
**Charakterisierung des Mitochondrialen Tumorsuppressor-Gens 1
(MTUS1) anhand von *In-vitro*-Untersuchungen und Etablierung
eines Knockout-Maus-Modells**

**Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Christina Anika Zürn
aus Würzburg**

Würzburg 2006

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2003 bis Mai 2006 in der Nephrologischen Abteilung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universitätsklinik Würzburg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Ulrike Holzgrabe. Ihre Offenheit und ihr Interesse für neue Forschungsgebiete und die Bereitschaft mit anderen Instituten zu kooperieren, waren die Voraussetzung für die hier vorliegende Dissertation.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Dr. Stefan Seibold bedanken. Als Gedankengeber dieser Arbeit und nie ermüdender Diskussionspartner hat er mich während der Promotion immer bestens betreut.

Darüber hinaus möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Christof Wanner und Herrn Prof. Jan Galle für die Gelegenheit, unter hervorragenden Bedingungen an einem sehr interessanten Themengebiet forschen zu dürfen.

Frau Carmen Bauer, Elke Baumeister, Margarethe Röder, Sylvia Renker, Herrn Manfred Bernhard und Herrn Dr. Thomas Hansen-Hagge für die gute Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen und die freundschaftliche Atmosphäre während meiner Promotion.

„Meinen“ beiden Medizindoktorandinnen Jutta Heimrich und Stephanie Starke für Ihre Hilfe bei den X-Gal-Färbungen und der MTUS1-Sequenzierung.

Herrn Dr. Alois Palmetshofer, Frau Dr. Bettina Holtmann und Melanie Seider für die vielen Tipps und Tricks zum Thema Blastozysteninjektion.

Herrn Dr. Laszlo Krenacs für die zuverlässige und professionelle Hilfe bei den Pathologiebefunden.

Meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Mann und unserem Baby für Ihre Unterstützung.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	4
1.1	TUMORENTSTEHUNG.....	4
1.2	TUMORTHERAPIE	6
1.2.1	Klassische Therapeutika.....	6
1.2.2	Neue Therapieoptionen	7
1.2.3	Tumorsuppressor-Gene als neue Therapieoption.....	7
1.3	DAS TUMORSUPPRESSOR-GEN MTUS1	9
1.4	GENERIERUNG VON MTUS1-KNOCKOUT-MÄUSEN.....	13
2.	PROBLEMSTELLUNG.....	16
3.	MATERIAL.....	17
3.1	CHEMIKALIEN	17
3.1.1	Zellkultur.....	17
3.1.2	Klonierung.....	18
3.1.3	PCR	19
3.1.4	Bisulfit-Reaktion	20
3.1.5	Western-Blot	20
3.1.6	Etablierung der Knockout-Mäuse	23
3.1.7	X-Gal-Färbung	23
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
3.3	GERÄTE UND ZUBEHÖR.....	25
3.4	VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG	26
4.	METHODEN.....	27
4.1	UNTERSUCHUNGEN AN MIAPaCa-2-ZELLEN	27
4.1.1	Untersuchung der MiaPaCa-2-Zellen auf Mutationen in der codierenden Sequenz.....	27
4.1.2	Untersuchung der MiaPaCa-2-Zellen auf Mutationen in der Promotorregion	28
4.1.3	Untersuchung der MiaPaCa-2-Zellen bezüglich der DNA-Methylierung im Promotorbereich.....	29
4.1.4	Bestätigung der funktionellen Relevanz der untersuchten Promotorregion im Promotor-Assay.....	32
4.2	UNTERSUCHUNGEN AN siRNA-TRANSFIZIERTEN HUVEC-ZELLEN	36
4.2.1	Grundlagen.....	36
4.2.2	Western-Blot-Analyse von siRNA-transfizierten HUVEC-Zellen	37
4.2.3	Proliferationsverhalten von siRNA-transfizierten HUVEC-Zellen	39
4.3	UNTERSUCHUNGEN AN HUMANEN COLONTUMOREN UND UMGEBENDEM NORMALGEWEBE	39
4.3.1	Nachweis der MTUS1-Protein-Expression.....	39
4.3.2	Nachweis der MTUS1-mRNA-Expression.....	40
4.3.3	Untersuchung der Colontumore auf Mutationen in der codierenden Sequenz	41
4.3.4	Untersuchung der Colontumore auf Mutationen in der Promotorregion	42
4.3.5	Untersuchung der Colontumore bezüglich der DNA-Methylierung im Promotorbereich.....	43
4.4	ETABLIERUNG EINER MTUS1-KNOCKOUT-MAUS	44
4.4.1	Stammzellen Zellkultur	44

4.4.2	Mycoplasmentest.....	45
4.4.3	Identifizierung der Lage des Vektors	45
4.4.4	Vasektomie.....	47
4.4.5	Superovulation	48
4.4.6	Pseudogravide Weibchen	48
4.4.7	Stammzellinjektion.....	48
4.4.8	Zucht homozygoter Tiere	49
4.4.9	PCR zur Genotypisierung der Knockout-Mäuse.....	49
4.5	CHARAKTERISIERUNG DER KNOCKOUT-MAUS	50
4.5.1	Nachweis des Knockouts auf DNA-Ebene	50
4.5.2	Nachweis des Knockouts auf mRNA-Ebene	51
4.5.3	Nachweis des Knockouts auf Protein-Ebene	52
4.5.4	Expression der β -Galaktosidase in verschiedenen Mausorganen	52
4.5.5	Laboruntersuchung der Knockout-Mäuse.....	53
4.6	LANGZEITBEOBACHTUNG DER KNOCKOUT-MÄUSE.....	53
4.6.1	Gewichtsentwicklung der Knockout-Tiere	53
4.6.2	Blutdruck der Knockout-Tiere	53
4.6.3	Beobachtung der Knockout-Tiere	54
4.7	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON FIBROBLASTEN DER KNOCKOUT-MÄUSE ..	54
4.7.1	Isolierung und Kultivierung von Bauchhautfibroblasten.....	54
4.7.2	X-Gal-Färbung der Fibroblasten	55
4.7.3	Größenbestimmung der Fibroblasten durch FACS-Messung	55
4.7.4	Proliferation der Bauchhautfibroblasten	55
5.	ERGEBNISSE	56
5.1	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN AN MIAPACA-2-ZELLEN.....	56
5.1.1	Sequenzanalyse der codierenden Sequenz	56
5.1.2	Sequenzanalyse des Promotorbereichs.....	57
5.1.3	Analyse des Methylierungsgrades der Promotorregion	57
5.1.4	Funktionelle Analyse des Promotorbereichs mittels Promotor-Assay.....	59
5.2	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN AN siRNA-TRANSFIZIERTEN HUVEC-ZELLEN.....	61
5.2.1	Western-Blot-Analyse.....	61
5.2.2	Proliferationsassay	62
5.3	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN AN HUMANEN COLONGEWEBEN	62
5.3.1	Analyse der MTUS1-Protein-Expression.....	62
5.3.2	Analyse der MTUS1-mRNA-Expression.....	63
5.3.3	Sequenzanalyse der codierenden Sequenz	64
5.3.4	Sequenzanalyse des Promotorbereichs.....	65
5.3.5	Analyse des Methylierungsgrades der Promotorregion	66
5.4	ERGEBNISSE DER ETABLIERUNG DER KNOCKOUT-MAUS.....	68
5.4.1	Kultivierung der Stammzellen und Mycoplasmentest	68
5.4.2	Identifizierung der Vektorlage	69
5.4.3	Blastozysteninjektion und Zucht der Knockout-Tiere	71
5.5	ERGEBNISSE DER CHARAKTERISIERUNG DER KNOCKOUT-MAUS.....	73
5.5.1	Nachweis des Knockouts auf DNA-, mRNA- und Protein-Ebene.....	73
5.5.2	Expression der β -Galaktosidase in verschiedenen Mausorganen	74
5.5.3	Laborwerte der Knockout-Mäuse.....	78
5.6	ERGEBNISSE DER LANGZEITBEOBACHTUNG DER MTUS1-KNOCKOUT-MÄUSE.....	80
5.6.1	Zuchtauffälligkeiten	80
5.6.2	Gewichtsentwicklung der Knockout-Mäuse	81

5.6.3	Blutdruckwerte der Knockout-Mäuse	82
5.6.4	Laborwerte der Knockout-Mäuse.....	82
5.6.5	Organspezifische Veränderungen der Knockout-Mäuse.....	84
5.7	ERGEBNISSE DER ANALYSE DER BAUCHHAUTFIBROBLASTEN.....	91
5.7.1	Expression der β -Galaktosidase in Bauchhautfibroblasten.....	91
5.7.2	Größenbestimmung der Bauchhautfibroblasten.....	91
5.7.3	Proliferation von Bauchhautfibroblasten	92
6.	DISKUSSION	93
6.1	UNTERSUCHUNGEN AN MIAPACA-2- UND HUVEC-ZELLEN.....	93
6.2	UNTERSUCHUNGEN AN HUMANEN COLONGEWEBEN.....	96
6.3	UNTERSUCHUNGEN AN MTUS1-KNOCKOUT-MÄUSEN	98
7.	ZUSAMMENFASSUNG	104
8.	SUMMARY	107
9.	LITERATUR.....	109

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Maligne Erkrankungen stellen nach der Gruppe der Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar (Arias et al., 2003). Trotz aller Fortschritte auf diagnostischem und therapeutischem Gebiet liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für eine Krebserkrankung in Deutschland bei 58% für Frauen und bei 46% für Männer (Robert Koch Institut, 2006). Diese Unterschiede ergeben sich durch die verschiedene Tumorlokalisation und deren Prognose bei Männern und Frauen. So ist die häufigste maligne Neuerkrankung von Männern das Prostatakarzinom, bei Frauen dagegen das Mammakarzinom.

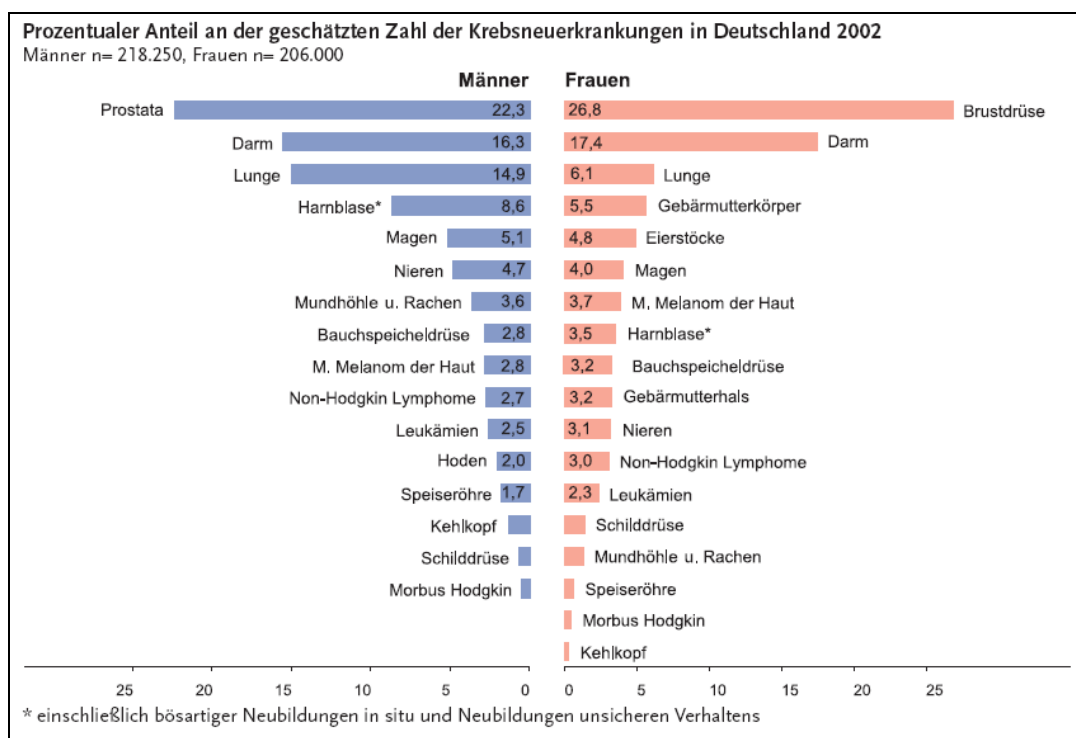


Abbildung 1: Prozentuale Verteilung der Krebsneuerkrankungen bei Männern und Frauen nach der Statistik des Jahres 2002 des Robert-Koch-Instituts

Die wesentlichen Charakteristika maligner Tumoren bestehen in der unkontrollierten Proliferation und im infiltrierenden, destruierenden und metastasierenden Wachstum des betroffenen Gewebes. Die Tumorgenese läuft dabei normalerweise in mehreren Phasen ab. Der entscheidende Schritt bei der Entstehung maligner Tumoren ist die Akkumulation von genetischen Mutationen in einzelnen Körperzellen. Diese Mutationen können bereits von den Eltern vererbt sein oder erst im Laufe des Lebens durch vielerlei Stoffe, so genannte Mutagene, ausgelöst werden. Zu den bekannten Mutagenen gehören Chemikalien wie z.B. Benzol, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Nitrosamine, ebenso wie energiereiche Strahlung in Form von radioaktiven Strahlen oder ultraviolettem Licht. Auch eine falsche Ernährung wie allgemeine Überernährung oder eine Ernährungsweise, die zuviel tierisches Fett und zuwenig Obst und Gemüse beinhaltet kann zur Mutagenese durch vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen führen. Über einen längeren Zeitraum akkumulieren so genetische Veränderungen in verschiedenen Genen in den betroffenen Körperzellen. Unabhängig von der

Art des Mutagens, können die daraus resultierenden Mutationen zur Aktivierung oder zur Inaktivierung der betroffenen Gene führen. Handelt es sich um Gene, die an der Regulation der Zellproliferation bzw. der Zelldifferenzierung beteiligt sind, so kann dies zur Entstehung maligner Körperzellen führen. Gene, die infolge Ihrer Aktivierung an der Tumorgenese beteiligt sind, werden Proto-Onkogene genannt, während Gene, die durch Inaktivierung zur Tumorgenese führen, als Tumorsuppressor-Gene bezeichnet werden (s. Abb.2).

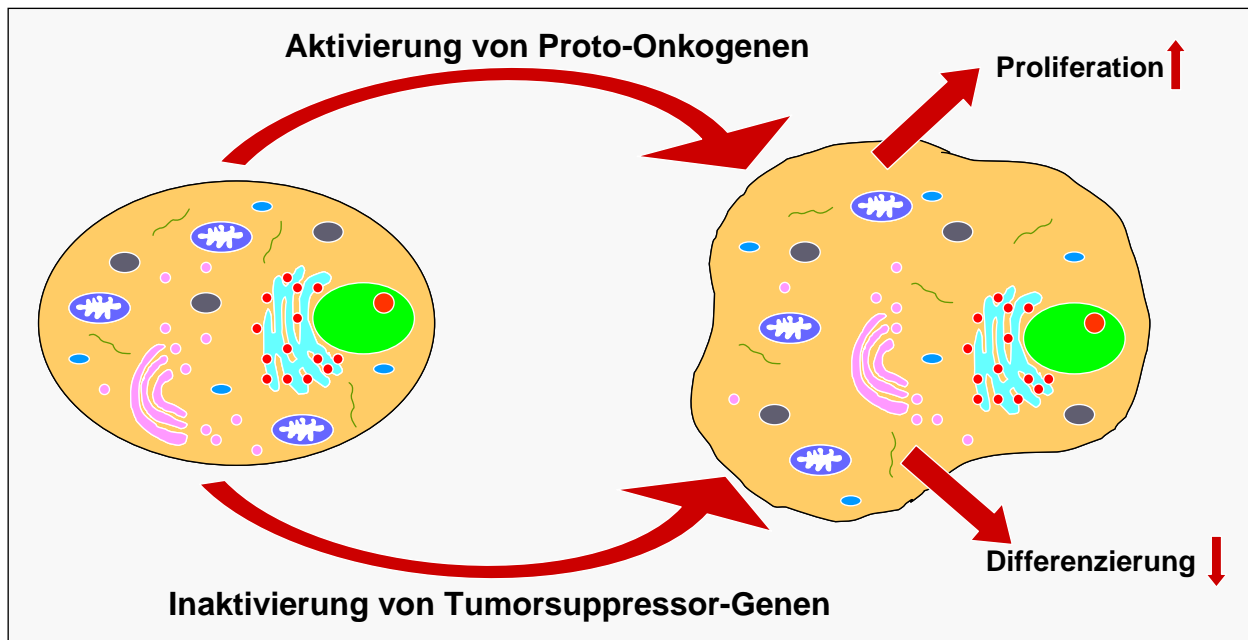


Abbildung 2: Die Entwicklung einer gesunden Zelle zu einer Tumorzelle kann durch die Aktivierung von Proto-Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen bedingt werden. Tumorzellen zeigen eine erhöhte Proliferation und eine reduzierte Differenzierung.

Proto-Onkogene codieren in der Regel für Proteine, die an der Zellteilung und Wachstumsregulation z.B. als Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Eine Aktivierung der Proto-Onkogene kann beispielsweise durch Mutationen im codierenden Bereich verursacht werden, wodurch sich die Struktur und damit die Aktivität des Proteins, verändern kann. Aber auch Infektionen mit onkogenen Viren oder eine vermehrte Genamplifikation durch Promotorveränderungen können für die Aktivierung von Proto-Onkogenen verantwortlich sein.

Tumorsuppressor-Gene hingegen codieren meist für Proteine, die das ungebremste Zellwachstum unterdrücken. Die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen kann ebenfalls durch eine Mutation der codierenden Sequenz ausgelöst werden. Das Gen wird in diesem Fall zwar abgelesen, aber durch die Mutation in der mRNA wird kein oder nur ein funktionell inaktives Protein gebildet. Eine andere Variante der Inaktivierung stellt die verminderte Expression des Gens dar. Hierbei wird das Gen durch eine Mutation in der Promotorregion oder durch eine veränderte Methylierung der Promotorregion in geringerem Ausmaß transkribiert, so dass keine ausreichende Menge an Protein gebildet werden kann. So konnte bereits in vielen Genen eine veränderte Methylierung der Promotorregion als Ursache für eine modifizierte Expression ausgemacht werden (Herman et al., 2003).

Zellen, bei denen eine Inaktivierung eines Tumorsuppressor-Gens oder eine Aktivierung eines Proto-Onkogens vorliegt, weisen eine erhöhte Proliferation und eine geringere Zelldifferenzierung im Vergleich zu normalen Zellen auf.

1.2 Tumorthherapie

1.2.1 *Klassische Therapeutika*

Bei den meisten Krebserkrankungen ist die Früherkennung wichtig, da sich bei einer frühzeitigen Diagnose die Überlebenschancen erhöhen. Nur selten, wie beispielsweise beim cerebralen Glioblastom, ist die Früherkennung bislang ineffektiv. Für Männer sind regelmäßige Untersuchungen z.B. auf Darm- und Prostatakrebs besonders wichtig, für Frauen sind z.B. ein Gebärmutterhalsabstrich und Mammographie-Vorsorgeuntersuchungen vorgesehen.

Die klassischen Möglichkeiten eine Tumorerkrankung zu behandeln, sind die operative Entfernung des Tumorgewebes, die Bestrahlung und die zytostatische Chemotherapie. In vielen Fällen wird eine Operation mit Bestrahlung oder Chemotherapie verbunden. Häufig kommt eine Kombination verschiedener Zytostatika zum Einsatz, die in ihrer Zusammensetzung abhängig von z.B. Tumorart, Tumorstadium und Patientenalter variieren kann. Gründe für eine Kombinationstherapie sind eine geringere Resistenzentwicklung der Krebszellen und damit eine Wirkungssteigerung ohne zusätzliches Toxizitätsrisiko.

Bei einer Operation wird der Tumor oder das befallene Gewebe chirurgisch entfernt. Das Ziel des operativen Eingriffes ist es, möglichst alle Krebszellen vollständig zu eliminieren. Die Tumorsektion erfolgt aus Sicherheitsgründen immer weiträumig, wobei immer umliegendes, gesundes Gewebe wie z.B. angrenzende Lymphknoten entfernt werden. Auch wenn das Tumorleiden durch einen erfolgreichen operativen Eingriff geheilt werden kann, wird oft eine so genannte adjuvante Strahlen- oder Chemotherapie durchgeführt, um eventuell noch verbliebene Tumorzellen zu eliminieren. Wenn eine chirurgische Entfernung des Tumors nicht möglich ist, kommt die Strahlen- oder Chemotherapie ohne vorausgehende Operation zum Einsatz.

Bei der radiologischen Therapie werden Strahlen gezielt auf den Tumor gerichtet, um die Krebszellen abzutöten. Hierbei können Röntgenstrahlen oder eine Strahlentherapie mit radioaktiven Stoffen wie z.B. Jod zum Einsatz kommen. Mittlerweile kann die Strahlung sehr zielgenau eingesetzt und dosiert werden, so dass das umliegende Gewebe möglichst wenig Schaden nimmt. Trotzdem ist eine Bestrahlung häufig mit gravierenden Nebenwirkungen wie Hautreizungen, Schleimhautentzündungen sowie gastrointestinale Beschwerden verbunden.

Die verwendeten Chemotherapeutika lassen sich in die Gruppe der Mitosehemmstoffe, der Alkylantien, der Antimetaboliten, der zytostatischen Antibiotika und der Hormone bzw. der Hormonantagonisten einteilen.

Die Mitosehemmstoffe hemmen den Zellzyklus und damit die Zellteilung. Einige greifen dabei so in den Aufbau der Kernspindel ein, dass sich diese nicht oder nur unzureichend ausbildet. Andere Stoffe hingegen verhindern den Abbau der Kernspindel, was ebenfalls in einer Störung des Stofftransports innerhalb der Zelle resultiert.

Unter Alkylantien versteht man alle Arzneistoffe, die durch die Alkylierung von Nukleinsäuren zu multiplen DNA-Veränderungen führen können. Diese Veränderungen können unabhängig von bestimmten Zellteilungsphasen z.B. durch DNA-Vernetzungen oder falsche Basenpaarungen gekennzeichnet sein.

Unter dem Begriff der Antimetaboliten werden Arzneistoffe zusammengefasst, die Antagonisten zu natürlichen Stoffwechselbausteinen wie z.B. Folsäure oder den verschiedenen Basen darstellen und so zur Blockade von Enzymen oder zur Fehlbildung von Proteinen führen. Die Folge ist eine Schädigung des Zellstoffwechsels, betroffen sind hier vor allem schnell proliferierende Zellen.

Eine weitere Therapieoption bieten Antibiotika, die wegen ihrer zytostatischen Wirkung nicht in der antibakteriellen, aber in der Tumorthherapie eingesetzt werden können. Zu nennen sind hier

vor allem die Anthracycline, die zum einen durch Interkalation mit der DNA zur Hemmung der Nukleinsäuresynthese führen und zum anderen DNA-Doppelstrangbrüche induzieren.

Für viele Tumoren, deren Wachstum hormonabhängig ist, kann auch eine Therapie mit Hormonen oder Hormonantagonisten eingesetzt werden. So sind Östrogene bei Prostatakarzinomen indiziert, um das Tumorstadium und die Metastasierung zu reduzieren. Aber auch Antiöstrogene und Antiandrogene können je nach Tumorart zum Einsatz kommen.

Das gemeinsame Wirkprinzip aller Chemotherapeutika ist das Verhindern oder zumindest die Verlangsamung der Zellteilung. Nachdem Chemotherapeutika Strukturen angreifen, die ubiquitär in den Zellen vorkommen, weisen sie eine hohe Toxizität auf. Alle schnell proliferierende Gewebe, darunter das Tumorgewebe, aber auch z.B. Knochenmarkszellen, Haut oder Schleimhäute werden durch die Zytostatika besonders geschädigt. Typische schwere Nebenwirkungen sind dementsprechend eine Hemmung der Hämatopoese, eine höhere Infektanfälligkeit in Folge der Immunsuppression, gastrointestinale Beschwerden sowie Haarausfall und entzündete Schleimhäute.

1.2.2 Neue Therapieoptionen

In den letzten Jahren sind viele neue Ansätze in der Krebstherapie entstanden. Zu nennen wäre hier die Behandlung mit Immunmodulatoren, die die biologische Reaktion des Körpers auf den Tumor unterstützen. Ein Beispiel ist das Interleukin 2, das beim Nierenzellkarzinom eingesetzt wird. Als so genanntes Cytokin erhöht es die Zytotoxizität von T-Zellen und die Aktivität der natürlichen Killerzellen.

Aber auch Therapien mit monoklonalen Antikörpern werden bereits eingesetzt. Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab beispielsweise blockiert das Her2-Protein, so dass dieses nicht mehr an den p185Her2-Rezeptor binden kann. Da es sich dabei um einen Wachstumsfaktor-Rezeptor handelt, der bei ca. 30% der Frauen mit Brustkrebs überexprimiert ist, kann so das Wachstum der Zellen unterdrückt werden. Zugleich können die Antikörper-Rezeptor-Komplexe von T-Killerzellen erkannt und die malignen Zellen so eliminiert werden.

Einen sehr erfolgreichen Arzneistoff stellt das Imatinib dar, das bei der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt wird und durch die Inhibierung der abnormal stimulierten Tyrosinkinase die Zellproliferation bremst.

Darüber hinaus wurden neue Angriffspunkte für Wirkstoffe definiert. So dient nun die Angiogenese als neues Angriffsziel für Arzneistoffe oder verschiedene Enzyme der Signaltransduktionswege und des Zellzyklus.

Aber auch die Gentherapie hat neue Therapieoptionen zu bieten. Denkbare Ansätze für eine Gentherapie wären die Stimulation des Immunsystems zur Eliminierung von Tumoren und Metastasen. Auch der Transfer und somit die Reparatur von Tumorsuppressor-Genen oder eine Onkogen-Inhibition könnten neue Heilungserfolge bringen.

1.2.3 Tumorsuppressor-Gene als neue Therapieoption

Trotz vielerlei Fortschritte in der Tumorthherapie sind die zahlreichen und zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen von Bestrahlung und Zytostatika-Behandlung ein erhebliches Problem. Hoffnung auf Lösung dieses Problems bieten vor allem die neueren Therapieoptionen und die gentechnischen Möglichkeiten. Nachdem die Entstehung von Tumoren immer auf Mutationen oder Promotorveränderungen von Tumorsuppressor-Genen oder

Proto-Onkogenen zurückzuführen ist, stellt die Erforschung dieser Gene möglicherweise den Schlüssel für die Therapie der Zukunft dar.

Bei dem Tumorsuppressor-Gen p53 handelt es sich um einen gut charakterisierten und sehr bekannten Transkriptionsfaktor, der den Zellzyklus und die Apoptose reguliert. Nach Zellschädigungen kann p53 die Zellteilung bis zur Reparatur des Zellschadens unterbinden oder aber bei irreparabler Zellschädigung den programmierten Zelltod dieser Zelle herbeiführen. Genetische Veränderungen, die zur Inaktivierung von p53 führen, finden sich bei etwa 50 % aller malignen Tumoren (Sherr, 2004). Damit ist p53 nach heutigem Wissensstand das am häufigsten inaktivierte Tumorsuppressor-Gen bei malignen Erkrankungen (Sherr, 2004). Tumorsuppressor-Gene verhalten sich im Allgemeinen rezessiv, so dass erst nach der Inaktivierung aller vorhandenen Allele das Auftreten von Tumorerkrankungen begünstigt wird. Die Charakterisierung von p53 und vielen anderen Genen wurde vor allem durch die Möglichkeit erleichtert, mit speziellen Techniken transgene Mäuse zu etablieren. Diese Knockout-Maus-Modelle haben vielfältige Vorteile. So können heterozygote Knockout-Mäuse eines Tumorsuppressor-Gens als Studienobjekt für Menschen angesehen werden, die durch eine erworbene oder vererbte Veränderung eines Tumorsuppressor-Gen Allels eine Prädisposition für Krebserkrankungen aufweisen. Darüber hinaus konnten mit Hilfe der Knockout-Tiere bereits viele Einblicke in die Rolle von Tumorsuppressor-Genen in der Embryologie gewonnen werden. Hier wären vor allem die Gebiete der Organogenese, der Zellzykluskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose zu nennen (Ghebraniou et al., 1998). Auch die Möglichkeit, zwei verschiedene Knockout-Linien miteinander zu verkreuzen und so Doppel-Knockout-Tiere zu generieren, bietet viele Vorteile gegenüber beispielsweise Zellkulturmodellen. So können die Effekte eines Tumorsuppressor-Gens auf ein zweites untersucht werden oder die Tumorgenese in Doppel-Knockout-Mäusen analysiert werden. Der wichtigste Vorteil stellt allerdings die Charakterisierung des ausgeschalteten Gens *in vivo* dar. Nur in einem lebenden Modell mit all seinen Organen und komplexen Stoffwechselprozessen können die Auswirkungen eines Gens vollständig untersucht werden.

Die Charakterisierung des p53-Gens konnte mit Hilfe eines Knockout-Maus-Modells bereits weit vorangetrieben werden. Transgene p53-Knockout-Mäuse, bei denen beide p53-Allele inaktiviert wurden, zeigen zwar eine weitgehend normale Entwicklung, neigen aber im Laufe ihres Lebens zur spontanen Entstehung von Tumoren (Donehower et al., 1992). Demnach traten bei 74 % der homozygoten p53-Knockout-Mäuse innerhalb von 9 Monaten maligne Erkrankungen auf, im Mittel waren die Tiere dabei gerade einmal 20 Wochen alt. Am häufigsten fanden sich Lymphome oder Sarkome, seltener auch Adenokarzinome oder benigne Tumoren. Heterozygote transgene p53-Mäuse entwickelten nur selten spontan Tumore (Donehower et al., 1992), zeigten jedoch eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Karzinogenen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Harvey et al., 1993). Weitere Untersuchungen an transgenen p53-Mäusen belegten, dass durch genetische Veränderungen eines p53-Allels dominant negative p53-Mutanten entstehen können, die das zweite gesunde p53-Allel funktionell inaktivieren können (Harvey et al., 1995). Auch der genetische Hintergrund des jeweiligen Inzuchtstamms der p53-Knockout-Mäuse beeinflusst das Spektrum und die Häufigkeit der malignen Tumoren in diesen Tieren, und deutet damit auf ein Zusammenspiel verschiedener genetischer Faktoren bei der Tumorentstehung hin (Harvey, et al., 1993). Des Weiteren belegten Untersuchungen in Doppel-Knockout-Mäusen, in denen zwei unterschiedliche Tumorsuppressor-Gene inaktiviert wurden, die Interaktion unterschiedlicher genetischer Faktoren bei der Tumorentstehung (Harvey et al., 1995). Derzeit geht man davon aus, dass in soliden Tumoren zumindest drei verschiedene genetische Veränderungen akkumulieren müssen, ehe ein maligner Tumor entsteht (Komarova et al., 2003). Bei Lymphomen und Leukämien hingegen kann möglicherweise auch eine geringere Anzahl von genetischen Veränderungen zur Tumorentstehung führen (Nowell, 2002).

Nachdem das p53-Gen auch das Potenzial besitzt, normal wachsende Zellen durch induzierte Apoptose zu eliminieren, wird die Stabilität und damit die Aktivität des p53-Proteins durch mehrere Proteine kontrolliert (Vassilev, 2005). Dabei scheint das MDM2-Gen eine herausragende Rolle zu spielen (Haupt et al., 1997). Fehlt dieses Gen in MDM2-Knockout-Mäusen, so sind die Embryonen bereits letal, während eine MDM2- und p53-Doppel-Knockout-Maus hingegen wieder lebensfähig ist (Jones et al., 1995). Nachdem die p53-MDM2-Bindung vorwiegend durch drei Aminosäuren von p53 mit einer MDM2-Tasche vermittelt wird, wurde hier ein erster Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika gesehen.

Ein Sulfonamid-Derivat konnte eine dosisabhängige, allerdings relativ schwache Hemmung der p53-MDM2-Bindung erreichen (Galatin et al., 2004). Kurz darauf wurde ein erster, im submikromolaren Bereich wirksamer MDM2-Antagonist publiziert, der eine p53-Akkumulation in Tumorzellen zur Folge hatte (Yin et al., 2004).

Ebenfalls im Jahr 2004 publizierten Vassilev et al. eine Gruppe von MDM2-Antagonisten, die so genannten „Nutlins“. Dabei handelt es sich um cis-Imidazolin-Analoga, die mit der p53-Tasche des MDM2-Proteins interagieren. Die Substanzen wiesen neben einer hohen Wirksamkeit auch das Potenzial auf, durch Membranen zu penetrieren und durch Akkumulation von p53 den p53-Signalweg zu aktivieren (Vassilev, 2005). Bei primären Tumorzellen, die aus dem Gewebe von humanen Myelomen gewonnen wurden, konnte eine Behandlung mit Nutlins eine effiziente Eliminierung der Tumorzellen durch Apoptose erzielen (Stuhmer et al., 2006). Allerdings muss für diese Art der Therapie zumindest noch eine geringe p53-Expression vorausgesetzt werden.

Beim Transfer von gesunden Genen in erkrankte Zellen muss dagegen keine Rest-Expression des betreffenden Gens vorliegen. So zeigten Untersuchungen, dass der Transfer von bis zu drei Anti-Tumorgenen durch einen Vektor des Semliki-Forest-Virus möglich ist und eine höhere Apoptoserate und Inhibierung der Zellproliferation erzielen kann, als der Transfer nur eines Gens (Segnatus et al., 2006).

Um die komplexen Prozesse bei der Tumorentstehung besser verstehen zu können, ist es weiterhin notwendig, neue Tumorsuppressor-Gene zu identifizieren und die Interaktionen dieser Gene mit bereits bekannten Tumorsuppressor-Genen oder Proto-Onkogenen zu erforschen. Entsprechende Modelle konnten nicht nur für p53, sondern auch für andere Tumorsuppressor-Gene entwickelt werden, so dass in nächster Zukunft neue Therapieoptionen mit gentechnischem Hintergrund zu erwarten sind.

1.3 Das Tumorsuppressor-Gen MTUS1

Zur Identifizierung und Charakterisierung von weiteren, bislang nicht bekannten Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen wurde in früheren Arbeiten die molekulare Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung untersucht, da diese als entscheidende Prozesse bei der Tumorentstehung und Tumorprogression angesehen werden (Seibold et al., 2003). Zelldifferenzierung und Zellzyklus-Arrest lassen sich *in vitro* induzieren, indem primäre Zellen aus proliferierenden zweidimensionalen Zellkulturen in dreidimensionale Kollagen-Typ-I-Zellkultursysteme transferiert werden (Gruber et al., 200; Marx et al., 1994; Prols et al., 2001). Zur Identifizierung von Genen, die an der Regulation der Induktion der Zelldifferenzierung und des Zellzyklus beteiligt sind, wurde die Genexpression in proliferierenden, undifferenzierten Zellen in zweidimensionaler Zellkultur mit der Genexpression in nicht-proliferierenden, sich differenzierenden Zellen in dreidimensionaler Zellkultur mit Hilfe der Technik des „Differential Display“ miteinander verglichen (Liang et al., 1992). Dabei konnte ein neues Gen identifiziert werden, das während der Induktion des Zellzyklusarrest und der Zelldifferenzierung

hochreguliert wird und in Übereinstimmung mit den „Guidelines for Human Gene Nomenclature“ nun als MTUS1 bezeichnet wird (Seibold et al., 2003). Die beobachtete Hochregulation von MTUS1 während der Induktion des Zellzyklusarrests und der Zelldifferenzierung entspricht dem erwarteten Verhalten eines Tumorsuppressor-Gens.

Zudem ist MTUS1 beim Menschen auf Chromosom 8p21.3-22 lokalisiert und liegt zwischen den Markern D8S254 und D8S261. Dabei ist der Marker D8S254 nur 0,9 Megabasen, und der Marker D8S261 nur 0,1 Megabasen vom MTUS1-Gen entfernt lokalisiert. Exakt in diesem Bereich, auf Chromosom 8p21.3-22, wurde die Existenz eines neuen Tumorsuppressor-Gens postuliert, da genetische Veränderungen in diesem Bereich für die Progression beim Mammakarzinom, Lungenkarzinom, Larynxkarzinom, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Hepatozellulären Karzinom, Pankreaskarzinom, Karzinom der Papilla vateri, Blasenkarzinom und beim Prostatakarzinom verantwortlich gemacht werden (Fujiwara et al., 1993; Bardi et al., 1993; Kerangueven et al., 1997; Ishii et al., 1999; Chan et al., 2002; Wistuba et al., 1999; Suzuki et al., 1995; Wagner et al., 1997; El Naggar et al., 1998). Für manche dieser Tumoren konnte der verantwortliche Genbereich auf Chromosom 8p21.3-22 weiter eingegrenzt werden. So geht der Allelverlust des Markers D8S261 unter anderem mit der Tumorprogression beim Lungenkarzinom, Larynxkarzinom, Magenkarzinom, Hepatozellulärem Karzinom und dem Prostatakarzinom einher (Wistuba et al., 1999; El Naggar et al., 1998; Kahng et al., 2003; Tamura et al., 2003; Mc Carthy et al., 2004). Der Allelverlust des nur etwa 1 Megabasen davon entfernten Markers D8S254 ist mit der Tumorprogression beim Mammakarzinom, Larynxkarzinom, Colonkarzinom und beim Prostatakarzinom assoziiert (Vocke et al., Yaremko et al., 1995; Tsai et al., 2002; Sasiadek et al., 2001). Auch funktionell konnte die Existenz von Tumorsuppressor-Genen auf Chromosom 8 bestätigt werden. Zum einen ließ sich durch den Transfer von gesundem Chromosom 8 in kolorektale Tumorzelllinien das maligne Potential der Tumorzellen reduzieren (Gustafson et al., 1996). Zum anderen konnte durch Chromosom-8-Transfer das Metastasierungspotential in Prostatakarzinomzellen verringert werden (Ichikawa et al., 1994).

Die MTUS1-mRNA umfasst 3738bp und kodiert ein Protein mit einer Länge von 436 Aminosäuren mit einer kalkulierten Masse von ca. 50kDa. Darüber hinaus wurden für die MTUS1-Sekundärstruktur fünf coiled-coil-Motive und zwei Leucin-Zipper-Motive vorausgesagt. Diese Motive könnten für Protein-Protein oder Protein-DNA-Interaktionen verantwortlich sein.

MTUS1 wird ubiquitär in allen gesunden Geweben exprimiert, somit auch in den Geweben für die eine Progression der Tumoren beim Allelverlust von 8p21.3-22 gezeigt werden konnte (Seibold et al., 2003).

Seibold et al. konnten bei weiteren Untersuchungen eine deutliche Reduktion der MTUS1-Expression bzw. eine komplette Inaktivierung von MTUS1 in Tumorzelllinien und Tumorgewebe nachweisen. In verschiedenen Zelllinien des Pankreaskarzinoms konnte festgestellt werden, dass die MTUS1-Expression invers mit der Proliferationsrate und dem Differenzierungsgrad in unterschiedlichen Tumorzelllinien korreliert. Langsam proliferierende und gut differenzierte Tumorzelllinien zeigten wie Normalgewebe eine hohe MTUS1-Expression. Hingegen wiesen mäßig proliferierende und mäßig differenzierte Tumorzelllinien gegenüber Normalgewebe eine erniedrigte MTUS1-Expression auf. In der hochmalignen Pankreastumorzelllinie MiaPaCa-2 und in Gewebe eines Pankreaskarzinoms war MTUS1 komplett inaktiviert (s. Abb.3). Entzündlich verändertes Pankreasgewebe zeigte gegenüber Normalgewebe hingegen keine veränderte MTUS1-Expression, so dass eine den Tumor umgebende Entzündungsreaktion als Ursache der Inaktivierung von MTUS1 beim Pankreaskarzinom praktisch ausgeschlossen werden kann.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MTUS1 in der Pankreastumorzelllinie MiaPaCa-2 komplett inaktiviert ist, wurde MTUS1 in dieser Tumorzelllinie rekombinant exprimiert. Dabei

konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass MTUS1 die Tumorzellproliferation signifikant inhibieren kann (s. Abb.3, Seibold et al., 2003). Somit scheint MTUS1 an der Regulation der Proliferation beteiligt zu sein.

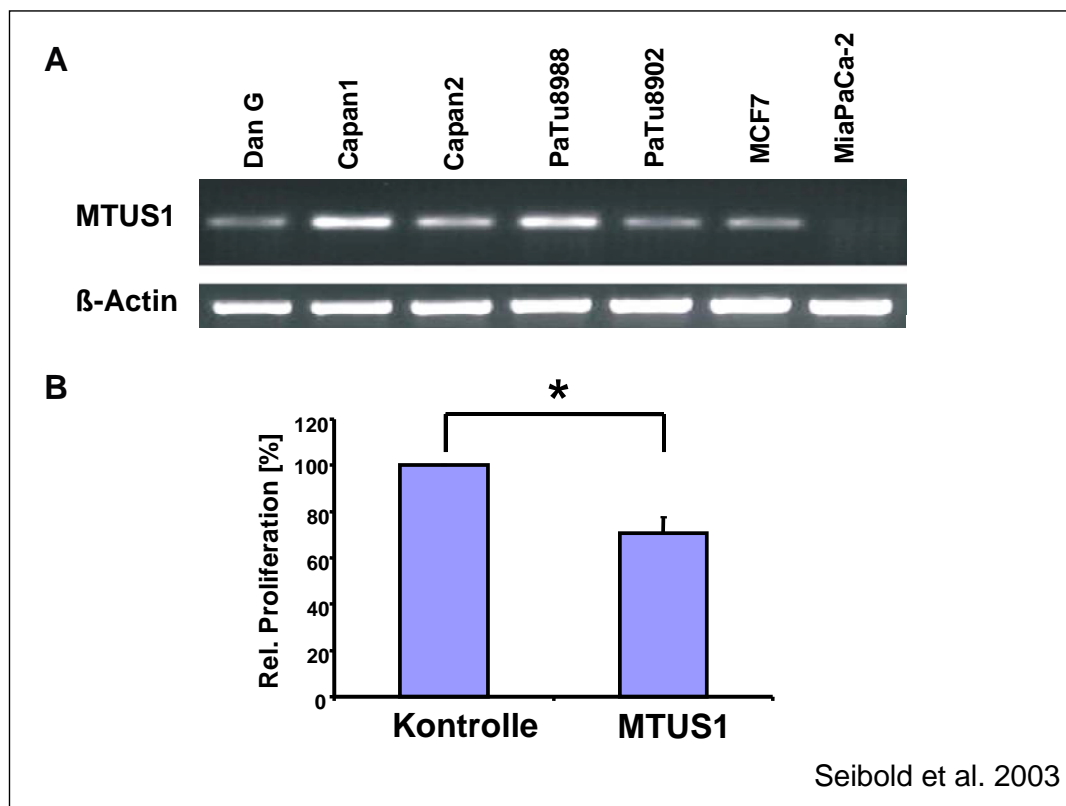


Abbildung 3: A, Eine hohe MTUS1-Expression konnte in gut differenzierten und langsam wachsenden Tumorzellen (Capan1, Capan2 und PaTu8988) nachgewiesen werden, eine niedrige Expression in schnell und undifferenziert wachsenden Tumorzellen (DanG, PaTu8902, MCF7 und MiaPaCa-2). B, verminderte Zellproliferation von MiaPaCa-2-Zellen nach rekombinanter Expression von MTUS1.

Zwei kürzlich publizierte Arbeiten beschäftigen sich ebenfalls mit dem potenziellen Tumorsuppressor-Gen MTUS1 (Nouet et al., 2004; Wruck et al., 2005).

Nouet et al. identifizierten das MTUS1-Protein unter dem Namen ATIP als ein Protein, das an das C-terminale Ende des AT2-Rezeptors binden kann. Es ist mehrfach beschrieben worden, dass der AT2-Rezeptor einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor darstellt, der über eine Hemmung der Adenylylcyclase auch die Proteinkinase-A inhibieren kann und damit einen Gegenspieler des AT1-Rezeptors darstellt. Allerdings müssen für einige Funktionen des Rezeptors davon abweichende Signalwege existieren (Landon et al., 2005). Das Protein ließ sich in vier Isoformen isolieren, die alle eine coiled-coil-Region aufwiesen und die Möglichkeit zur Dimerisierung besaßen. Die coiled-coil-Region wurde als Bindungspartner des AT2-Rezeptors identifiziert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ATIP in weit mehr Geweben exprimiert wird als der AT2-Rezeptor. Es wurde des Weiteren nachgewiesen, dass ATIP nicht nur in Tumorzellen an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist. Auch in primären Zellen, die mit fötalem Kälberserum oder den Wachstumsfaktoren Insulin, „basic fibroblast growth factor“ (bFGF), „platelet derived growth factor“ (PDGF), oder „epidermal growth factor“ (EGF) behandelt wurden, ließ sich in dieser Studie ein signifikant inhibitorischer Effekt auf die Zellproliferation nachweisen (Nouet et al., 2004). Dabei waren die beobachteten Effekte ähnlich denen des AT2-Rezeptors, wobei der inhibitorische Effekt von ATIP die Expression, nicht aber die Aktivierung des AT2-Rezeptors benötigte. Die Stimulation mit Angiotensin II führte zu einer Verstärkung

der vermittelten Effekte. Nachdem zudem nachgewiesen werden konnte, dass ATIP die Phosphorylierung der „extracellular regulated kinase“ (ERK2) inhibieren kann, lassen die Ergebnisse vermuten, dass ATIP mit dem AT2-Rezeptor kooperiert, um durch Inhibierung des Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Signalwegs die Zellproliferation zu regulieren (Nouet et al., 2004).

Es gibt bereits Hinweise, dass die antiproliferierenden Effekte des AT2-Rezeptors mit der Aktivierung von Tyrosinphosphatasen und der Inhibierung von Proteinkinasen einhergehen, was schließlich zu einer Hemmung von ERK2 führt. So scheint der AT2-Rezeptor funktionell mit der Tyrosinphosphatase SHP-1 gekoppelt zu sein, die z.B. zur Hemmung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase unter anderem durch Autophosphorylierung führen kann (Nouet et al., 2004).

Mehrere Mitglieder des RTK-Signalwegs wurden bereits als Tumorsuppressor-Gene identifiziert (Vogelstein et al., 2004).

Gen (Synonym)	Genetische Veränderung	Erkrankung
NF1	hereditär	Neurofibromatose-Typ I
ABL1	somatisch, Translokation	chronisch myeloische Leukämie
ALK	somatisch, Translokation	anaplastisches großzelliges Lymphom
BRAF	somatisch, Punktmutation	Melanom, kolorektales Karzinom, Schilddrüsenkarzinom
EGFR	somatisch, Punktmutation	Glioblastom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
EPHB2	somatisch, Punktmutation	Prostatakarzinom
ERBB2	somatisch, Amplifikation	Mammakarzinom, Ovarialkarzinom
FES	somatisch, Punktmutation	Colonkarzinom
FGFR1-3	somatisch, Translokation	Lymphom, Magenkarzinom, Blasenkarzinom
FLT3, 4	somatisch, Punktmutation	Leukämien, Angiosarkome
JAK2	somatisch, Translokation	Leukämien
KRAS2, N-RAS	somatisch, Punktmutation	kolorektales Karzinom, Pankreaskarzinom, Bronchialkarzinom
NTRK1, 3	somatisch, Translokation	Schilddrüsenkarzinom, Mammakarzinom, Colonkarzinom
PDGFB	somatisch, Translokation	Dermatofibrosarkome, Fibroblastome
PDGFRB	somatisch, Translokation	Leukämien

Tabelle 1: Gene des RTK-Signalwegs, die mit Tumorerkrankungen assoziiert sind (Vogelstein et al., 2004).

Die Beeinflussung der Signaltransduktion des RTK-Signalwegs wird therapeutisch sehr erfolgreich bei verschiedenen Tumorerkrankungen angewendet. So wurde Trastuzumab als Antikörper gegen das Her2-Protein erfolgreich bei Brustkrebspatienten eingesetzt, die eine Überexpression dieses Proteins aufwiesen (Papazisis et al., 2004). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib kann bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren eine Progression der Erkrankung verhindern (Verweij et al., 2004) und wird erfolgreich bei chronisch myeloischer Leukämie eingesetzt (O'Brien et al., 2004).

Wruck et al. beschrieben ebenfalls, dass das MTUS1-Protein, hier unter dem Namen ATBP, an das C-terminale Ende des AT2-Rezeptors bindet. Zusätzlich wurden drei Isoformen des Proteins

isoliert. Auch hier konnte die Expression von ATBP in allen getesteten Organen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren wiesen allerdings AT2-Knockout-Tiere eine stark reduzierte ATBP-Expression auf, die im Uterus sogar unter 10% des Ausgangswerts sank. Weiterhin konnte eine Kolo-kalisation von ATBP und einem Golgi-Marker in der perinuklearen Region nachgewiesen werden. Die Golgi-Lokalisierung ist dabei offensichtlich nicht durch die coiled-coil-Region vermittelt. Die Arbeit von Wruck et al. legt nahe, dass das ATBP-Protein für den Transport des AT2-Rezeptors zur Zelloberfläche verantwortlich sein könnte. Nach Stimulation durch Angiotensin II konnte eine erhöhte ATBP-mRNA-Expression nachgewiesen werden und die zellulären Effekte des AT2-Rezeptors scheinen von ATBP abhängig zu sein (Wruck et al., 2005).

Diese beiden Publikationen deuten darauf hin, dass der AT2-Rezeptor über Signalwege verfügt, die über die eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors hinausgehen und die ganz oder zumindest teilweise durch MTUS1 vermittelt werden könnten (Landon et al., 2005).

Darüber hinaus scheint MTUS1 aus einer Proteinfamilie von mindestens drei Proteinen zu bestehen, wobei bei allen drei Veröffentlichungen vor allem das Protein mit einer Größe von ca. 50kDa untersucht wurde. Dieses Protein wurde durch die Transkription von zehn Exons erhalten, denen eine vom Computerprogramm TESS des „Penn Centers for Bioinformatics“ (www.pcbi.upenn.edu) vorhergesagte Promotorregion vorgelagert war. Die Struktur des Proteins wies fünf coiled-coil-Regionen und zwei Leucin-Zipper-Motive auf. Darüber hinaus wurde das Protein in allen getesteten Geweben exprimiert.

