

---

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Charakterisierung des mitochondrialen Tumorsuppressorgens MTUS1**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Jutta Heimrich**

**aus Steinbach**

**Würzburg, Februar 2011**

---

---

**Referent** : Prof. Dr. med. C. Wanner

**Koreferent:** Prof. Dr. med. M. Scheurlen

**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2011**

**Die Promovendin ist Ärztin**

---

---

*Meiner Familie*

---

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1	TUMORENTSTEHUNG .....	- 1 -
1.2	DAS TUMORSUPPRESSORGEN MTUS1 .....	- 9 -
1.3	KNOCK-OUT-MÄUSE .....	- 13 -
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>- 16 -</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>- 18 -</b>
3.1	CHEMIKALIEN .....	- 18 -
3.1.1	Klonierung .....	- 18 -
3.1.2	PCR.....	- 19 -
3.1.3	Western-Blot.....	- 20 -
3.1.4	Zellkultur .....	- 23 -
3.2	GERÄTE UND ZUBEHÖR .....	- 26 -
3.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	- 27 -
3.4	VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG .....	- 28 -
<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>- 29 -</b>
4.1	UNTERSUCHUNGEN AN MIAPaCa-2-ZELL- UND KOLON-TUMOR-DNA .....	- 29 -
4.1.1	Gewinnung der DNA aus MiaPaCa-2-Zellen.....	- 29 -
4.1.2	Gewinnung der DNA aus Kolontumorgewebe.....	- 30 -
4.1.3	Gewinnung von cDNA aus Kolontumorgewebe .....	- 30 -
4.1.4	Sequenzanalyse des Promotors, der dem Promotor folgenden Sequenz und der codierenden Sequenz in MiaPaCa-2- und Kolontumor-DNA .....	- 30 -
4.1.5	Klonierungsreaktion .....	- 34 -
4.1.6	Sequenzanalyse.....	- 35 -
4.2	VERGLEICH DER GENEXPRESSION ZWISCHEN HOMOZYGOTEN MTUS1 KNOCK-OUT-MÄUSEN UND WILDTYP-MÄUSEN AUF PROTEINEBENE MITTELS WESTERN-BLOT-ANALYSE .....	- 36 -
4.2.1	Zellkultur zur Anzucht der zu untersuchenden Zelllinien.....	- 37 -
4.2.2	Proteinextraktion .....	- 38 -
4.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	- 38 -
4.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	- 38 -
4.2.5	Western Blot .....	- 39 -
4.3	ZUCHT VON KNOCK-OUT-MÄUSEN.....	- 40 -
4.3.1	PCR zur Genotypisierung der Knock-out-Mäuse .....	- 40 -
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>- 44 -</b>
5.1	SEQUENZANALYSE VON MIAPaCa-2-ZELLEN AUF GENETISCHE ABERRATIONEN IM MTUS1-GEN .....	- 44 -
5.1.1	Sequenzanalyse der codierenden Sequenz .....	- 44 -
5.1.2	Sequenzanalyse des Promotorbereichs und der folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 .....	- 45 -

---

---

5.2	SEQUENZANALYSE VON HUMANEN KOLONTUMOREN AUF GENETISCHE ABERATIONEN IM MTUS1-GEN .....	- 53 -
5.2.1	Sequenzanalyse der codierenden Sequenz .....	- 53 -
5.2.2	Sequenzanalyse des Promotorbereichs und der folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 .....	- 54 -
5.3	ZUCHT DER MTUS1 KNOCK-OUT-MÄUSE .....	- 57 -
5.3.1	Genotypisierung zum Nachweis des Knock-outs auf DNA-Ebene .....	- 57 -
5.3.2	Zuchtverlauf.....	- 58 -
5.4	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN AN BAUCHHAUTFIBROBLASTEN .....	- 66 -
5.4.1	Western Blot Analyse.....	- 66 -
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>- 69 -</b>
6.1	UNTERSUCHUNGEN AN MIAPACA-2- UND KOLONTUMOR-ZELLEN.....	- 69 -
6.1.1	Untersuchungen des codierenden Bereichs .....	- 69 -
6.1.2	Untersuchungen des Promotors und der dem Promotor folgenden Sequenz bis zum Exon 1 .....	- 70 -
6.2	ZUCHT DER MTUS1 KNOCK-OUT-MÄUSE .....	- 74 -
6.3	WESTERN BLOT ANALYSE .....	- 77 -
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>- 80 -</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>- 84 -</b>

DANKSAGUNG

CURRICULUM VITAE

---

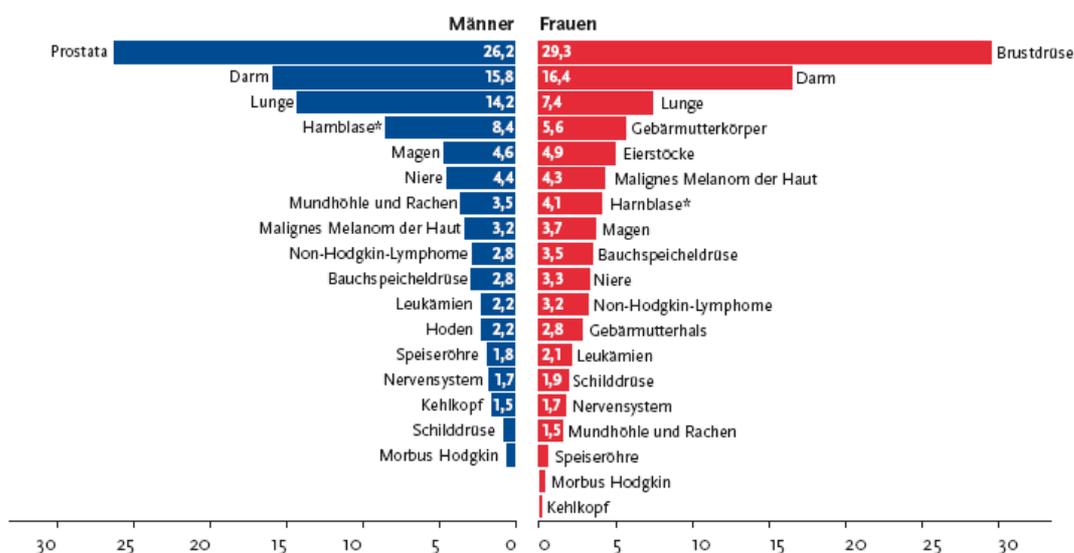
# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorentstehung

Maligne Tumoren zeichnen sich durch unkontrollierte, invasive und destruierte Proliferation sowie durch die Fähigkeit zur Verschleppung und Absiedelung von Zellen in andere Gewebe und Organe (Metastasierung) aus.

Nach den Herz-Kreislaufkrankungen stellen maligne Tumorerkrankungen in den westlichen Industrieländern zurzeit die zweithäufigste Todesursache dar (Arias et al., 2003). Eine aktuelle Schätzung des Robert-Koch-Instituts für das Jahr 2006 geht von einer Inzidenz von zirka 426.800 malignen Tumoren in Deutschland aus, wobei 229.200 Männer und 197.600 Frauen betroffen sind. Dabei sind bei Männern das Prostatakarzinom (26,2 %) und bei Frauen das Mammakarzinom (29,3 %) die beiden häufigsten malignen Neuerkrankungen (Robert Koch Institut, 2010).

**Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006**  
 Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut



\* einschließlich bösartiger Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens

Abbildung 1: Prozentuale Verteilung der Krebsneuerkrankungen in Deutschland bei Männern und Frauen nach der Statistik des Jahres 2006 des Robert-Koch-Instituts.

Der Entstehung maligner Tumoren, auch Kanzerogenese genannt, liegt ein mehrstufiger Prozess zu Grunde. Dieser ist gekennzeichnet durch eine Akkumulation von Mutationen im Genom der betroffenen Zelle und epigenetische Veränderungen wie Verlust der Kontaktinhibition, Entdifferenzierung, Resistenz gegen apoptotische und externe Wachstumsinhibitoren, Unabhängigkeit gegenüber Wachstumsfaktoren, Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation und Neoangiogenese sowie der Fähigkeit, eine tumorspezifische Immunantwort zu unterdrücken. Die genetischen Veränderungen können entweder vererbt sein oder sie werden im Lauf des Lebens durch verschiedene Auslöser, die als Kanzerogene bezeichnet werden, erworben. Zu den bekanntesten Kanzerogenen gehören Chemikalien wie aromatische Amine oder Benzol sowie physikalische Noxen wie UV-Licht, ionisierende Strahlen und onkogene Viren (zur Hausen et al., 1989). Die entstandenen genetischen Veränderungen akkumulieren über einen längeren Zeitraum in der betroffenen Zelle und können entweder zur Aktivierung oder zur Inaktivierung des betroffenen Gens führen. Für die Kanzerogenese und Progression von Tumoren sind vor allem Mutationen in zwei bestimmten Gengruppen entscheidend, die als Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene bezeichnet werden und welche maßgeblich an der Regulation und Kontrolle der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen beteiligt sind (Poremba et al., 1999).

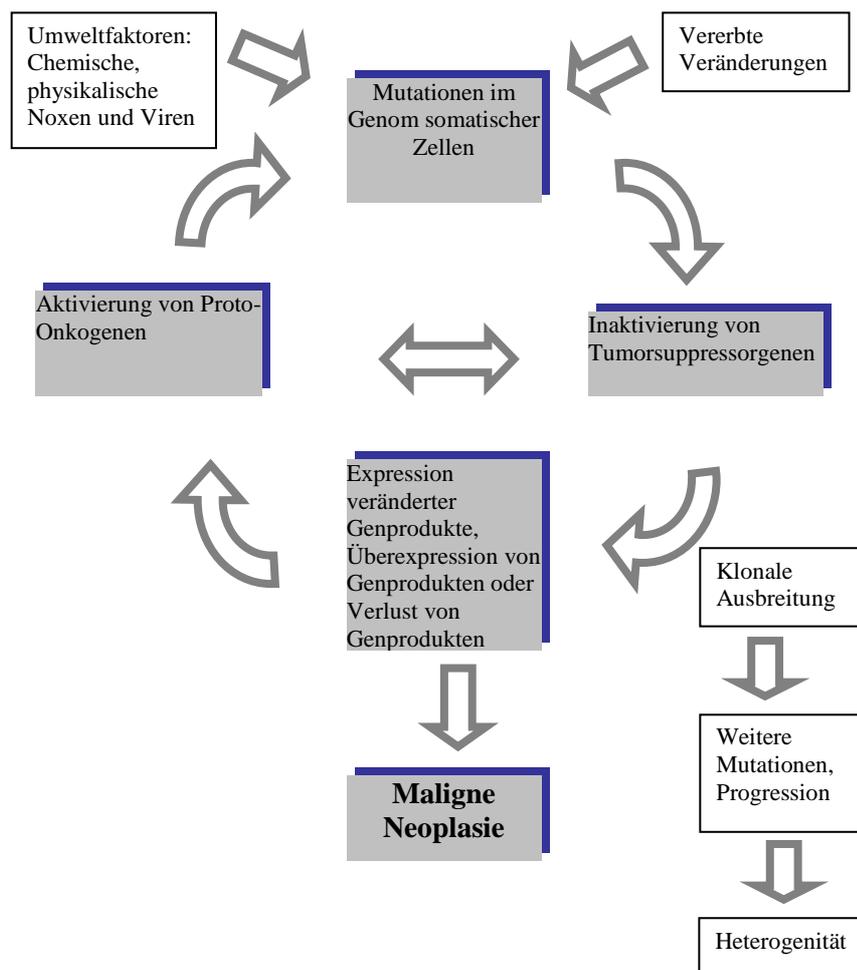


Abbildung 2: Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgen in der Karzinogenese (modifiziert nach Poremba C, 1999).

Proto-Onkogene codieren für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Elemente der Signaltransduktionskette, Transkriptionsfaktoren und Regulatoren der Apoptose. Die genannten Proteinprodukte der Proto-Onkogene stimulieren die Proliferation und werden in normalen Zellen streng kontrolliert und nur bei Bedarf in begrenzten Mengen exprimiert. Werden die Proto-Onkogene zu Onkogenen aktiviert, können sie eine abnorm erhöhte Proliferation verursachen und so zur Entstehung maligner Zellen führen. Die Aktivierung erfolgt am häufigsten durch Punktmutationen wie Deletionen (Verlust einer Base aus der DNA-Sequenz), Substitutionen (Austausch der ursprünglichen Base durch eine andere) oder Insertionen (Einfügen einer zusätzlichen Base in die ursprüngliche DNA-Sequenz). Ein weiterer Mechanismus, der

zur Aktivierung von Onkogenen führt, ist die Genamplifikation, worunter man die Vermehrung des normalerweise in zweifacher Kopie vorhandenen Gens versteht (Böcker et al., 2003). Die Amplifikation führt zu einer erhöhten Expression eines Gens, welche einen selektiven Vorteil für Proliferation bedeuten kann. Somit sind Onkogene infolge ihrer Aktivierung, die auch als „gain of function“ bezeichnet wird, durch ihre deregulierte, gesteigerte Funktion des Gens bzw. seines Expressionsproduktes an der Karzinogenese beteiligt (Poremba et al., 1999). Dabei ist es ausreichend, wenn ein Allel von der genetischen Veränderung betroffen ist, was ein dominantes Verhalten charakterisiert (Böcker et al., 2003).

Tumorsuppressorgene regulieren in normalen Zellen eine große Anzahl unterschiedlicher zellulärer Aktivitäten wie das Erkennen und die Reparatur von DNA-Schäden, Proteinubiquitierung und -degradation, Zelldifferenzierung und -migration und die Angiogenese (Sherr et al., 2004). Weitere Funktionen von Tumorsuppressorgenen sind die Induktion terminaler Differenzierung, die Aufrechterhaltung genomischer Stabilität, die Triggerung des Alterungsprozesses, die Hemmung von Proteinasen, die Modulation von Histokompatibilitätsantigenen und die Vermittlung der Zell-Zell-Kommunikation (Löffler G et al., 2007). Eine der wichtigsten Funktionen eines Tumorsuppressorgens ist die Regulation der Proliferation einer Zelle, da die codierten Genprodukte eines Tumorsuppressorgens negative, das heißt supprimierende Regulatoren der Zellproliferation sind. Die Inaktivierung mit dem einhergehenden Verlust dieser Funktion („loss of function“) führt daher zu einer deregulierten Proliferation von Tumorzellen (Böcker et al., 2003). Der wohl bekannteste und am besten charakterisierte Vertreter der Tumorsuppressorgene ist das Tumorsuppressorgen p53. Es handelt sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor, der den Zellzyklus und die Apoptose reguliert. Im Falle einer Zellschädigung besteht durch p53 die Möglichkeit, die Zellteilung bis zur Reparatur des Schadens zu unterbinden oder aber bei einem irreparablen Schaden, die Apoptose der Zelle einzuleiten. Genetische Veränderungen, die zu einer Inaktivierung von p53 führen, konnten in zirka 50 % aller malignen Tumore nachgewiesen werden (Levine, 1997). Damit handelt es sich bei p53 nach aktuellem Wissensstand um das am häufigsten inaktivierte Tumorsuppressorgen in malignen Tumoren (Sherr et al., 2004).

Um ein Tumorsuppressorgen mit seinen Funktionen zu inaktivieren, müssen beide Allele inaktiviert werden, was bedeutet, dass sich Tumorsuppressorgene in der Regel rezessiv verhalten (Böcker et al., 2003). Gemäß der „two hit Hypothese“ nach Knudson geschieht dies durch zwei aufeinander folgende Ereignisse (two hits), wobei das erste Ereignis vererbt und das zweite Ereignis erworben sein kann. Für die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens und die damit einhergehende verminderte oder fehlerhafte Expression des codierten Genprodukts sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Eine wichtige Möglichkeit stellen genetische Veränderungen dar, wobei Punktmutationen (Deletionen, Substitutionen oder Insertionen) am häufigsten sind. Diese genetischen Veränderungen können in unterschiedlichen Regionen eines Gens vorkommen.

Zum einen kommen genetische Veränderungen im Promotorbereich eines Gens in Betracht. Als Promotor eines Gens wird eine bestimmte DNA-Sequenz bezeichnet, die am 5' Ende und somit vor der codierenden Sequenz eines Gens liegt. Der Promotor enthält Basensequenzen für die Bindung des sogenannten Initiationskomplexes aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren, mit dessen Bildung die Transkription beginnt. Außerdem enthält der Promotor Sequenzen für zusätzliche regulatorische Faktoren, an die sich weitere Transkriptionsfaktoren anlagern und die die Transkription kontrollieren. Solche Sequenzen, die die Transkription beschleunigen, werden als Enhancer und jene, die die Transkription verlangsamen, als Silencer bezeichnet. Mutationen im Promotor können zur Folge haben, dass die Wirkung eines Silencers verstärkt und somit die Transkription des Tumorsuppressorgens verlangsamt wird. Des Weiteren können Mutationen im Promotor bedingen, dass Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können und somit der Promotor nicht mehr als Transkriptionsstartpunkt erkannt wird. Dadurch kann kein Protein gebildet werden, womit die Funktion des Gens inaktiviert wird. Darüber hinaus kann eine genetische Änderung in der Promotorsequenz zur Folge haben, dass anstelle der normalerweise bindenden Transkriptionsfaktoren sogenannte regulierende Transkriptionsfaktoren binden können, die die Transkriptionsrate negativ beeinflussen und als Transrepressoren bezeichnet werden (Ganten et al., 2007). Wird der Promotor trotz der genetischen Veränderungen in der Sequenz als Transkriptionsstartpunkt erkannt, kommt es zur Synthese des unveränderten Genprodukts. Durch die Mutation im Promotor gelangt das Gen jedoch unter die

Kontrolle eines fehlerhaften Promotors, wodurch die regulierte Expression des Gens beeinträchtigt oder fehlerhaft wird (Löffler et al., 2007).

Zum anderen kann die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens durch Mutationen im codierenden Bereich ausgelöst werden. Hierbei wird das Tumorsuppressorgen zwar noch transkribiert, aber durch die genetische Veränderung in der mRNA kommt es durch die Verschiebung des Leserasters zur Synthese von fehlerhaften Genprodukten, die ihre Funktion nur noch teilweise oder nicht mehr erfüllen können. Außerdem können durch die Mutationen im codierenden Bereich von Tumorsuppressorgenen Abbruchcodons entstehen, was durch den Abbruch der Transkription ebenfalls zu fehlerhaften Genprodukten führt (Löffler et al., 2007).

Zellen, bei denen eine Aktivierung eines Proto-Onkogens zu einem Onkogen oder eine Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens vorliegt, zeichnen sich durch eine geringere Differenzierung und eine erhöhte Proliferation im Vergleich zu normalen Zellen aus. Die Proliferation und Differenzierung einer Zelle werden insbesondere durch Wachstumsfaktoren reguliert, indem sie durch Bindung an spezifische Rezeptoren, die meist zu der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Familie (RTK-Familie) der Rezeptoren gehören, Signalkaskaden aktivieren (Blume-Jensen et al., 2001). Beispiele für Rezeptoren, die zur Familie der RTKs gehören, sind der EGF-Rezeptor (EGFR), der Insulin-Rezeptor (InsulinR), der PDGF- Rezeptor (PDGFR) und der FGF-Rezeptor (FGFR).

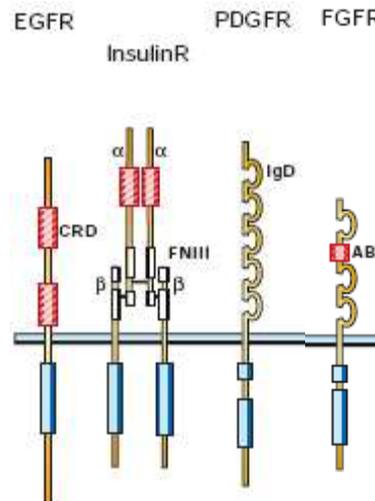
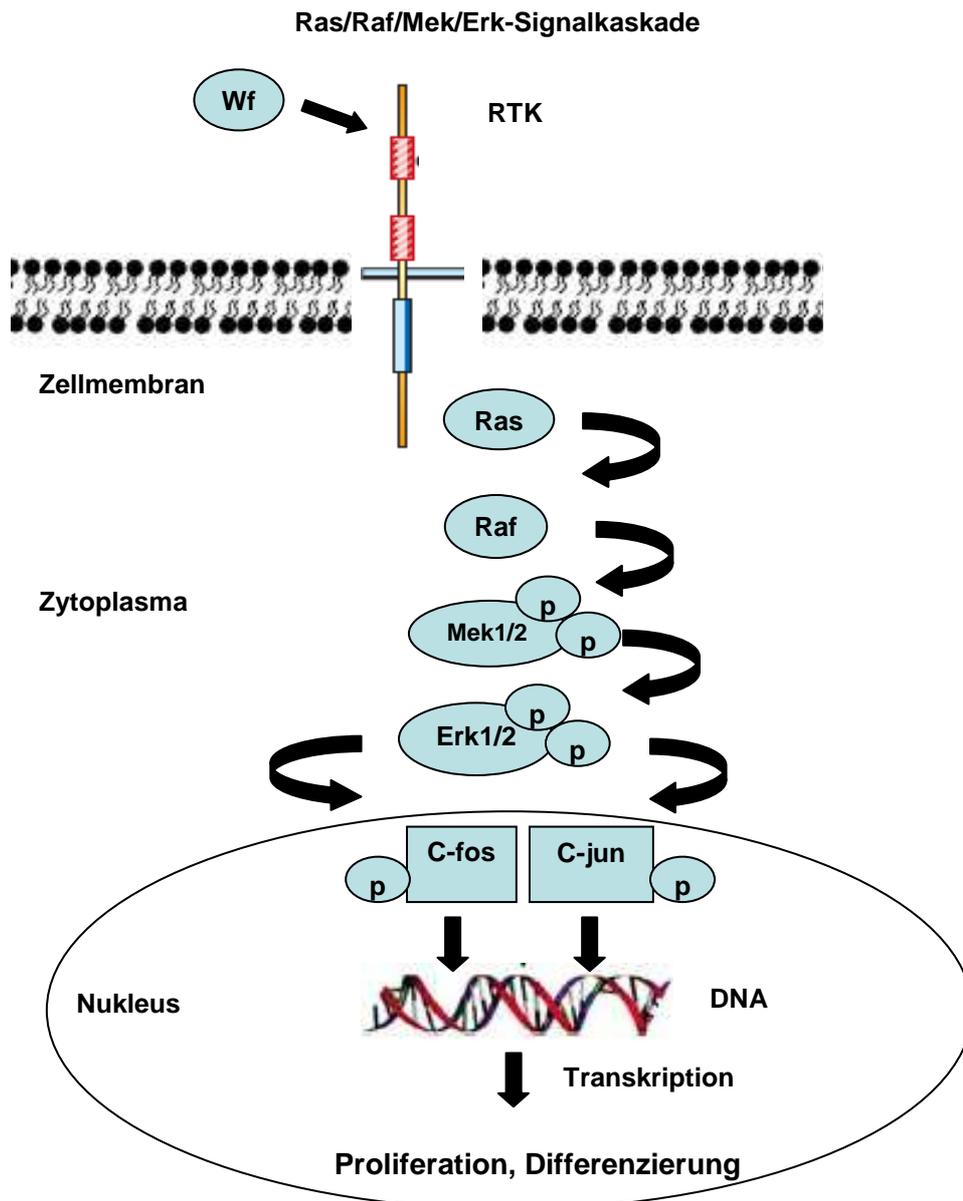


Abbildung 3: Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Abkürzungen der Rezeptoren: EGFR: epidermal growth factor receptor; InsulinR: Insulin-Rezeptor; PDGFR: platelet-derived growth factor receptor; FGFR: fibroblast growth factor receptor. CRD: Cystein reiche Domäne; FNIII: fibronectin type III like domain; IgD: immunoglobulin like domain, AC: acidic box;  $\alpha$ ,  $\beta$ :  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten. (Blume-Jensen et al., 2001).

