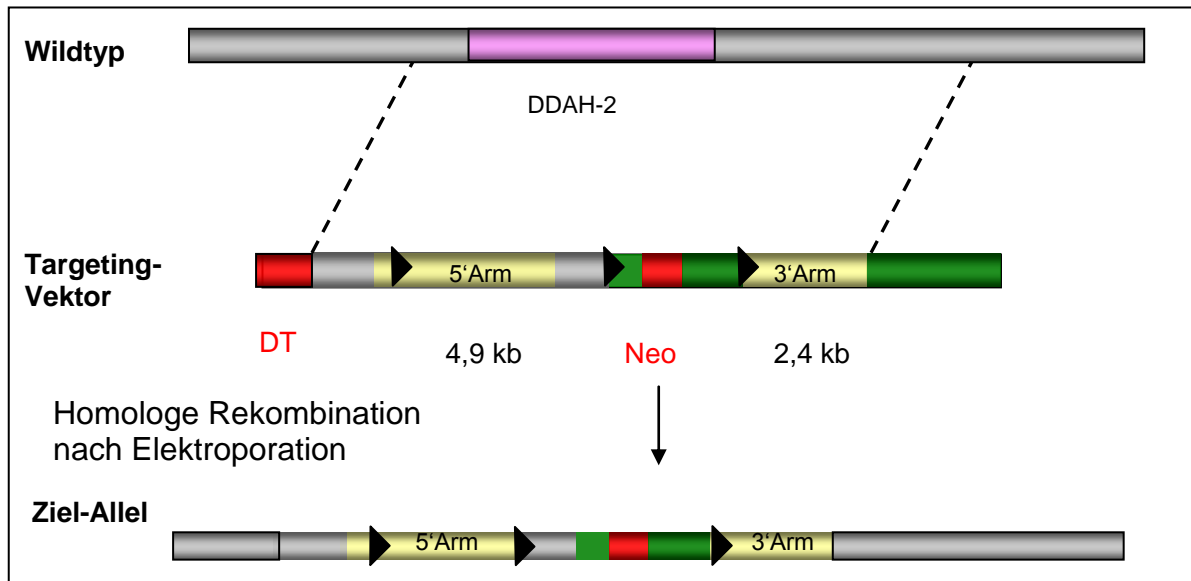


Abbildung 37: Schematische Darstellung der homologen Rekombination mit dem Ziel-Allel als Ergebnis. In der obersten Zeile ist das Wildtyp-Allel mit dem DDAH-2-Gen dargestellt. Der Targeting-Vektor in der zweiten Zeile enthält das Gen für Diphterietoxin A (DT), das Neomycin-Resistenzgen (Neo) und zwei homologe DNA-Bereiche (5'Arm und 3'Arm). Außerdem sind drei *loxP sites* dargestellt, die für die Deletion durch Cre-Rekombinase notwendig sind, als schwarze Dreiecke eingezeichnet. Zwei flankieren das Neomycin-Resistenzgen und eines liegt im ersten Intron des DDAH-2-Gens. Das Diphterietoxin A-Gen wird durch homologe Rekombination, jedoch nicht nach zufälligem Einbau des gesamten Targeting-Vektors, entfernt. Somit dient es als negativer Selektionsmarker. Das Neomycin-Resistenzgen dient als positiver Selektionsmarker, da nach Integration des Targeting-Vektors in das Genom der ES-Zellen, diese gegen G418 resistent sind. Nach Linearisierung des Targeting-Vektors erfolgte die Elektroporation in ES-Zellen. Durch homologe Rekombination wurden G418-resistente Zellklone mit einem Ziel-Allel (dritte Zeile) erhalten.

Nach der Elektroporation des linearisierten Targeting-Vektors und anschließend erfolgter homologer Rekombination in ES-Zellen, kam es zu einem Einbau der mit *loxP sites* versehenen Vektorsequenzen (Ziel-Allel) (vgl. hierzu Abb. 37).

Nach erfolgter Elektroporation wurden nun Klone mit korrekt eingebautem Vektor für 7 Tage mit G418 positiv selektiert. Bei den Klonen, die nach einer Selektionsphase von 7 Tagen dank ihrer Neomycin (bzw. G418) -Resistenz überlebt hatten, konnte davon ausgegangen werden, dass das Neomycinresistenz-Gen in ihrem Genom stabil integriert wurde.

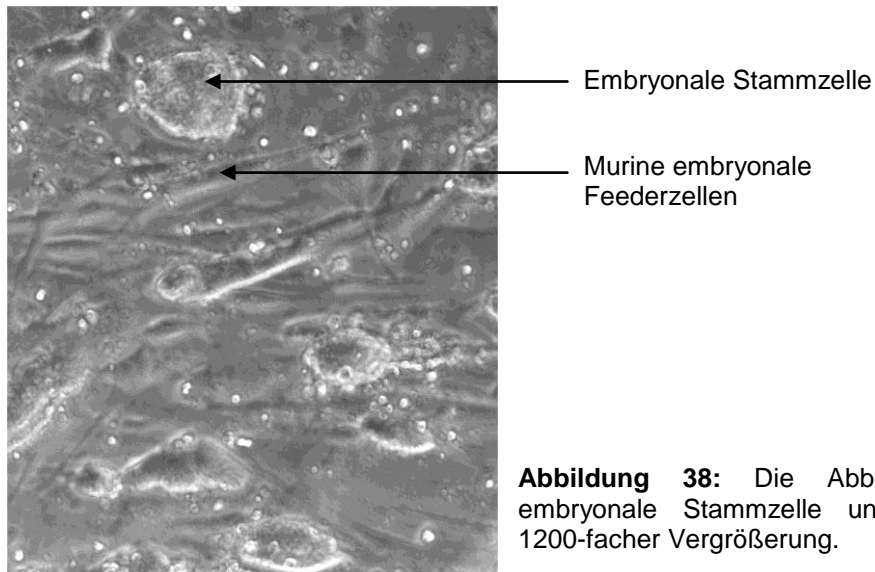


Abbildung 38: Die Abbildung zeigt eine embryonale Stammzelle und Feederzellen in 1200-facher Vergrößerung.

Um der zufälligen Integration vorzubeugen, besaß der Targeting-Vektor auch eine Diphterietoxin-Kassette als negativen Selektionsfaktor. Bei zufälliger Integration würde Diphterietoxin A exprimiert werden, was die Zellen nicht überleben könnten. Somit wird die Wahrscheinlichkeit noch weiter erhöht, dass nach erfolgter homologer Rekombination die Zellen, die überleben auch höchst wahrscheinlich das Ziel-Allel tragen.

3.11. Detektion der homologen Rekombination

Für die Detektion der homologen Rekombination wurden Southern Blots und PCR der positiven ES-Zell-Klone nach G418-Selektion durchgeführt.

Genomische DNA wurde aus den ES-Zellen präpariert.

Für die Southern Blot-Analyse wurden entsprechend aufgearbeitete Sonden (2.2.18) verwendet. Als Restriktionsenzyme für die 3'-Sonde kommen Bgl I und Bgl II in Betracht; für den 5'-Sonde Eco RI und Nco I.

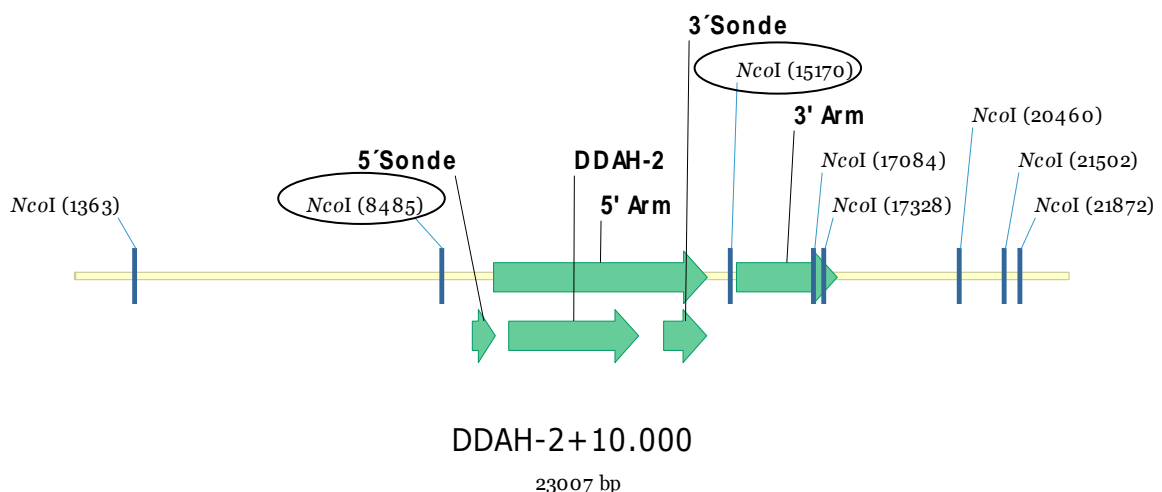


Abbildung 39: Darstellung des DDAH-2-Gens mit 10.000 angrenzenden Basenpaaren, Zudem sind die 5'-Sonde (532 bp lang) und die 3'-Sonde (1002 bp lang) an den entsprechenden Bereichen eingezeichnet. Die Nco I-Restriktionsschnittstellen sind als Balken eingezeichnet. Zu beachten ist, dass beim Wildtyp-Allel eine Fragmentgröße von 6,7 kbp zwischen den markierten Nco I-Schnittstellen zu erwarten ist.

Zum „Screenen“ der ES-Zellklone wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Diese Analyse wurde mit mehr als 300 Klonen durchgeführt. Die Klone, die positiv zu sein schienen, wurden mittels PCR-Reaktion und daran anschließender erneuter Southern Blot-Analyse verifiziert.

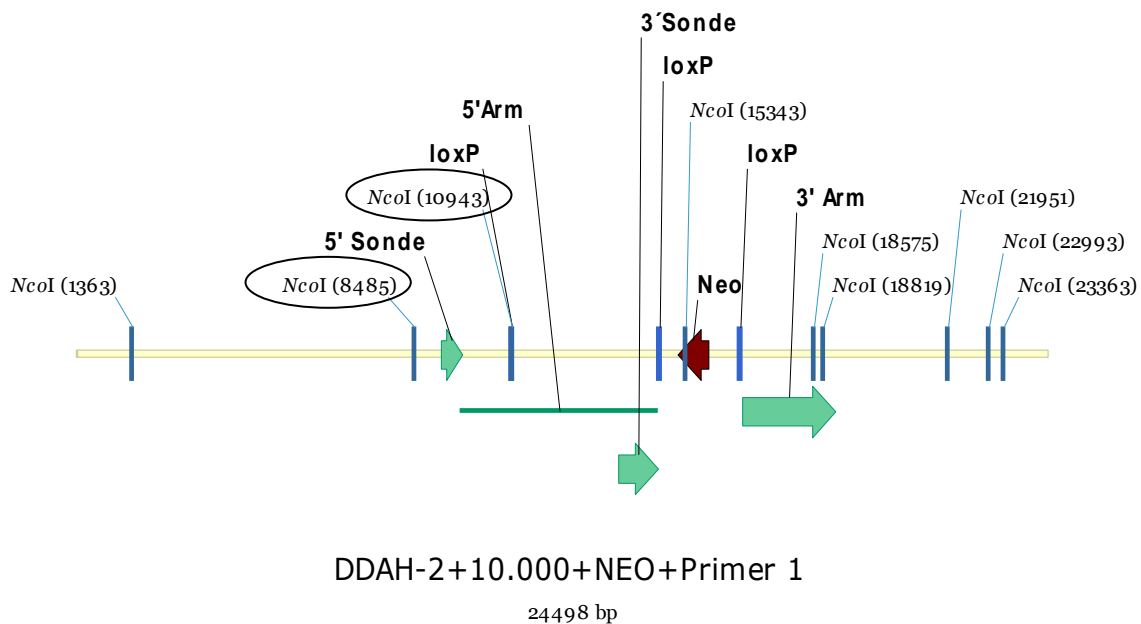
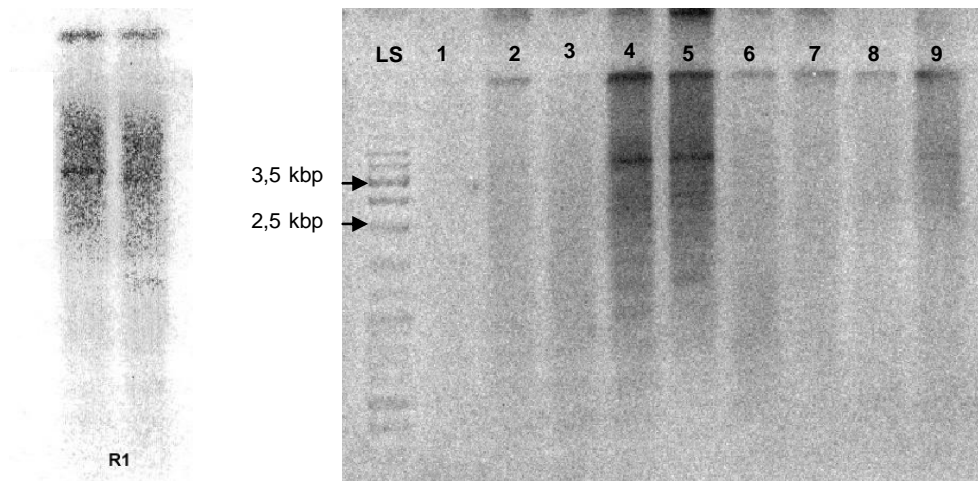