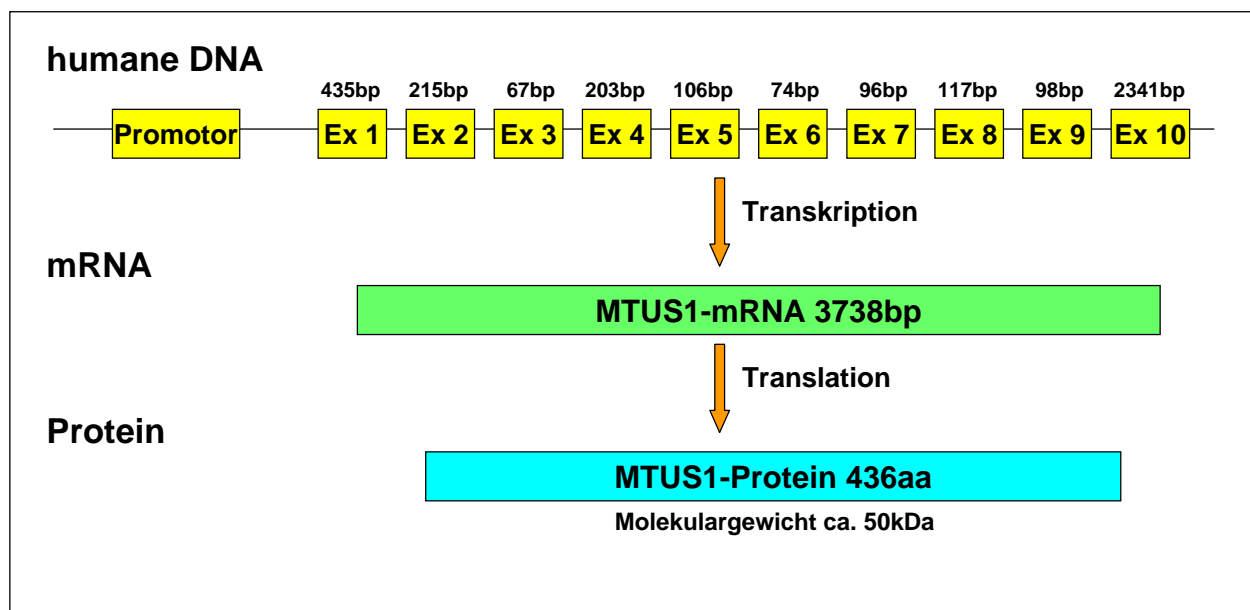


Abbildung 4: Darstellung der Transkription und Translation des 50kDa MTUS1-Proteins.

1.4 Generierung von MTUS1-Knockout-Mäusen

Für die geplante Generierung von MTUS1-Knockout-Mäusen konnte für diese Arbeit eine bereits existierende gentechnisch veränderte Stammzelllinie des wissenschaftlichen Konsortiums Baygenomics verwendet werden. Dieses Konsortium konnte in der Vergangenheit durch die Methode der Insertionsmutagenese bereits über 9000 verschiedene transgene embryonale Stammzelllinien der Mauslinie 129/Ola etablieren und für die Wissenschaft zur Verfügung stellen (Stryke et al., 2003). Die transgene embryonale Stammzelllinie für das MTUS1-Gen (Zelllinie RRA048) wurde von Baygenomics durch die zufällige Insertion des pGT11xf-Vektors

im 13,5 Kilobasen großen Intronbereich zwischen Exon 3 und 4 des MTUS1-Gens gewonnen. Durch die Insertion des pGT11xf-Vektors wird eine zusätzliche Exonsequenz zwischen Exon 3 und Exon 4 des MTUS1-Gens eingeschleust, die für 1323 Aminosäuren mit einer β -D-Galaktosidase und Neomycin-Fusionsdomäne (β -geo) und einer 3'-Phosphotransferase-Domäne gefolgt von einem Stopkodon codiert. Das Transkript des genetisch modifizierten MTUS1-Gens der embryonalen Stammzelllinie RRA048 codiert somit für ein funktionell inaktives MTUS1-Protein, da die C-terminalen 306 Aminosäuren des MTUS1-Proteins durch eine 1323 Aminosäuren umfassende Sequenz ersetzt wurden.

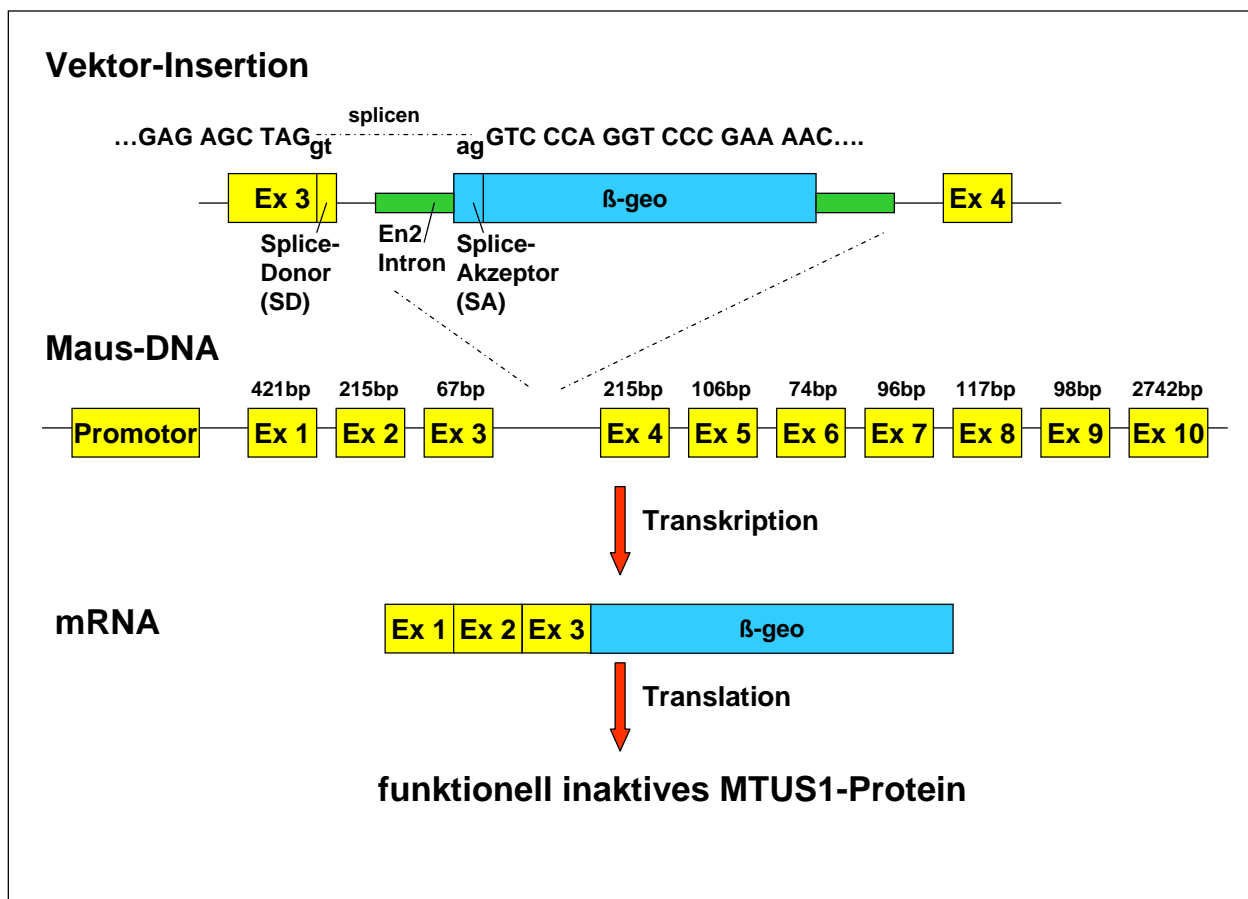


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Insertionsmutagenese in der Stammzelllinie RRA048.

Die Technik der Knockout-Maus-Generierung ist mittlerweile weit verbreitet. Trotzdem ist der Erfolg neben dem handwerklichen Geschick auch abhängig von der Qualität der verwendeten Stammzellen und der Blastozysten. Als Blastozystenspender hat sich die Mauslinie C57/Bl6 gut bewährt, da diese Linie für ihre guten Zuchteigenschaften und hohe Embryozahlen bekannt ist. Als pseudogravide Empfängertiere werden vorwiegend Mauslinien wie z.B. die CD1-Mauslinie verwendet, die sich besonders in der Brutpflege auszeichnen.

Die manipulierten Stammzellen werden üblicherweise mit Hilfe eines Mikroinjektionsmikroskops in die isolierten Blastozysten injiziert. Anschließend werden diese Blastozysten in ein Uterushorn des Empfängertiers transferiert, wo sie sich einnisten und weiterentwickeln können. Nach einer Tragezeit von ca. 20 Tagen werden die Mäuse geboren. Wenn die injizierten Stammzellen in der Blastozyste zugrunde gegangen sind, die Blastozyste selbst sich aber weiterentwickeln konnte, resultiert daraus ein Wildtyp-Tier, das an seiner schwarzen Fellfarbe zu erkennen ist. So genannte chimäre Tiere entstehen dagegen, wenn die injizierten Stammzellen sich in den Zellverbund der Blastozyste integrieren konnten. Diese Tiere weisen einen

mosaikartigen Genotyp auf, da sie teilweise Zellen mit unveränderten Genen besitzen, teilweise aber auch Zellen mit einem veränderten Allel des betreffenden Gens. Nachdem die genveränderten Zellen aus einer weißen Mauslinie stammen, die Blastozysten hingegen aus einer schwarzen Linie, können die chimären Tiere an ihrem braunen oder schwarz-weiß gefleckten Fell erkannt werden. Für die Zucht von homozygoten Knockout-Mäusen werden die chimären Tiere mit C57Bl/6-Wildtyp-Tieren verkreuzt. Der daraus resultierende Nachwuchs weist einen Wildtyp-Genotyp und ein schwarzes Fell auf, wenn das chimäre Tier den unveränderten Genotyp vererbt hat. Werden braune Nachkommen erhalten, so gehen diese Tiere auf die weißen genveränderten Zellen der chimären Maus zurück. Der Genotyp dieser braunen Nachkommen muss dennoch anhand von Genotypisierungen bestimmt werden, da die genveränderten Zellen nur ein verändertes Allel aufweisen, während das zweite Allel unverändert vorliegt. Die Verteilung von heterozygotem und Wildtyp-Genotyp sollte nach den Mendelschen Regeln im Verhältnis 1:1 erfolgen. Die F2-Generation kann schließlich durch das Verkreuzen von zwei heterozygoten Tieren erhalten werden, hier kann ebenfalls gemäß den Mendelschen Regeln eine Genotypverteilung Wildtyp:heterozygot:homozygot von 1:2:1 erwartet werden. In der F2-Generation können anhand der Fellfarbe keine Rückschlüsse auf den Genotyp getroffen werden, so dass alle Tiere genotypisiert werden müssen.

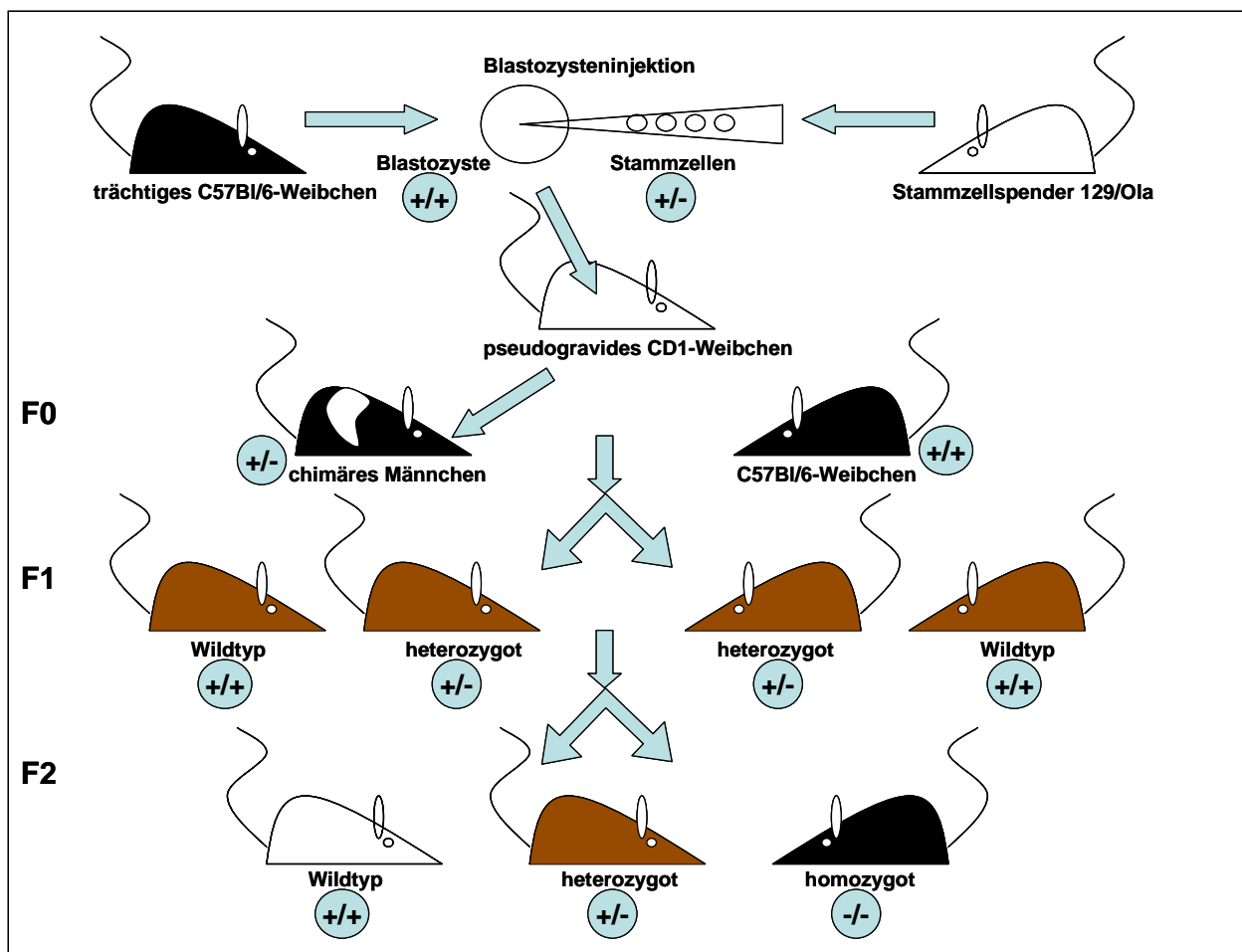


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Generierung von Knockout-Mäusen. Durch die Blastozysteninjektion können chimäre Tiere erhalten werden, aus deren Verkreuzung mit Wildtyp-Mäusen zunächst heterozygote Tiere und in der F2-Generation homozygote Tiere generiert werden können.

2. Problemstellung

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass MTUS1 Eigenschaften eines Tumorsuppressor-Gens aufweist. Ziel war es nun, die Tumorsuppressor-Funktion von MTUS1 *in vitro* und *in vivo* zu bestätigen. Dieser Arbeit lag dabei die Hypothese zugrunde, dass das MTUS1-Gen durch eine veränderte Expression die Zellproliferation beeinflussen kann und in der Folge an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt ist.

Zur Bestätigung dieser Hypothese sollten die Umstände für die nicht nachweisbare MTUS1-Expression in der Pankreastumorzelllinie MiaPaCa-2 erforscht werden. Denkbar wäre hier eine Mutation im codierenden Bereich des MTUS1-Gens oder aber eine genetische Veränderung im vorhergesagten Promotorbereich. Auch eine veränderte Methylierung in der Promotorregion könnte eine Erklärung für eine veränderte Expression sein und sollte untersucht werden.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, welchen Einfluss die MTUS1-Expression auf die Zellproliferation *in vitro* ausübt. Nachdem Tumorzelllinien durch die rekombinante Expression von MTUS1 in ihrem Wachstum gebremst werden können (Seibold et al., 2003), sollte hier nun umgekehrt die Proliferation von Zellen mit funktionellen MTUS1-Knockout untersucht werden.

Um die Relevanz von MTUS1 nicht nur in der Zellkultur, sondern vielmehr in menschlichem Gewebe nachzuweisen, sollte die Genexpression von MTUS1 in Gewebeproben von zehn Patienten mit Colonkarzinom analysiert werden. Für das bessere Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen der Expression, sollte das Gewebe anschließend auf Mutationen im codierenden Bereich bzw. in der Promotorregion analysiert werden. Auch die Methylierung der vorhergesagten Promotorregion sollte zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe verglichen werden.

Durch die Generierung einer MTUS1-Knockout-Maus sollte der Einfluss der MTUS1-Expression auf die Tumorentstehung *in vivo* näher erforscht werden. Für die weitere Charakterisierung dieser Mäuse sollte zunächst Wert auf den Nachweis des erfolgreichen Knockouts gelegt werden. Zusätzlich sollte das MTUS1-Gen durch die Bestimmung von verschiedenen Laborparametern, dem Blutdruck, der Verteilung der MTUS1-Expression, sowie einer Beobachtung der Tiere über einen Zeitraum von ca. zehn Monaten weiter funktionell untersucht werden. Alle erkrankten Tiere sollten darüber hinaus durch die pathologische Untersuchung der Organe charakterisiert werden. Schließlich sollten aus den Tieren transgene Fibroblasten-Zelllinien etabliert werden, um mit diesen Proliferationsversuche durchführen zu können.

3. Material

3.1 Chemikalien

3.1.1 Zellkultur

Chemikalien und Medien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
„DMEM Medium High Glucose“	PAA, Linz, Österreich
„Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS)“	PAA, Linz, Österreich
Endothelzellen-Basalmedium (EBM)	Cambrex, Walkersville, USA
Endothelzellen-Zusätze EGM (Hydrocortison, BBE, GA, hEGF)	Cambrex, Walkersville, USA
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fibroblasten-Basalmedium (FBM)	Cambrex, Walkersville, USA
Fibroblasten-Zusätze FGM2 (Insulin, GA, rhFGF)	Cambrex, Walkersville, USA
Geneticin 50mg/ml Active Geneticin	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
„Glasgow`s Minimum Essential Medium (GMEM)“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin 100x 200mM	PAA, Linz, Österreich
„Leukemia Inhibitory Factor (LIF)“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumpyruvat 100mM	PAA, Linz, Österreich
Nicht-essentielle Aminosäuren 100x	PAA, Linz, Österreich
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA, Linz, Österreich
Trypsin/EDTA 10x	PAA, Linz, Österreich

Zellen

Fibroblasten	Nephrologie, Würzburg, Deutschland
HUVEC	Cambrex, Walkersville, USA
MiaPaCa-2	LGC Promochem, Wesel, Deutschland
Zelllinie RRA048	Baygenomics, San Francisco, USA

Kits

„Gene PorterTM 2 Transfection Reagent“	Peqlab, Erlangen, Deutschland
„Gene PorterTM Booster 3“	Peqlab, Erlangen, Deutschland
„Booster 2 Booster Express“	Peqlab, Erlangen, Deutschland

MTUS1-Stammzellen

GMEM	430,0ml
200mM Glutamin	5,0ml
100mM Natriumpyruvat	5,0ml
100x Nicht-essentielle Aminosäuren	5,0ml
FBS	50,0ml
Mercaptoethanol-Stock	0,5ml
LIF-Lösung 1µg/ml	5,0ml
Geneticin 50mg/ml	1,0ml

HUVEC-Zellen

EBM-Medium	450,0ml
FBS	50,0ml
Hydrocortison 1mg/1ml	0,5ml
Gentamicinsulfat/Amphotericin B	0,5ml
Bovine Brain Extract (BBE) 3mg/ml	2,0ml
human Epidermal Growth Factor (hEGF)	0,5ml

MiaPaCa-2-Zellen

DMEM	450ml
FBS	50ml
L-Glutamin 100x	5ml

Fibroblasten

FBM-Medium	450,0ml
Penicillin/Streptomycin	5,0ml
FBS	50,0ml
Insulin	0,5ml
r-human Fibroblast Growth Factor (rhFGF)	0,5ml
Gentamicinsulfat/Amphotericin B	0,5ml

Einfriermedium

jeweiliges Wachstumsmedium mit 10% Dimethylsulfoxid versetzen

1x TrypsinEDTA

10x Trypsin/EDTA mit PBS verdünnen

3.1.2 Klonierung**Chemikalien**

„Agarose Electrophoresis Grade“	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin 100x	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
Enzym Xho I	New England Biolabs, Beverly, USA
Enzym Hind III	New England Biolabs, Beverly, USA
Kanamycin 100x	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
„Lennox L Broth Base“	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
„Lennox L Agar“	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland

UV-Marker Gelstar	Cambrex, Rockland, USA
Kits	
„Dual Glo Luciferase-Assay“	Promega, Mannheim, Deutschland
Expressionsvektor pGL3 Basic	Promega, Mannheim, Deutschland
Expressionsvektor pRL-TK	Promega, Mannheim, Deutschland
Ligationssystem LigaFast	Promega, Mannheim, Deutschland
„One Shot E.coli“	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
„Qiaprep Spin Miniprep Kit“	Qiagen, Hilden, Deutschland
„TOPO TA Klonierungsskit“	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
„XL1-Blue Competent Cells“	Stratagene, La Jolla, USA
LB-Agarplatten mit Antibiotika	32g Lennox L Agar in 1000ml Aqua dest. suspendieren 15min bei 121°C autoklavieren bei ca. 70°C 50µg/ml Antibiotikum zugeben Lösung direkt danach in Petrischalen ausgießen
LB-Medium	20g Lennox L Broth Base in 1000ml Aqua dest. suspendieren 15min bei 121°C autoklavieren
3.1.3 PCR	
Chemikalien	
„Agarose Electrophoresis Grade“	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
DNA-Leiter 1kb	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Leiter peqGold Mix	Peqlab, Erlangen, Deutschland
DNA-Leiter Sizer II	Peqlab, Erlangen, Deutschland
dNTP-Mischung 10mM	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ladepuffer 6x für PCR Produkte	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 25mM	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
PCR-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Primer	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
UV-Marker Gelstar	Cambrex, Rockland, USA
Kits	
„DNA Gel Extraction Kit“	Qiagen, Hilden, Deutschland
„DNA Tissue Kit“	Qiagen, Hilden, Deutschland
„Expand 20kbplus PCR-System“ (Expand 20kb ^{plus} Enzyme Mix, PCR-Puffer)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
„Expand High Fidelity PCR-System“ (PCR-Puffer, Expand High Fidelity Enzym-Mix)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
„First Strand cDNA Synthesis Kit“	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland

Hot Star-PCR (PCR-Puffer, HotStar-Taq-Polymerase, Q-Solution)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mycoplasmen Detektionskit	Biochrom, Berlin, Deutschland
„PCR Purification Kit“	Qiagen, Hilden, Deutschland
„RNeasy Kit“	Qiagen, Hilden, Deutschland

50x TAE-Puffer 2M Tris
 0,1M EDTA
 mit Eisessig auf pH 7,5 einstellen

3.1.4 Bisulfit-Reaktion

Chemikalien

Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
EB-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Hydrochinon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbisulfit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland

0,5M Hydrochinonlösung

0,2M Natriumhydroxidlösung

1M Natriumhydroxidlösung

2M Natriumhydroxidlösung

7,5M Ammoniumacetatlösung

3M Natriumacetatlösung

Bisulfitlösung	Natriumbisulfit	1,9g
	in Aqua dest. suspendieren	2,0ml
	2M Natriumhydroxidlösung	0,7ml
	0,5M Hydrochinonlösung	1,0ml

3.1.5 Western-Blot

Chemikalien

β-Aktin-Antikörper	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland

Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kanninchenimmunglobuline	DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mausimmunglobuline	DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Milchpulver Nonfat Dry Milk	Nestle, Ohio, USA
MTSG1-Antikörper c-term	Eurogentec, Seraign, Belgien
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
„Protease Inhibitor Tabletten“	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
„Rotiphorese Gel 30“	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SeeBlue Plus 2 Marker	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kits	
Bradford-Reagenz Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
„ECL plus Western Blotting Detection System“	Amersham, Buckinghamshire, England
Lowry Protein-Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

1x MLB-Puffer 150mM Natriumchlorid
 10mM Magnesiumchlorid
 1mM EDTA
 1% Igepal
 2% Glycerol
 25mM HEPES pH 7,4
 10ml Puffer frisch mit 1 Tablette Protease Inhibitor versetzen

1x Lysispuffer pH 7,4 10mM HEPES
 10mM Kaliumchlorid
 15mM EDTA
 100mM Sucrose
 9ml Puffer frisch mit 1 Tablette Protease Inhibitor versetzen und
 1ml 10% Triton-X-Lösung zugeben

3x SDS-Puffer pH 6,7	0,2M Tris 0,2M SDS 15ml Glycerin 3mg Bromphenolblau ad 100ml mit Aqua dest. frisch mit 10% β -Mercaptoethanol versetzen	
1x Laufpuffer	8mM Tris 250mM Glycine 1% SDS-Lösung 10%ig	
5x Transferpuffer pH 10	25mM Tris 0,2M Glycine 0,1M NaOH Plätzchen 1l Methanol ad 5l mit Aqua dest.	
1x TBS pH 7,5	200mM Tris 1500mM NaCl	
1x TBS-T	0,1% Tween 20 in 1x TBS	
Tris-Puffer 0,5M pH 6,7		
Tris-Puffer 3M pH 8,7		
10% APS-Lösung		
10% SDS-Lösung		
Sammelgel	Rotiphorese Gel 30 0,5M Tris-Puffer 10% SDS-Lösung Aqua dest. TEMED 10% APS-Lösung	3,0ml 2,5ml 0,2ml 14,1ml 10,0 μ l 0,8ml
Trenngel	Rotiphorese Gel 30 3M Tris-Puffer 10% SDS-Lösung Aqua dest. TEMED 10% APS-Lösung	13,3ml 5,0ml 0,4ml 21,2ml 20,0 μ l 0,4ml

3.1.6 Etablierung der Knockout-Mäuse

Anästhetika

Ketanest S	Parker-Davis, Freiburg, Deutschland
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland

Chemikalien

Aqua ad injectabilia	Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland
„Dulbecco's Phosphate Buffered Saline“	PAA, Linz, Österreich
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Humanes Choriongonadotropin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen, Deutschland
„Medium M16“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
„Medium M2“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mineral-Öl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Schweine-Gonadotropin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Ketanest-Narkotikum	400µl Ketanest S
	50µl Rompun
	200µl steriles PBS
	pro Maus ca. 200µl i. p. injizieren

3.1.7 X-Gal-Färbung

Chemikalien

Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Histofluid	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(II)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
„Nuclear Fast Red“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
„X-gal“ (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactoside)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

0,1M Phosphatpuffer pH 7,3	25mM Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
	75mM Dinatriumhydrogenphosphat
	mit Aqua dest. ansetzen

X-Gal-Waschpuffer	2mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat mit 0,1M Phosphatpuffer ansetzen
X-Gal-Fixierpuffer	5mM EGTA 0,2% Glutaraldehyd mit Waschpuffer ansetzen
X-gal-Lösung (50mg/ml)	500mg X-gal in 10ml Dimethylformamide lösen
X-gal-Färbepuffer	5mM Kaliumhexacyanoferrat(II) 5mM Kaliumhexacyanoferrat(III) mit Waschpuffer ansetzen direkt vor Verwendung X-gal-Lösung mit Endkonzentration 1mg/ml zugeben
50% (V/V) Ethanol	
70% (V/V) Ethanol	
95% (V/V) Ethanol	

3.2 Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Firma
Blotting Papier	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
dünnwandige PCR-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Diafilme	Fuji Foto, Tokyo, Japan
Eppendorf Cups versch. Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fettstift Edge Pen	Vector Lab., Burlingame, USA
Fotofilm Polaplan 667	Polaroid, Offenbach, Deutschland
Kanülen Sterican versch. Größen	Braun, Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Mikroansaugnadel Sterile Vacu-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroinjektionsnadel Sterile Transfer-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger superfrost plus	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pasteur Pipetten	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Petrischalen versch. Größen	Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Pipettenspitzen Biosphere-Filter-Tips	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Gel-Loader	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Plastikschalen mit Deckel	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Plastikzentrifugenröhrchen versch. Größen	Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
PVDF Membran Hybond P	Amersham, Little Chalfont, England
Röntgenfilm Fuji Medical X-Ray Film Super RX	Fuji Foto, Tokyo, Japan
serologische Pipetten versch. Größen	Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Skalpell Cutfix 10	Braun, Tuttlingen, Deutschland
Spritzen Omnican versch. Größen	Braun, Melsungen, Deutschland
steriler Nahtfaden Ethibond 75cm EH7426	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Schleicher, Dassel, Deutschland

3.3 Geräte und Zubehör

Materialbezeichnung

Blutdruckmessgerät LE5007 mit Zubehör
 Blotting Kammer mit Zubehör
 Densitometrische Auswertung Quantity One
 Eismaschine
 Elektrophoresekammer mit Zubehör
 Elektrophorese Power Supply EPS301
 FACS Calibur
 Fotoapparat Polaroid DS 34 Gelcam mit
 Zubehör
 Gefrierschrank -20°C Liebherr Comfort
 Gefrierschrank -80°C
 Gelkammer Elektrophorese mit Zubehör
 Glas Homogenisator 1ml
 Inkubator Heraeus für Bakterien
 Inkubator Heraeus B6030 für Zellkultur
 Kühlschrank Liebherr Profi Line
 Laminar Flow LaminAir HB2472
 Lupe Leica Wild M3B
 Mastercycler Gradient
 Mikroinjektionsmikroskop Leica DM IRB
 Mikroskop Axiovert 25
 Mikroskop Olympus CK2
 Mikrowelle
 Mischer/Zentrifuge Mikrospin FV-2400
 Neubauer Zählkammer
 OP-Licht Leica KL 750
 Pipetten Professional
 Pipettierhilfe Accu-Jet
 Rollschüttler Cat RM5
 Röntgenfilm Entwicklermaschine Optimax
 Röntgenkassette
 Schütteltisch Allegro Rotator
 Thermomixer 5436
 UV/VIS Spektrometer Lambda 12
 UV-Licht TFX-35M
 Vakuum Trockner DNA Speed Vac 110
 Waage Mettler AE240
 Waage Mettler PM6100
 Wasserbad Julabo EM
 Wasserkühlung Haake D1
 Zellzähler Cell Counter Z2
 Zentrifuge Centrifuge 5417C
 Zentrifuge Rotina 46R
 Zentrifuge Universal 30RF

Firma

Föhr Medical Instruments, Seeheim,
 Deutschland
 BioRad, Hercules, Canada
 BioRad, Hercules, Canada
 Genheimer, Hettstadt, Deutschland
 Peqlab, Erlangen, Deutschland
 amersham biotech, Freiburg, Deutschland
 Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

 Polaroid, Offenbach, Deutschland
 Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
 Genheimer, Hettstadt, Deutschland
 Peqlab, Erlangen, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Kendro, Hanau, Deutschland
 Kendro, Hanau, Deutschland
 Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
 Heraeus, Hanau, Deutschland
 Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland
 Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
 Olympus, Hamburg, Deutschland
 Siemens, München, Deutschland
 Hartenstein, Würzburg, Deutschland
 Hartenstein, Würzburg, Deutschland
 Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Brand, Wertheim, Deutschland
 Schröder & Henke, Wiesloch, Deutschland
 Protec Gerätebau, Oberstenfeld, Deutschland
 Peqlab, Erlangen, Deutschland
 Nichols Institute, Bad Nauheim, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Perkin Elmer, Langen, Deutschland
 Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich
 Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA
 Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
 Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
 Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
 Hartenstein, Würzburg, Deutschland
 Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Hettich, Tuttlingen, Deutschland
 Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3.4 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Mäuse wurden in Gruppen in speziellen Käfigen gehalten. Die Einstreu wurde zweimal wöchentlich gewechselt und die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser, Futter und Zellstoff. Die Bedingungen im Tierstall wurden auf die für Nager optimalen Parameter eingestellt, wobei die Temperatur konstant bei 20°C gehalten wurde und die Luftfeuchtigkeit bei 50-70%. Das Hell-Dunkel-Intervall wurde auf 12 Stunden festgelegt. Um eine Infektion der Tiere zu vermeiden, wurde der Tierstall nur mit einem frischen Kittel, Überschuhen, einer OP-Maske und Handschuhen betreten. Die Käfige der Tiere wurden außerdem nicht in offenen Regalen sondern in einzelbelüfteten Scantainern verwahrt.

Balb/c-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
C57/Bl6-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
CD1-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Einstreu	Harlan-Winkelmann, Borchon, Deutschland
Handschuhe	Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien
Nagerfutter	Harlan-Winkelmann, Borchon, Deutschland
Nagerkäfige mit Zubehör	Ehret, Emmendingen, Deutschland
OP-Maske	Lohmann&Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Scantainer	Scanbur, Karlslunde, Dänemark
Überschuhe	Panep, Rosice, Tschechien
Zellstoff	Lohmann&Rauscher, Rengsdorf, Deutschland

4. Methoden

4.1 Untersuchungen an MiaPaCa-2-Zellen

In bereits veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MiaPaCa-2-Zellen keine oder zumindest eine nicht nachweisbare MTUS1-mRNA-Expression aufweisen (Seibold et al., 2003). Um die molekularen Ursachen für die fehlende Expression von MTUS1 in MiaPaCa-2-Zellen zu untersuchen, wurde die codierende Sequenz und die vorhergesagte Promotorregion sequenziert und der Methylierungsgrad dieser Promotorregion mittels Bisulfit-Reaktion untersucht.

4.1.1 Untersuchung der MiaPaCa-2-Zellen auf Mutationen in der codierenden Sequenz

Für die Untersuchung auf Mutationen in der codierenden Sequenz wurden MiaPaCa-2-Zellen zunächst in Kultur genommen. Die Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in 5ml Wachstumsmedium suspendiert und 6min bei 1200rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt ist unbedingt nötig, da das zur Stabilisierung der Zellen im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid in der Zellkultur toxisch wirken kann und durch den Zentrifugationsschritt entfernt werden muss. Das Pellet wurde in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Nachdem die Zellen einen konfluenten Monolayer bildeten, wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, abzentrifugiert und die DNA mit Hilfe des „DNA Tissue Kits“ isoliert werden. Die Grundlage dieses Kits besteht aus einer Säule mit einer Kieselgel-Membran, die DNA in Abhängigkeit von pH-Wert und Salzkonzentration binden kann. Zunächst werden die Zellen mit einem Lysispuffer lysiert und durch Zugabe einer Proteinase alle Proteine zersetzt. Der salzreiche Lysispuffer besitzt einen pH-Wert von unter 7 und stellt somit die Bedingungen für eine effektive Bindung der DNA an die Kieselgel-Membran sicher. Das Lysat wird durch die Membran zentrifugiert und die gebundene DNA mit einem ethanolischen Puffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem salzarmen Puffer, der einen pH von 8 aufweist. Anschließend wurde die DNA-Konzentration im UV-Meter bestimmt, wobei hierfür die DNA bei 260nm vermessen wurde und die Konzentration nach folgender Formel berechnet wurde:

DNA-Konzentration (ng/µl) = OD₂₆₀ Wert * 50 * Verdünnungsfaktor

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	40,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	60,0°C	20s
Forward-Primer (10µM)	1µl	72°C	120s
Reverse-Primer (10µM)	1µl	Cycles	38
MiaPaCa-2 DNA-Konz.215ng/µl	1µl	72°C	7min
HotStarTaq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 2: PCR-Protokoll für alle verwendeten Primerkombinationen

Folgende Primerkombinationen wurden für die jeweiligen Exons verwendet, wobei sich die Positionsangaben auf die DNA-Sequenz der Genbank Nr. AF165145 beziehen:

Exon 1

Pos.8884 Forward-Primer hMTUS1 Exon F1 5' CCTGAGACCACCCACTTTCT 3'

Pos.9391 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R1 5' CATCCCCCGTGCAACTAA 3'

Exon 2

Pos.21901 Forward-Primer hMTUS1 Exon F2 5' TCCAACCATCTAGATCTCCG 3'

Pos.22311 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R2 5' CCGACCTCAAGTAGAAAGGC 3'

Exon 3

Pos.31226 Forward-Primer hMTUS1 Exon F3 5' CTTCCCAATACTGGGTCTCA 3'

Pos.31501 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R3 5' ATACCAGACAGGGAGTGCCA 3'

Exon 4

Pos.50431 Forward-Primer hMTUS1 Exon F4 5' GCTTCAGGTGTCATCACAGC 3'

Pos.50761 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R4 5' CAAGTAAGCAGCAGAGGCCT 3'

Exon 5

Pos.51821 Forward-Primer hMTUS1 Exon F5 5' CCACGCTTACCTGTGAAGCT 3'

Pos.52121 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R5 5' ACAGGGCATTCGCTGAAGCA 3'

Exon 6 bis 7

Pos.52995 Forward-Primer hMTUS1 Exon F6 5' CGGCTTCATCATCAACCCCT 3'

Pos.53476 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R6 5' TTCTCTGGCTGCTGAGTACT 3'

Exon 8

Pos.56519 Forward-Primer hMTUS1 Exon F7 5' GATGAACATCTGTCGCTTGC 3'

Pos.56826 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R7 5' GCAGTTAACCCAACTCCACA 3'

Exon 9

Pos.59433 Forward-Primer hMTUS1 Exon F8 5' GTGCTTGTGTCGTGAGGTGC 3'

Pos.59671 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R8 5' AGAGCGTGTCCAGAAAGTAC 3'

Exon 10

Pos.60321 Forward-Primer hMTUS1 Exon F9 5' CCTGTGACCTTGTGCAGGAT 3'

Pos.62839 Reverse-Primer hMTUS1 Exon R9 5' TACTGTGCTGTCACAGGGCT 3'

Die Proben wurden zur Auswertung mit 6x Ladepuffer gemischt und auf einem 2%igen Agarose Gel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt, dem zur Detektion der Banden 1µl GelStar zugesetzt worden war. GelStar kann wie Ethidiumbromid für eine sensitive Fluoreszenzdetektion von DNA und RNA verwendet werden (White et al., 1999), weist aber eine geringere Toxizität als Ethidiumbromid auf. Als Marker wurde der PeqGold Leiter eingesetzt. Die den Exons entsprechenden Banden wurden nach Anleitung des „Gel Extraction Kits“ aus dem Gel extrahiert, die so erhaltene DNA im Vakuum getrocknet und zu MWG Biotech AG zum Sequenzieren geschickt. Es wurde der jeweilige Forward-Primer als Sequenzierprimer verwendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden anschließend mit Hilfe des BLAST-N-Programms der NCBI-Homepage mit der Originalsequenz (Genbank Nr. AF165145) verglichen.

4.1.2 Untersuchung der MiaPaCa-2-Zellen auf Mutationen in der Promotorregion

Aus MiaPaCa-2-Zellen wurde wie bereits unter 4.1.1 beschrieben die genomische DNA gewonnen. Die Promotorregion des MTUS1-Gens wurde vom Computerprogramm TESS des „Penn Centers for Bioinformatics“ anhand eines Vergleichs von Motiven bereits bekannter Promotorsequenzen für das Sequenzstück Position 4860-5100 (Genbank Nr. AF165145) vorhergesagt. Für die Sequenzierung der Promotorregion wurde der Bereich von Position 4800 bis 6200 (Genbank Nr. AF165145) durch eine PCR amplifiziert.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Primerlage

hMTUS1 Exon F14

Pos.4801 (Genbank Nr. AF165145) 5` CTTTGGGAGGCCAAAGCAGGTGGAT 3`

hMTUS1 Exon R14

Pos.6094 (Genbank Nr. AF165145) 5` GAAGCAGAGCCTGTGTAGGATGTC 3`

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	40,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	60,5°C	30s
Forward-Primer (10µM)	1µl	72°C	120s
Reverse-Primer (10µM)	1µl	Cycles	38
MiaPaCa-2-DNA 215ng/µl	1µl	72°C	7min
HotStarTaq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 3: PCR-Protokoll für die verwendete Primerkombination hMTUS1 Exon F14-R14

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt und die Banden mit dem „Gel Extraction Kit“ isoliert. Die erhaltene DNA wurde für eine Klonierung nach dem Protokoll des „TOPO TA Klonierungskits“ eingesetzt und die erhaltenen Klone mit einem Forward- und einem Reverse-Primer sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden anschließend mit Hilfe des BLAST-N-Programms der NCBI-Homepage mit der Originalsequenz (Genbank Nr. AF165145) verglichen.

4.1.3 Untersuchung der MiaPaCa-2-Zellen bezüglich der DNA-Methylierung im Promotorbereich

Grundlagen

Seit der Entdeckung der modifizierten Base 5-Methyl-Cytosin vor fast 60 Jahren (Hotchkiss, 1948) haben sich etliche Methoden zur Unterscheidung von Cytosin und 5-Methyl-Cytosin entwickelt. Eine sehr häufig benutzte Methode stellt die Southern-Blot-Analyse dar, bei der Restriktionsendonukleasen verwendet werden, die zwischen Cytosin und 5-Methyl-Cytosin unterscheiden können (Southern, 1975). Für die Untersuchung von Methylierungsmustern z.B. des Promotorbereichs von Genen brachte die Entwicklung der selektiven Basenkonversion durch die Bisulfit-Reaktion einen großen Fortschritt. Grundlage dieser Methode ist die Eigenschaft des Bisulfits, unmethylierte Cytosin-Moleküle in Uracil umzuwandeln, während methylierte Cytosin-Reste nicht reagieren können (Wang et al., 1980). Bei der anschließenden Amplifikation mittels einer PCR werden alle Uracil-Moleküle als Thymidin gelesen, während die 5-Methyl-Cytosine weiterhin als Cytosine erkannt werden.

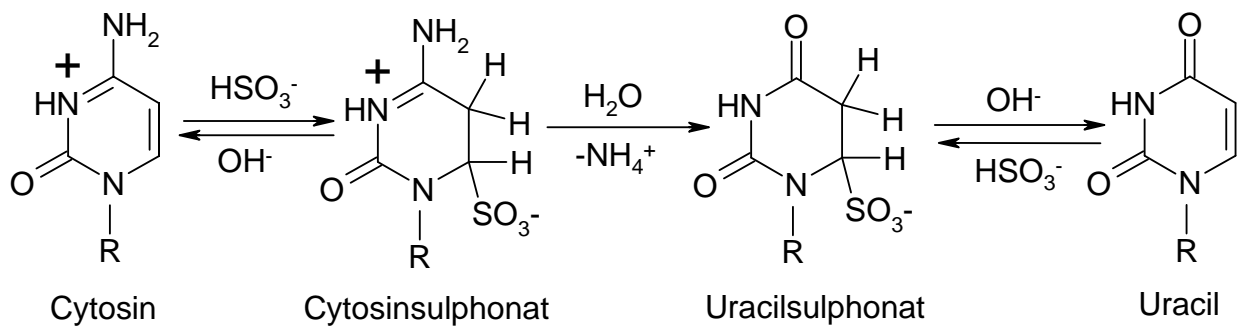


Abbildung 8: Reaktionsgleichung der Bisulfit-Reaktion

Das Cytosin kann über sein C an Position 5 mit dem Bisulfit-Ion binden. In wässriger Lösung kann anschließend das Cytosinsulphonat unter Abspaltung der NH_2 -Gruppe zum Uracilsulphonat desaminiert werden. Während der anschließenden Alkali-Behandlung wird dieses Zwischenprodukt zu Uracil desulphoniert. Für die erfolgreiche Cytosinkonversion wurde das Protokoll in Anlehnung an Raizis et al., 1995 festgelegt.

Durchführung der Bisulfit-Reaktion

1,9g Natrium Metabisulfit wurden in 2ml Wasser suspendiert, anschließend 0,7ml 2M NaOH, und 1ml 0,5M Hydrochinonlösung zugegeben und solange geschüttelt, bis sich alle Kristalle gelöst hatten.

MiaPaCa-2-Zellen wurden wie unter 4.1.1 erwähnt kultiviert. HUVEC-Zellen wurden in einem Wasserbad von 37°C aufgetaut, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert und mit frischem Medium in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte analog den MiaPaCa-2-Zellen. Aus den beiden Zelllinien wurde genomische DNA mit Hilfe des „DNA Tissue Kits“ gewonnen und deren Konzentration anschließend im UV-Meter bestimmt. Zum Scheren der DNA wurde diese mehrmalig in eine Insulinspritze aufgezogen.

Für jede Bisulfit-Reaktion wurde $1\mu\text{g}$ DNA mit Wasser auf ein Volumen von ca. $20\mu\text{l}$ verdünnt. Anschließend folgte die Denaturierung der DNA durch Zugabe von $5\mu\text{l}$ 1M NaOH und Inkubation über 15min bei 37°C . Für die Sulfonierung wurden $400\mu\text{l}$ frisch angesetzte Natriumbisulfit-Lösung zu dem Ansatz gegeben und die Mischung vier Stunden bei 50°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Mischung auf zwei Vials verteilt, um den Reaktionsansatz möglichst klein zu halten. Nachdem die Desaminierung im wässrigen Milieu erfolgt, wurden zu jedem Ansatz $100\mu\text{l}$ Natriumacetat pH 7,0 und $460\mu\text{l}$ Wasser hinzu pipettiert. Durch die Zugabe von $750\mu\text{l}$ Isopropanol wurde die DNA bei Raumtemperatur ausgefällt und 10min bei 13000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit $300\mu\text{l}$ Wasser, gefolgt von $30\mu\text{l}$ 3M Natriumacetat pH 7,0 resuspendiert. Durch Zugabe von $750\mu\text{l}$ eiskaltem Ethanol wurde die DNA erneut gefällt und 10min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in $200\mu\text{l}$ 0,2M NaOH gelöst und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt erfolgten die alkalische Desulfonierung und die abschließende Umwandlung zu Uracil. Durch Zugabe von $100\mu\text{l}$ 7,5M Ammoniumacetat und $750\mu\text{l}$ Ethanol wurde die DNA erneut gefällt, 10min abzentrifugiert und das Pellet in $40\mu\text{l}$ EB-Puffer gelöst. Die vorher geteilten Lösungen wurden wieder vereinigt.

PCR

Für die sich anschließende PCR mussten die Primer nach folgenden Vorschriften konstruiert werden. Die Forward- und Reverse-Primer wurden in einer relativ großen Länge von 33 Basenpaaren gewählt, um eine möglichst gute Bindung zu gewährleisten. Für die Forward-Primer wurden alle Cytosine gegen Thymidin ausgetauscht. Für die Reverse-Primer wurden alle Guanosine gegen Adenosin ausgetauscht, da nach der Bisulfit-Reaktion alle nicht methylierten

Cytosin-Moleküle zu Thymidin konvertiert worden waren und die Primer nur so an die veränderte Sequenz binden konnten. Für die zu untersuchende Region wurden zwei Primerpaare entwickelt, die sehr eng beieinander lagen, um nacheinander zwei PCR-Amplifikationen mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchführen zu können. Das war nötig, da bei der PCR mit dem ersten Primerpaar meist noch zu wenig DNA-Produkt amplifiziert wurde, so dass keine Banden auf dem Agarosegel detektiert werden konnten. Der Grund hierfür lag vermutlich in der Degradierung vieler DNA-Moleküle während der Bisulfit-Reaktion. Daher wurde das erste PCR-Produkt nach der Amplifikation mit dem „PCR Purification Kit“ zunächst erneut aufgereinigt, um die Primer und Verunreinigungen der ersten PCR-Reaktion zu entfernen. Dieser Kit bedient sich wieder des Prinzips, dass die DNA unter salzreichen Bedingungen und einem pH Wert von unter 7 an eine Kieselgel-Membran bindet. Nachdem das erste Primerpaar so entfernt worden war, wurde anschließend eine „nested“ PCR mit dem etwas kleineren Primerpaar durchgeführt. Ein drittes Primerpaar wurde für die Sequenzierung konstruiert, da bessere Sequenzierungen erhalten werden können, wenn die DNA nicht mit den Primern der Amplifizierung sequenziert wird.

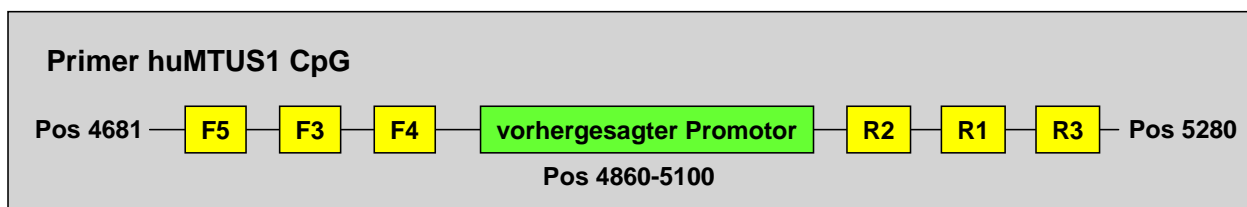


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Primerlage

Forward-Primer hu MTUS1 CpG F5

Pos.4692 (Genbank Nr.AF165145) 5' GTTTATGTTAAGTTTAAAAATAAATTGGAGAGT 3'

Reverse-Primer hu MTUS1 CpG R3

Pos.5248 (Genbank Nr.AF165145) 5' TCAATACAAAAATAAATTTTAATTATCAAAAAA 3'

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	38,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	45°C	20s
Primer huMTUS1 CpG F5 (10µM)	1µl	72°C	120s
Primer huMTUS1 CpG R3 (10µM)	1µl	Cycles	38
Template DNA-Konz. ca. 200ng/µl	1µl	72°C	7min
HotStarTaq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 4: PCR-Protokoll für die Primerkombination hu MTUS1 CpG F5-R3

Forward-Primer hu MTUS1 CpG F3

Pos.4811 (Genbank Nr.AF165145) 5' TTAAAGTAGGTGGATTATAAGGTTAGGATATTG 3'

Reverse-Primer hu MTUS1 CpG R1

Pos.5126 (Genbank Nr.AF165145) 5' ACAATAAACAAAATAAAAATTTAAATTA AAAAC 3'

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	31,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	49°C	20s
Primer huMTUS1 CpG F3 (10µM)	1µl	72°C	120s
Primer huMTUS1 CpG.R1 (10µM)	1µl	Cycles	38
Template DNA-Konz. ca. 200ng/µl	1µl	72°C	7min
HotStarTaq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 5: PCR-Protokoll für die „nested“ PCR mit der Primerkombination hu MTUS1 CpG F3-R1

Bei der anschließenden Gelelektrophorese mit einem 2%igen Agarosegel in TAE-Puffer und einem Zusatz von 1µl GelStar konnten die Banden im UV-Licht detektiert werden. Nach dem Ausschneiden der Banden wurde die DNA mit dem „Gel Extraction Kit“ aufgereinigt. Diesem Kit liegt ebenfalls das Prinzip zugrunde, dass sich DNA bei einem pH-Wert von unter 7 und unter salzreichen Bedingungen an eine Kieselgel-Membran binden lässt. Auch hier wird die DNA anschließend gewaschen und mit einem alkalischen und salzarmen Puffer eluiert. Die DNA wurde im Vakuum getrocknet und mit den Primern huMTUS1 CpG F4 und R2 sequenziert.

Forward-Primer hu MTUS1 CpG F4

Pos.4828 (Genbank Nr.AF165145) 5` TAAGGTTAGGATATTGAGATTATTTTGGTTAAT 3`

Reverse-Primer hu MTUS1 CpG R2

Pos.5101 (Genbank Nr.AF165145) 5` TTA AAAACAATAATACTTTTAATTCATATACAA 3`

Für die Beurteilung des Methylierungsgrades wurden die erhaltenen Sequenzen von MiaPaCa-2-Zellen und HUVEC-Zellen miteinander verglichen. Nachdem die HUVEC-Zellen im gesunden Zustand verwendet wurden, dienten sie bei diesem Vergleich als Beispiel eines normalen Methylierungsgrades.