Die Aktivierung der RTKs führt beispielsweise zur Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade. Diese ist ein zentraler MAPK-Signalweg (mitogen-activated protein kinases), der neben der Regulation der Proliferation auch eine Rolle bei der Differenzierung und unter bestimmten Umständen bei der Migration, Apoptose, der morphologischen Determination und onkogenetischen Transformation spielt (Seger et al., 1995; Torii et al., 2004; Viala et al., 2004; Yoon et al., 2006). Die Vermittlung der Signaltransduktion erfolgt über die Aktivierung von Ras, das an Raf bindet und dieses aktiviert. Raf aktiviert durch Phosphorylierung die MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) und die MEK2 Serin/Threonin Kinase. Diese bewirken über eine duale Phosphorylierung der Proteine Erk1 (extrazellular regulated kinase 1) und Erk2 (extrazellular regulated kinase 2) deren vollständige Aktivierung zu p-Erk1 (phosphorylated Erk1) und p-Erk2 (Seger et al., 1992). P-Erk1 und p-Erk2 phosphorylieren und aktivieren wiederum eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren wie c-Fos (Murphy et al., 2002) und c-Jun (Morton et al., 2003), die wichtig für die Initiation und Regulation von Proliferation und onkogenetischer Transformation sind (Shaul et al., 2007).



*Abbildung 4: Schematischer Überblick über die Ras/Raf/Mek/Erk-Signalkaskade. Die Bindung des Wachstumsfaktors (Wf) an den Rezeptor (hier RTK) führt zur Aktivierung von Ras, das an Raf bindet und dieses aktiviert. Raf aktiviert durch Phosphorylierung die MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) und die MEK2 Serin/Threonin Kinase. Diese bewirken über eine duale Phosphorylierung der Proteine Erk1 (extrazellular regulated kinase 1) und Erk2 (extrazellular regulated kinase 2) deren vollständige Aktivierung zu p-Erk1 (phosphorylated Erk1) und p-Erk2. P-Erk1 und p-Erk2 phosphorylieren und aktivieren wiederum eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren wie c-Fos und c-Jun.*

In malignen Tumoren findet sich häufig eine inadäquate Aktivierung der genannten Signalkaskade. So konnte in einer Vielzahl von Malignomen wie dem Mammakarzinom

(Sivaraman et al., 1997; Salh et al., 1999), dem Glioblastom (Mandell et al., 1998), dem Nierenzellkarzinom (Oka et al., 1995), dem hepatozellulären Karzinom (Schmidt et al., 1997), dem Prostatakarzinom (Magi-Galluzzi et al., 1998), dem oralen Plattenepithelkarzinomen (Mishima et al., 2002) und dem Adenokarzinom des Magens (Bang et al., 1998) eine erhöhte Erk-Expression oder aktiviertes p-Erk detektiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass viele Tumorsuppressorgene RTK Signalwege beeinflussen, um ihre Funktion zu erfüllen (Vogelstein et al., 2004).

Um die komplexen Prozesse der Karzinogenese besser verstehen zu können, ist es aufgrund der zentralen Bedeutung der Tumorsuppressorgene in der Tumorentstehung unabdingbar, neue Tumorsuppressorgene zu identifizieren und die von ihnen beeinflussten Signaltransduktionswege zu erforschen.

## **1.2 Das Tumorsuppressorgen MTUS1**

Mit dem Ziel neue, bisher nicht bekannte Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene zu identifizieren, wurde in früheren Arbeiten die molekulare Regulation der Zellproliferation und -differenzierung untersucht, da diese beiden Prozesse eine zentrale Rolle in der Kanzerogenese und der Tumorprogression spielen (Seibold et al., 2003). In vitro kann die Zelldifferenzierung und der Zellzyklusarrest durch die Transfektion von primären Zellen aus proliferierenden zweidimensionalen Zellkulturen in dreidimensionale Kollagen Typ I Zellkultursysteme induziert werden (Gruber et al., 2000; Marx et al., 1994; Prols et al., 2001). Um Gene zu identifizieren, die an der Regulation der Zelldifferenzierung und des Zellzykluses beteiligt sind, wurde so mit Hilfe des „Differential Display“ die Genexpression in proliferierenden, undifferenzierten Zellen in zweidimensionaler Zellkultur mit der Genexpression in nicht proliferierenden, sich differenzierenden Zellen in dreidimensionaler Zellkultur miteinander verglichen (Liang et al., 1992). So konnte ein neues Gen identifiziert werden, dessen Expression während der Einleitung des Zellzyklusarrests und der -differenzierung vorübergehend hochreguliert wird und zunächst als mitochondrial tumor suppressor 1 (MTUS1) bezeichnet wurde (Seibold et al., 2003). Die beobachtete Steigerung der Expression von MTUS1 während der Einleitung des Zellzyklusarrests

und der -differenzierung entspricht dabei dem erwarteten Verhalten eines Tumorsuppressorgens (Seibold et al., 2003).

Die zwischenzeitlich erfolgte weitere Charakterisierung von MTUS unterstützt die Hypothese, dass es sich bei diesem neuen Gen tatsächlich um ein Tumorsuppressorgen handelt. So ist MTUS1 auf Chromosom 8p21.3-22 lokalisiert, also einem Bereich, in dem schon lange die Existenz von mindestens zwei zusätzlichen Tumorsuppressorgenen vermutet wurde, da dort liegende genetische Veränderungen mit der Progression von Mammakarzinomen (Frank et al., 2007; Kerangueven et al., 1997; Yokota et al. 1999), hepatozellulären Karzinomen (Chan et al., 2002), Ösophaguskarzinomen (Ishii et al., 1999), kolorektalen Karzinomen (Fujiwara et al., 1993; Lee et al., 2006), Pankreaskarzinomen (Bardi et al., 1993), Prostatakarzinomen (Suzuki et al., 1995), Bronchialkarzinomen (Wistuba et al., 1999), Blasenkarzinomen (Wagner et al., 1997) und Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich (El Naggar et al., 1998; Ye et al., 2007) einhergehen. Für einige der genannten Tumorarten gelang es sogar, den Lokalisationsort weiterer Tumorsuppressorgene genau auf den Bereich zwischen den Markern D8S254 und D8S261 auf Chromosom 8p21.3-22 weiter einzugrenzen, in dem das MTUS1-Gen lokalisiert ist. So konnte nachgewiesen werden, dass ein Verlust des Allels, das zirka eine Megabase von dem Marker D8S254 entfernt liegt, mit einer Progression beim Kolonkarzinom (Tsai et al., 2002), Larynxkarzinom (Sasiadek et al., 2001), Mammakarzinom (Yaremko et al., 1995) und Prostatakarzinom (Vocke et al., 1996) in Zusammenhang steht. Außerdem wurde festgestellt, dass der Allelverlust des Markers D8S261 mit einer Progression von Bronchialkarzinomen (Wistuba et al., 1999), Larynxkarzinomen (El Naggar et al., 1998), Magenkarzinomen (Tamura et al., 2001), hepatozellulären Karzinomen (Kahng et al., 2003) und Prostatakarzinomen (Mc Carthy et al., 2004) einhergeht. Durch zwei weitere Arbeiten konnte auch ein funktioneller Nachweis für die Existenz von Tumorsuppressorgenen auf dem Chromosom 8 erbracht werden. So konnte durch einen Transfer von humanem Chromosom 8 eine Suppression der Metastasierung von Prostatakarzinomen bei Ratten induziert werden (Ichikawa et al., 1994) und durch monochromosomale Transfektion eines gesunden Chromosoms 8 das maligne Potenzial der Tumorzellen in kolorektalen Tumorzelllinien verringert werden (Gustafson et al., 1996).

Die weitere Charakterisierung von MTUS1 ergab, dass die MTUS1-mRNA in gesundem Gewebe ubiquitär exprimiert wird, somit auch in all den Geweben, für die bei einem Allelverlust von 8p21.3-22 eine Progression der Tumoren gezeigt werden konnte. Zwischen den verschiedenen untersuchten Geweben Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Plazenta, Skelettmuskel und Pankreas konnten dabei starke quantitative Unterschiede bezüglich der Genexpression detektiert werden (Seibold et al., 2003). Durch Seibold et al. konnte eine deutliche Reduktion der MTUS1-mRNA Expression bzw. eine komplette Inaktivierung von MTUS1 in Tumorzelllinien und Tumorgeweben gezeigt und nachgewiesen werden, dass die MTUS1-mRNA Expression in verschiedenen Pankreastumorzelllinien invers mit der Zelldifferenzierung und der -proliferation korreliert. In langsam proliferierenden und gut differenzierten Tumorzelllinien zeigt sich ebenso wie in gesundem Gewebe eine hohe Expression von MTUS1-mRNA. Dahingegen zeigten mäßig proliferierende und mäßig differenzierte Tumorzelllinien gegenüber gesundem Gewebe eine verminderte Expression von MTUS1-mRNA, und in der undifferenzierten, schnell proliferierenden Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2 und in Pankreaskarzinomgewebe konnte keinerlei MTUS1-mRNA Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 5). In unserer Arbeitsgruppe konnte in Kolontumorgeweben eine signifikante Verminderung von 40 bis 60 % der Expression der MTUS1-mRNA im Vergleich zu normalem Gewebe festgestellt werden, und eine weitere Arbeit bestätigte eine signifikant niedrigere Expression von MTUS1 in primären Ovarialtumoren im Vergleich zu normalem Gewebe des Ovars oder zu Ovarialzysten (Pils et al., 2005).

Schließlich konnte durch rekombinante Expression von MTUS1 in der Pankreastumorzelllinie MiaPaCa-2 auch nachgewiesen werden, dass die Tumorproliferation signifikant durch MTUS1 inhibiert werden kann, woraus sich eine direkte Beteiligung von MTUS1 an der Regulation der Zellproliferation ableiten lässt (siehe Abb. 5) (Seibold et al., 2003).

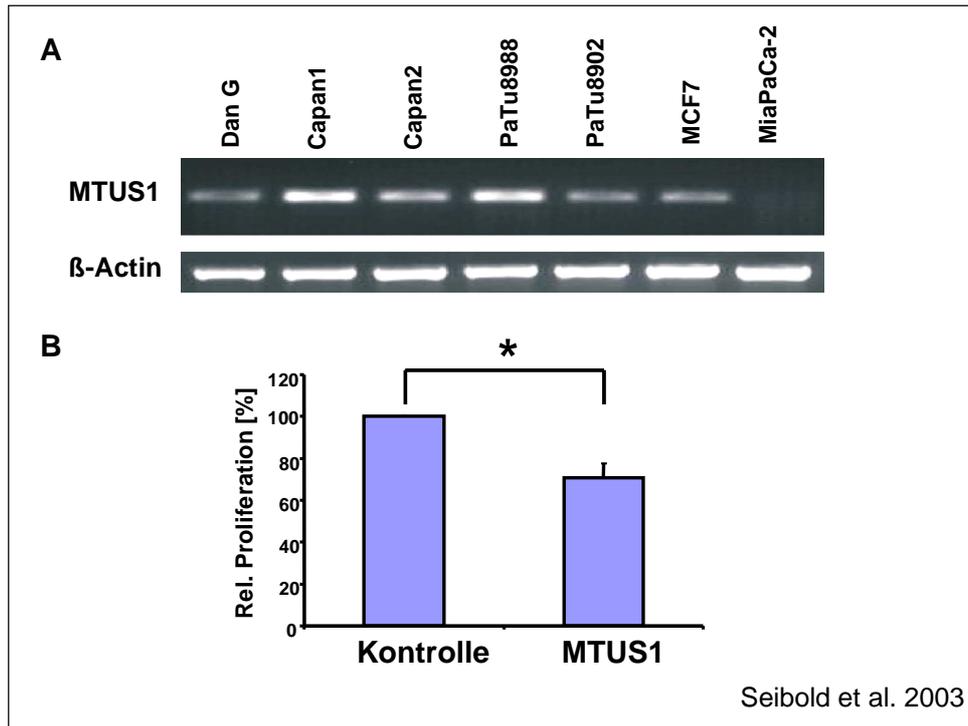


Abbildung 5: A, In den langsam proliferierenden und gut differenzierten Zelllinien (Capan1, Capan2 und PaTu8988) wurde eine hohe MTUS1-mRNA Expression gezeigt, wohingegen in den schnell proliferierenden und undifferenzierten Zelllinien (DanG, PaTu8902, MCF7 und MiaPaCa-2) eine niedrige Expression der MTUS1-mRNA festgestellt wurde. B: verminderte Zellproliferation von MiaPaCa-2-Zellen nach rekombinanter Expression von MTUS1.

Zunächst ergab die Analyse der 3753 Basenpaare (bp) langen cDNA von MTUS1, dass das Gen aus insgesamt zehn Exons besteht und ein Protein mit einer Länge von 436 Aminosäuren mit einer kalkulierten Masse von zirka 50 kDa kodiert.

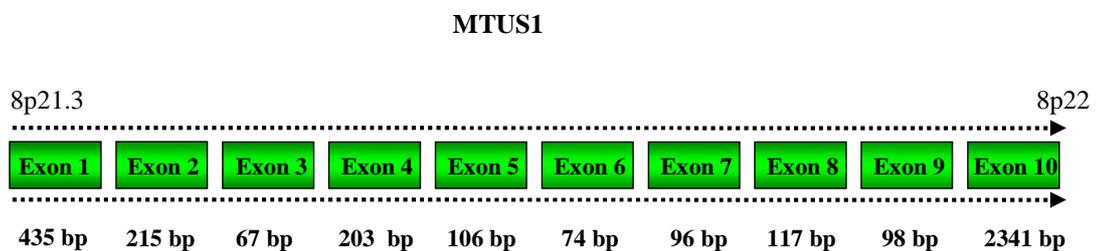


Abbildung 6: Darstellung der genomischen Lokalisation von MTUS1. Das Gen enthält zehn Exons auf dem Chromosom 8p21.3-8p22. Die Zahlen unter den einzelnen Exons geben die Größe des jeweiligen Exons in Basenpaaren (bp) an.

Später wurde von Nouet et al. MTUS1 unter dem neuen Namen ATIP (AT2-Rezeptor interagierendes Protein) als ein Protein mit vier Isoformen charakterisiert, das unterschiedliche N-terminale Enden, jedoch gleiche C-terminale Enden aufweist und an das C-terminale Ende des AT2-Rezeptors binden kann. Alle Proteinisoformen wiesen in der Nähe dieses C-terminalen Endes eine große coiled-coil Domäne auf, die ihnen eine Homo- und Heterodimerisierung erlaubt. Es wurde nachgewiesen, dass diese coiled-coil Region als Bindungspartner mit dem AT2-Rezeptor dient. Der AT2-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der generell gegensätzliche Wirkung zum AT1-Rezeptor hat und antiproliferative und proapoptotische Effekte induziert. Allerdings müssen für einige Funktionen des Rezeptors davon abweichende Signalwege existieren (Landon et al., 2005). Weiterhin konnten Nouet et al. zeigen, dass ATIP in deutlich mehr Geweben exprimiert wird als der AT2-Rezeptor. Zudem konnte gezeigt werden, dass ATIP nicht nur in malignen Tumorzellen an der Regulation der Proliferation beteiligt ist. So konnte ein signifikant inhibitorischer Effekt auf die Proliferation auch in primären Zellen, die mit den Wachstumsfaktoren Insulin, bFGF, EGF oder PDGF inkubiert wurden, nachgewiesen werden (Nouet et al., 2004). Dabei waren die beobachteten Effekte ähnlich denen des AT2-Rezeptors, wobei die Expression des AT2-Rezeptors, nicht aber dessen Aktivierung, Voraussetzung für den inhibitorischen Effekt durch ATIP war. Des Weiteren konnte durch Nouet et al. nachgewiesen werden, dass ATIP die Phosphorylierung von Erk, die zur Aktivierung von Erk zu p-Erk führt, inhibiert. Daher legen die Ergebnisse nahe, dass MTUS1/ATIP durch die Interaktion mit dem AT2-Rezeptor über die Inhibierung der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade die Proliferation inhibiert. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass es sich bei MTUS1 um ein mögliches Tumorsuppressorgen handelt. Um diese Hypothese zu erhärten, waren aber zusätzliche Untersuchungen erforderlich, die zur weiteren Charakterisierung von MTUS1 und dessen Signalwegen beitragen.

### **1.3 Knock-Out-Mäuse**

Die Charakterisierung des bekanntesten und bislang am besten charakterisierten Tumorsuppressorgens p53 wurde vor allem durch die Möglichkeit erleichtert, mit speziellen Methoden transgene Mäuse zu entwickeln. Diese Knock-Out-Mäuse, in

denen das zu untersuchende Gen ausgeschaltet ist, haben viele Vorteile. Zum einen können heterozygote Knock-Out-Mäuse für ein spezielles Tumorsuppressorgen als Krankheitsmodelle für Menschen dienen, die durch eine vererbte Veränderung für die Entstehung einer Tumorerkrankung prädisponiert sind. Homozygote Knock-Out-Tiere bieten den Vorteil, wichtige Einblicke in die Rolle von Tumorsuppressorgen in der Embryonalentwicklung, vor allem in der Organogenese, der Regulation der Zellzykluskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose zu gewähren. Der wichtigste Vorteil ist die Möglichkeit, das in der Knock-Out-Maus ausgeschaltete Tumorsuppressorgen und die Auswirkungen durch dessen Inaktivierung in vivo zu erforschen. Denn durch das lebende Modell mit allen Organen und komplexen Stoffwechselprozessen wird ermöglicht, diese nicht isoliert in Zellkulturmodellen, sondern in der Gesamtheit des Körpers zu betrachten. So wird durch die Ausschaltung eines Tumorsuppressorgens in einer Knock-Out-Maus möglich, dessen Funktion in einem komplexen Organismus zu erforschen und neue Erkenntnisse bezüglich dessen Rolle in der Entwicklung, der Differenzierung und der Zellzykluskontrolle zu gewinnen.

Um Knock-Out-Mäuse zu generieren, können genetisch veränderte Stammzellen (zum Beispiel aus der Mauslinie 129/OIa, die eine weiße Fellfarbe aufweisen) in aus Spendermäusen (zum Beispiel aus der Mauslinie C57Bl/6, die eine schwarze Fellfarbe aufweisen) isolierte Blastozysten injiziert werden. Diese werden dann in ein pseudogravidies Empfängertier transferiert, wo sie sich einnisten und entwickeln können. Nach ca. 20 Tagen werden die Mäuse geboren. Es resultieren Wildtyp-Tiere, wenn die injizierten veränderten Stammzellen zugrunde gegangen sind, sich die Blastozysten jedoch weiter entwickeln konnten. Diese Wildtyp-Tiere sind an ihrer schwarzen Fellfarbe zu erkennen. Können sich die Stammzellen in die Blastozyste integrieren, entsteht ein chimäres Tier. Diese Tiere verfügen über einen mosaikartigen Genotyp, da sie neben Zellen mit unveränderten Genen auch Zellen mit einem veränderten Allel des betroffenen Gens besitzen. Die chimären Tiere haben eine braune oder schwarz-weiß gefleckte Fellfarbe. Zur Zucht homozygoter Knock-Out-Mäuse werden die erzeugten chimären Tiere mit Tieren der Linie C57Bl/6 verkreuzt. Die Nachkommen können entweder einen Wildtyp-Genotyp mit schwarzer Fellfarbe

besitzen, wenn das chimäre Tier den unveränderten Genotyp vererbt hat, oder einen heterozygoten Genotyp mit brauner Fellfarbe, wenn das chimäre Tier den veränderten Genotyp vererbt hat. Die Verteilung der Wildtyp- und heterozygoten Tiere sollte gemäß der Mendelschen Regeln im Verhältnis 1:1 ausfallen. Durch Verkreuzen von zwei heterozygoten Tieren kann die F2-Generation erzeugt werden, wobei in dieser nach den Mendelschen Regeln eine Verteilung des Genotyps von Wildtyp:heterozygot:homozygot im Verhältnis 1:2:1 zu erwarten ist. In der F2-Generation kann nicht mehr von der Fellfarbe auf den Genotyp geschlossen werden, so dass ab der F2-Generation alle Tiere genotypisiert werden müssen.

Anhand dieser Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Knock-Out-Maus für MTUS1 entwickelt, anhand derer die weitere Charakterisierung des potenziellen Tumorsuppressorgens MTUS1 erfolgen sollte.

## **2 Problemstellung**

Die Tumorentstehung ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen, die unter anderem zu einer Inaktivierung und dem Expressionsverlust sogenannter Tumorsuppressorgene im Genom der betroffenen Zellen führen können. Durch Seibold et al. wurde ein neues, als MTUS1 bezeichnetes Gen identifiziert, für das ein hemmender Einfluss auf die Zellproliferation nachgewiesen werden konnte und dessen Expression in Tumorzelllinien und Kolontumoren signifikant vermindert ist. Andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass MTUS1 die Proliferation durch die Interaktion mit dem AT2-Rezeptor über die Inhibierung der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade inhibieren kann (Nouet et al., 2004). Zusammengefasst führen die Vorarbeiten zu der Hypothese, dass es sich bei dem Gen MTUS1 um ein neues Tumorsuppressorgen handelt, das durch seine Expression die Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade inhibiert und damit die Zellproliferation und schließlich die Tumorprogression hemmt. Um diese Hypothese zu erhärten, untersucht die vorliegende Arbeit die folgenden Fragen:

1. Kann die Inaktivierung und die damit verbundene Expressionsminderung von MTUS1 in MiaPaCa-2-Tumorzellen und Kolontumoren auf genetische Aberrationen zurückgeführt werden?
2. Welche Auswirkungen hat der Knock-Out von MTUS1 in vivo?
3. Bewirkt MTUS1 über eine Regulation der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade die Inhibition der Zellproliferation?

Mit folgenden Versuchen wurde die Hypothese überprüft:

- A. Sequenzanalyse von MiaPaCa-2-Zellen sowie Kolontumoren auf genetische Aberrationen im MTUS1-Gen. Nach Isolation und Amplifikation der DNA wurden der Promotor, die dem Promotor folgende nicht codierende Sequenz und der codierende Bereich von MTUS1 mittels Sequenzanalyse hinsichtlich vorhandener Mutationen untersucht.
- B. Zucht von MTUS1 Knock-Out-Mäusen zur weiteren Charakterisierung des MTUS1-Gens. Für eine erfolgreiche Generierung und Zucht von MTUS1-Knock-Out-Mäusen war die Etablierung einer Genotypisierungs-PCR zur Identifizierung der MTUS1-Knock-Out-Mäuse erforderlich. Zur

Genotypisierung wurde DNA aus Gewebe der zu untersuchenden Tiere isoliert und der Genotyp anschließend mittels Genotypisierungs-PCR ermittelt. Nach der Genotypisierung wurden die Tiere für die Generierung und Fortführung einer erfolgreichen Zucht oder zur Charakterisierung von MTUS1 eingesetzt.