Abbildung 40: Darstellung des DDAH-2-Allels nach erfolgter homologer Rekombination mit dem Targeting-Vektor. Als Pfeile erkennbar sind die beiden Sonden, die Neo-Kassette und der 3'Arm. Zudem sind die *loxP* sites und die für die PCR angewendeten Primer für die 5'-Sonden-Herstellung als Balken eingezeichnet. Die 5'-Sonde (532 bp lang) und die 3'-Sonde (1002 bp lang) sind an den entsprechenden Bereichen eingezeichnet. Die *Nco* I-Restriktionsschnittstellen sind als Balken dargestellt. Zu beachten ist, dass beim Ziel-Allel eine Fragmentgröße von 2,5 kbp zwischen den markierten *Nco* I-Schnittstellen zu erwarten ist.

Bei dem Ergebnis der Southern Blot-Analyse kam es zu einer Besonderheit, die sich wie folgt erklären lässt. Die erwartete Fragmentgröße für den Wildtyp lag bei 6,7 kbp. Bei der durchgeführten Southern-Blot-Analyse kam eine Bande bei ca. 4 kbp heraus. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass die ES-Zellen aus einem anderen Mausstamm (129/SV) als die Blastozysten-Zellen (C57Black 6 mouse) stammen. Da es für den ES-Zell-Stamm keine öffentliche Sequenz gibt, musste mit der verfügbaren Sequenz gearbeitet werden. Das Ergebnis des Wildtyp Southern Blots stellt somit den Standard zur Verfügung, mit der die Southern-Blot-Analyse des Ziel-Allels interpretiert werden kann. Es ist also eine Doppelbande zu sehen, weil ein Allel dem Wildtyp-Allel entspricht und das andere dem Ziel-Allel. Somit wurde bestätigt, dass die Elektroporation erfolgreich war (vgl. Abb. 41).



Wildtyp Southern Blot

Abbildung 41: Rechts: Ergebnis der Southern Blot-Analyse der ES-Zell-DNA nach Restriktionsverdau mit *Nco* I. Neben der 4 kbp-Bande ist in Probennummer 4 und 5 eine weitere bei 2,5 kbp sichtbar. Diese zweite Bande lässt auf eine Integration des Targeting-Vektors schließen. Die 4 kbp-Bande entspricht nicht den ausgerechneten Werten, da aber die Wildtyp-Bande links die entsprechende Fragmentgröße auch aufweist, wird dieses als Standard zum Vergleich genommen. Eine Bande entspricht dem Wildtyp-Allel, das andere dem Ziel-Allel.

3.12. DDAH-2 Genotypisierungs-PCR

Die aus dem Southern Blot hervorgegangenen positiven Klone wurden für die PCR weiter verifiziert.

Für die PCR wurden zunächst 3 Primer gewählt, die im Endbereich der 5'-Sonde, im 5'Arm und am Anfang der Neo-Kassette liegen. Als PCR-Produkte waren 2,6 kbp für den Wildtyp und für den Targeting-Vektor zusätzlich noch ein PCR-Produkt von 3,6 kbp zu erwarten.

Da die erste PCR nach wiederholtem Versuch nicht erfolgreich war, wurden neue Primer gesucht, die nun als PCR-Produkte 2,7 kbp für den Wildtyp und 3,9 kbp für den Targeting-Vektor ergeben sollten. Auch diese PCR führte nicht zum Erfolg. Schließlich wurde die Taq-Polymerase von Fermentas gegen das PCR Extender Kit (Triplemaster) von Eppendorf ausgetauscht. Hierbei ist zu beachten, dass 2 Mastermixe angesetzt werden müssen. Eins enthält die DNA mit allen Primern und Wasser, der andere enthält den Puffer, die dNTPs, Wasser und die Taq-Polymerase. Auch hier wurde kein positives Ergebnis festgestellt. Nachdem alle Fehlerquellen ausgeschlossen waren (Karten kontrolliert, Primer-Orientierung überprüft, Fragmentgrößen kontrolliert), wurde auf der Repeat Masker-Seite <http://www.repeatmasker.org/> das PCR-Produkt aus der Vektorkarte eingegeben. Das Ergebnis war, dass diese Sequenz im PCR-Produkt ca. 30% SINES (short-interpersed-nuclear-elements) enthält. Diese SINES können zu Hairpin- oder Loop-Strukturen führen. Dies legte nahe, dass die DNA geknäult war und die PCR so nicht funktionieren konnte. Um diesem Umstand entgegenzuwirken, wurden die Bedingungen der PCR geändert.

Tab.3 Tabellarische Übersicht der bisherigen PCR-Bedingungen und der jeweiligen Änderungen

	PCR alt	PCR neu
Erste Denaturierung	94°C, 2 min.	95°C, 5 min.
Zyklusdenaturierung	94°C, 20 sek.	95°C, 1 min.
Annealing	Gradient 54- 64°C 20 sek	Gradient 50-60°C 1 min.
Elongation	72°C, 4 min.	68°C, 1 min.
Finale Elongation	72°C, 4 min.	68°C, 4 min.
Anzahl der Zyklen	25	30

Schließlich wurden 4 verschiedene, neue Primer und die in Tabelle 3 aufgeführten Veränderungen gewählt, die paarweise relativ kleine PCR-Produkte ergaben.

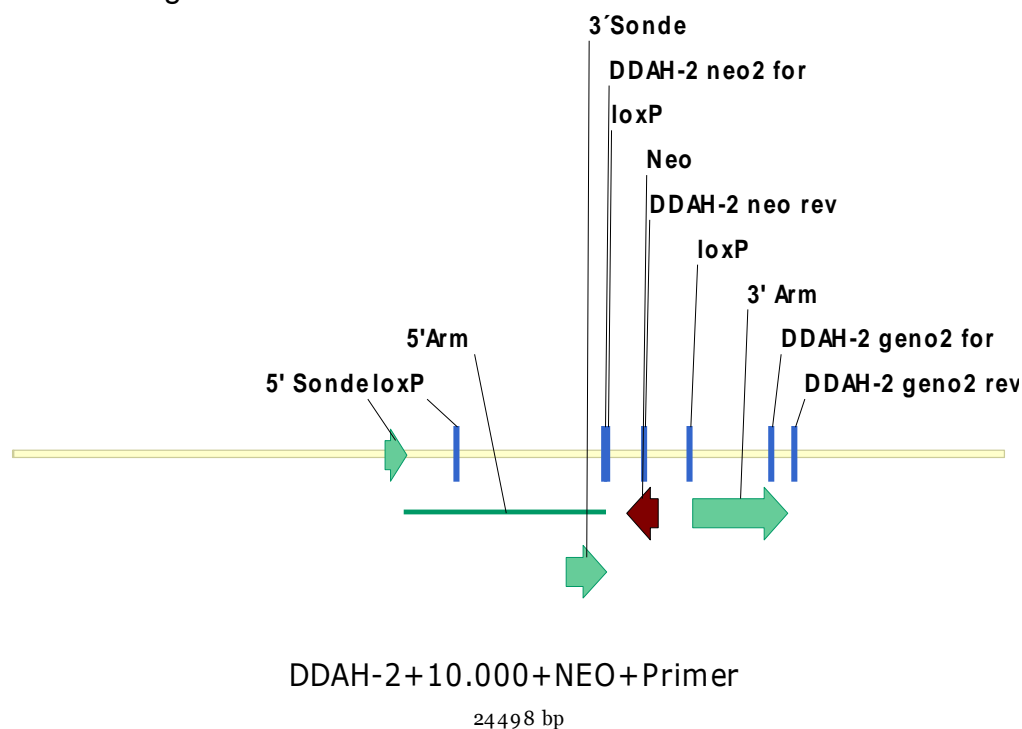


Abbildung 42: Darstellung des DDAH-2-Allels nach erfolgter homologer Rekombination mit dem Targeting-Vektor. Als Pfeile erkennbar sind die beiden Sonden, die Neo-Kassette und der 3'Arm. Zudem sind die *loxP sites* und die für die PCR angewendeten Primer als Balken eingezeichnet. Erwartete PCR-Produkt-Größe für *ddah2geno2for* & *ddah2geno2rev* : 601 bp. Erwartete PCR-Produkt-Größe für *ddah2neo2for* & *ddah2neorev*: 1000 bp.

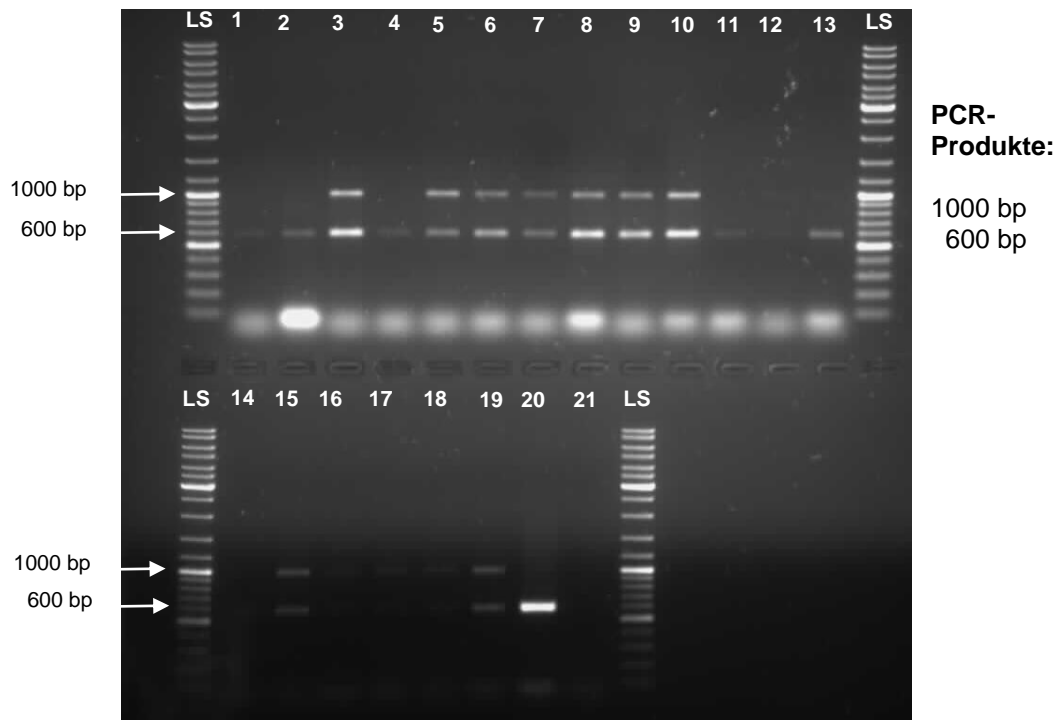


Abbildung 43 zeigt die PCR-Produkte einiger positiver Klone in einer Gel-Elektrophorese. Mit LS sind zwei Längenstandards markiert, die eine Bestimmung der Fragmentgröße ermöglichen (Fragmentgrößen 10, 8, 6, 5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2 und 1,5 kbp). Die 1000 bp-Bande ist nur bei den positiven Klonen zu beobachten (Spurennummer 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19), sie fehlt bei der genomischen DNA und den restlichen negativen Klonen. Dahingegen ist die 600 bp-Bande als einzige sichtbare Bande in der genomischen DNA-Bearbeitung als Kontrolle zu sehen (Spurennummer 20 ist R1 DNA). Alle positiven Klone zeigen also eine Doppelbande, weil sie PCR-Produkte aufweisen, die sowohl in der Neomycin-Sequenz entstehen als auch welche, die außerhalb der Stelle des Bereiches der homologen Rekombination liegen (vgl. vorherige Abbildung). Die Spurennummer 21 stellt eine Wasserprobe dar, die mitgelaufen ist, um mögliche Verunreinigungen auszuschließen.