4.1.4 Bestätigung der funktionellen Relevanz der untersuchten Promotorregion im Promotor-Assay

Um den Nachweis führen zu können, dass die veränderte Methylierung im untersuchten Promotorbereich tatsächlich für die verringerte Genexpression von MTUS1 in MiaPaCa-2-Zellen verantwortlich ist, wurde ein Promotor-Assay durchgeführt. Dieser Assay beruht im Wesentlichen darauf, dass die funktionelle Aktivität eines Promotorbereichs quantifiziert werden kann, indem der Promotorbereich in einem speziellen Vektor vor ein Reporter gen kloniert wird. Anhand der Genexpression des Reporter gen-Produktes kann anschließend direkt auf die Promotoraktivität zurückgeschlossen werden. Dazu wurde der zu untersuchende Promotorbereich mittels PCR amplifiziert, und anschließend in den Reporter vektor pGL3 Basic kloniert. Dieser klonierte Vektor wurde dann zusammen mit dem Kontrollvektor pRL-TK in MiaPaCa-2-Zellen transfiziert. Handelt es sich bei dem PCR-Fragment um einen funktionstüchtigen Promotor, so wird die cDNA-Sequenz für das Reporter gen Firefly-Luciferase abgelesen, und das entsprechende Genprodukt gebildet. Gleichzeitig wird in den Zellen auch die Renilla-Luciferase gebildet, deren cDNA-Sequenz auf dem Kontrollvektor pRL-TK enthalten ist. Im anschließenden Promotor-Assay werden nacheinander die Substrate für Firefly- und Renilla-Luciferase zugegeben. Durch Zugabe von Luciferin wird zunächst die Lumineszenz der Firefly-Luciferase quantitativ bestimmt. Danach wird durch die Zugabe von Coelenterazin auch noch die

Lumineszenz der Renilla-Luciferase bestimmt und als Kontrolle verwendet. Mit diesem Assay lässt sich also feststellen, ob es sich bei einem bestimmten Genabschnitt um einen funktionell aktiven Promotor handelt.

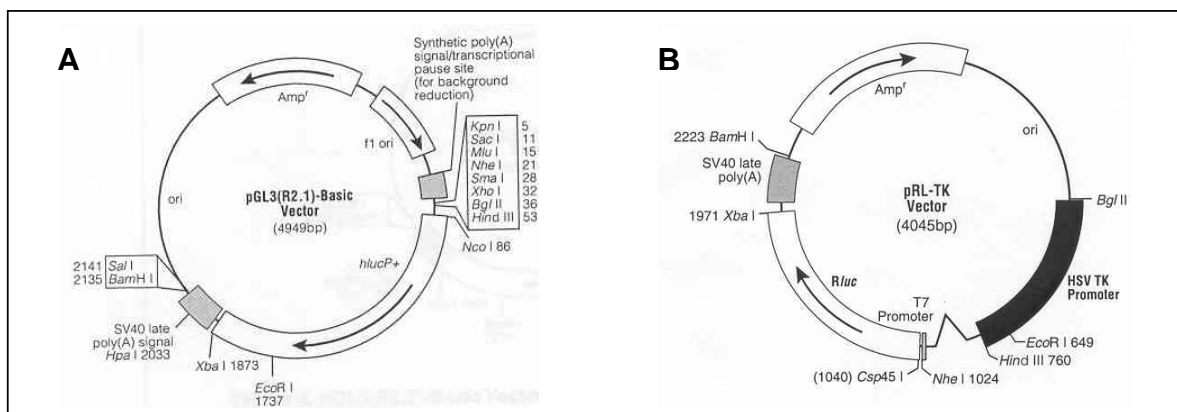


Abbildung 10: A, Firefly-Luciferase Versuchsvektor, in den die PCR-Produkte zwischen die XhoI- und HindIII-Schnittstellen eingefügt werden. B, Kontrollvektor kodiert für das Renilla-Luciferase-Gen

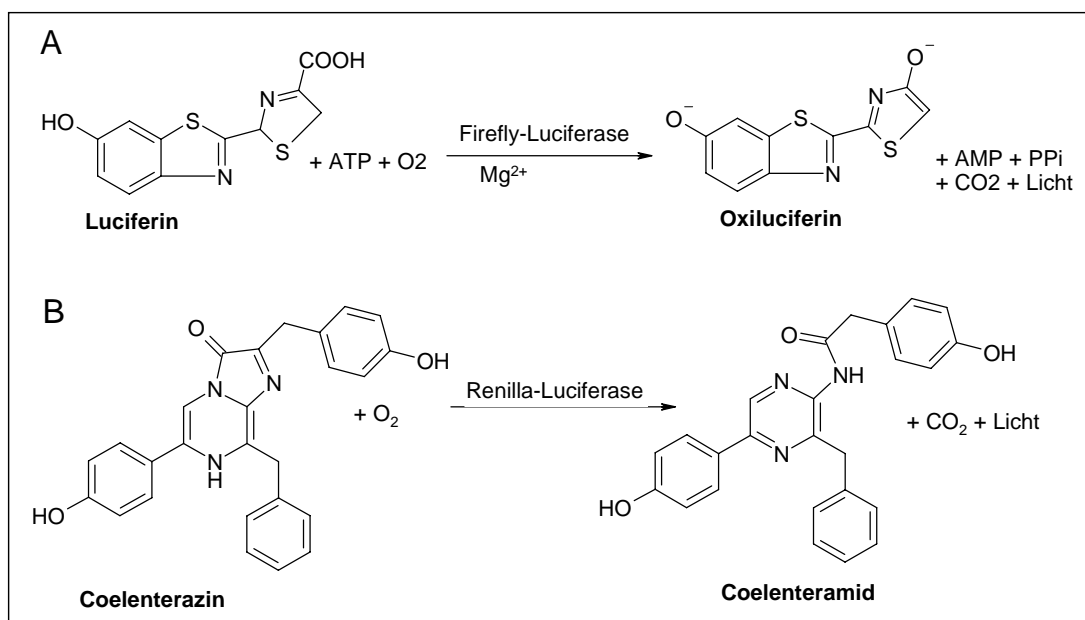


Abbildung 11: Reaktionsgleichungen der A, Firefly Luciferase und der B, Renilla Luciferase

Für die Durchführung des Promotor-Assays wurde aus HUVEC-Zellen genomische DNA mit Hilfe des „DNA Tissue Kits“ gewonnen. Anschließend wurden Primer für zwei verschiedenen Konstrukte des Promotorbereichs konstruiert. Das eine Konstrukt enthielt den Promotorbereich und den folgenden Intronabschnitt bis zum Exon 1, das andere Konstrukt entsprach nur dem Intronabschnitt und wurde als Kontrolle verwendet. Zusätzlich wurden die Forward-Primer mit einer XhoI-Schnittstelle und der Reverse-Primer mit einer HindIII-Schnittstelle versehen, um die PCR-Produkte später an diesen Positionen schneiden zu können. Nachdem der pGL3-Vektor über die gleichen Schnittstellen verfügt, konnte das PCR-Produkt bei der Klonierung gezielt in den Vektor eingesetzt werden.

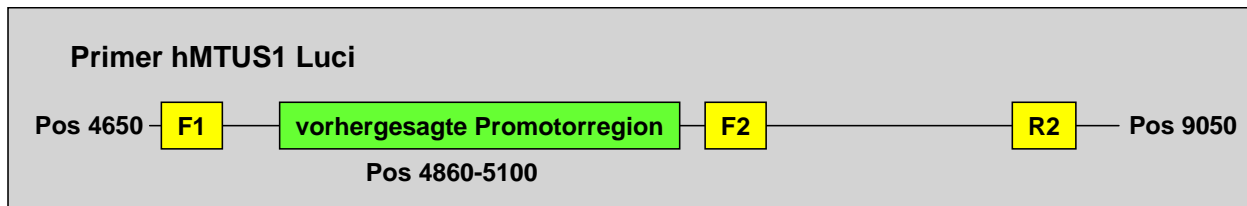


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Primerkombinationen hMTUS1 Luci F1-R2 oder F2-R2

Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Forward-Primer hMTUS1 Luci F1

Pos.4718 (Genbank Nr. AF165145) 5' CCCTCGAGGGAGAGCAGTCTGATGT 3'

Forward-Primer hMTUS1 Luci F2

Pos.5295 (Genbank Nr. AF165145) 5' CCCTCGAGGTGGAAAAATTGGGCCT 3'

Reverse-Primer hMTUS1 Luci R2

Pos.9028 (Genbank Nr. AF165145) 5' GGAAGCTTCACTTTCAGATGTTGCCA 3'

Mix 1	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	20µl	94°C	2min
10mM dNTP-Mischung	1µl	94°C	15s
Primer hMTUS1 Luci F1 oder F2 (10µM)	1µl	60,7°C	30s
Primer hMTUS1 Luci R2 (10µM)	1µl	72°C	4min
HUVEC DNA-Konz. 274ng/µl	2µl	pro Cycle	5s mehr
Mix 2			
Aqua dest.	19,25µl	Cycles	38
10x PCR-Puffer	5µl	72°C	7min
Expand High Fidelity PCR-Enzym	0,75µl	4°C	∞

Tabelle 6: PCR-Protokoll für die Primerkombinationen hMTUS1 Luci F1-R2 und F2-R2

Die Auswertung erfolgte auf einem 1%igen Agarose-Gel mit 1µl GelStar und als Marker wurde der PeqGold Leiter verwendet. Die Banden wurden ausgeschnitten und die DNA mit dem „Gel Extraction Kit“ aufgereinigt und in 30µl EBM-Puffer gelöst. Für den Verdau wurde zum einen die gesamte Menge an DNA eingesetzt, zum anderen ca. 1µg pGL3-Basic-Expressionsvektor. Der pGL3-Vektor wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten wie das PCR-Produkt, damit bei der anschließenden Ligation die Enden des PCR-Produkts genau mit den Enden an den Schnittstellen des Vektors übereinstimmten. Bei 37°C wurden die Ansätze eine Stunde lang geschüttelt, in diesem Zeitraum wurde die DNA vollständig verdaut.

DNA Luci F1-R2	Xho I / Hind III-Verdau	DNA Luci F2-R2	Xho I / Hind III-Verdau	pGL3 Basic	Xho I / Hind III-Verdau
	30µl DNA		30µl DNA		5µl DNA
	4,5µl Aqua dest.		4,5µl Aqua dest.		29,5µl Aqua dest.
	5µl Xho I (20U/µl)		5µl Xho I (20U/µl)		5µl Xho I (20U/µl)
	5µl Hind III (20U/µl)		5µl Hind III (20U/µl)		5µl Hind III (20U/µl)
	5µl Puffer 2		5µl Puffer 2		5µl Puffer 2
	0,5µl BSA		0,5µl BSA		0,5µl BSA

Tabelle 7: Protokoll für den Enzymverdau der PCR-Produkte und des Versuchsvektors

Zur Entfernung der abgeschnittenen DNA-Stücke wurden die Ansätze mit 10µl 6x Ladepuffer gemischt, auf einem 1%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer aufgetrennt und die erhaltenen Banden mit dem „Gel Extraction Kit“ isoliert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend im Vakuum getrocknet und die PCR-Stücke hMTUS1 Luci F1-R2 und F2-R2 in 4µl Wasser gelöst. Der geschnittene Expressionsvektor wurde in 10µl 2x Ligationspuffer gelöst. Zu den gelösten PCR-Fragmenten wurden dann je 5µl Expressionsvektor und 1µl T4 Ligase gegeben und 15min bei Raumtemperatur ligiert. Die anschließende Transformation in *E. coli* wurde gemäß dem Protokoll für „XL1-Blue Competent Cells“ durchgeführt und 200µl des erhaltenen Transformationsansatzes auf eine LB-Platte mit Ampicillin ausplattiert. Dadurch waren nur solche *E. coli* Kolonien zum Wachstum auf der Agarplatte fähig, die den Expressionsvektor und damit ein Ampicillin-Resistenzgen enthielten. Am nächsten Tag wurden von jedem Ansatz fünf Kolonien gepickt und in ein Röhrchen mit LB-Medium und 50µg/ml Ampicillin überführt. Nach Inkubation dieser Lösung im Schüttler bei 37°C über Nacht wurde eine Plasmidisolierung gemäß dem Protokoll des „Spin Miniprep Kits“ durchgeführt. Im ersten Schritt dieses Kits werden die Bakterien zunächst lysiert und die so frei gewordene DNA wird bei salzreichen Bedingungen und niedrigem pH Wert an eine Kieselgel-Membran gebunden. Die reine Plasmid-DNA wird dann mit einem salzarmen Puffer pH 8,5 eluiert.

Von der erhaltenen Plasmid-DNA wurden 5µl mit 6x Ladepuffer gemischt und in einer Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die Plasmide, bei denen das PCR-Produkt richtig in den Vektor eingebaut worden war, wiesen eine größere Basenlänge auf. Durch diesen Größenunterschied konnten in der Gelelektrophorese die Klone mit integriertem PCR-Produkt von Klonen ohne PCR-Produkt unterschieden werden. Von Ersteren wurden jeweils 5µl im Vakuum getrocknet und sequenziert. Als Sequenzierprimer wurde der RVprimer3 (5` CTAGCAAATAGGCTGTCCC 3`) verwendet, der auf dem Expressionsvektor kurz vor dem PCR-Insert liegt. Von der restlichen Plasmid-DNA wurde die Konzentration im UV-Meter bestimmt.

Für den eigentlichen Promotor-Assay wurden MiaPaCa-2-Zellen wie unter 4.1.1 in Kultur genommen. Die Zellen wurden in einer 96-well-Platte in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro well ausgesät. Am nächsten Tag wurden jeweils vier wells mit der gleichen DNA-Kombination transfiziert, wobei nach dem Protokoll des „GenePorter 2 Kits“ vorgegangen und insgesamt eine Menge von 0,5µg und 0,4µg DNA eingesetzt wurde. Der „GenePorter Kit“ bedient sich der so genannten Lipofektion, die erstmals von Felgner et al. 1987 beschrieben wurde. Dabei dispergiert man das geladene Lipid solange in einer wässrigen Lösung, bis sich Liposomen bilden. Der Kit kombiniert ein kationisches Lipid mit einem ungeladenen Helferlipid, das die Fusion mit der Zelle erleichtert (Rose et al., 1991). Gibt man jetzt zu diesen Liposomen Plasmid-DNA hinzu, komplexiert diese mit den Liposomen und wird nach der Fusion mit der Zelle ins Cytoplasma freigesetzt.

Um für die Auswertung geeignete Kontrollen zur Verfügung zu haben, wurde der Versuch mit zwei Testreihen durchgeführt. Zum einen wurden vier wells nicht transfiziert, um einen Nullwert definieren zu können. Zum anderen wurden vier wells mit dem Kontrollvektor pRL-TK und dem leeren Expressionsvektor pGL3 Basic im Verhältnis 1:1 transfiziert. Die beiden Versuchsreihen wurden einerseits mit dem Kontrollvektor pRL-TK und hMTUS1 Luci F1-R2 in pGL3 Basic, andererseits mit dem Kontrollvektor pRL-TK und hMTUS1 Luci F2-R2 in pGL3 Basic im Verhältnis 1:1 transfiziert. Das Transfektionsvolumen pro well betrug 100µl.

	DNA (μg) pro well	DNA Diluent (μl)	Gene Porter 2 (μl)	serumfreies Medium (μl)
F1-R2 in pGL3 Basic/ pRL-TK	0,5 (1:1)	12,5	2,5	10
F2-R2 in pGL3 Basic/ pRL-TK	0,5 (1:1)	12,5	2,5	10
pGL3 Basic/ pRL-TK	0,5 (1:1)	12,5	2,5	10

Tabelle 8: Protokoll für die Transfektion der Zellen mit 0,5 μg DNA gemäß dem „GenePorter Kit“.

	DNA (μg) pro well	DNA Diluent (μl)	Gene Porter 2 (μl)	serumfreies Medium (μl)
F1-R2 in pGL3 Basic/ pRL-TK	0,4 (1:1)	10	2	8
F2-R2 in pGL3 Basic/ pRL-TK	0,4 (1:1)	10	2	8
pGL3 Basic/ pRL-TK	0,4 (1:1)	10	2	8

Tabelle 9: Protokoll für die Transfektion der Zellen mit 0,4 μg DNA gemäß dem „GenePorter Kit“.

Vier Stunden nach Transfektion wurden pro well 100 μl Wachstumsmedium mit 1 μl Booster 2 zugegeben, da sich die Transfektionseffizienz durch die Booster-2-Lösung steigern lässt. Am nächsten Tag wurde der Promotor-Assay nach Anleitung des „Dual Glo Luciferase-Assays“ durchgeführt.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Verhältnis der beiden gemessenen Lumineszenzen berechnet. Dazu wurde der Wert eines wells für die Firefly-Lumineszenz durch den dazugehörigen Wert der Renilla-Lumineszenz geteilt. Anschließend wurde für diese Ratio der Mittelwert der vier wells ermittelt und die verschiedenen Ansätze miteinander verglichen.

4.2 Untersuchungen an siRNA-transfizierten HUVEC-Zellen

4.2.1 Grundlagen

Wie bereits erwähnt zeigen MiaPaCa-2 nach „Aktivierung“ des MTUS1-Gens eine reduzierte Zellproliferation (Seibold et al., 2003). Bei Tumorsuppressor-Genen lässt sich im Tumorgewebe der umgekehrte Effekt beobachten. Durch Inaktivierung des Gens zeigen die Zellen ein erhöhtes Wachstum und eine verringerte Differenzierung. In der Zellkultur kann man den Knockout eines bestimmten Gens durch die Transfektion einer spezifischen siRNA simulieren. Dabei bedient man sich der so genannten RNA-Interferenz. Bei der RNA-Interferenz macht man sich einen zelleigenen Abwehrmechanismus zum Nutzen, der darauf basiert, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) nicht nativ in den Zellen vorkommt, sondern nur von extern z.B. durch einen Virenangriff in die Zelle gelangen kann. An diese doppelsträngige RNA binden so genannte Dicer, das sind ATP abhängige Ribonukleasen, welche die RNA unter ATP-Verbrauch zerschneiden. Die RNA wird dadurch inaktiviert und der Virenangriff abgewendet. Handelt es sich aber bei der entstandenen „small interfering RNA“ (siRNA) um Sequenzstücke, die auch in der Zelle als mRNA vorhanden sind, dann läuft die Kaskade weiter. Die kurzen doppelsträngigen siRNAs werden von so genannten „RNA induced silencing complexes“, kurz RISC gebunden. In

diesem Komplex öffnet sich der Doppelstrang der siRNA unter Einwirkung von Helikasen und komplementäre mRNA kann an die Einzelstrang-siRNA (ssRNA) binden. Das wiederum aktiviert den „RNA induced silencing complex“ und die mRNA wird gespalten. Die mRNA Stücke sind damit dem Verdauungsprozess in der Zelle ausgeliefert und es kann kein Protein mehr gebildet werden. Nachdem durch eine Transfektion auch spezifische siRNA in die Zelle geschleust werden kann, kann das Zielgen funktionell inaktiviert werden, d.h. die Transkription des Gens erfolgt ungestört, aber eine Proteinbildung findet wegen dem beschleunigten Abbau der mRNA nicht mehr, oder nur noch in vermindertem Umfang statt (s. Abb.13).

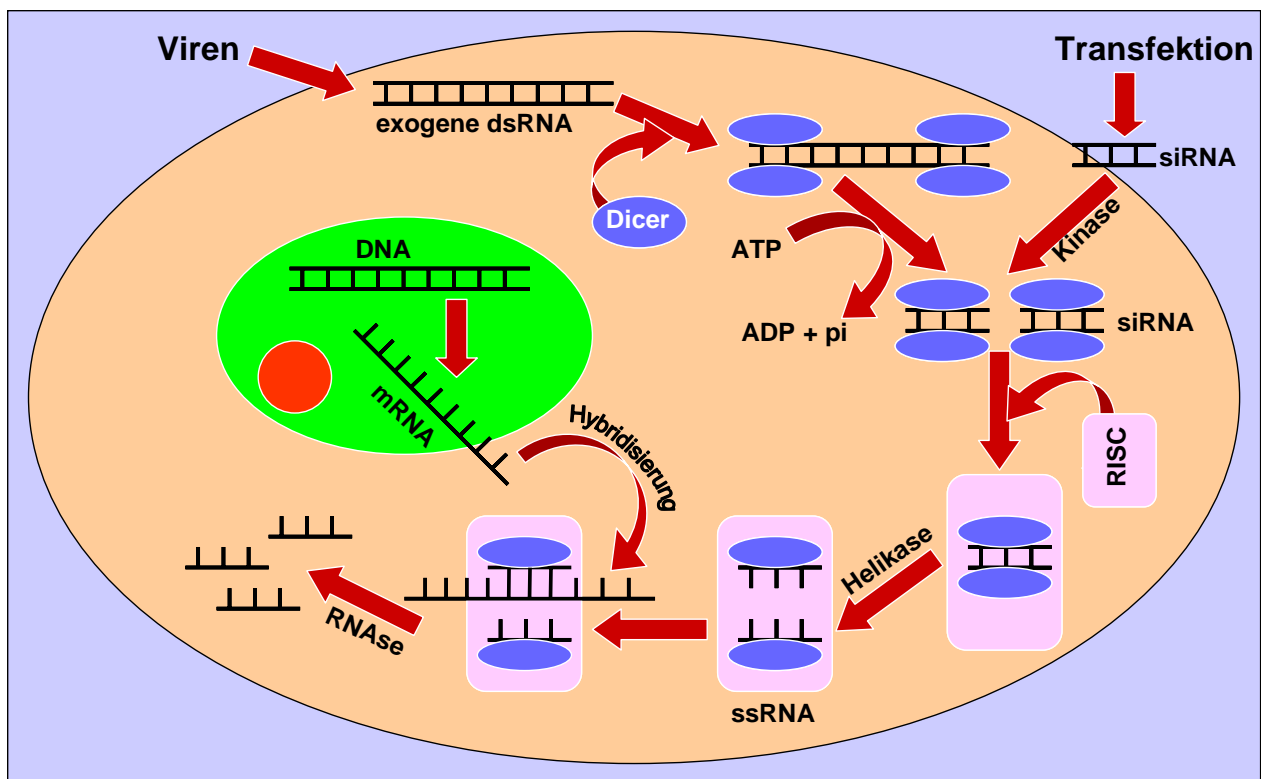


Abbildung 13: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz. RISC steht für „RNA induced silencing complex“, ssRNA für einzelsträngige RNA

4.2.2 Western-Blot-Analyse von siRNA-transfizierten HUVEC-Zellen

Am ersten Tag des Versuchs wurden drei 6-well-Platten mit 1×10^5 HUVEC-Zellen der sechsten bis siebten Passage pro 6-well ausgesät. Die Zellen wurden pro well in 2ml Wachstumsmedium kultiviert. Nach 24h wurde die Transfektion der siRNA gemäß dem Protokoll des „GenePorter2 Kits“ durchgeführt, wobei zwei wells zu Kontrollzwecken nicht transfiziert wurden. Die MTUS1-siRNA wurde in den Konzentrationen 10nM, 25nM und 50nM in jeweils zwei wells transfiziert. Parallel dazu wurden je zwei wells mit der Kontrolle Luciferase-siRNA transfiziert. Luciferase ist ein Enzym, das natürlicherweise nicht in humanen Zellen enthalten ist. Die Transfektion mit Luciferase-siRNA kann somit in den humanen Zellen keine Inaktivierung des Luciferase-Gens zur Folge haben, aber die Zellen sind den gleichen Reagenzien ausgesetzt und können daher als Vergleichsgruppe dienen.

	siRNA (ng) pro well	DNA Diluent (µl)	Gene Porter 2 (µl)	serumfreies Medium (µl)
MTUS1-siRNA	10	12,5	2,5	10
MTUS1-siRNA	25	12,5	2,5	10
MTUS1-siRNA	50	12,5	2,5	10
Luciferase-siRNA	10	12,5	2,5	10
Luciferase-siRNA	25	12,5	2,5	10
Luciferase-siRNA	50	12,5	2,5	10

Abbildung 14: Protokoll für die Transfektion der Zellen mit siRNA gemäß dem „GenePorter Kit“.

MTUS1-siRNA

5' AGCCAGGAAUGAGUUACAA 3'

Luciferase-siRNA

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA 3'

Vier Stunden nach Transfektion wurde den Zellen 1ml Wachstumsmedium und 10µl Booster 3 zugegeben und einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit frischem Wachstumsmedium gefüttert. Am vierten Tag dieses Protokolls wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 80µl eiskaltem MLB-Puffer pro well wurden die Zellen abgeschabt, die Suspension fünfmal durch eine Insulinspritze gepresst und anschließend bei 10000rpm und 4°C 10min abzentrifugiert. Die Proteine befanden sich nach diesem Arbeitsschritt im Überstand. Mit einem Teil der Suspension wurde gemäß der Gebrauchsanweisung eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Prinzip dieser Bestimmung ist der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau, der in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe bildet. Das Absorptionsspektrum der ungebundenen kationischen Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert und das Absorptionsspektrum verschiebt sich mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Durch eine Standardkurve kann so der Proteingehalt der Probe ermittelt werden.

Der andere Teil der Suspension wurde zur Denaturierung der Proteine mit 3xSDS-Puffer mit 10% Mercaptoethanol im Verhältnis 2:1 versetzt und bei 98°C 5min gekocht. Die Western Blot Analyse erfolgte anschließend mit einem 10%igen Polyacrylamidgel, wobei 10µg Protein pro Spur aufgetragen wurde und der Marker SeeBlue Plus2 verwendet wurde. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine 90min auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran über Nacht mit 5%igem Milchpulver in TBS-T-Puffer blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern. Die Membran wurde zum einen mit dem MTUS1-Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 und Anti-Kaninchen-Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:2000, zum anderen mit dem β-Aktin-Antikörper in einer Konzentration von 1:50000 und Anti-Maus-Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:20000 gefärbt. Die Detektion der Banden erfolgte nach Inkubation mit ECL Plus durch lichtsensitive Filme und anschließende Entwicklung.

Die densitometrische Auswertung erfolgte anschließend mit dem Quantity One-Berechnungsprogramm, wobei die Werte der MTUS1-Bande mit Hilfe der β-Aktin-Bande normalisiert wurden. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Werte in prozentuale Verhältnisse umgerechnet.

4.2.3 Proliferationsverhalten von siRNA-transfizierten HUVEC-Zellen

Für den Proliferationsnachweis wurden drei 6-well-Platten mit HUVEC-Zellen der 6. bis 7. Passage in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro 6-well ausgesät. Einen Tag danach wurden sechs wells mit 25nM MTUS1-siRNA und sechs wells mit 25nM Luciferase-siRNA gemäß den bereits oben genannten Vorschriften von „GenePorter2“ transfiziert.

MTUS1-siRNA

5' AGCCAGGAAUGAGUUACAA 3'

Luciferase-siRNA

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA 3'

Weitere sechs wells blieben zu Kontrollzwecken untransfiziert. Nach 4h wurde den Zellen 1ml Wachstumsmedium mit 10µl Booster 3 zugegeben, nach 24h wurden das Medium gewechselt. Die Proliferation wurde am vierten Tag dieses Protokolls mit einer Zellzählung gemessen. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit 500µl Trypsin/EDTA pro well abgelöst und die Suspension in 2ml Wachstumsmedium aufgenommen. Für die Zellzählung wurde diese Suspension in einer Verdünnung von 1:200 mit isotonischer Kochsalzlösung eingesetzt und die Konzentration durch den Zellzähler Z2 gemessen.

4.3 Untersuchungen an humanen Colontumoren und umgebendem Normalgewebe

4.3.1 Nachweis der MTUS1-Protein-Expression

Der Protein Nachweis erfolgte mit einer Western-Blot-Analyse. Dazu wurden von zehn Colontumor-Patienten jeweils ein Gewebestück des Tumors und ein Gewebestück des umgebenden Normalgewebes untersucht. Die Proben wurden gewogen und für die Aufarbeitung von 100mg Gewebe 100µl Lysispuffer verwendet. Das Colongewebe wurde so in einem Glashomogenisator zersetzt und die Suspension anschließend fünfmal durch eine Insulinspritze gedrückt, um die DNA zu scheren. Nach einer Inkubation von 15min auf Eis wurden 20µl der Lösung für die Proteinbestimmung nach Lowry verwendet. Die restliche Suspension wurde zur Denaturierung der Proteine mit 3xSDS-Puffer mit 10% Mercaptoethanol im Verhältnis 2:1 versetzt und bei 98°C 5min gekocht. Die Lowry-Bestimmung wurde nach der Beschreibung des Kits durchgeführt. Grundlage der Proteinbestimmung ist die Biuretreaktion, bei der das Biuret in alkalischer Lösung mit verdünnter Kupfersulfatlösung eine blauviolette Färbung durch Bildung eines Kupferkomplexes zeigt. Die gleiche Farbreaktion geben unter anderem Proteine, da sie mehrere -CO-NH- Gruppen enthalten. Lowry et al. publizierten bereits 1951 die Möglichkeit, mit dieser Methode Proteine zu quantifizieren. Die Auswertung erfolgt über die Berechnung des Proteingehalts anhand einer Kalibrierungskurve.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte anschließend mit einem 10%igen Polyacrylamidgel, wobei 10µg Protein pro Spur aufgetragen und der Marker SeeBlue Plus2 verwendet wurde. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine 90min auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran über Nacht mit 5%igem Milchpulver in TBS-T-Puffer blockiert. Die Entwicklung des Western-Blots wurde zum einen mit dem MTUS1-Antikörper in einer Konzentration von 1:1500 und Anti-Kaninchen-Zweitantikörper in einer Konzentration von 1:2000, zum anderen mit dem β-Aktin-Antikörper in einer Konzentration von 1:100000 und Anti-Maus-Zweitantikörper in

einer Konzentration von 1:20000 durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgte nach Inkubation mit ECL Plus durch lichtsensitive Filme und anschließende Entwicklung. Für die Berechnung der MTUS1-Expression wurden die densitometrisch gemessenen MTUS1-Werte durch die dazu gehörigen β -Aktin-Werte geteilt. Um eine prozentuale Darstellung zu ermöglichen wurden die MTUS1-Werte der Normalgewebe gleich 100% gesetzt und die Werte der Tumorgewebe dementsprechend in Prozent umgerechnet.

4.3.2 Nachweis der MTUS1-mRNA-Expression

Von den fünf Patienten, bei denen eine unterschiedliche Protein-Expression in Tumor- und Normalgewebe nachgewiesen werden konnte, wurden die Gewebeproben auch auf eine unterschiedliche mRNA-Expression untersucht. Dazu wurden die Gewebeproben noch unaufgetaut in RNAlater gelegt und drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die mRNA mit Hilfe des „RNeasy Kits“ aus dem Gewebe gewonnen. In einem UV-Meter wurde die mRNA-Konzentration der erhaltenen Lösungen gemessen. Die cDNA konnte dann nach dem Oligo dT Protokoll des „First Strand cDNA Synthesis Kits“ aus 1 μ g mRNA synthetisiert werden. Mit der cDNA wurde anschließend eine PCR durchgeführt, wobei die Primer so gewählt wurden, dass eine Bande für β -Aktin und eine für MTUS1 amplifiziert wurde. Die β -Aktin-Bande diente bei der späteren Quantifizierung der Banden als Bezugsgröße.

Folgendes PCR Protokoll wurde verwendet:

Forward-Primer h14AII F4

Pos.247 (Genbank Nr. NM020749) 5' GCCTCTTCTGTGAAATCTCGCC 3'

Reverse-Primer h14AII R10

Pos.602 (Genbank Nr. NM020749) 5' CGCTCAGACAGCAGGTGCTG 3'

Forward-Primer β -Aktin F3

Pos.269 (Genbank Nr. BT019932) 5' TCTACAATGAGCTGCGTGTG 3'

Reverse-Primer β -Aktin R4

Pos.379 (Genbank Nr. BT019932) 5' TACATGGCTGGGGTGTGAA 3'

	50 μ l Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	38,5 μ l	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5 μ l	94°C	40s
10mM dNTP-Mischung	1 μ l	57°C	45s
Primer h14AII F4 (10μM)	1 μ l	72°C	5min
Primer h14AII R10 (10μM)	1 μ l		
Primer β-Aktin F3 (10μM)	1 μ l	Cycles	35
Primer β-Aktin R4 (10μM)	1 μ l	72°C	7min
cDNA	1 μ l	4°C	∞
HotStar Taq 5u/μl	0,5 μ l		

Tabelle 10: PCR-Protokoll für die β -Aktin- und MTUS1-Quantifizierung

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarose Gel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt, das mit GelStar gefärbt worden war. Als Marker wurde der PeqGold Leiter verwendet.

Das Gel wurde mit dem Programm Quantity One densitometrisch ausgewertet. Nachdem in jedem Ansatz die gleiche Menge an cDNA eingesetzt worden war, sollte die β -Aktin-Bande in jeder Spur gleich dick sein. Für die Berechnung der MTUS1-Expression wurden die densitometrisch gemessenen MTUS1-Werte durch die dazu gehörigen β -Aktin-Werte geteilt.

Um eine prozentuale Darstellung zu ermöglichen wurden die MTUS1-Werte der Normalgewebe gleich 100% gesetzt und die Werte der Tumorgewebe dementsprechend in Prozent umgerechnet.

4.3.3 Untersuchung der Colontumore auf Mutationen in der codierenden Sequenz

Auf der Suche nach Gründen für die veränderte MTUS1-Expression wurden zwei Colontumore hinsichtlich Mutationen in der codierenden Sequenz untersucht. Dafür wurde mit den beiden cDNA der Colontumore eine PCR durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass fast die gesamte cDNA-Sequenz von 3738 Basenpaaren amplifiziert wurde.

Forward-Primer hMTUS1 F31

Pos.12 (Genbank Nr. NM020749) 5' GCAGCTTCTAGACCTGCAGGAGGGAG 3'

Reverse-Primer hMTUS1 R31

Pos.3358 (Genbank Nr. NM020749) 5' GAGAACAACCTTGGAAGCGTGAGCAGA 3'

Mix 1	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	21µl	94°C	2min
10mM dNTP-Mischung	1µl	94°C	15s
Primer hMTUS1 F31 (10µM)	1µl	66,5°C	30s
Primer hMTUS1 R31 (10µM)	1µl	72°C	4min
cDNA	1µl	pro Cycle	5s mehr
Mix 2			
Aqua dest.	19,25µl	Cycles	38
10x PCR-Puffer	5µl	72°C	7min
Expand High Fidelity PCR-Enzym	0,75µl	4°C	∞

Tabelle 11: PCR-Protokoll für die Primerkombination hMTUS1 F31-R31

Das erhaltene PCR-Produkt wurde auf einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Zur Detektion der DNA-Banden im UV Licht wurde dem Gel 1µl GelStar zugesetzt und als Marker wurde der PeqGold Leiter verwendet. Die erhaltene Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem „Gel Extraction Kit“ aufgereinigt. Nachdem die Sequenzierung des gesamten PCR-Produktes aufgrund seiner Größe technisch noch nicht möglich ist, wurden mehrere Primer so konstruiert, dass die Sequenz in Abschnitten von ca. 400 Basenpaaren sequenziert werden konnte.

Folgende Sequenzierprimer wurden verwendet:

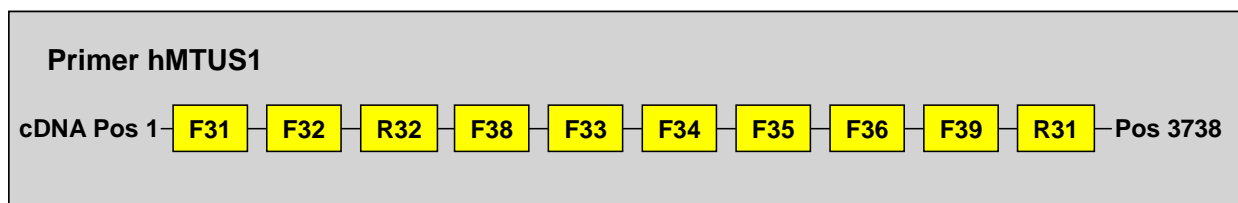


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Primerlage

Forward-Primer hMTUS1 F32

Pos.558 (Genbank Nr. NM020749) 5' AGTGGATTTATCCTGCAGCT 3'

Forward-Primer hMTUS1 F33

Pos.1458 (Genbank Nr. NM020749) 5' AGTCGAAAGTCAACAAGCGA 3'

Forward-Primer hMTUS1 F34

Pos.1947 (Genbank Nr. NM020749) 5' CTCAGGGCCCTATTAAGATT 3'

Forward-Primer hMTUS1 F35

Pos.2391 (Genbank Nr. NM020749) 5' CTTACCCATGTGAGCCTAAC 3'

Forward-Primer hMTUS1 F36

Pos.2927 (Genbank Nr. NM020749) 5' GGAGTCCCTTTGTCTTTGGG 3'

Forward-Primer hMTUS1 F38

Pos.966 (Genbank Nr. NM020749) 5' GAAGCTAGCCACTCAGAGAA 3'

Forward-Primer hMTUS1 F39

Pos.3389 (Genbank Nr. NM020749) 5' CTGCTCACGCTTCCAAGTTG 3'

Reverse-Primer hMTUS1 R32

Pos.558 (Genbank Nr. NM020749) 5' CGCTCAGACAGCAGGTGCTG 3'

4.3.4 Untersuchung der Colontumore auf Mutationen in der Promotorregion

Wie bereits beschrieben wurde aus den Colongeweben die genomische DNA gewonnen. Stellvertretend für alle Colontumorgewebe wurde die Sequenzierung der vorhergesagten Promotorregion im Sequenzstück Position 4860-5100 (Genbank Nr. AF165145) an dem Colontumorgewebe Nr.22816 durchgeführt. Analog den MiaPaCa-2-Zellen wurde der Promotorbereich von ca. 1400 Basenpaaren auch für die Sequenzierung des Colongewebes mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

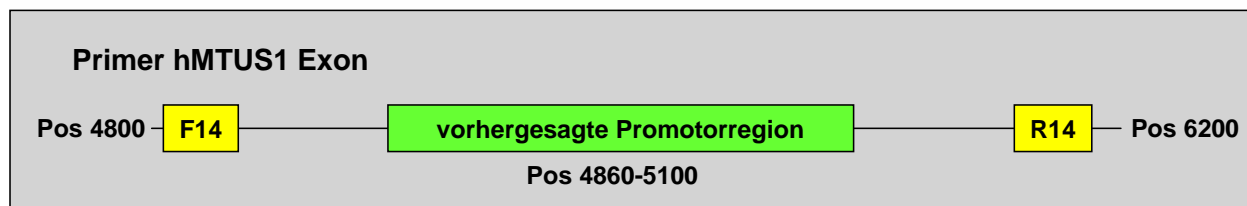


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Primerlage

Forward-Primer hMTUS1 Exon F14

Pos.4801 (Genbank Nr. AF165145) 5' CTTTGGGAGGCCAAAGCAGGTGGAT 3'

Reverse-Primer hMTUS1 Exon R14

Pos.6094 (Genbank Nr. AF165145) 5' GAAGCAGAGCCTGTGTTAGGATGTC 3'

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	40,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP Mischung	1µl	60,5°C	30s
Forward-Primer (10µM)	1µl	72°C	120s
Reverse-Primer (10µM)	1µl	Cycles	38
Colon DNA-Konz.165ng/µl	1µl	72°C	7min
HotStarTaq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 12: PCR-Protokoll für die Primerkombination hMTUS1 F14-R14

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetrennt und die Banden mit dem „Gel Extraction Kit“ isoliert. Die erhaltene DNA wurde für eine Klonierung nach dem Protokoll des „TOPO TA Klonierungskits“ eingesetzt und die erhaltenen Klone mit dem Forward- und Reverse-Primer des Expressionsvektors

sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Blast-N-Programm der NCBI-Homepage und der publizierten Sequenz (Genbank Nr. AF165145) verglichen und so mögliche Mutationen detektiert.

4.3.5 Untersuchung der Colontumore bezüglich der DNA-Methylierung im Promotorbereich

Durchführung der Bisulfit-Reaktion

Aus den Gewebeproben der Tumor- und Normalgewebe wurde genomische DNA mit Hilfe des „DNA Tissue Kits“ gewonnen. Die Konzentration der DNA wurde im UV-Meter bestimmt. Durch mehrmaliges Aufziehen in eine Insulinspritze wurde die DNA geschert. Für jede Reaktion wurde 1µg DNA mit Wasser auf ein Volumen von ca. 20µl verdünnt. Die Bisulfit-Reaktion wurde anschließend analog dem Protokoll mit MiaPaCa-2-Zellen durchgeführt.

PCR

Für die nachfolgende PCR wurden dieselben Primer verwendet, wie sie bereits im Protokoll für die MiaPaCa-2-Zellen genannt sind. Es wurde ebenfalls eine PCR mit anschließender „nested PCR“ durchgeführt, wobei folgende Protokolle verwendet wurden:

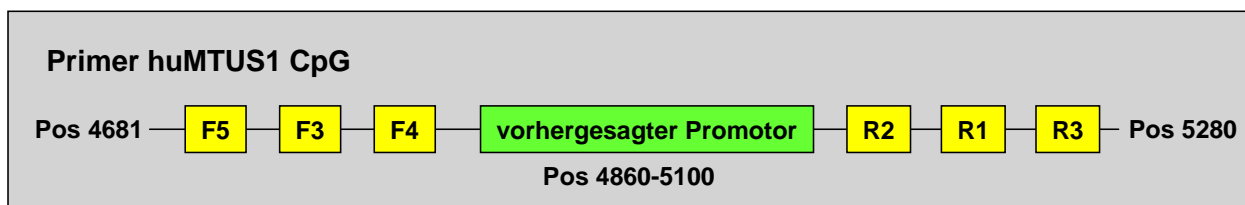


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Primerlage

Forward-Primer hu MTUS1 CpG F5

Pos.4692 (Genbank Nr.AF165145) 5' GTTTATGTTAAGTTTAAAAATAAATTGGAGAGT 3'

Reverse-Primer hu MTUS1 CpG R3

Pos.5248 (Genbank Nr.AF165145) 5' TCAATACAAAAATAAATTTTAATTATCAAAAAA 3'

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	38,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	45°C	20s
Primer huMTUS1 CpG F5 (10µM)	1µl	72°C	120s
Primer huMTUS1 CpG R3 (10µM)	1µl	Cycles	38
Template DNA-Konz. ca.200ng/µl	2µl	72°C	7min
HotStarTaq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 13: PCR -Protokoll für die Primerkombination hu MTUS1 CpG F5-R3

Forward-Primer hu MTUS1 CpG F3

Pos.4811 (Genbank Nr.AF165145) 5' TTAAAGTAGGTGGATTATAAGGTTAGGATATTG 3'

Reverse-Primer hu MTUS1 CpG R1

Pos.5126 (Genbank Nr.AF165145) 5' ACAATAAACAAAAATAAAAATTTAAATTA AAAAC 3'

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	31,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	49°C	20s
Primer huMTUS1 CpG F3 (10µM)	1µl	72°C	120s
Primer huMTUS1 CpG.R1 (10µM)	1µl	Cycles	38
Template DNA-Konz. ca.200ng/µl	2µl	72°C	7min
HotStarTaq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 14: PCR-Protokoll für die „nested“ PCR mit der Primerkombination hu MTUS1 CpG F3-R1

Bei der anschließenden Gelelektrophorese mit einem 2%igen Agarosegel in TAE-Puffer und einem Zusatz von 1µl GelStar konnten die Banden im UV-Licht detektiert werden. Nach dem Ausschneiden der Banden und der Aufreinigung mit dem „Gel Extraction Kit“ wurde die DNA im Vakuum getrocknet und mit den Primern huMTUS1 CpG F4 und R2 sequenziert.

Forward-Primer hu MTUS1 CpG F4

Pos.4828 (Genbank Nr. AF165145) 5` TAAGGTTAGGATATTGAGATTATTTTGGTAAAT 3`

Reverse-Primer hu MTUS1 CpG R2

Pos.5101 (Genbank Nr.AF165145) 5` TTAAAAACAATAATACTTTTAATTCATATACAA 3`

Für die Auswertung der Methylierung wurden die erhaltenen Sequenzen mit der nativen Sequenz (Genbank Nr. AF165145) verglichen und so der Methylierungsgrad von Tumorgewebe und Normalgewebe analysiert.

4.4 Etablierung einer MTUS1-Knockout-Maus

Eine oft verwendete Methode zur Inaktivierung von Genen stellt die Insertions-Mutagenese dar, bei der ein so genannter „Gene-Trap-Vektor“ in ein Gen eingeschleust wird. Dadurch kommt es nicht zur Expression des ursprünglichen Gens, sondern zur Expression der Vektorsequenz zusammen mit der endogenen Gensequenz, was zur Synthese eines funktionell gestörten Proteins führt. Seit der vollständigen Entschlüsselung des Mausgenoms arbeiten einige wissenschaftliche Konsortien daran, alle Mausgene durch Insertions-Mutagenese zu modifizieren und der Wissenschaft für die Etablierung von transgenen Tieren zur Verfügung zu stellen. Anhand einer Datenbank-Analyse auf der Homepage von Baygenomics konnte eine bereits etablierte transgene embryonale Maus-Stammzelllinie für das MTUS1-Gen identifiziert werden (Stammzelllinie RRA048).

4.4.1 Stammzellen Zellkultur

Die verwendeten Zellkulturflaschen wurden vor Verwendung mit einer sterilen 0,1%igen Gelatinelösung ausgegossen und eine halbe Stunde im Inkubator gewärmt. Vor dem Aussäen der Zellen wurde die überschüssige Gelatinelösung abgesaugt.

Das Röhrchen mit den Stammzellen RRA048 von Baygenomics wurde in einem Wasserbad von 37°C aufgetaut und die Zellen in 10ml vorgewärmtes Medium überführt. Zur Entfernung von DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert, das Medium entfernt und die Zellen mit 10ml frischem Medium in einer 25cm² Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden im Folgenden täglich wechselnd geteilt oder gefüttert. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit einer 1x

Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und 1×10^6 Zellen in eine neue 25cm^2 Flasche ausgesät. Zum Einfrieren wurden die Zellen nach der Ablösung abzentrifugiert und anschließend in 1ml Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen zunächst bei -20°C eingefroren, nach zwei Tagen dann in einen -80°C Gefrierschrank überführt.

4.4.2 Mycoplasmentest

Mit Mycoplasmen infizierte Zellen können in der Zellkultur veränderte Eigenschaften aufweisen oder nicht mehr richtig wachsen. Daher wurde in regelmäßigen Abständen ein Mycoplasmen Test durchgeführt.

Die zu testenden Zellen wurden mindestens 24h in ihrem Medium kultiviert. Von diesem Medium wurden $100 \mu\text{l}$ 5min bei 95°C gekocht. Mit dem Mycoplasmen-Detektionskit wurde eine PCR nach folgendem Schema durchgeführt:

	50 μl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	35,8 μl	94 $^\circ\text{C}$	2min
10x PCR-Puffer	5 μl	94 $^\circ\text{C}$	30s
Primer/Nukleotid-Gemisch	5 μl	55 $^\circ\text{C}$	1min
Interne Kontroll-DNA	2 μl	72 C	1min
Zellüberstand od. Kontrolle	2 μl	Cycles	35
Taq 5u/μl	0,2 μl	72 $^\circ\text{C}$	4min
		4 $^\circ\text{C}$	∞

Tabelle 15: PCR-Protokoll für den Mycoplasmen-Nachweis

Zur Auswertung wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel mit GelStar verwendet. Von den PCR-Produkten wurden jeweils $5 \mu\text{l}$ mit Ladepuffer gemischt, auf das Gel aufgetragen und unter der UV-Lampe detektiert.

4.4.3 Identifizierung der Lage des Vektors

Aus den Stammzellen der Zelllinie RRA048 von Baygenomics wurde unter Verwendung des „DNeasy Tissue Kits“ die DNA isoliert.

Zur Lagebestimmung des Vektors wurden zwei PCR-Ansätze vorbereitet, die den Genabschnitt zwischen Exon 3 und Exon 4 in zwei Hälften unterteilten. Als Forward-Primer wurden demnach MDNA E3 F1 und MDNA F4 eingesetzt, als Reverse-Primer jeweils der Vektorprimer pGT1.8TM86r. Der PCR wurden folgende Protokolle zugrunde gelegt und die Auswertung wurde mit einem 1% Agarose-Gel durchgeführt.