- C. Vergleich der p-Erk Expression in Zellen aus MTUS1 homozygoten Knock-Out Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren. Dafür wurden Zellen aus homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäusen und aus Wildtyp-Mäusen mit den Wachstumsfaktoren EGF, PDGF und Insulin inkubiert und anschließend eine Proteinisolierung und Expressionsanalyse von p-Erk mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

##### 3.1.1 Klonierung

###### **Chemikalien**

Agarose, Electrophoresis Grade  
 Ampicillin 50 µg/ml  
 Aqua ad injectabilia  
 Kanamycin 50 µg/ml  
 Lennox L Broth Base  
 Lennox L Agar  
 UV-Marker Gelstar

###### **Firma**

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland  
 GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland  
 GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland  
 GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland  
 Cambrex, Rockland, USA

###### **Kits**

One Shot E.coli  
 Qiaprep Spin Miniprep Kit  
 TOPO TA Klonierungskit  
 XL1-Blue Competent Cells

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Qiagen, Hilden, Deutschland  
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Stratagene, La Jolla, USA

###### **LB-Agarplatten mit Antibiotika**

32 g Lennox L Agar  
 in 1000 ml Aqua dest. Suspendieren  
 15 min bei 121°C autoklavieren  
 bei ca. 70° C 50µg/ml Antibiotikum zugeben  
 Lösung direkt danach in Petrischalen  
 ausgießen

###### **LB-Medium**

20 g Lennox L Broth Base  
 in 1000 ml Aqua dest. suspendieren  
 15 min bei 121°C autoklavieren

### 3.1.2 PCR

#### Chemikalien

Agarose Electrophoresis Grade  
 Aqua ad injectabilia  
 DNA-Leiter peqGold Mix  
 dNTP-Mischung 10mM  
 Essigsäure 100%  
 Ethylendiaminotetraessigsäure  
 (EDTA)  
 Ladepuffer 6x für PCR Produkte  
 Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) 25mM  
 PCR-Puffer  
 Primer  
 Taq DNA-Polymerase  
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan  
 (Tris)  
 UV-Marker Gelstar

#### Firma

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
 Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland  
 Peqlab, Erlangen, Deutschland  
 MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland  
 Roth, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland  
 Peqlab, Erlangen, Deutschland  
 MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland  
 MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland  
 MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland  
 MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland  
 Merck, Darmstadt, Deutschland  
 Cambrex, Rockland, USA

#### Kits

DNA Gel Extraction Kit  
 DNeasy Tissue Kit  
 Expand High Fidelity PCR-System  
 (PCR-Puffer, Expand High Fidelity  
 Enzym-Mix)  
 Hot Star-PCR (PCR-Puffer, HotStar-  
 Taq-Polymerase, Q-Solution)

Qiagen, Hilden, Deutschland  
 Qiagen, Hilden, Deutschland  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,  
 Deutschland  
 Qiagen, Hilden, Deutschland

#### 50x TAE-Puffer

2 M Tris  
 0,1 M EDTA  
 mit Eisessig auf pH 7,5 einstellen



---

ECL Western Blotting Detection System      Amersham, Buckinghamshire, England  
ECL plus Western Blotting Detection System      Amersham, Buckinghamshire, England

**1x MLB-Puffer**

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

**1x Lysispuffer pH 7,4**

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

**3x SDS-Puffer pH 6,7**

0,2 M Tris  
0,2 M SDS  
15 ml Glycerin  
3 mg Bromphenolblau  
ad 100 ml mit Aqua dest.  
frisch mit 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
versetzen

---

<b>1x Laufpuffer</b>	8 mM Tris 250 mM Glycine 1 % SDS-Lösung 10 %-ig
<b>5x Transferpuffer pH 10</b>	25 mM Tris 0,2 M Glycine 0,1 M NaOH Plätzchen 1 l Methanol ad 5 l mit Aqua dest.
<b>1x TBS pH 7,5</b>	200 mM Tris 1500 mM NaCl
<b>1x TBS-T</b>	0,1 % Tween 20 in 1x TBS
<b>Tris-Puffer 0,5 M pH 6,7</b>	0,5 M Tris mit HCl einstellen auf pH 6,7
<b>Tris-Puffer 3 M pH 8,7</b>	3 M Tris mit HCl einstellen auf pH 8,7
<b>10 % APS-Lösung</b>	10 g APS ad 100 ml H <sub>2</sub> O
<b>10 % SDS-Lösung</b>	10 g SDS ad 100 ml H <sub>2</sub> O
<b>Sammelgel</b>	Rotiphorese Gel 30    3,0 ml 0,5 M Tris-Puffer    2,5 ml 10 % SDS-Lösung    0,2 ml

	Aqua dest.	14,1 ml
	TEMED	10,0 µl
	10 % APS-Lösung	0,8 ml
<b>Trenngel</b>	Rotiphorese Gel 30	13,3 ml
	3M Tris-Puffer	5,0 ml
	10 % SDS-Lösung	0,4 ml
	Aqua dest.	21,2 ml
	TEMED	20,0 µl
	10 % APS-Lösung	0,4 ml
<b>Antikörper</b>		
anti-p-Erk (E-4), mouse monoclonal IgG, 200 µg/ml	Santa cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg	
ECL anti-Mouse IgG, HRP-Linked F(ab') <sub>2</sub> Fragment (from sheep)	Amersham, Buckinghamshire, England	
anti-β-Aktin, mouse monoclonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	
Anti-mouse gekoppelte Peroxidase	Dako Deutschland GmbH, Hamburg	

### 3.1.4 Zellkultur

#### Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM Medium High Glucose	PAA, Linz, Österreich
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Linz, Österreich
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fibroblasten-Basalmedium (FBM)	Cambrex, Walkersville, USA
Fötale Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gentamicinsulfat/Amphotericin B	Cambrex, Walkersville, USA

L-Glutamin 100 X 200mM	PAA, Linz, Österreich
Insulin	Cambrex, Walkersville, USA
Platelet derived Growth Factor (PDGF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Linz, Österreich
r-human Fibroblast Growth Factor (rhFGF)	Cambrex, Walkersville, USA
Trypsin/EDTA 10x	PAA, Linz, Österreich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

### Medien

#### EGF-Medium (EGF 100ng/ml)

Hungermedium	25 ml
EGF 100ng/ml	25 µl
Penicillin/Streptomycin 100 x	250 µl

#### FGF-Medium (FGF 50ng/ml)

Hungermedium	25 ml
rhFGF-B 50ng/ml	1866 µl
Penicillin/Streptomycin 100 x	250 µl

#### Hungermedium

FBM-Medium	450 ml
Penicillin/Streptomycin 100 x	4,5 ml

#### Insulin-Medium (Insulin 1µg/ml)

Hungermedium	25 ml
Insulin 1 µg/ml	2,5 µl
Penicillin/Streptomycin 100 x	250 µl

#### Insulin-Medium (Insulin 10µg/ml)

Hungermedium	25 ml
Insulin 10 µg/ml	2,5 µl
Penicillin/Streptomycin 100 x	250 µl

**PDGF-Medium (PDGF 50ng/ml)**

Hungermedium	25 ml
PDGF 50 ng/ml	12,5 µl
Penicillin/Streptomycin 100x	250 µl

**Wachstumsmedium**

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

**MiaPaCa-2-Zellen**

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

**Zellen**

Fibroblasten	Nephrologie, Würzburg, Deutschland
MiaPaCa-2	LGC Promochem, Wesel, Deutschland

**Einfriermedium**

Jeweiliges Wachstumsmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid versetzen.

**1x TrypsinEDTA**

10x Trypsin/EDTA mit PBS verdünnen.

### 3.2 Geräte und Zubehör

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Blotting Kammer mit Zubehör	BioRad, Hercules, Canada
Eismaschine	Genheimer, Hettstadt, Deutschland
Elektrophoresekammer mit Zubehör	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Elektrophorese Power Supply EPS301	Amersham Biotech, Freiburg, Deutschland
Fotoapparat Polaroid DS 34 Gelcam mit Zubehör	Polaroid, Offenbach, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C Liebherr Comfort	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Genheimer, Hettstadt, Deutschland
Gelkammer Elektrophorese mit Zubehör	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Glas Homogenisator 1 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubator Heraeus für Bakterien	Kendro, Hanau, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Profi Line	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Laminar Flow LaminAir HB2472	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland
Mischer/Zentrifuge Mikrospin FV-2400,	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Personal Spin Vortex	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten Professional	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe Accu-Jet	Schröder & Henke, Wiesloch, Deutschland
Rollschüttler Cat RM5	Protec Gerätebau, Oberstenfeld, Deutschland
Röntgenfilm Entwicklermaschine Optimax	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Röntgenkassette	Nichols Institute, Bad Nauheim, Deutschland
Schütteltisch Allegro Rotator	

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thriller (Thermoschüttler)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
UV-Licht TFX-35M	Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich
Vakuum Trockner DNA Speed Vac 110	Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA
Waage Mettler AE240	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Waage Mettler PM6100	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotixa / P	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Blotting Papier	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
dünnwandige PCR-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Cups versch. Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fotofilm Polaplan 667	Polaroid, Offenbach, Deutschland
Kryoröhrchen	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
Skalpell Cutfix 10	Braun, Tuttlingen, Deutschland
Spritzen Omnican versch. Größen	Braun, Melsungen, Deutschland

### 3.4 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte in speziellen Käfigen bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 20 °C. Die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 50 und 70 %. Die Käfige wurden in Scantainern verwahrt. Das Reinigen der Käfige durch Erneuerung der Einstreu wurde zweimal pro Woche durchgeführt, und den Tieren war es möglich, jederzeit an Wasser, Futter und Zellstoff zu gelangen. Als Ersatz für einen Tag-Nacht-Rhythmus wurde ein Hell-Dunkel-Intervall von zwölf Stunden eingehalten. Zur Infektionsprävention erfolgte das Betreten der Haltungsräume ausschließlich nach Bekleiden mit einem frischen Kittel, Überschuh, einer OP-Maske und Handschuhen.

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-Zell- und Kolontumor-DNA

Sowohl in Kolontumoren als auch in der Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2 konnte keine bzw. eine verminderte Expression und somit eine Inaktivierung des potenziellen Tumorsuppressorgens MTUS1 gezeigt werden (Seibold et al., 2003). Ziel der Arbeit war es, mögliche Ursachen dafür zu untersuchen. Eine Möglichkeit stellen genetische Mutationen dar, weshalb die codierende und nicht codierende Sequenz sowie der Promotorbereich dieser Zelllinie und zweier Kolontumoren hinsichtlich vorhandener genetischer Mutationen im MTUS1-Gen untersucht wurden.

#### 4.1.1 Gewinnung der DNA aus MiaPaCa-2-Zellen

Zur Untersuchung der DNA-Sequenz der MiaPaCa-2-Zellen wurden diese zunächst mittels Zellkultur angezüchtet. Die Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut, in 5 ml Wachstumsmedium suspendiert, dann 6 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Nachdem die Zellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Die DNA-Isolierung erfolgte anschließend mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kits“, dessen Prinzip darauf beruht, dass die DNA an eine auf Kieselsäure basierende Membran in Abhängigkeit von pH-Wert (optimale Bindung bei pH < 7,5) und der Salzkonzentration gebunden wird. Die spektralphotometrische Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte mittels UV-Meter. Bei der Messung wurde die Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm gemessen, da die DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm ein charakteristisches Absorptionsspektrum besitzt. Die Konzentration wurde mittels folgender Formel errechnet: DNA-Konzentration (ng/ $\mu$ l) = OD<sub>260</sub> Wert \* 50 \* Verdünnungsfaktor. Eine Extinktion von 1,0 bei  $\lambda = 260$  nm entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml, die Reinheit der DNA-Probe kann durch den Quotienten der OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ermittelt werden. Bei einer reinen Probe liegt der Quotient > 1,8.

#### **4.1.2 Gewinnung der DNA aus Kolontumorgewebe**

Zur Untersuchung der Promotorregion und der dem Promotor folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 in Kolontumorgewebe wurde die DNA Isolierung, wie bereits unter 4.1.1 beschrieben, mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kits“ durchgeführt.

#### **4.1.3 Gewinnung von cDNA aus Kolontumorgewebe**

Zur Untersuchung der codierenden Sequenz wurde zunächst bei einer begrenzten Menge an Tumorgewebe und somit des genetischen Materials deren cDNA synthetisiert. Die unaufgetauten Tumorgewebeproben zweier Patienten wurden zur Stabilisierung in RNAlater gelegt, drei Tage inkubiert und im Anschluss die mRNA mit Hilfe des „RNeasy Kits“ aus dem Gewebe gewonnen. Nach der Lyse und Homogenisierung der Gewebeproben in einem Puffer, der Guanidinothiocyanat enthält und so RNasen inaktiviert, werden durch die Zugabe von Ethanol die optimalen Bedingungen zur Bindung der RNA an eine Kieselsäuregelmembran hergestellt. Nach drei Waschschrritten konnte die RNA eluiert werden. Anschließend konnte nach dem Oligo dT-Protokoll des „First Strand cDNA Synthesis Kits“ aus 1 µg mRNA die cDNA synthetisiert werden.

#### **4.1.4 Sequenzanalyse des Promotors, der dem Promotor folgenden Sequenz und der codierenden Sequenz in MiaPaCa-2- und Kolontumor-DNA**

Der Promotorbereich des MTUS1-Gens wurde durch das Computerprogramm TESS des „Penn Center for Bioinformatics“ durch Vergleich von Motiven bekannter Promotorsequenzen für das Sequenzstück von Pos. 4860 - 5100 (Genbank Nr. AF165145) vorhergesagt. Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit wurde mittels Promoter Assay die regulatorische Funktion dieses vorhergesagten Promoterbereichs bestätigt. Für die Sequenzierung des Promotors und der dem Promotor folgenden, nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 (Pos. 5101 - 8933) wurden die Bereiche von Position 4800 - 6200 und 4860 - 8959, sowie die Bereiche der zehn Exons von MTUS1 mittels PCR mit den im Folgenden angegebenen Primerkombinationen zunächst amplifiziert. Die Primerkombinationen wurden so konstruiert, dass die jeweiligen Teilstücke überlappend amplifiziert wurden.

### MiaPaCa-2-bzw. Kolontumor-DNA

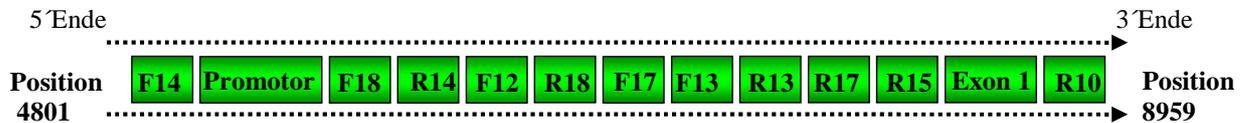


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Primerlage zur Amplifikation des Promotors und der folgenden Intronsequenz bis zum Beginn des Exon 1.

Die Bedingungen der PCR wurden ausgetestet, indem die optimale Annealing-Temperatur mittels eines Temperaturgradienten ermittelt wurde.

Pimer	Position	Sequenz Primer [5' 3']	Annealing-Temperatur	
			MiaPaCa	KoTu
<b>Promotor :</b>				
F14	4801 - 4825	CTTTGGGAGGCCAAAGCAGGTG GAT	60,5 °C	60,5 °C
R14	6094 - 6118	GAAGCAGAGCCTGTGTTAGGATG TC		
<b>Promotor folgende Sequenz :</b>				
<b>F18 - R18</b>				
F18	5895 - 5914	CTGGCTGCATGATTTTTGAA	63,3 °C	59,3 °C
R18	6518 - 6538	GGCATCACCAAGGACAGTAGA		
<b>F12 - R13</b>				
F12	6181 - 6205	GCTGGAGTGCAATGGCGCAATCT CT	65,1 °C	67,8 °C
R13	7321 - 7347	CGCAGTCTCTGCTCACTGCAATC TC		
<b>F13 - R10</b>				
F13	7299 - 7318	AATCACTTGAACCCGGGAGG	67,0 °C	67,8 °C
R10	8942 - 8959	CACTGTGCATGCTTGTGGAG		
<b>F17 - R17</b>				
F17	6926 - 6945	ATTCCTGCAGTCTTCTGCTC	Nicht verwendet	59,9 °C
R17	7581 - 7601	CCTCTACCTCCCAAACCTTG		

Tabelle 1: Verwendete Primerkombinationen für die Amplifikation und Sequenzierung der jeweiligen Teilstücke zur Sequenzierung des Promotors und der dem Promotor folgenden Sequenz bis zum Exon 1 (MiaPaCa-2- und Kolontumor-DNA).

Pimer	Position	Sequenz Primer [5' 3']	Annealing-Temperatur
<b>Exons</b>			
<b>Exon 1</b> (Position 8933 - 9367)			
F1	8884 - 8903	CCTGAGACCACCCACTTTCT	60,0 °C
R1	9391 - 9410	CATCCCCCGTGCAACACTAA	
<b>Exon 2</b> (Position 22072 - 22286)			
F2	21901 - 21920	TCCAACCATCTAGATCTCCG	60,0 °C
R2	22311 - 22330	CCGACCTCAAGTAGAAAGGC	
<b>Exon 3</b> (31328 - 31394)			
F3	31226 - 31245	CTTCCCAATACTGGGTCTCA	60,0 °C
R3	31501 - 31520	ATACCAGACAGGGAGTGCCA	
<b>Exon 4</b> (50528 - 50730)			
F4	50431 - 50450	GCTTCAGGTGTCATCACAGC	60,0 °C
R4	50761 - 50780	CAAGTAAGCAGCAGAGGCCT	
<b>Exon 5</b> (51929 - 52034)			
F5	51821 - 51840	CCACGCTTACCTGTGAAGCT	60,0 °C
R5	52121 - 52140	ACAGGGCATTTCGCTGAAGCA	
<b>Exon 6</b> (53097 - 53170) -7 (53314 - 53409)			
F6	52995 - 53014	CGGCTTCATCATCAACCCCT	60,0 °C
R7	53476 - 53495	TTCTCTGGCTGCTGAGTACT	
<b>Exon 8</b> (56633 - 56749)			
F8	56519 - 56538	GATGAACATCTGTCGCTTGC	60,0 °C
R8	56826 - 56845	GCAGTTAACCCAACTCCACA	
<b>Exon 9</b> (59517 - 59614)			
F9	59433 - 59452	GTGCTTGTGTCGTGAGGTGC	60,0 °C
R9	59671 - 59690	AGAGCGTGTCCAGAAAGTAC	
<b>Exon 10</b> (60457 - 62797)			
F10	60321 - 60340	CCTGTGACCTTGTGCAGGAT	60,0 °C
R10	62839 - 62858	TACTGTGCTGTCACAGGGCT	

*Tabelle 2: Verwendete Primerkombinationen für die Amplifikation und Sequenzierung der jeweiligen Teilstücke zur Sequenzierung der Exons in MiaPaCa-2-DNA mit Angabe der jeweiligen Annealing-Temperatur.*

PCR-Protokoll für die Amplifikation des Promotors und der dem Promotor folgenden, nicht codierenden Sequenz der MiaPaCa-2-DNA und Kolontumor-DNA und der Exons aus MiaPaCa-2-DNA:

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

*Tabelle 3: PCR-Protokoll für die Amplifikation des Promotors und der dem Promotor folgenden, nicht codierenden Sequenz der MiaPaCa-2-DNA und Kolontumor-DNA und der Exons aus MiaPaCa-2-DNA.*

Die jeweiligen PCR-Produkte wurden anschließend wie unter 4.1.6 beschrieben direkt sequenziert.

Zur Untersuchung der codierenden Sequenz zweier Kolontumorproben wurde mit der jeweiligen cDNA eine PCR zur Amplifikation der gesamten MTUS1 cDNA mit der genannten Primerkombination und unten aufgeführtem Protokoll nach Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur mittels Temperaturgradient durchgeführt (Positionsangaben gemäß Genbank Nr. NM020749).

Primer	Position	Sequenz (5'3')
hMTUS1 F31	43 - 68	GCAGCTTCTAGACCTGCAGGAGGGAG
hMTUS1 R31	3389 - 3414	GAGAACAACCTTGGAAGCGTGAGCAGA

*Tabelle 4: Primerkombination für die Amplifikation der cDNA der Kolontumorproben.*

PCR-Protokoll für die Amplifikation der Kolontumor-cDNA:

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

Tabelle 5: PCR-Protokoll für die Untersuchung der Kolontumor-cDNA.

#### 4.1.5 Klonierungsreaktion

Die amplifizierten Teilstücke mit den Primerkombinationen F12/R13 und F13/R10 der MiaPaCa-2-DNA wurden zur Vervielfältigung des genomischen Materials in Klonierungsreaktionen mit dem „TOPO TA Cloning Kit“ in den Plasmidvektor pCR2.1 TOPO inseriert, in *Escherichia coli* transfiziert und anschließend mit den Primern M13 uni (-21) und M13 rev (-29), die auf dem Plasmidvektor vor bzw. hinter dem inserierten PCR-Produkt liegen, sequenziert.

Primer	Sequenz Primer [5' 3']
M13 uni (-21)	TGTAAAACGGCCAGT
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC

Tabelle 6: Verwendete Primer m13 uni (-21) und M13 rev (-29).

Zur Klonierung wurde die gewünschte PCR-Bande zunächst aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert, dessen Prinzip darauf beruht, dass die DNA an einer auf Kieselsäure basierenden Membran in Abhängigkeit von pH-Wert (optimale Bindungsbedingungen bei pH-Wert < 7,5) und der Salzkonzentration gebunden wird. 4 µl der so gewonnenen DNA wurden anschließend mit 1 µl des TOPO Vektors und 1 µl Salzlösung vermischt und inkubiert. Die Taq-Polymerase besitzt eine Transferaseaktivität, die es ihr ermöglicht, einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende von PCR-Produkten anzufügen. Der TOPO Vektor hat überhängende Desoxythymidinreste am 3'-Ende, so dass eine Bindung des PCR-Produkts mit dem Vektor ermöglicht wird. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem QIAprep-Spin-Miniprep-Kit. Das Prinzip des Kits beruht auf der Lyse der Bakterien

unter alkalischen Bedingungen, so dass die frei gewordene DNA unter salzreichen Bedingungen an eine Kieselgelmembran gebunden werden kann. Die Plasmid-DNA kann dann nach einigen Waschschritten eluiert werden. Die Plasmide, die das PCR-Produkt enthalten, weisen mehr Basenpaare auf, wodurch es möglich ist, die Plasmide mit integriertem PCR-Produkt von solchen ohne das PCR-Produkt durch das unterschiedliche Laufverhalten in Agarosegelen zu unterscheiden.

#### 4.1.6 Sequenzanalyse

Zur Auswertung wurden die PCR-Proben jeweils mit 6 x Ladepuffer gemischt, in ein 2%-iges (Exons MiaPaCa-2-DNA) bzw. 1%-iges (Promotor, die dem Promotor folgende nicht codierende Sequenz, codierende Sequenz Kolontumor) Agarosegel in 1 x TAE-Puffer geladen und per Elektrophorese (Spannung: 110 V) nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Detektion der Banden mittels UV-Lampe wurde dem Gel 1 µl GelStar zugesetzt. Als Marker wurde der PeqGold Leiter eingesetzt. Die Banden der entsprechenden Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem „Gel Extraction Kit“ isoliert.

10 µl der gewonnenen DNA wurden mit der Zentrifuge DNA-Speed-Vac getrocknet und zum Sequenzieren zur MWG Biotech AG geschickt, wobei als Sequenzierprimer die oben genannten jeweiligen Forward-Primer und Reverse-Primer benutzt wurden (Sequenz- und Positionsangaben siehe oben, Tabellen 1 und 2).

Für das Teilstück F13-R10 wurde neben den Primern M13 uni (-21) und M13 rev (-29) (Sequenz- und Positionsangaben s.o. Tabelle 6) der Primer R15 verwendet.

Primer (Position)	Sequenz Primer [5' 3']
R15 (8434-8455)	CAGAGTTCCAGAAGAATAGTCC

*Tabelle 7: Verwendeter Primer R15.*

Zur Sequenzierung der cDNA aus Kolontumorgewebe wurden folgende Primer verwendet:

Vewendete Sequenzierungsprimer	Position Primer	Sequenz Primer [5' 3']
F32	558 - 577	AGTGGATTTATCCTGCAGCT
R32	633 - 652	CGCTCAGACAGCAGGTGCTG
F38	966 - 985	GAAGCTAGCCACTCAGAGAA
F33	1459 - 1478	AGTCGAAAGTCAACAAGCGA
F34	1947 - 1966	CTCAGGGCCCTATTAAGATT
F35	2391 - 2410	CTTACCCATGTGAGCCTAAC
F36	2927 - 2946	GGAGTCCCTTTGTCTTTGGG
F39	3390 - 3409	CTGCTCACGCTTCCAAGTTG

Tabelle 8: Verwendete Primer für die Sequenzierung der jeweiligen Teilstücke der codierenden Sequenz.