Mittels PCR wurden die positiven Klone identifiziert. Nach diesen Bestätigungen konnte die Injektion der ES-Zellen in Blastozysten erfolgen. Die erhaltenen chimären Mäuse (erkennbar an der schwarz-braunen Fellfärbung) sind in Abb. 44 dargestellt.

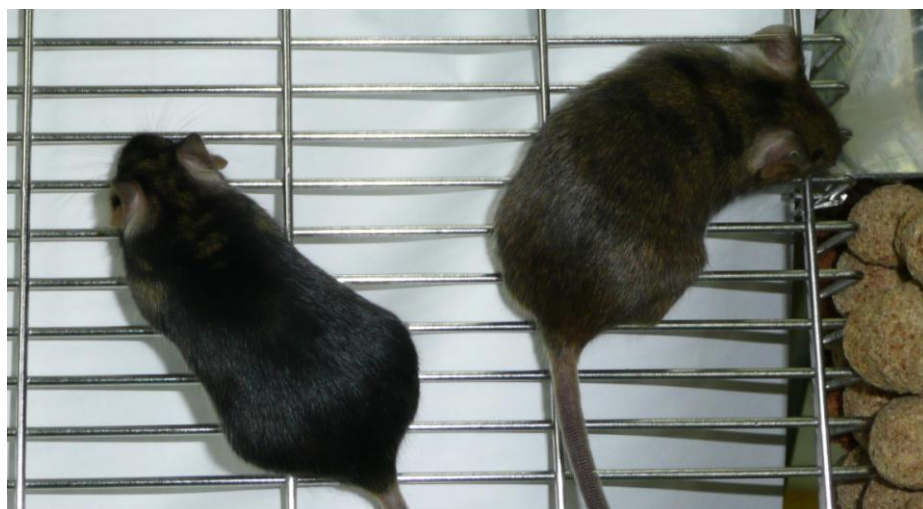


Abbildung 44: Die ersten chimären und nicht chimären Tiere nach der Blastozysteninjektion. Die chimären Mäuse besitzen eine gefleckte Fellfärbung.

4. Diskussion

Die gestellte Aufgabe, einen konditionalen K.O.-Vektor zu klonieren, wurde erfolgreich abgeschlossen, so dass der Vektor für die homologe Rekombination eingesetzt werden konnte. Die danach folgenden Arbeiten dienten der Verifizierung des richtigen Einbaus. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass der K.O.-Vektor in der vorhergesagten Weise integriert hatte.

Nach der Implantation der mit veränderten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) besetzten Blastozysten in scheinchwangere Mäuse, konnten die ersten heterozygot konditionalen K.O.-Mäuse gewonnen werden.

4.1. Auswahl eines geeigneten K.O.-Verfahrens und -Modells für die Generierung eines DDAH-2-K.O.

Bisher fehlen hochselektive Inhibitoren der beiden Isoformen der DDAH, so dass keine Aussage über die relative Bedeutung der DDAH-Isoformen im ADMA-Stoffwechsel getroffen werden kann (Maas 2005). Zudem kommen beide Isoformen in zahlreichen Geweben gleichzeitig vor. Es erschien deshalb sinnvoll, Tiermodelle zu generieren, die nur eine der beiden Isoformen exprimieren. Hierfür kommen insbesondere Mäuse in Frage, da für Mäuse die transgenen und die K.O.-Techniken am besten etabliert sind. Vorteilhaft ist auch die kurze Generationszeit.

Die DDAH ist bei den bisher untersuchten Säugetieren relativ gut konserviert. Es besteht bei einem Aminosäuresequenzvergleich eine über 90%ige Übereinstimmung zwischen menschlichem und Mäuse-DDAH Protein. Die Daten, die man durch eine K.O.-Maus erhalten würde, könnten somit zu großen Teilen auf den Menschen übertragen werden.

Erste Hinweise auf die Art der zu erwartenden Phänotypen von DDAH-2 und DDAH-2 K.O.-Mäusen liefern Daten zu Genpolymorphismen beim Menschen.

Jones et al. haben 2003 eine funktionelle Insertions-/Deletions-Polymorphismus-Variante in der DDAH-2 unter nicht verwandten Individuen gefunden. Von den sechs Polymorphismen, die sie entdeckten, war eine im „Core Promoter Element“ lokalisiert und ging mit einer Steigerung der basalen DDAH-2-Expression einher. Diese Entdeckung zeigt, dass es individuelle Unterschiede in der Fähigkeit gibt ADMA zu metabolisieren. Somit können möglicherweise einige Menschen gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen anfälliger sein. 2005 zeigten Valkonen et al., dass bei Trägern einer funktionellen Mutation der DDAH-1 ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und eine Veranlagung für Hypertension bestehen (Valkonen et al. 2005). In einer Fall-Kontroll-Studie wurde für bestimmte Haplotypen der DDAH-1 zudem eine Präeklampsie-Anfälligkeit festgestellt (Akbar et al. 2005).

Es gibt viele Möglichkeiten/Arten ein Gen „auszuschalten“, die im Folgenden hinsichtlich ihrer Eignung für das Ziel der aktuellen Arbeit diskutiert werden.

Grob kann man zufallsbasierte Verfahren (*Gene-Trap*) und gezielte Verfahren unterscheiden.

4.1.1. **Gene Trap versus Vektor basierter K.O.**

Bei der *Gene Trap*-Methode werden durch ungerichtetes Einbringen von bestimmten Vektoren in die Gene der Maus Mutationen hervorgerufen. Hierzu wird zunächst eine Splice-Akzeptor-Kassette vor der Reporteragen/LacZ/Neomycin Fusionskassette (dient dazu Klone mit Integration zu selektionieren) eingefügt. Wird ein solches Reporteragen in ein Intron eines aktiven Gens integriert, dann fusioniert diese posttranskriptionell mit dem Transkript des getroffenen Gens. Hierdurch steht der Reporter unter der Kontrolle des „getrappten“ Gens, das durch die Fusion gleichzeitig mutiert (Floss et al. 2002).

Zwar beschreiben Floss et al. 2002, dass der *Gene Trap* nicht völlig ungerichtet ist und die verschiedenen Vektoren gewisse Chromosomen präferieren, aber eine spezifische Mutation ist *in vivo* nur durch Verfahren mit homologe Rekombination zu erreichen. Dieser Punkt ist der entscheidende Vorteil bei der konventionellen und konditionalen K.O.-Methode. Allerdings sind beide mit einem erheblichem Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, was auch noch ziemlich kostenintensiv ist. Die *Gene Trap*-Methode hingegen ist, vorausgesetzt man erhält das „richtige *Gene Trap*-Modell“ eine schnelle und günstigere Methode, um Gene der Maus zu mutieren und somit auch schneller K.O.-Tiere zu generieren.

Es gibt aber keine Garantie für die Keimbahngängigkeit der ES-Zellen bei der *Gene Trap*-Methode, so dass das Entstehen von K.O.-Tieren möglicherweise gefährdet ist. Auch durch alternatives Spleißen ist es möglich, dass keine K.O.-Tiere entstehen.

Bei der konventionellen und konditionalen K.O.-Methode werden positive und negative Selektionsmarker verwendet, die die Wahrscheinlichkeit einer Integration nach homologer Rekombination erhöhen (Thomas und Capecchi 1986, Thomas und Capecchi 1987). Dann kann man auch davon ausgehen, dass eine korrekte Integration stattgefunden hat.

Das Einbringen von Vektoren kann sowohl durch Elektroporation als auch retrovirale Infektion stattfinden. Retroviren neigen dazu im 5' Bereich eines Gens, einschließlich des 5' untranslatierten Bereichs und im ersten Intron zu integrieren. Vektorintegration direkt hinter dem Startcodon führt bei Retroviren eher zu einer Null-Mutation als bei Elektroporation, was besser für eine Heterozygoten-Generierung geeignet ist.

Der hauptsächliche Vorteil der retroviralen Infektion ist, dass es den Vektor nur ein einziges Mal integriert, wohingegen bei der Elektroporation durch Optimierungsstrategien Mehrfachintegrationen zwar in weniger als 20% auftreten können, aber dennoch die Möglichkeit im Vergleich erhöht ist. Bei einer tatsächlichen Integration des Vektors in der *Gene Trap*-Methode bestätigt die Reporter (LacZ)-Expression eine stattgefunden Mutation sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Im Gegensatz hierzu können bei konventioneller und konditionaler K.O.-Methode Mehrfachintegrationen ins Mausgenom stattfinden. Die Analyse der ES-Zellen würde dann positiv ausfallen, aber der Phänotyp könnte beeinträchtigt sein. Retrovirale Vektoren haben den Nachteil, dass sie nur eine begrenzte Fremdsequenz einbringen können (Stanford et al. 2001).

Neben einem Splice-Akzeptor im 5'Bereich, der LacZ/Neo-Kassette (*reporter/selector*) und Poly-A-Schwanz werden bei der *Gene Trap*-Methode in der Regel auch Vektorbestandteile mitintegriert. Bei der konditionalen K.O.-Methode werden zwar auch Vektorbestandteile mitintegriert, diese können aber mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems während der Kultivierung von ES-Zellen, aber auch später wieder herausgeschnitten werden, so dass der Phänotyp nicht wie bei der *Gene Trap*-Methode oder der konventionellen K.O.-Methode beeinträchtigt werden kann/muss. Klassische K.O.-Vektoren enthalten ja noch die, für die Selektion der ES-Zellen benötigten Resistenzgene.

Außerdem kann man bei konditionalen und konventionell selbst hergestellten Zellen/Tieren gewisse Fehlerquellen bei einem nicht Gelingen besser identifizieren als etwas was man von Außen angeboten bekommt. Dadurch besteht der Vorteil, dass man die vermuteten Fehler nach dem Eruiern gezielt vermeiden kann oder andere Wege einschlagen kann, um das Problem zu umgehen.

Im Rahmen einer anderen Arbeit in unserem Institut (Reichel 2006) wurde der *Gene Trap*-Klon der DDAH-2 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die *Gene Trap*-Zellen mit Wildtypzellen kontaminiert waren. Problematisch war auch, dass die RACE (Rapid amplification of cDNA ends)-Sequenz des *German Gene Trap Consortiums* (GGTC) im Intron 1 des DDAH-2-Gens lag, prinzipiell könnte dies nur durch das Vorliegen unbekannter Exons erklärt werden. Allerdings fand sich bei einer Analyse der *Gene Trap*-Zelllinien des GGTC keine vergleichbare Linie. Eine weitere Schwierigkeit, die sich für diesen spezifischen *Gene Trap*-Vektor ergab, war, dass im 5'Bereich der RACE-Sequenz nur das Exon 1 liegt und dieses nicht für das Protein kodiert. Da der kodierende Bereich im Exon 2 lokalisiert ist, kann es sein, dass trotz DDAH-2 *Gene Trap*-Vektor-Integration die Expression nicht beeinträchtigt werden kann.

Insgesamt erscheint für das DDAH-2-Gen somit die klassische Strategie, sprich die homologe Rekombination überlegen.