Forward-Primer MDNA E3 F1

Pos.36562 (Genbank Nr. AC116511) 5' CTGAAGCAACACAAAACCCTCTCTC 3'

Reverse-Primer pGT1.8TM 86r

Vektor Pos.66 (Baygenomics) 5' CACTCCAACCTCCGCAAACCTC 3'

Mix 1	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	19,5µl	92°C	2min
10mM dNTP-Mischung	2,5µl	92°C	10s
Primer MDNA E3 F1 (10µM)	1µl	65,8°C	30s
Primer pGT1.8TM86r (10µM)	1µl	68°C	4min
Stammzellen DNA-Konz.268ng/µl	1µl	pro Cycle	10s mehr
Mix 2			
Aqua dest.	19µl	Cycles	36
10x PCR-Puffer	5µl	68°C	7min
Expand 20kb ^{plus} PCR-Enzym	1µl	4°C	∞

Tabelle 16: PCR-Protokoll für die Primerkombination MDNA E3 F1-pGT1.8TM86r

Forward-Primer MDNA F4

Pos.43569 (Genbank Nr. AC116511) 5` GCTTGAGTCTTAGAACACACCGACA 3`

Reverse-Primer pGT1.8TM 86r

Vektor Pos.66 (Baygenomics) 5` CACTCCAACCTCCGCAAACCTC 3`

Mix 1	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	19,5µl	92°C	2min
10mM dNTP-Mischung	2,5µl	92°C	10s
Primer MDNA F4 (10µM)	1µl	60,0°C	30s
Primer pGT1.8TM86r (10µM)	1µl	68°C	4min
Stammzellen DNA-Konz.268ng/µl	1µl	pro Cycle	10s mehr
Mix 2			
Aqua dest.	19µl	Cycles	36
10x PCR-Puffer	5µl	68°C	7min
Expand 20kb ^{plus} PCR-Enzym	1µl	4°C	∞

Tabelle 17: PCR-Protokoll für die Primerkombination MDNA F4-pGT1.8TM86r

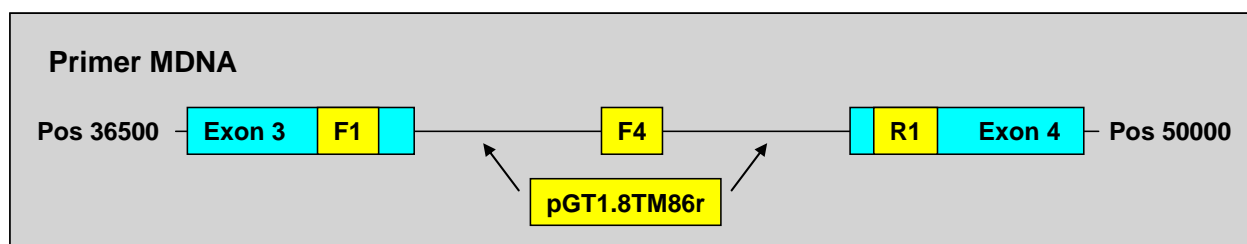


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Primerlage und der möglichen Lage des Vektors, auf dem der Primer pGT1.8TM86r liegt

Für eine weitere Eingrenzung der möglichen Vektorlage wurden zwei weitere PCRs mit den Forward-Primer MDNA F2 und MDNA F3 durchgeführt und dem Reverse-Primer pGT1.8TM86r, wobei folgendes Protokoll verwendet wurde:

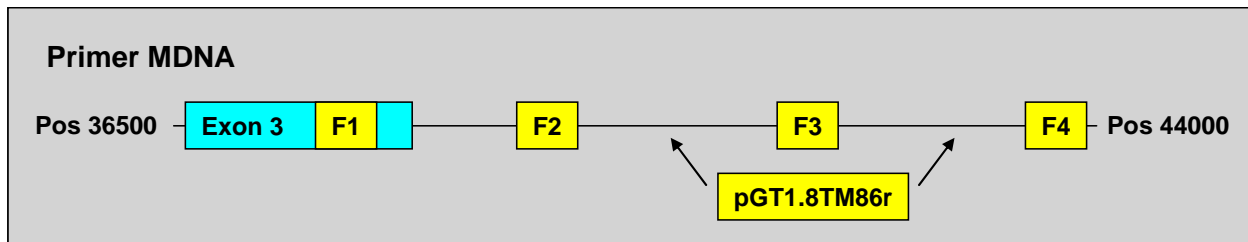


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Primerlage und der möglichen Lage des Vektors, auf dem der Primer pGT1.8TM86r liegt

Forward-Primer MDNA F2

Pos.38713 (Genbank Nr. AC116511) 5' GGTCTCACAGTCTCCAGGTTTGAAT 3'

Forward-Primer MDNA F3

Pos.41432 (Genbank Nr. AC116511) 5' CCTAAGATGGAGACAAGGAAGGTGA 3'

Reverse-Primer pGT1.8TM 86r

Vektor Pos.66 (Baygenomics) 5' CACTCCAACCTCCGCAAATC 3'

Mix 1	Standard	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	19,5µl	94°C	2min
10mM dNTP-Mischung	2,5µl	94°C	15s
Primer MDNA F2 oder F3 (10µM)	1µl	60,0°C	30s
Primer pGT1.8TM86r (10µM)	1µl	72°C	2min
Stammzellen DNA-Konz.268ng/µl	1µl	pro Cycle	5s mehr
Mix 2			
Aqua dest.	19µl	Cycles	40
10x PCR-Puffer	5µl	72°C	7min
Expand 20kb ^{plus} PCR-Enzym	1µl	4°C	∞

Tabelle 18: PCR-Protokoll für die Primerkombination MDNA F2-pGT1.8TM86r oder MDNA F3-pGT1.8TM86r

Die erhaltenen Banden wurden durch Ausschneiden aus dem Gel isoliert und die DNA mit dem „Gel Extraction Kit“ extrahiert. Nach dem Trocknen der DNA mittels Vakuum wurde diese mit dem Primer pGT1.8TM 86r sequenziert.

4.4.4 Vasektomie

Die männlichen, ca. vier Wochen alten Mäuse wurden mit einer Ketanest/Rompun-Narkose intraperitoneal betäubt. Der anästhesierten Maus wurde die Haut des unteren Abdomens mit 70% Ethanol desinfiziert, anschließend die Haut und Bauchdecke durch einen transversalen Schnitt auf ca. 1,5 cm Länge eröffnet. Mit einer Pinzette konnte im Lendenbereich der linken Seite ein Hoden exponiert werden. Der Vas deferens wurde vorsichtig von Hoden und Fettgewebe getrennt und an zwei Stellen verodet. Anschließend konnten Hoden und Fettgewebe wieder in den Bauchraum zurückgeführt werden. Der Vorgang wurde auf der rechten Seite wiederholt. Zum Abschluss der Operation wurde die Bauchdecke mit einem sterilen Faden genäht und das Bauchfell mit zwei Wundclips geschlossen.

4.4.5 Superovulation

Als Spender für die Blastozysten wurden ca. fünf Wochen alte weibliche C57/B16-Mäuse vor der Verpaarung mit C57/B16-Mäusen zur Superovulation gebracht. Dazu wurden den Weibchen am ersten Tag 5U Schweine-Gonadotropin und am dritten Tag 5U humanes Gonadotropin intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Weibchen mit C57/B16-Männchen verpaart und am siebten Tag dieses Protokolls die Blastozysten gewonnen.

4.4.6 Pseudogravide Weibchen

Zur Induktion einer Pseudogravidität wurden 8-14 Wochen alte weibliche CD-1 Mäuse am vierten Tag dieses Protokolls mit vasktomierten Männchen verpaart. Die erfolgreiche Verpaarung der Weibchen wurde am Vorhandensein eines Vaginalpfropfes überprüft.

4.4.7 Stammzellinjektion

Die Spender-Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, dann wurde die Haut mit einem Schnitt in der Mittellinie eröffnet. Die Bauchhaut wurde ebenfalls eröffnet und Uterus und Ovidukte aus dem Bauchraum entnommen. Der Uterus wurde anschließend von den Ovidukten abgetrennt und mit einer stumpfen, sterilen Kanüle mit M2 Medium durchspült. Die Blastozysten wurden im Mikroskop detektiert und durch mehrmaliges Umsetzen in M2 Medium aufgereinigt. Zur Regeneration wurden die Blastozysten dann eine Stunde in M16 Medium bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert.

Währenddessen wurden die Stammzellen mit sterilem PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA behandelt, bis sich die Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst und vereinzelt hatten. Die Stammzellen wurden bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt, dann auf einen Objektträger pipettiert und die Blastozysten hinzugefügt. Diese Mischung wurde mit Mineral-Öl überschichtet, um eine Austrocknung der Zellen zu vermeiden. Die Stammzellen wurden mit einer vakuumregulierten Kanüle vorsichtig aufgezogen. Mit einer ebenfalls vakuumregulierten Ansaugnadel wurden die Blastozysten fixiert und jeweils 10-15 Stammzellen injiziert. Die so erhaltenen Blastozysten wurden anschließend einer pseudograviden CD-1 Maus implantiert. Dafür wurde die Maus mit einer Ketanest/Rompun-Narkose intraperitoneal betäubt. Im Bereich der Lendenregion wurde ein ca. 1cm langer Hautschnitt gesetzt, das Peritoneum eröffnet, und Ovar mitsamt Ovidukt und Uterushorn einer Seite wurden exponiert. Mit einer sterilen Kanüle wurde die proximale Wand des Uterus durchstoßen und die Blastozysten mit einer Pasteur Pipette intrauterin transferiert. Nach Verschluss des Peritoneums durch eine Naht, wurde die Haut durch zwei Wundclips verschlossen. Nach einer Dauer von 20 Tagen wurde die Geburt von chimären Mäusen erwartet.

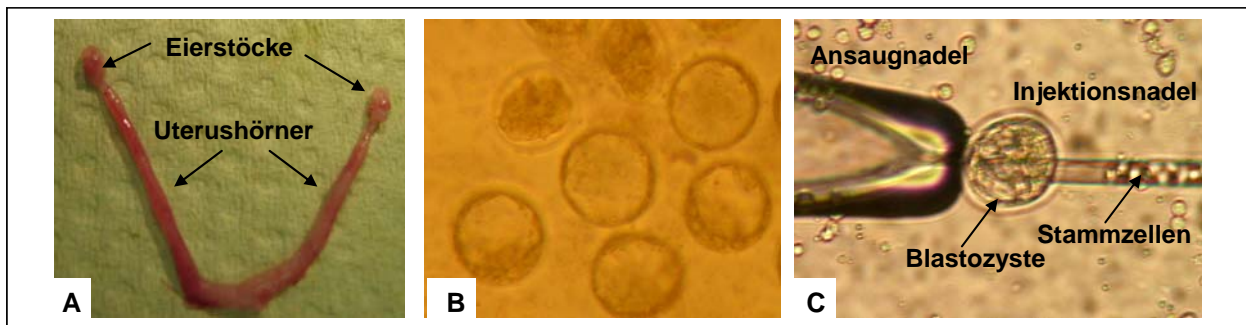


Abbildung 20: A, entnommener Uterus mit Eierstöcken. B, isolierte Blastozysten im Mikroskop. C, Injektion der Stammzellen in die Blastozystenhöhle

4.4.8 Zucht homozygoter Tiere

Im Alter von sechs Tagen konnte bei den Nachkommen der Blastozysteninjektion anhand der Fellfarbe bestimmt werden, ob es sich um chimäre Tiere handelte. Durch Verpaarung der fünf Wochen alten chimären Männchen mit C57/Bl6-Weibchen wurde die F1-Generation erhalten. Die Jungen konnten ebenfalls im Alter von ca. einer Woche auf die Fellfarbe hin untersucht werden. Von allen Tieren mit einer braunen Fellfarbe wurden Schwanzbiopsien gewonnen und mit Hilfe einer PCR der Genotyp bestimmt.

Jeweils zwei heterozygote Mäuse wurden miteinander verkreuzt, um homozygote Tiere zu generieren. Nachdem der Genotyp in der F2-Generation nicht mehr mit der Fellfarbe korreliert, wurden alle Tiere mittels Schwanzbiopsie und PCR genetisch untersucht.

Zur Etablierung einer Zucht mit einem stabilen genetischen Hintergrund, wurden heterozygote Tiere zunächst dreimal auf C57/Bl6 bzw. Balb/c zurückgekreuzt und erst anschließend untereinander verpaart.

4.4.9 PCR zur Genotypisierung der Knockout-Mäuse

Generell sollte die Genotypisierung mit drei Primern erfolgen, um parallel eine spezifische Wildtyp-Bande und eine Knockout-Bande detektieren zu können. Die Primer wurden deshalb so gewählt, dass der Forward-Primer vor dem Vektor lag, ein Reverse-Primer auf dem Vektor und ein Reverse-Primer nach dem Vektor.

Es wurde darauf geachtet, dass der Größenunterschied der zwei möglichen PCR-Produkte mindestens 400 Basenpaaren betrug, um die Banden gut voneinander unterscheiden zu können.

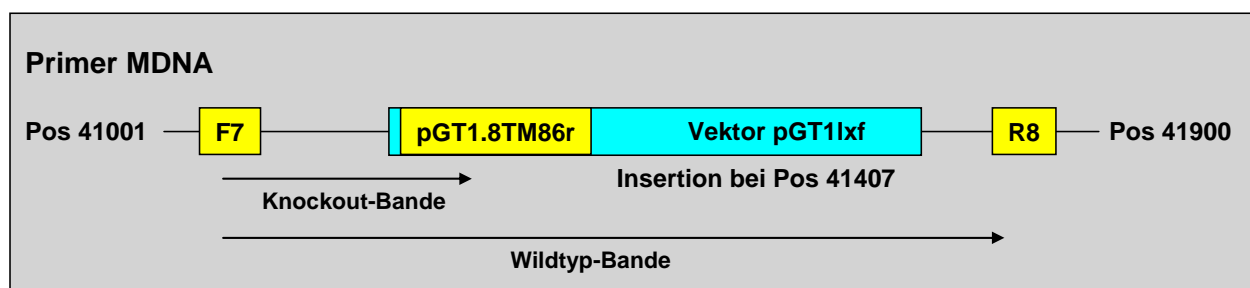


Abbildung 21: Schematische Darstellung der verwendeten Primer bei der Genotypisierung

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Forward-Primer MDNA F7

Pos.41115 (Genbank Nr. AC116511) 5` CCCTGCGTTTCCAGAGTCCT 3`

Reverse-Primer MDNA R8

Pos.41832 (Genbank Nr. AC116511) 5` GGTTTGATCCCCAACACCAC 3`

Reverse-Primer pGT1.8TM 86r

Vektor Pos.66 (Baygenomics) 5` CACTCCAACCTCCGCAAACCTC 3`

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	38,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	60,0°C	20s
Primer MDNA F7 (10µM)	1µl	72°C	120s
Primer MDNA R8 (10µM)	1µl		
Primer pGT1.8TM86r (10µM)	1µl	Cycles	34
Maus DNA-Konz. ca. 70ng/µl	2µl	72°C	7min
HotStar Taq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 19: PCR-Protokoll der Primerkombinationen zur Genotypisierung

Die Auswertung erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel mit Gelstar, die PCR-Produkte wurden mit je 5µl Ladepuffer vermischt und als Marker wurde der PeqGold Leiter verwendet.

Zur sicheren Identifizierung der erhaltenen zwei Banden wurden diese getrennt voneinander aus dem Gel geschnitten und die DNA mit Hilfe des „Gel Extraction Kits“ extrahiert. Für ein besseres Sequenzierergebnis wurden beide DNA-Stücke mit dem „TOPO TA Klonierungskit“ in den pCR4 TOPO-Vektor kloniert und durch Transformation in E. coli vermehrt. Unter Verwendung des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ wurde aus den E. coli Kolonien dann die Plasmid-DNA isoliert.

Die erhaltenen Lösungen wurden vakuumgetrocknet und zum Sequenzieren an MWG Biotech geschickt.

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden diese im Alter von ca. vier Wochen markiert, eine ca. 4mm lange Schwanzbiopsie genommen und die DNA entsprechend dem Protokoll des „DNeasy Tissue Kits“ isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA im UV-Meter bestimmt und 100-200ng DNA für die PCR eingesetzt.

4.5 Charakterisierung der Knockout-Maus

4.5.1 Nachweis des Knockouts auf DNA-Ebene

Die DNA aus der Leber von einem Wildtyp-Tier, einem heterozygoten Tier und einem homozygoten Tier wurde mit Hilfe des „DNA Tissue Kits“ gewonnen. Analog der Genotypisierung wurde eine PCR durchgeführt, allerdings wurden die beiden Primerkombinationen in zwei verschiedenen Reaktionen amplifiziert.

Für die Detektion der Vektorbande wurde folgendes Protokoll verwendet:

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	40,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	60,0°C	20s
Primer MDNA F7 (10µM)	1µl	72°C	120s
Primer pGT1.8TM86r (10µM)	1µl	Cycles	34
Maus DNA-Konz. ca. 200ng/µl	1µl	72°C	7min
HotStar Taq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 20: PCR-Protokoll für die Primerkombination MDNA F7-pGT1.8TM86r

Für die Detektion der Wildtyp-Bande wurde folgendes Protokoll verwendet:

	50µl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	40,5µl	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5µl	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1µl	60,0°C	20s
Primer MDNA F7 (10µM)	1µl	72°C	120s
Primer MDNA R8 (10µM)	1µl	Cycles	34
Maus DNA-Konz. ca. 200ng/µl	1µl	72°C	7min
HotStar Taq 5u/µl	0,5µl	4°C	∞

Tabelle 21: PCR-Protokoll für die Primerkombination MDNA F7-R8

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt und die Banden im UV-Licht detektiert.

4.5.2 Nachweis des Knockouts auf mRNA-Ebene

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Tiere auch tatsächlich keine MTUS1-mRNA-Expression aufweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde aus einem Wildtyp-Tier, einem heterozygoten Tier und einem homozygoten Tier das Herz entnommen. Kleine Stücke dieser Organe wurden sofort in RNALater überführt und anschließend mit dem „RNeasy Kit“ die mRNA isoliert. Nach dem Oligo dT Protokoll des „First Strand cDNA Synthesis Kits“ wurde dann die cDNA synthetisiert. Die Primer lagen in diesem Fall auf Exon 3 und 4, so dass bei den gewählten Bedingungen für die homozygoten Tieren keine Bande erwartet wurde, weil diese Tiere nach der Sequenz des Exons 3 die Exonsequenz des Insertionsvektors enthalten. Als Kontrolle für den Einsatz einheitlicher Mengen an cDNA wurde parallel dazu eine PCR mit β-Aktin-Primern durchgeführt.

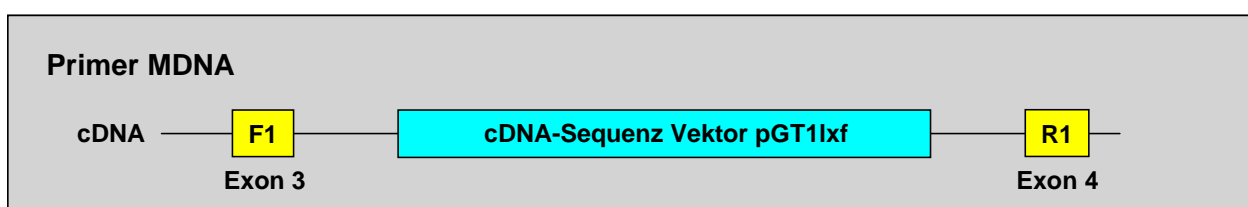


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Primerlage

Folgendes Protokoll wurde gewählt:

Forward-Primer MDNA E3 F1

Pos. 36562 (Genbank Nr. AC116511) 5' CTGAAGCAACACAAAACCCTCTCTC 3'

Reverse-Primer MDNA E4 R1

Pos.49900 (Genbank Nr. AC116511) 5' TGTCTGATGCTGCTGGTTAGTTTC 3'

bzw.

Forward-Primer β -Aktin F3

Pos.269 (Genbank Nr. BT019932) 5' TCTACAATGAGCTGCGTGTG 3'

Reverse-Primer β -Aktin R4

Pos.379 (Genbank Nr. BT019932) 5' TACATGGCTGGGGTGTGAA 3'

	50μl Ansatz	Temperatur	Zeitdauer
Aqua dest.	40,5 μ l	95°C	15min
10x PCR-Puffer	5 μ l	94°C	20s
10mM dNTP-Mischung	1 μ l	60,0°C	20s
Primer MDNA E3 F1 od. β-Aktin F3 (10μM)	1 μ l	72°C	120s
Primer MDNA E4 R1 od. β-Aktin R4 (10μM)	1 μ l	Cycles	40
cDNA aus Herz	1 μ l	72°C	7min
HotStarTaq 5u/μl	0,5 μ l	4°C	∞

Tabelle 22: PCR-Protokoll für den Nachweis des Knockouts auf mRNA-Ebene

4.5.3 Nachweis des Knockouts auf Protein-Ebene

Auf Protein-Ebene sollte MTUS1 ebenfalls nicht exprimiert werden. Für diesen Nachweis wurde aus einem Wildtyp-, einem hetero- und einem homozygoten Tier das Herz entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Kleine Fragmente dieser Organe wurden mit 500 μ l eiskaltem 1x MLB-Puffer versetzt und bei 4°C in einem Glashomogenisator zersetzt. Nach Zentrifugation der Suspension 10min bei 4°C und 12000rpm wurde mit dem Überstand eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Der restliche Überstand wurde im Verhältnis 2:1 mit 3xSDS-Ladepuffer mit 5%Mercaptoethanol gemischt und 5min bei 98°C gekocht. Für den Western-Blot wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel verwendet. Als Marker wurde der SeeBlue Plus2 Marker eingesetzt und jeweils 10 μ g Protein pro Spur geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer und das Blot in 1x Transferpuffer. Der fertige Blot konnte in einer Höhe von 98kDa geschnitten werden, wobei der obere Teil wurde mit dem β -Galaktosidase-Antikörper in einer Konzentration von 1:2000, der untere Teil mit dem MTUS1-Antikörper gleicher Konzentration inkubiert wurde. Beide Teile wurden mit Anti-Kaninchen-Zweitantikörper 1:2000 entwickelt. Die Auswertung erfolgte mit dem ECL Plus-System.

4.5.4 Expression der β -Galaktosidase in verschiedenen Mausorganen

Da die Knockout-Tiere anstatt des MTUS1-Proteins ein verändertes Konstrukt, bestehend aus einem N-terminalen MTUS1-Anteil und einer C-terminalen β -Galaktosidase-Domäne, exprimieren, kann durch den Nachweis der Galaktosidase mittels X-Gal-Färbung die üblicherweise vorliegende Gewebeexpression von MTUS1 *in vivo* untersucht werden. Jeweils zwei Wildtyp, zwei heterozygoten und zwei homozygoten Tieren wurden die Leber, Niere, Nebenniere, Lunge, Herz, Gehirn, Milz, Colon, Thymus und Muskeln entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von allen Geweben wurden Kryoschnitte hergestellt, die nach dem Auftauen 15min mit Fixierpuffer inkubiert wurden. Nach dem Waschen der Schnitte

wurden diese über Nacht mit Färbepuffer behandelt. Mit Waschpuffer wurden die Schnitte erneut gewaschen und eine Gegenfärbung mit „Nuklear Red“ durchgeführt. Anschließend konnten die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in Histofluid eingebettet werden.

4.5.5 Laboruntersuchung der Knockout-Mäuse

Zur Kontrolle der Laborwerte wurden zehn Wildtyp-, 20 heterozygote und 15 homozygote Tiere im Alter von ca. 1-3 Monaten narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurde das Herz punktiert. Das so gewonnene Blut wurde zum Teil in ein EDTA beschichtetes Röhrchen überführt, um daraus das Blutbild bestimmen zu lassen. Das restliche Blut wurde 5min bei 6000rpm abzentrifugiert und das Serum zur Analyse der chemischen Parameter herangezogen. Die Blase wurde zur Urinanalyse punktiert. Sämtliche Analysen wurden vom Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg durchgeführt.

4.6 Langzeitbeobachtung der Knockout-Mäuse

4.6.1 Gewichtsentwicklung der Knockout-Tiere

Sechs Wildtyp-Tiere und sechs gleichaltrige homozygote Tiere wurden jeweils im Alter von ca. vier Wochen und ca. zehn Monaten gewogen. Die Tiere wurden hierfür auf eine spezielle Waagschale gesetzt, aus der sie nicht heraus springen konnten. Das Gewicht wurde bei Stillstand des Tieres bestimmt.

4.6.2 Blutdruck der Knockout-Tiere

Von sechs Wildtyp-Tieren und sechs gleichaltrigen homozygoten Knockout-Tieren wurde im Alter von 9-10 Monaten der Blutdruck bestimmt. Dafür wurden die Tiere einzeln in speziellen Röhren fixiert. Nachdem die Tiere durch eine Wärmplatte auf 37°C erwärmt wurden, entspannten die Tiere langsam und die Gefäße dilatierten. Nur in diesem Zustand ist die Blutdruckmessung möglich und aussagekräftig. Mit einer Schwanzmanschette wurde bei den Tieren vollautomatisch der Blutdruck gemessen, wobei von jedem Tier fünf Werte ermittelt wurden. Die Mittelwerte dieser Messungen wurden als Grundlage dieses Vergleichs verwendet.

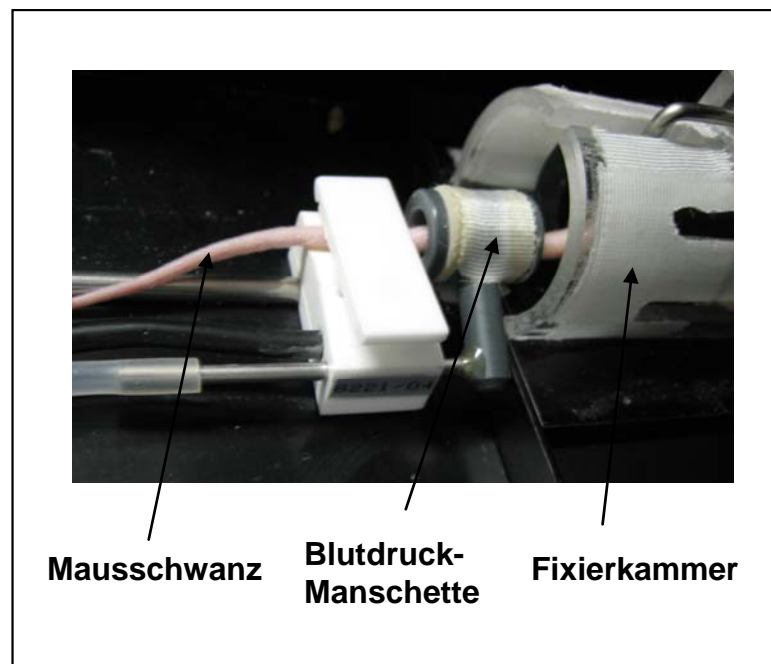


Abbildung 23: Foto der vollautomatischen Blutdruckmessung bei Mäusen

4.6.3 Beobachtung der Knockout-Tiere

Zur Beurteilung der Auswirkungen des MTUS1-Knockouts wurden drei Gruppen von Tieren über einen Zeitraum von 10-12 Monaten beobachtet. Für diesen Versuch wurden 35 homozygote Tiere, 18 heterozygote Tiere und zehn Wildtyp-Mäuse gezüchtet und in geeigneten Gruppengrößen im Tierstall gehalten. Dabei wurden die Tiere alle zwei Tage gründlich auf Auffälligkeiten hinsichtlich Verhalten, Fell, Augen, Schnauze und Zähne untersucht.

Tiere, die ein stumpfes Fell, Augenentzündungen oder Verhaltensauffälligkeiten wie Apathie aufwiesen, wurden durch zervikale Dislokation nach vorangegangener Narkose getötet. Anschließend wurde aus dem Herzen Blut entnommen, das zur Bestimmung des Blutbildes und der chemischen Parameter in das Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg gebracht wurde. Sämtliche Organe wurden auf makroskopische Veränderungen überprüft und das gesamte Tier danach in Formalin konserviert. Tiere, die keinerlei Auffälligkeiten bezüglich Verhalten oder Erscheinung zeigten, wurden im Alter von 10-12 Monaten durch zervikale Dislokation nach vorhergehender Narkose getötet. Auch von diesen Tieren wurden die chemischen Parameter und ein Differentialblutbild bestimmt. Makroskopisch auffällige Tiere wurden zur pathologischen Untersuchung an Herrn Dr. Laszlo Krenacs, Institute of Biotechnology, Pathology Diagnostics, Szeged in Ungarn geschickt, die restlichen Tiere wurden in Formalin konserviert.

4.7 Isolierung und Charakterisierung von Fibroblasten der Knockout-Mäuse

4.7.1 Isolierung und Kultivierung von Bauchhautfibroblasten

Drei Wildtyp- und drei homozygote Tiere gleichen Alters wurden getötet, die Bauchhaut entnommen und in steriles PBS überführt. Unter dem Laminar Flow wurde das Gewebe zweimal in frisches PBS überführt und mit einem sterilem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Die

Gewebestücke wurden 30min mit 2ml 10x Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 10ml FBM Kulturmedium aufgenommen und die Zellen auf eine 6-well-Platte ausgesät. Nach einer Woche wurde das Medium gewechselt, nach einer weiteren Woche konnten bereits kleine Fibroblastenkolonien beobachtet werden. Drei Wochen nach Isolierung wurden die Fibroblasten das erste Mal geteilt. Im Folgenden wurden die Zellen immer dann geteilt, wenn sie eine konfluente Zellschicht bildeten.

4.7.2 X-Gal-Färbung der Fibroblasten

In die Vertiefungen einer 6-well-Platte wurden sterile runde Deckgläschen gelegt. Die Fibroblasten aus Wildtyp- und homozygoten Tieren wurden dann in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/well ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen 15min mit Fixierpuffer behandelt, gewaschen und über Nacht mit Färbepuffer inkubiert. Mit Waschpuffer wurden die Zellen erneut gewaschen und eine Gegenfärbung mit „Nuklear Red“ durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, die Deckgläschen auf Objektträgern fixiert und die Zellen mit Histofluid eingebettet.

4.7.3 Größenbestimmung der Fibroblasten durch FACS-Messung

Um Größenunterschiede zwischen den Wildtyp- und den homozygoten Fibroblasten zu bestimmen, wurden die Fibroblasten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/well in eine 6-well-Platte ausgesät. Nach 48h wurden die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA abgelöst, abzentrifugiert und die Zellen in 2ml FBM Kulturmedium suspendiert. Die Größenbestimmung erfolgte durch eine FACS-Analyse. Dazu wurden 5000 Zellen ausgewertet und der Mittelwert berechnet.

4.7.4 Proliferation der Bauchhautfibroblasten

Für den Proliferationsnachweis wurden die Bauchhautfibroblasten in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro 6-well ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 500µl 1x Trypsin/EDTA-Lösung behandelt und die abgelösten Zellen in 2ml Wachstumsmedium aufgenommen. Für die Zellzählung wurde diese Suspension in einer Verdünnung von 1:200 mit isotonischer Kochsalzlösung eingesetzt und die Konzentration durch den Zellzähler Z2 gemessen.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Untersuchungen an MiaPaCa-2-Zellen

5.1.1 Sequenzanalyse der codierenden Sequenz

Die PCRs der einzelnen Exons ergaben scharfe und starke Banden, die ausgeschnitten und nach Aufreinigung erfolgreich sequenziert werden konnten. Die codierende Sequenz von MTUS1 ergab in Exon 2 eine Punktmutation an Position 22124 (GenBank Nr. AF165145), wobei das normalerweise vorhandene Nukleotid Adenosin durch Guanosin ersetzt wurde. Diese Punktmutation konnte durch eine Wiederholung der Sequenzierung mit einer neu isolierten MiaPaCa-2-DNA bestätigt werden. Die Punktmutation führt auf Proteinebene allerdings zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz, da sowohl das Triplet ACA, als auch das durch die Punktmutation resultierende Triplet ACG für die Aminosäure Threonin kodiert. Die komplette Sequenzierung der Exons 1 und 3-10 ergab keinen weiteren Mutationsnachweis.

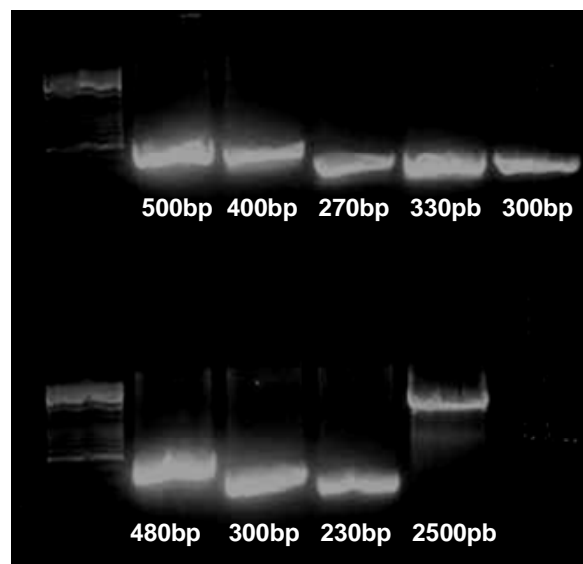


Abbildung 24: Auswertung der PCR der Exonsequenzen mit Angabe der ungefähren Größe der PCR-Produkte. Die obere Reihe zeigt die Banden für den Marker und die Exons 1-5. Die untere Reihe zeigt die Banden für den Marker, die Exons 6/7 und die Exons 8-10.

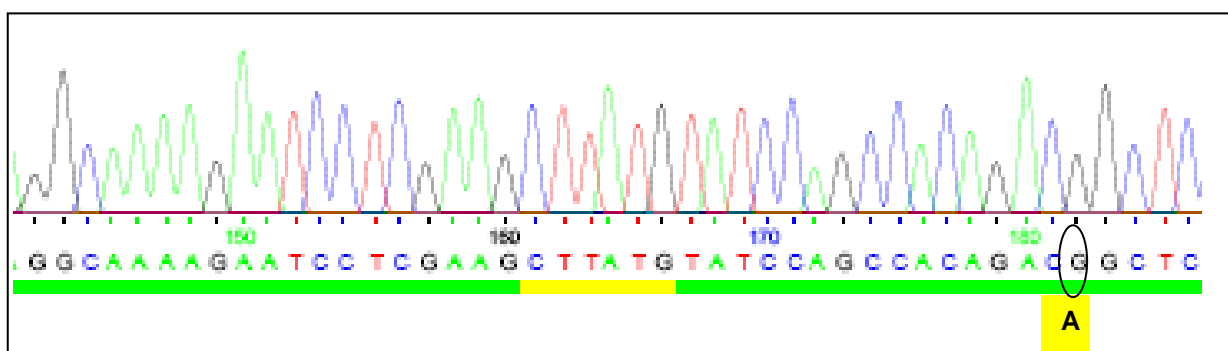


Abbildung 25: Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 2. Die Markierung zeigt die Punktmutation Adenosin zu Guanosin an Pos. 22124.

Da sich somit die verringerte MTUS1-Expression in MiaPaCa-2-Zellen nicht auf Mutationen der codierenden Sequenz zurückführen ließ, wurde im nächsten Schritt die Promotorregion von MTUS1 auf das Vorliegen von Mutationen untersucht.

5.1.2 Sequenzanalyse des Promotorbereichs

Die PCR des Promotorbereichs ergab eine gut sichtbare Bande, die ausgeschnitten, und nach Aufreinigung erfolgreich sequenziert werden konnte. Der Promotorbereich von MTUS1 zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz (Genbank Nr. AF165145).

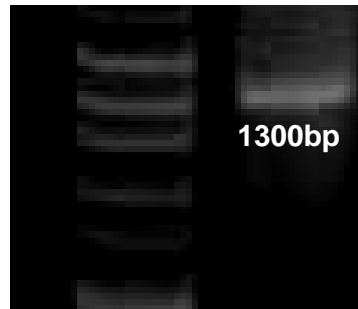


Abbildung 26: Auswertung der PCR des Promotorbereichs mit Angabe der ungefähren Größe des PCR-Produkts. Links die Banden des Markers, rechts die Bande des Promotorbereichs.

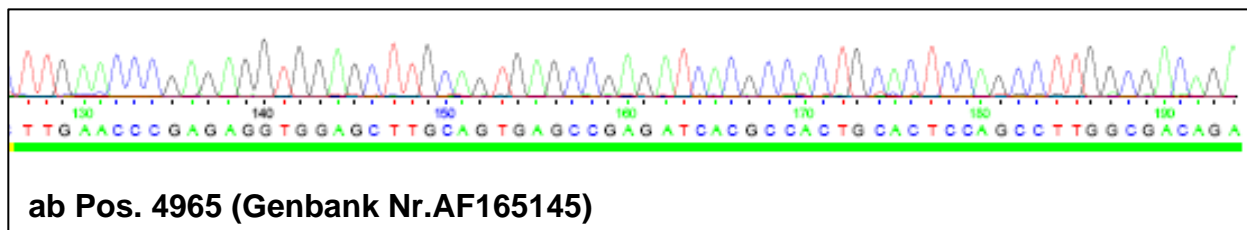


Abbildung 27: Ausschnitt aus der Sequenzierung des Promotorbereichs

Somit ergab auch die Sequenzierung des Promotorbereichs keine Erklärung für die verminderte Expression von MTUS1 in MiaPaCa-2-Tumorzellen. Daher wurde anschließend der Methylierungsgrad des Promotorbereichs untersucht, um zu klären, ob eine veränderte Methylierung für die nicht nachweisbare MTUS1-Expression verantwortlich sein könnte.

5.1.3 Analyse des Methylierungsgrades der Promotorregion

Durch die Sequenzierung der Bisulfit-behandelten DNA von HUVEC und MiaPaCa-2 konnte die Methylierung der untersuchten Promotorregion in beiden Zelllinien verglichen werden. Nicht methylierte Cytosin-Moleküle wurden dadurch erkannt, dass diese im Vergleich zur publizierten Sequenz durch die Bisulfit-Reaktion zu Thymin-Molekülen umgewandelt worden waren. Wurde bei der Sequenzanalyse der Zelllinien ein Cytosin gelesen, so musste es sich bei diesem Molekül um ein methyliertes Cytosin handeln. Als zusätzlicher Vergleich wurden die Sequenzen mit der Methylierung eines Colonnalgewebes verglichen.

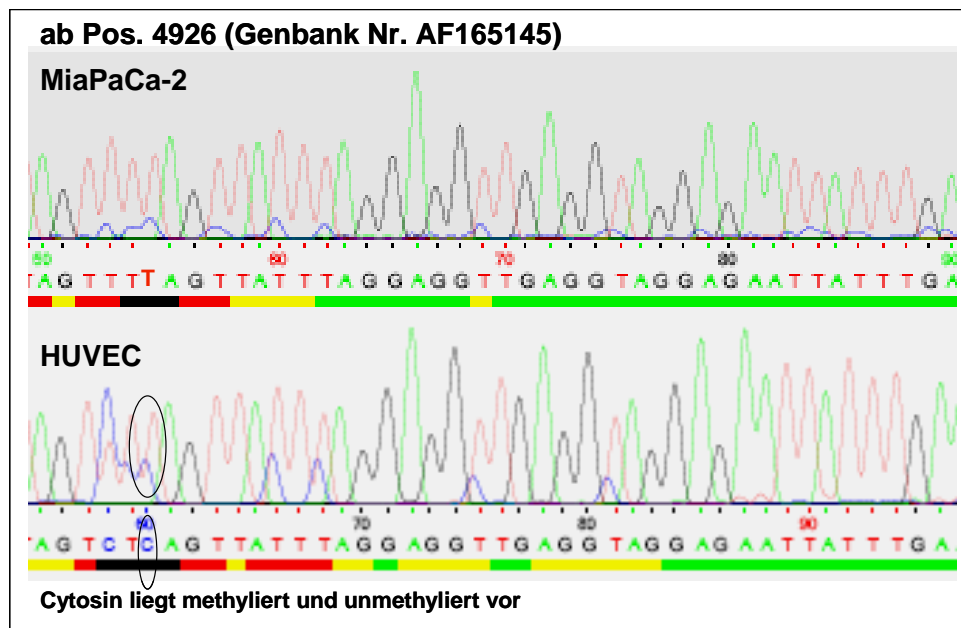


Abbildung 28: Ausschnitt aus der Sequenzierung von MiaPaCa-2- und HUVEC-Zellen. Die Markierung zeigt ein Cytosin, das zwei überlappende Sequenzierkurven erzielt und folglich methyliert und unmethyliert vorliegen kann.

Promotor-Sequenz gelesen ab Pos. 4881 bis Pos. 5070 (Genbank Nr. AF165145)

ctaaaaatacaaaaaaattagc	cag	gc	at	ggt	gg	cg	gc	ct	g	tag	tc	cag	ct	act	cag	gag	g	tg	agg	cag	gag	aa	Literatur
ttaaaaataaaaaaattagt	agg	cat	ggt	gg	cg	gc	ct	g	tag	ttt	ag	t	att	cag	gag	g	tg	agg	agg	gag	aa	MiaPaCa-2	
ctaaaaataaaaaaattagt	agg	cat	ggt	gg	cg	gc	ct	g	tag	ttt	ag	t	att	cag	gag	g	tg	agg	agg	gag	aa	HUVEC	
ctaaaaataaaaaaattagc	cag	gc	at	ggt	gg	cg	gc	ct	g	tag	tc	cag	ct	act	cag	gag	g	tg	agg	cag	gag	aa	CoTu20264N
tcacttgaac	ccg	ag	ag	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	Literatur
tcacttgaac	ccg	ag	ag	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	MiaPaCa-2	
tcacttgaac	ccg	ag	ag	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	HUVEC	
tcacttgaac	ccg	ag	ag	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	CoTu20264N	
ccg	t	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	Literatur
tcg	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	MiaPaCa-2
tcg	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	HUVEC
tcg	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	CoTu20264N

Abbildung 29: Übersicht der Methylierungsmuster. In der Literatur-Sequenz wurden die untersuchten Cytosin-Moleküle gekennzeichnet. In den untersuchten Sequenzen wurden die Cytosine wie folgt gekennzeichnet: blau für methyliert, rot für unmethyliert, grün für beide Methylierungsmöglichkeiten.

Zwischen der Position 4881 und 5070 (Genbank Nr. AF165145) wies die normale Sequenz 48 Cytosin-Moleküle auf. Von diesen Cytosinen lagen neun in einer CpG-Insel, weitere 14 Cytosine befanden sich in einer CpNpG-Insel, wobei N für jede der vier Basen stehen konnte. Für die Analyse der Methylierung wurden nur diese 23 Cytosin-Moleküle betrachtet, da die Cytosin-Moleküle außerhalb dieser Inseln normalerweise nicht methyliert werden können. Auch liegen zurzeit noch keine Erkenntnisse über die Funktion von Cytosinen außerhalb der Inseln vor. In den CpG-Inseln konnten keine Methylierungsunterschiede erkannt werden. Alle Cytosine lagen hier in der methylierten Form vor. In der MiaPaCa-2-Zelllinie waren alle 14 CpNpG-Inseln nicht methyliert, wohingegen die HUVEC-Zellen zehn nicht methylierte Cytosine, ein methyliertes Cytosin und drei unterschiedlich methylierte Cytosine aufwiesen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Tumorzelllinie MiaPaCa-2 eine leicht erhöhte Zahl an unmethylierten Cytosinen in den

CpNpG-Inseln besitzt. Im Vergleich zu einem Colonnormalgewebe, bei dem zehn Cytosin-Moleküle in den CpNpG-Inseln methyliert waren, war die Zahl der methylierten Moleküle in den MiaPaCa-2-Zellen noch deutlicher reduziert.

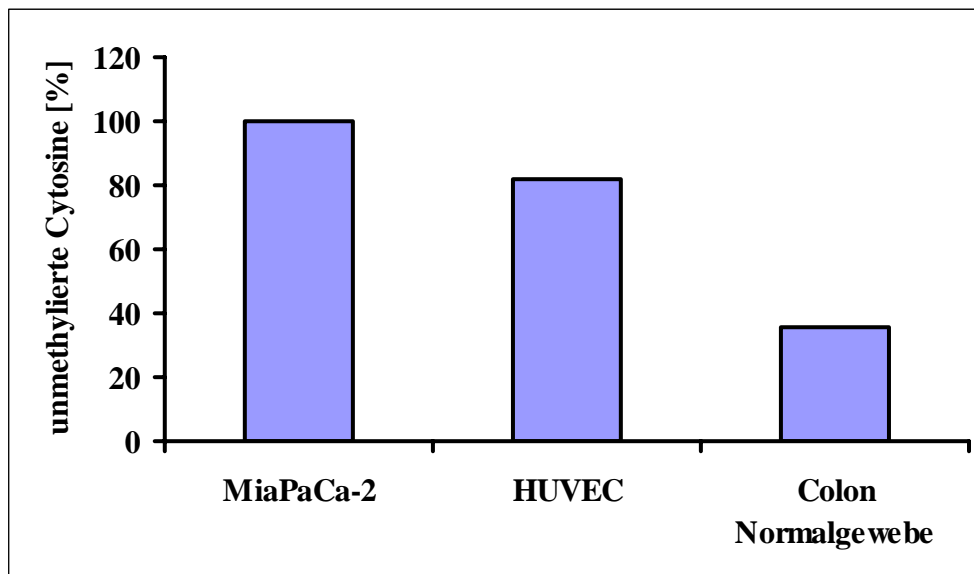


Abbildung 30: Prozentualer Gehalt an unmethylierten Cytosinen in den CpNpG-Inseln

5.1.4 Funktionelle Analyse des Promotorbereichs mittels Promotor-Assay

Nachdem gezeigt werden konnte, dass im vorhergesagten Promotorbereich des MTUS1-Gens Methylierungsunterschiede in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen bestehen, folgte nun der Bestätigung mittels Promotor-Assay, dass die untersuchte Promotorregion funktionell für die Transkription des MTUS1-Gens relevant ist.

Die korrekte Sequenz der Versuchsvektoren Luci F1-R2 und Luci F2-R2 konnte durch eine Sequenzierung sichergestellt werden, wobei das Insert Luci F1-R2 die Promotorsequenz enthielt, während diese im Insert Luci F2-R2 fehlte. Um die Werte der einzelnen Transfektionen miteinander vergleichen zu können, wurde das Ergebnis der Firefly-Lumineszenz durch den Wert der Renilla-Lumineszenz des gleichen wells geteilt. Der Mittelwert dieser Ratio aller vier wells einer Transfektionsreihe wurde mit den Mittelwerten anderer Versuchstage verglichen. Der Promotor-Assay wurde mit einer DNA-Konzentration von 0,5 μ g und 0,4 μ g pro well durchgeführt, wobei der Versuchsvektor und der Kontrollvektor im Verhältnis 1:1 transfiziert wurden.

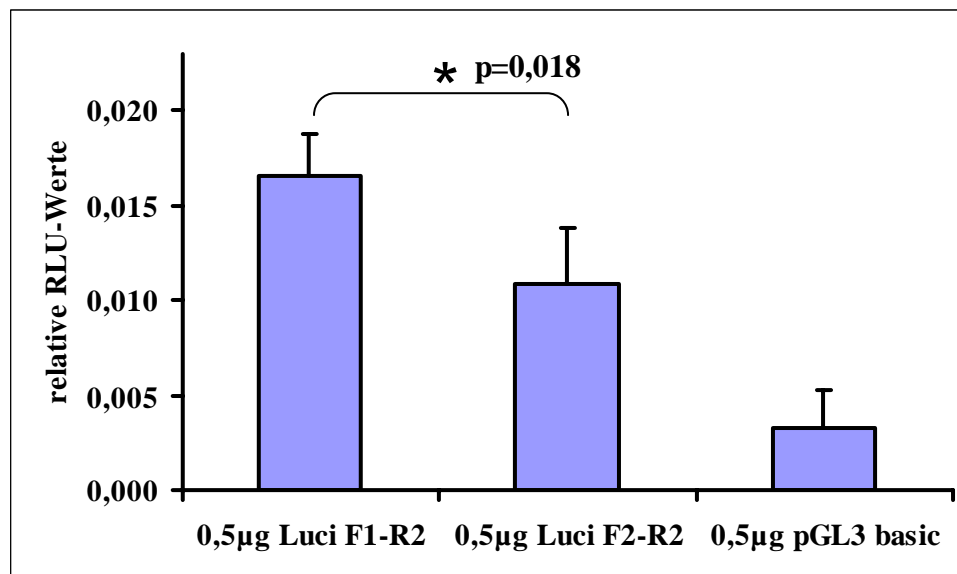


Abbildung 31: Ergebnis des Promotor-Assays mit 0,5µg eingesetzter DNA. Die Auswertung ergab eine signifikant erhöhte Promotoraktivität mit dem Konstrukt Luci F1-R2, das die vorhergesagte Promotorsequenz enthielt.

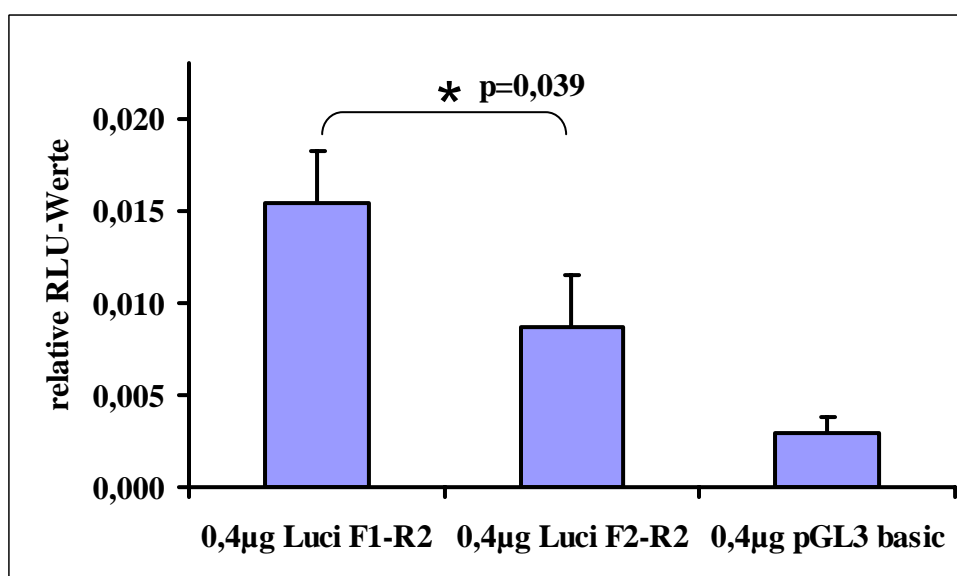


Abbildung 32: Ergebnis des Promotor-Assays mit 0,4µg eingesetzter DNA. Die Auswertung ergab eine signifikant erhöhte Promotoraktivität mit dem Konstrukt Luci F1-R2, das die vorhergesagte Promotorsequenz enthielt.

Die relativen Werte für das Insert Luci F1-R2 lagen mit 0,017 ($\pm 0,001$) und 0,015 ($\pm 0,002$) für alle zwei getesteten DNA-Konzentrationen signifikant höher als die Werte 0,011 ($\pm 0,002$) und 0,009 ($\pm 0,002$) des Inserts Luci F2-R2. Nachdem das Konstrukt Luci F1-R2 die vorhergesagte Promotorsequenz enthielt, lässt dieses Ergebnis auf eine erhöhte Transkriptionsrate bedingt durch die Promotorsequenz schließen. Der durchgeführte Promotor-Assay belegt somit die funktionelle Aktivität des vorhergesagten Promotorbereichs.

5.2 Ergebnisse der Untersuchungen an siRNA-transfizierten HUVEC-Zellen

5.2.1 Western-Blot-Analyse

Zunächst wurde nachgewiesen, dass die MTUS1-siRNA tatsächlich die MTUS1-Protein-Expression vermindern konnte. Der dafür durchgeführte Western-Blot wurde zum einen mit einem β -Aktin-Antikörper entwickelt, zum anderen mit MTUS1. Nachdem der Western-Blot in allen Bahnen eine gleich dicke β -Aktin-Bande aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass in allen Bahnen gleichviel Protein geladen worden war.

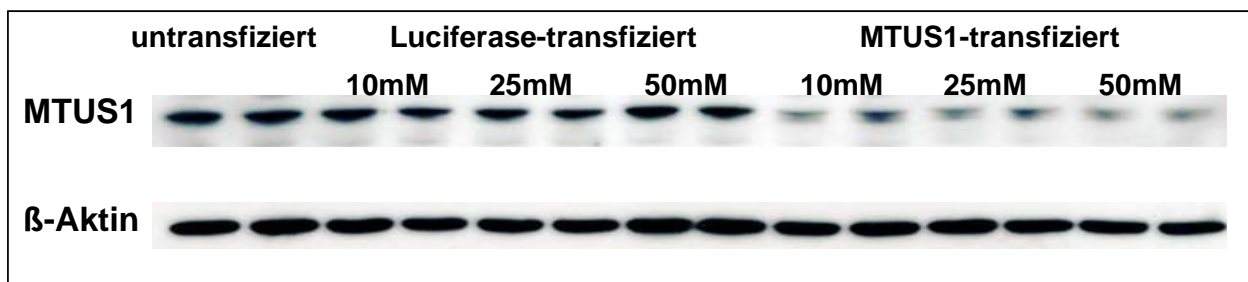


Abbildung 33: Auswertung der Western-Blot-Analyse. Die mit MTUS1-siRNA-transfizierten Zellen wiesen eine deutliche Reduktion der MTUS1-Protein-Expression auf.

Die Banden der untransfizierten Zellen und die Banden der Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen unterschieden sich in ihrer Stärke fast nicht. Die Banden der MTUS1-siRNA-transfizierten Zellen wiesen hingegen eine deutlich schwächere Intensität auf. Bei der densitometrischen Quantifizierung mit dem Quantity One-Programm ergab sich ein signifikanter Abfall der MTUS1-Protein-Expression von mehr als 50% in allen Konzentrationen der MTUS1-transfizierten Zellen gegenüber den Luciferase-transfizierten Zellen.