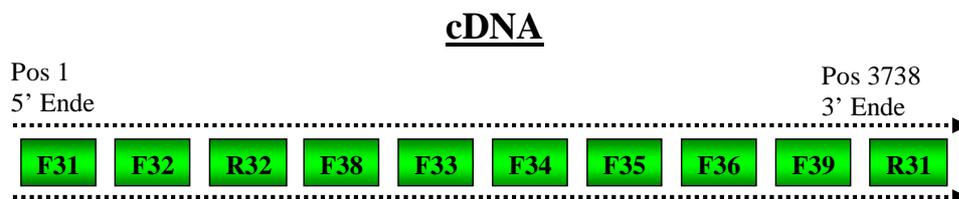


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Primerlage, die zur Sequenzierung der codierenden Sequenz verwendet wurden.

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit Hilfe des nucleotide BLAST Programms (Homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit der Genbank Nr. AF165145 (gesamten Sequenz von Homo sapiens chromosome 8 clone GS1 – 194016 map 8p23) verglichen und so auf Veränderungen überprüft.

## **4.2 Vergleich der Genexpression zwischen homozygoten MTUS1 Knock-Out-Mäusen und Wildtyp-Mäusen auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse**

In unserer Arbeitsgruppe wurden Proliferationsversuche mit Bauchhautfibroblasten durchgeführt, die aus für das MTUS1-Gen homozygoten Knock-Out- und Wildtyp-Mäusen isoliert und anschließend mit verschiedenen Wachstumsmedien inkubiert wurden. Die homozygoten Zellen zeigten dabei im Vergleich zu den Wildtypzellen eine

deutlich stärkere Proliferation mit allen verwendeten Wachstumsmedien. Zudem konnte durch Seibold et al. eine signifikant reduzierte Proliferation in MiaPaCa-2-Zellen nach rekombinanter Expression von MTUS1 nachgewiesen werden. Die ermittelten Proliferationsunterschiede sprechen für die Hypothese, dass es sich bei dem Gen MTUS1 um ein Tumorsuppressorgen handelt, das die Proliferation einer Zelle inhibiert. Nouet et al. postulierten, dass diese Beeinflussung der Proliferation durch MTUS1 mittels AT2-Rezeptor über den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg vermittelt wird. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob die Proliferationsunterschiede in Bauchhautfibroblasten aus homozygoten MTUS1-Gen Knock-Out-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren durch eine Beeinflussung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs zu erklären sind.

#### **4.2.1 Zellkultur zur Anzucht der zu untersuchenden Zelllinien**

Zur Isolation von Bauchhautfibroblasten wurde aus einer für MTUS1 homozygoten Knock-Out-Maus und einem gleich alten Wildtyp-Tier die Bauchhaut entnommen und in steriles PBS überführt. Unter dem Laminar Flow wurde das Gewebe zweimal in steriles PBS überführt und mit einem sterilen Skalpell in kleine Fragmente zerteilt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Gewebestücke für 30 Minuten mit 2 ml 10 x Trypsin/EDTA. Anschließend wurde die Suspension mit 10 ml FBM Kulturmedium aufgenommen und die Zellen auf eine 6-well-Platte ausgesät. Der Wechsel des Mediums erfolgte nach einer Woche, nach einer weiteren Woche waren bereits kleine Fibroblastenkolonien zu erkennen. Die erste Teilung der Fibroblasten erfolgte nach drei Wochen, die weiteren Teilungen erfolgten bei Konfluenz. Schließlich wurden die Zellen in sechs Flaschen à 75 cm<sup>2</sup> aufgeteilt, und man ließ sie in Wachstumsmedium vier Stunden anwachsen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und danach für 20 Stunden in FBM inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das FBM abgesaugt und 10 ml mit unterschiedlichen Wachstumsfaktormedien dazu pipettiert (FBM, EGF, PDGF, Insulin 1 µg/ml, Insulin 10 µg/ml und Wachstumsmedium, siehe 3.1.4). Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, dann mit 2 ml 2 x Trypsin abtrypsinisiert und in 6 ml PBS in 15 ml Röhrchen aufgenommen. Danach wurden die Zellen für fünf Minuten bei 22 °C bei 1200 U abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden danach noch einmal bei 1200 U für fünf Minuten bei 22 °C zentrifugiert und der restliche Überstand vorsichtig abpipettiert.

Die entstandenen Pellets wurden danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Proteinisolierung durchgeführt.

#### **4.2.2 Proteinextraktion**

Zur Proteinextraktion wurde zu dem Pellet 100 µl MLB Puffer hinzugegeben und das Ganze anschließend einige Male durch eine Insulinspritze gezogen, um die DNA zu scheren. Danach wurden die Proben für zehn Minuten bei 12000 rpm bei einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Zentrifugat verworfen.

#### **4.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Mit einer kleinen Menge der so gewonnenen Proteinlösung wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Komplexbildung des Triphenylmethan-Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) mit nichtpolaren, hydrophoben und kationischen Seitenketten von Proteinen in einer sauren Umgebung. Der Farbstoff liegt in seiner ungebundenen kationischen Form als roter Farbstoff vor. Durch die Komplexbildung des Farbstoffs mit den Proteinseitenketten im sauren Milieu wird die anionische, unprotonierte Sulfatform stabilisiert. Dadurch wird das Absorptionsmaximum von 470 nm der ungebundenen Form auf 595 nm des Komplexes verschoben. Anhand der Verdünnungsfaktoren und Proteinstandards kann per Messung die Proteinmenge ermittelt werden (Bradford, M., 1976). Zu dem Rest der Proteinlösung wurde 3x SDS-Puffer mit 10 % Mercaptoethanol im Verhältnis 2:1 hinzugegeben und das Gemisch anschließend für fünf Minuten bei 98 °C inkubiert. Von der Lösung wurden anschließend 10 µl entnommen und mit 90 µl 3 x SDS-Puffer mit 10 % Mercaptoethanol und MLB-Puffer im Verhältnis 1:2 versetzt.

#### **4.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten

dadurch eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt. Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (1970) wurden die Proben zunächst in einem Polyacrylamid-Sammelgel konzentriert und anschließend im Trenngel mit 10 % Polyacrylamid aufgetrennt. Von jeder Probe wurden 20 µl auf das Gel geladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde SeeBlue Plus 2 (4 - 250 kDa) verwendet. Danach erfolgte die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel und einer elektrischen Spannung von 300 Volt über zwei bis drei Stunden in den mit Laufpuffer gefüllten Gelkammern.

#### **4.2.5 Western-Blot**

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das Proteinmuster mit Hilfe einer Transblot-Electroforetic-Transfer-Cell nach Angaben des Herstellers auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Dazu wurde diese mit Methanol befeuchtet, um sie zu aktivieren. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran in Nachbarschaft zum Gel gebracht und beide Seiten mit Filterpapier bedeckt. Das Blotten erfolgte im Transferpuffer durch Anlegen eines elektrischen Feldes (2 A) für 90 Minuten unter kontinuierlicher Eiskühlung. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit Blockierungslösung (TBS-T in 5 % fettfreiem Milchpulver) inkubiert, um die freien Bindungsstellen der Membran zu blockieren und dadurch unspezifische Bindungsstellen zu minimieren (Towbin, H., 1979). Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (anti-p-Erk) in TBS-T mit 5 % BSA in einer Verdünnung von 1:300 für eine Stunde. Nach viermaligem Waschen für je fünf Minuten in TBS-T wurde die Membran für 45 Minuten mit dem Zweitantikörper (ECL anti-Mouse IgG) in einer Verdünnung von 1:2000 in TBS-T in 5 % fettfreiem Milchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran vier Mal für je fünf Minuten in TBS-T und einmal für fünf Minuten in TBS gewaschen. Die Detektion der gebundenen Zweitantikörper erfolgte durch das ECL Plus Western Blotting Detection System, welches mittels gekoppeltem Enzym eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert. Die Membranen wurden mit den Lösungen beschichtet und für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden Röntgenfilme aufgelegt und anschließend nach unterschiedlich langen Belichtungszeiten entwickelt.

Die Membranen wurden im Anschluss mit dem Erstantikörper  $\beta$ -Aktin in TBS-T mit 5 % fettfreiem Milchpulver mit in einer Verdünnung von 1:40000 für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen für je fünf Minuten in TBS-T wurde die Membran für 45 Minuten mit dem Zweitantikörper (anti-mouse IgG) in einer Verdünnung von 1:2000 in TBS-T in 5 % fettfreiem Milchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal für je fünf Minuten in TBS-T und einmal für fünf Minuten in TBS gewaschen und nach Inkubation mit dem ECL Plus Western Blotting Detection System die Röntgenfilme mit unterschiedlichen Belichtungszeiten entwickelt.

Die Western Blots wurden densitometrisch mit Hilfe des Computerprogrammes Quantity One ausgewertet. Bei der Auswertung wurde die Intensität der anti-p-Erk Banden mittels der Intensität der  $\beta$ -Aktin Bande standardisiert, um dadurch eine möglicherweise ungleiche Proteinbeladung der einzelnen Gelspuren auszugleichen. Um die so ermittelten Werte übersichtlich darzustellen, wurde die Intensität der mit FBM inkubierten Fibroblasten als 100 % dargestellt und die Werte der jeweiligen Wachstumsfaktoren dazu in Korrelation gebracht.

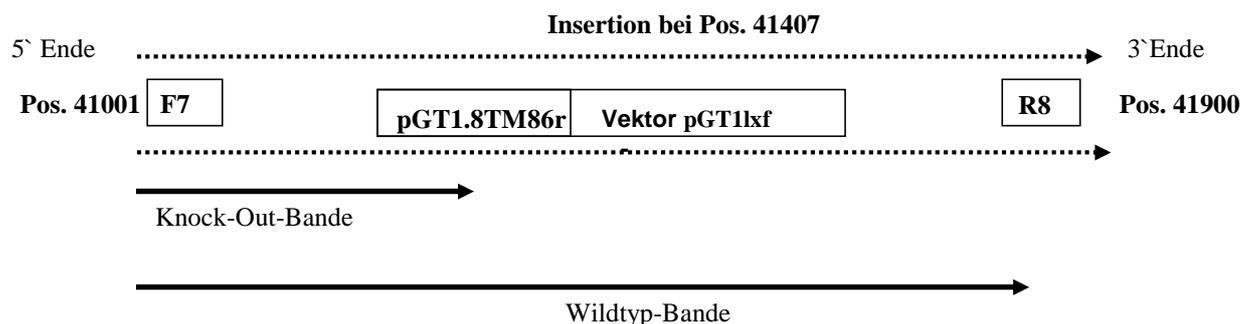
### **4.3 Zucht von Knock-Out-Mäusen**

#### **4.3.1 PCR zur Genotypisierung der Knock-Out-Mäuse**

Um die Auswirkungen einer funktionellen Ausschaltung des MTUS1-Gens auf den gesamten Organismus der Maus genauer zu erforschen, wurde eine Knock-Out-Maus für MTUS1 etabliert. Bei den dafür verwendeten Stammzellen erfolgte die Inaktivierung des MTUS1-Gens mittels Insertions-Mutagenese, einer oft verwendeten Methode zur Inaktivierung von Genen, bei der der pGT11xf-Vektor zufällig im Intronbereich zwischen Exon 3 und 4 des MTUS1-Gens inseriert wurde. So wurde eine zusätzliche Exonsequenz zwischen Exon 3 und Exon 4 eingeführt, die für 1323 Aminosäuren mit einer  $\beta$ -D-Galaktosidase, einer Neomycin-Fusionsdomäne ( $\beta$ -geo) und einer 3'-Phosphotransferase-Domäne, an die sich ein Stopcodon anschließt, codiert. Das Transkript des genetisch veränderten MTUS1-Gens codiert somit für ein funktionell inaktives MTUS1-Protein. Durch PCR und Sequenzierung konnte in Vorarbeiten die Position 41407 (Genbank Nr. AC116711) als Beginn der

Vektorinsertionsstelle ermittelt werden, was notwendig war, um den Genotyp der zu analysierenden Mäuse bestimmen zu können. Zur Überprüfung des jeweiligen Genotyps sollten alle Tiere mittels PCR genotypisiert werden. Anhand der ermittelten Genotypen wurde festgelegt, welche Tiere miteinander verkreuzt wurden, um homozygote MTUS1-Knock-Out-Mäuse, heterozygote und Wildtyp-Mäuse für die Aufrechterhaltung der Zucht zu erzeugen. Bei der Genotypisierungs-PCR wurden drei Primer verwendet, um eine spezifische Wildtyp-Bande und eine Knock-Out-Bande detektieren zu können. Dabei lag der Forward-Primer MDNA F7 vor dem Vektor pGT11xf, ein Reverse-Primer (pGT1.8TM86r) auf dem Vektor pGT11xf und ein zweiter Reverse-Primer MDNA R8 nach dem Vektor pGT11xf.

### MAUS DNA



*Abbildung 9: Schematische Darstellung der Primerlage von MDNA F7, MDNA R8 und pGT1.8TM86r zur Genotypisierung der Mäuse.*

Bei Erscheinen einer Bande (ca. 360 bp) in der PCR mit den Primern MDNA F7 und pGT1.8TM86r muss der Vektor pGT11xf in das Genom des Probenmaterials inseriert sein, da der Primer pGT1.8TM86r auf dem Vektor pGT11xf liegt. Die DNA homozygoter MTUS1 Knock-Out-Mäuse zeigt folglich nur bei einer PCR mit der verwendeten Primerkombination MDNA F7 und pGT1.8TM86r eine Bande (Knock-Out-Bande). Die DNA von Wildtyp-Mäusen zeigt nur bei einer PCR mit der verwendeten Primerkombination MDNA F7 und MDNA R8 eine Bande (ca. 740bp). Die DNA heterozygoter Mäuse zeigt hingegen bei beiden Primerkombinationen eine Bande.

<b>Genotyp</b>	<b>Wildtyp-DNA (Primer MDNA F7 und MDNA R8)</b>	<b>Knock-Out-DNA (Primer MDNA F7 und pGT1.8TM86r)</b>
Homozygot	–	+
Heterozygot	+	+
Wildtyp	+	–

*Tabelle 9: Vorhandensein der Wildtyp-Bande und der Knock-Out-Bande in Abhängigkeit vom Genotyp.*

Die Gewinnung der benötigten DNA für die erforderliche Genotypisierungsreaktion erfolgte mittels „DNeasy Tissue Kit“ für Rodent Tails aus 4mm langen Schwanzbiopsien von ca. 4 Wochen alten Mäusen.

Mit der aufgereinigten DNA wurde eine spezifische PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

<b>Primer</b>	<b>Positionen</b>	<b>Sequenz (5´3´)</b>
MDNA F7	41115 - 41134	CCCTGCGTTTCCAGAGTCCT
pGT1.8TM86r	41473 - 41493	CACTCCAACCTCCGCAAATC
MDNA R8	41832 - 41851	GGTTTGATCCCCAACACCAC

*Tabelle 10: Verwendete Primer für die Genotypisierungsreaktion.*

Die genannten Positionsangaben beziehen sich auf die Genbank Nr. AC116711.

PCR - Protokoll zur Detektion der Knock-Out- bzw. der Wildtyp-DNA:

<b>Reagenzien</b>	<b>50µl Ansatz</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
<b>Aqua dest.</b>	40,5µl	95 °C	15 min
<b>10x PCR-Puffer</b>	5µl	94 °C	20 s
<b>10mM dNTP-Mischung</b>	1µl	60 °C	20 s
<b>Forward Primer (10µM)</b>	1µl	72 °C	120 s
<b>Reverse Primer (10µM)</b>	1µl	Cycles	34
<b>Maus DNA</b>	1µl	72 °C	7 min
<b>HotStar Taq 5u/µl</b>	0,5µl	4 °C	∞

*Tabelle 11: PCR-Protokoll für die verwendete Primerkombination MDNA F7-pGT1.8TM86.r und MDNA F7 und MDNA R8.*

Als Negativkontrolle wurde 1 µl DNA einer Wildtyp-Maus eingesetzt, die aus der entnommenen Leber des Tieres gewonnen wurde. Als Positivkontrolle wurde 1 µl DNA aus Wildtyp Fibroblasten mit MTUS1 Stammzellen eingesetzt. Zur Auswertung der PCR wurden die Proben jeweils mit 6x Ladepuffer gemischt, in ein 2%-iges Agarose

Gel in 1x TAE-Puffer geladen und anschließend per Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von zirka 110 V nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Voraussetzung für die Detektion der Banden mittels UV-Lampe wurde dem Gel 1 µl GelStar zugesetzt. Als Marker wurde der PeqGold Leiter eingesetzt.

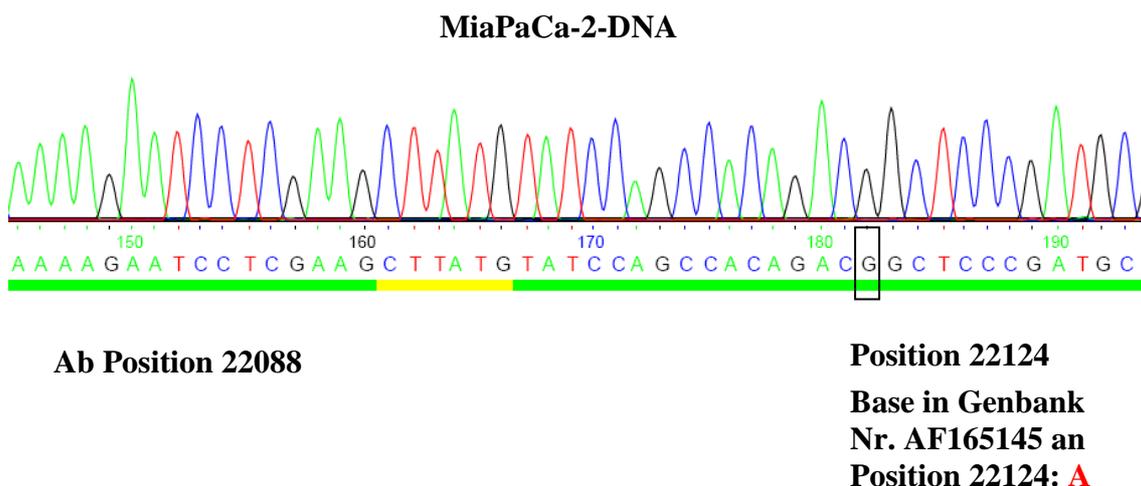
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Sequenzanalyse von MiaPaCa-2-Zellen auf genetische Aberationen im MTUS1-Gen

#### 5.1.1 Sequenzanalyse der codierenden Sequenz

Zur Untersuchung der codierenden Sequenz von MTUS1 auf genetische Veränderungen wurde die DNA nach den durchgeführten Amplifikationen aus dem Agarose Gel extrahiert und anschließend sequenziert.

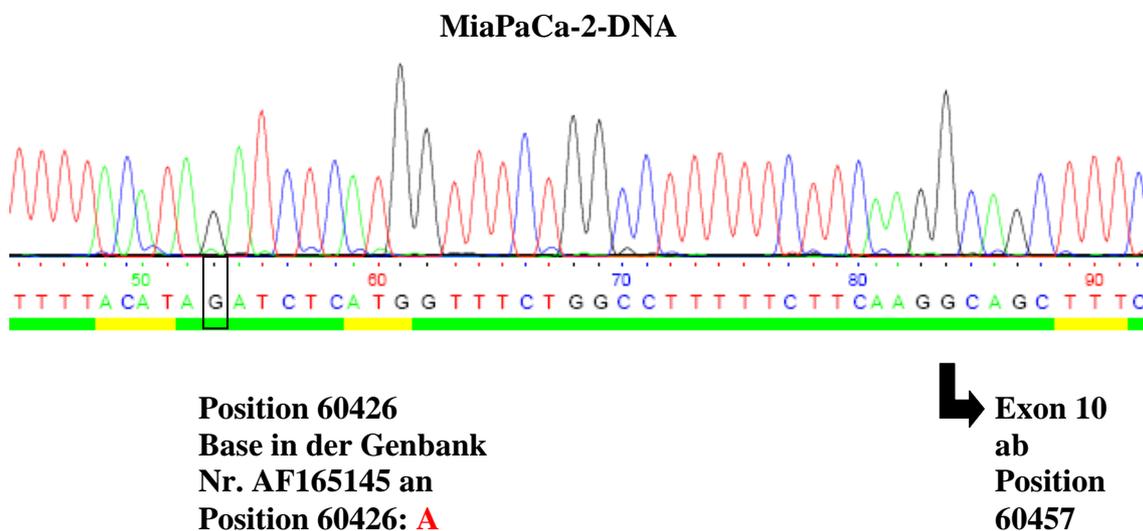
Im Exon 2 der codierenden Sequenz von MTUS1 konnte eine Punktmutation an Position 22124 ermittelt werden. Das an dieser Position in der Sequenz der Genbank Nr. AF165145 vorhandene Nukleotid Adenosin wurde in der untersuchten Probe durch Guanosen ersetzt, was mittels einer erneuten Sequenzierung neu isolierter und amplifizierter MiaPaCa-2-DNA nochmals bestätigt werden konnte. Das durch die gefundene Punktmutation resultierende Codon ACG in MiaPaCa-2-DNA codiert jedoch wie das Basen-Triplett der Sequenz der Genbank Nr. AF165145 ACA für die Aminosäure Threonin, was bedeutet, dass die ermittelte Mutation auf Proteinebene keinerlei Auswirkung hat.



*Abbildung 10: Ergebnisse der Sequenzierung von Exon 2 der MiaPaCa-2-DNA. Darstellung der Punktmutation Adenosin zu Guanosen an Pos. 22124.*

Die durchgeführte vollständige Sequenzierung der Exons 1 und 3-10 des MTUS1-Gens erbrachte keinen weiteren Mutationsnachweis in der MiaPaCa-2-DNA.

Lediglich im Intronbereich, in der Splice-site von Exon 10, wurde eine weitere Punktmutation an Position 60426 der MiaPaCa-2-DNA festgestellt. Hier ergab sich eine Änderung der Sequenz von Adenosin nach Guanodin im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145, ebenfalls jedoch ohne Auswirkung auf die codierende Sequenz. Auch diese Punktmutation wurde durch Wiederholen der Sequenzierung mit einer neu amplifizierten DNA verifiziert.



*Abbildung 11: Ausschnitt der Sequenzierung des nicht codierenden Bereichs in unmittelbarer Nähe zu Exon 10 der MiaPaCa-2-DNA. Darstellung der Punktmutation Adenosin zu Guanodin an Position 60426.*

### 5.1.2 Sequenzanalyse des Promotorbereichs und der folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1

Die mittels PCR amplifizierte MiaPaCa-2-DNA des zu untersuchenden Promotorbereichs und der ihm folgenden Intronsequenz bis zum Exon 1 wurde wie oben beschrieben aus dem Agarose Gel extrahiert und sequenziert.

In der Sequenzanalyse des Promotorbereichs (Position 4860-5100) fanden sich keine Mutationen.

In der Sequenzanalyse der dem Promotorbereich folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 (Position 5101-8933) fanden sich insgesamt 12 Punktmutationen und eine Deletion zweier Nukleotide. Da in diesem Bereich eventuell Transkriptionsfaktoren zur Initiation der Transkription an transcription factor binding sites (tfbs) binden können, könnten durch die ermittelten Mutationen in der MiaPaCa-2-DNA Änderungen der tfbs und somit der Bindung von Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des MTUS1-Gens regulieren, resultieren. Daraufhin wurde sowohl die Sequenz der Genbank Nr. AF165145 als auch die Sequenz mit den ermittelten Sequenzänderungen der MiaPaCa-2-DNA im genannten Bereich hinsichtlich möglicher tfbs mit dem Programm Promo 3.0 untersucht und miteinander verglichen. Das Programm greift auf die TRANSFAC-Datenbank (Version 8.3) zu und ist auf der Internetseite <http://alggen.lsi.upc.es> zu finden.