4.1.2. Konventionell K.O. versus konditional K.O.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen konventioneller und konditionaler K.O.-Methode stellt sich heraus, wenn bei der „Inaktivierung“ eines Gens embryonale Letalität vorzuweisen ist. Dann nämlich ist die konditionale Methode im Vorteil, weil das Gen erst nach einem bestimmten Entwicklungsstadium ausgeschaltet werden kann, während der Rest der genetischen Information der Tiere nach dem K.O. essentiell nicht verändert wird. Zudem ist die konditionale Methode auch viel flexibler, was das örtliche „Inaktivieren“ eines Gens betrifft. Mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems können bestimmte Gene nur in gewissen Geweben ausgeschaltet werden und dieses kann sogar zeitlich selbst bestimmend durch einen Stimulus induziert werden (siehe 1.9.). Dies bietet einen großen Vorteil und ermöglicht eine gezielte Aussage über Regulationsvorgänge oder das direkte Eingreifen bei der Entwicklung von Therapien und meidet die Entwicklung kompensatorischer Veränderungen. Die konventionelle K.O.-Methode betrifft jede Zelle in einem Tier, so dass oft nicht zwischen primären und sekundären Veränderungen unterschieden werden kann.

Die konditionale Methode bietet die Möglichkeit zweier Selektionsmarker (Neo und DT). Bei nicht erfolgreicher homologer Rekombination nach Elektroporation und anschließender „Verunreinigung“ der zu untersuchenden DNA mit Feederzellen, können die Schnittstellen in Neo, die zur Verifizierung der Rekombination dienen, zwar eine Integration vortäuschen, aber kein vermutetes Ergebnis bei der PCR zeigen (Feederzellen tragen auch eine Neo-Resistenz). Dieses ist aber durch gezieltes Berechnen der zu erwartenden Fragmentgröße bei der PCR auszuschließen.

Konventionelle K.O.-Methoden weisen normalerweise einen Selektionsmarker auf (Neo). Das oben angesprochene Problem kann demnach auch für die konventionelle Methode in Betracht gezogen werden. Aber nach der erfolgreichen homologen Rekombination ist der Selektionsmarker unwiderruflich im Genom eingebaut. Falls dieses einen Einfluss auf die umliegenden Gene und somit vielleicht auf den Phänotyp hat, kann man diese Fehlerquelle nie ganz ausschließen. Dahingegen kann das Neo-Gen in der konditionalen K.O.-Methode entfernt werden.

Um homozygote Tiere zu erhalten, müssen die mit *loxP*-sites ausgestatteten Mäuse ("gefloxt" Mäuse) nur noch mit *Cre*-Rekombinase transgenen Tieren gekreuzt werden, d.h. für die Herstellung eines K.O.-Tieres werden außer der *loxP* site und der *Cre*-Rekombinase keine weiteren Faktoren benötigt (siehe Abb 11 in der Einleitung).

Die konventionelle Methode ist etwas schneller, weil die Zucht einfacher ist. Die Schritte bei den beiden Methoden verlaufen nahezu parallel, mit dem Unterschied, dass in der konventionellen Methode die F-2-Generation schon homozygot K.O.-Tiere aufweisen kann. In der konditionalen Methode müssen zunächst homozygot „gefloxt“ Tiere entstehen, die dann erst mit *Cre*-Mäusen gekreuzt werden können. Je nachdem, ob man da noch gewebsspezifische „Inaktivierung“ anstrebt, die induziert werden muss, kommt das als Zusatzschritt noch dazu.

4.1.3. Eigenständiges Klonieren versus fertige Sequenz

Ein allgemeiner Nachteil der K.O.-Methoden ist, dass sie sehr zeit- und arbeitsaufwendig sind.

Es gibt Firmen, die fertige Sequenzen verkaufen, nur bewegte sich der Wert zu Beginn der Arbeit bei ca. 10.000 Euro. So gesehen, würde man bei dem eigenständigen Klonieren etwas einsparen und wichtig zu erwähnen, eine Menge über die Klonierung lernen. Mittlerweile sind die Preise auf vertretbare Größen gesunken, aber diese Arbeit ist auch schon beendet.

Trotz der einfachen Vorgehensweise zu Beginn würde sich eine Schwierigkeit bei der Überprüfung der fertigen Sequenz ergeben. Diese müsste vor der Nutzung zunächst total sequenziert werden. Eine Sequenzierung in einem Schritt kann hier nicht durchgeführt werden. Die konventionellen Sequenzierungen können einen Bereich von ca. 200-300 bp gut darstellen. Es wäre also eine sehr aufwendige Überprüfung mit vielen verschiedenen Primern. Man könnte auch durch das Wissen um die Sequenz und die Schnittstellen einen Restriktionsverdau durchführen, um zu einer Verifizierung zu kommen, aber diese wäre nicht so spezifisch, wie die Sequenzierung.

4.1.4. Bezug zu den experimentellen Ergebnissen

Das *Cre/loxP*-System bietet eine elegante Methode zur Herstellung konditionaler K.O.-Tiere (ubiquitär/gewebsspezifisch). Die *Cre*-Rekombinase vermittelt die Locus spezifische Rekombination zwischen den *loxP sites*. Diese Bereiche können unter *Cre*-Katalyse deletiert, invertiert oder transloziert werden (vgl. Abb. 8, Nagy 2000, Babinet 2000). Da die Funktionalität der *loxP sites* im Targeting-Vektor für die konditionale K.O.-Maus ausschlaggebend sind, wurde diese vor der Elektroporation in embryonale Stammzellen mit Hilfe *Cre*-Rekombinase exprimierender Bakterien überprüft und bestätigt (vgl. Abb. 32). Die *Cre*-Rekombinase erkennt spezifisch die *loxP sites*, die bestimmte Bereiche flankieren und deletiert diese Region durch das *Cre/loxP*-System.

Die erfolgte Sequenzierung diente einer zusätzlichen Überprüfung, die die richtige Sequenz und die richtige Orientierung bestätigen konnte.

Nach der Elektroporation und der anschließenden DNA-Isolierung wurden die positiven Zellen mittels der in den Methoden beschriebenen Vorgehensweise/Bedingungen identifiziert. Hierbei war die zusätzliche Schnittstelle (*Nco I*), die mit der *loxP site* mit einkloniert wurde von Bedeutung, weil sie es ermöglichte zwischen Wildtyp und Transgen zu unterscheiden. Es entstehen unterschiedliche Fragmentgrößen, die vorher berechnet werden können (vgl. Abb. 41).

Schwierig war es auch eine Schnittstelle zu finden, die geeignet war für das Integrieren der *loxP site*. Da am Ende quasi zwei Vektoren miteinander verbunden werden sollten, musste eine geeignete Schnittstelle gefunden werden, die sowohl in dem „Erstvektor“ mit der zusätzlich eingebrachten Schnittstelle (*Nco I*) einen Einbau bestätigen konnte und schließlich auch im Targeting-Vektor verifizieren konnte, dass beide Vektoren miteinander ligiert worden sind (ausführlichere Erklärung siehe Ergebnisteil 3.3.)

4.2. Auswahl des K.O.-Zieles

Für die Auswahl des K.O.-Zieles spielte die Tatsache, dass schließlich ein (konditionaler) DDAH-2-K.O. entstehen soll, eine entscheidende Rolle. Um das Gen für dieses Protein zu „inaktivieren“, muss der kodierende Bereich ausgeschaltet werden. Der kodierende Bereich befindet sich innerhalb des Exon 2 (vgl. Abbildungen im Ergebnisteil), so dass innerhalb des 1. Introns nach einer geeigneten Stelle für das Einbringen der *loxP sites* gesucht wurde. Auf diese Weise wird bei einer Kreuzung mit einer *Cre*-Maus (gewebsspezifisch oder ubiquitär) der ganze kodierende Bereich herausgeschnitten.

4.3. Alternativen zum K.O.-Verfahren

Im weiteren werden zwei Möglichkeiten diskutiert, die als Alternative zur K.O.-Methode in Frage kommen könnten und ihre Vor- bzw. Nachteile werden eruiert.

4.3.1. Spezifische Inhibitoren

Rossiter et al. stellten 2005 die ersten Beispiele für eine reversible und spezifische

Säugetier-DDAH-Hemmung vor. Dieser Weg bietet Potential für den pharmazeutischen Gebrauch von DDAH-Inhibitoren in Bezug auf Krankheiten

mit einer übersteigerten NO-Produktion oder Sepsis (z.B. Tumorwachstum und Angiogenese, Kostourou et al. 2002). Die entsprechenden Verbindungen sind anscheinend wenig zytotoxisch. Die durchgeführten Experimente zeigten auch, dass die Hemmung der DDAH zu einem Anstieg der ADMA-Plasma-Konzentration führt und dass die ADMA-Plasma-Konzentration *in vivo* durch DDAH reguliert wird. Die Inhibitoren können als pharmakologisches Werkzeug genutzt werden, um die Rolle der DDAH in der ADMA-Spiegel-Kontrolle und die pathophysiologische Verbindung zwischen ADMA-Plasma-Konzentration und Krankheitsstadium zu erforschen. N^G-(2-Methoxyethyl) Arginin und sein Methylester (L-257 und L-291) sind „Abkömmlinge“ von 2-Amino-4-(N^G-Methylguanidin) Buttersäure, (4124W) einem schwachen DDAH-Inhibitor. Diese Verbindung ist ein verkürztes Analogon der L-NMMA, aber auch ein schwacher NOS-Inhibitor und ist heutzutage als einziger reversibler DDAH-Inhibitor bekannt. Die Abkömmlinge L-257 und L-291 zeigen keine inhibitorische Aktivität gegenüber der NOS, ihre halbmaximale hemmende Konzentration (IC₅₀) beträgt < 25 µM. Auch bei diesen beiden DDAH-Inhibitoren konnten Leiper et al. 2007 *in vivo* und *ex vivo* zeigen, dass daraus eine erhöhte ADMA-Plasma-Konzentration resultierte.

Bis jetzt bleibt aber für alle beschriebenen DDAH Inhibitoren noch zu zeigen, dass sie nicht nur keine Wirkung auf die NOS haben, sondern auch sie keine wesentlichen anderen Enzyme hemmen.

4.3.2. Short/Small interfering (si) RNA und micro (mi)RNA

Diese relativ neue Technik erlaubt es experimentell die Gen-Expression zu hemmen (erstmalig beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beobachtet Fire et al. 1998). Das Prinzip besteht darin, dass doppelsträngige RNA, die identische oder nahezu identische Sequenzen zur Ziel-mRNA aufweist injiziert wird, mit der endogenen mRNA hybridisiert und zu einem Abbau der mRNA in den Zellen führt. Somit wird die Genexpression beeinträchtigt (Fire et al. 1998, Ngô et al 1998). Während die miRNA vom Genom selbst als Haarnadel-Struktur kodiert wird, kann die siRNA sowohl künstlich als auch endogen sein (Hamilton und Baulcombe 1999, Ketting und Plasterk 2004).

Um herauszufinden, ob DDAH-1 oder DDAH-2 für die Regulierung der Serum-ADMA-Spiegel und die NO-Antwort verantwortlich sind, setzten Wang et al. (2007) siRNAs ein. Sie stellten durch die siDDAH-1 fest, dass die Serum-ADMA-Spiegel überwiegend über DDAH-1 reguliert werden, während die siDDAH-2-Ergebnisse die Aussage zuließen, dass die NO-Antwort vorwiegend über DDAH-2 reguliert wird. Diese Beobachtungen, die einen Hinweis auf eine spezifische Funktion geben, korrelieren auch mit der Verteilung der beiden Isoenzyme in den unterschiedlichen Geweben.

Die Limitierung der doppelsträngig RNA-vermittelten Beeinflussung der Genexpression liegt zum einen darin, dass wenn eine Sequenz mehreren verwandten Genen ähnelt, mehrere Mitglieder der Genfamilie beeinträchtigt werden könnten. Es kann auch sein, dass „low level“-Expression sich der RNA-vermittelten Beeinflussung in vielen Genen widersetzen wird, so dass ein bestimmter Teil der Zellen nicht von diesem Effekt beeinträchtigt wird (Fire et al. 1998).

In Pflanzen wurde eine Cosuppression beobachtet, das ist die Fähigkeit von Transgenen die Expression ihrer und homologer Chromosomen Loci simultan abzdämpfen. Bezogen auf Experimente mit Säugetieren könnte bei siRNA bearbeiteten Transgenen ein Selektionsnachteil entstehen, da die

Cosuppression eine Art antivirales Abwehrsystem darstellt und Transgene gezielt angegriffen werden könnten (Lewis et al. 2002)

Die Größe von ca. 21-25 Nukleotiden sollte nicht überschritten werden, weil dann eine unspezifisch hemmende Antwort resultiert (Lewis et al 2002 und Elbashir et al. 2001).