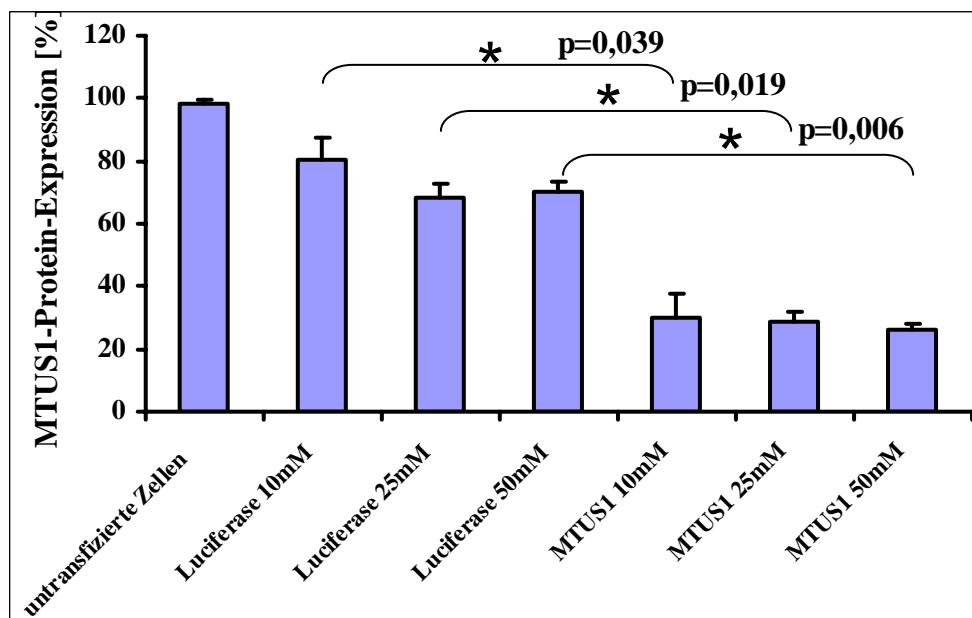


Abbildung 34: Die Transfektion mit MTUS1-siRNA konnte in allen drei verwendeten Konzentrationen die MTUS1-Expression signifikant reduzieren.

5.2.2 Proliferationsassay

Da alle verwendeten siRNA-Konzentrationen im Western-Blot eine verminderte MTUS1-Expression zur Folge hatten, wurde für den Proliferationsassay die mittlere Konzentration von 25nM gewählt. Die Zellen wurden analog dem Western-Blot-Versuch transfiziert und untransfizierte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Die absoluten Konzentrationen, die im Zellzähler bestimmt worden waren, wurden prozentual umgerechnet. Als Bezugsgröße dienten dabei die Luciferase-transfizierten Zellen, die einem Wert von 100% gleichgesetzt wurden. Die MTUS1-transfizierten Zellen zeigten gegenüber den Luciferase-transfizierten Zellen eine signifikant erhöhte Proliferation um 13 % ($\pm 4,5$).

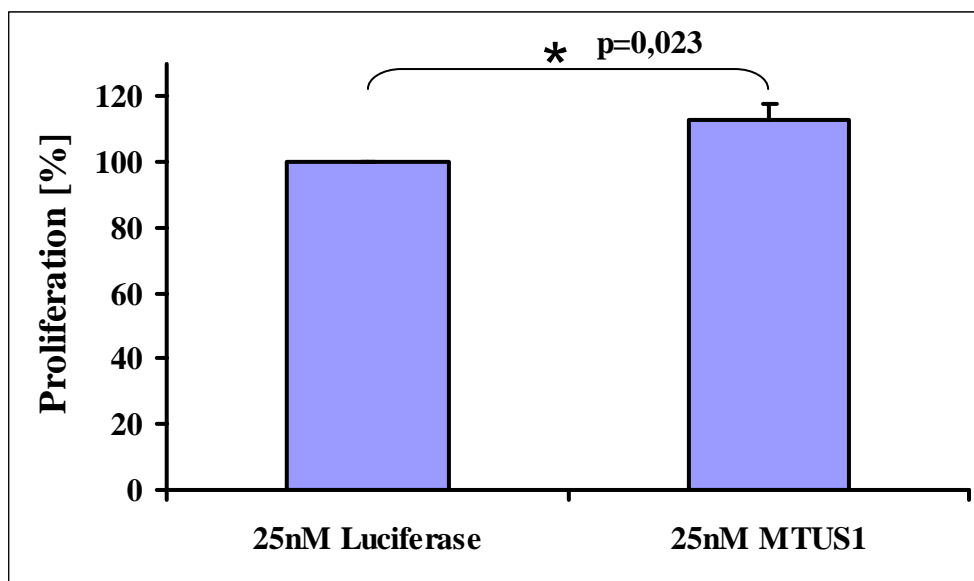


Abbildung 35: MTUS1-siRNA-transfizierte Zellen wiesen ein signifikant schnelleres Wachstum auf als Luciferase-transfizierte Zellen.

5.3 Ergebnisse der Untersuchungen an humanen Colongeweben

5.3.1 Analyse der MTUS1-Protein-Expression

Nachdem die Ergebnisse der Zellversuche nahe legten, dass MTUS1 eine Rolle in der Tumorentstehung oder der Tumorprogression spielen könnte, wurden weitere Versuche an Colongeweben von zehn Tumorpatienten durchgeführt. Von allen Patienten wurde das Tumorgewebe (T) untersucht, sowie zur Kontrolle das jeweilige umgebende Normalgewebe (N). Von den erhaltenen Western Blots wurde eine densitometrische Auswertung der MTUS1-Bande und der β -Aktin-Bande vorgenommen und die Ergebnisse auf die β -Aktin-Bande standardisiert. Um die so erhaltenen Absolutwerte übersichtlich darstellen zu können, wurden die Werte der Normalgewebe mit 100% gleichgesetzt und die Werte der dazugehörigen Tumorgewebe dazu in Korrelation gebracht.

Zwei der Patienten, Patient 29903N/29898T und Patient 26536N/26540T, wiesen im Tumorgewebe eine geringfügig erhöhte MTUS1-Protein-Expression auf. Die Patienten 29478N/29469T, 28738N/28744T und 26319N/26323T zeigten eine um ca. 15% reduzierte MTUS1-Expression in den Tumorgeweben im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe. Die

Untersuchung der restlichen fünf Patienten ergab eine deutlich verminderte Expression von MTUS1 von 35-75%.

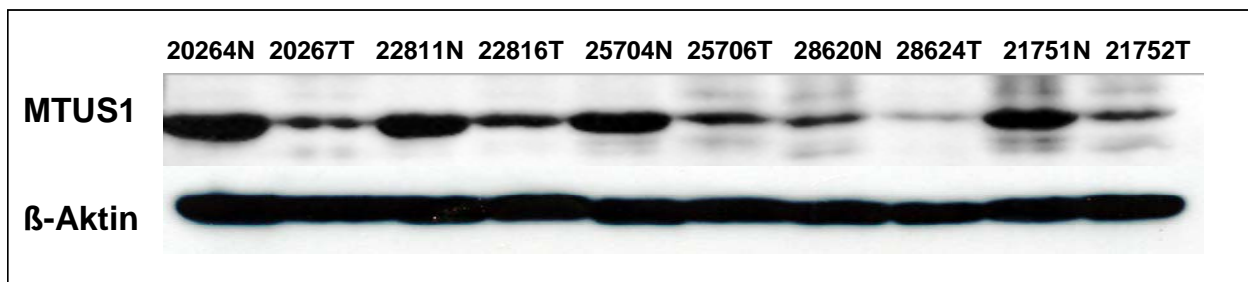


Abbildung 36: Western-Blot der fünf Patienten, die im Tumorgewebe eine Reduktion der MTUS1-Expression von 35-75% aufwiesen. Für jeden Patienten wurden Banden für die Expression des Normalgewebes (N) und des Tumorgewebes (T) detektiert.

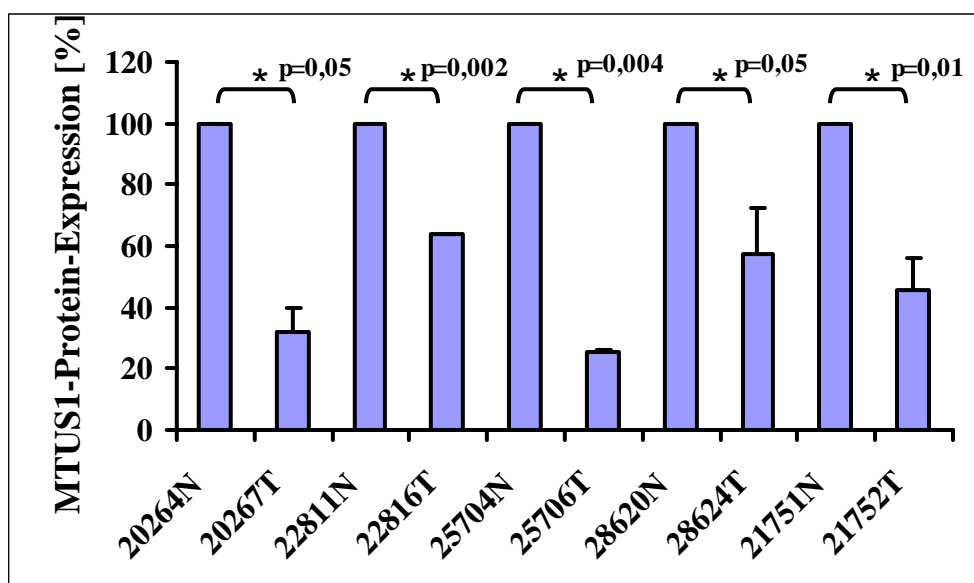


Abbildung 37: Auswertung der Western Blot Analyse der fünf Patienten mit signifikant reduzierter MTUS1-Expression im Tumorgewebe (T) gegenüber Normalgewebe (N).

Nachdem diese fünf Patienten eine so hohe Abweichung zeigten, wurde der nächste Versuch nur mit diesen Geweben durchgeführt. Ob die erniedrigte Proteinexpression durch eine verminderte Transkription oder durch einen erhöhten Proteinabbau bedingt wurde, sollte durch die Analyse der mRNA-Expression geklärt werden.

5.3.2 Analyse der MTUS1-mRNA-Expression

Zur Analyse der mRNA-Expression wurde zunächst die mRNA aus den Normalgeweben und den Tumorgeweben der fünf Patienten isoliert. Die PCR-Analyse konnte anschließend mit der daraus synthetisierten cDNA durchgeführt werden. Die spezifischen PCRs für β -Aktin- und die MTUS1-Bande wurden in einer Reaktion amplifiziert, so dass die Versuchsbedingungen für beide Amplifikationen absolut identisch waren. Die Banden wurden densitometrisch vermessen und die Werte der MTUS1-Bande auf die β -Aktin-Bande normalisiert. Die Werte der Normalgewebe wurden mit 100% gleichgesetzt und die Werte der Tumorgewebe prozentual umgerechnet.

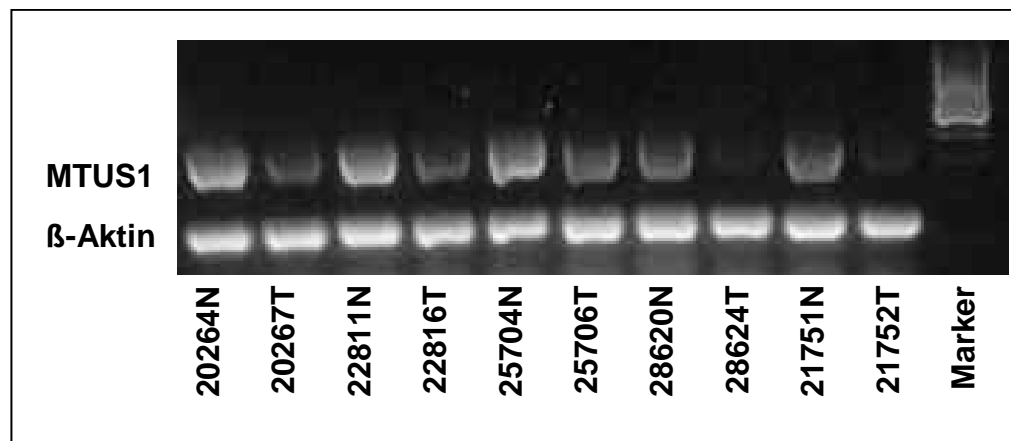


Abbildung 38: Auswertung der PCR-Analyse. Alle Tumorgewebe (T) wiesen eine deutlich dünnere MTUS1-Bande auf als das Normalgewebe (N).

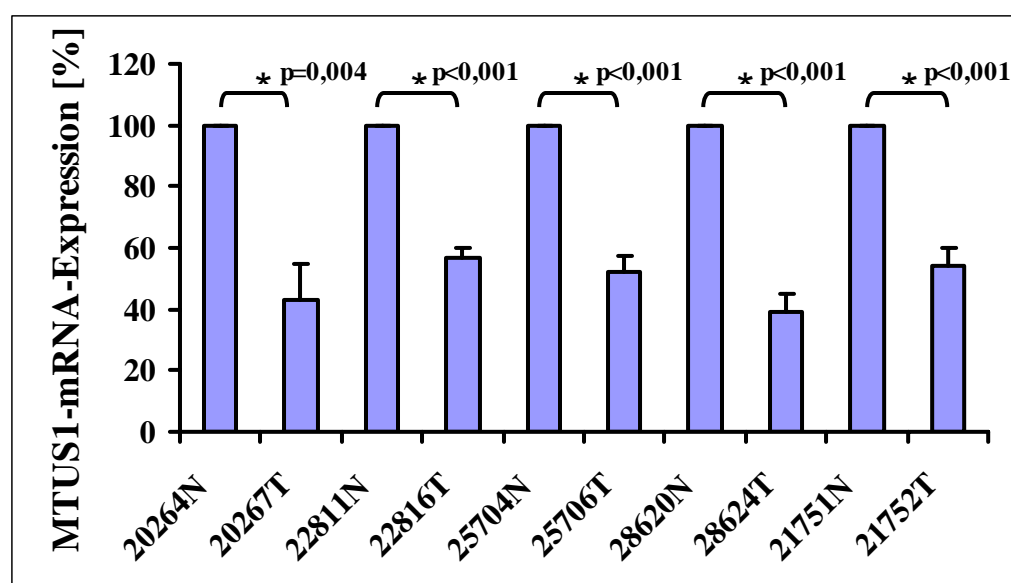


Abbildung 39: Auswertung der Analyse der MTUS-mRNA-Expression. Alle Patienten zeigten eine signifikant reduzierte Expression in den Tumorgeweben (T) im Vergleich zu den Normalgeweben (N).

Bei allen untersuchten Patienten konnte nach der verminderten MTUS1-Protein-Expression auch eine signifikant reduzierte MTUS1-mRNA-Expression festgestellt werden. Alle mRNA-Expressionen in den Tumorgeweben waren zwischen 40% und 60% erniedrigt im Vergleich zu den jeweiligen Normalgeweben.

5.3.3 Sequenzanalyse der codierenden Sequenz

Um der Frage nachzugehen, warum in den Zellen dieser fünf Colontumoren weniger MTUS1-mRNA exprimiert wurde, wurde die codierende Sequenz des MTUS1-Gens auf mögliche Mutationen untersucht. Dazu wurde das PCR-Produkt hMTUS1 F31-hMTUS1 R31 mit den angegebenen Primern stückweise sequenziert. In Analogie zu den Ergebnissen der Tumorzelllinie MiaPaCa-2 waren in der gesamten Sequenz keine Mutationen detektierbar, die sich auf die Proteinsequenz auswirken könnten.

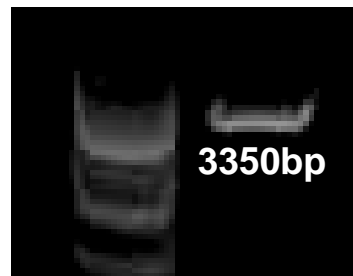


Abbildung 40: Auswertung der PCR für die MTUS1-cDNA-Amplifizierung mit Angabe der ungefähren Größe des PCR-Produkts. Links die Banden des Markers, rechts die Bande für die cDNA.

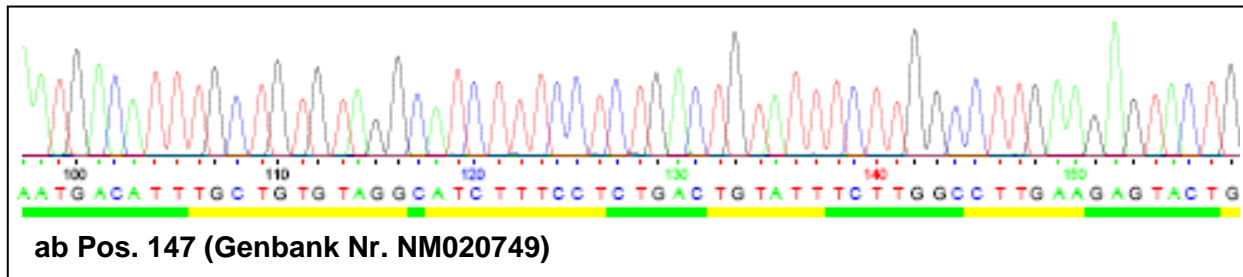


Abbildung 41: Ausschnitt aus dem Sequenzierergebnis der Promotorregion. Es wurden keine Mutationen detektiert.

5.3.4 Sequenzanalyse des Promotorbereichs

Da sich somit die verringerte MTUS1-Expression in den Colontumoren nicht auf Mutationen der codierenden Sequenz zurückführen ließ, wurde im nächsten Schritt die Promotorregion von MTUS1 auf das Vorliegen von Mutationen untersucht. Die Analyse der Sequenzierergebnisse mit dem Blast-N-Programm der NCBI-Homepage zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der publizierten MTUS1-Sequenz (Genbank Nr. AF165145), so dass sich hieraus keine Erklärung für die verminderte MTUS1-Expression in den Tumorgewebe ergab.

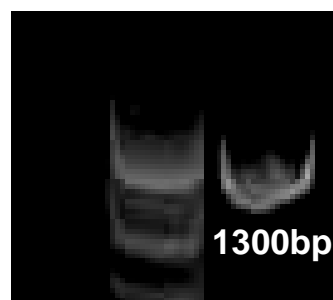


Abbildung 42: Auswertung der PCR für den Promotorabschnitt mit Angabe der ungefähren Größe des PCR-Produkts. Links die Banden für den Marker, rechts die Bande für den Promotorbereich.

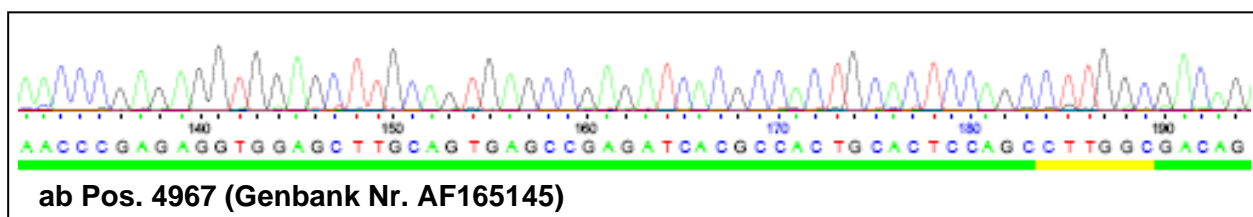


Abbildung 43: Ausschnitt aus dem Sequenzierergebnis der Promotorregion. Es wurden keine Mutationen festgestellt.

In den Colontumoren lag nach diesen Ergebnissen weder eine Mutation in der codierenden Sequenz noch in der Promotorregion vor, die eine verminderte Expression des MTUS1-Proteins zur Folge hätte. Daher wurde der Methylierungsgrad des vorhergesagten Promotors untersucht, um die Möglichkeit einer Inaktivierung des MTUS1-Gens aufgrund einer veränderten Methylierung zu klären.

5.3.5 Analyse des Methylierungsgrades der Promotorregion

Zur Analyse der Bisulfit-behandelten DNA wurden die Methylierungsgrade der Tumorgewebe mit denen der jeweiligen Normalgewebe verglichen. Dabei wurden nur die Cytosin-Moleküle in CpG-Inseln und in CpNpG-Inseln miteinander verglichen, da für Cytosin-Moleküle außerhalb solcher Inseln noch keine Funktion beschrieben ist. Vier Patienten wiesen in den untersuchten CpNpG-Inseln in den Tumorgeweben zum Teil deutlich mehr unmethylierte Cytosin-Moleküle auf als die dazu passenden Normalgewebe. Das Gewebepaar 29903N/29898T des fünften Patienten zeigte dagegen eine höhere Methylierung im Tumorgewebe. Bei vier untersuchten Patienten waren keine Methylierungsunterschiede in den CpG-Inseln zu finden. Der fünfte Patient zeigte in den Geweben 25704N/25706T einen Unterschied der CpG-Methylierung. Hier war im Tumorgewebe eines der sieben Cytosine nicht methyliert. Auffallend war außerdem, dass bestimmte Cytosin-Moleküle in allen Geweben einen gleichen Zustand aufwiesen, während andere Cytosin-Moleküle bevorzugt für die verschiedene Methylierung der Gewebe verantwortlich waren.

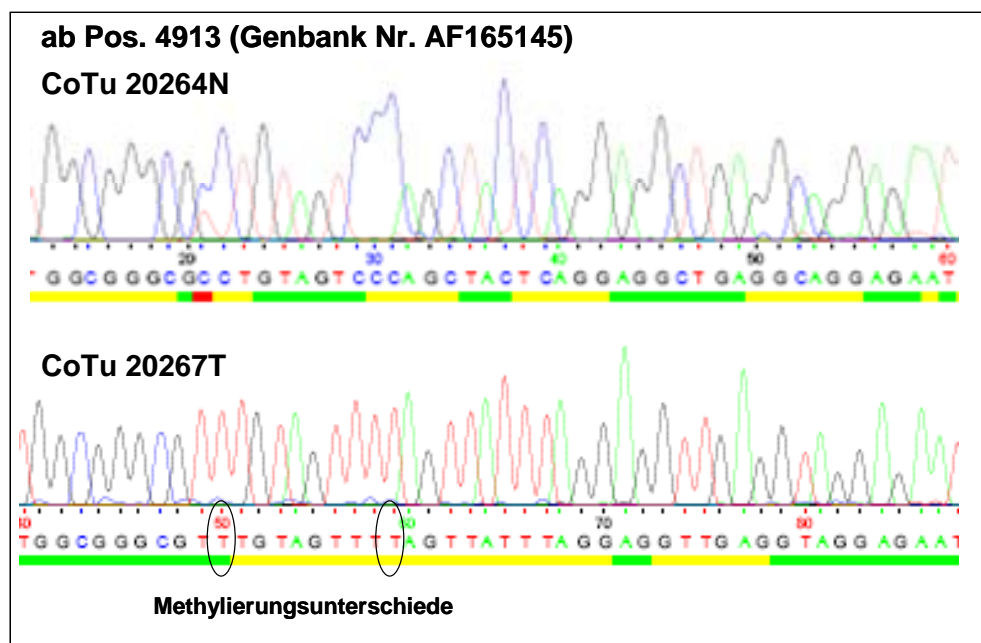


Abbildung 44: Ausschnitt aus der Sequenzierung des Normalgewebes CoTu20264N und des Tumorgewebes CoTu20267T. Die Kreise markieren Methylierungsunterschiede.

Promotor-Sequenz gelesen ab Pos. 4882 bis Pos.5070 (Genbank Nr. AF165145)

taaaaatatacaaaaaaaattagccaggcatggtggcgggcgcctgtagtc	ccagctactcaggaggctgaggcaggagaa	Literatur
taaaaatatacaaaaaaaattagccaggcatggtggcgggcgcctgtagtc	ccagctactcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 20264N
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 20267T
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 22811N
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 22816T
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 25704N
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 25706T
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 29478N
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 29469T
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 29903N
taaaaatatacaaaaaaaattagttaggcatggtggcgggcgcctgtagttt	agttattcaggaggctgaggcaggagaa	CoTu 29898T

tcacttgaacccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	Literatur
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 20264N
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 20267T
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 22811N
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 22816T
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 25704N
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 25706T
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 29478N
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 29469T
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 29903N
ttatttgaatccgagaggtggagcttg	cagtgagccgagatcacgccactgcactccagccttggcgacagaccgaggtt	CoTu 29898T

ccgtctcaaaaaaaatttctaccgatgaac	Literatur
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaac	CoTu 20264N
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 20267T
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 22811N
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 22816T
ccgtcttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 25704N
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 25706T
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 29478N
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 29469T
ccgttttaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 29903N
ccgtctcaaaaaaaatttctaccgatgaat	CoTu 29898T

Abbildung 45: Übersicht der Methylierungsmuster. In der Literatur-Sequenz wurden die untersuchten Cytosin-Moleküle gekennzeichnet. In den untersuchten Sequenzen wurden die Cytosine wie folgt gekennzeichnet: blau für methyliert, rot für unmethyliert, grün für beide Methylierungsmöglichkeiten.

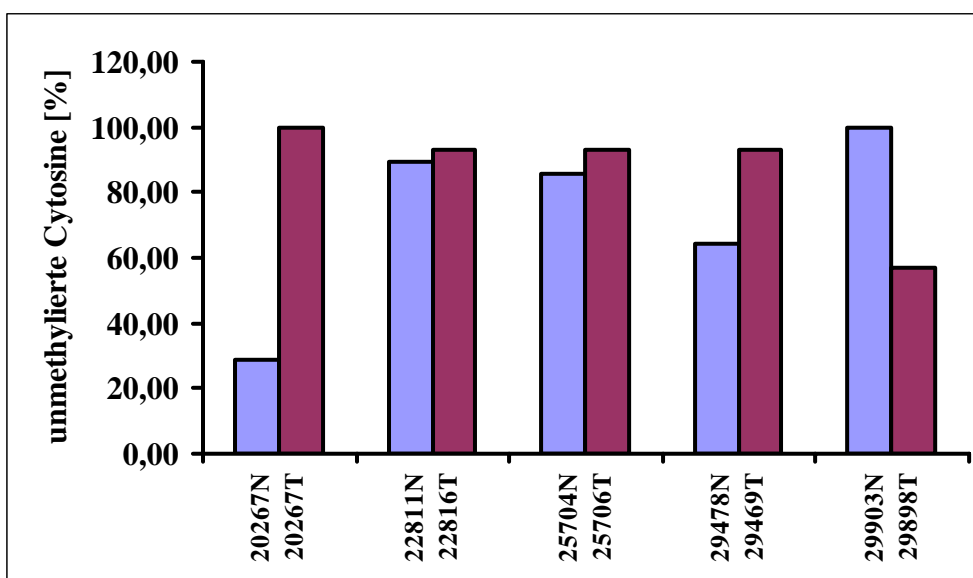


Abbildung 46: Prozentualer Gehalt an unmethylierten Cytosinen in den CpNpG-Inseln von Tumorgewebe (T) und Normalgewebe (N).

5.4 Ergebnisse der Etablierung der Knockout-Maus

5.4.1 Kultivierung der Stammzellen und Mycoplasmentest

Für die erfolgreiche Generierung von Knockout-Mäusen sind unterschiedliche Faktoren besonders ausschlaggebend. Ein bedeutender Faktor ist die verwendete Stammzelllinie und deren sorgsame Kultivierung. Die Stammzellkolonien wachsen am besten auf einer Zellschicht aus Fibroblasten, an die sie sich gut anheften können. Werden die Zellen zu dicht ausgesät oder nicht ausreichend gefüttert, können Stammzellen schnell ausdifferenzieren. Auch bei einer erfolgreichen Blastozysteninjektion können sich die differenzierten Stammzellen dann nicht mehr in die Keimbahn integrieren und es werden keine chimären Tiere erhalten.

Die Kultivierung der Stammzellen erfolgte daher in Gelatine-gecoateten Flaschen, auf die zunächst Fibroblasten ausgesät wurden, die sich sehr schnell an die Oberfläche anlagerten. Die Stammzellen hefteten sich hingegen erst nach einigen Stunden auf die bereits angewachsenen Fibroblasten an. Durch das Teilen der Zellen in Abständen von zwei Tagen und dem täglichen Wechseln des Mediums, wiesen die Zellen auch nach 15 Passagen noch vorwiegend undifferenzierte Kolonien auf.

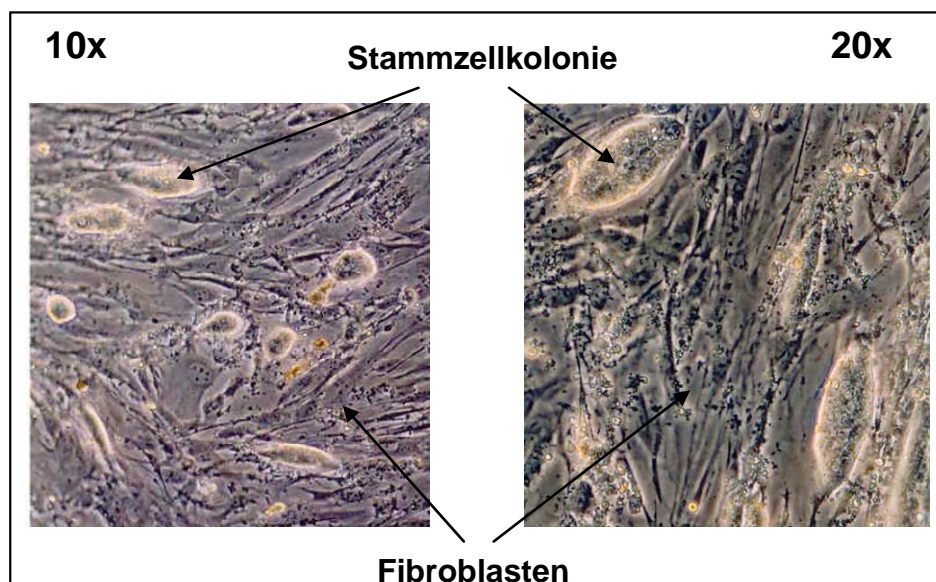


Abbildung 47: Fotos von undifferenzierten Stammzellkolonien auf einer Fibroblastenschicht

Ein weiterer wichtiger Faktor für das Gelingen einer Blastozysteninjektion sind unkontaminierte Stammzellen, da die Blastozyste oder das pseudogravide Weibchen sonst infiziert werden könnten. Ein gängiger Nachweis von Keimfreiheit in der Zellkultur ist der Test auf Mycoplasmen mittels PCR. Zur Sicherheit wurde dieser Test alle acht Wochen durchgeführt, wobei die verwendeten Stammzellen immer ein negatives Ergebnis erzielten.

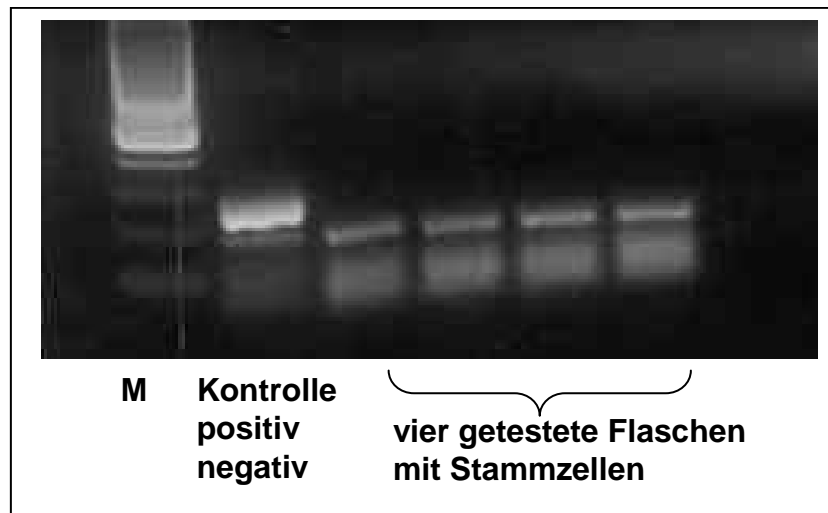


Abbildung 48: Beispielfoto der Auswertung eines Mycoplasmen-Tests. Die obere Bande der Kontrolle entspricht einem positiven, die untere einem negativen Ergebnis. Alle getesteten Zellen wiesen ein negatives Ergebnis auf.

5.4.2 Identifizierung der Vektorlage

Der Knockout von MTUS1 wurde in den Stammzellen durch eine Insertion eines Vektorgens erreicht. Dabei war nur bekannt, dass die Insertion im Intronbereich zwischen Exon 3 und 4 erfolgte, die genaue Lage innerhalb dieses 13,5kb großen Intronbereichs war allerdings nicht bekannt.

Die PCR mit den Forward-Primern MDNA F1 und MDNA F4 und jeweils dem auf dem Vektor liegenden Reverse-Primer pGT1.8TM 86r ergab nur eine Bande mit dem MDNA F1 Primer.

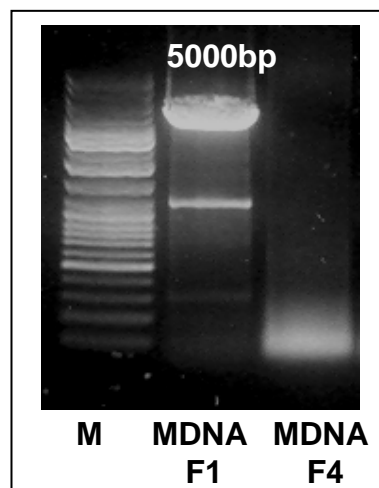


Abbildung 49: Auswertung der Suche der Vektorlage mit Angabe der ungefähren Größe des PCR-Produkts. Nur die Primerkombination F1-pGT1.8TM86r ergab eine Bande, M bedeutet Marker.

Der Vektor musste folglich vor dem Primer MDNA F4 liegen. Eine genauere Eingrenzung war mit der nächsten PCR möglich. Hier wurden die Forward-Primer MDNA F2 und MDNA F3 eingesetzt, die zwischen den Primern MDNA F1 und MDNA F4 lagen. Zur Kontrolle wurde das PCR-Produkt von MDNA F1 und pGT1.8TM86r auf das Gel geladen.

Die Primerkombination F2-pGT1.8TM86r ergab eine deutliche Bande im Bereich von ca. 2500 Basenpaaren. Die Primerkombination F3-pGT1.8TM86r hingegen zeigte keine Bande. Die Bande MDNA F1-Vektor befand sich etwa im Bereich von 5000 Basenpaaren, das ließ darauf schließen, dass der Vektor ca. 5000 Basenpaare vom Primer MDNA F1 entfernt lag. Die Bande MDNA F2-Vektor zeigte, dass der Vektor ca. 2500 Basenpaare von MDNA F2 entfernt lag. Nachdem aber mit dem Primer MDNA F3 keine Bande erhalten wurde, musste der Vektor noch vor dem Primer MDNA F3 liegen.

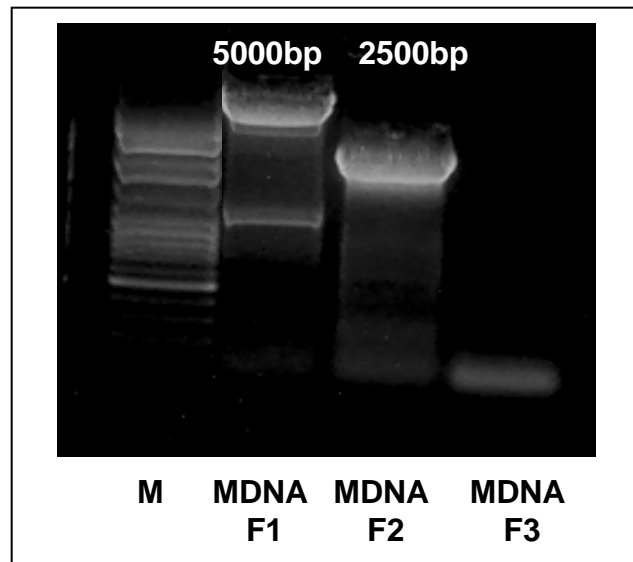


Abbildung 50: Auswertung der Suche der Vektorlage mit Angabe der ungefähren Größe der PCR-Produkte. Nur die Primerkombinationen F1 und F3-pGT1.8TM86r ergaben eine Bande, M bedeutet Marker.

Die Klonierung der Bande MDNA F2-pGT1.8TM86r mit dem „TOPO TA Kit“ und die Sequenzierung mit dem Reverse-Primer bestätigten diese Vermutungen. Durch die Analyse der Sequenz und den Abgleich mit der publizierten Sequenz von MTUS1 (Genbank Nr. AF165145) und dem Vektor pGT1Lxf (Baygenomics) konnte die genaue Lage des Vektors bestimmt werden. Demnach wurde der Vektor an Position 41407 in die DNA eingefügt.

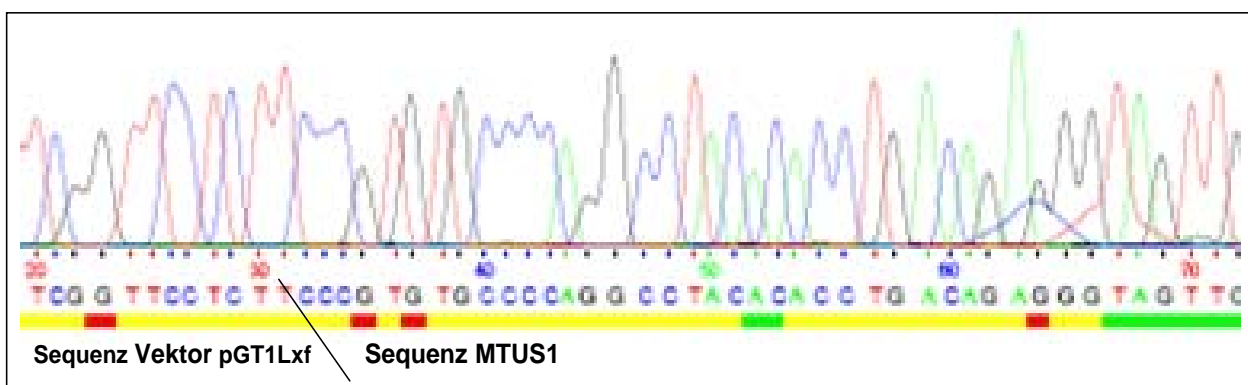


Abbildung 51: Reverse Sequenzierung der Vektorinsertion mit dem pGT1.8TM86r Primer. Der Vektor ist im Intronbereich zwischen Exon 3 und 4 an der Position 41407 eingefügt worden.

5.4.3 Blastozysteninjektion und Zucht der Knockout-Tiere

In der Folge von ca. 300 Blastozysteninjektionen und 16 Blastozystentransfers wurden vier pseudogravide CD1-Weibchen trächtig, von denen ein Weibchen den Wurf nicht annahm. Die drei verbliebenen Würfe brachten 15 Junge hervor, von denen ca. ab dem fünften Lebenstag die Fellfarbe bestimmt werden konnte. Vier chimäre Männchen waren anhand ihrer braunen oder sogar hellbeigen Färbung erkennbar, während keine chimären Weibchen detektiert wurden.

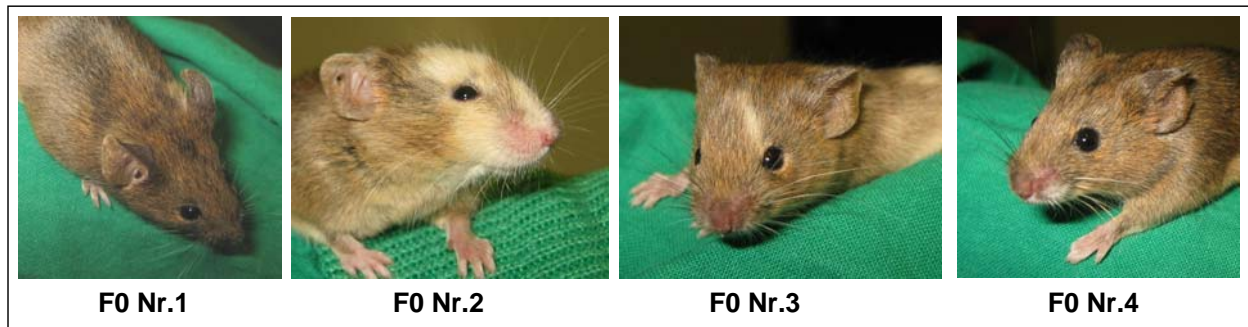


Abbildung 52: Aus den Blastozysteninjektionen hervorgegangene chimäre Männchen.

Das chimäre Männchen F0 Nr.1 starb vor der fünften Lebenswoche, nachdem es innerhalb kurzer Zeit einen Tumor am Schwanz entwickelte. Aufgrund der bereits eingetretenen Autolyse des Gewebes konnte keine pathologische Untersuchung mehr durchgeführt werden. Die anderen drei Chimären wurden mit C57/Bl6-Weibchen verkreuzt, um so heterozygote Tiere zu erhalten. Das Männchen F0 Nr.3 pflanzte sich nicht fort, die beiden anderen Männchen wurden mit insgesamt vier verschiedenen C57/Bl6-Weibchen verpaart.

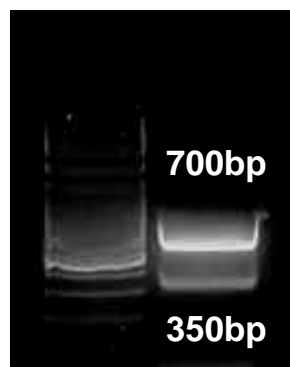


Abbildung 53: Foto der Genotypisierung einer heterozygoten Maus.
Die linke Spur zeigt den Marker, die obere Bande der rechten Spur entspricht der Wildtyp-Bande mit ca. 700bp, die untere der Knockout-Bande mit ca. 350bp.

Das Männchen F0 Nr.2 zeugte 32 braune Nachkommen, von denen 18 Tiere einen heterozygoten Genotyp aufwiesen. Nachdem diese Genotyp-Verteilung ungefähr dem Verhältnis 1:1 der ersten Mendelschen Regel entspricht, gab es keine Anhaltspunkte für eine erhöhte intrauterine Mortalität der heterozygoten Tiere. Das chimäre Tier F0 Nr.4 hingegen zeugte 33 schwarze Nachkommen, die alle einen Wildtyp-Genotyp aufwiesen.



Abbildung 54: Erster Wurf der F1-Generation. Die Hälfte der Tiere wies einen heterozygoten Genotyp auf.

Alle heterozygoten Tiere stammen demnach von F0 Nr.1 und verschiedenen Müttern ab. Jeweils zwei heterozygote Tiere von unterschiedlichen Müttern wurden direkt miteinander verkreuzt, die so erhaltenen Nachkommen zeigten Wildtyp-, hetero- und homozygote Genotypen, sowie unterschiedliche Fellfarben, die allerdings nicht an den Genotyp gekoppelt waren. Von insgesamt 53 geborenen Tieren konnten zehn Tiere als homozygot, zwölf als Wildtyp und 31 Tiere als heterozygot typisiert werden. Das entspricht einem Verhältnis von 23% Wildtyp : 58% heterozygot : 19% homozygot und entspricht in etwa den Mendelschen Regeln. Eine erhöhte embryonale Sterblichkeit von homozygoten Tieren lässt sich demnach nicht nachweisen.



Abbildung 55: Erster Wurf der F2-Generation. Die Genotypen entsprachen in etwa der Mendelschen Regel, nach der homozygote:Wildtyp:heterozygote Tiere im Verhältnis 1:2:1 auftreten.

Mit Hilfe der homozygoten Tiere wurde eine homozygote Zucht aufgebaut, mit Hilfe der Wildtyp-Tiere eine Wildtyp-Zucht. Alle heterozygoten Weibchen und einige Männchen wurden als Kontrollgruppe gehalten.

Parallel zu diesen Zuchten wurden heterozygote Tiere der F1-Generation mit C57/Bl6-Wildtyp-Tieren verkreuzt. Die erhaltenen heterozygoten Nachkommen wurden ebenfalls wieder mit Wildtyp-Tieren verkreuzt und dieser Vorgang dreimal wiederholt. Diese Rückkreuzungen sollten der Homogenisierung der genetischen Eigenschaften dienen, da die ersten heterozygoten Tiere mit einem genetischen Hintergrund von C57/Bl6 (Blastozysten) und 129/Ola (Stammzelllinie)

geboren worden waren. Um eine zweite MTUS1-Knockout-Linie auf einem anderen genetischen Hintergrund zu etablieren, wurden diese Rückkreuzungen ebenfalls dreimal mit Balb/c-Tieren durchgeführt. Die Etablierung beider Linien dauerte ca. ein Jahr, deshalb wurden die folgenden Versuche mit den Tieren aus den direkten Verkreuzungen durchgeführt.

5.5 Ergebnisse der Charakterisierung der Knockout-Maus

5.5.1 Nachweis des Knockouts auf DNA-, mRNA- und Protein-Ebene

Zunächst wurden die Mäuse mittels PCR überprüft, ob die homozygoten Tiere das MTUS1-Gen tatsächlich in inaktivierter Form trugen. Die homozygoten Tiere zeigten eine Bande für den Insertionsvektor, aber keine Bande für das native MTUS1-Gen. Bei den heterozygoten Mäusen konnten hingegen beide Banden nachgewiesen werden. Die Wildtyp-Tiere wiederum wiesen nur eine deutliche Bande für das native MTUS1-Gen auf.

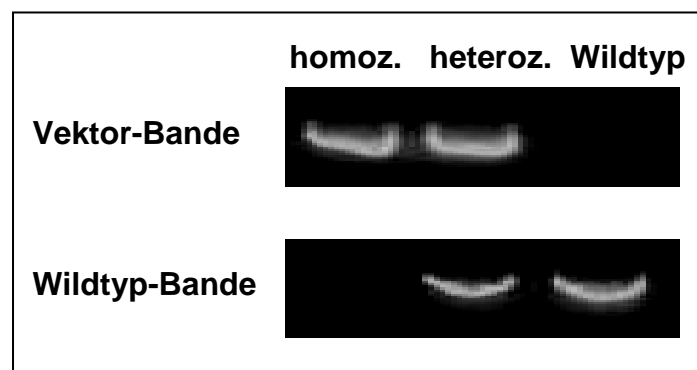


Abbildung 56: Nachweis des Knockouts auf DNA-Ebene.

Um den richtigen MTUS1-Knockout auch auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurde aus den Herzen von drei Tieren die mRNA gewonnen und die cDNA synthetisiert. Anschließend wurde mit dieser cDNA zwei PCRs durchgeführt, aus denen zum einen eine β -Aktin-Bande und zum anderen eine Bande für die native MTUS1-cDNA-Sequenz resultierte. Die erhaltenen β -Aktin-Banden waren bei den Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tieren gleich stark. Bei den homozygoten Mäusen ließ sich keine Bande für das native MTUS1 nachweisen, während die heterozygoten Tiere eine schwache und die Wildtyp-Tiere eine starke Bande aufwiesen.



Abbildung 57: Nachweis des Knockouts auf mRNA-Ebene.

Aus dem Herzen von drei untersuchten Tieren wurden die Proteine gewonnen und diese in einem Western-Blot analysiert. Dieser Blot wurde zum einen mit einem β -Galaktosidase-Antikörper entwickelt, da β -Galaktosidase im Insertionsvektor enthalten ist. Zum anderen wurde mit einem MTUS1-Antikörper entwickelt. Die homozygoten Tiere zeigten eine deutliche Bande in der β -Galaktosidase-Färbung und keine Bande in der MTUS1-Färbung. Die heterozygoten Tiere zeigten bei beiden Antikörpern eine Bande, während bei den Wildtyp-Tieren keine β -Galaktosidase-Bande nachweisbar war.

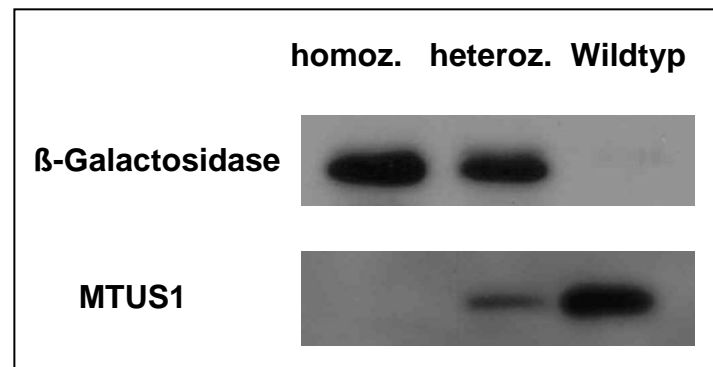


Abbildung 58: Nachweis des Knockouts auf Protein-Ebene.

Somit konnte der korrekte Knockout auf DNA-, mRNA- und Protein-Ebene bestätigt werden.

5.5.2 Expression der β -Galaktosidase in verschiedenen Mausorganen

In früheren Publikationen wurde bereits beschrieben, dass das MTUS1-Gen in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird. Genauerem Aufschluss darüber lieferte die X-Gal-Färbung, bei der β -Galaktosidase exprimierende Zellen selektiv blau gefärbt werden können. Nachdem die Knockout-Tiere β -Galaktosidase anstatt MTUS1 exprimieren, konnte durch die X-Gal-Färbung die normalerweise vorhandene MTUS1-Expression farblich gekennzeichnet werden. Es konnte in fast allen Organen eine MTUS1-Expression nachgewiesen werden, allerdings in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Im Herzen wurde in den Kardiomyozyten eine sehr intensive Färbung detektiert, während in Lunge, Colon und Nierentubuli vor allem die Epithel- und Endothelzellen gefärbt waren. Im Gehirn waren die Purkinjezellen am deutlichsten angefärbt. In der Leber wiesen die Hepatozyten eine relativ gleichmäßig verteilte Färbung auf, während die Muskelfaserzellen eine mosaikartige Färbung zeigten. In der Milz konnte nur wenig β -Galaktosidase und damit MTUS1-Expression nachgewiesen werden, allerdings wies die Bindegewebsartige, von Peritonealepithel umgebene Kapsel eine leichte Färbung auf. Durch das Thymusgewebe ziehen sich netzartige Stränge aus epithelialen Zellen, bei denen eine Blaufärbung festgestellt wurde. Schließlich konnte in der Nebenniere eine Färbung im Bereich der Kapsel und der äußeren Rindenzone nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle wurde die X-Gal-Färbung ebenfalls an Organen von Wildtyp-Mäusen durchgeführt, wobei wie erwartet in keinem Fall Blaufärbung festzustellen war.