Im Einzelnen fanden sich die im Folgenden aufgeführten Mutationen:

An Position 5702 und 5703 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Deletion von Cytosin und Thymin. Diese Deletion ist in der Genbank als Polymorphismus beschrieben worden. Unter einem Polymorphismus versteht man einen DNA-Abschnitt, innerhalb dessen sich zwei Individuen durch eine oder mehrere Nucleotidbasen unterscheiden. Liegen Polymorphismen innerhalb von regulatorischen Regionen, so können sie Unterschiede in der Proteinexpression hervorrufen (Löffler G et al., 2007).

Durch die Deletion der beiden Basen resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit der Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta und FOXA1 in der MiaPaCa-2-DNA.

<b>Position 5702: C → - (Deletion); Position 5703: T → - (Deletion)</b>	
AF165145	5681 ctatgcagac cagtggaatt tctggttggt tgaatatact gtgatgttac
MiaPaCa	5681 ctatgcagac cagtggaatt t-ggttggt tgaatatact gtgatgttac
Sequenz	Bindende Transkriptionsfaktoren
Genbank Nr. AF165145	-
MiaPaCa-2-DNA	C/EBPbeta, FOXA1

*Tabelle 12: Darstellung der Sequenzveränderung an den Positionen 5702 und 5703 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 6102 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Adenosin durch Guanodin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit der Transkriptionsfaktoren ATF3 und C-jun in der MiaPaCa-2-DNA. Die Transkriptionsfaktoren PR A und PR B hingegen können in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 6102: A → G (Punktmutation)</b>	
AF165145	6081 tttgttttcc actgacatcc taacacaggc tctgcttcat aaagactcat
MiaPaCa	6081 tttgttttcc actgacatcc tgacacaggc tctgcttcat aaagactcat
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
Genbank Nr. AF165145	PR A, PR B
MiaPaCa-2-DNA	ATF3, C-jun

*Tabelle 13: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 6102 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 6155 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Guanodin durch Adenosin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation können die Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta, NFI und GR-alpha in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 6155: G → A (Punktmutation)</b>	
AF165145	6131 cttttttttt tttttttttt ttttggagga gttttgctct tattgccag
MiaPaCa	6131 cttttttttt tttttttttt ttttagagga gttttgctct tattgccag
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	C/EBPbeta, NFI, GR-alpha
MiaPaCa-2-DNA	-

*Tabelle 14: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 6155 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 6463 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Cytosin durch Guanosin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit des Transkriptionsfaktors FOXP3 in der MiaPaCa-2-DNA. Die Transkriptionsfaktoren HNF-1C und HNF-1B hingegen können in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 6463: C → G (Punktmutation)</b>	
AF165145	6441 gccataaag actcatagct aa <sup>c</sup> tttttaca actacaaact gttgtacttt
MiaPaCa	6441 gccataaag actcatagct aa <sup>g</sup> tttttaca actacaaact gttgtacttt
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	HNF-1C, HNF-1B
MiaPaCa-2-DNA	FOXP3

*Tabelle 15: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 6463 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 6898 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Adenosin durch Guanosin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit des Transkriptionsfaktors NFI in der MiaPaCa-2-DNA.

<b>Position 6898: A → G (Punktmutation)</b>	
AF165145	6871 tgctgcacgg ccaccaggag gcagactatg tttgggaaag aactgaattt
MiaPaCa	6871 tgctgcacgg ccaccaggag gcagactgtg tttgggaaag aactgaattt
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	-
MiaPaCa-2-DNA	NFI

*Tabelle 16: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 6898 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 7043 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Adenosin durch Guanosin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit des Transkriptionsfaktors TR-beta1 in der MiaPaCa-2-DNA. Der Transkriptionsfaktor XBP-1 hingegen kann in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 7043: A → G (Punktmutation)</b>	
AF165145	7021 tgттаатgaa tctgattaat cgaatgattag atggtaattt cttcttttag
MiaPaCa	7021 tgттаатgaa tctgattaat cgaatgattag atcgtaattt cttcttttag
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	XBP-1
MiaPaCa-2-DNA	TR-beta1

*Tabelle 17: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 7043 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 7053 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Guanosin durch Cytosin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation kann der Transkriptionsfaktor YY1 in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 7053: G → C (Punktmutation)</b>	
AF165145	7031 tctgattaat cgatgattag atggtaattt cttcttttag ggagtctaaa
MiaPaCa	7031 tctgattaat cggtgattag atcgttaattt cttcttttag ggagtctaaa
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	YY1
MiaPaCa-2-DNA	-

*Tabelle 18: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 7053 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 7156 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Cytosin durch Thymidin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert keine Änderung hinsichtlich bindender Transkriptionsfaktoren.

<b>Position 7156: C → T (Punktmutation)</b>	
AF165145	7131 cctgtaatcc cagcaacttgg gaggcgagg tgtgtggatc acctgaggtc
MiaPaCa	7131 cctgtaatcc cagcaacttgg gaggcgagg tgtgtggatc acctgaggtc
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	-
MiaPaCa-2-DNA	-

*Tabelle 19: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 7156 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 7444 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Guanosin durch Cytosin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit der Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta, VDR, PXR:RXR-alpha, PR B, PR A und GR-alpha in der MiaPaCa-2-DNA.

<b>Position 7444: G → C (Punktmutation)</b>	
AF165145	7421 atttagaatt tgctgttact gaag <sup>g</sup> aaacaa caaacacaac caaaagaaag
MiaPaCa	7421 atttagaatt tgctgttact gaac <sup>c</sup> aaacaa caaacacaac caaaagaaag
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	-
MiaPaCa-2-DNA	C/EBPbeta, VDR, PXR:RXR-alpha, PR B, PR A, GR-alpha

*Tabelle 20: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 7444 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. <sup>g</sup>: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, <sup>c</sup>: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 7545 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Guanodin durch Adenosin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit der Transkriptionsfaktoren FOXA1, GR-beta, MEF-2A, HOXD9 und HOXD10. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 hingegen kann in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 7545: G → A (Punktmutation)</b>	
AF165145	7481 ggcaaaattt gactctgttc ttct <sup>g</sup> tttgt tggagtgggtg gcatgtctgt
MiaPaCa	7481 ggcaaaattt gactctgttc ttct <sup>a</sup> tttgt tggagtgggtg gcatgtctgt
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	FOXP3
MiaPaCa-2-DNA	FOXA1, GR-beta, MEF-2A, HOXD9, HOXD10

*Tabelle 21: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 7545 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. <sup>g</sup>: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, <sup>a</sup>: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 7618 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Thymin durch Guanodin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit des Transkriptionsfaktors FOXP3. Die Transkriptionsfaktoren GR-alpha, MEF-2A und FOXA1 hingegen können in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 7618: T → G (Punktmutation)</b>	
AF165145	7551 ggaggttagag gaaaagggttc tggatata <sup>tt</sup> caaggttttg ggaggttagag
MiaPaCa	7551 ggaggttagag gaaaagggttc tggatata <sup>gt</sup> caaggttttg ggaggttagag
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	GR-alpha, MEF-2A, FOXA1
MiaPaCa-2-DNA	FOXP3

*Tabelle 22: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 7618 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. <sup>tt</sup>: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, <sup>gt</sup>: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 7708 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Guanodin durch Thymin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit des Transkriptionsfaktors C/EBPbeta. Der Transkriptionsfaktor ENKTF-1 hingegen kann in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 7708: G → T (Punktmutation)</b>	
AF165145	7681 agtaaaaggc aacacctaga agcagct <sup>ggc</sup> cttgatttta attccttgat
MiaPaCa	7681 agtaaaaggc aacacctaga agcagct <sup>ggc</sup> cttgatttta attccttgat
Sequenz	bindende Transkriptionsfaktoren
AF165145	ENKTF-1
MiaPaCa-2-DNA	C/EBPbeta

*Tabelle 23: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 7708 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. <sup>ggc</sup>: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, <sup>ggc</sup>: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

An Position 8870 in der untersuchten MiaPaCa-2-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Thymin durch Guanodin ersetzt wurde. Durch diese Punktmutation können die Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta, FOXP3, PR B und PR A in der veränderten Sequenz der MiaPaCa-2-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 8870: T → G (Punktmutation)</b>	
AF165145	8841 gtggttacag gatctgtgac attattggt <b>t</b> gttctgtaaa gctcctgaga
MiaPaCa	8841 gtggttacag gatctgtgac attattggt <b>g</b> gttctgtaaa gctcctgaga
<b>Sequenz</b>	<b>bindende Transkriptionsfaktoren</b>
AF165145	C/EBPbeta, FOXP3, PR B, PR A
MiaPaCa-2-DNA	-

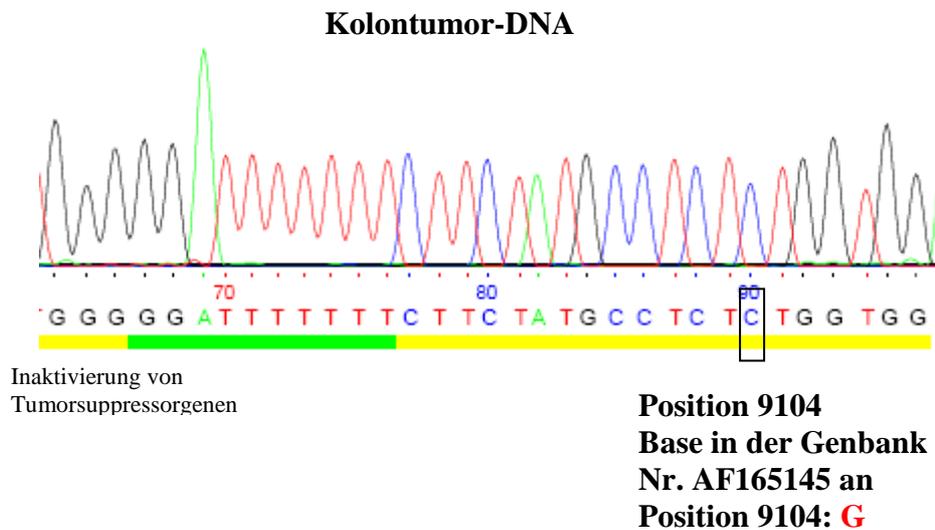
*Tabelle 24: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 8870 in der MiaPaCa-2-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in MiaPaCa-2-DNA.*

## **5.2 Sequenzanalyse von humanen Kolontumoren auf genetische Aberationen im MTUS1-Gen**

### **5.2.1 Sequenzanalyse der codierenden Sequenz**

Zur Untersuchung der codierenden Sequenz von MTUS1 auf genetische Veränderungen wurde die Kolontumor-DNA nach den durchgeführten Amplifikationen aus dem Agarose Gel extrahiert und anschließend sequenziert.

Im Exon 1 der codierenden Sequenz von MTUS1 konnte eine Punktmutation an Position 9104 detektiert werden. Das in der Sequenz der Genbank Nr. AF165145 vorhandene Nukleotid Guanosin wurde in der untersuchten Probe durch Cytosin ersetzt. Diese Punktmutation konnte mittels einer weiteren Sequenzierung einer weiteren cDNA bestätigt werden. Die gefundene Mutation liegt im 5`UTR Bereich des Exons 1. Somit liegt sie im nicht codierenden Bereich des Exons.



*Abbildung 12: Ergebnisse der Sequenzierung des codierenden Bereichs in Kolontumor-DNA. Darstellung der Punktmutation Guanodin zu Cytosin an Position 9104.*

In der Analyse der restlichen codierenden Sequenz konnten keine weiteren Abweichungen von der Sequenz der Genbank Nr. AF165145 nachgewiesen werden.

## 5.2.2 Sequenzanalyse des Promotorbereichs und der folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1

Die mittels PCR amplifizierte Kolontumor-DNA des zu untersuchenden Promotorbereichs und der ihm folgenden Intronsequenz bis zum Exon 1 wurde wie oben beschrieben aus dem Agarose Gel extrahiert und sequenziert.

In der Sequenzanalyse des Promotorbereichs (Position 4860-5100) fand sich an Position 4909 in der untersuchten Kolontumor-DNA im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation, wobei das Nukleosid Adenosin durch Guanodin ersetzt wurde. Diese Mutation konnte in der Sequenzanalyse der MiaPaCa-Zellen nicht nachgewiesen werden.

<b>Position 4909: A → G (Punktmutation)</b>	
AF165145	4881 ctaaaaatac aaaaaaaaaatt agccaggca <sup>■</sup> t ggtggcgggc gctgtagtc
Kolontumor	4881 ctaaaaatac aaaaaaaaaatt agccaggc <sup>■</sup> t ggtggcgggc gctgtagtc
<b>Sequenz</b>	<b>Bindende Transkriptionsfaktoren</b>
Genbank Nr. AF165145	YY1, XBP-1
Kolontumor-DNA	AhR:Arnt

*Tabelle 25: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 4909 im Promotor der Kolontumor-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in Kolontumor-DNA.*

In der Sequenzanalyse der dem Promotorbereich folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 (Position 5101 – 8933) fanden sich insgesamt 11 Punktmutationen und 2 Deletionen. Diese wurden wie bereits oben beschrieben auf mögliche Änderungen der tfbs untersucht.

An Position 5702 und 5703 in der untersuchten Kolontumor-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank-Nr. AF165145 eine Deletion von Cytosin und Thymin, die in der Genbank als Polymorphismus beschrieben worden ist und die in identischer Weise auch in der Sequenzanalyse mit MiaPaCa-Zellen nachweisbar war (siehe Tabelle 12).

An Position 6216 in der untersuchten Kolontumor-DNA fand sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 eine Punktmutation die in der Sequenzanalyse der MiaPaCa-Zellen nicht nachweisbar war, wobei das Nukleosid Adenosin durch Guanosin ersetzt wurde. Durch sie resultiert eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit der Transkriptionsfaktoren RXR-alpha und TFII-I. Die Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta und FOXP3 hingegen können in der veränderten Sequenz der Kolontumor-DNA nicht mehr binden.

<b>Position 6216: A→C (Punktmutation)</b>	
AF165145	6191 aatggcgcaa tctctgctga ttgcaaacctc catctcccag attcaagcgg
Kolontumor	6191 aatggcgcaa tctctgctga ttgcaacctc catctcccag attcaagcgg
Sequenz	Bindende Transkriptionsfaktoren
Genbank Nr. AF165145	C/EBPbeta, FOXP3
Kolontumor-DNA	RXR-alpha, TFII-I

*Tabelle 26: Darstellung der Sequenzveränderung an Position 6216 in der Kolontumor-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145 und der resultierenden Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren. ■: verändertes Nukleotid in Genbank Nr. AF165145, ■: verändertes Nukleotid in Kolontumor-DNA.*

An den Positionen 6102, 6155, 6463, 6898, 7043, 7053, 7156, 7444, 7545 sowie 7708 in der untersuchten Kolontumor-DNA fanden sich im Vergleich zur Genbank Nr. AF165145 jeweils eine Punktmutation. Diese konnten in identischer Weise auch in der Sequenzanalyse der MiaPaCa-Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabellen 12 bis 20, 22).

Zusammenfassend ergaben sich die oben im Einzelnen aufgeführten 29 Sequenzänderungen in der durchgeführten Sequenzanalyse der MiaPaCa-2-DNA und der Kolontumor-DNA im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145. In der codierenden Sequenz ergaben sich insgesamt drei Änderungen, im Promotor insgesamt eine Änderung und der ihm folgenden Sequenz bis zum Exon 1 insgesamt 25 Änderungen. Dabei konnte festgestellt werden, dass von den ermittelten 25 Sequenzänderungen in der dem Promotor folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 (Position 5101-8933) elf Mutationen mit jeweils identischen Nukleotidveränderungen sowohl in MiaPaCa-2-DNA als auch in Kolontumor-DNA zu finden waren. Im Einzelnen waren dies die Deletionen an Position 5702 und 5703 und die Punktmutationen an den Positionen 6102, 6155, 6463, 6898, 7043, 7053, 7156, 7444, 7545 und 7708. Zusätzlich fanden sich in diesem Bereich an der Position 6216 in der Kolontumor-DNA und an den Positionen 7618 und 8870 in der MiaPaCa-2-DNA Punktmutationen, die in der jeweils anderen DNA-Probe nicht ermittelt werden konnten.

Sequenzänderung Position	MiaPaCa-2-DNA	Kolontumor-DNA
5702-5703	+	+
6102	+	+
6155	+	+
6216	-	+
6463	+	+
6898	+	+
7043	+	+
7053	+	+
7156	+	+
7444	+	+
7545	+	+
7618	+	-
7708	+	+
8870	+	-

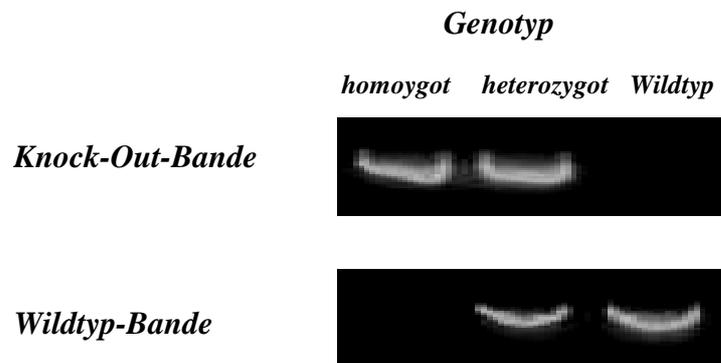
*Tabelle 27: Gegenüberstellung der ermittelten Sequenzveränderungen in MiaPaCa-2-DNA und Kolontumor-DNA in der dem Promotorbereich folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 (Position 5101-8933). +: Sequenzveränderung vorhanden, -: Sequenzveränderung nicht vorhanden. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf Sequenz der Genbank Nr. AF165145 (komplette Sequenz von Homo sapiens chromosome 8 clone GS1 – 194016 map 8p23).*

### **5.3 Zucht der MTUS1 Knock-Out-Mäuse**

#### **5.3.1 Genotypisierung zum Nachweis des Knock-Outs auf DNA-Ebene**

Der Genotyp jeder geborenen Maus wurde mittels der oben beschriebenen Genotypisierungs-PCR ermittelt, um kontrollierte Verpaarungen zur Erzeugung homozygoter MTUS1-Knock-Out-Mäuse, heterozygoter und Wildtyp-Mäuse zur Aufrechterhaltung der Zucht und zur weiteren Charakterisierung des MTUS1-Gens durchführen zu können. Die Genotypisierungs-PCR mit der DNA homozygoter MTUS1 Knock-Out-Tiere erbrachte eine Bande für den Insertionsvektor (Knock-Out-Bande), jedoch keine Bande für das unveränderte MTUS1-Gen (Wildtyp-Bande). Die

Genotypisierungs-PCR mit der DNA heterozygoter MTUS1-Mäuse zeigte hingegen beide genannten Banden. Die Genotypisierungs-PCR mit der DNA aus Wildtyp-Mäusen zeigte eine Bande für das unveränderte MTUS1-Gen (Wildtyp-Bande), jedoch keine Bande für den Insertionsvektor (Knock-Out-Bande).



*Abbildung 13: Darstellung der Genotypisierungs-PCR zum Nachweis des Genotyps.*

### 5.3.2 Zuchtverlauf

Durch die Generierung einer Knock-Out-Maus für MTUS1 sollten weitere Untersuchungen bezüglich der Charakterisierung des Tumorsuppressorgens MTUS1 *in vivo* durchgeführt werden. Um eine ausreichende Anzahl an Tieren für die entsprechenden Versuche und die Aufrechterhaltung der Zucht zu generieren, wurden gezielte Verkreuzungen der Tiere vorgenommen. Insgesamt wurden mit homozygoten MTUS1 Knock-Out Tieren der F2-Generation elf Verkreuzungen zur Generierung homozygoter MTUS1 Knock-Out-Mäuse (insgesamt 87 homozygote Tiere der F3-Generation) und drei Verkreuzungen mit Wildtyp-Mäusen der F2-Generation zur Generierung von Wildtyp-Mäusen (insgesamt 16 Wildtyp-Tiere der F3-Generation) durchgeführt. Pro Wurf wurden in der F3-Generation durchschnittlich sieben Tiere geboren. Im Verlauf der Zucht starben in der F3-Generation insgesamt 15 homozygote Tiere (im Durchschnitt nach 53 Tagen) und drei Wildtyp-Tiere (im Durchschnitt nach zwei Tagen). Die durchschnittliche Beobachtungsdauer betrug 137 Tage.

Des Weiteren erfolgten mit den gezüchteten Tieren in der Arbeitsgruppe die im Folgenden aufgeführten biochemischen Untersuchungen: Es wurden aus drei Wildtyp-Tieren und drei homozygoten Tieren Leber, Niere, Nebenniere, Lunge, Herz, Gehirn,

Milz, Kolon, Thymus und Muskeln entnommen und eine X-Gal-Färbung durchgeführt, bei der Zellen, die  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, selektiv gefärbt werden. Da die MTUS1 Knock-Out-Mäuse durch die Vektorinsertion anstatt dem MTUS1-Protein ein funktionell inaktives MTUS1-Protein exprimieren, das aus einem N-terminalen MTUS1-Anteil und einer C-terminalen  $\beta$ -Galaktosidase-Domäne besteht, kann durch den Nachweis der Galaktosidase die Expression von MTUS1 ermittelt werden. Außerdem wurde für diese Arbeit cDNA isoliert, die für Sequenzierungsanalysen hinsichtlich vorhandener Mutationen in der codierenden und nicht codierenden Sequenz verwendet wurde. Es wurden des Weiteren aus drei homozygoten und drei Wildtyp-Mäusen Fibroblasten isoliert, die für Proliferationsversuche mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und zur Western-Blot-Analyse für diese Arbeit verwendet wurden. Zusätzlich wurden bei den Mäusen Vitalparametern erhoben, wobei dafür bei insgesamt sechs Wildtyp- und sechs homozygoten Tieren der Blutdruck und das Gewicht der Tiere bestimmt und miteinander verglichen wurden. Daneben wurden bei 17 homozygoten und drei Wildtyp-Tieren in Laboruntersuchungen verschiedenste Parameter in Blut und Urin bestimmt, 40 Tiere einer pathohistologischen Untersuchung zugeführt und fünf Tiere an die Arbeitsgruppe Dr. Kai Schuh (Physiologisches Institut der Universität Würzburg) weiter gegeben.

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 2 (homozygot) *02.02.05 x ♀ F2 Nr. 29 (homozygot) *19.02.05, Geburtsdatum: 23.04.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
1	Männchen ♂	homozygot	Laboruntersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 75 Tage
2	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 01.03.06, Alter: 313 Tage, pathologische Untersuchung
3	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 336 Tage
4	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 30.05.05, Alter: 38 Tage, pathologische Untersuchung
5	Weibchen ♀	homozygot	Organentnahme am 09.02.06, Alter: 293 Tage
6	Weibchen ♀	homozygot	Organentnahme am 07.06.05, Alter: 46 Tage, pathologische Untersuchung

*Tabelle 28: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 2 (homozygot) und F2 Nr. 29 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 12 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 43 (homozygot) *22.02.05, Geburtsdatum: 25.04.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
7		homozygot	bei der Zucht verstorben am 25.04.05, Alter: 1 Tag
8		homozygot	bei der Zucht verstorben am 25.04.05, Alter: 1 Tag
9		homozygot	bei der Zucht verstorben am 25.04.05, Alter: 1 Tag
10		homozygot	bei der Zucht verstorben am 25.04.05, Alter: 1 Tag
11		homozygot	bei der Zucht verstorben am 25.04.05, Alter: 1 Tag
12		homozygot	bei der Zucht verstorben am 25.04.05, Alter: 1 Tag
13		homozygot	bei der Zucht verstorben am 25.04.05, Alter: 1 Tag

*Tabelle 29: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 12 (homozygot) und F2 Nr. 43 (homozygot), des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 3 (Wildtyp) *02.02.05 x ♀ F2 Nr. 41 (Wildtyp)*22.02.05, Geburtsdatum: 25.04.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
14	Weibchen ♀	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 354 Tage, pathologische Untersuchung
15	Weibchen ♀	Wildtyp	Laboruntersuchungen, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 31.05.05, Alter: 37 Tage

*Tabelle 30: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 3 (Wildtyp) und F2 Nr. 41 (Wildtyp), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 16 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 34 (homozygot) *21.02.05, Geburtsdatum: 26.04.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
16	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 333 Tage, pathologische Untersuchung
17	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, bei der Zucht verstorben, pathologische Untersuchung
18	Männchen ♂	homozygot	Laboruntersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 72 Tage
19		homozygot	bei der Zucht verstorben am 26.04.05, Alter: 1 Tag
20	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 06.07.05, Alter: 72 Tage
21	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 333 Tage, pathologische Untersuchung
22	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 333 Tage, pathologische Untersuchung
23	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 06.07.05, Alter: 72 Tage

*Tabelle 31: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 16 (homozygot) und F2 Nr. 34 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 12 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 63 (homozygot) *18.03.05, Geburtsdatum: 16.05.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
24	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 313 Tage, pathologische Untersuchung
25	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 313 Tage, pathologische Untersuchung
26	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 06.07.05, Alter: 52 Tage
27	Männchen ♂	homozygot	Biochemische Untersuchung, Organentnahme am 24.06.05, Alter: 40 Tage
28	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 06.07.05, Alter: 52 Tage
29	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 313 Tage, pathologische Untersuchung

*Tabelle 32: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 12 (homozygot) und F2 Nr. 63 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 3 (Wildtyp) *02.02.05 x ♀ F2 Nr. 28 (Wildtyp) *19.02.05, Geburtsdatum: 19.05.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
30	Weibchen ♀	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 330 Tage, pathologische Untersuchung
31	Weibchen ♀	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 330 Tage, pathologische Untersuchung
32	Weibchen ♀	Wildtyp	getötet am 20.07.05, Alter: 63 Tage (Tier hatte Elefantenzähne und konnte dadurch nicht mehr fressen)
33	Weibchen ♀	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 330 Tage, pathologische Untersuchung
34	Männchen ♂	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 330 Tage, pathologische Untersuchung
35	Männchen ♂	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 330 Tage, pathologische Untersuchung
36	Weibchen ♀	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 330 Tage, pathologische Untersuchung
37		Wildtyp	bei der Zucht gestorben am 20.05.05, Alter: 2 Tage
38		Wildtyp	bei der Zucht gestorben am 20.05.05, Alter: 2 Tage
39		Wildtyp	bei der Zucht gestorben am 20.05.05, Alter: 2 Tage

*Tabelle 33: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 3 (Wildtyp) und F2 Nr. 28 (Wildtyp), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 16 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 36 (homozygot) *21.02.05, Geburtsdatum: 19.05.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
40	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 06.07.05, Alter: 49 Tage
41	Männchen ♂	homozygot	Mikrobiologische Untersuchung der Zuchttiere (Sentinel)
42	Männchen ♂	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 09.02.06, Alter: 267 Tage, pathologische Untersuchung
43	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 06.07.05, Alter: 49 Tage
44	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 310 Tage, pathologische Untersuchung
45	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 24.03.06, Alter: 310 Tage, pathologische Untersuchung
46		homozygot	tot geboren, Alter: 0 Tage

*Tabelle 34: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 16 (homozygot) und F2 Nr. 36 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 16 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 34 (homozygot) *21.02.05, Geburtsdatum: 09.06.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
47	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 27.07.05, Alter: 49 Tage
48	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 27.07.05, Alter: 49 Tage
49	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 27.07.05, Alter: 49 Tage
50	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 27.07.05, Alter: 49 Tage
51	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 27.07.05, Alter: 49 Tage
52	Weibchen ♀	homozygot	Organentnahme am 20.07.05, Alter: 42 Tage, pathologische Untersuchung
53	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 306 Tage
54	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 02.01.06, Alter: 208 Tage, pathologische Untersuchung
55	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 306 Tage, Biochemische Untersuchung, pathologische Untersuchung
56	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, bei der Zucht verstorben am 01.01.06, Alter: 207 Tage, pathologische Untersuchung

*Tabelle 35: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 16 (homozygot) und F2 Nr. 34 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 12 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 29 (homozygot) *19.02.05, Geburtsdatum: 10.06.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
57	Männchen ♂	homozygot	Laboruntersuchungen, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 27 Tage, pathologische Untersuchung
58	Männchen ♂	homozygot	Langzeitbeobachtung, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 27 Tage
59	Männchen ♂	homozygot	Langzeitbeobachtung, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 27 Tage
60	Männchen ♂	homozygot	Organentnahme am 20.07.05, Alter: 41 Tage
61	Weibchen ♀	homozygot	Organentnahme am 20.07.05, Alter: 41 Tage
62	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 09.02.06, Alter: 245 Tage, pathologische Untersuchung
63	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 305 Tage, pathologische Untersuchung
64	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 305 Tage, pathologische Untersuchung
65	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 305 Tage, pathologische Untersuchung
66	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 305 Tage, pathologische Untersuchung
67	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 305 Tage, pathologische Untersuchung

*Tabelle 36: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 12 (homozygot) und F2 Nr. 29 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 3 (Wildtyp) *02.02.05 x ♀ F2 Nr. 41 (Wildtyp) *22.02.05, Geburtsdatum: 10.06.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
68	Männchen ♂	Wildtyp	Laboruntersuchungen, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 27 Tage
69	Männchen ♂	Wildtyp	Laboruntersuchungen, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 27 Tage
70	Männchen ♂	Wildtyp	Laboruntersuchungen, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 06.07.05, Alter: 27 Tage
71	Weibchen ♀	Wildtyp	Langzeitbeobachtung, Vitalparameter, Organentnahme am 13.04.06, Alter: 27 Tage, pathologische Untersuchung

*Tabelle 37: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 3 (Wildtyp) und F2 Nr. 41 (Wildtyp), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 16 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 63 (homozygot) *18.03.05, Geburtsdatum: 02.07.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
72	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 60 Tage
73	Männchen ♂	homozygot	getötet am 11.10.05, Alter: 102 Tage
74	Männchen ♂	homozygot	Laboruntersuchungen, Zellisolierung für biochemische Untersuchungen, Organentnahme am 19.12.05, Alter: 171 Tage
75	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 60 Tage
76	Männchen ♂	homozygot	getötet am 11.10.05, Alter: 102 Tage
77	Männchen ♂	homozygot	getötet am 16.11.05, Alter: 138 Tage
78	Weibchen ♀	homozygot	getötet am 02.08.05, Alter: 32 Tage
79		homozygot	bei der Zucht verstorben am 03.07.2005, Alter: 1 Tag
80	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 238 Tage, pathologische Untersuchung

*Tabelle 38: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 16 (homozygot) und F2 Nr. 63 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 16 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 34 (homozygot) *21.02.05, Geburtsdatum: 11.07.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
81	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 21.03.06, Alter: 263 Tage, pathologische Untersuchung
82	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 51 Tage
83	Weibchen ♀	homozygot	bei der Zucht verstorben am 28.03.06, Alter: 261
84	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 14.01.06, Alter: 188 Tage, pathologische Untersuchung
85	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, bei der Zucht verstorben am 15.02.06, Alter: 220 Tage, pathologische Untersuchung
86	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 21.03.06, Alter: 254 Tage
87	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 10.04.06, Alter: 274 Tage

*Tabelle 39: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 16 (homozygot) und F2 Nr. 34 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 12 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 36 (homozygot) *21.02.05, Geburtsdatum: 15.07.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
88		homozygot	Bei der Zucht verstorben am 28.07.05, Alter: 18 Tage
89	Männchen ♂	homozygot	getötet am 11.10.05, Alter: 89 Tage
90	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 47 Tage
91	Weibchen ♀	homozygot	Weitergabe des Tieres an die Arbeitsgruppe Dr. Kai Schuh, Physiologisches Institut der Universität Würzburg
92	Weibchen ♀	homozygot	Weitergabe des Tieres an die Arbeitsgruppe Dr. Kai Schuh, Physiologisches Institut der Universität Würzburg
93	Weibchen ♀	homozygot	Weitergabe des Tieres an die Arbeitsgruppe Dr. Kai Schuh, Physiologisches Institut der Universität Würzburg
94	Weibchen ♀	homozygot	Weitergabe des Tieres an die Arbeitsgruppe Dr. Kai Schuh, Physiologisches Institut der Universität Würzburg
95	Weibchen ♀	homozygot	Weitergabe des Tieres an die Arbeitsgruppe Dr. Kai Schuh, Physiologisches Institut der Universität Würzburg

*Tabelle 40: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 12 (homozygot) und F2 Nr. 36 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

<b>Eltern ♂ F2 Nr. 16 (homozygot) *04.02.05 x ♀ F2 Nr. 34 (homozygot) *21.02.05, Geburtsdatum: 02.08.2005</b>			
<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>
96	Weibchen ♀	homozygot	bei der Zucht verstorben am 01.09.05, Alter: 31 Tage
97	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Organentnahme am 21.03.06, Alter: 232 Tage
98	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 29 Tage
99	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 29 Tage
100	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 29 Tage
101	Männchen ♂	homozygot	getötet am 30.08.05, Alter: 29 Tage
102	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 15.02.06, Alter: 198 Tage, pathologische Untersuchung
103	Weibchen ♀	homozygot	Langzeitbeobachtung, Laboruntersuchungen, Organentnahme am 15.02.06, Alter: 198 Tage, pathologische Untersuchung

*Tabelle 41: Darstellung der erzeugten Tiere der F3-Generation durch Verpaarung der Tiere F2 Nr. 16 (homozygot) und F2 Nr. 34 (homozygot), des Geschlechts, des Genotyps und der Verwendung des jeweiligen Tieres.*

## **5.4 Ergebnisse der Untersuchungen an Bauchhautfibroblasten**

### **5.4.1 Western-Blot-Analyse**

In unserer Arbeitsgruppe wurden Proliferationsversuche mit Bauchhautfibroblasten durchgeführt, die aus für das MTUS1-Gen homozygoten Knock-Out- und Wildtyp-Mäusen isoliert und anschließend mit verschiedenen Wachstumsmedien inkubiert wurden. Die homozygoten Zellen zeigten im Vergleich zu den Wildtypzellen eine deutlich stärkere Proliferation mit allen verwendeten Wachstumsmedien. Zudem konnte durch Seibold et al. eine signifikant reduzierte Proliferation in MiaPaCa-2-Zellen nach rekombinanter Expression von MTUS1 nachgewiesen werden. Die ermittelten Proliferationsunterschiede sprechen für die Hypothese, dass es sich bei dem Gen MTUS1 um ein Tumorsuppressorgen handelt, das die Proliferation einer Zelle inhibiert. Nouet et al. postulierten, dass diese Beeinflussung der Proliferation durch MTUS1 mittels AT2-Rezeptor über den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg vermittelt wird.

Um zu ermitteln, ob und in welcher Form die gesehenen Proliferationsunterschiede zwischen den aus homozygoten MTUS1 Knock-Out-Mäusen und aus Wildtyp-Mäusen gewonnenen Fibroblasten über die Ras/Raf/MEK/ERK- Signalkaskade vermittelt sind, wurde mit den Proteinen aus den beiden stimulierten Zelllinien ein Western Blot mit dem Antikörper p-Erk entwickelt.  $\beta$ -Aktin diente zur Vergleichbarkeit der Quantifizierung der Proteinladung. Es folgte eine densitometrische Auswertung der p-Erk- und der  $\beta$ -Aktin-Banden. Die Ergebnisse wurden auf die  $\beta$ -Aktin-Bande standardisiert. Um die so ermittelten Absolutwerte übersichtlich darstellen zu können, wurden die Werte der mit FBM inkubierten Fibroblasten mit 100 % gleichgesetzt und die Werte der jeweiligen Wachstumsfaktoren in Korrelation gebracht.

In aus homozygoten MTUS-Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten zeigte sich eine Expressionssteigerung von p-Erk von 877,62 % versus 138,60 % bei aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten nach der Inkubation mit EGF (siehe Abbildung 15).

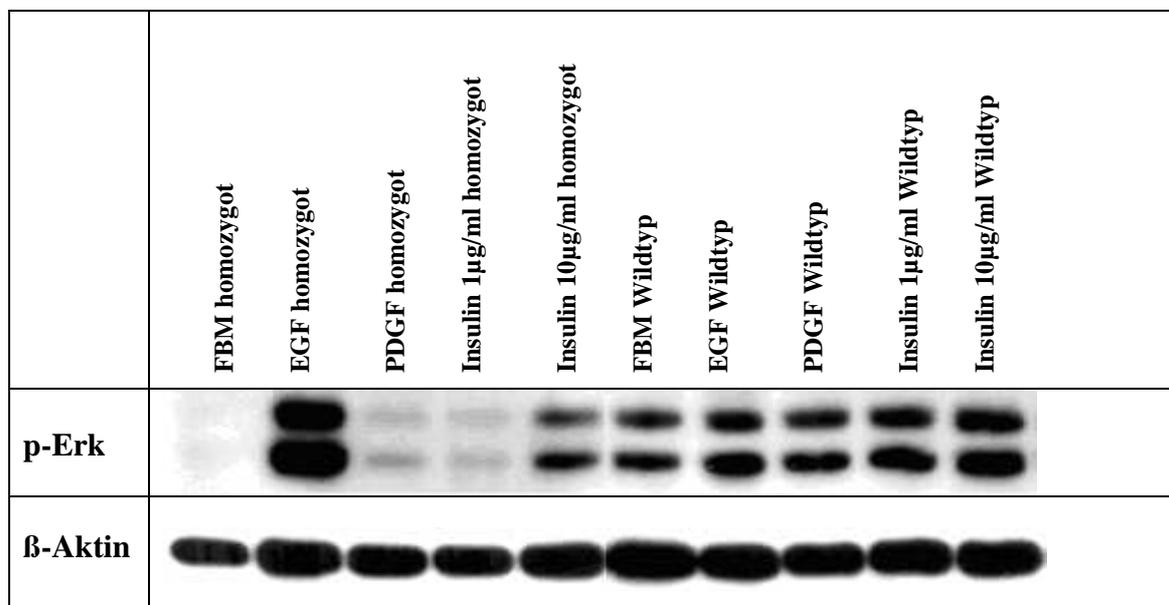
Nach der Inkubation mit PDGF ergab sich in aus homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäusen eine Expressionssteigerung von p-Erk von 272,40 % im Vergleich zu 143,72 % in aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten (siehe Abbildung 15).

Des Weiteren wurden die Zellen mit Insulin 1  $\mu$ g/ml inkubiert. Es zeigte sich in aus homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten eine

Expressionssteigerung von p-Erk von 245,60 % versus 160,67 % in aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten.

Die Inkubation der Fibroblasten mit Insulin 10  $\mu\text{g/ml}$  ergab eine Expressionssteigerung von p-Erk in den aus homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten von 396,65 % versus 184,55 % in den aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten (siehe Abbildung 15).

Somit konnte nach Inkubation mit allen verwendeten Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF und Insulin in den Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) eine Expressionssteigerung in den aus homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten gegenüber den aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten gezeigt werden.



*Abbildung 14: Darstellung der Auswertung der Western-Blot-Analyse der p-Erk Expression in aus homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten nach Inkubation mit den Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF und Insulin in den Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$ ) gegenüber den aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten.  $\beta$ -Aktin diente zur Vergleichbarkeit der Quantifizierung der Proteinladung. Es folgte eine densitometrische Auswertung der p-Erk und der  $\beta$ -Aktin-Banden. Die Ergebnisse wurden auf die  $\beta$ -Aktin-Bande standadisiert.*

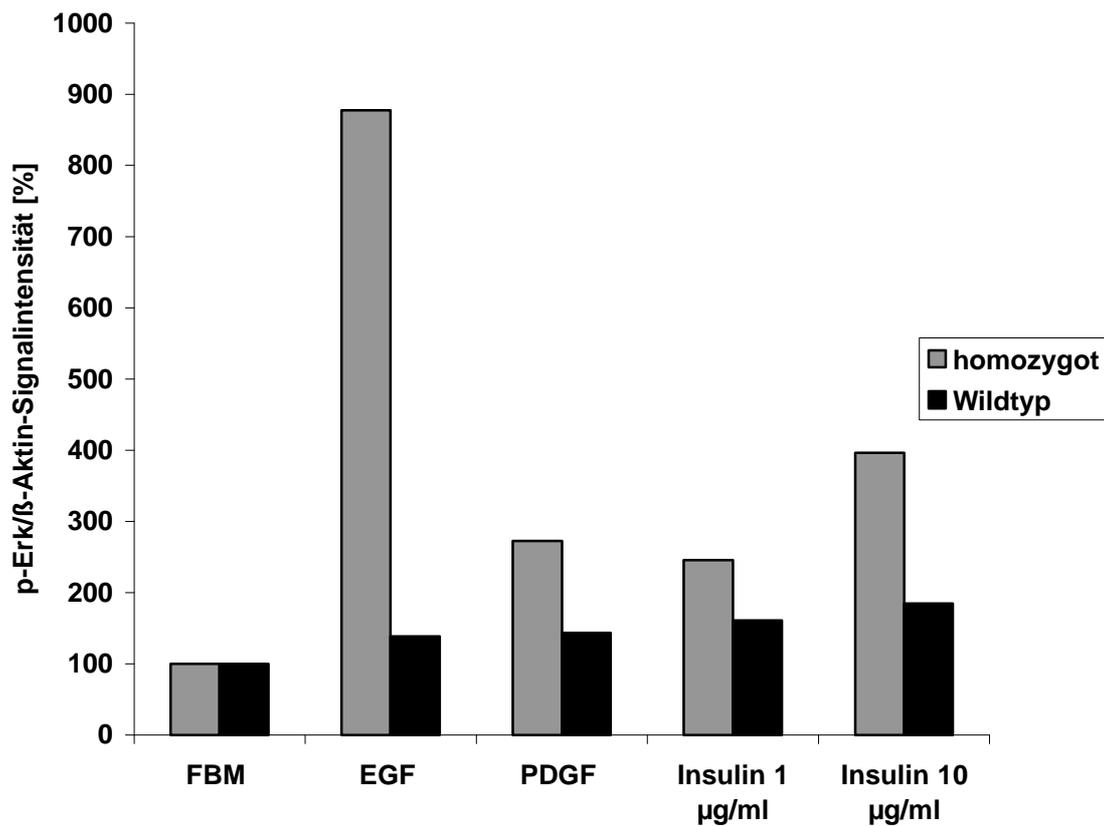


Abbildung 15: Auswertung der Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der p-Erk-Expression in aus homozygoten *MTUS1* Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten (graue Säulen) im Gegensatz zu aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten (schwarze Säulen) nach der Inkubation mit EGF, PDGF, Insulin 1 µg/ml und Insulin 10 µg/ml. Die Werte der mit FBM inkubierten Fibroblasten mit 100 % gleichgesetzt und die Werte der jeweiligen Wachstumsfaktoren in Korrelation gebracht.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Untersuchungen an MiaPaCa-2- und Kolontumor-Zellen**

Zu den wichtigsten Mechanismen der Karzinogenese gehören die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die Zielsetzung der durchgeführten Untersuchungen war es, die ursächlichen Mechanismen der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens MTUS1 und des resultierenden Expressionsverlusts in der Pankreaszelllinie MiaPaCa-2 und in Kolontumoren auf molekularer Ebene weiter zu charakterisieren.

Der Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens liegen zumeist genetische Veränderungen im Promotorbereich oder im Bereich der codierenden Sequenz zu Grunde. Die in dieser Arbeit vorgestellten genetischen Untersuchungen konnten weitere Erkenntnisse bezüglich der Inaktivierung von MTUS1 in der Tumorzelllinie MiaPaCa-2 und in Kolontumorgewebe liefern.

#### **6.1.1 Untersuchungen des codierenden Bereichs**

In der Tumorzelllinie MiaPaCa-2 kann eine Inaktivierung des MTUS1-Gens durch eine Mutation im codierenden Bereich anhand der durchgeführten Sequenzanalysen ausgeschlossen werden.

Im Exon 2 konnte lediglich eine Substitution detektiert werden, die jedoch keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hat und daher für die Funktion des MTUS1 Proteins unbedeutend ist. Des Weiteren fand sich im Intronbereich nahe der Splice-site von Exon 10 eine weitere Substitution. Da bei der Untersuchung der MiaPaCa-2 cDNA jedoch keine aberrante Bande gefunden wurde, ist trotz der veränderten Intronsequenz ein korrekter Splicevorgang anzunehmen.

In Kolontumorzellen zeigte die durchgeführte Sequenzanalyse eine genetische Veränderung, die die Inaktivierung des MTUS1-Gens möglicherweise erklären könnte. Die Sequenzanalyse der MTUS-1 cDNA zeigte im 5` UTR-Bereich (5` untranslatierter Bereich) vor Exon 1 eine Punktmutation an Position 9104. Das in der Sequenz der Genbank Nr. AF165145 vorhandene Nukleotid Guanodin wurde in der untersuchten

Probe durch Cytosin ersetzt. Arbeiten anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine einzelne Punktmutation im 5`UTR-Bereich zu einer Veränderung der Translation und einer Expressionsänderung eines codierten Proteins führen kann und dass mRNAs, die an der Proliferation von Zellen beteiligt sind, häufig atypische 5`UTR-Bereiche aufweisen. Oft enthalten diese mRNAs sogenannte internal ribosome entry sites (IRESs), die zur veränderten Initiation der Translation führen können (Pickering et al., 2004), und upstream open reading frames (uORFs), die die Genexpression durch Veränderung der mRNA Stabilität beeinflussen können (Morris et al., 2000). Bei Patienten mit einem multiplen Myelom konnte im IRES im 5`UTR-Bereich des Proteins c-myc eine Mutation nachgewiesen werden, die bei der gesunden Kontrollgruppe nicht detektierbar war (Chappell et al., 2000), die zu einer Deregulation der Translation und so zu einer Steigerung der Expression von c-myc führte (Paulin et al., 1996). Zusätzlich gibt es Belege dafür, dass Mutationen im 5`UTR-Bereich zu einer verminderten Aktivität der mRNA Translation führen können (Cazzola M. et al., 2000). Es ist denkbar, dass dieser Mechanismus auch für die detektierte Punktmutation im 5`UTR-Bereich von MTUS1 der untersuchten Kolontumor-DNA zutrifft, so zu einer veränderten Translation und somit zur Inaktivierung von MTUS1 führen könnte. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Hypothese zu überprüfen.

### **6.1.2 Untersuchungen des Promotors und der dem Promotor folgenden Sequenz bis zum Exon 1**

Die Sequenzanalyse im Promotorbereich und in der dem Promotor folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 des MTUS-1-Gens ergab insgesamt 14 genetische Veränderungen gegenüber der MTUS-1-Sequenz der Genbank Nr. AF165145, die ebenfalls die Inaktivierung des MTUS1-Gens in der Tumorzelllinie MiaPaCa-2 und in humanen Kolontumoren erklären könnten, wobei insgesamt elf Mutationen davon in identischer Weise sowohl in der MiaPaCa-2-DNA als auch in der Kolontumor-DNA nachgewiesen werden konnten. Durch die ermittelten genetischen Aberrationen resultieren Veränderungen der möglichen transcription factor binding sites (tfbs) verschiedener Transkriptionsfaktoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein

geändertes Muster der tfbs für verschiedene Transkriptionsfaktoren im Promotor zu einer veränderten Transkription eines Gens führen kann (Xu et al., 1999).

Durch die nachgewiesenen Sequenzänderungen resultieren zusätzliche tfbs für die Transkriptionsfaktoren c-jun, AhR/Arnt (Heterodimer aus AhR und Arnt), TR-beta1 und ATF3, die ihrerseits die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und dadurch die Tumorentstehung beeinflussen können und somit die Inaktivierung des MTUS1-Gens in der Tumorzelllinie MiaPaCa-2 und in humanen Kolontumoren erklären könnten. C-jun ist ein positiver Regulator der Zellproliferation und wird für eine Vielzahl von zellulären Prozessen benötigt, die die onkogene Transformation beeinflussen (Jochum et al., 2001; Bakiri et al., 2000; Wisdom, 1999). C-jun hemmt die Transkription von p53 und antagonisiert so den durch p53 vermittelten hemmenden Einfluss auf die Proliferation (Schreiber et al., 2000). Außerdem scheint C-jun ein Regulator der Apoptose zu sein (Eferl et al., 1999, Wisdom et al., 1999, Kolbus et al., 2000, Estus et al., 1994; Ham et al., 1995, Behrens et al., 1999). AhR vermittelt die Effekte von Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (Fernandez-Salguero et al., 1996; Mimura et al., 1997, Prash et al., 2003), indem er nach dessen Bindung mit Arnt ein Heterodimer (AhR/Arnt) bildet (Reyes et al., 1992), das die Transkription verschiedener Gene aktiviert oder reprimiert (Swanson et al., 1995; Beischlag et al., 2008; Mimura et al., 2003). Es wird vermutet, dass AhR eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, der Apoptose und der Zelldifferenzierung spielt (Gasiewicz et al., 2008) indem AhR eine Vielzahl von Genen aktiviert die an der Proliferation (TGF- $\beta$ ), der Zellzyklusregulation (p27, jun-B) und der Apoptose (Bax) beteiligt sind (Hankinson O., 1995; Sogawa et al., 1997; Hahn ME, 1998; Kolluri et al., 1999; Matikainen et al., 2001). Eine abnormale Funktion von AhR scheint mit malignen Tumorerkrankungen assoziiert zu sein (Gasiewicz et al., 2008), da eine konstitutive Expression von AhR eine tumorinduzierende Wirkung im Magen und der Leber zeigte (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004), wobei die Rolle von AhR in der natürlichen Entstehung von Tumoren zurzeit noch nicht geklärt ist (Kawajiri et al., 2007). TR-beta1 ist ein negativer Regulator der p53 vermittelten Signalwege (Barrera-Hernandez et al., 1998) und vermittelt die Effekte des Thyroidhormons T3 über eine Repression oder Aktivierung der Transkription verschiedener Gene, die bei der Zellproliferation und der

Zelldifferenzierung von Bedeutung sind (Cheng et al., 2000). ATF3 scheint ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren zu spielen (Hai et al., 2001, Ishiguro et al., 1996 und 2000), dessen Bindung eher zur Repression als zur Aktivierung der Transkription eines Promotors führt (Chen et al., 1994; Hai et al., 2001).

Durch die nachgewiesenen Sequenzänderungen resultiert zudem ein Verlust der tfbs für die Transkriptionsfaktoren YY1 (Yin Yang 1), XBP-1 (X box binding protein 1), HNF-1alphaB (hepatocyte nuclear factor 1 alpha B), HNF-1alphaC (hepatocyte nuclear factor 1 alpha C) sowie ENKTF-1. Da YY1, XBP-1, HNF-1alphaB, HNF1-alphaC und ENKTF-1 als Aktivatoren der Transkription agieren können, könnte der Verlust ihrer Bindung zu einer Verminderung der Transkription von MTUS1 führen und so den ermittelten Expressionsverlust der MTUS1-mRNA in MiaPaCa-2-Zellen und die Reduktion der Expression der MTUS1-mRNA in Kolontumorzellen mit bedingen. YY1 hat eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung und kann als Aktivator oder Repressor als ein Initiator der Tumorigenese wirken, da eine Überexpression und/oder eine Aktivierung mit einer unkontrollierten Proliferation, einer Resistenz gegenüber Apoptose-auslösenden Stimuli, der Tumorigenese und der Fähigkeit zur Metastasierung einhergeht (Gordon et al., 2006; Wang et al., 2006). XBP-1 aktiviert die Transkription verschiedener Gene und ist essentiell für die Differenzierung von Plasmazellen (Iwakoshi et al., 2003; Reimold et al., 2001). XBP-1 ist essentiell für die Proliferation von Tumoren und zeigt im Mammakarzinom, dem kolorektalen und dem hepatozellulären Karzinom eine erhöhte Expression (Fujimoto et al., 2003; Fujimoto et al., 2007; Shuda et al., 2003), während die Inhibition von XBP-1 zu einer Verminderung des Tumorwachstums führt (Koong et al., 2006). HNF-1alpha spielt eine Rolle bei der Leber- und Pankreasdifferenzierung (Arrese M et al., 2002) und HNF1-B und HNF1-C fungieren als Aktivatoren der Transkription verschiedener Gene (Bach et al., 1993). ENKTF-1 agiert ebenfalls als Aktivator der Transkription (Comb et al., 1988).

Durch einige der ermittelten Substitutionen verlieren die Transkriptionsfaktoren C/EBPbeta, NFI, PR A, PR B, GR-alpha, GR-beta, FOXA1, FOXP3 und MEF-2A ihre tfbs, wobei durch andere Substitutionen teilweise wiederum neue tfbs für den jeweiligen

Faktor entstehen. Inwieweit die geänderten tfbs der genannten Transkriptionsfaktoren die verminderte Expression von MTUS1 in der Tumorzelllinie MiaPaCa-2 und in den Kolontumorgewebe bedingen könnten, ist aufgrund der Komplexität ihres Bindungsverhaltens, das in Abhängigkeit von verschiedenen Umständen wie beispielsweise dem Vorhandensein von Cofaktoren gegensätzlich sein kann, derzeit nicht beurteilbar. C/EBPbeta ist ein wichtiger Mediator der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und dem Überleben verschiedener Zelltypen und spielt als Aktivator oder als Repressor der Transkription eine Rolle in der Tumorigenese (Ramji et al., 2002; Sebastian et al., 2006). Im Falle des Tumorsuppressorgens p53 kann C/EBPbeta als Aktivator der Transkription fungieren, wobei das Fehlen von C/EBPbeta dazu führt, dass keine p53-Expression mehr nachgewiesen werden kann (Boggs et al., 2007). C/EBPbeta kann aber nach DNA-Schäden auch zu einer Repression von p53 und der Apoptose führen, um das Überleben der geschädigten Zelle zu fördern (Ewing et al., 2008). NFI kann als Aktivator oder Repressor der Transkription fungieren und spielt eine wichtige regulierende Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und Proliferation (Gronostajski, 2000). Progesteron spielt eine zentrale Rolle hinsichtlich der Reproduktion im Uterus, in den Ovarien, im Gehirn und in der Proliferation und Differenzierung der Mamma (Graham et al., 1997; Conneely et al., 2003). Diese Funktionen werden über den Progesteronrezeptor vermittelt, der in zwei funktionell unterschiedlichen Isoformen, PR A und PR B, existiert, wobei PR B in den meisten Fällen die Funktion eines Aktivators der Transkription eines Progesteron-abhängigen Promotors hat, während PR A keinen Einfluss auf die Transkription dieses Promotors hat oder sogar als ein Repressor von PR B agiert. FOXP3 fungiert als Repressor der Transkription (Schubert et al., 2001) und hat eine wichtige immunsuppressive Funktion. Eine erhöhte Expression von FOXP3 wirkt sich einerseits nützlich hinsichtlich einer erfolgreichen immunsuppressiven Behandlung einiger Autoimmunerkrankungen aus, andererseits schädlich durch die Unterdrückung einer Immunantwort gegen Tumorzellen (Yakirevich et al., 2007). Gleichzeitig gibt es Daten, die zeigen, dass FOXP3 die Transkription des HER-2/ErbB2 Onkogens über die Interaktion mit forkhead-DNA-Bindungsmotiven im Promotor von ErbB2 unterdrückt und die Entstehung von Mammakarzinomen supprimiert (Zuo et al., 2007). GR-alpha und GR-beta sind Splicevarianten von GR. GR reguliert die Proliferation, Apoptose,

Differenzierung, Metastasierung, Reproduktion und das Überleben der Zelle (Moutsatsou et al., 2008; Heitzer et al., 2007). GR-alpha aktiviert oder reprimiert die Transkription, was durch GR-beta inhibiert wird. FOXA1 wird für die Entwicklung von Leber, Pankreas, Lunge und Prostata benötigt (Friedman et al., 2006). MEF-2A spielt als Aktivator der Transkription eine Rolle in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems, der Proliferation, der Differenzierung und des Zelluntergangs (McKinsey et al., 2002).

Durch die nachgewiesenen Sequenzänderungen resultieren zusätzliche tfbs für die Transkriptionsfaktoren HOXD9, HOXD10, RXR-alpha, TFII-I und VDR, sowie für das Heterodimer PXR/RXR-alpha aus PXR und RXR-alpha. Da diese jedoch als Aktivatoren der Transkription fungieren, kann deren zusätzliche Bindung an die veränderte Sequenz der MiaPaCa-2- und Kolontumor-DNA den ermittelten Expressionsverlust von MTUS1 in MiaPaCa-2-Zellen und die Verminderung der Expression von MTUS1 in Kolontumor-Zellen zunächst nicht erklären.

Neben der direkten Beeinflussung der Transkription hinsichtlich einer Aktivierung oder Repression ist es zudem denkbar, dass die geänderten tfbs die sequenzspezifische DNA-Protein- oder die Protein-Protein-Interaktion im Initiationskomplex der Transkription beeinflussen und diese dadurch verändern (Xu et al., 1999). Da nahezu alle beschriebenen Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung spielen, die ihrerseits zur Tumorentstehung beitragen können oder direkt die Tumorentstehung auslösen können, scheint es sinnvoll und wichtig, diese hinsichtlich ihrer Funktion im Zusammenhang mit dem Tumorsuppressorgen MTUS1 weiter zu erforschen und so ihren Einfluss auf die Tumorentstehung weiter zu charakterisieren, da sich daraus Möglichkeiten einer Behandlung von Tumoren ergeben könnten.

## **6.2 Zucht der MTUS1-Knock-Out-Mäuse**

Durch die Etablierung von Knock-Out-Mäusen eines Tumorsuppressorgens entsteht die Möglichkeit, die komplexen Stoffwechselprozesse in der Gesamtheit eines lebenden Organismus in vivo und nicht isoliert in Zellkulturmodellen zu untersuchen. Die

Abschaltung eines Gens in homozygoten Knock-Out-Tieren bietet den Vorteil, wichtige Einblicke in die Rolle von Tumorsuppressorgenen in der Emryonalentwicklung, vor allem in der Organogenese, der Regulation der Zellzykluskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose zu gewähren (Ghebraniou et al., 1998). In der Vergangenheit wurden für die meisten der heute bekannten Tumorsuppressorgene wie das p53-Gen (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994) und das BRCA1-Gen (Hakem et al., 1996) Knock-Out-Mäuse etabliert und dadurch neue Erkenntnisse hinsichtlich ihrer Funktionen gewonnen. Die Entwicklung der Knock-Out-Maus für das MTUS1-Gen sollte ebenfalls zum besseren Verständnis seiner Funktionen beitragen. Um zu gewährleisten, dass die Untersuchungen tatsächlich an einem funktionierenden Knock-Out des MTUS1-Gens durchgeführt wurden, war es notwendig, nachzuweisen, dass das MTUS1-Gen tatsächlich inaktiviert war. Der Nachweis des MTUS1-Knock-Outs auf DNA-Ebene wurde mittels einer PCR-Reaktion mit DNA aus Knock-Out-, Wildtyp- und heterozygoten Tieren durchgeführt. Auch für die korrekte Verpaarung der Tiere zur Aufrechterhaltung der Zucht und zur Generierung einer ausreichenden Anzahl an homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Tieren für die verschiedenen Untersuchungen war es notwendig, den korrekten Genotyp eines jeden Tieres zu ermitteln, was ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit mit der PCR-Analyse der DNA der Tiere erfolgte. Der Nachweis des funktionellen Knock-Outs auf Proteinebene wurde im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit erbracht.

Seibold et al. konnten zeigen, dass MTUS1 in den untersuchten Geweben Herz, Plazenta, Gehirn, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Pankreas und Niere in unterschiedlicher Intensität exprimiert wird. Mit den gezüchteten Knock-Out-Mäusen für MTUS1 wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung die Expressionsverteilung von MTUS1 in verschiedenen Organkompartimenten untersucht. Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass MTUS1 vor allem in Epithel- und Endothelzellen, in Kardiomyozyten, in den Purkinjefasern des Kleinhirns und in der Nebennierenrinde aktiviert ist. Die Lokalisationen der MTUS1-Expression stimmen dabei zumindest zum Teil mit den Lokalisationen des AT2-Rezeptors überein, der in den genannten Kompartimenten ebenfalls exprimiert wird (Stoll et al. 1995, Reagan et al., 1994, Wintour et al., 1999). Des Weiteren wurden die gezüchteten MTUS1-Knock-Out-Tiere über einen längeren Zeitraum klinisch

beobachtet und pathologisch untersucht, um weitere wichtige Einblicke in die Funktion des ausgeschalteten Gens zu gewinnen. Bei der pathologischen Untersuchung zeigten sich eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz und lymphatische Infiltrate in verschiedenen Organen bei den hetero- und homozygoten Tieren. Weiterhin zeigten sich vor allem Veränderungen im Blutbild, wobei die homozygoten und heterozygoten Tiere deutlich erhöhte Leukozyten- und Lymphozytenwerte aufwiesen, wohingegen die Erythrozyten und Thrombozyten deutlich vermindert waren. Zusammengenommen deutet dies auf das Vorhandensein einer hämatologischen Erkrankung in den untersuchten homo- und heterozygoten Tieren hin. So konnten in der pathologischen Untersuchung bei 23 % der homozygoten und 17 % der heterozygoten Tiere Befunde passend zu einem B-Zell-Lymphom erhoben werden, was sich bei keinem der untersuchten Wildtyp-Tiere nachweisen ließ. Bei der Untersuchung des Gewichts der Tiere waren die homozygoten MTUS1 Knock-Out-Tiere signifikant schwerer als die Wildtyp-Tiere, was möglicherweise durch die hemmende Wirkung von MTUS1 auf die Proliferation begründet ist. Zusammengenommen untermauern all diese Erkenntnisse die Vermutung, dass es sich bei MTUS1 um ein Tumorsuppressorgen handelt.

Des Weiteren wurden mit Bauchhautfibroblasten Proliferationsversuche durchgeführt, in denen die Bauchhautfibroblasten aus MTUS1 homozygoten Knock-Out-Mäusen nach Inkubation mit den Wachstumsfaktoren EGF, Insulin [1 µg/ml] und Insulin [10 µg/ml] im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine deutlich stärkere Proliferation zeigten. Lediglich die Inkubation mit PDGF erbrachte eine nahezu identische Proliferationssteigerung der Bauchhautfibroblasten aus MTUS1 homozygoten Knock-Out-Mäusen im Vergleich zu den aus Wildtyp-Mäusen isolierten Bauchhautfibroblasten. Die Ergebnisse wurden gegenüber der Inkubation mit FBM verglichen und die Werte der mit FBM inkubierten Fibroblasten mit 100 % gleichgesetzt. Für die aus homozygoten MTUS1 Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten zeigte sich eine Proliferationssteigerung von 240,08 % versus 189,85 % bei aus Wildtyp-Mäusen isolierten Fibroblasten nach der Inkubation mit EGF, von 113,38 % versus 127,07 % nach der Inkubation mit PDGF, von 214,29 % versus 153,89 % nach der Inkubation mit Insulin 1 µg/ml und von 208,47 % versus 151,57 % nach der Inkubation mit Insulin 10 µg/ml. Dadurch konnte der hemmende Einfluss auf die Proliferation von MTUS1 bestätigt werden.

### **6.3 Western-Blot-Analyse**

Nouet et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Interaktion des Genproduktes von MTUS1 mit dem AT2-Rezeptor eine Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges nach sich zieht und so die Zellproliferation vermindert. Damit wurde die durch Seibold et al. formulierte These, dass MTUS1 die Funktion eines Tumorsuppressorgens aufweist, gestützt und die Funktion des MTUS1-Gens weiter charakterisiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von MTUS1 auf die Zellproliferation durch Proliferationsversuche in Zellen aus Knock-Out-Mäusen näher untersucht, wobei eine deutliche Proliferationssteigerung der homozygoten Zellen im Vergleich zu aus MTUS1 Wildtyp-Tieren isolierten Zellen nach der Inkubation mit EGF, Insulin 1µg/ml und Insulin 10 µg/ml festgestellt werden konnte. Daher wurden im Weiteren aus den mit den genannten Wachstumsmedien inkubierten MTUS1-homozygoten und -Wildtyp-Zellen Proteine isoliert und im Rahmen dieser Doktorarbeit Western-Blot-Analysen zur Untersuchung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges durchgeführt, der, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Proliferation durch MTUS1 zu spielen scheint. Hierfür wurde die Expression von p-Erk mittels Western-Blot näher untersucht, wobei die homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nach der Inkubation mit allen Wachstumsfaktoren eine Expressionssteigerung von p-Erk zeigten. Nach Inkubation mit EGF konnte in aus Wildtypmäusen isolierten Fibroblasten eine Expressionssteigerung von p-Erk von 138,60 % versus 877,62 % bei aus homozygoten MTUS1 Knock-Out-Mäusen isolierten Fibroblasten, nach Inkubation mit PDGF von 143 72 % versus 272,40 %, nach Inkubation mit Insulin 1 µg/ml von 160,67 % versus 245,60 % und nach Inkubation mit Insulin 10 µg/ml von 184,55 % versus 396,65 % ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit gezeigte Überexpression von p-Erk in MTUS1 homozygoten Knock-Out Fibroblasten konnte somit den von Nouet et al. vermuteten Einfluss von MTUS1 auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg bestätigen. Somit konnte auch gezeigt werden, dass MTUS1 offensichtlich Einfluss auf tumortypische Signalwege ausübt.

Die Überexpression von Erk ist ein bekanntes Phänomen in Malignomen. So konnten in einer Vielzahl von Tumoren wie dem Glioblastom (Mandell et al., 1998), dem Nierenzellkarzinom (Oka et al., 1995), dem hepatozellulären Karzinom (Schmidt et al.,

1997), dem Prostatakarzinom (Magi-Galluzzi et al., 1998), dem oralen Plattenepithelkarzinomen (Mishima et al., 2002), dem Adenokarzinom des Magens (Bang et al., 1998) und dem Mammakarzinom (Sivaraman et al., 1997; Salh et al., 1999, Mueller et al., 2000), eine erhöhte Erk-Expression oder aktiviertes Erk detektiert werden. Sivaraman et al. konnten als erste Arbeitsgruppe eine signifikant erhöhte Erk-Aktivität in invasiven Mammakarzinomen im Vergleich zu normalem Brustdrüsengewebe zeigen. Dabei wurde eine erhöhte Erk-Aktivität von  $1,4 \pm 0,19$  pmol/min/mg Protein in benignem Brustdrüsengewebe im Vergleich zu  $6,39 \pm 0,71$  in Mammakarzinomen nachgewiesen. Die durch Sivaraman beschriebene erhöhte Erk-Aktivität in Mammakarzinomen konnte durch Salh et al. bestätigt werden, die eine bis zu 2,5-fache Überexpression von Erk1 und Erk2 in Mammakarzinomen mit spezifischen Antikörpern in Western-Blot-Analysen ermitteln konnten. Mueller et al. konnten zudem zeigen, dass die Erk-Aktivität bei Patientinnen mit primär nodal positivem Mammakarzinom höher im Vergleich zu nodal negativen Mammakarzinomen ist und postulierten zudem, dass die erhöhte Erk-Aktivität eine prognostische Bedeutung für das krankheitsfreie Überleben darstellt.

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchungen an den MTUS1 Knock-Out-Mäusen bestätigt werden, dass neben der durch Nouet et al. ermittelten Beteiligung des AT2-Rezeptors weitere Rezeptorsysteme mit ihren jeweiligen Liganden an der Signaltransduktion von MTUS1 mittels der Ras/Raf/MEK/Erk-Kaskade beteiligt sind. So wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass neben AT2 auch die über die Wachstumsfaktoren EGF, PDGF und Insulin vermittelte Proliferation durch MTUS1 gehemmt wird, da aus einem Knock-Out von MTUS1 in den Zellen, die mit den genannten Wachstumsfaktoren inkubiert wurden, eine Expressionssteigerung von p-Erk in den homozygoten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren resultiert. Somit muss MTUS1 seinen hemmenden Effekt „unterhalb“, downstream, der Rezeptortyrosinkinase vermitteln. Weiterhin konnte durch die durchgeführte Untersuchung mit den Proteinen aus homozygoten Knock-Out-Tieren für MTUS1 gezeigt werden, dass MTUS1 seine Funktion „oberhalb“, upstream, von Erk haben muss, da die Ausschaltung von MTUS1 eine Expressionssteigerung von p-Erk im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zur Folge hat. Damit konnte die Hypothese untermauert

werden, dass MTUS1 die Phosphorylierung von Erk inhibiert und damit Proliferation mindert.

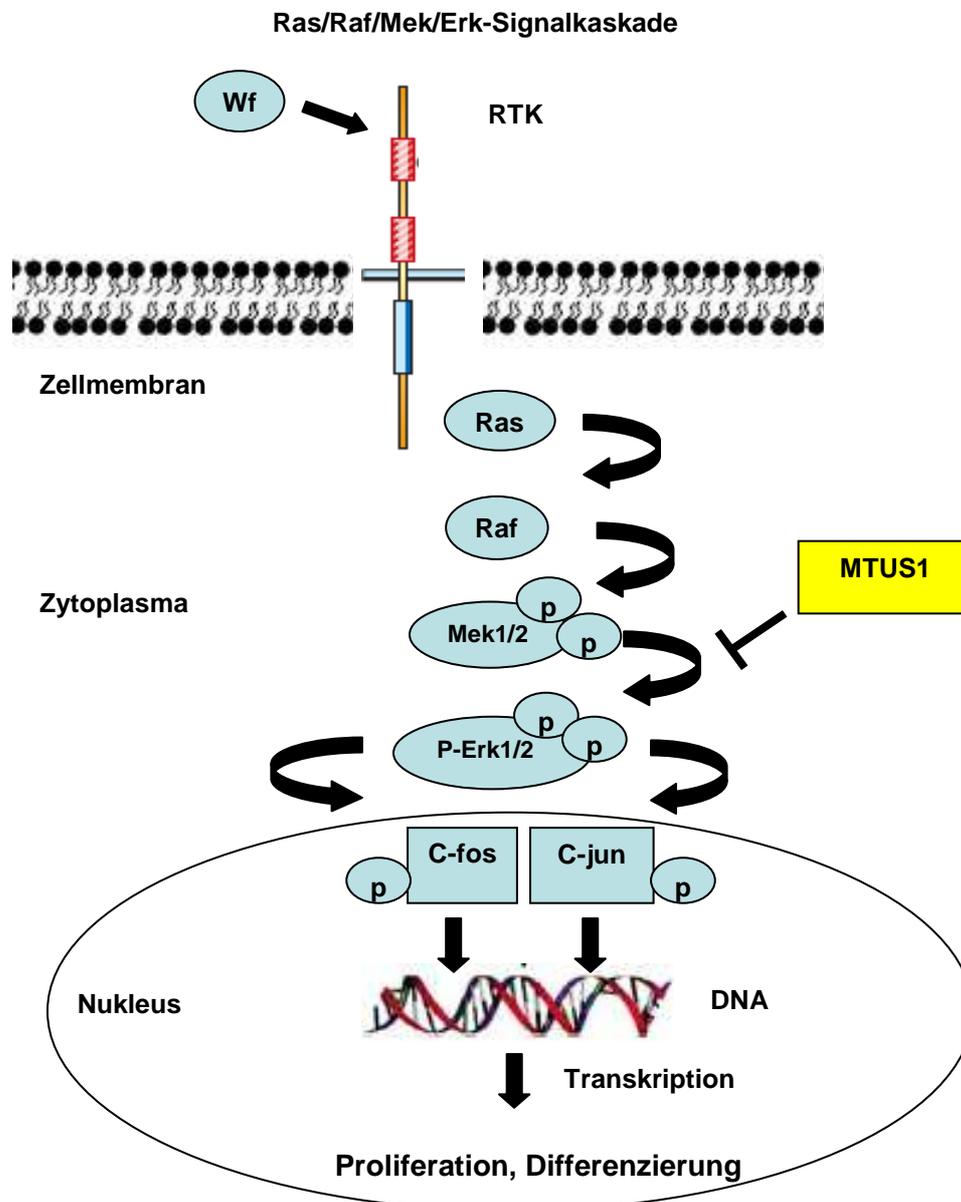


Abbildung 16: Schematischer Überblick über die Ras/Raf/Mek/Erk-Signalkaskade. Die Bindung des Wachstumsfaktors (Wf) an den Rezeptor (hier RTK) führt zur Aktivierung von Ras, das an Raf bindet und dieses aktiviert. Raf aktiviert durch Phosphorylierung die MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) und die MEK2 Serin/Threonin Kinase. Diese bewirken über eine duale Phosphorylierung der Proteine Erk1 (extrazellular regulated kinase 1) und Erk2 (extrazellular regulated kinase 2) deren vollständige Aktivierung zu p-Erk1 (phosphorylated Erk1) und p-Erk2. P-Erk1 und p-Erk2 phosphorylieren und aktivieren wiederum eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren wie c-Fos und c-Jun. MTUS1 hemmt die Phosphorylierung von Erk.

## **7 Zusammenfassung**

Die Kanzerogenese ist gekennzeichnet durch eine Akkumulation genetischer Veränderungen vor allem in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Sie führen zu einer Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen und zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die maßgeblich an der Regulation und Kontrolle der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen beteiligt sind. Diese Veränderungen können im Promotor, der dem Promotor folgenden, nicht codierenden oder in der codierenden Sequenz lokalisiert sein. Die genetischen Veränderungen können so zu einer abnorm erhöhten Proliferation und zur Entstehung maligner Zellen führen. Die Proliferation wird durch Wachstumsfaktoren reguliert, indem diese durch Bindung an spezifische Rezeptoren, die meist zu der Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK) Familie der Rezeptoren gehören, Signalkaskaden wie die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade aktivieren. Diese spielt neben der Regulation der Proliferation auch eine Rolle bei der Differenzierung und unter bestimmten Umständen bei der Migration, Apoptose, der morphologischen Determination und onkogenetischen Transformation und ist in malignen Tumoren häufig inadäquat aktiviert. (Seger et al., 1995; Torii et al., 2004; Viala et al., 2004; Yoon et al., 2006). Um die komplexen Prozesse der Karzinogenese besser verstehen zu können, ist es aufgrund der zentralen Bedeutung der Tumorsuppressorgene in der Tumorentstehung unabdingbar, sämtliche Tumorsuppressorgene zu identifizieren und die von ihnen verwendeten Signaltransduktionswege zu erforschen.

So konnte auf dem Chromosom 8p21.3-22 das Gen MTUS1 identifiziert werden, dessen Expression in einigen Tumorzelllinien und Tumoren signifikant vermindert beziehungsweise nicht mehr nachweisbar ist. Bei rekombinanter Expression von MTUS1 in der Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2 konnte die Zellproliferation signifikant inhibiert werden, was auf eine Beteiligung von MTUS1 an der Zellproliferation schließen lässt. Voruntersuchungen legen den Schluss nahe, dass MTUS1 durch die Interaktion mit dem AT2-Rezeptor über die Inhibierung der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade die Zellproliferation inhibiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Tumorsuppressorgen-Funktion von MTUS1 weiter zu untersuchen, wobei als Grundlage die Hypothese galt, dass es sich bei dem Gen MTUS1 um ein Tumorsuppressorgen handelt, das durch seine Expression die Ras/Raf/MEK/Erk-Signalkaskade und damit schließlich die Proliferation inhibiert.

Die Untersuchungen der MiaPaCa-2-Zelllinie im codierenden Bereich konnten eine Inaktivierung des MTUS1-Gens und damit einhergehende Expressionsminderung durch eine Mutation in diesem Bereich ausschließen. Bei der Sequenzanalyse der cDNA von Kolontumorzellen konnte im 5' UTR-Bereich (5'untranslatierter Bereich) vor Exon 1 eine Punktmutation detektiert werden. Mutationen in diesem Bereich können zu einer Veränderung der Translation und einer Expressionsänderung eines codierten Proteins führen (Cazzola M. et al., 2000). Es ist denkbar, dass diese detektierte Punktmutation zu einer veränderten Translation und somit zur Inaktivierung von MTUS1 führen könnte.

Bei der Überprüfung hinsichtlich genetischer Veränderungen in der MiaPaCa-Zelllinie und der Kolontumor-DNA im Bereich des Promotors sowie der folgenden nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 ergaben sich insgesamt 14 verschiedene genetische Änderungen im Vergleich zur Sequenz der Genbank Nr. AF165145. Dabei konnte festgestellt werden, dass in der dem Promotor folgenden, nicht codierenden Sequenz bis zum Exon 1 insgesamt elf Mutationen mit jeweils identischen Nukleotidveränderungen sowohl in MiaPaCa-2-DNA als auch in Kolontumor-DNA zu finden waren. Durch die ermittelten genetischen Aberrationen resultierten eine Vielzahl an Veränderungen der möglichen transcription factor binding sites (tfbs) verschiedener Transkriptionsfaktoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein geändertes Muster der tfbs für verschiedene Transkriptionsfaktoren im Promotor zu einer veränderten Transkription des Gens führen können (Xu et al., 1999). Da nahezu alle Transkriptionsfaktoren, deren Bindungsverhalten durch die Mutationen verändert wurde, eine Rolle in Prozessen wie der Proliferation und der Differenzierung spielen, die zur Tumorentstehung beitragen oder direkt die Tumorentstehung auslösen können, scheint es sinnvoll und wichtig, diese hinsichtlich ihrer Funktion im Zusammenhang mit dem Tumorsuppressorgen MTUS1 weiter zu erforschen und so ihren Einfluss auf die Tumorentstehung weiter zu charakterisieren.

Durch die Etablierung von Knock-Out-Mäusen für MTUS1 entstand die Möglichkeit, die komplexen Stoffwechselprozesse in der Gesamtheit eines lebenden Organismus, in vivo und nicht nur isoliert in Zellkulturmodellen zu untersuchen und so Einblicke in die Rolle des MTUS1-Gens, vor allem in der Organogenese, der Regulation der Zellzykluskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose zu gewinnen. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren konnten bei den homo- und heterozygoten Tieren neben Blutbildveränderungen eine extramedulläre Hämatopoese, lymphatische Infiltrate in verschiedenen Organen, B-Zelllymphome, Herzhypertrophien, Glomerulonephritiden und Atelektasen der Lungen nachgewiesen werden.

Der Nachweis des MTUS1 Knock-Outs auf DNA-Ebene wurde mittels einer PCR-Reaktion mit DNA aus Knock-Out-, Wildtyp- und heterozygoten Tieren im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Auch für die korrekte Verpaarung der Tiere zur Aufrechterhaltung der Zucht und zur Generierung einer ausreichenden Anzahl an homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Tieren für die verschiedenen Untersuchungen war es notwendig, den korrekten Genotyp eines jeden Tieres zu ermitteln, was ebenfalls im Rahmen dieser Doktorarbeit mit der PCR-Analyse der DNA der Tiere erfolgte.

Des Weiteren wurden aus mit Wachstumsmedien inkubierten MTUS1-homozygoten und -Wildtyp-Zellen Proteine isoliert und Western-Blot-Analysen zur Untersuchung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges durchgeführt, der eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Proliferation durch MTUS1 zu spielen scheint. Hierfür wurde die Expression von p-Erk mittels Western Blot näher untersucht, wobei die homozygoten MTUS1-Knock-Out-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nach der Inkubation mit allen Wachstumsfaktoren eine Expressionssteigerung von p-Erk zeigten. Die Überexpression von Erk ist ein bekanntes Phänomen in Malignomen und die in dieser Arbeit gezeigte Überexpression von p-Erk in MTUS1 homozygoten Knock-Out Fibroblasten bestätigt den von Nouet et al. vermuteten Einfluss von MTUS1 auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg. Somit zeigt sich, dass MTUS1 offensichtlich Einfluss auf tumortypische Signalwege ausüben kann. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Untersuchungen an MTUS1-Knock-Out-Mäusen bestätigt werden, dass neben

der durch Nouet et al. nachgewiesenen Beteiligung des AT2-Rezeptors weitere Rezeptorsysteme mit ihren jeweiligen Liganden an der Signaltransduktion von MTUS1 mittels der Ras/Raf/MEK/Erk-Kaskade beteiligt sind. So wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass neben AT2 auch die über die Wachstumsfaktoren EGF, PDGF und Insulin vermittelte Proliferation durch MTUS1 gehemmt wird, da in den Zellen aus homozygoten Knock-Out-Tieren für MTUS1, die mit den genannten Wachstumsfaktoren inkubiert wurden, eine Expressionssteigerung von p-Erk im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren resultiert. Somit scheint MTUS1 seinen hemmenden Effekt „unterhalb“, downstream, der Rezeptortyrosinkinasen und „oberhalb“, upstream, von Erk zu vermitteln, da die Ausschaltung von MTUS1 eine Expressionssteigerung von p-Erk im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zur Folge hat. Damit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass MTUS1 die Phosphorylierung von Erk inhibiert und damit Proliferation mindert.

Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit die Hypothese weiter untermauert werden, dass es sich bei dem Gen MTUS1 um ein Tumorsuppressorgen handelt, das seine proliferationsmindernde Funktion über eine Suppression von RTK-Signalwegen ausübt.

## **8 Literatur**

**Andersson P**, McGuire J, Rubio C, Gradin K, Whitelaw ML, Pettersson S, Hanberg A, Poellinger L. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):9990-5.

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

**Arrese M**, Karpen SJ. HNF-1 alpha: have bile acid transport genes found their "master"? *J Hepatol.* 2002 Jan;36(1):142-5.

**Bach I**, Yaniv M. More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J.* 1993 Nov;12(11):4229-42.

**Bakiri L**, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.* 2000 May 2;19(9):2056-68.

**Bang Y.J.**, Kwon J.H., Kang S.H., Kim J.W., Yang Y.C., Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 250: 43-47

**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.

**Barrera-Hernandez G**, Zhan Q, Wong R, Cheng SY. Thyroid hormone receptor is a negative regulator in p53-mediated signaling pathways. *DNA Cell Biol.* 1998 Sep;17(9):743-50.

**Behrens A**, Sibia M, Wagner EF. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet.* 1999 Mar;21(3):326-9.

**Beischlag TV**, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008;18(3):207-50.

**Blume-Jensen P**, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):355-65.

**Boggs K**, Reisman D. C/EBPbeta participates in regulating transcription of the p53 gene in response to mitogen stimulation. *J Biol Chem.* 2007 Mar 16;282(11):7982-90.

**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.

**Böcker W, Denk H, Heitz PU**, *Pathologie, 3. Auflage, 2004, Urban & Fischer, München, S. 184 – 198*

**Cazzola M**, Skoda RC. Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3280-8.

**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.

**Chappell SA**, LeQuesne JP, Paulin FE, deSchoolmeester ML, Stoneley M, Soutar RL, Ralston SH, Helfrich MH, Willis AE. A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene.* 2000 Sep 7;19(38):4437-40.

**Chen BP**, Liang G, Whelan J, Hai T. ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem.* 1994 Jun 3;269(22):15819-26.

**Cheng SY.** Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000 Jan;1(1-2):9-18.

**Comb M**, Mermod N, Hyman SE, Pearlberg J, Ross ME, Goodman HM. Proteins bound at adjacent DNA elements act synergistically to regulate human proenkephalin cAMP inducible transcription. *EMBO J.* 1988 Dec 1;7(12):3793-805.

**Conneely OM**, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003 Apr;8(2):205-14.

**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

**Di Benedetto M**, Bièche I, Deshayes F, Vacher S, Nouet S, Collura V, Seitz I, Louis S, Pineau P, Amsellem – Ouazana D, Couraud PO, Strosberg AD, Stoppa – Lyonnet D, Lidereau R, Nahmias C. Structural organization and expression of human MTUS1, a candidate 8p22 tumor suppressor gene encoding a family of angiotensin II AT2 receptor – interacting proteins, ATIP. *Gene.* 2006, Oct 1; 380(2):127 – 36. Epub 2006 Aug1.

**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.

**Eferl R**, Sibilica M, Hilberg F, Fuchsbichler A, Kufferath I, Guertl B, Zenz R, Wagner EF, Zatloukal K. Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol.* 1999 May 31;145(5):1049-61.

**El Naggari 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.

**Estus S**, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(6 Pt 1):1717-27.

**Ewing SJ**, Zhu S, Zhu F, House JS, Smart RC. C/EBPbeta represses p53 to promote cell survival downstream of DNA damage independent of oncogenic Ras and p19(Arf). *Cell Death Differ.* 2008 Nov;15(11):1734-44.

**Fernandez-Salguero PM**, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996 Sep;140(1):173-9.

**Frank B**, Bermejo JL, Hemminki K, Sutter C, Wappenschmidt B, Meindl A, Kiechle M, Bugert P, Schmutzler RK, Bartram CR, Burwinkel B. Copy number variant in the candidate tumor suppressor gene MTUS1 and familial breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2007; Jul;28(7):1442-5. Epub 2007 Feb 13

**Friedman JR**, Kaestner KH. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Oct;63(19-20):2317-28.

**Fujimoto T**, Onda M, Nagai H, Nagahata T, Ogawa K, Emi M. Upregulation and overexpression of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) gene in primary breast cancers. *Breast Cancer.* 2003;10(4):301-6.

**Fujimoto T**, Yoshimatsu K, Watanabe K, Yokomizo H, Otani T, Matsumoto A, Osawa G, Onda M, Ogawa K. Overexpression of human X-box binding protein 1 (XBP-1) in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Anticancer Res.* 2007 Jan-Feb;27(1A):127-31.

**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.

**Ganten D**, Ruckpaul K. Grundlagen der molekularen Medizin. Springer Verlag, 2007. S. 124

**Ghebranious N**, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* 1998;17:3385-3400

**Gordon S**, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene.* 2006 Feb 23;25(8):1125-42;

**Graham JD**, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 1997 Aug;18(4):502-19

**Gronostajski RM**. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene.* 2000 May 16;249(1-2):31-45.

**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.

**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.

**Hai T**, Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene.* 2001 Jul 25;273(1):1-11.

**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

**Ham J**, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron.* 1995 May;14(5):927-39.

**Hankinson O**. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:307-40.

**Heitzer MD**, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF, DeFranco DB. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007 Dec;8(4):321-30.

**Ichikawa, T.**, Nihei, N., Suzuki, H., Oshimura, M., Emi, M., Nakamura, Y., Hayata, I., Isaacs, J. T., 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, S. I., Murakumo, Y., Rattan, S., Inoue, H., Mori, M., Fidanza, V., Alder, H., Croce, C.M.: 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.

**Iwakoshi NN**, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev.* 2003 Aug;194:29-38.

**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

**Jochum W**, Passequé E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2401-12

**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.

**Kawajiri K**, Fujii-Kuriyama Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Aug 15;464(2):207-12.

**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.

**Kolbus A**, Herr I, Schreiber M, Debatin KM, Wagner EF, Angel P. c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol*. 2000 Jan;20(2):575-82.

**Kolluri SK**, Weiss C, Koff A, Göttlicher M. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev*. 1999 Jul 1;13(13):1742-53.

**Koong AC**, Chauhan V, Romero-Ramirez L. Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy. *Cancer Biol Ther*. 2006 Jul;5(7):756-9

**Knudson, A. G., Jr.** Mutation and cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 April; 68(4): 820–823.

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

**Lee S, Bang S, Song K, Lee I.** Differential expression in normal – adenoma – carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol Rep.* 2006; 16(4): 747 – 754.

**Levine, A.J.** 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323–331.

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

**Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC,** Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, 2007, Springer Verlag, Berlin, S. 161-162

**Magi-Galluzzi C., Montironi R., Cangi M.G., Wishnow K., Loda M.** Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN. *Virchows Arch* 1998; 432:407–413

**Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR.** *In situ* visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol* 1998;153:1411–23

**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.

**Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, Sakai T, Korsmeyer SJ, Casper RF, Sherr DH, Tilly JL.** Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet.* 2001 Aug;28(4):355-60.

**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.

**McKinsey TA**, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci.* 2002 Jan;27(1):40-7.

**Mimura J**, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Feb 17;1619(3):263-8.

**Mimura J**, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells.* 1997 Oct;2(10):645-54.

**Mishima K**, Inoue K, Hayashi Y. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2002 Jul;38(5):468-74

**Moennikes O**, Loeppen S, Buchmann A, Andersson P, Ittrich C, Poellinger L, Schwarz M. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 2004 Jul 15;64(14):4707-10.

**Morris DR**, Geballe AP. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol.* 2000 Dec;20(23):8635-42.

**Morton S**, Davis RJ, McLaren A, Cohen P. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-jun. *EMBO J.* 2003 Aug 1; 22(15):3876-86

**Moutsatsou P**, Papavassiliou AG. The glucocorticoid receptor signalling in breast cancer. *J Cell Mol Med.* 2008 Jan-Feb;12(1):145-63.

**Mueller H**, Flury N, Eppenberger-Castori S, Kueng W, David F, Eppenberger U. Potential prognostic value of mitogen-activated rotein kinase activity for disease-free-survival of primary breast cancer patients, *Int J Cancer.* 2000 Jul 20;89(4):384-8.

**Murphy LO**, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol.* 2002 Aug;4(8):556-64

**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.

**Oka H.**, Chatani Y., Hoshino R., Ogawa O., Kakehi Y., Terachi T., Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **55** (1995), pp. 4182–4187

**Paulin FE**, West MJ, Sullivan NF, Whitney RL, Lyne L, Willis AE. Aberrant translational control of the c-myc gene in multiple myeloma. *Oncogene.* 1996 Aug 1;13(3):505-13

**Pickering BM**, Willis AE. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Feb;16(1):39-47.

**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

**Poremba C**, Simon R, Boecker W, Dockhorn – Dworniczack. Molekulare Ursachen der Tumorentstehung, *Onkologe*, 1999; 5; 847 – 854

**Prasch AL**, Teraoka H, Carney SA, Dong W, Hiraga T, Stegeman JJ, Heideman W, Peterson RE. Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish. *Toxicol Sci.* 2003 Nov;76(1):138-50. Epub 2003 Jul 25.

**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.

**Ramji DP**, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 2002 Aug 1;365(Pt 3):561-75.

**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

**Reimold AM**, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravallesse EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature.* 2001 Jul 19;412(6844):300-7.

**Reyes H**, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science.* 1992 May 22;256(5060):1193-5.

**Robert Koch Institut**, Krebs in Deutschland, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Saarbrücken, 2008

**Salh B**, Marotta A, Matthewson C, et al. Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Res* 1999;19:731-40

**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.

**Schmidt C.M.**, McKillop I.H., Cahill P.A., Sitzmann J.V. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;236:54–58

**Schreiber M**, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Möhle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner EF. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* 1999 Mar 1;13(5):607-19.

**Schubert LA**, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):37672-9.

**Sebastian T**, Johnson PF. Stop and go: anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPbeta. *Cell Cycle.* 2006 May;5(9):953-7.

**Seger R**, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, Cobb MH, Krebs EG. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem.* 1992 Jul 15;267(20):14373-81

**Seger R**, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995 Jun;9(9):726-35

**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

**Shaul YD**, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signalling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug; 1773 (8):1213-26. Epub 2006 Oct 19

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

**Shuda M**, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O, Yamamoto N, Yamamoto M. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol.* 2003 May;38(5):605-14.

**Sivaraman VS**, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997;99:1478-83

**Sogawa K**, Fujii-Kuriyama Y. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem.* 1997 Dec;122(6):1075-9.

**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

**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.

**Swanson HI**, Chan WK, Bradfield CA. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26292-302.

**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.

**Torii S**, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E. Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J.Biochem.* 2004 Nov;136(5):557-61.

**Towbin, H.**, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

**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.

**Viala E**, Pouyssegur J. Regulation of tumor cell motility by ERK mitogen-activated protein kinases. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1030:208-18.

**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**, 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.

**Wang CC**, Chen JJ, Yang PC. Multifunctional transcription factor YY1: a therapeutic target in human cancer? *Expert Opin Ther Targets*. 2006 Apr;10(2):253-66.

**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

**Wisdom R**. AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res*. 1999 Nov 25;253(1):180-5

**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.

**Xu Y**, Krishnan A, Wan XS, Majima H, Yeh CC, Ludewig G, Kasarskis EJ, St Clair DK. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene.* 1999 Jan 7;18(1):93-102.

**Yakirevich E**, Resnick MB. Regulatory T lymphocytes: pivotal components of the host antitumor response. *J Clin Oncol.* 2007 Jun 20;25(18):2506-8.

**Yaremko, M. L.**, 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.

**Ye H**, Pungpravat N, Hung BL, Muzio LL, Marigliò MA, Chen Z, Wong DT, Zhou X. Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity on 8p21.3 approximately p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 176(2): 100 – 6.

**Yokota, T.**, Yoshimoto, M., Akiyama, F., Sakamoto, G., Kasumi, F., Nakamura, Y., Emi, M., (1999) Localization of a tumor suppressor gene associated with the progression of human breast carcinoma within 1 – cM interval of 8p22-p23.1. *Cancer* 85, 447 - 452

**Yoon S**, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006 Mar; 24(1):21-44.

**Zuo T**, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, Liu Y, Wang Y, Liu X, Chan MW, Liu JQ, Love R, Liu CG, Godfrey V, Shen R, Huang TH, Yang T, Park BK,

Wang CY, Zheng P, Liu Y. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1275-86.

**zur Hausen H.** Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res*. 1989; 49:4677–4681

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Christoph Wanner gilt mein Dank für die Möglichkeit, unter hervorragenden Bedingungen an diesem interessanten Themengebiet im Labor der nephrologischen Abteilung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg arbeiten zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Seibold und Frau Dr. Christina Zürn für die hervorragende Betreuung bedanken. Ihr beständiges Engagement und die Bereitschaft für wertvolle Diskussionen sowohl während der Zeit der Planung und der Versuchsdurchführung im Labor als auch während der Fertigstellung dieser Arbeit haben maßgeblichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei

Frau Carmen Bauer, Elke Baumeister, Margarethe Röder, Silvia Renker und Herrn Dr. Thomas Hansen-Hagge für die gute Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre, die vielen Diskussionen, wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der Versuche und die schönen Stunden inner- und außerhalb des Labors. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht mit euch!

Meiner Freundin und Mitdotorandin Stephanie Starke für die Hilfe bei der Zellkultur und die gegenseitige emotionale Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Meinen Eltern Ursula und Helmut Heimrich, durch deren stetiges, nie endendes Bestärken und deren Unterstützung mein Weg möglich gemacht wird.

Meinem Freund Dr. Dominik Pretscher für den liebevollen Rückhalt, das entgegengebrachte Verständnis und die unendliche Geduld.

---

---

## **Curriculum vitae**

### **PERSÖNLICHE DATEN**

---

- Name Jutta Heimrich
- Familienstand ledig
- Geburtsdatum 05.09.1982
- Geburtsort Hünfeld
- Beruf Ärztin

### **SCHULLAUFBAHN**

---

- 1989-1993 Grundschule Eiterfeld
- 1993-1999 Gymnasialer Zweig der Gesamtschule Eiterfeld
- 1999-2002 Gymnasiale Oberstufe und Abitur am Wigbertgymnasium Hünfeld

### **HOCHSCHULSTUDIUM**

---

- 10/2002- 07/2004 Vorklinischer Studienabschnitt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 14.09.2004 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 10/2004-07/2008 Klinischer Studienabschnitt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 26.05.2009 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 02.06.2009 Approbation als Ärztin

### **BERUFLICHE TÄTIGKEIT**

---

- Seit 01.08.2009 Assistenzärztin der Frauenklinik Erlangen der Friedrich-Alexander Universität