Lewis et al. zeigten, dass fluoreszent markierte siRNA bei Hochdruck-Aufnahme *in vivo* nicht gleichmäßig ist und Zellen, die weniger davon aufgenommen haben auch eine inkomplette Hemmung zeigen. Das könnte bei der Vergleichbarkeit von Experimenten eine Schwierigkeit darstellen.

Auf der anderen Seite wurde auch gezeigt, dass siRNA effektiv die Genexpression in Säugetieren hemmen kann, so dass auch hier die Möglichkeit offen steht mittels siRNA Menschen mit bestimmten Erkrankungen zu behandeln. Der Organismus kann diese Technik für eine „physiologische“ Gen-Herunterregulation (*Gene-silencing*) nutzen (Lewis et al. 2002). Positiv an dieser Technik ist auch anzumerken, dass über das posttranskriptionale *Gene-silencing* das Genom nicht verändert wird und es trotzdem zu einer Herabregulation der jeweiligen (z.B.) Enzymaktivität kommt. Wohingegen bei den K.O.-Verfahren das jeweilige Gen aus dem Genom entfernt wird.

4.3.3. K.O.-Verfahren versus Alternativen

Die Tatsache, dass der ganze kodierende Bereich herausgeschnitten wird, ist für den K.O. positiv, birgt zugleich aber auch einen negativen Punkt, denn sowohl nicht kodierende Bereiche zwischen den Genen als auch Intronbereiche in den Genen können Promoter oder auch micro-RNA-Sequenzen für andere Gene darstellen. Diese werden dann mit entfernt.

Um dieses soweit wie möglich auszuschließen, wurden die Sequenzen auf der *NCBI*- und der *ENSEMBLE*-Seite geblastet und verglichen. Dabei verlässt man sich auf die computerbasierte Prädiktion von der Lokalisation von Genen, ihren Exons und Introns. Auch diese Datenbanken werden aktualisiert, so dass ursprünglich angenommene Informationen in Zukunft vielleicht nicht mehr valide sein können. Bisher kann man diese Effekte anhand der reinen Sequenzdaten nur schwer abschätzen und im Voraus meist noch keine Aussage darüber machen, welche Auswirkungen dies auf den Phänotyp haben wird. Aber das ist das Risiko oder gerade das, was die Forschung ausmacht; einer ständigen Ergänzung und Aktualisierung von Daten unterworfen zu sein.

Ein weiterer Punkt, der im Zusammenhang mit dem konditionalen K.O.-Verfahren angesprochen werden sollte, ist, dass in dem Zeitraum bis zur „Inaktivierung“ des Gens eine Fremd-DNA im Genom vorhanden ist, die auch Auswirkungen auf die Nachbargene haben kann und den Phänotyp dadurch auch beeinflussen könnte. Je nachdem, wann diese „Inaktivierung“ und somit das Entfernen der Fremd-DNA stattfindet, kann es variable Veränderungen aufweisen.

Wie oben bereits schon erwähnt können auch Mehrfachintegrationen stattfinden. Auch hier kann man keine Aussage über die Auswirkungen auf den Phänotyp machen, die einen solchen Fall betreffen. Man muss mit bedenken, dass maximale Veränderungen eindeutig sichtbar sind, aber was ist mit kleinen

Veränderungen, an die zunächst gar nicht gedacht wird oder die gar nicht auffallen.

Die Inhibitor-Alternative ist nützlich, um generelle Aussagen über den ADMA-DDAH-Stoffwechsel zu machen. Allerdings kann ein Isoenzym nicht spezifisch untersucht werden, da es allgemein DDAH inhibiert. Dahingegen können in der K.O.-Methode und der siRNA-Methode die einzelnen Isoformen gezielt inaktiviert werden.

4.4. Erwarteter Phänotyp

4.4.1. Rückschlüsse aus den Studien zur DDAH-Überexpression

Ein weiterer Ansatz die Bedeutung der DDAH zu untersuchen ist es, diese nicht auszuschalten, sondern die DDAH in Ihrer Expression zu steigern bzw. transgen zu überexprimieren. Smith et al. haben 2003 gezeigt, dass eine DDAH-Überexpression in humanen Nabelvenen-Endothelzellen mit einer verminderten ADMA-Konzentration und einer gesteigerten Bildung von Gefäßstrukturen („tube formation“) einhergehen.

Um zu zeigen, dass der ADMA/DDAH-Stoffwechsel die Zytokin induzierte NO-Synthese reguliert, haben Ueda et al. (2003) glatte Gefäßmuskelzellen von Ratten in Kultur gehalten und mit Interleukin-1 β behandelt. Dosisabhängig wurden die iNOS aber auch die DDAH-Expression stimuliert, wie es auch bei einem gewöhnlichen Gefäßinsult der Fall wäre. Dies führte zu einer erhöhten NO-Synthese und zu einer verminderten ADMA-Konzentration, die durch den verwendeten DDAH-Inhibitor 4124W wieder aufgehoben werden konnten. Eine durch Adenoviren vermittelte DDAH-Überexpression konnte wiederum die NO-Synthese steigern. In diesem Beispiel wird die durch Interleukin-1 β -induzierte NO-Synthese durch zwei Wege eingeleitet, 1. die direkte Expressionsstimulierung der iNOS und 2. eine indirekte durch die DDAH-Hochregulierung und Reduzierung der ADMA-Konzentration.

Dayoub et al. zeigten 2003, dass eine DDAH-1-Überexpression *in vitro* und *in vivo* eine verminderte ADMA-Plasma-Konzentration und eine gesteigerte NOS-Aktivität zur Folge hat (Dayoub et al. 2003). Die transgenen DDAH-1-Tiere zeigten einen reduzierten systolischen Blutdruck, einen reduzierten systemischen Gefäßwiderstand und ein vermindertes Schlagvolumen.

Eine interessante Beobachtung machten Kostourou et al. (2004), als sie bei einer DDAH1-Überexpression eine gesteigerte Hypoxie in Tumorzellen im Vergleich zu Wildtyp Tumorzellen feststellten. Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, dass es einen entgegengesetzten Zusammenhang zwischen Tumoroxygenierung und Angiogenese gibt.

In der Studie von 2005 untersuchten Jacobi et al., ob mittels DDAH-1-Überexpression und die folgende Senkung der ADMA-Konzentration die Angiogenese gesteigert werden kann. Die transgenen Tiere zeigten trotz ADMA-Gabe von außen eine angiogenetische Antwort auf ischämische Prozesse. Dies wurde im Gegenteil zu den Wildtyp-Mäusen, auch ohne ADMA-Zugabe beobachtet. Die verbesserte angiogenetische Antwort der transgenen Tiere auf Ischämie war mit einer verminderten ADMA-Konzentration im Gewebe

und einer erhöhten NOS-Aktivität assoziiert. Somit kann man davon ausgehen, dass DDAH die Angiogenese modulieren kann.

Das Ziel einer Studie von Ayling et al. 2006 war es die DDAH-Expression und Funktion in Trophoblasten zu untersuchen. Dabei stellten sie fest, dass DDAH-1 und 2-m RNA und Proteine bereits im ersten Trimenon im plazentären Gewebe (extravillöse Trophoblasten und davon abgeleitet Zelllinien) nachzuweisen sind. Trophoblasten produzieren NO, weil es einen wichtigen proinvasiven Effekt hat und somit eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Schwangerschaft spielt. Eine Überexpression von DDAH-1 zeigte in dieser Studie eine starke Enzymaktivität, die zu verminderter ADMA-Konzentrationen führte. Die DDAH-1-Überexpression war mit einer gesteigerten NO-Produktion und einem vermehrten Anfall von cGMP assoziiert.

Sydow et al. stellen 2008 im DDAH1-Überexpressionsmodell der Maus einen möglichen Zusammenhang zwischen NO und Insulin-Empfindlichkeit fest. Aus früheren Studien war ersichtlich, dass NO eine Rolle bei der Insulin-induzierten Glucose-Aufnahme in Insulin empfindlichen Geweben spielen könnte. Da erhöhte ADMA-Konzentrationen die endogene NOS inhibieren, stellten sie die Hypothese auf, dass eine ADMA-Reduktion zu einer NO-Synthese-Steigerung und demnach zu einer erhöhten Insulin-Empfindlichkeit führen müsste.

Zhang et al. berichten 2008 zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen DDAH/ADMA-Stoffwechsel und Nitroglycerin-Toleranz-Entwicklung. Letzteres steht in enger Beziehung zu oxidativem Stress induzierten Aktivitätsverminderung der mitochondrialen Isoform der Aldehyd-Dehydrogenase-2 (ALDH-2). Anhaltende Behandlung mit Nitroglycerin führt zu endothelialer Dysfunktion. Durch die Hemmung der NOS ist ADMA in der Lage oxidativen Stress in Endothelzellen zu induzieren und sowohl die ALDH-2-Aktivität als auch die cGMP-Produktion in humanen Nabelvenen-Endothelzellen zu senken. Eine DDAH-2-Überexpression in den Zellen konnte den Nitroglycerin-induzierten oxidativen Stress und die Inhibition der ALDH-2 signifikant unterdrücken.

Dayoub et al. 2008 zeigten schließlich, dass sich die vaskulären Effekte von ADMA durch Überexpression der DDAH-1 reduzieren lassen. Hierzu haben sie transgene DDAH-1-Tiere mit Wildtyp-Tieren in Bezug auf die Gefäßantwort auf ADMA in den Karotiden und der Aorta (*in vitro*) und in zerebralen Arteriolen (*in vivo*) verglichen. Dabei haben sie die DDAH-1-Expression und ADMA-Konzentration gemessen. Die Expression in den Gefäßen war in den Transgenen erhöht, ADMA-Konzentrationen waren um 50% gesenkt und NO-Synthese war gesteigert. *In vivo* konnte bei ADMA-Zugabe eine reduzierte Antwort auf Acetylcholin bei Wildtyp-Tieren beobachtet werden, während dieses bei den transgenen Tieren nicht beobachtet wurde. Die Daten von Dayoub et al. bieten einen ersten Anhaltspunkt, dass eine Überexpression der DDAH-1 basale NO-Spiegel steigert und vor ADMA-induzierte endotheliale Dysfunktion im zerebralen Kreislauf schützt.

Diese Beispiele zeigen verschiedene Bereiche, die durch eine Überexpression beeinträchtigt werden, was für ein erweitertes Verständnis dieser komplexen Pfade wichtig ist. Aber in der Klinik haben Zustände mit zu hohen ADMA-

Plasma-Konzentrationen größeren Stellenwert und somit auch größeres Interesse als niedrige Konzentrationen. Die Überexpressionsmodelle stoßen hierbei an ihre Grenzen. Wenig praktikabel erscheint auch die Gabe von ADMA in der Praxis. Abgesehen von den Kosten, die entstehen würden, könnte nicht sicher beurteilt werden, welche der beiden Isoformen der DDAH die Effekte von ADMA hierbei beeinflusst.

4.4.2. Beispiele für eine DDAH-Defizienz

Nach dem durch Experimente über verschiedene Auswirkungen einer DDAH-Überexpression berichtet wurde, war es an der Zeit, die Auswirkungen der DDAH-Defizienz zu untersuchen. Damit können weitere Informationen über den ADMA/DDAH-Stoffwechselweg in Erfahrung gebracht werden und wenn möglich auch gewisse Therapien zur kardiovaskulären Risikoreduktion eingesetzt werden.

Kurz nach Beginn der Arbeiten an diesem Projekt gab es eine Publikation zu heterozygot DDAH1-defizienten Mäusen (Leiper et al 2007). Die Beobachtungen von Leiper et al. 2007 bestätigen/unterstützen den in dieser Arbeit ausgewählten Weg einen konditionalen K.O.-Vektor herzustellen.

Ihre Hypothese war, dass durch die Anreicherung von endogenem ADMA die Endothelfunktion beeinträchtigt wird. Hierfür haben sie zum einen versucht eine K.O.-Maus für DDAH-1 zu generieren, zum anderen DDAH spezifische Inhibitoren eingesetzt.

Interessanterweise entstanden bei der Kreuzung von heterozygoten Mäusen als Nachkommen erneut nur Heterozygote (DDAH-1 ^{+/-}) oder homozygot gesunde Tiere (DDAH-1 ^{+/+}). Dies lässt vermuten, dass eine homozygote K.O.-Maus schon im Uterus letal ist. Ein konditionales K.O.-Tier bietet den Vorteil, dass erst im Nachhinein und gewebsspezifisch mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems die DDAH-2 ausgeschaltet werden kann. Die von Leipers Arbeitsgruppe generierten heterozygoten Tiere zeigten eine normale Entwicklung, keine phänotypischen Abnormitäten, aber eine fast halbierte DDAH-Aktivität. Die ADMA-Plasma-Konzentration stieg, während die SDMA-Plasma-Konzentration unverändert blieb. Dies unterstützt auch die Hypothese, dass nur ADMA das Substrat der DDAH ist und nicht die SDMA.

Ein Nachteil der Methode Gene durch Deletion auszuschalten ist, dass auch andere Gene, die in der Umgebung liegen, beeinträchtigt werden können.

Zur Verifizierung ihrer Beobachtungen haben Leiper et al. deshalb kleine DDAH-inhibierende Moleküle synthetisiert.

Wojciak-Stothard et al. haben 2007 die Rolle von endogenem und exogen zugeführtem ADMA bei der Regulierung der Zellmotilität von pulmonalen Endothelzellen bei Schweinen und pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen bei heterozygoten DDAH-1-Knock-out-Mäusen untersucht. Dabei stellten sie fest, dass die K.O. Mäuse 2x höhere ADMA-Plasma-Konzentration aufwiesen, die endotheliale Motilität gehemmt ist und die Aktivität der Rho A-Aktivität - in Bezug auf Wildtyp-Mäuse - gesteigert ist. Außerdem wiesen die transgenen Tiere signifikant weniger sprießende Mikrogefäße auf als die Wildtyp-Mäuse, was einen Hinweis der Effekte von ADMA auf die Angiogenese gibt.

In einer Studie von Hasegawa et al. wurde 2007 der molekulare Mechanismus der DDAH-induzierten *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Expression untersucht.

Die Transfektion von DDAH-1 und 2 erhöhten die DDAH-Aktivität in Endothelzellen (Rinder-Aorten-Endothelzellen, humane Nabelvenen-Endothelzellen). Aber nur DDAH-2 konnte hier die VEGF-Expression und Sekretion in Endothelzellen unabhängig vom NO-Metabolismus erhöhen. Durch siRNA für DDAH-2 konnten sie die Transkription für DDAH-2 herunterregulieren und erzielten eine Abnahme der VEGF-Produktion. Sie gehen davon aus, dass diese Strategie eine mögliche Lösung für eine VEGF bezogene Vaskulopathie, einschließlich diabetische Angiopathie und Arteriosklerose ist.

4.4.3. Der NOS-K.O. als Modell für den erwarteten Phänotyp des DDAH-K.O.

Da ein DDAH-K.O. zu einer Akkumulation von ADMA und einer verminderten Synthese von NO führt, könnte der erwartete Phänotyp vergleichbar mit NOS-K.O.-Tieren sein. Im Folgenden sind deshalb Phänotypen der NOS-K.O.-Tiere beispielhaft dargestellt. Prinzipiell sind 3 Isoformen der NOS (iNOS, eNOS und nNOS) und deren Kombination zu berücksichtigen.

Die durch Fluss induzierte Dilatation von Gefäßen in isolierte Koronararterien von eNOS-K.O.-Mäusen wurde von Huang et al. 2002 mit dem von Wildtyp-Mäusen verglichen. Der Phänotyp des eNOS K.O. ist hier durch eine signifikante Erhöhung des basalen Gefäßtonus gekennzeichnet. Durch Immunhistochemie konnten sie erstmals die Anwesenheit von nNOS in arteriellem Endothel von eNOS-K.O.-Mäusen zeigen, das zusammen mit einer gesteigerten Prostaglandinsynthese bei der Fluss-induzierten Dilatation eine Rolle spielt.

Moroi et al. untersuchten 1998 eNOS-K.O.-Mäuse auf die Hypothese hin, dass eine reduzierte NO-Synthese eine Atherosklerose-Neigung zeigt. Dabei entdeckten sie, dass eNOS-K.O.-Mäuse phänotypisch einen gesteigerten Intimawachstum als Antwort auf Gefäßverletzungen zeigten. Männliche Mäuse zeigten mehr Intima-Formationen als weibliche. Interessanterweise war während der Schwangerschaft eine Unterdrückung des Intima-Wachstums sowohl in Wildtyp- als auch in K.O.-Mäusen zu beobachten.

Die Studie von Rudic et al. zeigte 1998, dass NO, produziert von der eNOS, ein bedeutender Regulator der Gefäßreorganisation als Antwort auf einen Remodeling-Stimulus ist. Nach externer A.carotis-Ligation links bei eNOS-K.O.-Mäusen beobachteten sie vermindertes Lumen-Remodeling ipsilateral im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Außerdem zeigten die transgenen Mäuse Gefäßwandverdickungen. Der eNOS-K.O. ist somit durch einen abnormen Gefäß-Phänotyp gekennzeichnet. Diese Resultate zeigen NO in einer kritischen Rolle als negativer Regulator der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur im Hinblick auf einen Remodeling- Stimulus. Die Daten würden auch die Hypothese unterstützen, dass Primärdefekte im NOS/NO-Stoffwechsel zu einem abnormen Remodeling führen können und die pathologischen Veränderungen in Gefäßwänden, die mit komplexen Erkrankungen wie Hypertension und Arteriosklerose assoziiert sind, begünstigen.

Um zu testen, ob nNOS-Defizienz die Atherosklerose beeinflusst, haben Kuhlencordt et al. 2006 Apo E/nNOS Doppel-K.O.-Tiere und Apo E-K.O.-Tiere

als Kontrolle untersucht. Da die nNOS-Deletion zu einer erhöhten Plaque-Formation in den Doppel-K.O.-Mäusen führte, gehen sie davon aus, dass die nNOS gegen Arteriosklerose schützt. In den atherosklerotischen Gefäßen entdeckten sie außerdem Splice-Varianten der nNOS. Zudem zeigten die Doppel-K.O.-Mäuse eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate. Somit ist der nNOS-Doppel-K.O. phänotypisch durch eine erhöhte atherosklerotische Eigenschaft gekennzeichnet.

Niu et al untersuchten 2001 iNOS Knock-out-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen, die zuvor einer atherogenetischen Diät für 15 Tagen unterlagen. Ergebnis dieser Untersuchung war, dass die iNOS weder proatherogenetischen noch antiatherogenetischen Einfluss bei Hyperlipidämie induzierter Atherosklerose hat. Allerdings setzt es den Kollagengehalt herab und könnte so eine Plaque-Instabilität verursachen.

Kuhlencordt et al. haben 2001 (a) bei ApoE/iNOS-Doppel-K.O.-Mäusen untersucht, ob iNOS einen Einfluss auf die Atherosklerose hat. Die iNOS wird in Leukozyten und glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen gebildet. Daher bestätigen ihre Ergebnisse, dass eine genetische Defizienz der iNOS die Diät-induzierte Atherosklerose in Doppel-K.O.-Mäuse reduziert. Zu dem beobachteten sie auch einen verminderten oxidativen Stress. Die L-Arginin-Gabe führte zu keiner Änderung des Läsionsareals in den Doppel-K.O.-Mäusen. Dies führt zu der Annahme, dass zumindest in diesem Model ein Mangel an Substrat nicht sehr wahrscheinlich ist für eine iNOS vermittelte Verletzung.

Analog zu dem vorigen Versuch, untersuchten Kuhlencordt et al. im selben Jahr (2001 b) ApoE/eNOS-Doppel-K.O.-Mäuse. Dabei beobachteten sie, dass eine eNOS-Defizienz zu einer gesteigerten Atherosklerose in ApoE-Mäusen mit einer bestimmten Diät führt, eine koronare Erkrankung einleitet und eine Reihe von kardiovaskulären Komplikationen, wie spontane Aortenaneurysma oder Dissektion nach sich zieht. Dieser Phänotyp stellt das erste Modell dar, in dem die koronare Atherosklerose assoziiert ist mit einem Nachweis von myokardialer Ischämie, Infarkt und Herzinsuffizienz. Hier wird deutlich, dass eine richtige eNOS-Funktion bei Atherosklerose-Patienten eine entscheidende Rolle als Therapie-Ziel dienen kann.

Der erwartete Phänotyp könnte Teile der aufgezählten Eigenschaften besitzen, diese geben nur einen Anhalt dafür, wie die K.O.-Tiere phänotypisch auffällig werden könnten.

Eine interessante und zugleich erstaunliche Feststellung ist, dass alle NOS-K.O.-Tiere nicht letal sind und die transgenen Tiere überleben. Da drängt sich natürlich die Frage auf, ob der DDAH-1 tatsächlich letal ist. Wie oben bereits beschrieben, geben die Experimente von Leiper et al. Anhalt dafür, dass möglicherweise der DDAH-1-K.O. embryonal letal ist, aber genau kann man das noch nicht sagen. Die konditionale K.O.-Methode könnte hier zur Aufklärung beitragen, indem man die Induktion der „Inaktivierung“ zu verschiedenen Zeitpunkten anstrebt. Vielleicht gibt es auch bisher unbekannte Wirkungen von ADMA/Monomethylarginin, die Gegenstand der Forschung sein werden.

Inzwischen sind auch Mäuse verfügbar die für alle 3 Isoformen der NOS defizient sind. Diese zeigen einen kardiovaskulären Phänotyp mit spontanen Infarkten und einer verkürzten Lebensdauer (Nakata et al. 2008).

Einen ähnlichen Phänotyp würde man auch für die DDAH-2-defizienten Tiere erwarten.

4.5. Ausblick

Diese Dissertation sollte die Vorarbeit für transgene Mäuse leisten, die in Zukunft charakterisiert werden können und zur genauen Analyse und besserem Verständnis des ADMA/DDAH-2-Stoffwechsels dienen werden. Wenn die K.O.-Mäuse da sind, kann der Phänotyp der Tiere mit integriertem Vektor mit denen ohne integriertem Vektor verglichen werden. Zur Quantifizierung der DDAH-2-Aktivität kann man sich verschiedener Techniken wie Western Blot oder RT-PCR bedienen. In diesem Zusammenhang könnte der Vergleich zu den Nachbargenen mit einbezogen werden.

Eine neue K.O.-Maus bietet viele Möglichkeiten, die im Folgenden erwähnt werden.

4.5.1. Messung der DDAH-Aktivität und NO-Aktivität

Durch eine isolierte Inaktivierung eines der Isoenzyme kann in Zukunft eine differenziertere Aussage über ihre Aufgaben gemacht werden. Möglicherweise kommt es bei einem DDAH-2-K.O. in gewissem Maße auch zu einem kompensatorischen Anstieg der DDAH-1-Aktivität. Daher wird einer der Punkte, die zunächst untersucht werden, die Messung der DDAH-Aktivität sein. Dieses könnte gekoppelt werden an die NOS-Aktivität. Allgemein wird sich die phänotypische Charakterisierung der DDAH-2-K.O.-Mäuse an den Vorarbeiten zu NOS-K.O.-Mäusen orientieren.

4.5.2. Gewebsspezifische Untersuchung und therapeutische Konsequenz

Mit den Möglichkeiten, die das *Cre/loxP*-System mit sich bringt, eröffnen sich außerdem viele verschiedene Ansatzpunkte für die weitere Untersuchung des ADMA/DDAH-Stoffwechsels. Insbesondere das gewebsspezifische Ausschalten der DDAH wird es erlauben, die Rolle der DDAH in verschiedenen Geweben besser zu verstehen. Später könnten Ansätze entwickelt werden, die zu einem therapeutischen Eingriff in diesen Stoffwechsel-Weg dienen können, um den Herzkreislauf Risikofaktor ADMA zu reduzieren und somit als ein weiteres Medikament auch Herzkreislauf-Erkrankungen zu behandeln.

4.5.3. Fertilität und Langzeitüberleben

Interessant ist auch zu beobachten, ob sich eine DDAH-Defizienz in irgendeiner Art und Weise auf die Fertilität oder das Langzeitüberleben auswirken wird. Die NOS-defizienten Mäuse haben diesbezüglich zum Teil nur überraschend geringe Defizite gezeigt.