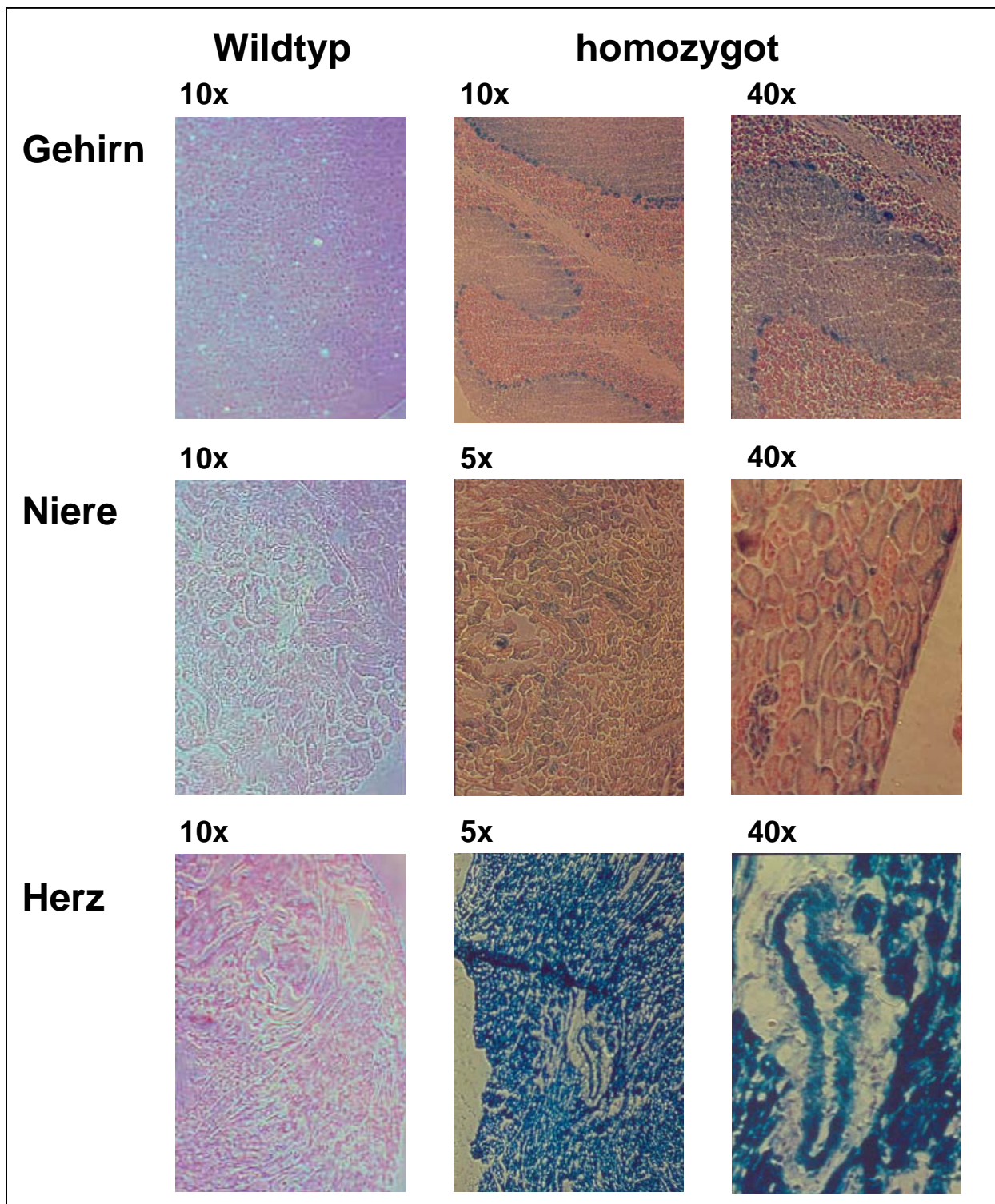


Abbildung 59: Auswertung der X-Gal-Färbung. Die blaue Färbung bedeutet eine Expression von β -Galaktosidase, diese konnte in den Epithel- und Endothelzellen der Niere detektiert werden, im Herz in den Kardiomyozyten und im Gehirn in den Purkinjefasern. Die Wildtyp-Organen zeigten keine Färbung.

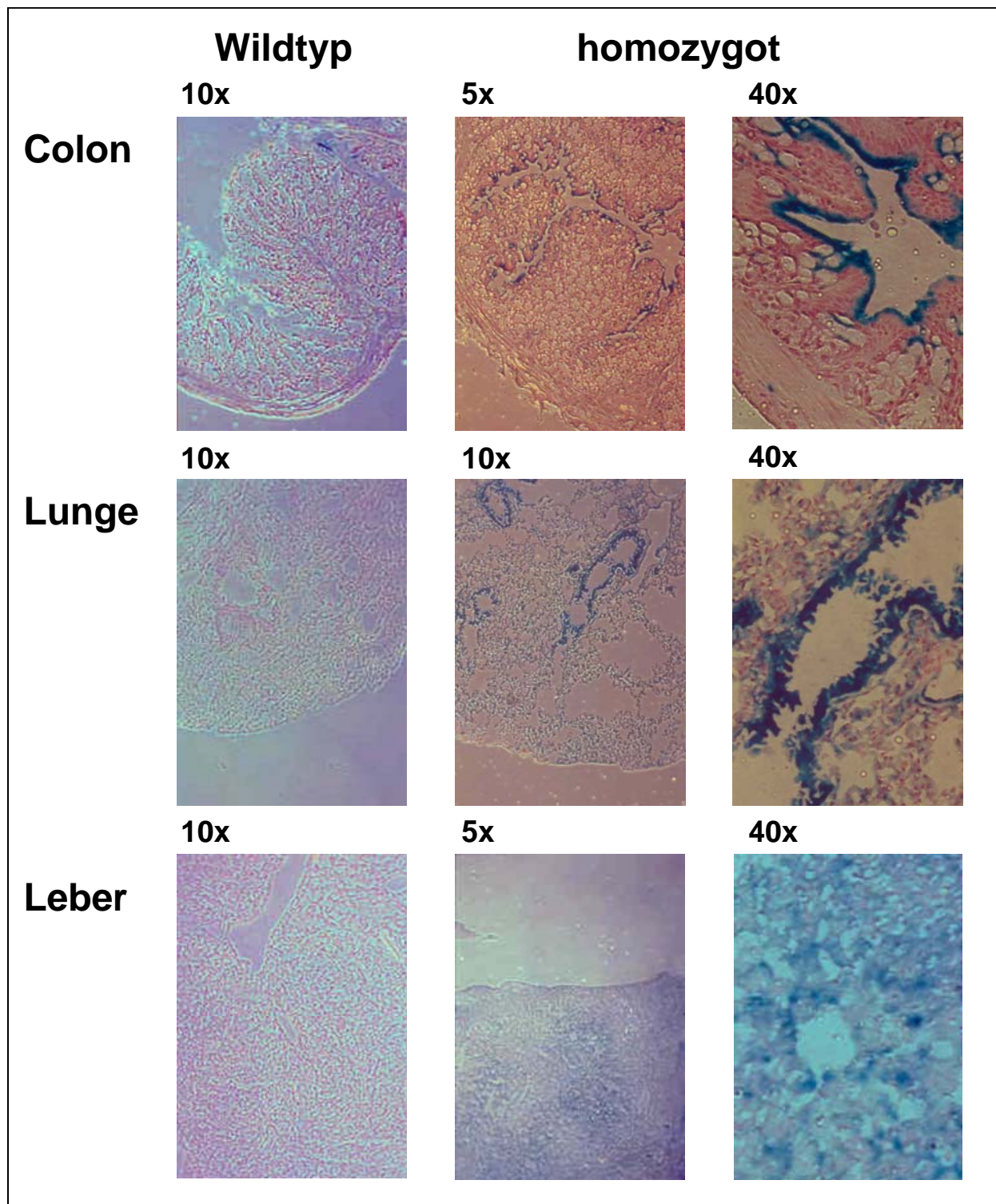


Abbildung 60: Auswertung der X-Gal-Färbung. Die Blaufärbung konnte bei homozygoten Mäusen in den Epithel- und Endothelzellen der Lunge und des Colons und in den Hepatozyten der Leber nachgewiesen werden. Die Wildtyp-Organen zeigten keine Färbung.

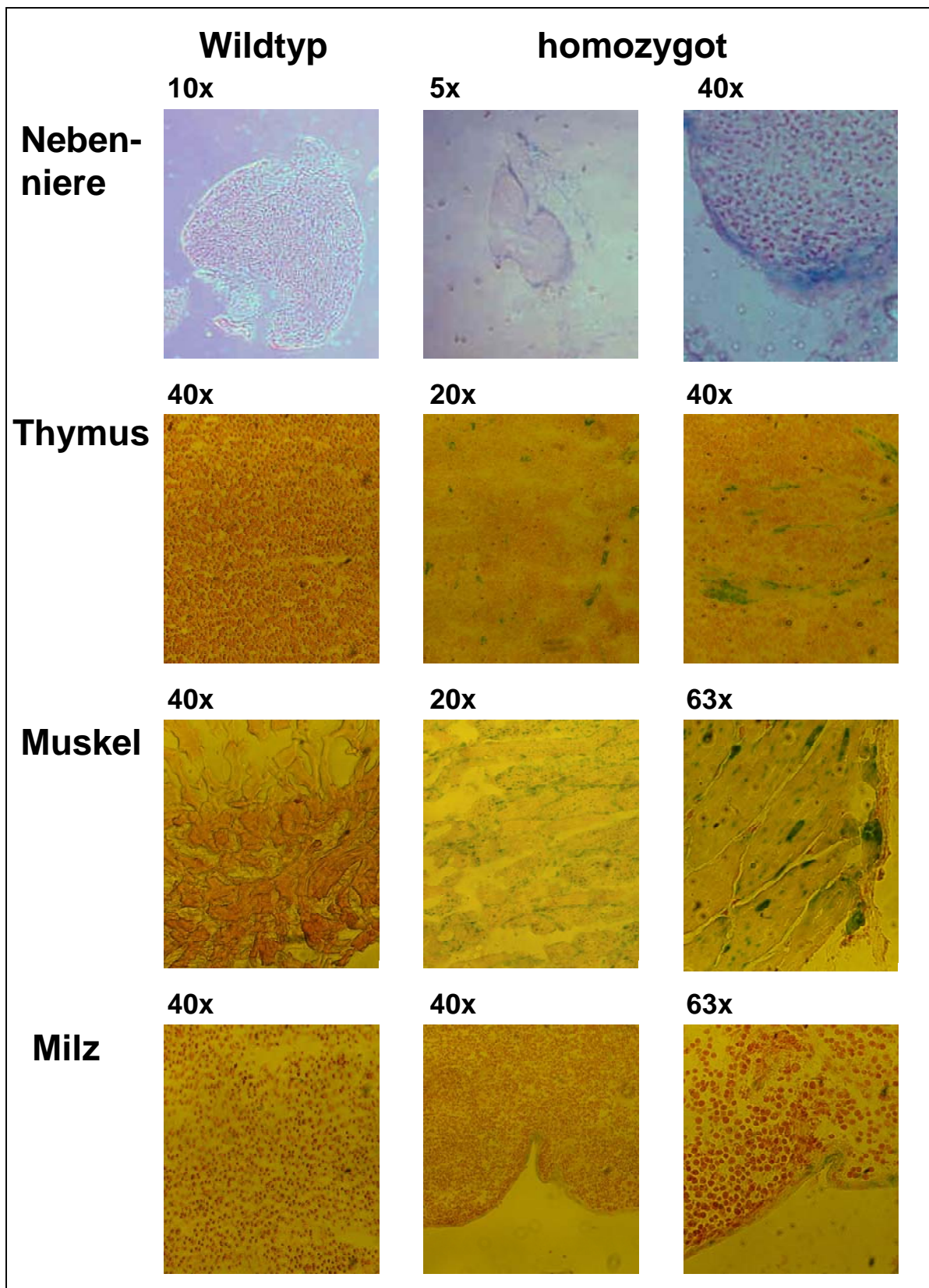


Abbildung 61: Auswertung der X-Gal-Färbung. Eine positive Farbreaktion konnte bei den homozygoten Tieren in der Kapsel der Milz, in den epithelialen Zellen des Thymus, in der Nebennierenrinde und in den Muskelfaserzellen detektiert werden. Die Wildtyp-Organе zeigten keine Färbung.

5.5.3 Laborwerte der Knockout-Mäuse

Die Analyse der Blutwerte sowie des Urins diente dem Vergleich von makroskopisch betrachtet gesunden Wildtyp-, hetero- und homozygoten Tieren. Außerdem konnten diese Daten von relativ jungen Mäusen als Basiswerte zum Vergleich mit erkrankten Tieren verwendet werden.

Tier	Mittelwerte	Mittelwerte	Mittelwerte
Genotyp	Wildtyp	heterozygot	homozygot
Klinische Chemie			
Natrium	145,8 (±1,34)	137,0 (±5,60)	140,6 (±3,44)
Kalium	7,9 (±0,46)	8,0 (±0,82)	7,2 (±0,59)
Calcium	2,52 (±0,10)	2,38 (±0,04)	2,48 (±0,05)
Magnesium	1,2 (±0,07)	1,1 (±0,03)	1,1 (±0,03)
anorganisches Phosphat	3,6 (±0,30)	3,3 (±0,21)	3,5 (±0,22)
Chlorid	118,8 (±2,80)	110,9 (±2,74)	111,2 (±2,70)
Glucose	290,7 (±57,2)	335,2 (±17,0)	307,5 (±32,4)
Creatinin	0,1 (±0,02)	0,1 (±0,01)	0,1 (±0,01)
Harnstoff	36,5 (±3,90)	50,9 (±2,74)	43,3 (±3,32)
Harnsäure	3,7 (±1,18)	1,5 (±0,23)	1,6 (±0,34)
Gesamt-Eiweiß	4,5 (±0,21)	4,6 (±0,07)	4,5 (±0,17)
Albumin	2,5 (±0,24)	2,7 (±0,08)	2,6 (±0,15)
Cholinesterase	4551,8 (±542)	5447,6 (±356)	5394,6 (±423)
Gesamt-Bilirubin	1,05 (±0,35)	0,94 (±0,24)	0,42 (±0,21)
Glutamat-Oxalacetat-Transferase (GOT)	126,1 (±24,6)	93,0 (±5,88)	132,7 (±17,7)
Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)	58,4 (±32,0)	40,3 (±7,43)	42,0 (±6,70)
Glutamatdehydrogenase (GLDH)	8,5 (±1,41)	8,4 (±1,4)	9,0 (±0,88)
Alkalische Phosphatase	199,2 (±45,7)	120,7 (±20,9)	169,3 (±41,1)
Lactatdehydrogenase	418,7 (±53,4)	866,6 (±513)	394,9 (±39,6)
Creatinkinase gesamt	952,4 (±225)	762,3 (±153)	1262,9 (±522)
Lipase	33,4 (±2,93)	30,9 (±3,84)	32,5 (±4,26)
Cholesterin	69,4 (±13,4)	102,4 (±3,89)	86,3 (±8,26)
Triglyceride	84,4 (±10,0)	83,1 (±6,98)	105,3 (±18,5)
HDL Cholesterin	61,8 (±15,5)	90,4 (±3,49)	74,6 (±5,62)
Eisen	226,7 (±25,3)	168,7 (±12,4)	192,3 (±14,3)
Hämatologie			
Leukozyten	3,7 (±0,58)	1,9 (±0,25)	2,8 (±0,25)
Erythrozyten	6,8 (±0,43)	7,7 (±0,21)	7,6 (±0,25)
Hämoglobin	11,7 (±0,67)	12,5 (±0,28)	12,5 (±0,32)
Hämatokrit	38,9 (±2,48)	43,2 (±1,02)	42,8 (±1,19)
mittleres corpusculäres Volumen (MCV)	60,6 (±1,03)	56,5 (±0,97)	58,5 (±1,14)
mittleres corpusculäres Hämoglobin (MCH)	17,3 (±0,24)	16,4 (±0,23)	16,6 (±0,29)
mittlere corpusculäre Hämoglobinkonzentration (MCHC)	28,6 (±0,35)	29,1 (±0,28)	28,3 (±0,33)
Thrombozyten	534,6 (±88,0)	430,4 (±35,4)	486,2 (±65,2)
Lymphozyten	1,7 (±0,26)	0,9 (±0,10)	1,0 (±0,15)
Urin			
Calcium	3,8 (±0,74)	4,3 (±1)	5,7 (±2,42)
Creatinin	18,1 (±2,76)	22,2 (±4,25)	14,9 (±3,22)
Kalium	127,7 (±19,3)	111,4 (±17,9)	105,2 (±20,5)
Natrium	77,5 (±19,0)	109,3 (±27,7)	66,1 (±13,8)

Tabelle 23: Auswertung der Blut- und Urinparameter von 4-12 Wochen alten Mäusen. Es wurden jeweils die Mittelwerte mit SEM-Wert angegeben. Gelb markierte Werte wiesen Unterschiede zwischen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tieren auf.

Die Analyse des Blutserums brachte keine auffälligen Unterschiede in den Konzentrationen der verschiedenen Ionen wie Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Phosphat und Chlorid. Die Tiere wiesen also keine Hinweise auf einen veränderten Elektrolythaushalt auf.

Die gemessenen Glucose-Werte ließen keine Vermutung auf Diabetes mellitus in einer der Gruppen zu.

Auch die Werte für Serumcreatinin, für Harnstoff und Harnsäure zeigten lediglich Schwankungen im Normbereich, so dass ein Verdacht auf eine veränderte Nierenfunktion oder ein Gichtisiko nicht vorlag.

Des Weiteren wiesen die gemessenen Konzentrationen für Gesamt-Eiweiß und Albumin keine Unterschiede auf.

Die Werte für Cholesterin, HDL Cholesterin und Triglyceride ließen keinen Hinweis auf eine Fettstoffwechselstörung oder ein erhöhtes Arteriosklerosisiko zu.

Die Enzyme Cholinesterase, alkalische Phosphatase, GOT, GPT und GLDH geben Aufschluss über eventuelle Leberfunktionsstörungen. Die Werte lagen alle im Normbereich.

Die Werte des Gesamt-Bilirubins lagen bei den heterozygoten und homozygoten Tieren niedriger als bei den Wildtyp-Tieren. Daraus konnte eine gute Leberfunktion bzw. ein geringer Abbau von Erythrozyten abgelesen werden.

Die Lipase stellt ein Enzym des Pankreas dar und könnte über eine Funktionsstörung Auskunft geben. Die Enzyme Lactatdehydrogenase und Creatinkinase sind in Muskelzellen enthalten und werden bei einer Zerstörung von Muskelgewebe erhöht freigesetzt. Der Nachweis dieser Enzyme wird zur Erkennung und Verlaufskontrolle eines Herzinfarkts eingesetzt. In den untersuchten Gruppen lagen die gemessenen Werte bei diesen drei Enzymen aber im normalen Schwankungsbereich.

Die Bestimmung des Eisenwerts ergab eine niedrigere Konzentration der homozygoten und heterozygoten Tiere. Diese könnte möglicherweise mit dem erhöhten Eisenverbrauch dieser Tiere aufgrund der erhöhten Erythrozytenbildung erklärt werden.

Auch im Blutbild wiesen einige Werte Differenzen zwischen den verschiedenen Genotypen auf. So waren die Leukozyten-, Lymphozyten- und Thrombozytenkonzentrationen der homozygoten und heterozygoten Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren reduziert. Dagegen zeigten die homo- und heterozygoten Tiere einen höheren Hämoglobingehalt, der mit einem Anstieg der Erythrozytenzahl zu erklären ist. Die Werte MCH (mittleres corpusculäres Hämoglobin) und MCV (mittleres corpusculäres Volumen) geben Aufschluss über den Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten und über die Größe des einzelnen roten Blutkörperchens. Wie die Werte für die homozygoten und heterozygoten Tiere zeigten, sind zwar mehr Erythrozyten im Blut dieser Tiere zu finden, die einzelnen Blutkörperchen weisen aber eine geringere Größe und einen geringeren Hämoglobingehalt als die Wildtyp-Tiere auf. Nachdem aber die MCHC (mittlere corpusculäre Hämoglobinkonzentration) bei allen Tieren ähnlich ist, weisen die Erythrozyten aller Tiere gemessen an ihrer Größe eine gleich hohe Hämoglobinkonzentration auf. Als Folge der höheren Erythrozytenzahl im Blut der homozygoten und heterozygoten Tiere stieg auch der Hämatokrit-Wert an.

Die Analyse des Urins brachte Unterschiede in der Salzkonzentration zum Vorschein. So wurde bei den homozygoten und heterozygoten Tieren eine leicht erhöhte Ausscheidung an Calcium und eine erniedrigte Ausscheidung an Kalium diagnostiziert.

5.6 Ergebnisse der Langzeitbeobachtung der MTUS1-Knockout-Mäuse

5.6.1 Zuchtauffälligkeiten

Es konnten schon nach kurzer Zuchtdauer einige Besonderheiten des MTUS1-Stammes detektiert werden. So blieben von 90 geborenen homozygoten Jungen 19 in Wachstum und Entwicklung zurück. Vier von 40 heterozygoten Jungen und drei von 26 Wildtyp-Jungen waren von dem retardierten Wachstum betroffen.



Abbildung 62: Foto eines homozygoten Geschwisterpaares am 10. Lebensstag. Die weiße Maus weist eine Entwicklungsverzögerung auf.

In den verschiedenen Genotyp-Gruppen verstarben jeweils zwei der kleineren Tiere spontan ohne vorhergehende Anzeichen einer Verschlechterung des Zustandes. Darüber hinaus wurden bei den zurückgebliebenen Tieren vermehrt Augenentzündungen diagnostiziert. Bei 13% der homozygoten Tiere, bei 10% der heterozygoten Tiere und bei 11% der Wildtyp-Tiere konnte eine Beeinträchtigung der Augen detektiert werden. Der Verlauf der Entzündung war gekennzeichnet von zunächst tränenden und verklebten Augen, bis hin zum vollständigen Anschwellen des Auges. Bei den meisten Tieren klang die Entzündung nach wenigen Tagen spontan ab, wobei das betroffene Auge meist längerfristig trännte. Einige Tiere mussten aufgrund der Entzündung getötet werden. Der pathologische Befund ergab jeweils einen subkutanen Abszess als Ursache der Augenschwellung.

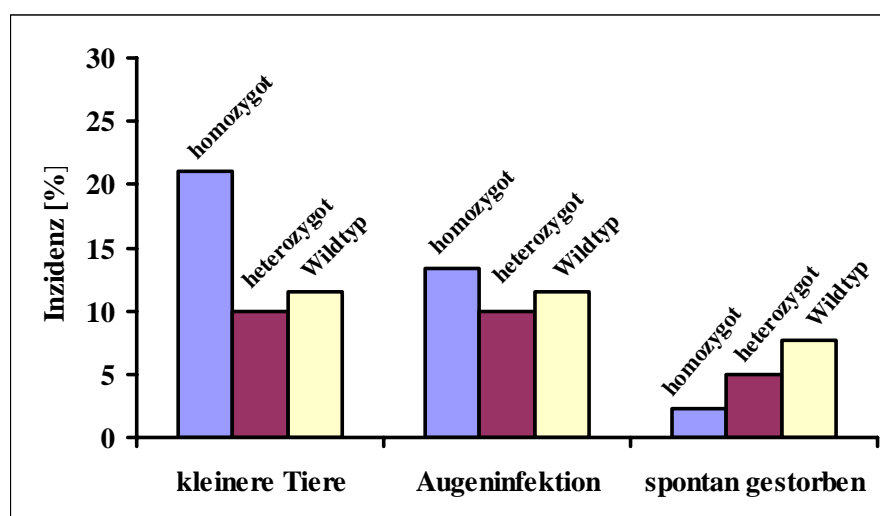


Abbildung 63: Prozentualer Anteil der wachstumsverzögerten Tiere, Anteil der Tiere, die eine Augeninfektion entwickelten und spontan starben.

Vorwiegend bei den homo- und heterozygoten Tieren konnten außerdem Felldefekte detektiert werden, wobei einzeln gehaltene Tiere diese seltener aufwiesen. Die Tiere hatten kahle Stellen vorwiegend am Kopf, wobei die Schnurrhaare zuerst ausfielen. Die Gründe für dieses Phänomen könnten zum einen ein erhöhter Juckreiz der Haut sein, eine andere Erklärung wäre allerdings auch, dass die Tiere zu einer höheren Aggressivität neigten und die Haare gegenseitig abgefressen wurden.

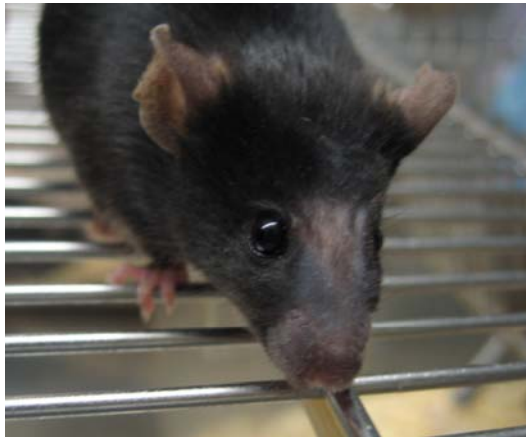


Abbildung 64: Foto einer homozygoten Maus mit fehlenden Schnurrhaaren und einem Felldefekt im Bereich der Schnauze.

5.6.2 Gewichtsentwicklung der Knockout-Mäuse

Bei der Analyse der Gewichtsentwicklung wurden jeweils gleichaltrige Paare von homozygoten und Wildtyp-Tieren miteinander verglichen. Die Tiere wurden beim Absetzen von der Mutter im Alter von ca. vier Wochen und im Alter von ca. zehn Monaten gewogen. Bereits im Alter von vier Wochen konnte bei den homozygoten Tieren ein signifikant höheres Gewicht von durchschnittlich 10,8g ($\pm 0,2$ g) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit 8,7g ($\pm 0,8$) festgestellt werden. Diese Beobachtung setzte sich bis zum zweiten Messpunkt im Alter von zehn Monaten fort, bei dem die homozygoten Tiere durchschnittlich ein Gewicht von 36,7g ($\pm 1,6$) und die Wildtyp-Tiere von 32g ($\pm 1,9$) auf die Waage brachten.

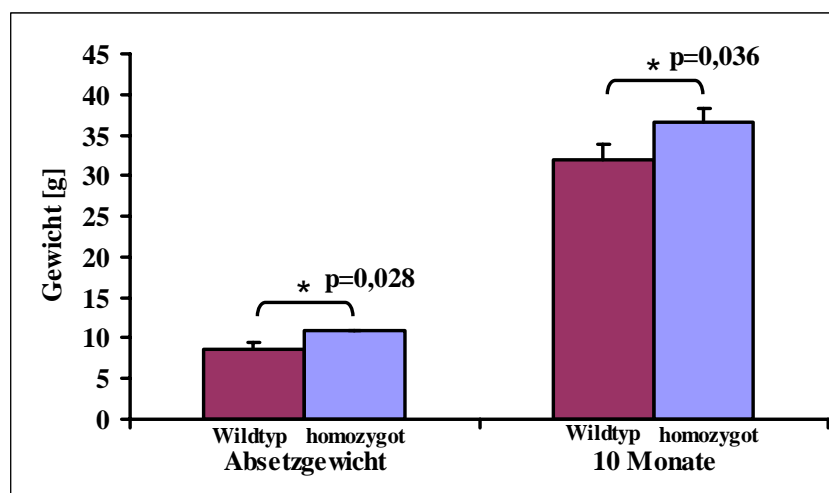


Abbildung 65: Auswertung der Gewichtsentwicklung von homozygoten und Wildtyp-Mäusen. Die homozygoten Tiere wiesen ein signifikant erhöhtes Körpergewicht auf.

5.6.3 Blutdruckwerte der Knockout-Mäuse

Der Mittelwert von fünf gemessenen Blutdruckwerten eines homozygoten Tiers wurde mit dem entsprechenden Wert des gleichaltrigen Wildtyp-Tiers verglichen. Mit einer Ausnahme zeigte sich bei allen sechs Vergleichspaaren ein niedrigerer systolischer Blutdruck bei den homozygoten Tieren. Auch der diastolische Blutdruck lag bei den homozygoten Tieren unter dem der Wildtyp-Vergleichstiere. Im Mittel wiesen die homozygoten Tiere einen Blutdruck von 100mmHg (± 6) zu 77mmHg (± 6), die Wildtyp-Tiere eine Blutdruck von 107 (± 4) zu 82 (± 3). Die Tendenz ergab allerdings keine Signifikanz ($p=0,101/p=0,087$) zwischen den Ergebnissen der homozygoten und der Wildtyp-Tiere.

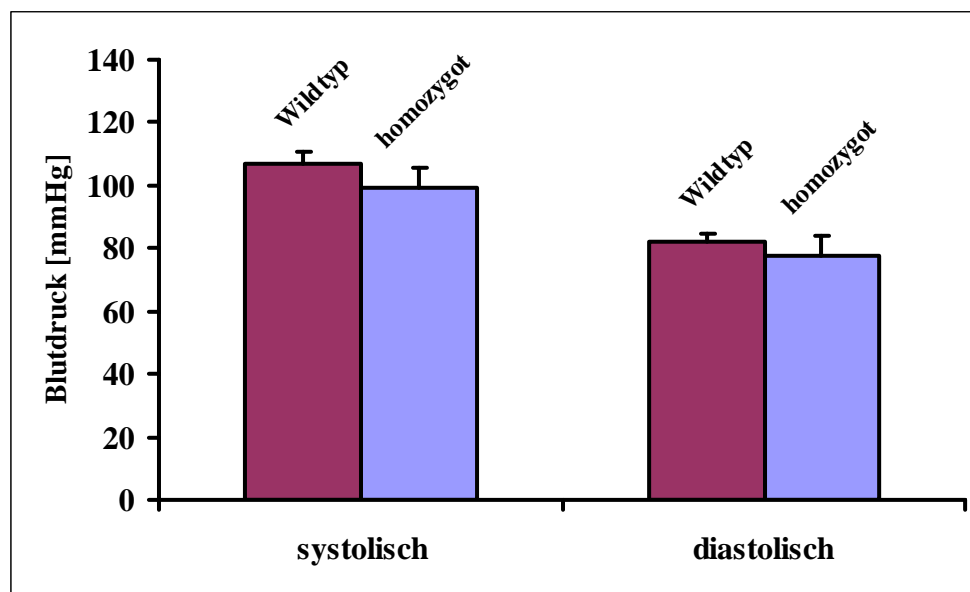


Abbildung 66: Auswertung der Blutdruckmessung bei homozygoten und Wildtyp-Tieren. Die homozygoten Tiere wiesen einen reduzierten Blutdruck auf.

5.6.4 Laborwerte der Knockout-Mäuse

Für die Auswertung der Laborparameter der 10-12 Monate alten Tiere, wurden die Gruppen untereinander verglichen. Die laborchemischen Parameter der Blutuntersuchung wiesen bis auf zwei Ausnahmen keine relevanten Unterschiede auf. Die beiden Enzyme Lactatdehydrogenase und Creatinkinase finden sich vor allem in den Herzmuskelzellen und den Skelettmuskeln und gelangen vermehrt ins Blut, wenn Muskelzellen absterben. Nachdem die homozygoten Tiere erhöhte Werte beider Enzyme aufwiesen, kann in diesen Tieren von einer Schädigung des Herzens bzw. der Muskelzellen ausgegangen werden.

In der Hämatologie fanden sich einige deutliche Veränderungen. So ergab die Analyse der Leukozytenzahl eine deutliche Erhöhung in den heterozygoten und homozygoten Tieren, dabei war die Lymphozytenzahl deutlich erhöht. Dagegen wiesen die heterozygoten und homozygoten Tiere eine verminderte Zahl an Erythrozyten und eine Thrombozytopenie auf.

Einhergehend mit einem verminderten Hämoglobingehalt im Blut, wiesen auch die einzelnen Erythrozyten der heterozygoten und homozygoten Tiere einen geringeren Hämoglobingehalt bei erhöhtem Zellvolumen auf. Die mittlere corpuskuläre Hämoglobinkonzentration sank dadurch bei den heterozygoten und homozygoten Mäusen ab. Hämatokrit und Zahl der Neutrophilen waren bei den Knockout-Tieren reduziert, die Zahl der Monozyten erhöht.

Tier	Mittelwerte	Mittelwerte	Mittelwerte
Genotyp	Wildtyp	heterozygot	homozygot
Klinische Chemie			
Natrium	150,1 (± 074)	144,5 ($\pm 1,16$)	148,8 ($\pm 0,99$)
Kalium	9,8 (± 045)	12,7 ($\pm 0,64$)	10,9 ($\pm 0,56$)
Calcium	2,85 ($\pm 0,03$)	2,82 ($\pm 0,06$)	2,71 ($\pm 0,05$)
Magnesium	1,3 ($\pm 0,05$)	1,6 ($\pm 0,04$)	1,5 ($\pm 0,10$)
anorganisches Phosphat	2,65 ($\pm 0,13$)	2,91 ($\pm 0,13$)	3,03 ($\pm 0,27$)
Chlorid	113,1 ($\pm 0,54$)	109,0 ($\pm 0,66$)	113,3 ($\pm 1,14$)
Glucose	364,2 ($\pm 25,6$)	385,6 ($\pm 21,8$)	286,9 ($\pm 33,2$)
Creatinin	0,2 ($\pm 0,00$)	0,2 ($\pm 0,04$)	0,2 ($\pm 0,04$)
Harnstoff	36,8 ($\pm 4,01$)	38,6 ($\pm 2,33$)	68,7 ($\pm 18,1$)
Harnsäure	5,8 ($\pm 0,48$)	7,0 ($\pm 0,00$)	4,1 ($\pm 0,34$)
Gesamt-Eiweiß	6,0 ($\pm 0,12$)	5,8 ($\pm 0,14$)	5,9 ($\pm 0,23$)
Albumin	3,6 ($\pm 0,08$)	3,4 ($\pm 0,09$)	3,2 ($\pm 0,14$)
Cholinesterase	8033,0 (± 424)	8671,4 (± 335)	8174,6 (± 458)
Gesamt-Bilirubin	0,17 ($\pm 0,03$)	0,15 ($\pm 0,04$)	0,16 ($\pm 0,02$)
Glutamat-Oxalacetat-Transferase (GOT)	87,7 ($\pm 7,52$)	146,0 ($\pm 17,9$)	158,6 ($\pm 21,6$)
Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)	48,4 ($\pm 3,74$)	38,3 ($\pm 2,88$)	54,3 ($\pm 14,5$)
Glutamatdehydrogenase (GLDH)	9,3 ($\pm 1,52$)	7,0 ($\pm 0,98$)	9,1 ($\pm 2,13$)
Alkalische Phosphatase	85,5 ($\pm 23,8$)	118,0 ($\pm 18,6$)	63,5 ($\pm 8,21$)
Lactatdehydrogenase	427,5 ($\pm 77,3$)	428,5 ($\pm 55,0$)	625,5 ($\pm 84,4$)
Creatinkinase gesamt	130,3 ($\pm 22,5$)	326,8 ($\pm 27,4$)	502,9 (± 106)
Lipase	28,8 ($\pm 3,65$)	21,8 ($\pm 0,49$)	20,5 ($\pm 1,80$)
Cholesterin	118,8 ($\pm 14,5$)	114,3 ($\pm 15,2$)	112,3 ($\pm 9,64$)
Triglyceride	107,6 ($\pm 9,75$)	116,6 ($\pm 8,72$)	97,5 ($\pm 6,40$)
HDL Cholesterin	82,0 ($\pm 0,00$)	96,5 ($\pm 10,3$)	91,4 ($\pm 13,2$)
Eisen	202,6 ($\pm 15,2$)	243,7 ($\pm 14,1$)	181,8 ($\pm 12,7$)
Hämatologie			
Leukozyten	5,7 ($\pm 0,64$)	10,1 ($\pm 2,77$)	8,7 ($\pm 0,72$)
Erythrozyten	8,9 ($\pm 0,15$)	8,8 ($\pm 0,20$)	7,8 ($\pm 0,32$)
Hämoglobin	13,5 ($\pm 0,17$)	13,3 ($\pm 0,36$)	11,3 ($\pm 0,67$)
Hämatokrit	47,7 ($\pm 0,55$)	46,1 ($\pm 2,44$)	43,0 ($\pm 1,70$)
mittleres corpusculäres Volumen (MCV)	53,7 ($\pm 0,47$)	54,9 ($\pm 0,57$)	55,3 ($\pm 0,68$)
mittleres corpusculäres Hämoglobin (MCH)	15,2 ($\pm 0,15$)	15,1 ($\pm 0,22$)	14,3 ($\pm 0,59$)
mittlere corpusculäre Hämoglobinkonzentration (MCHC)	28,2 ($\pm 0,17$)	27,4 ($\pm 0,26$)	25,9 ($\pm 1,03$)
Thrombozyten	753,3 ($\pm 73,4$)	630,9 ($\pm 45,5$)	608,4 ($\pm 53,3$)
Neutrophile	0,35 ($\pm 0,05$)	0,31 ($\pm 0,05$)	0,23 ($\pm 0,03$)
Lymphozyten	2,5 ($\pm 0,29$)	4,3 ($\pm 1,46$)	3,6 ($\pm 0,29$)
Monozyten	0,02 ($\pm 0,00$)	0,07 ($\pm 0,03$)	0,14 ($\pm 0,03$)

Tabelle 24: Auswertung der Blut- und Urinparameter von 10-12 Monate alten Mäusen. Es wurden jeweils die Mittelwerte mit SEM-Wert angegeben. Gelb markierte Werte wiesen Unterschiede zwischen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tieren auf.

5.6.5 Organspezifische Veränderungen der Knockout-Mäuse

Alle Tiere der Langzeituntersuchung wurden nach der Entnahme von Blut einer Autopsie unterzogen. Dabei wurden die Organe makroskopisch und mit Hilfe einer Operationslupe begutachtet. Falls bei dieser Untersuchung Auffälligkeiten detektiert wurden, wurden die konservierten Tiere histopathologisch untersucht.

Von den zehn Wildtyp-Tieren in der Langzeitbeobachtung starb kein Tier spontan bzw. musste aus ethischen Gründen getötet werden. Dagegen starben von den 18 heterozygoten Tieren drei Mäuse spontan, zwei weitere mussten getötet werden, das entspricht einem Prozentsatz von 28%. Von den 35 beobachteten homozygoten Tieren mussten 37% getötet werden bzw. starben spontan. Die restlichen Tiere wurden zum Abschluss der Langzeitbeobachtung in einem Alter von 10-12 Monaten getötet. Bei der Autopsie ergab keine Wildtyp-Maus einen auffälligen Befund, wohingegen 56% der heterozygoten und 66% der homozygoten Tiere Organanomalien vielfältiger Ausprägung zeigten.

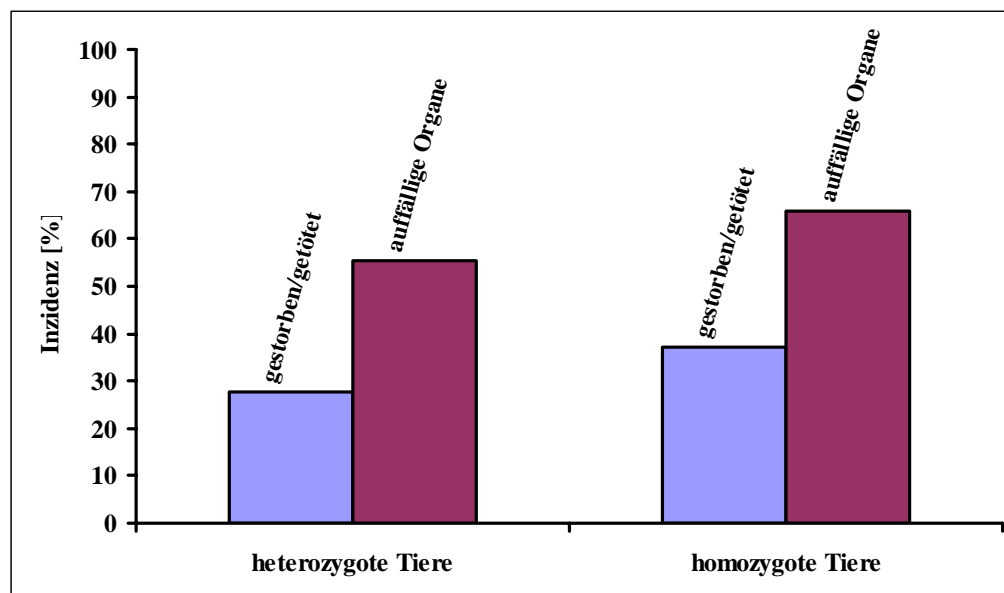


Abbildung 67: Prozentualer Anteil der frühzeitig verstorbenen Tiere und der aufgetretenen Organanomalien.

Alle zehn Tiere der Wildtyp-Kontrollgruppe zeigten keinerlei außergewöhnliche Veränderungen betreffend der makroskopischen Beurteilung der Organe.

Bei den heterozygoten Tieren wurden Anomalien der Milz festgestellt, wobei die Milz vergrößert vorlag oder ein ungleichmäßiges Dickenwachstum aufwies. Auch konnten Farbveränderungen der Leber und der Lunge diagnostiziert werden. Ein heterozygoten Tier wies eine extreme Fettleibigkeit auf, das Gewicht überstieg den Normwert um ca. 45%. Ein weiteres Tier zeigte weiß-gelbliche Einlagerungen in der Leber.

Bei den homozygoten Tieren wurden ähnliche Symptome diagnostiziert wie schon bei den heterozygoten Mäusen. Es konnten ein verändertes Größenwachstum der Milz, vergrößerte Herzen, gelbliche Nieren, Verfärbungen der Leber und der Lunge festgestellt werden. In der Leber einer Maus konnten ebenfalls weiß-gelbliche Einlagerungen detektiert werden, während ein anderes Tier deutlich geschwollene und blutunterlaufene Lymphdrüsen am Hals aufwies. Ein weiteres homozygoten Tier wies eine extrem vergrößerte Blase auf.

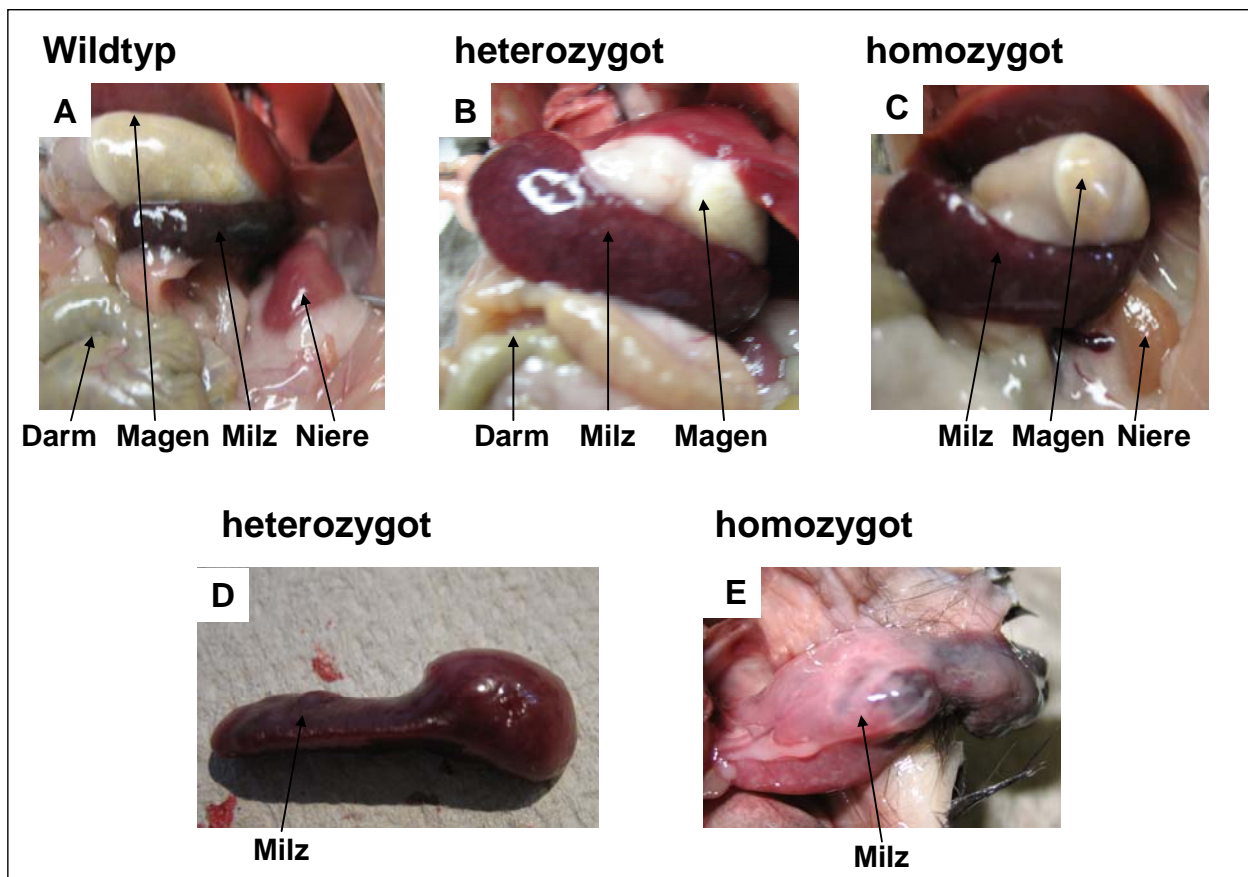


Abbildung 68: Fotos einer intakten Wildtyp-Milz und Niere (A), einer stark vergrößerten Milz in hetero- und homozygoten Tieren (B-C) und eines veränderten Dickenwachstums der Milz in heterozygoten und homozygoten Tieren (D-E). Bild C zeigt dazu eine gelblich verfärbte Niere einer homozygoten Maus.

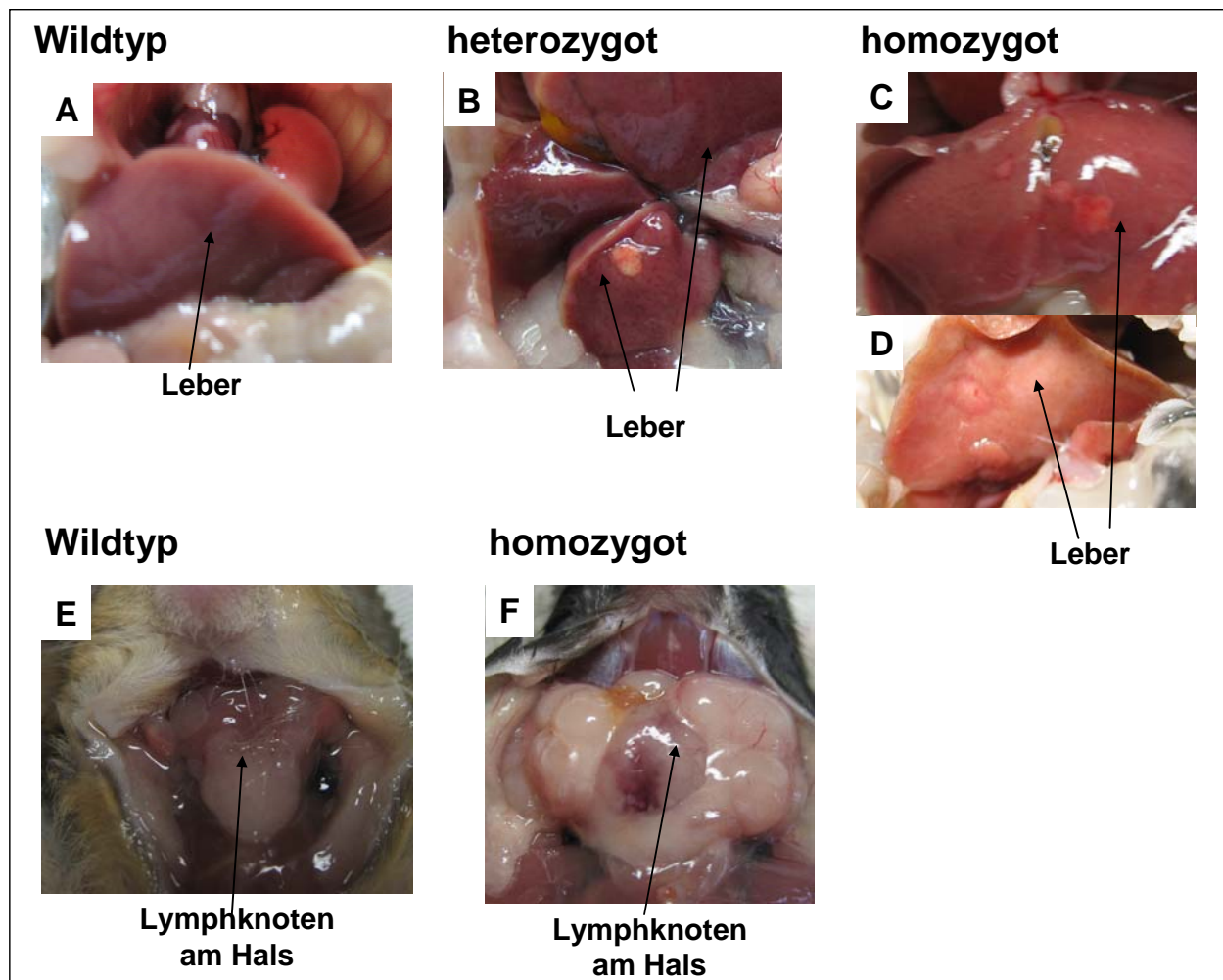


Abbildung 69: Fotos von einer intakten Wildtyp-Leber (A), einer Leber mit weißen Einlagerungen und Farbveränderungen in einer heterozygoten Maus (B) und in homozygoten Mäusen (C-D). Bild E zeigt einen normal ausgebildeten Wildtyp-Lymphknoten, während das Bild F einen veränderten Lymphknoten in einer homozygoten Maus darstellt.

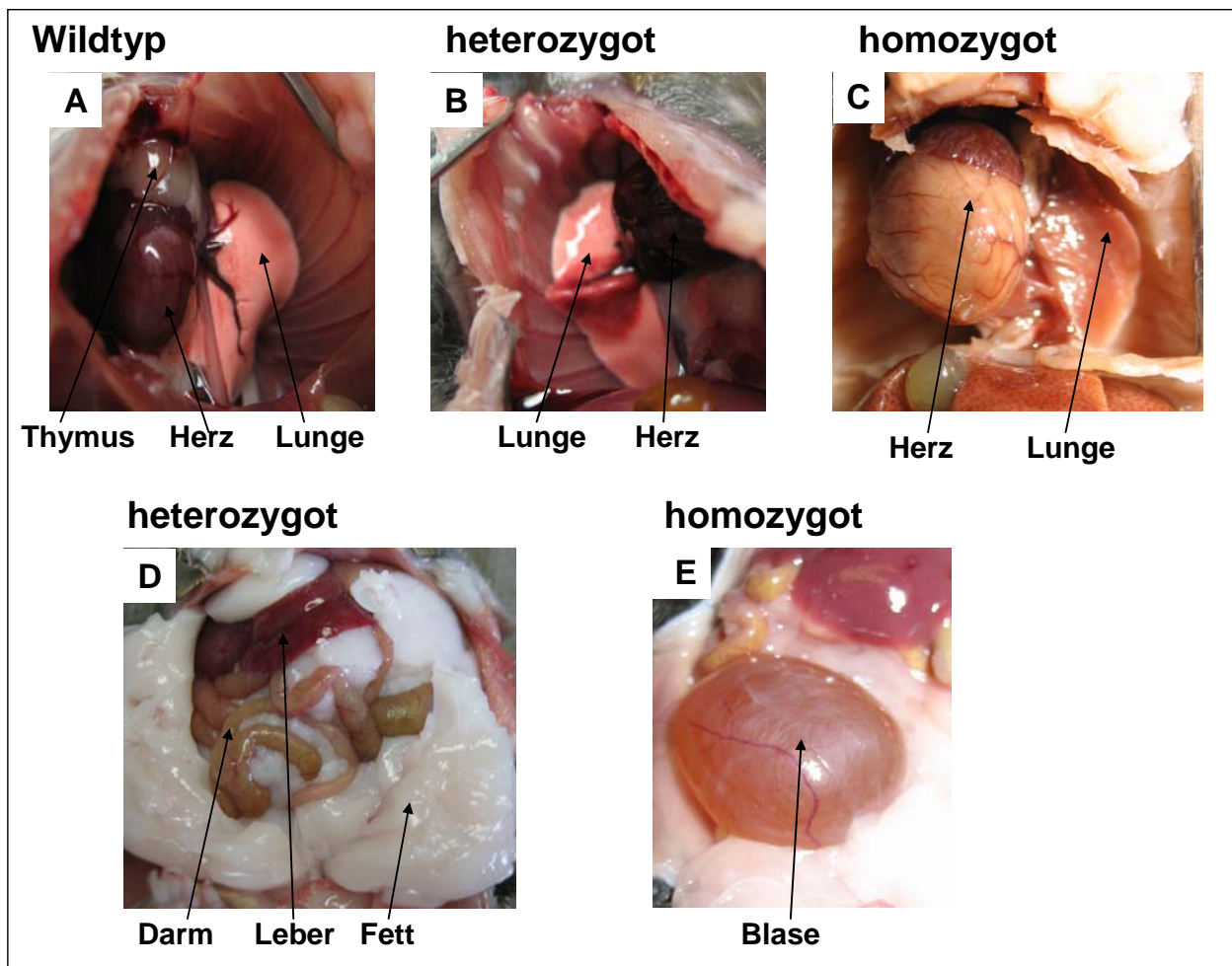


Abbildung 70: Fotos von Wildtyp -Herz und Lunge (A), Farbveränderungen der Lunge in hetero- und homozygoten Tieren (B-C), sowie eines vergrößerten Herzens in einem homozygoten Tier (C). Weitere diagnostizierte Organanomalien waren ein extrem ausgeprägtes Fettgewebe (D), sowie eine stark vergrößerte Blase (E).

Die histologische Untersuchung der auffälligen Organe erfolgte anhand von Paraffinschnitten, die einer Hämatoxylin-Eosin Färbung unterzogen worden waren. Der zelluläre Aufbau der Organe konnte damit besser begutachtet werden. So wurden für die ca. 20fach vergrößerte Blase eines homozygoten Tiers keine veränderten zellulären Strukturen nachgewiesen, zusätzlich lag keine Abflusshinderung vor. Zu vermuten ist hier eventuell eine erhöhte Proliferation der gesunden Zellen. Ähnliches galt für die extrem adipöse heterozygote Maus, nachdem auch hier keine strukturellen Veränderungen der einzelnen Fettzellen festgestellt werden konnte. Sämtliche anderen makroskopischen Befunde wurden anhand der histopathologischen Untersuchung genauer charakterisiert. So wiesen 6% der heterozygoten und 20% der homozygoten Tiere eine Leberdegenerierung durch Fetteinlagerungen auf. Eine Stauung der Leber konnte in 11% der heterozygoten und 3 % der homozygoten Tiere nachgewiesen werden, eine Stauung der Milz ebenfalls bei 3% der homozygoten Mäuse und bei 6% der heterozygoten Mäuse. Bei den heterozygoten Tieren wurden Lungenödeme in 17% der Fälle und Lungenemphyseme in 11% der Fälle diagnostiziert, während bei den homozygoten Tieren mit 6% bzw. 3% weit weniger Erkrankungen der Lunge detektiert wurden.

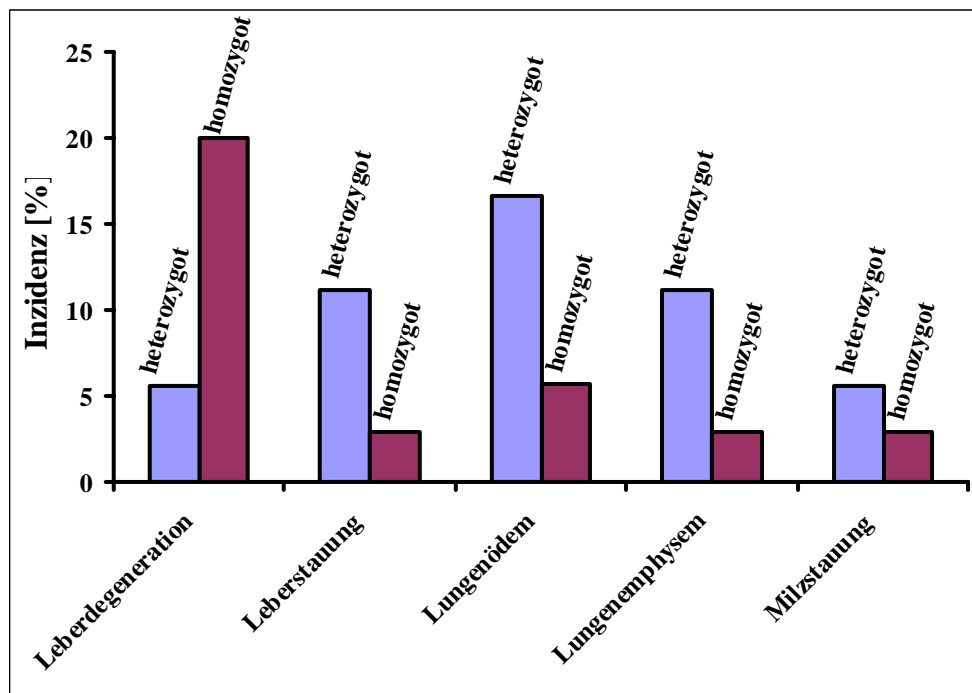


Abbildung 71: Prozentualer Anteil an histopathologisch detektierten Organerkrankungen.

Bei den homozygoten Mäusen konnten drei zusätzliche Erkrankungen detektiert werden. So wiesen 6% der Tiere eine Atelektase der Lunge auf. Die Verfärbungen der Nieren konnten durch die histologische Untersuchung einer Glomerulonephritis zugeordnet werden, an der 11% der homozygoten Tiere erkrankten. Bei fast jeder vierten homozygoten Maus konnte darüber hinaus eine Herzhypertrophie festgestellt werden.

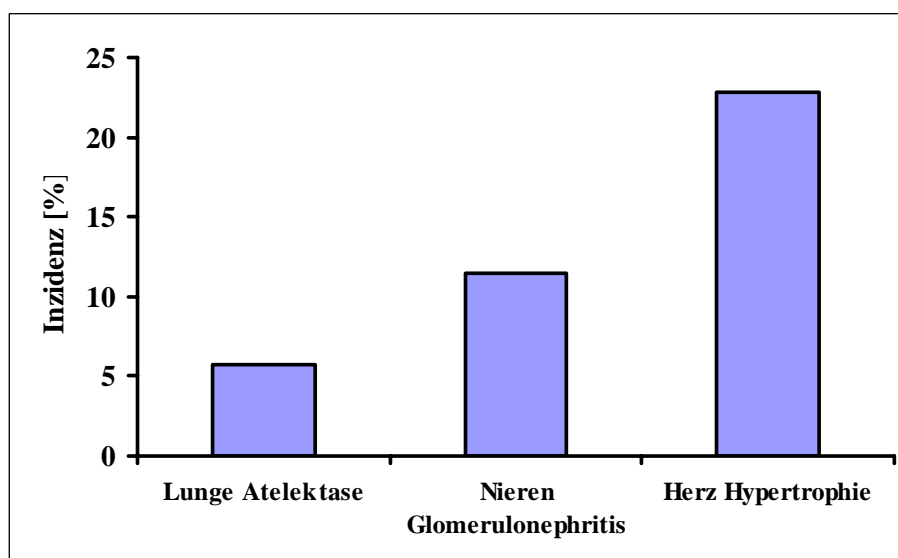


Abbildung 72: Prozentualer Anteil an zusätzlichen histopathologisch detektierten Organerkrankungen in den homozygoten Tieren.

Die Hämatopoese findet normalerweise im Knochenmark sowie im lymphatischen System statt. Eine extramedulläre Hämatopoese kann während der Embryonalzeit erfolgen, im Erwachsenenstadium kommt sie pathologisch in einigen Blutkrankheiten vor. Die Untersuchung der heterozygoten und homozygoten Tiere brachte bei den heterozygoten Mäusen mit 22% eine

hohe extramedulläre Hämatopoese in der Milz zum Vorschein, 5% der Tieren wiesen diese auch in den Lymphknoten auf. Die homozygoten Tiere zeigten eine extramedulläre Hämatopoese in 3-9% der Fälle, mit 3% sogar auch in der Niere.

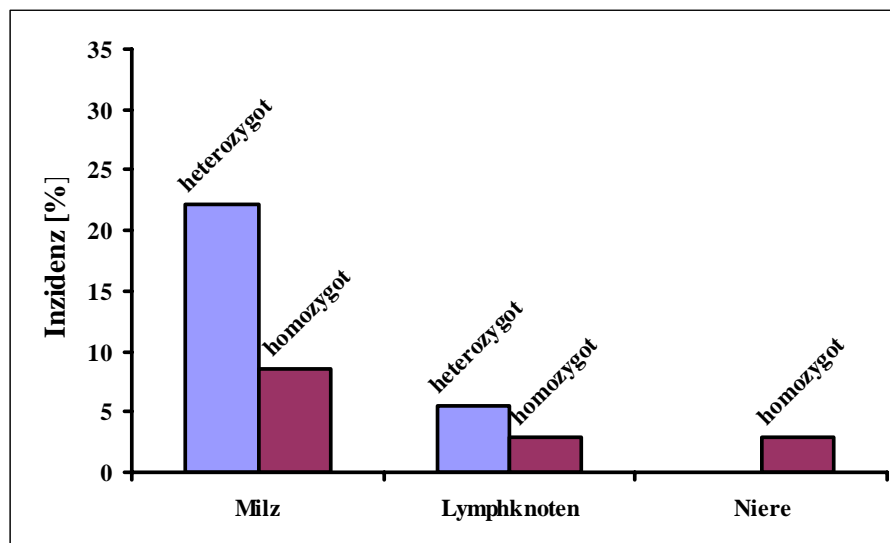


Abbildung 73: Prozentualer Anteil an histopathologisch detektierter extramedullärer Hämatopoese in den genannten Organen.

Bei den heterozygoten Tieren und vermehrt auch bei den homozygoten Tieren wurden lymphozytäre Infiltrate in verschiedene Organe diagnostiziert.

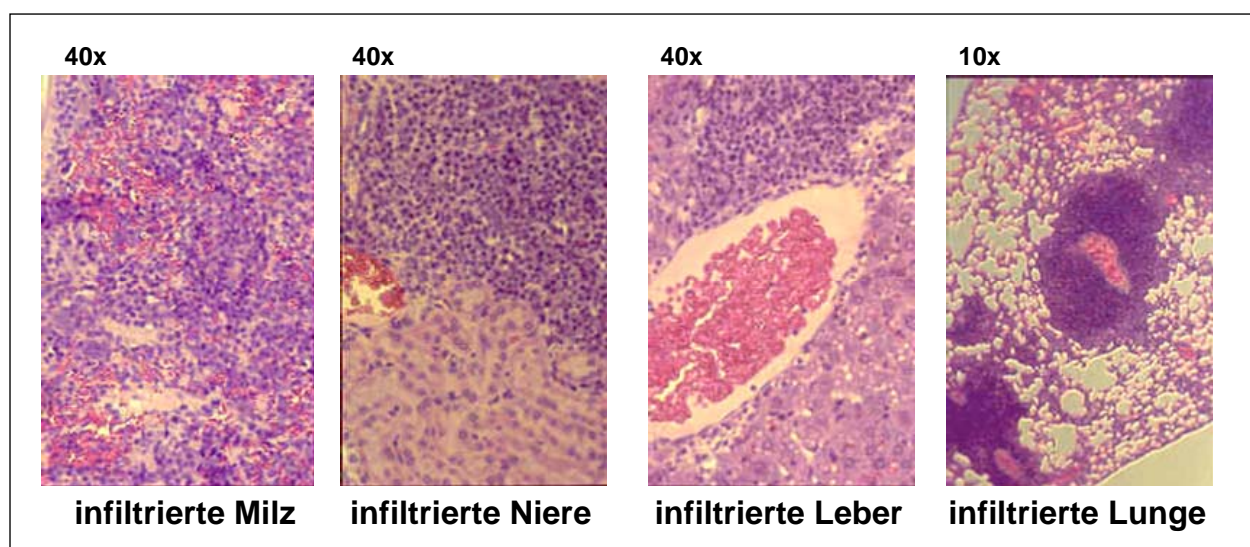


Abbildung 74: Beispiele für die pathologischen Befunde, alle vier Organe zeigen deutliche lymphatische Infiltrate (dunkle Zellen).

So wiesen 37% der homozygoten Tiere eine Infiltration der Milz, 29% eine Infiltration der Nieren und 20% eine Infiltration in der Lunge auf. Ebenfalls konnten Infiltrate in der Speicheldrüse und der Leber nachgewiesen werden, während heterozygote Tiere dort keine Infiltration aufwiesen.

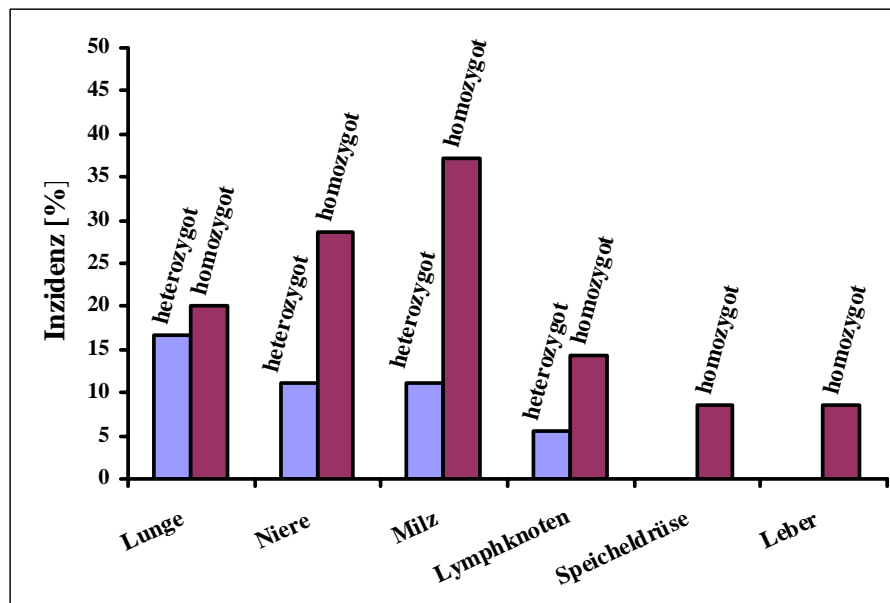


Abbildung 75: Prozentualer Anteil an histopathologisch detektierten lymphozytären Infiltrationen.

Das Zusammenspiel der genannten histopathologischen Erkenntnisse ließ die Einordnung einiger Tiere zu bestimmten hämatologischen Erkrankungen zu. So zeigten 6% der heterozygoten Tiere eine chronisch myeloproliferative und 17% eine lymphoproliferative Erkrankung der B-Zellen. Fast ein Viertel der homozygoten Mäuse erkrankte ebenfalls an einer proliferativen Erkrankung der B-Lymphozyten. Die Beurteilung der histologischen Schnitte ließ die Vermutung zu, dass die betroffenen Tiere an malignen Non-Hodgkin-Lymphomen litten. Dabei deutete die Beteiligung von marginalen B-Zellen auf Marginalzonen-Lymphome des „Mucosa Associated Lymphatic Tissue“ (MALT) Typs hin. Im Falle der myeloproliferativen Erkrankung schien es sich um eine chronische idiopathische Myelofibrose zu handeln.

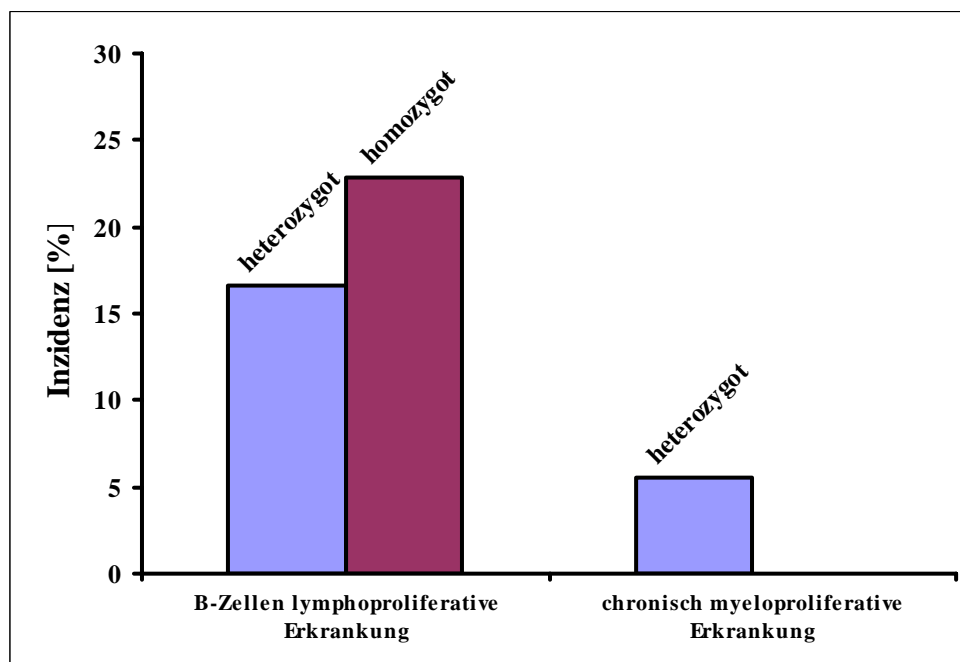


Abbildung 76: Prozentualer Anteil an proliferativen Erkrankungen.

Die untersuchten Wildtyp-Tiere wiesen keine histopathologischen Auffälligkeiten hinsichtlich der extramedullären Hämatopoese oder der lymphatischen Infiltration von Organen auf. Auch konnten keine Erkrankungen der Leber, Milz, Lunge, Nieren oder des Herzens detektiert werden. Allerdings zeigte ein Wildtyp-Tier eine massive Akkumulation von Plasmazellen in einem zervikalen Lymphknoten, was auf eine Erkrankung hindeuten könnte.

5.7 Ergebnisse der Analyse der Bauchhautfibroblasten

5.7.1 Expression der β -Galaktosidase in Bauchhautfibroblasten

Aus der Bauchhaut von jeweils drei verschiedenen Wildtyp- und homozygoten Tieren wurden Fibroblasten für *in vitro* Versuche isoliert und mit einer X-Gal-Färbung gefärbt. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Fibroblasten zeigten die homozygoten Zellen eine deutliche Blaufärbung insbesondere um den Zellkern, während die Peripherie der Zellen nur schwach angefärbt wurde. Aber auch die homozygoten Zellen wiesen nicht alle eine identische Färbungsintensität auf. Zellen, die sich gerade in Teilung befanden, zeigten eine erhöhte Blaufärbung.

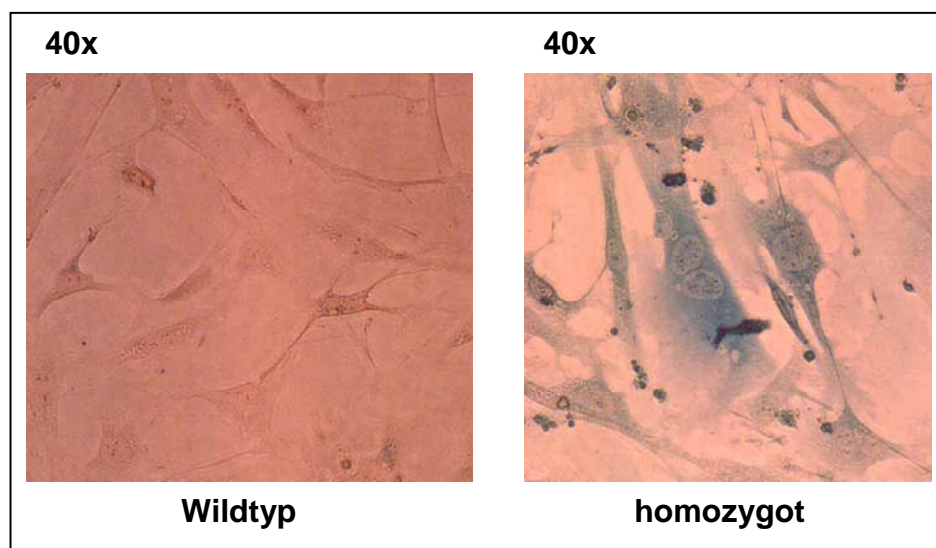


Abbildung 77: Auswertung der X-Gal-Färbung. Die MTUS1-Expression kann vor allem um den Zellkern herum nachgewiesen werden.

5.7.2 Größenbestimmung der Bauchhautfibroblasten

Um die Fibroblasten weiter zu charakterisieren wurden diese im FACS analysiert, wobei eine Anzahl von 5000 Zellen analysiert wurde und die Mittelwerte miteinander verglichen wurden. Es zeigte sich, dass die homozygoten Zellen eine um 25% erniedrigte Größe aufwiesen als die Wildtyp-Fibroblasten.

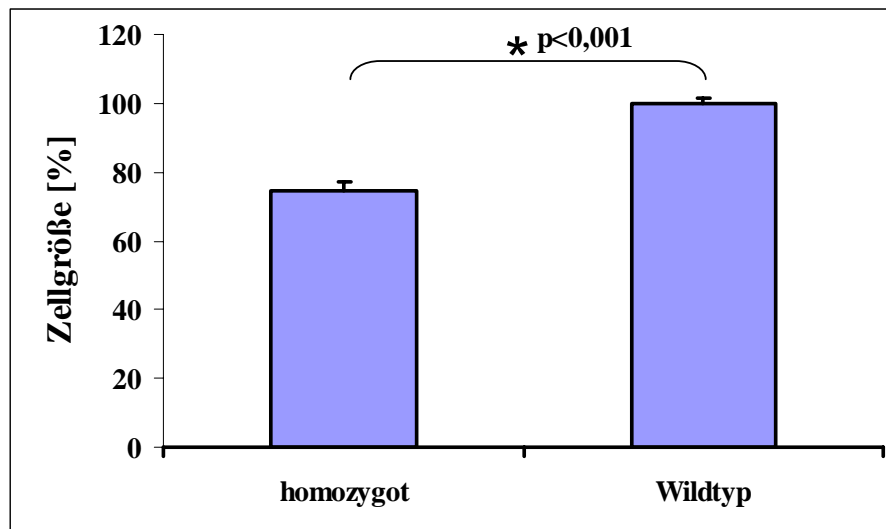


Abbildung 78: Auswertung der FACS-Analyse. Die homozygoten Zellen sind signifikant kleiner.

5.7.3 Proliferation von Bauchhautfibroblasten

Schließlich sollten die Fibroblasten hinsichtlich ihrer Proliferation untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach Wachstumsphase von zwei Tagen mittels Zellzählung analysiert. Die drei Wildtyp- und zwei homozygote Zelllinien zeigten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum. Eine der homozygoten Zelllinien proliferierte dagegen deutlich schneller als die anderen Zelllinien.

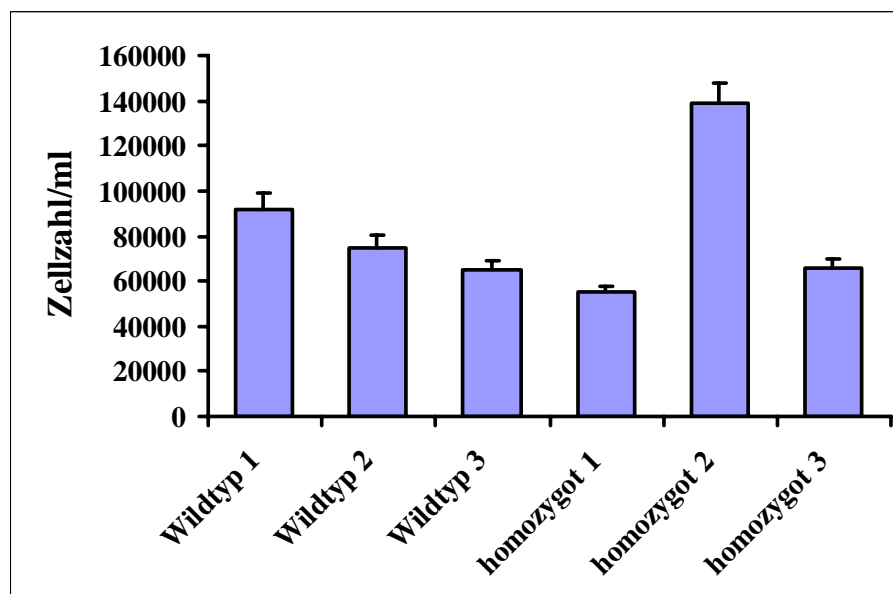


Abbildung 79: Auswertung der Proliferation. Eine homozygote Zelllinie zeigte ein erhöhtes Wachstum.

6. Diskussion

6.1 Untersuchungen an MiaPaCa-2- und HUVEC-Zellen

Die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen stellt neben der Aktivierung von Proto-Onkogenen die häufigste Ursache für die Krebsentstehung dar. Ziel der Untersuchungen im Zellkulturmodell war es, die Mechanismen der Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens MTUS1 in der Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2 zu erforschen.

Mit den MiaPaCa-2-Zellen wurde ein Zellkulturmodell gewählt, das für seine hohe Proliferationsrate und sein undifferenziertes Wachstum bekannt ist. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MiaPaCa-2-Zellen keine MTUS1-mRNA-Expression aufweisen und die Zellproliferation bei Transfektion von MTUS1 signifikant vermindert wird (Seibold et al., 2003).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen an MiaPaCa-2-Zellen brachten weitere Erkenntnisse bezüglich der MTUS1-Inaktivierung in diesen Zellen. Eine oft beschriebene und weit verbreitete Folge von genomischen Mutationen stellt die Geninaktivierung dar. So besitzen heterozygote Träger einer Mutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen, die einen Funktionsverlust des betreffenden Allels zur Folge hat, eine deutliche Präposition für eine Brustkrebserkrankung (Daniel, 2002). Mutationen im p16-Gen werden unter anderem mit der Entstehung von Melanomen, Mutationen der hMSH2- und hMLH1-Gene mit der Entstehung von Colonkarzinomen in Verbindung gebracht (Holland et al., 1999; Farrington et al., 1998).

Eine Mutation kann in der Promotorregion oder in der codierenden Sequenz lokalisiert sein, um den Funktionsverlust eines Gens auszulösen. Durch eine veränderte Basenfolge kann der Promotorbereich unter Umständen nicht mehr als Transkriptionsstart erkannt werden, so dass kein Protein gebildet wird. Eine Veränderung in der codierenden Sequenz kann durch eine veränderte Proteinsequenz zu einer funktionellen Störung des Genproduktes führen.

Bei den Untersuchungen zu Mutationen im vorhergesagten Promotorbereich von MTUS1 wurde keine Mutation detektiert. Allerdings wurde eine Punktmutation in Exon 2 entdeckt, die sich in einer zweiten Sequenzierung bestätigte. Datenbankrecherchen ergaben aber für die resultierende Proteinsequenz der mutierten DNA die gleiche Aminosäurefolge wie für die nicht mutierte DNA. Eine Inaktivierung des MTUS1-Gens durch eine genomische Mutation in Promotorbereich oder in der Exon Sequenz kann deshalb ausgeschlossen werden.

Für zahlreiche Gene wurde postuliert, dass die Methylierung der Promotorregion regulierend in die Transkription und damit in die Expression von Proteinen eingreifen kann (Wajed et al., 2000). Bei der Untersuchung des vorhergesagten Promotorbereichs in MiaPaCa-2-Zellen ergab eine Analyse der Methylierung von so genannten CpG- und CpNpG-Inseln Unterschiede zwischen den untersuchten MiaPaCa-2-Zellen und den als Kontrollzellen verwendeten HUVEC-Zellen.

Im Genom von Säugetieren und Menschen findet sich neben den vier Nukleotiden Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin auch die methylierte Form des Cytosins. Diese modifizierte Form des Cytosins wird erst nach der Replikation der DNA gebildet, in dem ein Enzym aus der Gruppe der Methyltransferasen das Cytosin an Position 5 methyliert. Die Methylierung findet in eukaryotischen Zellen vorwiegend an Cytosin-Molekülen statt, die Teil des 5' CpG 3'-Dinukleotids sind (Gruenbaum et al., 1982). Dabei sind die Cytosin-Moleküle dieses Dinukleotids im Doppelstrang symmetrisch methyliert (Riggs et al., 1983). In so genannten 5' CpNpG 3'-Trinukleotiden wurde ebenfalls die Möglichkeit einer Methylierung nachgewiesen,

wobei N für jede der vier Hauptbasen stehen kann (Clark et al., 1995). Bisher gibt es nur wenige Studien zu den Sequenzkombinationen CCAGG oder CCTGG, in denen das erste Cytosin methyliert vorliegen kann (Lorincz et al., 2001). In Säugetierzellen liegen ca. 3-5% aller Cytosine methyliert vor.

Die CpG-Dinukleotide kommen gehäuft in Promotorregionen vor, während sie außerhalb von diesen Abschnitten nur vereinzelt auftreten. Außerhalb von Promotorbereichen liegen die Cytosine in CpG-Inseln zumeist methyliert vor, während die Cytosine innerhalb einer Promotorregion meist unmethyliert sind (Herman et al., 2003).

Unterschiede in der Methylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion wurden bereits oft als Ursache für die Inaktivierung von Genen beschrieben. Bei Tumorsuppressor-Genen wie z.B. dem bekannten p16-Gen, wurde eine Hypermethylierung der CpG-Inseln des Promotorbereichs in verschiedenen Tumorgeweben als Ursache für die Geninaktivierung gefunden (Wajed et al., 2000). Das TIMP-3-Gen kann unter anderem in Nierenzellkarzinomen und Gehirntumoren durch Hypermethylierung des Promotors still gelegt werden (Bachman et al., 1999). Auch das GSTP1-Gen kann durch Hypermethylierung der CpG-Inseln in der Promotorregion inaktiviert sein. Diese Veränderung ist die häufigste genomische Abnormalität in humanen Prostatakarzinomen (Bastian et al., 2005).

Gleichzeitig kann in den Tumorgeweben meistens auch eine Hypomethylierung der Cytosin-Moleküle außerhalb des Promotorbereichs beobachtet werden. Diese sind in den Normalgeweben zumeist methyliert (Herman et al., 2005). Für die Tumorentstehung und Progression sind beide Methylierungsmuster von großer Bedeutung. In neueren Arbeiten konnte sogar gezeigt werden, dass die Hypomethylierung außerhalb des Promotors ein Fortschreiten der Tumorgenese in späteren Stadien von intestinalen Tumoren unterdrücken kann, wohingegen Frühstadien durch einen „Loss of Heterozygosity“ Mechanismus unterstützt werden können (Yamada et al., 2005). In den meisten Fällen einer Geninaktivierung liegen die Cytosin-Moleküle in den CpG-Inseln demnach hypermethyliert vor, wohingegen die Cytosine in den CpG-Inseln außerhalb von Promotoren vorwiegend unmethyliert sind (Herman et al., 2003).

Man geht zurzeit davon aus, dass der inhibitorische Effekt der Hypermethylierung der Promotorregion durch spezielle Proteine vermittelt wird. Diese Proteine enthalten neben einer Methyl-CpG-Bindungsstelle eine Domäne, welche die Transkription des Gens verhindern kann. Dazu kann diese transkriptionelle Repressordomäne mit Korepressor-Molekülen und Histon-Deacetylasen Komplexe bilden, so dass die Histon-Moleküle, um die die DNA gewunden ist, deacetyliert werden. In der Folge verändert sich die Chromatin-Struktur der DNA derartig, dass der freie Zugang zur DNA erschwert und die Transkription unterbunden wird (Wajed et al., 2000).

Obwohl die Hypermethylierung bei den meisten Tumorsuppressor-Genen für eine Inaktivierung und damit für die Regulation des Gens steht, gibt es bereits Daten, wonach die Hypomethylierung des Promotors die regulierende Rolle spielt. Ein Beispiel dafür ist das Proto-Onkogen bcl-2, das durch eine Hypomethylierung der Promotorregion erst aktiviert wird (Hanada et al., 1993). Auch bei dem Proto-Onkogen c-myc wurde in den Tumorzellen eine reduzierte Methylierung in der Promotorregion einhergehend mit einer erhöhten Protein-Expression gefunden (Sharrard et al., 1992). Neuere Publikationen verbinden die Promotor-Hypomethylierung des LINE-1-Gens und die damit verbundene Aktivierung des Gens mit der Progression der chronisch myeloischen Leukämie (Roman-Gonez et al., 2005) oder untersuchen die Hypomethylierung des XIST-Promotors im Prostatakarzinom (Laner et al., 2005). In einer neueren Untersuchung konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Demethylierung der Promotorregion z.B. bei dem MAGE-Gen und die daraus resultierende Aktivierung des Gens

vorwiegend in Tumoren im fortgeschrittenen Stadium nachzuweisen ist und damit eine schlechtere Prognose einhergeht (Tamura, 2005).

Auch wenn bisher nur wenige Studien zu anderen methylierbaren Sequenzkombinationen veröffentlicht sind, so gibt es doch Hinweise, dass eine Methylierung von CCAGG oder CCTGG Sequenzen eine repressorische Wirkung von 50% auf die Transkription des B29-Gens in der Zellkultur ausübt (Malone et al., 1998). Eine regulative Funktion von methylierten Cytosinen auch außerhalb von CpG-Inseln kann damit bestätigt werden.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Methylierung von CpNpG-Inseln *in vivo* erfolgen kann (Lorincz et al., 2001). Damit ist die Grundvoraussetzung dafür gegeben, dass diese Methylierung von der Zelle regulierend eingesetzt werden kann. Bisher sind dazu allerdings noch keine Daten bekannt. Man geht davon aus, dass die Methylierung von CpNpG-Inseln zur Stabilisierung der DNA beitragen kann (Lorincz et al., 2001).

Im hier gezeigten Vergleich von MiaPaCa-2-Zellen und HUVEC-Zellen ergab die Methylierung der CpG-Inseln keine Unterschiede, alle Cytosin-Moleküle lagen im methylierten Zustand vor. Die Analyse der CpNpG-Inseln hingegen zeigte eine vermehrte Methylierung der Cytosine in den HUVEC-Zellen. Eine mögliche Interpretation dieser Resultate wäre zum einen, dass die untersuchte Sequenz nicht die richtige Promotorsequenz darstellt. Dafür würde sprechen, dass die Cytosine in CpG-Inseln außerhalb von Promotorregionen meist methyliert vorliegen. Im Falle einer Geninaktivierung durch Promotor-Hypermethylierung liegen die Cytosine außerhalb der Promotorregion allerdings meist nicht mehr methyliert, sondern unmethyliert vor (Herman et al., 2003). Sollte das MTUS1-Gen also in MiaPaCa-2-Zellen durch die Hypermethylierung einer anderen Stelle inaktiviert sein, so müssten die untersuchten Cytosin-Moleküle unmethyliert vorliegen. Eine weitere Erklärung wäre auch, dass das MTUS1-Gen nicht über eine Methylierung der Promotorregion reguliert wird. Nur ca. 80% aller Gene weisen in der Promotorregion eine Häufung von CpG-Inseln auf. Auch könnte im MTUS1-Gen nicht die Methylierung der CpG-Inseln, sondern die Methylierung der CpNpG-Inseln zur Regulation des Gens beitragen. Nachdem in den HUVEC-Zellen eine erhöhte Methylierung dieser Sequenzen gefunden wurde und als eine mögliche Eigenschaft die Stabilisierung der DNA diskutiert wird, könnte die verminderte Methylierung in den MiaPaCa-2-Zellen auf einen Stabilitätsverlust der DNA hindeuten. Die Folge davon könnte eine verminderte Genaktivität sein.

Die beobachteten Methylierungsunterschiede könnten in der untersuchten Promotorsequenz verantwortlich für die Inaktivierung des MTUS1-Gens in MiaPaCa-2-Zellen sein, ob die Sequenz auch tatsächlich eine transkriptionsregulierende Funktion aufweist, konnte mit Hilfe eines Promotor-Assays geklärt werden. Die Transfektion von Zellen mit so genannten Luciferase-Reportervektoren ist mittlerweile eine gängige Methode zur Bestimmung von Promotoraktivitäten. Durch das Einbringen von ganzen Promotorregionen oder nur Teilstücken eines Promotors in die Luciferase-Reportervektoren können die Auswirkungen dieser Sequenzen auf die Transkription *in vitro* untersucht werden. Die transkriptionsregulierende DNA-Sequenz kann so sehr genau bestimmt werden (Chen et al., 2006). Zu beachten ist bei den Luciferase-Assays, dass die Größe des Vektorinserts invers mit der Luciferaseaktivität korreliert und bei der Auswertung eines Luciferase-Assays beachtet werden sollte (Yin et al., 2005). Die von uns verwendeten Konstrukte wiesen einen Größenunterschied von ca. 600 Basenpaaren auf, wobei das größere Konstrukt Luci F1-R2 in pGL3 Basic zusätzlich die vorhergesagte Promotorsequenz enthielt. Nachdem dieses Konstrukt aber dennoch eine höhere Luciferaseaktivität zur Folge hatte, können diese Werte für eine glaubhafte Bewertung zur Verfügung stehen.

Die Ergebnisse des Luciferase-Assays ergaben eine signifikant erhöhte Lumineszenz mit dem Luci F1-R2 Konstrukt in pGL3 basic, so dass die vorhergesagte Promotorsequenz tatsächlich eine erhöhte Transkription bewirken konnte.

Nachdem somit der Nachweis geführt werden konnte, dass die untersuchte Promotorsequenz eine erhöhte Transkription bewirkt, könnten die beobachteten Methylierungsunterschiede in dieser Region für die Inaktivierung von MTUS1 verantwortlich sein.

Seibold und Kollegen wiesen in verschiedenen Tumorzelllinien, darunter auch die MiaPaCa-2-Zellen, eine Inaktivierung von MTUS1 nach (Seibold et al., 2003). Darüber hinaus wurde bei MiaPaCa-2-Zellen mit rekombinanter Expression von MTUS1 eine signifikant reduzierte Proliferation festgestellt, so dass für MTUS1 eine proliferationsregulierende Funktion und daraus abgeleitet eine Beteiligung in der Tumorgenese postuliert wurde (Seibold et al., 2003).

Die Versuche mit MTUS1-siRNA konnten Aufschluss über diese Hypothese geben, nachdem mit der Transfektion einer spezifischen doppelsträngigen siRNA in der Zellkultur der Knockout eines bestimmten Gens simuliert werden kann. Bei dieser so genannten RNA-Interferenz kann ein zelleigener Abwehrmechanismus genutzt werden. Dieser basiert darauf, dass doppelsträngige RNA nicht nativ in den Zellen vorkommt, sondern nur von extern z.B. durch einen Virenangriff in die Zelle gelangen kann. Die spezifische Sequenz der siRNA dient schließlich als Erkennungssequenz der mRNA, die dadurch zerschnitten wird und so ein hoch spezifischer funktioneller Knockout erreicht werden kann. Solche gezielten Gen-Knockouts sind in der Zellkultur eine gängige Methode, um z.B. die Auswirkungen eines Wachstumsfaktors auf die Proliferation von Krebszellen oder die Funktionen eines Rezeptors zu untersuchen (Shen et al., 2005; Zhang et al., 2006).

Die Analyse von MTUS1-siRNA-transfizierten HUVEC-Zellen mittels Western-Blot bestätigte den funktionellen MTUS1-Knockout in diesen Zellen. Die anschließenden Proliferationsversuche zeigten, dass das Wachstum von HUVEC-Zellen bei einer funktionellen MTUS1-Inaktivierung signifikant erhöht werden kann. Wie bereits erwähnt, konnte diese proliferationsregulierende Funktion von MTUS1 auch in entgegengesetztem Zusammenhang nachgewiesen werden. Es kann deshalb die Hypothese bestätigt werden, dass MTUS1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation spielt und somit Eigenschaften eines Tumorsuppressor-Gens aufweist.

6.2 Untersuchungen an humanen Colongeweben

Bei den meisten bekannten Krebserkrankungen finden sich Mutationen oder sonstige Inaktivierungen von einem oder mehreren Tumorsuppressor-Genen. Viele solcher Gene sind mittlerweile gut charakterisiert, dennoch werden für bestimmte Genregionen Tumorsuppressor-Gene postuliert, die noch nicht publiziert worden sind. Lange Zeit wurde für die Genregion 8p21.3-22 auf Chromosom 8 zwischen den Markern D8S254 und D8S261 ein Tumorsuppressor-Gen vermutet (Seibold et al., 2003), das mit der Entstehung und der Progression von vielen verschiedenen Karzinomen in Verbindung gebracht wurde (Fujiwara et al., 1993; Bardi et al., 1993; Kerangueven et al., 1997; Ishii et al., 1999; Chan et al., 2002; Wistuba et al., 1999; Suzuki et al., 1995; Wagner et al., 1997; El Naggar et al., 1998). Auch funktionell konnte die Existenz eines Tumorsuppressor-Gens auf Chromosom 8 bestätigt werden. Zum einen ließ sich durch Transfer von gesundem Chromosom 8 in kolorektale Tumorzelllinien das maligne Potential der Tumorzellen reduzieren (Gustafson et al., 1996). Zum anderen konnte durch Chromosom-8-Transfer das Metastasierungspotential in Prostatakarzinomzellen verringert werden (Ichikawa et al., 1994). Das 2003 publizierte MTUS1-Gen ist auf Chromosom 8p21.3-22 lokalisiert, dabei ist

der Marker D8S254 nur 0,9 Megabasen, und der Marker D8S261 nur 0,1 Megabasen vom MTUS1-Gen entfernt. MTUS1 wird ubiquitär in allen gesunden Geweben exprimiert, somit auch in den Geweben für die eine Progression der Tumoren beim Allelverlust von 8p21.3-22 gezeigt werden konnte (Seibold et al., 2003). Eine neuere Untersuchung bestätigt die signifikant verminderte Expression von MTUS1 in Ovarialtumoren (Pils et al., 2005).

Die hier durchgeführten Untersuchungen an zehn Patienten mit Colonkarzinomen sollten Aufschluss über die Expression von MTUS1 in diesen Geweben geben und damit die Hypothese bestärken, dass es sich bei MTUS1 um ein Tumorsuppressor-Gen handelt. Bei acht der zehn Patienten ergaben die Western-Blot-Analysen der Proteine eine deutliche Reduktion der MTUS1-Expression in den Colontumorgeweben gegenüber den jeweiligen Normalgeweben. Bei fünf der zehn Patienten lag die Reduktion der Protein-Expression sogar bei 35-75%. Bei diesen fünf Patienten ergab die Untersuchung der MTUS1-mRNA-Expression ebenfalls eine hoch signifikante Reduktion der Expression in den Tumorgeweben im Vergleich zu den Proben aus dem umgebenden Normalgewebe. Bei der Hälfte der untersuchten Patienten liegt demnach die Vermutung nahe, dass MTUS1 in der Funktion eines Tumorsuppressor-Gens die Entstehung von Colontumoren beeinflussen kann.

Als Ursache für eine derartig erniedrigte MTUS1-Expression können mehrere Gründe in Betracht kommen. Denkbar wäre eine verminderte Transkription des MTUS1-Gens bedingt durch eine Mutation im Promotorbereich oder in der codierenden Sequenz. Für die Gene hMSH und hMLH1 wurde bereits beschrieben, dass Mutationen in der Sequenz dieser Gene die Entstehung von Colontumoren begünstigen (Farrington et al., 1998). Genomische Mutationen können durch die Sequenzänderung der DNA eine veränderte Aminosäuresequenz des resultierenden Proteins zur Folge haben. Dieses veränderte Protein kann seine Funktion nur noch teilweise oder gar nicht mehr erfüllen, was zu einer funktionellen Inaktivierung des Gens führt. Andererseits können Mutationen aber auch eine verminderte oder fehlende Transkription bedingen. Denkbar wäre hier ein mutierter Promotorbereich, der nicht mehr als Transkriptionsstart erkannt werden kann oder eine Mutation in der Exonsequenz, die zum Abbruch der Transkription führt. Die Sequenzanalyse der vorhergesagten Promotorregion und der cDNA der Colontumore brachte allerdings keine Hinweise auf eine derartige Mutation. Dieses Resultat stimmt mit kürzlich publizierten Beobachtungen überein, nach denen in hepatozellulären Karzinomen nur fünf von 108 untersuchten Geweben MTUS1-Mutationen aufwiesen (DiBenedetto et al., 2006).

Wie unter 6.1 bereits diskutiert, können verschiedene Methylierungsmuster der CpG-Inseln im Promotorbereich für eine Genregulation verantwortlich sein, wobei die Hypermethylierung in der Regel zur Inaktivierung und die Hypomethylierung zu Aktivierung von Genen führen kann (Wajed et al., 2000; Hanada M et al., 1993). Ebenfalls beschrieben wurden mittlerweile verschiedene Methylierungsmuster für Cytosine außerhalb von CpG-Inseln. Dabei wurden vor allem Cytosine in der Kombination CCTGG, CCAGG und CpNpG untersucht (Malone et al., 1998; Lorincz et al., 2001).

Der Nachweis der Methylierung des vorhergesagten Promotors zeigte in unseren Versuchen schließlich auch Unterschiede zwischen den Tumorgeweben und dem umgebenden Normalgewebe auf. Zwar befanden sich die untersuchten CpG-Inseln bis auf einen Fall alle im methylierten Zustand. Drei der fünf Patienten mit hohem MTUS1-Expressionsunterschied in Tumor- und Normalgewebe zeigten aber eine verringerte Methylierung der Cytosin-Moleküle in den CpNpG-Inseln im Tumorgewebe. Ein Patient mit nur ca. 15% erniedrigter MTUS1-Protein-Expression im Tumorgewebe zeigte ebenfalls eine verringerte Methylierung in den CpG-Inseln

der Promotorregion des Tumorgewebes. Der fünfte untersuchte Patient hingegen zeigte eine erhöhte Methylierung im Tumorgewebe. Dieses Ergebnis korreliert aber ebenfalls mit den vorher ermittelten Werten der MTUS1-Protein-Expression, da der Patient im Tumorgewebe eine leicht erhöhte MTUS1-Expression aufwies.

Nach diesen und den bereits erwähnten Ergebnissen der MiaPaCa-2-Untersuchungen liegt die Vermutung nahe, dass die Genaktivität von MTUS1 durch die Methylierung der Cytosin-Moleküle in der untersuchten Region reguliert werden könnte. Eine erhöhte Genaktivität wurde in den hier gezeigten Versuchen bei einer erhöhten Methylierung der CpNpG-Inseln der Promotorregion beobachtet, eine erniedrigte Genaktivität entsprechend bei einer niedrigeren Methylierung.

Die Analyse der Methylierungsmuster könnte in Zukunft nicht nur zur Erstellung einer Diagnose oder Prognose eingesetzt werden, denkbar wäre auch die Inaktivierung z.B. eines Proto-Onkogens mit Hilfe einer Methylierung der Promotorregion oder die Reaktivierung z. B. eines Tumorsuppressor-Gens durch die Blockierung oder Aktivierung der DNA-Methyltransferasen und somit einer gezielten Tumorthherapie. Die ersten potenziellen Inhibitoren der DNA-Methyltransferase wie z.B. das RG108 werden bereits *in vitro* getestet (Brueckner, 2005), vor dem klinischen Einsatz müssen allerdings noch viele Fragen bezüglich der Funktion der Methylierung im Promotor, in der Exon- und der Intronsequenz geklärt werden.

6.3 Untersuchungen an MTUS1-Knockout-Mäusen

Die Etablierung von so genannten Knockout-Mäusen wird mittlerweile in vielen Gebieten zur besseren Erforschung von Expressionsmustern und Funktionen von Genen eingesetzt. Der Vorteil dieser Maus-Modelle besteht vor allem darin, dass die komplexen Interaktionen von Enzymen und Proteinen nicht isoliert in Zellkulturen betrachtet werden, sondern im Gesamtzusammenhang des Körpers. Durch das Abschalten eines bestimmten Gens, können die Auswirkungen und damit die Funktion des Gens viel umfassender analysiert werden (Hanahan, 1989).

Aktivierte Proto-Onkogene reagieren im Mechanismus meist dominant, so dass bereits die Veränderung eines Allels Auslöser für die Entstehung oder das Fortschreiten einer Krebserkrankung sein kann. Tumorsuppressor-Gene verhalten sich dagegen meist rezessiv, so dass auch eine Veränderung des zweiten Allels nötig ist, um eine maligne Veränderung hervorzurufen. Vererbliche Präpositionen für bestimmte Tumorerkrankungen gehen daher meist mit der Vererbung eines fehlerhaften Allels einher, während das zweite Allel noch intakt ist (Ghebranious et al., 1998). Für die meisten der bekannten Tumorsuppressor-Gene wurden Knockout-Mäuse entwickelt. Gleich mehrere Forschungsgruppen generierten Anfang der 90er Jahre Knockout-Mäuse für das p53-, p16- oder BRCA1-Gen (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994; Serrano et al., 1996; Hakem et al., 1996; Liu et al., 1996). Diese Maus-Modelle ergaben neue Aspekte hinsichtlich der Rolle der betreffenden Gene in der embryonalen Entwicklung, der Regulation des Zellzyklus und der Tumor-Suppression (Ghebranious et al., 1998). Solche neuen Erkenntnisse erhofft man sich auch von der Entwicklung eines MTUS1-Knockout-Maus-Modells.

Die Generierung der MTUS1-Knockout-Maus lag in der erfolgreichen Kultivierung der MTUS1-Knockout-Stammzellen begründet, wodurch gesunde und undifferenzierte Zellen für die Blastozysteninjektion gewonnen werden konnten.

Die Analyse der Vektorlage im MTUS1-Gen mittels PCR bestätigte die Integration des Vektors an Position 41407 (Genbank Nr. AC116511) zwischen Exon 3 und 4. Nachdem das MTUS1-Gen aus zehn Exons besteht, ist diese Lage für einen Gen-Knockout gut geeignet, da bei einer Insertion des Vektors in einem vorderen Bereich das Risiko besteht, dass der Vektor bei Splicevarianten wieder aus der Sequenz entfernt werden kann. In einem hinteren Bereich, etwa zwischen Exon 9 und 10 besteht hingegen die Gefahr, dass das Protein nicht ausreichend verändert und somit der funktionelle Knockout unvollständig ist.