4.5.4. NO-Expressionsmuster und Genpolymorphismen

Da der DDAH-Stoffwechsel auch einen Einfluss auf die NO-Synthese hat, ist es auch von Interesse die NO-Synthese und das Expressionsmuster NO-regulierter Gene zu untersuchen. In diesem Zusammenhang könnten auch Gene, die im ADMA bzw. L-Arginin-Stoffwechsel eine Rolle spielen (z.B. PRMTs und Genpolymorphismen) untersucht werden, wie z.B. Valkonen et al 2005 berichteten. Dabei vermuten sie, dass in unterschiedlichen Populationen es wahrscheinlich verschiedene funktionelle Variationen in der Genkodierung der DDAH-Enzyme gibt. Einige dieser Genpolymorphismen können einen schützenden Effekt gegenüber erhöhten ADMA-Plasma-Konzentrationen haben und wiederum andere, die durch verminderte Enzym-Aktivität zu einer Akkumulation von ADMA im Zytosol und im Blut führen, können sich nachteilig auswirken und zur KHK und Hypertension prädisponieren.

4.5.5. DDAH-K.O. in etablierten Mausmodellen

Weitere Verpaarungen mit ApoE-K.O.-Tieren wie es Kuhlencordt et al. in verschiedenen Variationen mit der NOS kreiert haben (siehe oben), könnten hilfreiche Aussagen als Arteriosklerose-Modell oder Hypertonus-Modell liefern.

ADMA wird entweder renal ausgeschieden oder über DDAH metabolisiert (größter Teil), wenn nun dieser wichtige Eliminierungsweg fehlt und nur der renale Pfad der Eliminierung „zur Verfügung“ steht, könnte man Folgen einer DDAH-2-Defizienz auch bei niereninsuffizienten Mäusen untersuchen. Womöglich gibt es hierbei eine kompensatorische Hochregulation der DDAH-1.

Eine Kreuzung mit triple NO-K.O.-Tieren könnte Aussagen über NO-unabhängige Effekte von ADMA offenbaren.

4.5.6. DDAH und Tumorwachstum

Ein weiterer wichtiger Untersuchungspunkt wäre auch in Tumor-Modellen denkbar. Wie es Kostourou et al. 2002 und 2003 aus ihren Experimenten erschlossen, kann eine gesteigerte DDAH-1-Expression in C6 Gliom-Zellen in Ratten eine gesteigerte NO-Synthese herbeiführen, die Expression und die Sekretion von Wachstumsfaktoren für die Gefäß-Endothel-Zellen steigern und die induzierte Angiogenese *in vitro* (2002) und *in vivo* (2003) fördern. In zahlreichen humanen Tumoren wurde eine Überexpression der DDAH-1 (Ummanni et al. 2008) bzw. DDAH-2 (Pucci-Minafra et al. 2008) nachgewiesen.

Dies bedeutet, dass Tumorgewebe eine DDAH-Aktivität besitzt und legt nahe, dass die Blutversorgung und das Wachstum von Tumoren durch die DDAH begünstigt werden. Da hochmaligne Tumoren meist eine gute Perfusion aufweisen, könnte eine Untersuchungsfrage in die Richtung gehen, ob DDAH die Tumorprogression fördert und oder mit der Malignität korreliert.

4.5.7. DDAH-1-K.O. und Doppel-K.O.

Schließlich könnte man noch einen DDAH-1-K.O. generieren, um die einzelnen Isoform-K.O.s miteinander zu vergleichen. Denkbar ist natürlich auch ein

Doppel-DDAH-K.O. (DDAH-1 und DDAH-2) zu generieren, um die Folgen zu untersuchen, die nicht kompensatorisch reguliert werden können Analog zu dem NOS triple K.O. Modell.

5. Zusammenfassung

Im Herzkreislaufsystem stellt Stickstoffmonoxid (NO) einen zentralen Botenstoff dar. NO wird durch NO-Synthasen aus L-Arginin gebildet. Endogen vorkommendes asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) kann die physiologische Bildung von NO stören. Erhöhte ADMA-Plasma-Konzentrationen sind ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und Tod.

ADMA wird überwiegend durch die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut, von der 2 Isoformen (DDAH-1 und DDAH-2) mit unterschiedlicher Gewebeverteilung bekannt sind. Um die Funktion der beiden DDAH-Isoformen, die ein interessantes Ziel für therapeutische Optionen darstellen besser untersuchen zu können, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen Genvektor für einen konditionalen Knockout der DDAH-2 zu generieren und die Integrität des Vektors zu überprüfen.

Hierzu wurde ein Vektor generiert, der homologe Sequenzen des DDAH-2-Gens bzw seiner Umgebung besitzt, das mit einer Neomycin-Kassette als „positiver Selektionsmarker“, einer Diphtherietoxin-Kassette als „negativer Selektionsmarker“ und drei *loxP sites*, die den kodierenden Bereich des Gens und die Neomycinresistenz-Kassette flankieren, ausgestattet ist. Die *loxP sites* sollten späteres selektives Ausschneiden des Gens bzw der Neomycinresistenz-Kassette erlauben.

Durch das angewendete *Cre/loxP*-System bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, das Enzym flexibel in verschiedene Gewebe und zu verschiedenen Zeiten zu „inaktivieren“ und somit wertvolle Information für das bessere Verständnis des ADMA-DDAH-Stoffwechsels zu gewinnen. Wegen der Wichtigkeit der Orientierung der *loxP sites* wurden alle Elemente sequenziert. Anschließend wurde die prinzipielle Funktionalität des Vektors mit seinen *loxP sites* durch einen Expressionversuch in *Cre*-exprimierende Bakterien bestätigt. Der Targeting-Vektor wurde anschließend in Mausstammzellen (ES-Zellen) elektroporiert. Aus der Blastozysteninjektion der ES-Zellen und Implantation in scheinsschwangere Mäuse sind chimäre Mäuse hervorgegangen, deren Verpaarung mit Wildtypmäusen nun wiederum Mäuse hervorgebracht hat, die heterozygot für den konditionalen K.O. sind. Erste Mäuse der F2 Generation mit konditionalem DDAH-2-K.O. stehen nun für weitere Untersuchungen und Verpaarungen mit den entsprechenden *Cre*-Mäusen bereit. Somit wird es nun erstmals möglich sein, isoliert die Folgen einer DDAH-2-Defizienz im Tiermodell zu untersuchen.

6. Allgemeine Abkürzungen

ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
Aqua bidet	Aqua bidestilata
bp	Basenpaare
° C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Cre	<i>causes recombination</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco 's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DT-Kassette	Diphtherietoxin-Kassette
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ES	embryonale Stammzellen
FCS	Fetales Kälberserum
GC	Guanylylzyklase
GGTC	<i>German Gene Trap Consortium</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kbp	Kilobasenpaare
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory Factor</i>
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-Arginin
loxP	<i>locus of crossino over P1</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MEF	Murine embryonale Feederzellen
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MES	Murine embryonale Stammzellen
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Neo-Gen	Neomycinresistenz-Gen
Neo-Kassette	Neomycinresistenz-Kassette
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PRMT	Proteinmethyltransferase
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDMA	symmetrisches Dimethylarginin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SINE	<i>Short interspersed nuclear element</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	vascular endothelial growth factor
V	Volt
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

7. Literaturverzeichnis

Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao PS (2001) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 88:1201-1203

Achan V, Tran CT, Arrigoni F, Whitley GS, Leiper JM, Vallance P (2002) All-trans-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 90:764-769

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P (2003) Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1455-1459

Akbar F, Heinonen S, Pirskanen M, Uimari P, Tuomainen TP, Salonen JT (2005) Haplotypic association of DDAH1 with susceptibility to pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 11:73-77

Alheid U, Frölich J C, Förstermann U (1987) Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res* 47:561-571

Altura BM, Chand N (1981) Bradykinin-induced relaxation of renal and pulmonary arteries is dependent upon intact endothelial cells. *Br J Pharmacol* 74:10-11

Anthony S, Leiper J, Vallance, P (2005) Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors. *Vasc Med* 10:3-9

Araki K, Araki M, Miyazaki J, Vassalli P (1995) Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:160-164

Ayling LJ, Whitleym GS, Aplinm JD, Cartwrightm JE (2006) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) regulates trophoblast invasion and motility through effects on nitric oxide. *Hum Reprod* 21:2530-2537

Babinet C (2000) Transgenic mice: an irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology. *J Am Soc Nephrol.* 11 Suppl 16:S88-S94

Berliner J A, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 91:2488-2496

Birdsey GM, Leiper JM, Vallance P (2000) Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line. *Acta Physiol Scand* 168:73-79

Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC (1996) The L-arginine-nitric oxide pathway: role in the atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* 127:1-11

Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC (1997) Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95:2068-2074

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP (1998) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:1842-1847

Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM (2000) LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 87:99-105

Böger RH, Vallance P, Cooke JP (2003) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl.* 4:1-3

Böger RH, Zoccali C (2003) ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl.* 4:23-28

Böger RH, Cooke JP, Vallance P (2005) ADMA: an emerging cardiovascular risk factor. *Vasc Med* 10:1-2

Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH (2007) Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: Effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 49:2274-2282

Bogle RG, MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P (1995) Induction of NG-monomethyl-L-arginine uptake: a mechanism for differential inhibition of NO synthases? *Am J Physiol* 269:C750-C756

Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF (1996 a) A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* 15:3118-3119

Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF (1996 b) Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 21:4256-4262

Ceravolo R, Maio R, Pujia A, Sciacqua A, Ventura G, Costa MC, Sesti G, Perticone F (2003) Pulse pressure and endothelial dysfunction in never-treated hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 41:1753-1758

Chand N, Altura BM (1981) Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells: role in lung vascular diseases. *Science* 213:1376-1379

Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U (1997) Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1:65-73

Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA (1991) Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 83:1118-1120

Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP (2003) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 108:3042-3047

Dayoub H, Rodionov R, Lynch C, Cooke JP, Arning E, Bottiglieri T, Lentz SR, Faraci FM (2008) Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibits asymmetric dimethylarginine-induced endothelial dysfunction in the cerebral circulation. *Stroke* 39:180-184

Eickhoff B (2000) Transgene Tiere. *Bio Tec* 2:58-61.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:10887-10890

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811

Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R (1986) Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase by an Acetylcholine-Induced Endothelium-Derived Factor from Rabbit and Canine Arteries. *Circ Res* 58:531-538

Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS (1993) Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J Suppl* 1:10-15

Floss T, Wurst W, von Melchner H, von Sloun P, Schnütgen F, Füchtbauer E, Arnold H, Vauti F, Ruiz P, Hansen J (2002) Gene in der Falle: Mutagenese des Mausgenoms. *BIO Spektrum* 1:84-90

Frey D, Braun O, Briand C, Vasák M, Grütter MG (2006) Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors. *Structure* 14:901-911

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376

Garg UC, Hassid A (1989) Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultures rat smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1774-1777

Gooding C, Clark F, Wollerton MC, Grellscheid SN, Groom H, Smith CW (2006) A class of human exons with predicted distant branch points revealed by analysis of AG dinucleotide exclusion zones. *Genome Biol* 7:1-19

Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori SG, Pyorala K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Scholte op Reimer W, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL; Other experts who contributed to parts of the guidelines: Walma E, Fitzgerald T, Cooney MT, Dudina A; European Society of Cardiology (ESC) Committee for Practice Guidelines (CPG), Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Funck-Brentano C, Filippatos G, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Hellemans I, Altiner A, Bonora E, Durrington PN, Fagard R, Giampaoli S, Hemingway H, Hakansson J, Kjeldsen SE, Larsen ML, Mancina G, Manolis AJ, Orth-Gomer K, Pedersen T, Rayner M, Ryden L, Sammut M, Schneiderman N, Stalenhoef AF, Tokgözoğlu L, Wiklund O, Zampelas A (2007) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Eur Heart J* 28:2375-2414

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol* 166:557-80

Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Sugano N, Kimoto M, Hayashi K, Itoh H (2007) Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2. *Circ Res* 101: e2-e10

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z (1987) Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235:473-476

Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114:193-197

Huang A, Sun D, Shesely EG, Levee EM, Koller A, Kaley G (2002) Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H429-H436

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9265-9269

Ishino Y, Nomura Y, Kato I (1995) Sse8647I, a new type II restriction endonuclease from a *Streptomyces* species cutting at 5'-AG/GWCCT-3'. *Nucleic Acids Res* 23:742-744

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP (1999) Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 99:3092-3095

Jacobi J, Sydow K, von Degenfeld G, Zhang Y, Dayoub H, Wang B, Patterson AJ, Kimoto M, Blau HM, Cooke JP (2005) Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation* 111:1431-1438

Jones LC, Tran CT, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P (2003) Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310:836-843

Kakimoto Y, Akazawa S (1970) Isolation and identification of N^G,N^G- and N^G,N^ε-dimethyl-arginine, N^ε-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl- δ -hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem* 245:5751-5758

Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, Angrand PO, Stewart F, Schütz G (1996) Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res* 24:1404-1411

Ketting RF, Plasterk RH (2004) What's new about RNAi? Meeting on siRNAs and miRNAs. *EMBO Rep* 5:762-765

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Schaffer J, Barbey M, Koch KM, Frölich JC (1999) Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 10:594-600

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Klein G, Graf S, Haller H, Fliser D (2003 a) Endogenous nitric oxide synthase inhibitors and renal perfusion in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 33:370-375

Kielstein JT, Bode-Böger SM, Frölich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D (2003 b) Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 107:1891-1895

Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T (1995) Detection of N^G, N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem* 117:237-238

Knipp M, Vasák M (2000) A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal Biochem* 286:257-264

Knipp M, Charnock JM, Garner CD, Vasák M (2001) Structural and functional

characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. *J Biol Chem* 276:40449-40456

Kostourou V, Robinson SP, Cartwright JE, Whitley GS (2002) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer* 87:673-680

Kostourou V, Robinson SP, Whitley GS, Griffiths JR (2003) Effects of overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase on tumor angiogenesis assessed by susceptibility magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 63:4960-4966

Kostourou V, Troy H, Murray JF, Cullis ER, Whitley GS, Griffiths JR, Robinson SP (2004) Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase enhances tumor hypoxia: an insight into the relationship of hypoxia and angiogenesis in vivo. *Neoplasia* 6:401-411

Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651-4655

Kuhlen cordt PJ, Hötten S, Schödel J, Rützel S, Hu K, Widder J, Marx A, Huang PL, Ertl G (2006) Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1539-1544

Kuhlen cordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL (2001 a) Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 103:3099-3104

Kuhlen cordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL (2001 b) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104:448-454

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P (1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 343:209-214

Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J, Malaki M, O'Hara B, Rossiter S, Anthony S, Madhani M, Selwood D, Smith C, Wojciak-Stothard B, Rudiger A, Stidwill R, McDonald NQ, Vallance P (2007) Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* 13:198-203

Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H (2002) Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32:107-108

Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP (2002) Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes

mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 106:987-992

Lu TM, Ding YA, Charng MJ, Lin SJ (2003) Asymmetrical dimethylarginine: a novel risk factor for coronary artery disease. *Clin Cardiol* 26:458-464

Maas R (2005) Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Vasc Med* 10 Suppl 1:S49-S57

Maas R, Tan-Andreesen J, Schwedhelm E, Schulze F, Böger RH (2007) A stable-isotope based technique for the determination of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity in mouse tissue. *J Chromatogr B* 851:220-228

MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P (1996) Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 119:1533-1540

Malek AM, Alper SL, Izumo S (1999) Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282:2035-2042

McDermott JR (1976) Studies on the catabolism of N^G-methylarginine, N^G, N^G-dimethylarginine and N^G, N^G-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 154:179-184

Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6991-6995

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (1999) Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99:1141-1146

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS (2003) Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors *JAMA* 289:76-79

Monsalve E, Oviedo PJ, García-Pérez MA, Tarín JJ, Cano A, Hermenegildo C (2007) Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 73:66-72

Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL (1998) Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest* 101:1225-1232

Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, McDonald N (2001) Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 8:679-683

- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109
- Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N (2008) Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation* 117:2211-2223
- Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14687-14692
- Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PA (2003) The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). *Clin Nutr* 22:17-22
- Niu XL, Yang X, Hoshiai K, Tanaka K, Sawamura S, Koga Y, Nakazawa H (2001) Inducible nitric oxide synthase deficiency does not affect the susceptibility of mice to atherosclerosis but increases collagen content in lesions. *Circulation* 103:1115-1120
- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K (1987) Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of N^G,N^G-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 148:671-677
- Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K (1989) Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 264:10205-10209
- Onozato ML, Tojo A, Leiper J, Fujita T, Palm F, Wilcox CS (2008) Expression of N^G,N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase and protein arginine N-methyltransferase isoforms in diabetic rat kidney: effects of angiotensin II receptor blockers. *Diabetes* 57:172-180
- Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3227-H3245
- Paik WK, Kim S (1968) Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J Biol Chem* 243:2108-2114
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666
- Pucci-Minafra I, Cancemi P, Albanese NN, Di Cara G, Marabeti MR, Marrazzo A, Minafra S (2008) New protein clustering of breast cancer tissue proteomics using actin content as a cellularity indicator. *J Proteome Res* 7:1412-1418
- Rees DD, Palmer RM, Moncada S (1989) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci* 86:3375-3378

- Reichel M (2006) Charakterisierung eines murinen, embryonalen Stammzellklones zur Generierung einer DDAH-2 Knock-out-Mauslinie. Diplomarbeit. Universität Hamburg
- Revkin JH, Shear CL, Pouleur HG, Ryder SW, Orloff DG (2007) Biomarkers in the prevention and treatment of atherosclerosis: need, validation, and future. *Pharmacol Rev* 59:40-53
- Rikitake Y, Hirata K, Kawashima S, Akita H, Yokoyama M (1998) Inhibitory effect of inducible type nitric oxide synthase on oxidative modification of low density lipoprotein by vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 136:51-57
- Ross R (1986) The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N England J Med* 314:488-500
- Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419-S420
- Rossiter S, Smith CL, Malaki M, Nandi M, Gill H, Leiper JM, Vallance P, Selwood DL (2005) Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Med Chem* 48:4670-4678
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC (1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101:731-736
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Sauer B (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14:381-392
- Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Böhme E (1988) Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 154:213-216
- Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T (2005) Asymmetric Dimethylarginine and the Risk of Cardiovascular Events and Death in Patients With Coronary Artery Disease: Results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 97:e53-e59
- Smith CL, Birdsey GM, Anthony S, Arrigoni FI, Leiper JM, Vallance P (2003) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGF expression, and cell phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 308:984-989
- Sorrenti V, Mazza F, Campisi A, Vanella L, Li Volti G, Di Giacomo C (2006) High glucose-mediated imbalance of nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression in endothelial cells. *Curr Neurovasc Res* 3:49-54

- Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2:756-768
- Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP (2001) Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 104:2569-2575
- Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS (2002) Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 287:1420-1426
- Sydow K, Münzel T (2003) ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl.* 4:41-51
- Sydow K, Mondon CE, Schrader J, Konishi H, Cooke JP (2008) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression enhances insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:692-697
- Tanaka M, Osanai T, Murakami R, Sasaki S, Tomita H, Maeda N, Satoh K, Magota K, Okumura K (2006) Effect of vasoconstrictor coupling factor 6 on gene expression profile in human vascular endothelial cells: enhanced release of asymmetric dimethylarginine. *J Hypertens* 24:489-497
- Thomas KR, Capecchi MR (1986) Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature* 324:34-38
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512
- Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM (2000) Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 68:101-105
- Tsai KW, Tarn WY, Lin WC (2007) Wobble splicing reveals the role of the branch point sequence-to-NAGNAG region in 3' tandem splice site selection. *Mol Cell Biol* 16:5835-48
- Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T (2003) Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 92:226-233
- Ummanni R, Junker H, Zimmermann U, Venz S, Teller S, Giebel J, Scharf C, Woenckhaus C, Dombrowski F, Walther R (2008) Prohibitin identified by proteomic analysis of prostate biopsies distinguishes hyperplasia and cancer. *Cancer Lett* 266:171-185
- Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R (2001) Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetric dimethylarginine. *Lancet* 358:2127-2128

Valkonen VP, Laakso J, Paiva H, Lehtimäki T, Lakka TA, Isomustajarvi M, Ruokonen I, Salonen JT, Laaksonen R (2003) Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and risk of acute coronary events. Does statin treatment influence plasma ADMA levels? *Atheroscler Suppl* 4:19-22

Valkonen VP, Tuomainen TP, Laaksonen R (2005) DDAH gene and cardiovascular risk. *Vasc Med* 10 Suppl 1:45-48

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992) Accumulation of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339:572-575

Verma S, Anderson TJ (2002) Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 105:546-549

Voziyanov Y, Pathania S, Jayaram M (1999) A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res* 27: 930-941

Wang J, Sim AS, Wang XL, Wilcken DE (2006) L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells. *Cell Mol Life Sci* 63:2838-2846

Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, Onozato ML, Raggio J, Mendonca M, Dennehy K, Li M, Modlinger P, Leiper J, Vallance P, Adler O, Leone A, Tojo A, Welch WJ, Wilcox CS (2007) Isoform-specific regulation by N^(G),N^(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO. *Circ Res* 101:627-635

Weintraub WS, Klein LW, Seelaus PA, Agarwal JB, Helfant RH (1985) Importance of total life consumption of cigarettes as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 55:669-72

Weis M, Kledal TN, Lin KY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine HA, Mocarski ES, Cooke JP (2004) Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation* 109:500-505

Witztum JL, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88:1785-1792

Wojciak-Stothard B, Torondel B, Tsang LY, Fleming I, Fisslthaler B, Leiper JM, Vallance P (2007) The ADMA/DDAH pathway is a critical regulator of endothelial cell motility. *J Cell Sci* 120:929-942

Yoo JH, Lee SC (2001) Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158:425-430

Zhang GG, Shi RZ, Jiang DJ, Chen YR, Jia-Chen, Tang ZY, Bai YP, Xiao HB, Li YJ (2008) Involvement of the endothelial DDAH/ADMA pathway in nitroglycerin tolerance: The role of ALDH-2. *Life Sci* 82:699-707

Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger RH (2001) Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 358:2113-2117

Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Böger R, CREED Investigators (2002) Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62:339-345

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit, dass ich im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie diese Arbeit anfertigen konnte.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rainer Böger und Prof. Dr. med. Renke Maas für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die Betreuung und die Unterstützung bei der Ausarbeitung bedanken.

Frau PD Dr. rer. nat. Irmgard Hermans-Borgmeyer danke ich für die freundliche und kompetente Unterstützung bei der murinen Stammzellkultur.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die kollegiale Zusammenarbeit und viele anregende Diskussionen bedanken, insbesondere bei Dr. Nicole Lüneburg, Thomas Lutz, Stephan Döker, Dr. Olaf Friese, Dr. Christina Rogge, Dr. Mirja Reichel, Dr. Thomas Rau.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die gewährte Unterstützung.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich danken für die große emotionale Unterstützung während der gesamten Zeit.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Arezoo Eslami Amirabadi
Geburtsdatum: 19.09.1983
Geburtsort: Teheran/Iran

Deutsche Schulbildung

Aug. 1990-Juni 1991 Schule Thadenstraße (Hamburg)
Aug. 1991-Juni 1992 Schule Rothestraße (Hamburg)
Aug. 1992-Juli 1994 Schule Hohe Landwehr (Hamburg)
Aug. 1994-Juni 1995 Gymnasium Hamm (Hamburg)
Aug. 1995-Juni 2003 Goethe Gymnasium (Hamburg)

Iranische Schulbildung

1990-1994 Schule Schahidbeheshti (Hamburg)

Universitätsausbildung

Seit Oktober 2003 Medizinstudium an der Universität Hamburg

Prüfungen

August 2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

Januar/Februar 2006 Krankenhaus Altona (Hamburg, Deutschland)
Februar/März 2006 unfallchirurgische Praxis bei Dr. Stein (Hamburg, Deutschland)
Juli/August 2006 Hospiten Sur (Arona, Spanien)
Juli/August 2007 Spital Männedorf (Männedorf, Schweiz)

Dissertation

Seit August 2006 Dissertation am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung für Pharmakologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

10. Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stelleneinzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....

Arezo Eslami Amirabadi