Durch die Injektionen der MTUS1-defizienten Stammzellen in C57/Bl6-Blastozysten konnten schließlich vier chimäre Männchen erhalten werden, von denen eines das veränderte MTUS1-Gen vererben konnte. Nachdem in den Stammzellen nur ein MTUS1-Allel mit der Insertionsmutagenese ausgeschaltet worden war, zeigten ca. 50% der erhaltenen Nachkommen einen Wildtyp-Genotyp, die andere Hälfte wies einen heterozygoten Genotyp auf. Bei den daraus gezüchteten homozygoten Tieren konnte ein Knockout in beiden MTUS1-Allelen nachgewiesen werden.

Nachdem für Knockout-Tiere von Tumorsuppressor-Genen wie z.B. dem p53-Gen bereits Daten publiziert wurden, die von einer unterschiedlichen Tumorlokalisierung begründet auf die Ausgangs-Mauslinie berichteten (Harvey et al., 1993), wurden die MTUS1-Knockout-Tiere auf den C57/Bl6- und den Balb/c-Hintergrund gezüchtet. Die dreimaligen Rückkreuzungen der Knockout-Tiere auf C57/Bl6- und auf Balb/c-Hintergrund entsprachen einem gängigen Procedere, um die Einflüsse von verschiedenen Ausgangs-Mauslinien im Versuch zu minimieren. Dieser Vorgang dauerte ca. ein Jahr, deshalb wurden sämtliche hier beschriebenen Versuche mit direkt verkreuzten homozygoten Tieren des C57/Bl6-Hintergrunds durchgeführt. Für weitere Untersuchungen wäre es allerdings interessant, die erzielten Ergebnisse mit Tieren eines Balb/c-Hintergrunds zu vergleichen.

Die Grundlage aller Untersuchungen an den Knockout-Tieren stellte der Nachweis des funktionierenden Knockouts des MTUS1-Gens dar. Die Insertion des Vektors zwischen Exon 3 und 4 allein erbringt dabei noch keinen ausreichenden Beweis, da eine erfolgreiche Integration des Vektors eventuell durch eine unvorhergesehene Splicevariante eliminiert werden kann. Die Firma Baygenomics, die die verwendete Stammzelllinie RRA048 für die Generierung der Knockout-Maus zur Verfügung gestellt hat, bestätigte zwar ein korrektes Splicen *in vitro*, allerdings könnten *in vivo* nicht berücksichtigte Splicevarianten vorkommen.

Der Nachweis des Knockouts auf DNA-Ebene wurde vor der Etablierung der PCR-Technik mit Southern-Blot-Analysen durchgeführt, die allerdings mehrere Tage in Anspruch nahm. Schneller und weitaus effektiver werden seitdem DNA-Proben mit Hilfe einer PCR analysiert (Gaw et al., 1995).

Für die Verifizierung des tatsächlich geglückten Knockouts wurden die DNA, die mRNA und Proteine von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tiere analysiert. Alle Ergebnisse der PCR- und Western-Blot-Analysen bestätigten den vollständigen Knockout des Gens. Damit kann davon ausgegangen werden, dass sämtliche beobachtete Veränderungen der Knockout-Maus auf die erfolgreiche Inaktivierung des MTUS1-Gens zurückzuführen sind.

Zur Erstellung von Expressionsprofilen von Genen können so genannte Gewebe Microarrays verwendet werden, bei denen die zu untersuchenden Gewebe in kleinen Feldern auf Platten fixiert sind. Durch immunhistologische Färbung kann dann schnell und gleichzeitig in sehr vielen Geweben auf die Expression eines bestimmten Gens getestet werden. Beschrieben sind solche Expressionsprofile für unterschiedliche Tumorarten von vielen Tumorsuppressor-Genen wie z.B. dem p53-Gen in Non-Hodgkin-Lymphomen (Went et al., 2004). Eine andere

Möglichkeit für den Nachweis der Genexpression in bestimmten Organen ist die cDNA-Analyse mittels PCR.

Für MTUS1 wurde mit dieser Methode bereits die Expression in vielen verschiedenen Organen detektiert (Seibold et al., 2003). Auch die Tumoren, bei denen MTUS1 möglicherweise als Tumorsuppressor-Gen eine Rolle spielt, finden sich in vielen verschiedenen Organen (Pils et al., 2005; Fujiwara et al., 1993). Bisher gibt es aber noch keine Ergebnisse zu der Verteilung der MTUS1-Expression innerhalb der Organe. Denkbar wäre hier theoretisch eine gleichmäßige Expression, aber die Mehrzahl von Genen weist entsprechend ihrer Funktion eine erhöhte Expression in bestimmten Organkompartimenten auf. Diese Verteilung sollte im Rahmen dieser Arbeit für das MTUS1-Gen näher untersucht werden.

Durch die so genannte X-Gal-Färbung lässt sich das Enzym β -Galaktosidase nachweisen, das normalerweise nicht in Mäusen exprimiert ist. Bei der Etablierung von transgenen Mäusen setzt man allerdings bevorzugt Vektoren ein, die eine Exonsequenz für ein β -Galaktosidase/Neomycin-Fusionsprotein besitzen. Mit Hilfe dieser Vektoren wird das β -Galaktosidase Enzym in den Zellen gebildet, in denen eigentlich das Zielgen exprimiert worden wäre. In manchen Publikationen wurde so die Aktivität von Promotoren in den unterschiedlichen Organkompartimenten untersucht (Bundschu et al., 2006).

Bei der Generierung der MTUS1-Knockout-Maus wurde ebenfalls ein Insertionsvektor verwendet, der für das β -Galaktosidase/Neomycin-Fusionsgen kodiert. Nachdem dieser Vektor aber nach dem MTUS1 Exon 3 integriert wurde, steht dieses Fusionsgen unter der Kontrolle des MTUS1-Promotors. Das Fusionsprotein wird in der Folge immer dann transkribiert, wenn der MTUS1-Promotor aktiviert wird und kann dann mit Hilfe der X-Gal-Färbung detektiert werden. Mit dieser Methode konnte so die Aktivität des MTUS1-Gens nicht nur allgemein in den Organen, sondern vielmehr in den Organkompartimenten analysiert werden.

Die Ergebnisse der Färbung zeigten, dass das MTUS1-Gen vor allem in Epithelzellen und Endothelzellen aktiviert ist. So waren im Colongewebe und dem Lungengewebe vor allem die Epithelzellen und die Endothelzellen der Blutgefäße gefärbt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass eine große MTUS1-Aktivität in den Kardiomyozyten vorlag. Im Gehirn waren die Purkinjefasern in der Kleinhirnrinde stark gefärbt. Die Hepatozyten der Leber wiesen eine relativ gleichmäßig verteilte Färbung auf, ebenso zeigten die Muskelfaserzellen eine mosaikartige Färbung. Die Milz wird von einer bindegewebsartigen, von Peritonealepithel umgebenen Kapsel umgeben, die eine leichte Färbung aufwies. Das Thymusgewebe zeigte eine Färbung der epithelialen Zellen, die sich netzartig durch den Thymus hindurch ziehen. Schließlich konnte in der Nebenniere eine Färbung im Bereich der Kapsel und der äußeren Rindenzone nachgewiesen werden.

Nachdem MTUS1 mit dem AT2-Rezeptor interagieren kann, könnte die antiproliferative Wirkung von MTUS1 durch den gleichen Mechanismus wie beim AT2-Rezeptor erfolgen. Für diesen wurde bereits beschrieben, dass er die Zellproliferation in Endothelzellen des Herzens inhibieren kann (Stoll et al., 1995). Außerdem soll der AT2-Rezeptor die Regenerierung von Nerven wie dem Sehnerv fördern (Lucius et al., 1998), genauso wie die Differenzierung in neuronalen Zellen (Meffert et al., 1996). Im Gehirn kann eine AT2-Rezeptor Lokalisation unter anderem in den Purkinjefasern nachgewiesen werden (Reagan et al., 1994). In der Nebenniere ist der AT2-Rezeptor vorwiegend in der Nebennierenrinde lokalisiert (Wintour et al., 1999), während die Verbreitung des Rezeptors in den Skelettmuskeln auf die großen und kleinen Blutgefäße festgelegt werden konnte. Hier wiesen vor allem die Endothelzellen eine Expression auf (Nora et al., 1998). Diese Daten zeigen eine mögliche Übereinstimmung der Lokalisation von MTUS1 und dem AT2-Rezeptor und unterstützen so die Vermutung, dass MTUS1 mit dem AT2-Rezeptor interagiert und die Funktionen von MTUS1 und AT2-Rezeptor gemeinsam vermittelt werden.

Die klinische und pathologische Untersuchung der Knockout-Mäuse über einen längeren Zeitraum stellt eine der wichtigsten Methoden zur Beurteilung der Funktion des ausgeschalteten Gens dar.

Die Beobachtung der Gewichtsentwicklung von Wildtyp-Tieren und homozygoten Tieren zeigte ein signifikant erhöhtes Körpergewicht der homozygoten Tiere. Eine Begründung hierfür liegt möglicherweise in den antiproliferativen Eigenschaften von MTUS1.

Die bei einem Tier detektierte extrem vergrößerte Blase und das Fettgewebe einer extrem adipösen Maus wiesen mikroskopisch keine Veränderungen der Zellstruktur auf. Dieser Befund könnte auf eine erhöhte Proliferation des betreffenden Gewebes schließen lassen, ohne dabei allerdings andere Gewebe zu infiltrieren oder die Differenzierung der Zellen zu verlieren. Nach den bisherigen Analysen des MTUS1-Gens korreliert dieses Verhalten gut mit den erzielten Ergebnissen in der Zellkultur, aus denen MTUS1 deutlich als Regulator der Proliferation hervorging. Auch das bereits erwähnte erhöhte Körpergewicht der Knockout-Tiere könnte die Vermutung der antiproliferativen Eigenschaften von MTUS1 bestätigen.

Die Messung des Blutdrucks von homozygoten und Wildtyp-Tieren ergab eine Reduktion des Blutdrucks der homozygoten Tiere. Der AT1-Rezeptor ist für eine Erhöhung des Blutdrucks bekannt und wird bereits seit Jahren zur Blutdrucksenkung blockiert (Bonner et al., 2000). Der AT2-Rezeptor soll wiederum blutdrucksenkende Wirkung haben. In AT2-Knockout-Mäusen wurde dementsprechend ein erhöhter Blutdruck diagnostiziert (Gross et al., 2004). Über die Expression des AT2-Rezeptors im Herzen gibt es widersprüchliche Publikationen. Der Nachweis mit AT2-rezeptorspezifischen Antikörpern ergab, dass die Expression des AT2-Rezeptors im Herzen vorwiegend auf die Blutgefäße beschränkt ist (Utsunomiya et al., 2005), jedoch gibt es mehrere Untersuchungen, nach denen der AT2-Rezeptor in Kardiomyozyten die wachstumsfördernden Effekte des AT1-Rezeptors antagonisiert (Wollert et al., 1999). MTUS1 weist im Herzen die größte Aktivität auf, sowohl in den Endothelzellen der Blutgefäße, wie auch in den Kardiomyozyten kann eine hohe Expression nachgewiesen werden.

Die Hypotonie der homozygoten Tiere ist nach diesen Erkenntnissen mit einer Interaktion von MTUS1 und dem AT2-Rezeptor nicht zu erklären, da hier genau entgegengesetzte Reaktionen beobachtet wurden. Nachdem MTUS1 auch in glatten Muskelzellen exprimiert wird, wäre eine denkbare Hypothese, dass MTUS1 infolge einer Funktionsstörung der glatten Muskulatur zu einem erniedrigten Gefäßtonus und einer Hypotonie führen kann. Weiterführende Experimente müssten in dieser Hinsicht allerdings noch durchgeführt werden.

Die Untersuchung der Tiere ergab bei fast einem Viertel der homozygoten Tiere eine Herzhypertrophie, 11% der Mäuse entwickelten eine chronische Glomerulonephritis und 6% eine Atelektase der Lunge. Wie bereits erwähnt soll der AT2-Rezeptor die wachstumsfördernden Effekte des AT1-Rezeptors in Kardiomyozyten antagonisieren (Wollert et al., 1999). Darüber hinaus ist die Entstehung einer Herzhypertrophie in AT2-Knockout-Mäusen anscheinend nicht oder nur teilweise an das Vorliegen einer Hypertonie gebunden, da AT2-Mäuse keine oder nur eine geringe Herzhypertrophie, wohl aber eine Hypertonie entwickeln (Senbonmatsu et al., 2000). Ebenfalls von Senbonmatsu et al. wurde eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen publiziert, in der die Interaktion des AT2-Rezeptors mit dem PLZF-Protein als neuer Signalweg in der Entstehung der Herzhypertrophie beschrieben wird (Senbonmatsu et al., 2003). Die Entstehung einer Herzhypertrophie in hypotonen MTUS1-Mäusen könnte demnach ebenfalls vom Blutdruck unabhängig erfolgen. Denkbar wäre hier eine Beeinflussung von Wachstumsfaktoren durch MTUS1, die eine Hypertrophie des Herzens zur Folge haben könnten. Nouet et al. beschrieb für MTUS1 nicht nur eine Interaktion mit dem AT2-Rezeptor, sondern auch eine durch MTUS1 vermittelte Inhibierung von Insulin-, bFGF- und EGF-gesteuerten Signalkaskaden, in deren Folge die Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK2 inhibiert wurde. Dabei waren die beobachteten Effekte ähnlich denen des AT2-Rezeptors, wobei der

inhibitorische Effekt von MTUS1 die Expression, nicht aber die Aktivierung des AT2-Rezeptors benötigte (Nouet et al., 2004).

AT2 defiziente Mäuse, die einer Obstruktion des Harnleiters unterzogen wurden, zeigten eine erhöhte Fibrose des renalen Interstitiums (Ma et al., 1998; Morrissey et al., 1999). Diese Art der Fibrose kann wiederum eine Folge der chronischen Glomerulonephritis darstellen. Die beobachtete Atelektase der Lunge könnte unter anderem auf die Herzvergrößerung und einer damit verbundenen Druckbelastung der Lunge einhergehen. Auch die Lungenemphyseme wären eventuell damit zu erklären. Die Blutstauung der Leber und der Milz, so wie die Lungenödeme könnten eventuell mit einer fehlerhaften Funktion des Herzens erklärt werden.

Bei der Analyse des Blutbilds der älteren Tiere ergaben sich deutliche Abweichungen zwischen den verschiedenen Gruppen. Auffallend waren hier vor allem die Abweichungen im Blutbild, wonach die homozygoten und heterozygoten Tiere auffallend hohe Werte an Leukozyten und Lymphozyten aufwiesen, während die Werte für Erythrozyten und Thrombozyten vermindert waren. Die Erythrozyten der heterozygoten und homozygoten Tiere wiesen dabei ein größeres Volumen auf, enthielten aber weniger Hämoglobin. Auch die mittlere corpuskuläre Hämoglobinkonzentration war in den heterozygoten und homozygoten Tieren vermindert. Infolge dessen zeigten die heterozygoten und homozygoten Mäuse auch einen geringeren Hämoglobin-Wert.

Die Hämatopoese findet normalerweise im Knochenmark sowie im lymphatischen System statt, eine extramedulläre Hämatopoese kommt pathologisch in einigen Blutkrankheiten vor. Nachdem bei den heterozygoten und homozygoten Mäusen eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz, den Lymphknoten und der Niere detektiert wurde, stellt dies neben den Blutwerten einen Hinweis auf eine hämatologische Erkrankung dar. Auch die lymphatischen Infiltrate in Milz, Nieren, Lunge, Leber und Speicheldrüse in den heterozygoten und homozygoten Tieren gaben Anzeichen auf eine Störung der blutbildenden Gewebe.

Nach diesen pathologischen Ergebnissen konnten 6% der heterozygoten Tiere einer myeloproliferativen Erkrankung zugeordnet werden, bei der es sich wahrscheinlich um eine chronisch idiopathische Myelofibrose handelte. 17% der heterozygoten Tiere und 23 % der homozygoten Tiere wiesen Symptome eines B-Zell-Lymphoms auf.

Zusätzlich zeigte die Langzeituntersuchung eine signifikant erhöhte Sterberate bei den heterozygoten und homozygoten Mäusen gegenüber der Wildtyp-Vergleichsgruppe. Die untersuchten Wildtyp-Tiere wiesen dagegen keine pathologischen Auffälligkeiten hinsichtlich der extramedullären Hämatopoese oder der lymphatischen Infiltration von Organen auf. Allerdings zeigte ein Wildtyp-Tier eine massive Akkumulation von Plasmazellen in einem zervikalen Lymphknoten, was auf eine Erkrankung hindeuten könnte.

Die Untersuchungen an MTUS1-Knockout-Mäusen bestätigten demnach die Vermutung, dass es sich beim MTUS1-Gen um ein Tumorsuppressor-Gen handelt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MTUS1 in primären Zellen, die mit fötalem Kälberserum, Insulin, bFGF oder EGF behandelt wurden, einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation aufweist (Nouet et al., 2004). Nachdem zudem nachgewiesen werden konnte, dass MTUS1 die Phosphorylierung von ERK2 inhibieren kann, könnte MTUS1 mit dem AT2-Rezeptor kooperieren, um durch Inhibierung des Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Signalwegs die Zellproliferation zu regulieren (Nouet et al., 2004). Da bereits mehrere Mitglieder des RTK-Signalwegs als Tumorsuppressor-Gene identifiziert wurden (Vogelstein et al., 2004), könnte MTUS1 seine Eigenschaften als Tumorsuppressor-Gen über diesen Weg vermitteln.

Das gehäufte Auftreten von Lymphomen in den MTUS1-Knockout-Mäusen und die fehlende Tumorlokalisation in anderen Geweben könnte damit erklärt werden, dass in soliden Tumoren zumindest drei verschiedene genetische Veränderungen akkumulieren müssen ehe ein maligner Tumor entsteht (Komarova et al., 2003). Dagegen kann bei Lymphomen und Leukämien

möglicherweise schon eine geringere Anzahl von genetischen Veränderungen zur Tumorentstehung führen (Nowell, 2002).

So erbrachte auch die Erforschung des p53-Tumorsuppressor-Gens in p53-Knockout-Mäusen eine erhöhte Bildung von Lymphomen, während Tumoren anderer Lokalisation nur selten beobachtet wurden (Donehower et al., 1992). In Menschen wird der Verlust des p53-Gens allerdings mit einem weit größeren Spektrum an Tumoren assoziiert, auch wenn Mutationen des p53-Gens ebenfalls mit B-Zell-Lymphomen assoziiert sind (Ichikawa et al., 1993). Auch MTUS1 wird mit einer ganzen Reihe von Tumoren in Verbindung gebracht. Neben Colontumoren, Mamma- oder Prostatakarzinomen, wird der Verlust des Chromosoms 8p21-23 mit dem Mantelzell-Lymphom assoziiert (Martinez-Climent et al., 2001), wobei sich das MTUS1-Gen genau in dieser Region befindet.

Die X-Gal-Färbung von Wildtyp- und homozygoten Bauchhautfibroblasten ergab eine vermehrte MTUS1-Protein-Lokalisation in der Nähe des Zellkerns. Von Wruck et al. wurde für MTUS1 unter dem Namen ATBP beschrieben, dass sich das Protein in der perinukleären Region befindet und durch sein C-terminales Ende mit der Golgi Matrix interagiert (Wruck et al., 2005). Mit der X-Gal-Färbung konnte eine Lokalisierung von MTUS1 auch in der perinukleären Region bestätigt werden.

Bei der Untersuchung von homozygoten und Wildtyp-Bauchhautfibroblasten wurde schließlich eine geringere Zellgröße der homozygoten Fibroblasten festgestellt. Diese verringerte Größe lässt sich eventuell mit der proliferationsregulierenden Wirkung von MTUS1 erklären. Während MTUS1 generell auf die Zellteilung repressiv wirkt, wäre es denkbar, dass die Knockout-Zellen durch eine erhöhte Bereitschaft zur Zellteilung ein vermindertes Größenwachstum der einzelnen Zelle aufweisen. Auch könnte MTUS1 durch die Interaktion mit dem AT2-Rezeptor ebenfalls eine Rolle in der Zelldifferenzierung spielen (Meffert et al., 1996). Eine verminderte Zellgröße könnte demnach auch ein Hinweis auf eine geringere Differenzierung der betreffenden Zelle sein. Bei den Blutuntersuchungen wurde bei jungen Knockout-Tieren ebenfalls ein kleineres Volumen der Erythrozyten festgestellt, allerdings wiesen die älteren homozygoten Tiere größere Erythrozyten auf und in den Organen der Tiere wurden hypertrophe Zellen detektiert. Der Grund für die verringerte Zellgröße lässt sich hier also nicht abschließend beantworten.

Eine der drei untersuchten homozygoten Fibroblastenlinien zeigte gegenüber den anderen Fibroblasten eine deutlich erhöhte Proliferation. Nachdem die homozygoten Fibroblasten keine MTUS1-Expression mehr aufweisen, haben sie das Potential ungehemmt zu proliferieren. Da sich dieses Verhalten aber nur bei einer homozygoten Zelllinie zeigt und die Zelllinien aus erst ca. fünf Wochen alten Mäusen gewonnen worden waren, könnte das ein Hinweis darauf sein, dass sich die regulierende Wirkung von MTUS1 erst nach einer gewissen Latenzzeit z.B. nach der Wachstumsphase der Mäuse voll entfaltet. Auch wäre denkbar, dass sich der Knockout von MTUS1 interindividuell in unterschiedlicher Ausprägung und Schnelligkeit bemerkbar macht oder zusätzliche Mutationen auftreten müssen. Diese Hypothese würden auch die Ergebnisse der Langzeituntersuchung stützen. Die Blutwerte der Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tiere zeigten bei 1-3 Monate alten Tieren sehr viel geringere Abweichungen als bei Tieren im Alter von 10-12 Monaten. Auch traten die Krankheitssymptome oder spontane Sterbefälle nicht vor einem Alter von sechs Monaten auf.

7. Zusammenfassung

Eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen stellen die malignen Erkrankungen dar. Die Tumorentstehung wird dabei durch die Akkumulation von genetischen Mutationen ausgelöst, da diese Veränderungen zur Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen führen können. Eine Mutation in der codierenden Sequenz kann durch eine veränderte Proteinsequenz ein funktionell gestörtes Protein zur Folge haben. Eine Mutation im Promotorbereich eines Gens kann sich dagegen negativ auf die Transkriptionsrate auswirken.

Nachdem die bisher eingesetzten Therapeutika hohe Nebenwirkungen aufweisen, bietet die Gentherapie Hoffnung auf neue Therapieoptionen für die Zukunft. Um die komplexen Prozesse bei der Tumorentstehung besser verstehen zu können, ist es deshalb notwendig, neue Tumorsuppressor-Gene und Proto-Onkogene zu identifizieren und zu charakterisieren.

Das kürzlich publizierte MTUS1-Gen zeigt Eigenschaften eines Tumorsuppressor-Gens. So liegt die MTUS1-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien vermindert vor und bei rekombinanter Expression in der schnell wachsenden Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2 konnte die Proliferation signifikant reduziert werden. Darüber hinaus interagiert MTUS1 mit dem AT2-Rezeptor und scheint durch die Inhibierung des RTK-Signalwegs die Zellproliferation zu regulieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Tumorsuppressor-Funktion von MTUS1 *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dabei wurde die Hypothese zugrunde gelegt, dass das MTUS1-Gen durch eine veränderte Expression die Zellproliferation beeinflussen kann und in der Folge an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt ist.

Nach den Untersuchungen der MiaPaCa-2-Zelllinie konnte eine Mutation in der Exonsequenz und der vorhergesagten Promotorregion als Ursache der niedrigen MTUS1-Expression ausgeschlossen werden. Die Analyse des Promotorbereichs hinsichtlich des Methylierungsmusters der CpG- und CpNpG-Inseln brachte keine Unterschiede in der Methylierung der CpG-Inseln, aber deutliche Methylierungsunterschiede in den CpNpG-Inseln der MiaPaCa-2-Zellen gegenüber HUVEC-Zellen zu Tage. Die anschließende Untersuchung der vorhergesagten Promotorregion mit Hilfe eines Promotor-Assays brachte die Gewissheit, dass es sich bei der untersuchten Sequenz um einen Transkription regulierenden Genabschnitt handelt.

Durch die Transfektion von HUVEC-Zellen mit MTUS1-siRNA konnten nachweislich Zellen mit einem funktionellen MTUS1-Knockout hergestellt werden. Diese Zellen zeigten mit der verminderten MTUS1-Expression ein signifikant erhöhtes Wachstum.

Die Ergebnisse der Zellversuche legen die Vermutung nahe, dass MTUS1 deshalb als Tumorsuppressor-Gen agieren kann, weil es die Zellproliferation reguliert und so der funktionelle MTUS1-Knockout mit einem erhöhten Zellwachstum einhergeht. Als Mechanismus der Geninaktivierung kommt die Hypomethylierung der vorhergesagten Promotorsequenz in Frage.

Die Untersuchung der Colontumorgewebe und Normalgewebe von zehn Patienten mit Colonkarzinom zeigte eine deutliche Reduktion der MTUS1-Protein-Expression in 50% der Tumorgewebe. Bei diesen Patienten konnte ebenfalls eine signifikant reduzierte mRNA-Expression nachgewiesen werden. Wie bereits bei den MiaPaCa-2-Zellen nachgewiesen, zeigten sich keine Methylierungsunterschiede in den CpG-Inseln, aber eine Hypomethylierung der CpNpG-Inseln in den Geweben mit geringer MTUS1-Expression. Diese veränderte Methylierung könnte die Erklärung für die verminderte Transkription des MTUS1-Gens sein.

Mit dem MTUS1-Knockout-Maus-Modell wurde die Grundlage für das bessere Verständnis der Funktion von MTUS1 *in vivo* geschaffen. Nach erfolgreicher Blastozysteninjektion und Zucht der homozygoten Knockout-Mäuse, konnte auf DNA-, mRNA- und Protein-Ebene die geglückte Ausschaltung des MTUS1-Gens bestätigt werden.

Bei der Langzeituntersuchung der Tiere zeigten sich vor allem Abweichungen im Blutbild, wonach die homozygoten und heterozygoten Tiere auffallend hohe Werte an Leukozyten und Lymphozyten aufwiesen, während die Werte für Erythrozyten und Thrombozyten vermindert waren. Dabei wiesen die Erythrozyten ein größeres Volumen auf, enthielten aber weniger Hämoglobin. Die pathologische Untersuchung konnte eine extramedulläre Hämatopoese in Milz, Lymphknoten und Nieren der heterozygoten und homozygoten Mäuse detektieren, zusätzlich wurden lymphatische Infiltrate in Milz, Nieren, Lunge, Leber, Lymphknoten und Speicheldrüse nachgewiesen und gaben Hinweise auf eine Bluterkrankung. Nach diesen pathologischen Ergebnissen zeigten 23% der homozygoten und 17% der heterozygoten Tiere Symptome eines B-Zell-Lymphoms. Außerdem wurde eine signifikant erhöhte Sterberate bei den heterozygoten und homozygoten Mäusen gegenüber der Wildtyp-Vergleichsgruppe gezeigt. Bei den Wildtyp-Tieren konnten keine pathologischen Auffälligkeiten hinsichtlich der extramedullären Hämatopoese oder der lymphatischen Infiltration von Organen gezeigt werden.

Fast ein Viertel der homozygoten Mäuse wiesen bei der pathologischen Organuntersuchung eine Herzhypertrophie auf, oft einhergehend mit einer chronischen Glomerulonephritis und einer Atelektase der Lunge. Eine denkbare Erklärung für die blutdruckunabhängige Entstehung der Herzhypertrophie wäre eine Beeinflussung von Wachstumsfaktoren, da bereits nachgewiesen wurde, dass eine durch MTUS1 vermittelte Inhibierung von Insulin-, bFGF- und EGF-gesteuerten Signalkaskaden eine Inaktivierung von ERK2 zur Folge hatte. Dabei waren die beobachteten Effekte ähnlich denen des AT2-Rezeptors, wobei der inhibitorische Effekt von MTUS1 die Expression, nicht aber die Aktivierung des AT2-Rezeptors benötigte. Teilweise entwickelten die heterozygoten und homozygoten Tiere zudem Lungenödeme und Stauungen der Leber oder der Milz, was auf eine fehlerhafte Herzfunktion hindeuten könnte.

Die Ergebnisse der Langzeituntersuchung ergaben darüber hinaus ein signifikant höheres Körpergewicht der homozygoten Tiere gegenüber Wildtyp-Mäusen. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis auf die antiproliferative Eigenschaft von MTUS1 sein, die sich auch in der extremen Proliferation der Blase einer homozygoten Maus und dem Fettgewebe einer heterozygoten Maus widerspiegeln könnte.

Die Blutdruckmessung von homozygoten und Wildtyp-Tieren ergab eine Reduktion des Blutdrucks der homozygoten Tiere. Dieses Ergebnis weicht von Beobachtungen der AT2-Knockout-Maus ab und kann nicht mit einer Interaktion von MTUS1 und dem AT2-Rezeptor erklärt werden. Nachdem MTUS1 auch in der Gefäßwand von glatten Muskeln exprimiert wird, könnte eine funktionelle Störung der glatten Muskelzellen eventuell auf einen erniedrigten Tonus und damit eine Hypotonie schließen lassen.

Mit Hilfe einer X-Gal-Färbung von verschiedenen Organen einer Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Maus konnten Erkenntnisse über die Genaktivität von MTUS1 in den verschiedenen Organen gewonnen werden. Zusammenfassend lässt sich von einer hohen MTUS1-Expression in den meisten Epithelzellen und Endothelzellen sprechen, außerdem weisen die Kardiomyozyten im Herz und die Purkinjefasern im Gehirn eine hohe Expression auf. Die Lokalisation des MTUS1-Proteins stimmt dabei teilweise mit der Lokalisation des AT2-Rezeptors überein. Die detektierten MTUS1-Expressionen dienen der weiteren Charakterisierung des MTUS1-Gens, darüber hinaus wurde die MTUS1-Expression in allen Geweben nachgewiesen, für die in der Region 8p21.3-22 ein Tumorsuppressor-Gen postuliert wurde.

Bei der Untersuchung von homozygoten und Wildtyp-Bauchhautfibroblasten wurde schließlich eine geringere Zellgröße der homozygoten Fibroblasten festgestellt. Mit der X-Gal-Färbung

konnte nachgewiesen werden, dass das MTUS1-Protein vorwiegend in der Nähe des Zellkerns lokalisiert ist. Eine der untersuchten homozygoten Fibroblastenlinien zeigte gegenüber den anderen Fibroblasten eine deutlich erhöhte Proliferation. Das könnte ein Hinweis auf eine antiproliferative Wirkung von MTUS1 und eine Erklärung für die kleinere Zellgröße der homozygoten Fibroblasten sein.

Als Zusammenfassung aller hier gezeigten Ergebnisse konnte die Hypothese untermauert werden, dass es sich bei MTUS1 um ein Tumorsuppressor-Gen handelt, das seine antiproliferativen Eigenschaften wahrscheinlich in Kooperation mit dem AT2-Rezeptor durch die Inhibierung des RTK-Signalwegs vermittelt. Nachdem bereits mehrere Mitglieder des RTK-Signalwegs als Tumorsuppressor-Gene identifiziert wurden, könnte MTUS1 seine Eigenschaften als Tumorsuppressor-Gen über diesen Weg vermitteln.

8. Summary

Malignant diseases represent one of the most frequent causes of death in the western nations. The tumor genesis is released by the accumulation of genetic mutations, because these modifications can lead to the activation of proto-oncogenes or inactivating of tumor suppressor genes. A mutation in the coding sequence can cause a functionally disturbed protein by a modified protein sequence. A mutation within the promoter of a gene can negatively affect the transcription rate.

While the current therapeutics show various adverse reactions, the gene therapy could represent the therapy option of the future. For a better understanding of the tumor genesis, it is necessary to identify new tumor suppressor genes and proto-oncogenes.

The recently published MTUS1 gene exhibits characteristics of a tumor suppressor gene. Thus the MTUS1 expression is decreased in different tumor cell lines and the recombinant expression of MTUS1 could reduce the proliferation in the fast growing pancreatic tumor cell line MiaPaCa-2. Beyond that, MTUS1 interacts with the AT2 receptor and seems to regulate the cell proliferation by the inhibition of the RTK signaling pathway.

This work was purposed to examine the tumor suppressor function of MTUS1 *in vitro* and *in vivo*. This was founded in the hypothesis that the MTUS1 gene can affect the cell proliferation by a modified expression and is therefore involved in the development and progression of tumors.

After the investigations of the MiaPaCa-2 cell line, a mutation in the exon sequence or the predicted promoter region could be excluded as a cause of the low MTUS1 expression. The analysis of the promoter range regarding the methylation pattern of the CpG and CpNpG islands did not reveal differences in the methylation of the CpG islands, but clear discrepancies in the CpNpG islands of the MiaPaCa-2 cells in contrast to the HUVEC cells. The subsequent investigation of the predicted promoter sequence with a promoter assay approved the hypothesis that the examined sequence has properties for the regulation of gene transcription.

HUVEC cells with a functional MTUS1 knockout could be obtained by the transfection with MTUS1 siRNA. The experiment with these cells exhibited that cells without MTUS1 expression can proliferate significantly faster. The assumption that MTUS1 could act like a tumor suppressor gene by affecting the regulation of the cell proliferation is thereby confirmed.

The investigation of the tumor tissue and normal tissue of ten patients with colorectal carcinoma revealed a clear reduction of the MTUS1 protein expression in 50% of the tumor tissues. In these tissues a significantly reduced MTUS1 mRNA expression could also be proven. The methylation pattern of the CpG islands showed no differences between tumor and normal tissue, but there was a hypomethylation of the CpNpG islands in the tissue with less MTUS1 Expression. This methylation pattern could be the explanation for the decreased transcription of the MTUS1 gene.

With the MTUS1 knockout mouse model the basis for a better understanding of the MTUS1 function *in vivo* has been created. After successful injection of stem cells into blastocysts and breeding of the homozygote knockout mice, the elimination of the MTUS1 gene could be proven on DNA, mRNA and protein level.

The long-term investigation showed discrepancies in the haemogram of the wildtype, heterozygote and homozygote mice. The homozygote and heterozygote animals had remarkably high values of leukocytes and lymphocytes, while the values of the erythrocytes and the thrombocytes decreased. The erythrocytes exhibited a bigger volume and contained less

haemoglobin. The pathological investigation could detect extramedullary haematopoiesis in spleen, lymph node and kidneys of the heterozygote and homozygote mice, in addition lymphocytic infiltrates in spleen, kidneys, lung, liver, lymph node and salivary gland were discovered, probably referring to a blood illness. To these pathological results 23% of the homozygote and 17% of the heterozygote animals showed symptoms of a B-cell-lymphoma. Furthermore the investigations presented a significantly increased mortality rate of the heterozygote and homozygote mice. The wildtype animals showed no abnormality regarding the extramedullary haematopoiesis or the lymphocytic infiltration in organs.

Nearly a quarter of the homozygote mice exhibited a hypertrophy of the heart, often accompanied with a chronic glomerulonephritis and an atelectasis of the lung. The interaction with growth factors could be an explanation for the blood pressure independent hypertrophy because MTUS1 can inhibit the insulin, bFGF and EGF signaling cascades. Some of the heterozygote and homozygote animals developed oedema of the lung and congestions of the liver or the spleen, which could be a result of a heart failure.

In the long-term investigation a significant higher body weight of the homozygote animals in comparison to the wildtype mice was measured in the age of four weeks and ten month. These results could prove the antiproliferative characteristic of MTUS1 which was also suggested by the extreme proliferation of the urinary bladder of a homozygote mouse and the fatty tissue of a heterozygote mouse.

The blood pressure of homozygote and wildtype animals resulted in a reduction of the blood pressure of the homozygote animals. This result deviates from observations of AT2 knockout mice and cannot be explained with an interaction of MTUS1 and the AT2 receptor. Because MTUS1 is also expressed in the smooth muscle cells, a dysfunction of these cells could perhaps lead to a decreased tone and blood pressure.

With the help of the X-gal staining of different organs from wildtype, heterozygote and homozygote mice, informations about the MTUS1 activity could be gathered. In summary MTUS1 showed a high expression in epithelial and endothelial cells, in the cardiomyocytes in the heart and the pukinje cells in the brain. The localization of the MTUS1 protein is partially the same like the localization of the AT2 receptor.

During the analysis of the homozygote and wildtype fibroblasts a smaller height of the homozygote fibroblasts was determined. With the X-gal staining it could be proven that the MTUS1 protein is located predominantly in the perinuclear region. One of the examined homozygote fibroblast lines showed a significant higher proliferation rate in comparison to the wildtype and two other homozygote fibroblast lines. This could be again a reference of the antiproliferative effect of MTUS1 and an explanation for the smaller cell height of the homozygote fibroblasts.

The summary of all results supports the hypothesis that MTUS1 has characteristics of a tumor suppressor gene. For the antiproliferative effect MTUS1 seems to cooperate with the AT2 receptor to inhibit the RTK signaling pathway. Because there are already some members of the RTK signaling cascade identified as tumor suppressor genes, MTUS1 could mediate the tumor suppressor functions by this mechanism.

9. Literatur

Arias E, Anderson RN, Kung HC, Murphy SL, Kochanek KD. Deaths: final data for 2001. *Natl.Vital Stat.Rep.* 2003;52:1-115.

Bachman KE, Herman JG, Corn PG. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain and other human cancers. *Cancer Res.* 1999;59:798-802

Bardi G, Johansson B, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Andren-Sandberg A, Mitelman F, Heim S. Karyotypic abnormalities in tumours of the pancreas. *Br.J.Cancer* 1993;67:1106-1112.

Bastian JP, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S et al., Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clin.Cancer.Res.* 2005;11:4037-4043

Bonner G, Fuchs W. Long-acting blood pressure reduction by candesartan cilexetil in patients with hypertension. *Curr.Med.Res.Opin.* 2005;21:935-940

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.

Brueckner B, Boy RG, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Suhai S, Wiessler M, Lyko F. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA transferases. *Cancer Res.* 2005;65:6305-6311

Bundschu K, Gattenlohner S, Knobloch KP, Walter U, Schuh K. Tissue-specific Spred-2 promoter activity characterized by a gene trap approach. *Gene.Expr.Patterns* 2006;6:247-255

Chan KL, Lee JM, Guan XY, Fan ST, Ng IO. High-density allelotyping of chromosome 8p in hepatocellular carcinoma and clinicopathologic correlation. *Cancer* 2002;94:3179-3185.

Chen PJ, Wei CC, Wang C, Chen FW, Hsu YH, Chang MS. Promoter analysis of interleukin 19. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2006; Epub

Clark SJ, Harrison J, Frommer M. CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat.Genet.* 1995;10:20-27

Daniel DC. Highlight: BRCA1 and BRCA2 proteins in breast cancer. *Microsc.Res.Tech.* 2002;59:68-83

Di Benedetto M, Pineau P, Nouet S, Berhout S, Seitz I, Louis S, Dejean A, Couraud PO, Strosberg AD, Stoppa-Lyonnet D, Nahmias C. Mutation analysis of the 8p22 candidate tumor suppressor gene ATIP/MTUS1 in hepatocellular carcinoma. *Mol.Cell.Endocrinol.* 2006; Epub

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992;356:215-521.

- El Naggar AK**, Coombes MM, Batsakis JG, Hong WK, Goepfert H, Kagan J. Localization of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. *Oncogene* 1998;16:2983-2987.
- Farrington SM**, Lin-Goerke J, Ling J, Wang Y, Burczak JD, Robbins DJ, Dunlop MG. *Am.J.Hum.Genet.* 1998;63:749-759
- Fujiwara Y**, Emi M, Ohata H, Kato Y, Nakajima T, Mori T, Nakamura Y. Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1993;53:1172-1174.
- Galatin PS**, Abraham DJ. A nonpeptidic sulfonamide inhibits the p53-MDM2 interaction and activates p53-dependent transcription in MDM2-overexpressing cells. *J.Med.Chem.* 2004;47:4163-4165
- Gaw A**, Mancini FP, Ishibashi S. Rapid genotyping of low density lipoprotein receptor knockout mice using a polymerase chain reaction technique. *Lab.Anim.* 1995;29:447-449
- Ghebranious N**, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* 1998;17:3385-3400
- Gross V**, Obst M, Luft FC. Insights into angiotensin II receptor function through AT2 receptor knockout mice. *Acta.Physiol.Scand.* 2004;181:487-494
- Gruber HE** and Hanley EN, Jr. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation. *BMC.Musculoskelet.Disord.* 2000;1:1.
- Gruenbaum Y**, Cedar H, Razin A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* 1982;295:620-622
- Gustafson CE**, Wilson PJ, Lukeis R, Baker E, Woollatt E, Annab L, Hawke L, Barrett JC, Chenevix-Trench G. Functional evidence for a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Res.* 1996;56:5238-5245.
- Hakem R**, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J et al. The tumor suppressor gene BRCA1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 1996;85:1009-1023
- Hanada M**, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1993;82:1820-1828
- Hanahan D**. Transgenic mice as probes into complex systems. *Science* 1989;246:1265-1275
- Harvey M**, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A, Donehower LA. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat.Genet.* 1993;5:225-229.
- Harvey M**, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Bradley A, Donehower LA. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J.* 1993;7:938-943.

Harvey M, Vogel H, Morris D, Bradley A, Bernstein A, Donehower LA. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat.Genet.* 1995;9:305-311.

Harvey M, Vogel H, Lee EY, Bradley A, Donehower LA. Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Res.* 1995;55:1146-1151.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387:296-299

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:2042-2054

Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ. CDKN2A and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. *Genes.Chromosomes.Cancer* 1999;25:339-348

Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 1948;175:315-332

Ichikawa A, Hotta T, Saito H. Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. *Leuk.Lymphoma.* 1993;11:21-25

Ichikawa T, Nihei N, Suzuki H, Oshimura M, Emi M, Nakamura Y, Hayata I, Isaacs JT, Shimazaki J. Suppression of metastasis of rat prostatic cancer by introducing human chromosome 8. *Cancer Res.* 1994;54:2299-2302.

Ishii H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, Mori M, Fidanza V, Alder H, Croce CM. The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:3928-3933.

Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronsoon RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr.Biol.* 1994;4:1-7

Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in MDM2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 1995; 378:206-208

Kahng YS, Lee YS, Kim BK, Park WS, Lee JY, Kang CS. Loss of heterozygosity of chromosome 8p and 11p in the dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 2003;18:430-436.

Kerangueven F, Noguchi T, Coulier F, Allione F, Wargniez V, Simony-Lafontaine J, Longy M, Jacquemier J, Sobol H, Eisinger F, Birnbaum D. Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Res.* 1997;57:5469-5474.

Komarova NL, Sengupta A, Nowak MA. Mutation-selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability. *J.Theor.Biol.* 2003;223:433-450.

Landon EJ, Inagami T. Beyond the G Protein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005;25:15-16

Laner T, Schulz WA, Engers R, Muller M, Florl AR. Hypomethylation of the XIST gene promotor in prostate cancer. *Oncol.Res.* 2005;15:257-264

Liang P and Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-971.

Liu CY, Flesken-Nikitin A, Li S, Zeng Y, Lee WH. Inactivation of the mouse BRCA1 gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes.Dev.* 1996; 10:1835-1843

Lorincz MC, Groudine M. C^mC(a/t)GG methylation: a new epigenetic mark in mammalian DNA? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001;18:10034-10036

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951;193:265-275

Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. The angiotensin II type 2 receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J.Exp.Med.* 1998;188:661-670

Ma J, Nishimura H, Fogo A, Kon V, Inagami T, Ichikawa I. Accelerated fibrosis and collagen deposition develop in the renal interstitium of the angiotensin type 2 receptor null mutant mice during ureteral obstruction. *Kidney.Int.* 1998;53:937-944

Malone CS, Miner MD, Doerr J, Jackson JP, Wall R, Teitell M. C^mC(A/T) DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001;98:10404-10409

Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, et al. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 2001;98:3479-3482

Marx M, Perlmutter RA, Madri JA. Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. *J.Clin.Invest.* 1994;93:131-139.

McCarthy RP, Zhang S, Bostwick DG, Qian J, Eble JN, Wang M, Lin H, Cheng L. Molecular genetic evidence for different clonal origins of epithelial and stromal components of phyllodes tumor of the prostate. *Am.J.Pathol.* 2004;165:1395-1400.

Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol.Cell.Endocrinol.* 1996;122:59-67

Morrissey JJ, Klahr S. Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am.J.Physiol.Renal.Physiol.* 1999;276:39-45

Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM, Lombardt JH, Greene AS. Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am.J.Physiol.* 1998;275:1395-1403

Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M et al. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J.Biol.Chem.* 2004;279:28989-28997.

Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin.Cancer Biol.* 2002;12:261-266.

O'Brien S, Tefferi A, Valent P. Chronic myelogenous leukemia and myeloproliferative disease. *Hematology* (Am.Soc.Hematol.Educ.Program.) 2004;146-162.

Papazisis KT, Habeshaw T, Miles DW. Safety and efficacy of the combination of trastuzumab with docetaxel for HER2-positive women with advanced breast cancer. A review of the existing clinical trials and results of the expanded access programme in the UK. *Int.J.Clin.Pract.* 2004;58:581-586.

Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus VJ, Zielinski C, Reinthaller A, Zeilinger R, Krainer M. Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have potential impact on overall survival. *Cancer* 2005;104:2417-2429

Prols F, Mayer MP, Renner O, Czarnecki PG, Ast M, Gassler C, Wilting J, Kurz H, Christ B. Upregulation of the cochaperone Mdg1 in endothelial cells is induced by stress and during *in vitro* angiogenesis. *Exp.Cell Res.* 2001;269:42-53.

Reagan LP, Flanagan-Cato LM, Yee DK, Ma LY, Sakai RR, Fluharty SJ. Immunohistochemical mapping of angiotensin type 2 receptors in rat brain. *Brain.Res.* 1994;662:45-59

Riggs AD, Jones PA. 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv.Cancer.Res.* 1983;40:1-30

Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Saarbrücken, 2006

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukaemia. *Oncogene* 2005;24:7213-7223

Sasiadek M, Stembalska-Kozłowska A, Smigiel R, Krecicki T, Blin N, Mirghomizadeh F. Microsatellite and chromosome instability in squamous cell laryngeal carcinoma. *Int.J.Oncol.* 2001;19:401-405.

Seibold S, Rudroff C, Weber M, Galle J, Wanner C, Marx M. Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J.* 2003;17:1180-1182

Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y, Brown MD, Anderson RC, Parsa AT, Brandt-Rauf PW, Bruce JN, Fine RL. Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells *in vitro* and *in vivo* by a p53 COOH-terminal peptide. *Mol.Cancer.Ther.* 2006;5:20-28

Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during *in vivo* pressure overload. *J. Clin. Invest.* 2000;106:25–29

Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 2003;22:6471-6482

Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85:27-37

Sharrard RM, Royds JA, Rogers S, Shorthouse AJ. Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. *Br.J.Cancer* 1992;65:667-672

Shen HL, Xu WL, WU ZY, Qi YY, zhong XM, Huang WB, Xiao M. Inhibition of vascular endothelial growth factor gene expression and proliferation of leukemia cells by RNA interference. *Zhonghua.Xue.Ye.Xue.Za.Zhi.* 2005;26:710-714

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004;116:235-246.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975; 98:503-517

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 1995;95:651-657

Stryke D, Kawamoto M, Huang CC, Johns SJ, King LA, Harper CA, Meng EC et al. BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. *Nucl.Acids.Res.* 2003;31:278-281

Stuhmer T, Bargou RC. Selective pharmacologic activation of the p53-dependent pathways as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Cell Cycle* 2006;5:39-42

Suzuki H, Emi M, Komiya A, Fujiwara Y, Yatani R, Nakamura Y, Shimazaki J. Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosomes. Cancer* 1995;13:168-174.

Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Lab. Invest.* 2001;81:593-598.

Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World. J. Gastroenterol.* 2006;12:192-198

Tsai MH, Yang YC, Chen KH, Jiang JK, Chou SJ, Chiang TC, Jan HS, Lou MA. RER and LOH association with sporadic colorectal cancer in Taiwanese patients. *Hepatogastroenterology* 2002;49:672-677.

Utsunomiva H, Nakamura M, Kakadu K, Inagami T, Tamura M. Angiotensin II AT2 receptor localization in cardiovascular tissues by its antibody developed in AT2 gen-deleted mice. *Regul.Pept.* 2005;126:155-161

Vassilev LT. p53 activation by small molecules: application in oncology. *J.Med.Chem.* 2005;48:4491-4499

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844-848

Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, Issels R, van Oosterom A, Hogendoorn PC, Van Glabbeke M, Bertulli R, Judson I. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* 2004;364:1127-1134.

Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res.* 1996;56:2411-2416.

Vogelstein B and Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat.Med.* 2004;10:789-799.

Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC, Moch H, Gorog JP, Richter J, Mihatsch MJ, Waldman FM, Sauter G. Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. *Am.J.Pathol.* 1997;151:753-759.

Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA Methylation: An alternative pathway to cancer. *Ann.Surg.* 2001;234:10-20

Wang R, Gehrke C, Ehrlich M. Comparisation of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucl.Acids Res.* 1980;8:4777-4790

Went P, Dellas T, Bourgau C, Maurer R, Augustin F, Tzankov A, Dirnhofer S. Expression profile and prognostic significance of CD24, p53 and p21 in lymphomas. A tissue microarray study of over 600 non-Hodgkin lymphomas. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2004; 129:2094-2099

White HW, Vartak NB, Burland TG, Curtis FP, Kusakawa N. GelStar nucleic acid gel stain: high sensitivity detection in gels. *Biotechniques* 1999;26:984-988

Wintour EM, Moritz K, Butkus A, Baird R, Albiston A, Tennis N. Ontogeny and regulation of the AT1 and AT2 receptors in the ovine fetal adrenal gland. *Mol.Cell.Endocrinol.* 1999;157:161-170

Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed S, Lam S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res.* 1999;59:1973-1979.

Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc.Res.* 1999;43:838-849

Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Schefe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005;25:57-64

Yamada Y, Jackson-Grusby L, Linhart H, Meissner A, Eden A, Lin H, Jaenisch R. Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2005;102:13580-13585

Yaremko ML, Recant WM, Westbrook CA. Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is an early event in breast cancers. *Genes Chromosomes. Cancer* 1995;13:186-191.

Yin H, Hamilton AD. Synthetic inhibitors based on a terphenyl scaffolds antagonize p53/MDM2 interaction and induce p53 accumulation *in vivo*. *Abstract of papers.* 2004;227th National Meeting of the American Chemical Society, Anaheim, CA

Yin W, Xiang P, Li Q. investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Anal.Biochem.* 2005;346:289-294

Zhang JQ, Ma YX, Wang DW, Xiao JM. Selective knockdown of angiotensin II receptor subtype 1a in rat vascular smooth muscle cells by RNA interference. *Zhonghua.Xin.Xue.Guan.Bing.Za.Zhi.* 2006;43:54-59

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christina Zürn

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule
1988 – 1997 Gymnasium
27.06.1997 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung:

1997 – 2002 Studium der Pharmazie
18.04.2002 2. Staatsexamen
03.07.2003 3. Staatsexamen
09.07.2003 Approbation als Apothekerin
seit 08/2003 Promotion an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg