FUNKTIONSANALYSE EPIDERMALER 12-LIPOXYGENASEN IN DER HAUT VON MÄUSEN

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)

Vorgelegt von
Herrn
Diplom-Lebensmittelchemiker
Karsten Müller

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern, 2002

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 20.09.2002

<u>Prüfungskommission:</u>

Vorsitzender:	Prof. Dr. Hans-Georg Kuball
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Friedrich Marks

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 1999 bis Juni 2002 in der Abteilung „Biochemie der gewebsspezifischen Regulation“ am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Herrn Prof. Dr. H.-G. Kuball danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand möchte ich für die Betreuung und die Vertretung dieser Arbeit an der Universität Kaiserslautern ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. F. Marks danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine Anregungen und Unterstützung während der Promotionszeit.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG

Lipoxygenasen (LOXn) sind Enzyme, die sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich weitverbreitet vorkommen. Sie katalysieren die stereo- und regiospezifische Dioxygenierung von Pentadienstrukturen, die vor allem in mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) enthalten sind. Die Produkte der katalytischen Aktivität von LOXn wirken bei Pflanzen und Invertebraten vor allem als Aroma- und Lockstoffe sowie als Botenstoffe in Signalübertragungskaskaden und Streßsituationen (Siedow 1991; Abe et al., 1995).

Weniger gut erforscht ist die Funktion der LOXn bei Säugetieren und beim Menschen. Bei der Maus sind 7 und beim Menschen 6 Isoformen bekannt, die meist gewebsspezifische Expressionsmuster aufweisen. Noch am besten untersucht sind die Isoformen, die vornehmlich in Blutzellen vorkommen: Die 5S-LOX und ihre Produkte, die Leukotriene, spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und bei allergischen Reaktionen wie z.B. Asthma. Der 15-LOX-1 wird eine Beteiligung am Abbau von Organellen bei der Zellenentwicklung und –differenzierung zugeschrieben. Eine pathophysiologische Funktion wird bei der Enstehung atherosklerotischer Läsionen diskutiert (Kühn et al., 1994).

Eine eigene Isoenzymgruppe wird nach ihrem Vorkommen in der Oberhaut als Epidermis-Typ Lipoxygenasen bezeichnet. Dazu gehören die zuletzt entdeckten Vertreter der Enzymfamilie, wovon einige sich durch zusätzliche Proteindomänen oder durch eine unter zellfreien Bedingungen kaum meßbare Aktivität auszeichnen. Funktionell deutet sich ein Zusammenhang zwischen LOX-Expression und der terminalen Keratinozytendifferenzierung an. Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß LOXn an der Entstehung transienter oder permanenter Proliferationsstörungen in der Haut beteiligt sind. So wurden bei der Schuppenflechte (Psoriasis) und bei der Hautkrebsentwicklung eine aberrante Expression und/oder Anhäufung von spezifischen LOX-Produkten nachgewiesen (Bürger et al., 1999; Baer et al., 1991). In einer vor kurzem erschienenen Publikation wurde nachgewiesen, daß der genetische Defekt zweier epidermaler LOXn unabhängig voneinander eine Form der kongenitalen Ichthyose, einer erblichen Verhornungsstörung („Fischschuppenhaut"), verursacht (Jobard et al., 2002).

Es besteht noch großer Forschungsbedarf, um die Funktion der verschiedenen LOX-Isoenzyme verstehen zu können. Die genauere Charakterisierung der epidermalen LOXn kann dazu beitragen, den Zusammenhang zwischen LOXn und Proliferationsstörungen der Haut sowie epithelialem Krebs aufzuklären.

2. THEORETISCHER TEIL

2.1. Arachidonsäure-Stoffwechsel und Lipoxygenasen

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linol-, Linolen- und Arachidonsäure sind in veresterter Form strukturelle Bestandteile von zellulären Membranen. Als freie Fettsäuren bilden sie Vorstufen zu einer Vielzahl von Signalmolekülen, den Eicosanoiden und Octadecanoiden, denen eine Schlüsselrolle bei der zellulären Kommunikation in Pflanzen und Tieren zukommt. Sie sind Produkte des oxidativen Stoffwechsels, der von drei Enzymfamilien beherrscht wird, den Cyclooxygenasen, einzelnen Vertretern der Cytochrom P450-haltigen Monooxygenasen und den Lipoxygenasen.

Abb. 1 zeigt eine Übersicht über den Arachidonsäurestoffwechsel im Säuger. Arachidonsäure befindet sich in Zellen vorwiegend in der sn-2-Position von Lipiden wie z.B. Phosphatidylcholin verestert. Als freie Fettsäure wird sie den metabolisierenden Enzymen nach Phospholipase A_2-katalysierter Hydrolyse als Substrat zur Verfügung gestellt. Die Freisetzung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Arachidonsäurekaskade, da die Konzentration der freien Säure in ruhenden Zellen mit $<10^{-6}$ M deutlich unter den K_m-Werten der metabolisierenden Enzyme liegt (Irvine, 1982). Die Mobilisierung der Arachidonsäure kann endogen durch Hormone oder Wachstumsfaktoren sowie exogen durch Ca^{2+}-Ionophore, den Phorbolester TPA oder Verwundung ausgelöst werden. Die Prostaglandin-Synthasen (PGHS) 1 und 2, meist als Cyclooxygenasen (COX) bezeichnet, sind Hämoproteine, die in ihrer katalytisch aktiven Form als Kopf-Schwanz-Homodimere vorliegen. Die COXn besitzen zwei voneinander unabhängige Enzymaktivitäten: die eigentliche Cyclooxygenase-Aktivität katalysiert die Oxidation der Arachidonsäure zum zyklischen Endohydroperoxid PGG_2, die Peroxidaseaktivität die Reduktion von PGG_2 zu PGH_2. Dieses wird durch spezifische Synthasen in die verschiedenen Prostaglandine und Thromboxane umgewandelt. Die Cytochrom P450-haltigen Monooxygenasen bilden aus der Arachidonsäure Metabolite wie razemische HETEn, 19S- und 20S-HETE sowie cis-Epoxyeicosatetraensäuren (EETn), aus denen wiederum cis-trans-konjugierte DiHETEn hervorgehen (Übersicht in Marks und Fürstenberger, 1999). Die Bestimmung der Stereochemie der HETEn kann aus diesen Gründen dazu dienen, die Enzyme zu identifizieren, die für ihre Bildung verantwortlich sind.

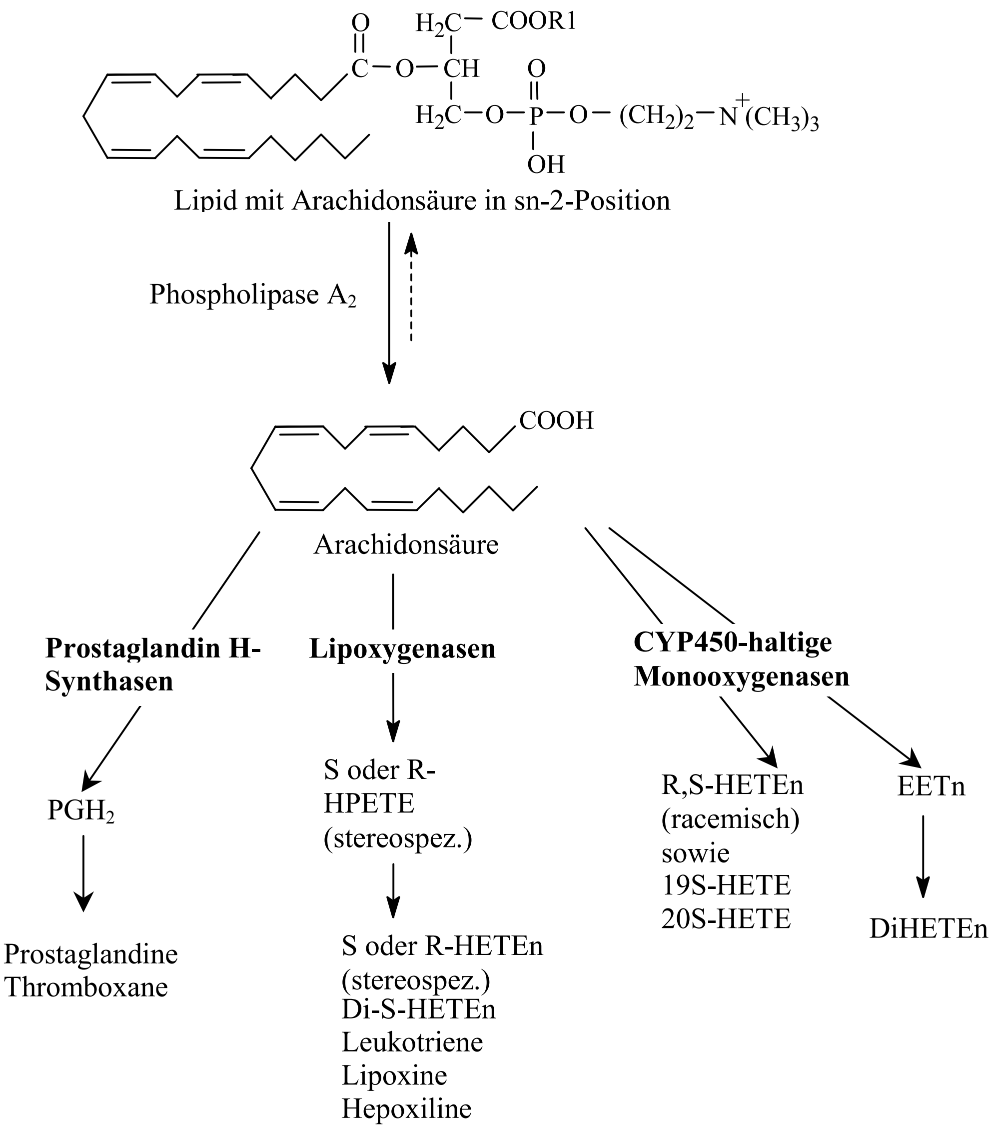


Abb. 1 Metabolismus von Arachidonsäure im Säuger

Lipoxygenasen (LOXn) sind Dioxygenasen mit einer weiten Verbreitung im Pflanzen- und Tierreich. Sie enthalten in ihrem katalytischen Zentrum ein Eisen(III)-Ion, das nicht hämgebunden ist. Mit dessen Hilfe katalysieren sie die stereospezifische Einführung von molekularem Sauerstoff in 1,4-cis,cis-Pentadienstrukturen, die z. B. in mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) vorkommen (Abb. 2). Dabei wird ein Wasserstoffatom der Methylengruppe stereospezifisch abgespalten und anschließend Sauerstoff von der Rückseite her (antarafacial) in

Position eins bzw. fünf angelagert. Das Produkt ist ein Hydroperoxid (Willis 1987; Brash 1999).

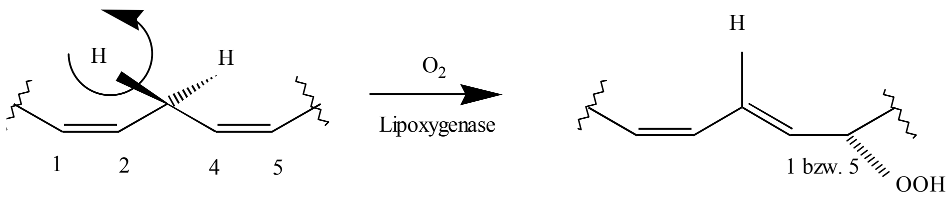


Abb. 2 Schematische Darstellung der von Lipoxygenasen katalysierten Oxidation

Mit Arachidonsäure als Substrat entstehen Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETEn), die dann unter der Katalyse von Glutathion-abhängigen Peroxidasen durch Reduktion in Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEn) umgewandelt werden. Diese können als lokale Mediatoren (Gewebshormone) oder als Second Messenger wirken (Yamamoto 1992). Die HPETEn werden stereospezifisch gebildet, d.h. das entstehende asymmetrische C-Atom weist entweder R- oder S-Konfiguration auf. Bei Pflanzen und Säugern überwiegen LOXn, die Produkte mit S-Stereoisomerie herstellen. Die Nomenklatur der LOXn erfolgt im Pflanzenreich nach der Position des Sauerstoffeinbaus in der Kohlenstoffkette von Linolensäure, während im Tierreich die Kohlenstoffkette der Arachidonsäure für die Namensgebung verwendet wird.

LOXn bestehen aus einem Polypeptidstrang, der bei Tieren ein Molekulargewicht von 75-80 kDa und bei Pflanzen eines von 94-104 kDa erreicht. Die verschiedenen Isoformen der Säugerlipoxygenasen haben eine 40-90%ige Homologie in der Aminosäuresequenz, wobei die Varianten einer Isoform bei verschiedenen Tierarten sich stärker ähneln als die verschiedenen Isoenzyme innerhalb einer Tierart. Am N-terminalen Ende der LOX-Proteine befindet sich eine β-Barrel-Domäne, die kleiner ist als die katalytische Domäne am C-Terminus. Letztere enthält das nicht-hämgebundene Eisen, das von konservierten Histidin-Resten und der Carboxylgruppe des C-terminalen Isoleucins gebunden wird. Die β-Barrel-Domäne ist homolog zu der C-terminalen Domäne von Säugerlipasen, die es diesen ermöglicht, aus der cytosolischen Umgebung mit den lipophilen Substraten in Kontakt zu kommen (Gillmor et al., 1997). Eine ähnliche Funktion übernimmt bei der 5-LOX das 5-LOX-aktivierende Protein (FLAP), das als Transferprotein für das Substrat wirkt (Mancini et al., 1993). Bisher konnte bei keiner anderen LOX eine ähnliches Protein nachgewiesen werden.

Die zur Zeit intensive Analyse von LOXn fördert neue Strukturen und Reaktionen zu Tage. Bei dem Pilz *Gäumannomyces graminis* wurde das Vorhandensein von Mangan statt Eisen im aktiven Zentrum beschrieben (Su und Oliw, 1998: Melan et al., 1994). Bei bekannten Lipoxygenasen werden immer mehr Reaktionen nachgewiesen, die auf bislang unterschätzte Zusammenhänge hindeuten. So wurde etwa nachgewiesen, daß die Blutplättchen- oder Thrombozyten-Typ (*p)*12S-LOX - wie die Prostaglandin H Synthasen - in der Lage ist, Xenobiotika mit Glutathion zu konjugieren (Kulkarni und Sajan, 1999).

Hydroperoxyfettsäuren, die primären Produkte der LOX-Reaktion, stellen Aktivatoren für die Initiation und die Unterhaltung dieser Enzymreaktion dar. Dies geschieht vermutlich über die Oxidation von Fe(II) zum Fe(III) in der enzymatisch aktiven Form. Hohe Konzentrationen der Hydroperoxyfettsäuren führen dagegen zu einer Inaktivierung der LOXn, die enzymspezifisch variiert. So konnte nachgewiesen werden, daß die h15-LOX-1 nach ein bis zwei Minuten inaktiviert wird, während *p*12S-LOX, m8-LOX und h15-LOX-2 für mehr als eine Stunde aktiv sein können (Hwang 1982; Fürstenberger et al., 1991; Hada et al., 1991).

Der Grad der Sequenzhomologie wird dazu benutzt, die Multigenfamilie der LOXn in vier Subfamilien zu unterteilen (Abb. 3). Die Subfamilie der 12S/15S-LOXn umfaßt vor allem die Vertreter der Leukozyten-Typ-Lipoxygenasen (*l*12S-LOXn), während die Thrombozyten-Typ 12S-LOXn (*p*12S-LOXn) zu einer eigenen Gruppe zusammengefaßt werden. Auch die 5S-LOXn bilden eine eigene Subfamilie. Eine weitere, vom Produktspektrum sehr inhomogene Subfamilie ist die der sogenannten Epidermis-Typ Lipoxygenasen. Ihnen ist gemeinsam, daß sie vorwiegend in epidermalen Geweben exprimiert werden. Mitglieder dieser Gruppe sind die 8S-LOX der Maus und der Ratte, die 15S-LOX-2 von Mensch und Rind sowie die 12R-LOX und die *e*LOX-3, die beide sowohl vom Menschen als auch von der Maus kloniert wurden. Auch die Epidermis-Typ 12S-LOX der Maus wird zu dieser Gruppe gerechnet, obwohl sie von ihrer Struktur her den 12S/15S-LOXn näher steht.

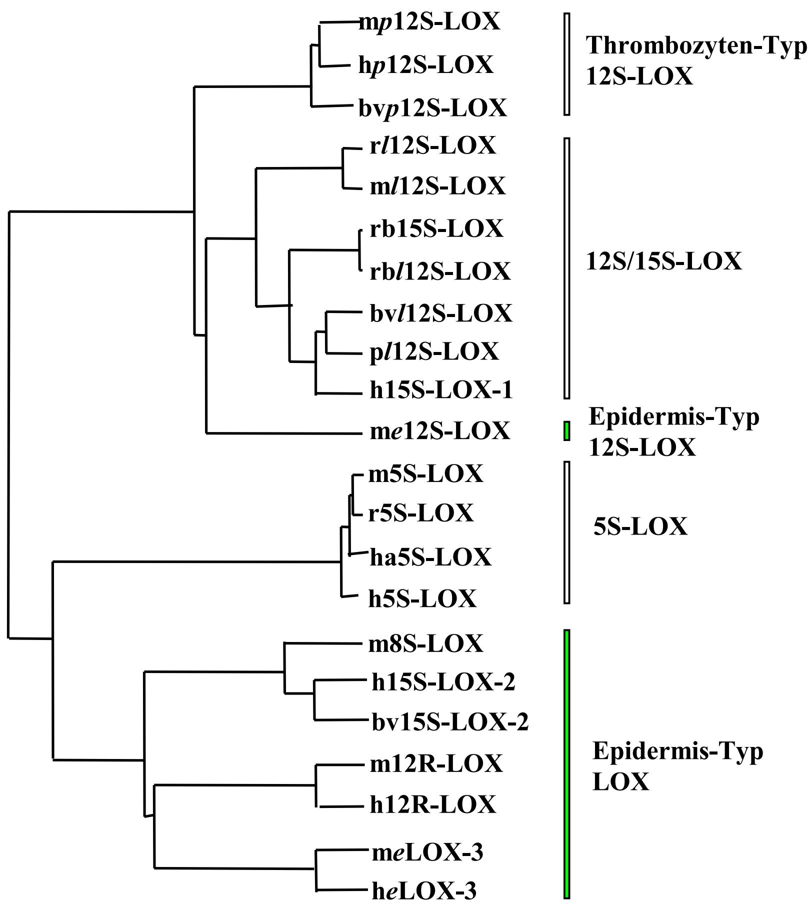


Abb. 3 Von der genomischen Sequenz abgeleiteter Stammbaum der Säuger-Lipoxygenasen bv=Rind; h=Mensch; m=Maus; p=Schwein; r=Ratte

2.1.1. Die Funktion von Lipoxygenasen

LOXn sind in Pflanzen Schlüsselenzyme bei der Herstellung von Aromastoffen, Phytoalexinen und anderen Signalstoffen aus Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure. Besonders hervorzuheben ist dabei die Bildung von Jasmon- und Traumatinsäure, die bei der Einleitung der Samenkeimung und in Streßsituationen benötigt werden (Siedow 1991). Auch bei Invertebraten wie Korallen, Schnecken, Seesternen und Seepocken sind LOX-Produkte wichtige Mediatoren bei Differenzierungs- oder Signalübertragungsvorgängen (Abe et al., 1995).

Über die genaue Funktion der Säuger-Lipoxygenasen ist weniger bekannt. Lediglich die Produkte der 5-Lipoxygenase-Reaktion, die Leukotriene und Lipoxine, sind als wichtige Mediatoren allergischer und inflammatorischer Reaktionen, insbesondere als potente Bronchokonstriktoren bei Asthma, schon seit längerem gut untersucht (Samuelson et al., 1987). Die freien HPETEn, die bei Lipoxygenase-Reaktionen gebildet werden, können selbst oder über die anschließend gebildeten HETEn an der Signaltranduktion beteiligt sein. Für 8S-HETE ist ein Einfluß auf die Genregulation durch Bindung an Transkriptionsfaktoren vom PPAR-Typ (Peroxisomen-Proliferator aktivierte Rezeptoren) nachgewiesen (Sohlenius et al., 1995; Muga et al., 2000a). Eine erhöhte Expression oder Aktivität der Lipoxygenasen und die Anhäufung von HETEn hat man mit Atherosklerose, Asthma und entzündlichen Darmerkrankungen in Zusammenhang gebracht. Ähnliche Beobachtungen bei Tumoren haben zu Hypothesen geführt, welche die LOXn mit Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung bringen. Eine Anhäufung von LOX-Produkten wurde auch bei Hauterkrankungen wie der Psoriasis entdeckt (Baer et al., 1994). Ein fehlgesteuerter Lipoxygenase-katalysierter Arachidonsäurestoffwechsel scheint also ein Merkmal zahlreicher Erkrankungen zu sein. Es muß geklärt werden, ob diese Fehlsteuerung eine Ursache oder eine Folge der Erkrankungen ist.

2.1.1.1. LOX, oxidativer Streß und Gentoxizität

Die LOXn katalysieren die Lipidperoxidation (LPO). Diese führt zu einer Umgestaltung von Membranen mit einer teilweisen Freisetzung von Membranbestandteilen, die als endogene Signale zahlreiche weitere Reaktionen hervorrufen können. Die LPO kann jedoch auch zerstörerische und nachteilige Wirkungen für den Organismus haben, da sie aggressive Radikale freisetzt. Entscheidend ist daher eine balancierte Regulation der LOX-Aktivität. Die positiven Wirkungen der LPO sind z. B. die Mobilisierung von Lipiden und die Bildung von Eicosanoiden als Mediatoren mit mittlerer Reichweite (Gewebshormone). Solche Reaktionen können ein wichtiger Beitrag zur Zellreifung sein, wie es während der Erythropoese beim LOX-vermittelten Abbau von Mitochondrien in den Retikulozyten der Fall ist. Die negativen Wirkungen dagegen sind eine Schädigung von Biomembranen und die Förderung von oxidativem Streß, der mit einem Verlust von antioxidativen Verbindungen einhergeht. Dies führt zu einer Störung zellulärer Funktionen. Eine Beteiligung des LOX-Stoffwechsels an der Bildung atherogener LDL (Low Density Lipoproteins) ist ebenfalls nachgewiesen worden (Kühn et al., 1994; Jostarndt et al., 2002).

Für die LOX-Metaboliten 12-HPETE, 12-HETE, 8-HPETE und 8-HETE sind klastogene Effekte in primären Keratinozytenkulturen gezeigt worden, und zwar bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich, wie sie auch im Gewebe gemessen wurden (Bürger et al., 1999). Unter Verwendung des Initiations-Promotions-Protokolls der Maushautkarzinogenese konnte die

Anhäufung von 8- und 12-HETE in den Tumoren mit dem gesteigerten Anteil an promutagenen Ethenoaddukten in der DNA korreliert werden (Nair et al., 2000).

2.1.2. Epidermale 12-Lipoxygenasen

In keinem anderen Gewebe wird eine solch große Anzahl verschiedener LOXn exprimiert wie in der Epidermis. Die Subfamilie der Epidermis-Typ Lipoxygenasen stellt deshalb eine große und erst seit kurzem bekannte Gruppe dar (Abb. 3). Die epidermalen LOXn werden differenzierungsspezifisch in unterschiedlichen Schichten des Epithels exprimiert. Daher wird eine kurze Beschreibung der Hautstruktur vorangestellt.

2.1.2.1. Die Epidermis

Die Epidermis ist die oberste Hautschicht (Oberhaut) und bildet damit die letzte Barriere des menschlichen Körpers zur Außenwelt. Von der Dermis (Lederhaut) und der Subcutis (Unterhaut mit Fettgewebe) wird die Haut nach unten abgeschlossen. Die Epidermis ist ein sich ständig erneuerndes Gewebe, das hauptsächlich von Keratinozyten gebildet wird. Die unten gelegene Basalzellschicht (Stratum basale) proliferiert und die dabei entstehenden Zellen wandern nach oben (Abb. 4). Dabei findet eine terminale Differenzierung statt, bei dem die Zellen zu toten Hautschuppen umgewandelt werden, welche die Hornschicht (Stratum corneum) bilden. Dort werden sie abgeschilfert.

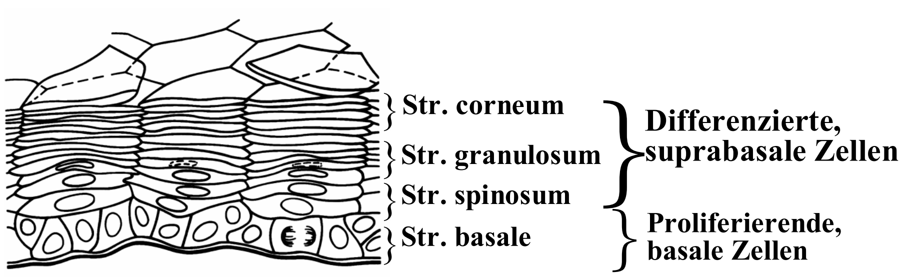


Abb. 4 Schematischer Aufbau der Epidermis (Str. = Stratum)

In allen Schichten der Epidermis kann die Expression von LOX-Isoenzymen nachgewiesen werden.

2.1.2.2. Die 12R-Lipoxygenase

Die 12R-Lipoxygenase gehört zur Gruppe der epidermalen Lipoxygenasen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Lipoxygenasen liegt das Produkt der von ihr katalysierten Reaktion, 12-HETE, in der R-Konfiguration vor. Bisher wurden eine 12R-Lipoxygenase aus der menschlichen Haut (Boeglin et al., 1998) und eine aus der Maushaut kloniert (Krieg et al., 1999).
Beim Menschen akkumuliert 12R-HETE in psoriatischen Hautschuppen und bei anderen hyperproliferativen Dermatosen (Baer et al., 1991; Baer et al., 1995). Jüngste Untersuchungen haben außerdem nachgewiesen, daß es eine Korrelation zwischen inaktivierenden Mutationen im Gen der 12R-LOX (*ALOX12B*) und familiären Ichthyosen gibt (Jobard et al., 2002).
Die 12R-LOX ist mit 701 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 80,58 kDa größer als die meisten anderen Säugetier-LOXn. Sie weist als Besonderheit eine zusätzliche prolinreiche Domäne auf, die 31 Aminosäuren umfaßt und deren Funktion noch unbekannt ist. Um die räumliche Struktur des Proteins zu untersuchen, wurden Molecular-Modelling-Verfahren angewendet, die auf Basis der einzigen bisher publizierten Röntgenstrukturanalyse einer LOX, nämlich der der 15S-LOX des Kaninchens, arbeiten. Danach ist die Extradomäne nicht in die globuläre Struktur des LOX-Proteins integriert, sondern liegt als eine Art flexibles Segel am Eingang der Substratbindungstasche vor. Das Gen, aus dem eine cDNA von 2347 Nukleotiden gebildet wird, hat eine Größe von 12,5 kb. Die cDNA schließt einen 5`-nichtkodierenden Bereich von 175 bp und eine 3`-untranslatierte Region von 98 bp ein. Der offene Leserahmen ist somit 2107 Nukleotide lang.
Die mRNA-Expression der 12R-LOX in NMRI-Mäusen ist vor allem in Epidermis und Vormagen und darüberhinaus in Trachea, Zunge und Leber festzustellen. Die Expression ist in neonataler Epidermis auf die suprabasalen Schichten beschränkt, in adulter Epidermis aber auch in Basalzellen nachweisbar (Heidt et al., 2000). Auch in chronisch-hyperplastischer Epidermis von NMRI-Mäusen wird 12R-LOX-mRNA exprimiert, während es nur bei einem Teil der Papillome und Karzinome nachweisbar ist, die durch Initiation und Promotion in der Haut erzeugt worden sind (Heidt, 1999). Rekombinante 12R-LOX der Maus zeigt eine schwache enzymatische Aktivität mit Arachidonsäuremethylester, aber nicht mit Arachidonsäure als Substrat. Die physiologischen Substrate sind noch unbekannt.

2.1.2.3. Die Epidermis-Typ 12S-Lipoxygenase (*e*12S-LOX)

Ein weiterer Vertreter der epidermalen Lipoxygenasen ist die Epidermis-Typ 12S-Lipoxygenase (*e*12S-LOX) der Maushaut (van Dijk et al., 1995; Funk et al., 1996; Kinzig et al., 1997). Beim Menschen ist ein orthologes transkribiertes Pseudogen bekannt.
*e*12S-LOX weist *in vitro* nur eine schwache Enzymaktivität auf. Die Transkription von *e*12S-LOX findet in der Epidermis und in Thrombozyten statt. Sie unterscheidet sich von den anderen LOX-Isoenzymen dadurch, daß ihre mRNA am stärksten in der basalen Zellschicht der Epidermis vorhanden ist. Die mRNA-Expression wird als Reaktion auf eine TPA-Behandlung kurzfristig erhöht und nach 12 h vollständig abgeschaltet. Die mRNA ist in chronisch-hyperplastischer Epidermis noch nachweisbar, in Papillomen und Karzinomen, die nach dem Initiations-Promotions-Protokoll erzeugt wurden, findet keine nachweisbare Transkription mehr statt (Heidt 1999; Heidt et al., 2000).

2.2. Methoden zur Ermittlung der LOX-Funktion

Für die Analyse der Funktion von LOXn im Säuger können unterschiedliche experimentelle Verfahren angewendet werden. Zunächst können Tiermodelle etabliert werden, die LOX-Isoenzyme überexprimieren oder bei denen die genetische Information zur Herstellung eines LOX-Isoenzyms unbrauchbar gemacht wurde (Knockout). Dieses Verfahren wird mit dem Schwerpunkt auf eine steuerbare, also konditionale Variante des Knockouts in 2.2.3 genauer beschrieben.
Die Überexpression in der Zellkultur ist ebenfalls eine vielfach angewandte Methode, die meist mittels Transfektion entsprechender cDNA-Konstrukte erzielt wird. In organotypische Kulturen kann die Auswirkung einer gezielten Überexpression auf die Struktur oder Homöostase der Modellgewebe untersucht werden. Um die Kompensation einer Überexpression zu vermeiden und auszuschließen, daß die LOX-Expression zur negativen Selektion beiträgt, können induzierbare Systeme wie das Tet on/off-System verwendet werden.
Der Knockout-Technik entspricht in der Zellkultur das Abfangen von mRNA-Kopien mit Antisense-Proben oder die Hemmung der Enzymfunktion mittels spezifischer Inhibitoren. Die Effekte der Reaktionsprodukte können ergänzend in Zellkultursystemen erforscht werden. Die

meisten der genannten Techniken werden in der vorliegenden Arbeit angewandt. In den folgenden Kapiteln wird auf Einzelheiten einiger Verfahren eingegangen.

2.2.1. Das Tet on/off-System

Für viele Anwendungen ist eine regulierbare Gen-Expression erwünscht. In allen Fällen, in denen die (abschaltbare) Expression toxischer Genprodukte in stabil transfizierten Zellinien und/oder die Möglichkeit der quantitativen Regulation der Gen-Expession benötigt wird, kommen regulierbare Systeme zum Einsatz. Systeme, die auf eukaryontischen Regulationselementen basieren, sind für manche Einsatzzwecke weniger geeignet. So ist die Induktion oftmals unspezifisch und die Expressionsstärke kann nur schlecht reguliert werden. Fast alle Systeme weisen eine (schwache) Expression auch im „abgeschalteten" Zustand auf. Zu den eukaryontischen Systemen gehört z.B. das Ecdyson-System aus *Drosophila* (Christopherson et al., 1992). Weiterhin gibt es Systeme, die auf der Ebene des Proteins reguliert werden. Weit verbreitet sind Hormon-aktivierbare Fusionsproteine, die z.B. eine modifizierte Estrogen-Rezeptor-Domäne benutzen, deren Konformationsänderung mit Hydroxytamoxifen induziert werden kann und zu einer Aktivierung des Fusionsproteins führt (Mattioni et al., 1994). Dagegen kommen bei Tet-Expressionssystemen (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) heterologe bakterielle Regulationselemente zum Einsatz, die in eukaryontischen Zellen nicht existieren. Das System basiert auf zwei Regulationselementen, die vom Tetrazyklin (Tet)-Resistenz Operon des *E. coli* Tn10 Transposons abgeleitet sind, dem Tet Repressor-Protein (TetR) und der Tet Operator-Sequenz (tetO), an die TetR bindet (Abb. 5).

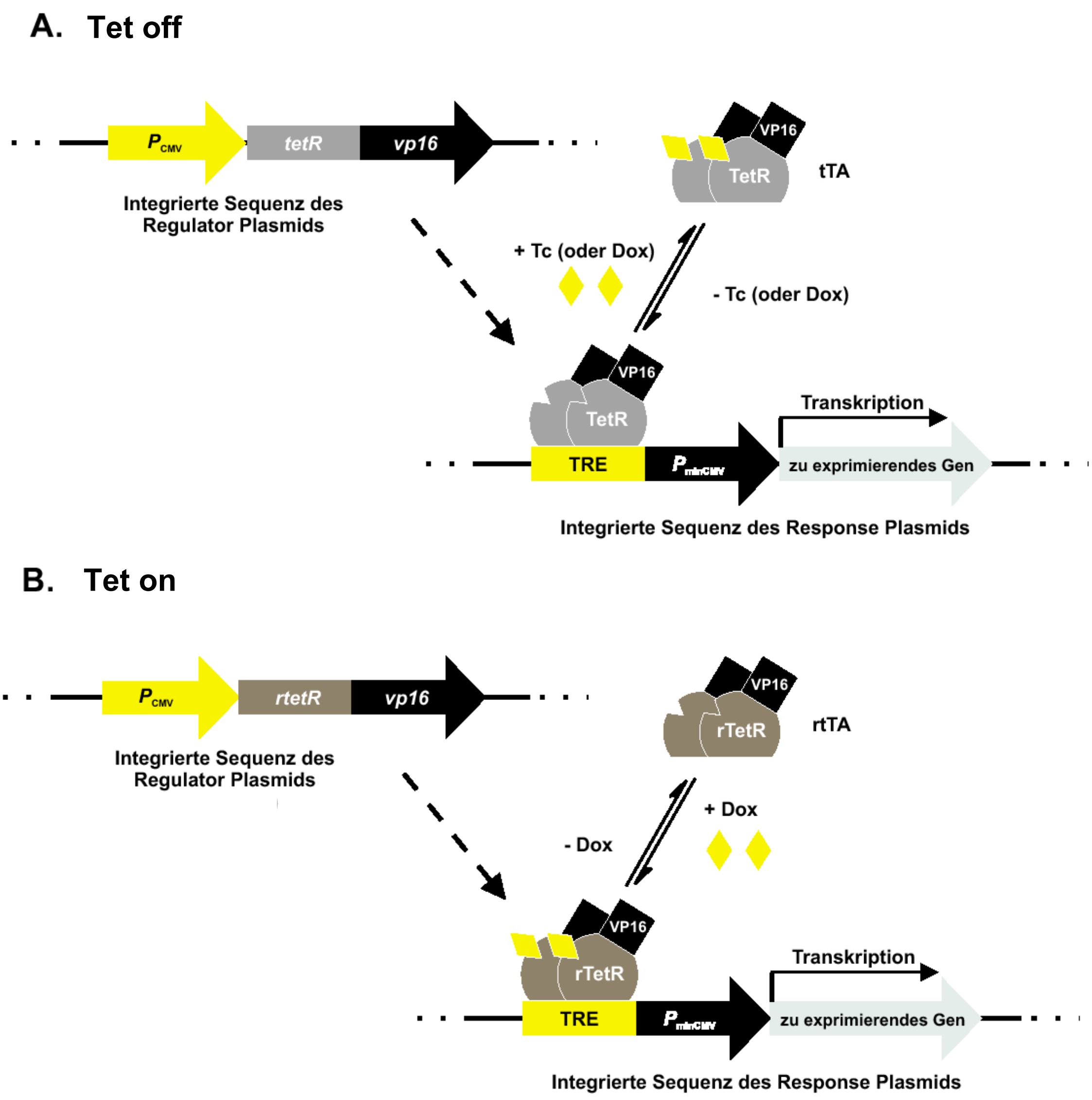


Abb. 5 Schematische Darstellung des Tet off- (A.) und des Tet on - Systems (B.)
rTetR=reverser Tet-Repressor; rtTA=reverser Tet-gesteuerter Transkriptionsaktivator; TetR=Tet-Repressor; TRE=Tet-responsives Element; tTA=Tet-gesteuerter Transkriptionsaktivator; VP16=Aktivierungsdomäne aus dem Herpes-simplex-Virus

Das zu exprimierende Gen wird in ein „Response“-Plasmid stromabwärts eines CMV-Minimalpromotors (P_{minCMV}) kloniert, der mit einem Tet-responsiven Element (TRE) verknüpft ist. Mit Hilfe des zweiten Plasmids (dem „Regulator“) wird ein Hybridprotein exprimiert, der Tet-gesteuerte Transkriptionsaktivator (tTA). Dieses Fusionsprotein besteht aus dem Wildtyp TetR und der VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes-simplex-Virus. In Abwesenheit von Tetrazyklin oder seinem Analogon Doxyzyklin (Dox) bindet das tTA Protein an das Tet-responsive Element und aktiviert damit die Transkription. Sobald Tetrazyklin oder

Doxyzyklin dem Kulturmedium zugesetzt wird, erfolgt die Abschaltung der Transkription in dosisabhängiger Weise, man spricht daher vom Tet off-System.
Mit Hilfe von vier Aminosäureaustauschen im Wildtyp TetR entsteht das „reverse“ TetR (rTetR), das die Transkription in Anwesenheit von Doxyzyklin oder Tetrazyklin aktiviert. Diese Variante wird Tet on-System genannt. Beide Systeme erlauben eine stringente Kontrolle der Gen-Expression, eine dosisabhängige Regulierung der Induktion und eine starke Expression bei voller Induktion.

2.2.2. Retrovirale Gentransfer-Systeme

Retroviren sind neben Adenoviren die am häufigsten als Gentransfersystem eingesetzten Viren. Grundlage der meisten retroviralen Systeme ist das Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV), in letzter Zeit kommen aber auch vermehrt lentivirale Systeme auf der Basis des Human Immunodeficiency Virus (HIV) zum Einsatz, die im Gegensatz zu anderen Retroviren den Gentransfer in ruhende Zellen erlauben (Gallay et al., 1995). Retroviren sind (+)-Strang-RNA Viren, deren Replikationszyklus zwei Besonderheiten aufweist (Temin, 1985):

- Nach Eindringen des Virus in die Zielzelle wird das virale RNA-Genom in DNA umgeschrieben, also revers transkribiert. Hierbei findet eine Verdoppelung der Steuersequenzen am 5'- und 3'-Ende statt, so daß die Strukturgene im entstandenen DNA-Intermediat (dem sogenannten Provirus) von identischen Sequenzen, den Long Terminal Repeats (LTR), flankiert sind.
- Das nach der reversen Transkription vorliegende doppelsträngige DNA-Intermediat integriert stabil in das Genom der Wirtszelle.

Die Transkription des Provirus, die im 5' LTR initiiert und im 3' LTR beendet wird, führt zur Bildung der viralen mRNAs und der genomischen RNA, d. h. die LTRs enthalten die für die Transkription notwendigen Signale. Nach Translation der mRNAs kommt es zur Verpackung der genomischen RNA in das reifende Nucleocapsid. Das Vorläufer-Hüllprotein *env* enthält ein Signalpeptid, das dem Transport ins endoplasmatische Retikulum dient. Nach Abspaltung des Signalpeptids und Prozessierung erfolgt der Export zur Zellmembran, in der die Hüllproteine über eine carboxyterminale hydrophobe Sequenz verankert werden. Nach Interaktion der *env*-Proteine mit Proteinen des Nucleocapsids kommt es zur Abschnürung kompletter Virus-

Partikel. Für den Einsatz als Gentransfersystem bestehen bei Retroviren mehr Anpassungs- und Modifikationsmöglichkeiten als bei anderen viralen Gentransfer-Systemen. In diesem Zusammenhang zu nennen sind:

- Die retroviralen Strukturgene und das retrovirale Genom können als voneinander unabhängige Einheiten behandelt werden. Als retrovirales Genom kann hierbei jede Sequenz dienen, die die Steuerelemente für die Verpackung, Expression und Integration in der richtigen Anordnung beinhaltet. Die Anwesenheit retroviraler Strukturgene ist nicht notwendig, stattdessen kann jedes gewünschte Gen eingesetzt werden, wobei lediglich eine Größengrenze von ca. 8 kb zu beachten ist.
- Werden die retroviralen Strukturgene in geeigneten Zellen zur Expression gebracht (den sog. Verpackungszellen) und diese Zellen zusätzlich mit einem rekombinanten retroviralen Genom ausgestattet, so kommt es zur Bildung von Retroviren. Das Genom kann also als *trans*–Element beigesteuert werden.
- Da für die Expression der Strukturgene das Verpackungssignal nicht notwendig ist, kann durch seine Deletion die Bildung replikationskompetenter Viruspartikel bei gleichzeitiger Expression der Strukturgene verhindert werden. Rekombinante Zellinien (sog. Verpackungszellinien) tragen das entsprechend deletierte Retrovirus-Genom und sind daher in der Lage, alle retroviralen Proteine, aber keine Viruspartikel zu bilden. Die Verpackungszellinie wird nun mit einem Plasmid transfiziert, das auf cDNA-Ebene die Information für eine verpackungsfähige RNA besitzt, die jedoch keine Information mehr für virale Proteine trägt. Statt dessen enthält sie ein Fremdgen (z. B. einen Selektionsmarker), das unter der Kontrolle eines starken Promotors steht. Nach Transfektion wird die cDNA in RNA umgeschrieben, so daß retrovirale Partikel gebildet werden, die „infektiös“ aber replikationsdefizient sind. Solche Viruspartikel können ihr Genom „nur“ noch stabil auf Zielzellen übertragen, eine Virusvermehrung kann in den Zielzellen aufgrund der fehlenden Strukturgene nicht stattfinden. Daher spricht man in diesem Zusammenhang von Transduktion und nicht mehr von Infektion. Dies bildet die Voraussetzung für einen sicheren Umgang im Labor und eine niedrigere Sicherheitseinstufung. Mit diesen rekombinanten Retroviren können nun geeignete Zielzellen transduziert werden, wobei der Erfolg der Transduktion über die Expression des Selektionsmarkers kontrolliert werden kann.
- Das ursprüngliche Hüllprotein des Retrovirus kann durch heterologe Hüllproteine ersetzt werden, womit die Spezifität für Zielzellen verändert werden kann.

2.2.3. Herstellung von gentechnisch veränderten Tieren

Bei gentechnisch veränderten Tieren wird ein Protein durch die Wahl des Promotors mit einer veränderten Stärke oder Gewebsspezifität exprimiert. Desweiteren ist es möglich, das betreffende Gen abzuschalten oder das Genprodukt zu mutieren bzw. funktionsunfähig zu machen. Dieser sogenannte Knockout (k.o.) kann systemisch oder entwicklungs- bzw. gewebsspezifisch, d.h. konditional, durchgeführt werden.

2.2.3.1. Gen-Targeting und Herstellung von Knockout-Mäusen

Gen-Targeting ist die sequenzspezifische Modifikation des Genoms durch homologe Rekombination, bei der ein spezifisches DNA-Segment gerichtet gegen ein anderes ausgetauscht wird. Die homologe Rekombination mit fremder DNA ist ein seltener Vorgang und bleibt in ihrer Häufigkeit noch weit hinter der örtlich zufälligen Integration zurück.

Gen-Targeting durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen wurde 1987 erstmals publiziert (Thomas und Carpecchi, 1987). Dieser experimentelle Ansatzpunkt wird seither bei vielen verschiedenen Fragestellungen angewendet, die die Funktionsanalyse von Proteinen *in vivo* betreffen.

Pluripotente embryonale Stammzellinien (ES-Zellinien) erlauben die Identifizierung und Selektion der rekombinanten Klone. Sie können anschließend zu allen Geweben inklusive Keimbahnzellen differenzieren. Die ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen und können in Kultur in einem nichtdifferenzierten Zustand gehalten werden. Dazu sind differenzierungshemmende Faktoren nötig, die zum Beispiel von mitotisch inaktiven Feeder-Zellen abgegeben werden, die aus neomycinresistenten Mäuseembryonen (Tag 13,5) unter anschließender Bestrahlung gewonnen werden. Durch die Bestrahlung bleiben die Feeder-Zellen lebensfähig, können sich aber nicht mehr vermehren. Diese Feeder-Zellen bilden als konfluenter Zellrasen die Matrix, auf der die ES-Zellen wachsen. Als zusätzlicher Hemmstoff der Differenzierung oder als Alternative zu den Feeder-Zellen kann der Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) dienen (Deussing et al., 1997). Die ES-Zellen werden mit dem Targeting-Konstrukt mittels Elektroporation transfiziert und dann unter Selektionsbedingungen (meist Neomycin) kultiviert.

Nach Charakterisierung der erhaltenen Klone werden diese in einen frühen Embryo im Blastozystenstadium injiziert, der von einer scheinschwangeren Amme ausgetragen wird. Das führt zu chimär transgenen Tieren (Abb. 6), aus denen durch Züchtung eine homozygote Linie etabliert werden kann, falls die transgene Veränderung auch in der Keimbahn vorhanden ist (Torres und Kühn, 1997).

Eine geeignete Nachweismethode für die Keimbahntransmission ist die Kreuzung mit Mäusen, die eine andere Fellfarbe haben (z.B. schwarze C57Bl/6) als diejenigen, von denen die ES-Zellen abgeleitet wurden (meist Mausstamm 129, agouti). Auch als Spender der Blastozysten werden schwarze C57Bl/6 ausgewählt. Chimäre Tiere, deren Nachkommen wiederum agouti sind, werden bei dieser Vorgehensweise zur Züchtung einer in allen Zellen homozygot transgenen Mauslinie verwendet.

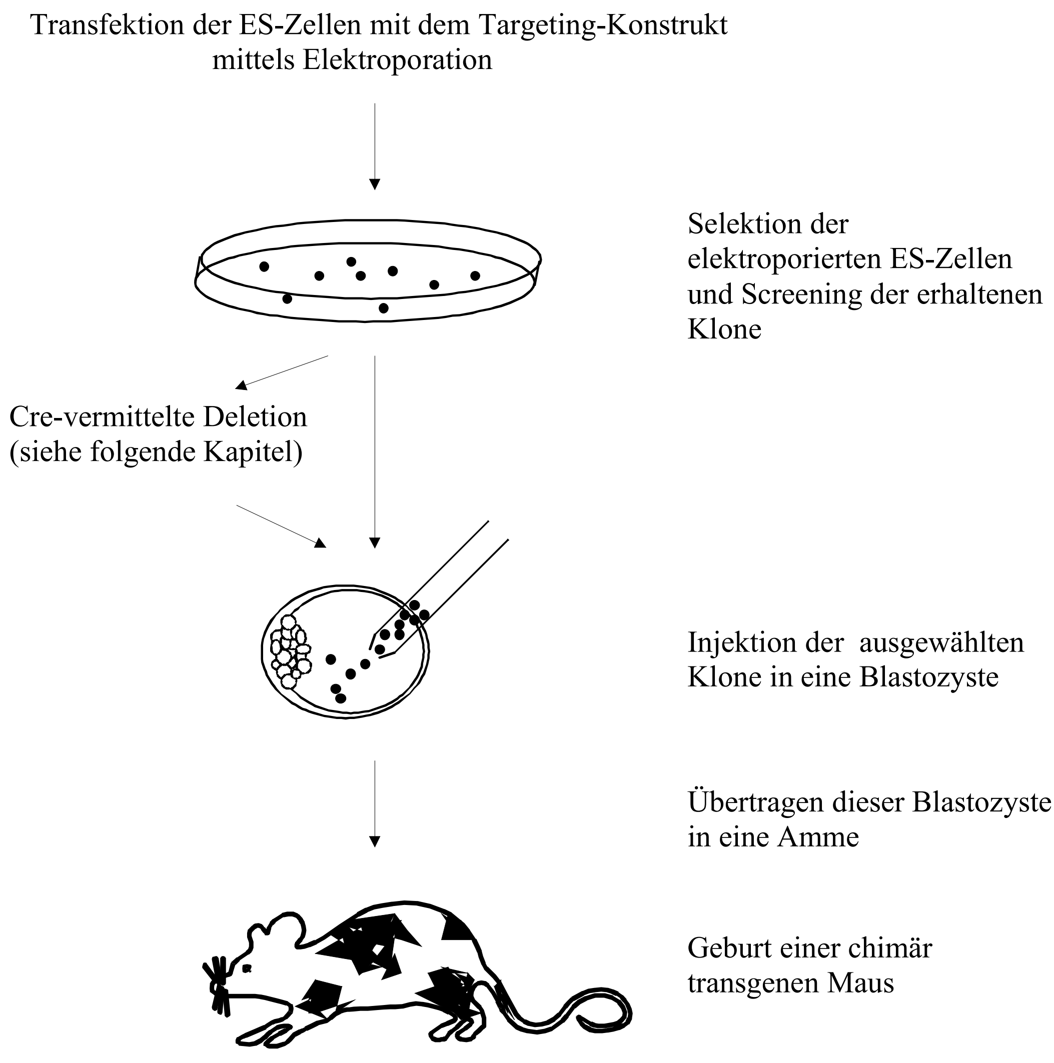


Abb. 6 Generierung chimär transgener Tiere aus transfizierten ES-Zell-Klonen

Außer der Blastozysteninjektion gibt es weitere Methoden, die dem Einbringen von ES-Zellen in einen Zellverband dienen, der sich bis zum adulten Tier entwickeln kann. Dazu wird ein

Embryo im Achtzell-Stadium (Morula) von der Glykoproteinhülle (Zona pellucida) befreit und mit ES-Zellen kokultiviert. Enstehende Blastozysten werden in Ammen implantiert. Die Generierung von nicht-chimären Mäusen, die ganz von ES-Zellen abgeleitet sind, ist für die routinemäßige Durchführung entweder noch nicht effizient genug (Nagy et al., 1993) oder wird gerade erst vermarktet (Eggan et al., 2002).

2.2.3.2. Aufbau von Targeting-Vektoren

Für das Gen-Targeting werden Vektoren konstruiert, die aus einer Homologie-Sequenz und einem Selektionsmarker bestehen. Unabhängig davon, ob das genetische Material in das Genom zusätzlich eingefügt werden soll oder einen Teil des Genoms ersetzen soll, liegt am Ende der Selektionsmarker am Genlocus der Zielsequenz vor. Das Vorhandensein des Markers, der aus der kompletten cDNA und zumeist einem eigenen Promotor besteht, kann zu Störungen bei der Transkription des betreffenden Gens oder auch benachbarter Gene führen. Deshalb werden vermehrt Varianten dieser Strategie entwickelt, um den Selektionsmarker wieder zu entfernen (Torres und Kühn, 1997).

Ein typischer Targeting-Vektor besteht aus zwei Homologiesequenzen, die zusammen etwa 4-10 kb groß sind. Theoretisch nähme die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination mit der Größe der Homologiesequenz zu. Die Größe ist aber aus praktischen Gründen wie der Vermehrbarkeit in Bakterien, dem Vorhandensein von Klonierungsenzymen und der mangelnden Kenntnis der benachbarten Sequenzen begrenzt. Die beiden Homologiesequenzen werden unterbrochen von einem Markergen für die Positivselektion, das entweder in ein Exon in der Homologiesequenz eingeschoben wurde oder eines oder mehrere Exons ersetzt. Für die spätere Analyse der rekombinanten ES-Zell-Klone mittels PCR sollte ein Arm der Homologiesequenz kürzer gehalten werden. Die Positivselektion erleichtert die Suche nach stabil transfizierten ES-Klonen. Aufgrund der geringen Häufigkeit einer homologen Rekombination (etwa 10^{-4}) ist dies der kritische Schritt eines solchen Experiments. Meist wird die Neomycin-Resistenz für die Positivselektion verwendet. Die Neomycin-Resistenz (neo^R) kodiert für eine bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase. Sie erlaubt das Screening mit Geneticin (G418), das bei Abwesenheit dieser Phosophotransferase als Inhibitor der Aminoglykosid-Synthese wirkt (Torres und Kühn, 1997).

Ein HSV-tk-Gen am Ende des langen Armes kann der negativen Selektion dienen. Die Herpes-simplex-Virus Thymidin-Kinase (HSV-tk) verwandelt das nicht-toxische Guanidin-Analog Gancyclovir oder das Uracilderivat FIAU zu toxischen Metaboliten. Diese stören den

DNA-Metabolismus und führen zum Tod der Zelle. Bei einer zufälligen Integration des Konstruktes ohne homologe Rekombination würde das tk-Gen erhalten bleiben und die betreffenden Klone sensitiv gegenüber Gancyclovir machen (GANC-Selektion). Die Negativselektion erhöht die Anzahl der homologen Rekombinanten gegenüber zufälligen Integrationen um das 3-10fache, so daß der Anteil dieser Klone auf 2,5-10 % steigt (Torres und Kühn, 1997). Andere Autoren beziffern den Anreicherungsfaktor mit 2-2000 (Deussing et al., 1997). Alternativ oder zusätzlich zum tk-Gen kann auch das Diphterietoxin A (DTA)-Gen verwendet werden, dessen toxisches Genprodukt eine externe Gabe von Toxinen in das Kulturmedium unnötig macht.

2.2.4. <u>Konditionaler Knockout und das Cre/loxP-Rekombinationssystem</u>

Konditionales Gen-Targeting ist auf bestimmte Zelltypen oder Entwicklungsstadien begrenzt. Der meistbenutzte Ansatz für einen konditionalen Knockout beruht auf dem Cre/loxP-Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1. Dieses Verfahren verwendet die Rekombinase Cre und ihre Erkennungssequenzen loxP. In den Targeting-Vektor werden meist drei der loxP-Sequenzen eingebracht, mit deren Hilfe gezielte Deletionen durchgeführt werden können.

Die loxP-Sequenzen und die Resistenzkassette dürfen die Funktionalität des Genproduktes nicht beeinträchtigen und werden deshalb in Introns „versteckt". Daher muß bei der Klonierung des Targeting-Konstrukts und der Charakterisierung der homologen Rekombination penibler vorgegangen werden als bei einem konventionellen Knockout. Nach der homologen Rekombination sind noch zwei weitere Rekombinationsschritte notwendig. Die erste dieser Cre-vermittelten Deletionen findet noch in den ES-Zellen statt, indem mit einem Cre-Expressionsvektor transfiziert wird. Die Rekombinase entfernt die Resistenzkassette und hinterläßt das Gen in einem funktionellen Zustand – jedoch mit zwei in Introns versteckten loxP-Sequenzen, die für die Funktion des Gens essentielle Sequenzen flankieren. Dies kann das Startcodon sein oder ein Exon, das für die katalytische Domäne des Genprodukts kodiert. Aus diesen ES-Zellen wird dann eine Mauslinie hergestellt, die diese loxP-Sequenzen in einem funktionsfähigen Gen trägt. Wird in dieser Mauslinie erneut die Rekombinase Cre exprimiert, führt die daraufhin stattfindende Deletion zur Inaktivierung des Gens, dem eigentlichen Knockout. Die Cre-Expression wird meist durch Kreuzung mit einer anderen Mauslinie erzeugt, die Cre unter der Kontrolle eines differenzierungs- oder entwicklungsspezifischen Promotors oder eines induzierbaren Systems bildet. Man kann damit Zeitpunkt und Ort des Knockouts vorgeben, also konditional gestalten. Seltener werden topische Applikationen oder Virus-vermittelte Expressionen von Cre verwendet. Es wurde festgestellt, daß die Deletionseffizienz durch die Rekombinase Cre zwischen 5 und 100% variiert. Die Effizienz hängt von Selektionsphänomenen durch eine nachteilige Wirkung der Deletion, vor allem aber von den Eigenschaften der Cre-exprimierenden Mauslinie ab (Torres und Kühn, 1997).

Das Cre/loxP-Verfahren wird eingesetzt, um die letalen oder stark schädigenden Einflüsse des konstitutiven Knockouts durch einen entwicklungsspezifischen Promotor zu umgehen. Mit einem solchen oder einem induzierbaren Promotor ist es auch möglich, die Adaption des Organismus an einen Knockout zu vermindern. Die Adaption verhindert oft das Auftreten eines Phänotyps oder das Erkennen subtiler Störungen (Gödecke et al., 1999). Gleichzeitig kann bei Verwendung dieser Technik auch der Selektionsmarker wieder entfernt werden, um sekundäre Effekte auf benachbarte Gene zu minimieren.

2.2.4.1. Komponenten desCre/loxP-Rekombinationssytems

Die Rekombinase Cre schneidet an sogenannten loxP-Sequenzen (Cre steht für „causes recombination“, loxP bedeutet „location of cross-over in bacteriophage P1“). Diese Erkennungssequenzen werden von 34 Basen gebildet, die aus zwei inversen Wiederholungen einer 13 bp-Sequenz und einem 8 bp Spacer aufgebaut sind (Abb. 7). Die Orientierung des Spacers legt die Orientierung der loxP-Sequenz fest.

Nach der Cre-vermittelten Rekombination bleibt eine der beiden loxP-Sequenzen erhalten. Der Schnitt findet in der Spacer-Region statt und erzeugt 3‘-überhängende Enden. Dazu bindet Cre nach Spaltung der Phosphodiesterbrücke kovalent an einen 3‘-Phosphat-Rest. Eine solche kovalente Bindung ist auch bei anderen Topoisomerasen zu finden, die eine sequenzspezifische Rekombination durchführen können (Hoess und Abremski, 1985). Jede der inversen Wiederholungen und 4 bp des Spacers dienen als Bindungsstelle für Cre (Abremski et al., 1984).

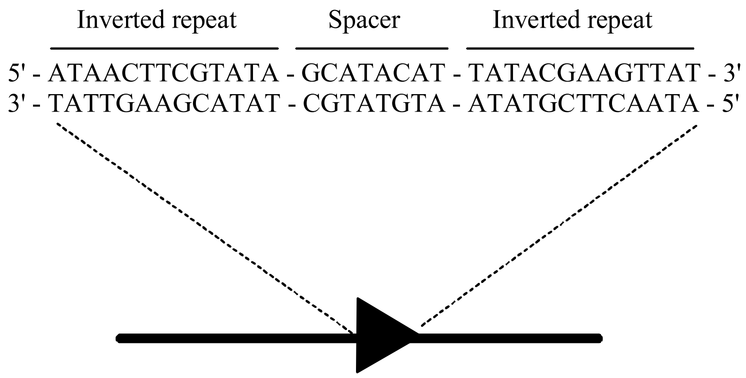


Abb. 7 Struktur einer loxP-Sequenz
Die 34 bp-Sequenz wird durch das schwarze Dreieck symbolisiert, das zugleich die Orientierung des Spacers zeigt.

Grundlegende Arbeiten und das Postulat der beiden essentiellen Faktoren Cre und loxP stammen aus den 80er Jahren (Sternberg und Hamilton, 1981; Hoess und Abremski, 1985). Eine zelltypspezifische Cre-Expression wurde erstmals 1992 publiziert (Lakso et al., 1992). Die konditionale Inaktivierung eines endogenen Gens, der DNA-Polymerase β, wurde zwei Jahre später veröffentlicht (Gu et al., 1994).

2.2.4.2. Homologe und Cre-vermittelte Rekombination

Der erste Schritt bei Verwendung des Cre-loxP-Systems entspricht dem herkömmlichen Verfahren: der Targeting-Vektor wird durch Elektroporation in die ES-Zellen eingeführt und soll dort durch homologe Rekombination mit Hilfe der Homologiesequenzen integrieren.
Vektoren für das Cre/loxP-System tragen mindestens zwei loxP-Sequenzen, die das Resistenzgen flankieren. Auf diese Weise kann die Resistenzkassette in einem zweiten Schritt durch Cre-vermittelte Rekombination wieder entfernt werden. Eine von loxP-Sequenzen flankierte Resistenzgenkassette bezeichnet man auch als „gefloxt“. Die loxP-Sequenzen müssen dabei dieselbe Orientierung haben. Ist die Orientierung von zwei loxP-Sequenzen entgegengesetzt, so kommt es zu einer Inversion des flankierten DNA-Segmentes, liegen sie auf zwei verschiedenen Strängen, so kommt es zu einer Translokation (Torres und Kühn, 1997). Werden mehr als zwei loxP-Stellen eingeführt, so stehen dem Experimentator mehr Möglichkeiten offen. Er kann in diesem Falle nach der homologen Rekombination den Gen-Knockout auch konditional gestalten – abhängig davon, welche Klone er nach der Cre-vermittelten Deletion auswählt.
An die homologe Rekombination schließen sich Cre-vermittelte Deletionen an, die mechanistisch gesehen auch Rekombinationen darstellen. Für die Entfernung der Resistenzkassette

und den anschließenden konstitutiven oder konditionalen Knockout sind drei loxP-Stellen nötig. Zwei davon flankieren den Selektionsmarker, während zwischen dieser Resistenzgenkassette und der dritten loxP-Sequenz der Teil des Gens liegen soll, der durch Entfernen den gewünschten Knockout verursacht. Der Kotransfer aller loxP-Sequenzen durch homologe Rekombination wird bei zunehmendem Abstand unwahrscheinlicher, so daß die Distanz nicht mehr als 7-10 kb betragen sollte.

Nachdem das Targeting-Konstrukt über homologe Rekombination in die ES-Zellen eingebracht wurde und Rekombinanten selektioniert und überprüft wurden, wird einer der homolog rekombinierten Klone mit einem Cre-Expressionskonstrukt transfiziert. Diese transiente Transfektion hat eine Effizienz von etwa 10 %, wobei nur bei etwa der Hälfte der Transfektanten eine Deletion des gefloxten DNA-Abschnittes zu beobachten ist (Torres und Kühn, 1997). Bei diesem zweiten Rekombinationsschritt entstehen bei drei vorhandenen loxP-Sequenzen auch drei Deletionen (Abb. 8).

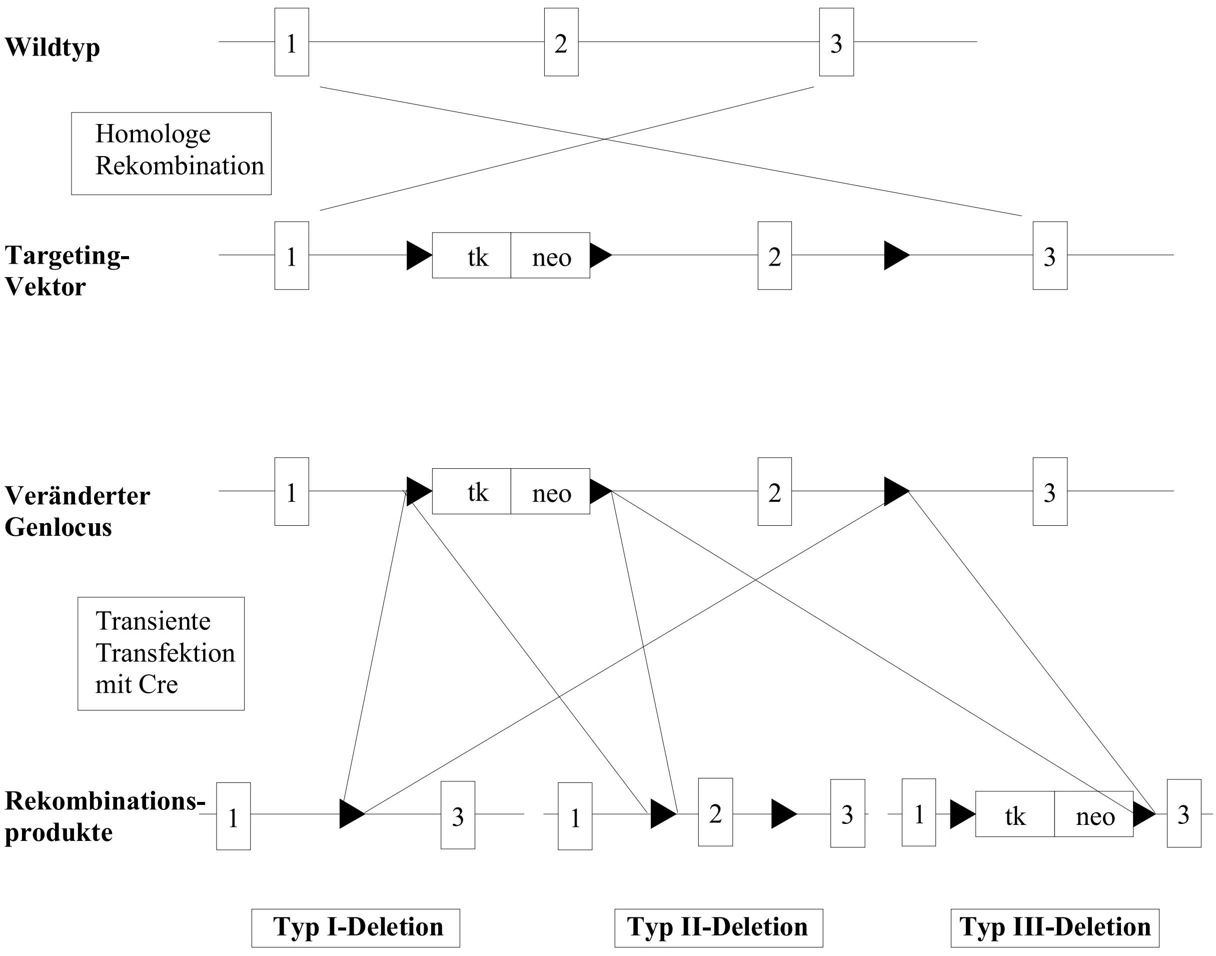


Abb. 8 Deletionen in ES-Zellen nach transienter Transfektion mit Cre-Rekombinase
Die schwarzen Dreiecke symbolisieren die loxP-Sequenzen (vgl. Abb. 7)

Eine ist das Produkt einer Rekombination zwischen den äußeren loxP-Sequenzen (Typ I- Deletion). Dabei wird der Selektionsmarker zusammen mit der Homologiesequenz deletiert. Diese Klone können für die Etablierung einer konstitutiven Knockout-Linie benutzt werden.
Die Deletion des Selektionsmarkers tritt bei einer Rekombination zwischen den ihn flankierenden loxP-Sequenzen auf (Typ II-Deletion). ES-Zell-Klone mit einer Typ II-Deletion können für die Produktion einer Mauslinie verwendet werden, die das gefloxte Allel enthält und dadurch eine konditionale Geninaktivierung *in vivo* erlaubt. Die Effizienz dieser zweiten Rekombination *in vivo* nimmt bei zunehmendem Abstand der loxP-Sequenzen ab. Abstände von 1,5 – 3,5 kb vermindern die Effizienz jedoch nicht wesentlich.
Die Deletion der Homologiesequenz bei Erhalt des Selektionsmarkers (Typ III-Deletion) ist von keinerlei praktischem Nutzen und ist bei Verwendung einer tk/neo-Kassette nach der Gancyclovir-Behandlung nicht lebensfähig. Bei der Konstruktion des Vektors muß darauf geachtet werden, daß der gewünschte Targeting-Vorgang eindeutig durch PCR- und Southern-Blot-Analyse identifiziert werden kann. Sonden sollten innerhalb und außerhalb der Targeting-Sequenz liegen, um Rekombinationsprodukte wie Verdopplungen und Konkatemere erkennen zu können (Thomas et al., 1992; Hasty et al., 1991). Es ist wünschenswert, daß das Vorhandensein der loxP-Sequenzen und die verschiedenen Deletionstypen mit diesen Sonden verifiziert werden können.
Das beschriebene Vorgehen nach der Cre/loxP-Methode eröffnet die Möglichkeit, nach der Cre-vermittelten Deletion in ES-Zellen zwischen einem konstitutiven oder einem konditionalen Knockout zu wählen. Man kann also mit dem schnelleren konstitutiven Knockout beginnen und bei Problemen mit Letalität oder Redundanz auf die ebenfalls isolierten Klone mit dem gefloxten Allel zurückgreifen. Mit dem konditionalen Knockout müßten dann alle Probleme beseitigt werden können. In dieser Arbeit wurde dieses stufenweise Vorgehen mit einem konstitutivenKnockout als Einstieg gewählt.

2.2.4.3. Weiterzucht der chimären Tiere

Aus den chimär transgenen Tieren, bei denen das Transgen heterozygot in der Keimbahn vorliegt, müssen anschließend Tiere mit einem einheitlichen genetischen Hintergrund gezüchtet werden. Die Rückkreuzungen auf einen Hintergrund, der von dem der ES-Zellen abweicht, müssen unter Selektion des Differentiallokus über mindestens 10 Generationen durchgeführt werden. Allein dieser Schritt nimmt einige Jahre in Anspruch. Da nicht jeder genetische Hintergrund für eine bestimmte Untersuchung geeignet ist, werden in diesem Stadium oft gleichzeitig Rückkreuzungen auf verschiedene Mausstämme durchgeführt, um später die richtigen Tiermodelle bereit zu haben. Weiterhin ist noch Zeit für die Züchtung einer homozygoten Mauslinie einzuplanen.

Bei dem konditionalen Ausschalten des Gens ist es ratsam, den genetischen Hintergrund der Cre-Maus zu berücksichtigen, die für die Deletion des gefloxten Allels sorgen soll. Auf diese Weise könnte die Verwendung von doppelt transgenen Hybrid-Mäusen umgangen werden.

2.3. Der Comet-Assay

Ein besonders vielfältiges Instrument zur Bestimmung von Gentoxizität stellt der Comet-Assay dar. Er wird auch als Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; single cell gel electrophoresis) bezeichnet. Die ursprüngliche Durchführung wurde von Östling und Johansson (1984) publiziert. Anschließend wurden verschiedene Verbesserungen entwickelt, die für die Anwendbarkeit auf verschiedene Fragestellungen sorgten (Singh et al., 1988; Übersicht in McKelvey-Martin et al., 1993 und Tice et al., 2000). Mit Hilfe des Comet-Assays ist es möglich, die Bildung von DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüchen zu messen, die nach Einwirkung reaktiver Agenzien entstehen. Es können auch Strangbrüche erfaßt werden, die durch Basen-Exzision im Laufe von Reparaturprozessen gebildet werden. Weitere Anwendungen stellen die Detektion von DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen sowie Apoptose dar.

Nach der Inkubation der Zellen werden diese in niedrigschmelzende Agarose eingegossen, lysiert und einer Gelelektrophorese unter stark alkalischen Bedingungen unterworfen. Dabei wandern die DNA-Einzelstränge mit größenabhängiger Geschwindigkeit zur Anode. Die anschließende DNA-Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen verleiht geschädigten Zellen das Aussehen von Kometen. Der Zellkern stellt dabei den Kopf und die DNA-Fragmenten den Schweif dar. Je höher die Zahl der Strangbrüche und damit die Gentoxizität ist, desto länger und intensiver wird der Schweif. Diese DNA-Verteilung kann mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

3. PROBLEMSTELLUNG

Ziel der Arbeit war eine bessere Einschätzung der Rolle von Lipoxygenasen bei proliferativen Hauterkrankungen und Hautkrebs. Zu diesem Zweck sollten *in vivo*- und *in vitro*-Modelle für die Funktionsanalyse epidermaler Lipoxygenasen entwickelt werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Epidermis-Typ 12S-Lipoxygenase (*e*12S-LOX) und der 12R-Lipoxygenase (12R-LOX). In Abb. 9 sind die Projekte dieser Arbeit schematisch zusammengefaßt.

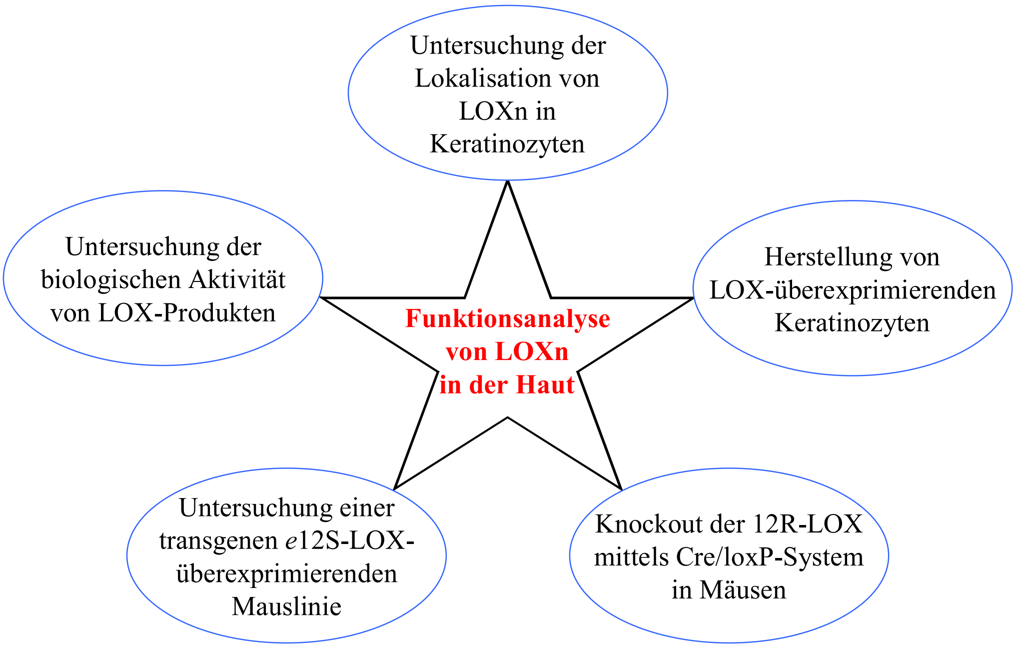


Abb. 9 Experimentelle Ansätze zu Funktionsaufklärung epidermaler LOXn

An Keratinozyten sollten in Zellkultur die Lokalisation von Fusionsproteinen aus LOX und Green Fluorescent Protein (GFP) untersucht werden. Mit LOX-überexprimierenden Keratinozyten sollte ein System geschaffen werden, das direkt oder in rekonstituierter Haut Funktionsstudien erlaubt. Um die Funktion der 12R-LOX, vor allem bei der Psoriasis und Ichthyosen, zu charakterisieren, sollte eine 12R-LOX-Knockout-Maus etabliert werden, wobei die Vorteile des konditionalen Cre/loxP-Systems gegenüber einem konventionellen Knockout genutzt werden sollten. Bereits vorhandene transgene Mäuse, die *e*12S-LOX in der Epidermis überexprimieren, sollten näher charakterisiert werden. Im Zusammenhang mit der potentiell DNA-schädigenden Wirkung von LOX-Produkten stand die Etablierung des Comet-Assays mit primären Keratinozyten. Mit dieser Methode zur Ermittlung der gentoxischen Aktivität sollte der Beitrag von LOX-Produkten zur Tumorentstehung untersucht werden.

4. MATERIAL

4.1. Geräte

Biofuge B	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Comet-Assay-Auswertesystem Komet 3.0	Kinetic Imaging, Bromborough, UK
Comet-Assay-Objektträger	Trevigen, USA
Dri-Block DB-1	thermo-DUX, Wertheim/Main
Entwickler-Maschine Curix 60	Agfa-Gevaert, München
Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Floureszenzmikroskope	Olympus, Hamburg
	Zeiss, Göttingen
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia LKB, Freiburg
Horizontal-Gelelektrophoresekammern	Biorad, München
HPLC-Anlage mit UV-Detektion	BIO-TEK Kontron, Neufahrn
Hybridisierungsofen OV-10	Biometra, Göttingen
Kamera-Aufsatz MP 551	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Kühltisch Julabo SC	Julabo, Seelbach
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Mikrodismembrator II	B. Braun, Melsungen
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Mikrowellengerät	Bosch, Karlsruhe
Netzgerät Phero-stab 500	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research, Watertown, MA, USA
pH-Meter 763	Knick, Berlin

Röntgenfilmkassetten	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Sicherheitswerkbank BSB 4a	Gelaire, Meckenheim
Sofortbild-Kamera DS 34	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Speedvac Vakuumkonzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Szintillationszähler LS 5000 TD	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Tischzentrifuge 5412	Eppendorf, Hamburg
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator	UVP, San Gabriel, CA, USA
Vortex Genie2	Bender & Hohbein, Bruchsal
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Hannover-Vinnhorst
Wasserbadschüttler 3020	GFL, Hannover-Vinnhorst

4.2. Allgemeine Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma, München
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Merck, Darmstadt
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Qualex Gold)	AGS, Heidelberg
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carbenicillin	Hybaid, Heidelberg
Chelex	Biorad, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt

Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Glycerin	Roth, Karlruhe
HETE/HODE-Standards	Reatec, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Hybaid, Heidelberg
Luria Agar	Gibco, Karlsruhe
Luria Broth Base	Gibco, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, München
N,N'-Methylen-bisacrylamid (BA)	Sigma, München
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, München
SybrGreen	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Szintillationsflüssigkeit Ready Safe	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Triethanolamin (TEA)	Sigma, München
Trimethylphosphit	Fluka, Neu-Ulm
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Biomol, Hamburg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Nicht aufgeführte Chemikalien wie Lösungsmittel, Säuren und Salze wurden von Roth, Karlsruhe, Merck, Darmstadt, Fluka, Neu-Ulm, oder Sigma, München, in p.a.-Qualität bezogen.

4.3. Radiochemikalien

[α-^{32}P]dCTP (Desoxycytidin-5'-[α-^{32}P]-Triphosphat)

Radioaktive Konzentration: 370 MBq/ml (10 mCi/ml)

Spezifische Aktivität: 110 TBq/mmol (3000 Ci/mmol)

Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig bezogen.

4.4. Membranen, Säulen, Papier und Filme

Fuji New RX Röntgenfilme	Diaprint, Heidelberg
Hybond N^+ Membran	Amersham, Braunschweig
Kodak Ektapress Gold II	Diaprint, Heidelberg
Nick Columns (Sephadex G-50)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pall Membran	Pall, Pourtsmouth, England
Polaroidfilme 667	Diaprint, Heidelberg
Whatman 3MM Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

4.5. Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Advantage cDNA Polymerase	Clontech, Heidelberg
Advantage HF Polymerase	Clontech, Heidelber
Big Dye Sequencing Kit	PE Biosystems, Weiterstadt
DNA-Größenstandard pUC19 DNA/MspI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Ligation Kit	Stratagene, Heidelberg
DNase I, RNase frei	Roche, Mannheim
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Fugene 6	Roche, Mannheim
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ligation Express Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Mammalian Transfection Kit	Stratagene, Heidelberg
Megaprime DNA Labeling Kit	Amersham, Braunschweig
Nukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
PCR-Product Purification Kit	Roche, Mannheim
Polynukleotidkinase (PNK)	Roche, Mannheim
Polyornithin	Sigma, München

Prime it II-Labeling Kit	Stratagene, Heidelberg
QIAEX-DNA-Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	AGS, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen und Puffer	AGS, Heidelberg
	Amersham, Braunschweig
	Boehringer, Mannheim
	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNA-Clean	Hybaid-AGS, Heidelberg
RT-PCR Core Kit	Perkin-Elmer, Darmstadt
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche, Mannheim
T4-DNA Ligase und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
Taq DNA-Polymerase	Qbiogene101, Heidelberg

4.6. Oligonukleotide

Die Desoxy-Oligonukleotide wurden von Wolfgang Weinig (DKFZ) oder ThermoHybaid (Ulm) synthetisiert.

OL	Sequenz
24	5’-AAA CTG GAA CGG TGA AGG C-3’
25	5’-GCT GCC TCA ACA CCT CAA C-3’
69	5’-TTT CTG TTT GCG CAG CTT CAC C-3’
70	5’-GTT GGG TGC AGG GCA AGG AGA C-3’
73	5’-CCC GTT CAG TAC TCC CTG CTA T-3’
88	5‘-ACG GAT GCA GAT AAC AGT CAC C-3‘
183	5’-TGC CGG GAA GCT CCT CTC ATA G-3’
225	5’-AGC TTA TAC AGG GGG TGG CAC ATG GGC AGG-3’

230	5’-CTG TGC CCC GAT GTG CTT GCT G-3’
233	5’-ACC GTC GGG GAG GAG GAT GGT AAC-3’
248	5’-CAG GTA TAG TTC GCA AGC AGG TGG-3’
708	5’-TCT GAG TGG GAC TGG CTG TTG G-3’
1204	5’-AGG CCC AGG GAG CTC TAT T-3’
1210	5’-AAA TCA TAT TCA AGG GCT TGG-3’
1254	5’-GAA GGA GGC TGT CTT GAC GAA GGA-3’
1255	5’-GGT TGT CGA CGT GGG TCT CGA AGA G-3‘
1256	5’-CGG GAT CCC TAG ATG GAA ATA CTG TTC TCA ATC-3’
1257	5’-TGA GGA TCC GCC ATG GCC ACC TAT AAA GTC AAG GTG-3’
1259	5’-GAT CAG AAT TCT CGA GCA CAC T-3’
1260	5’-CTA GAG TGT GCT CGA GAA TTC C-3’
1275	5’-AAT TCG ATA TCA AGC TTG GTA CCT CGA GGA TCC GCG GCC GC-3’
1276	5’-AGC TGC GGC CGC GGA TCC TCG AGG TAC CAA GCT TGA TAT CG-3’
1277	5’-GAT CAT AAC TTC GTA TAA TGT ATG CTA TAC GAA GTT AT-3’
1278	5’-GAT CAT AAC TTC GTA TAG CAT ACA TTA TAC GAA GTT AT-3’
1279	5’-AGA CAG GCT GGT CGA CTG GCT TGT-3’
1280	5’-CTA CAA GCC AGT CGA CCA GCC TGT-3’
1281	5’-CAG ACT CGA GCC GCC ATG GGC CGC TAC CGC GTC CGT GTG-3’
1282	5’-AGC AGC GGC CGC TCA GAT GGT GAT ACT GTT CT-3’
1283	5’-TCC TCT CGA GCC GCC ATG GCC ACC TAT AAA GTC AAG GTG-3’
1284	5’-AGA AGC GGC CGC CTA GAT GGA AAT ACT GTT CTC AAT C-3’
1285	5’-AGA CAG GCT GGT CGA CTG GCT AGA TCT-3’
1286	5’-GAT CAG ATC TAG CCA GTC GAC CAG CCT GT-3’
1297	5’-GAG GCA TCC GGG GAT CAT AAC TTC GTA TA-3’
1603	5’-CCG TCG ACC TCG ACC AGC CTG TCT ACA C-3’
1604	5’-CTG AGG CCA GAA GAT CAC AAG TTC AAG-3’
1605	5’-TCT GCA TCC GCA TGG CCC TTA TCC TCC TTA-3’
1606	5’-TTA GTG GGT CTC GAA GAG GGA TTT CAT GGA-3’
1609	5’-CAC ATC TAG AGA AAC TTC TAT ATT GGG GTG TTA CT-3’
1611	5’-TTC AGC GGC CGC ATG AAA TCC CTC TTC GAG ACC CAC TAA-3’
1612	5’-TTA GCG GCC GCA TAA GGG CCA TGC GGA TGC AGA GA-3’

1614	5’-GAT TCT AGA CCC GGA AGG CCC TGG TTT GGA TCG GTG-3’
1624	5’-GCA GAG AGA CCT CCC TTG TTG AGA AGG AG-3’
1627	5’-CTG TGT AGA CAG GCT GGT CGA GGT CGA CGG-3’
1634	5’-AAG AGT CGA CAT GGC CAC CTA TAA AGT CAA GGT G-3’
1636	5’-AGG GAT CGA TCT AGA TGG AAA TAC TGT TCT CAA TC-3’
1637	5’-CCA TGT CGA CAT GGG CCG CTA CCG CGT CCG TGT G-3’
1638	5’-GCC AAA GCT TAT GGG CCG CTA CCG CGT CCG TGT G
1639	5’-GCA GAT CGA TTC AGA TGG TGA TAC TGT TCT-3’
1658	5‘-GGA CCA CGG AGA TGT T-3‘
1901	5‘-CCA AGT GAC ACA TCC GTC C-3‘
1902	5‘-AGA GTC GAA CTG GCC TGA A-3‘
1903	5‘-CCA GAC ATG GTA CCT CTA-3‘
1904	5‘-CAG TCC TAG GGC TGA C-3‘
1911	5‘-AGT GGG CAG CAT GAC TTT-3‘
1912	5‘-GAA GGC TGC GAT GCT CT-3‘
1913	5‘-GCT ATC CAG TCG TTC ACG-3‘
1914	5‘-CCA GGA GCA CCA GTC ATA-3‘
1919	5‘-CCG CAT CCT CTT CCT-3‘
1920	5‘-GGA GCA ATG ATC TTG ATC-3‘
1922	5‘-CAT CAG TCG GTA TGT GGA-3‘
1923	5‘-GGC AAG GCA ACG AGT-3‘
1928	5‘-GAT GGA GAG GTA CGT GAC-3‘
1929	5‘-AGT AGT TAG CCC CTT GG-3‘
1930	5‘-TCA TGA ATC GGT ACG TGG-3‘
1931	5‘-GTC GCG TCC TTG GTT T-3‘
SP6	5’-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3’
T7	5’-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3’

4.7. Plasmide

GFP-LOX-Konstrukte	P. Krieg, Abt. Marks, DKFZ
K5-Promotor, bovin (Plasmid 5)	M. Blessing, Universität Mainz
K6.e12S-LOX (Plasmid 2140)	M. Heidt, Abt. Marks, DKFZ
K14-Promotor, bovin (Plasmid 89)	M. Blessing, Universität Mainz
neoflox-8 (Plasmid 2484)	Abt. Angel, DKFZ
pAdVAntage (Plasmid 50)	Promega, Madison, WI, USA
pBluescript II KS+ (Vektor 14)	Stratagene, Heidelberg
pCRII TOPO (Vektor 33)	Invitrogen, Leek, NL
pcDNA3.1 (-) (Vektor 29)	Invitrogen, Leek, NL
pcDNA3-β-Gal (Vektor 40)	Invitrogen, Leek, NL
pDTA (Plasmid 2489)	Abt. Angel, DKFZ
pHR2 (Plasmid 2488)	H. Reichardt, Abt. Schütz, DKFZ
pRNS-1 (Plasmid 20)	H. Ozer, Newark, USA
tk-neo-Kassette, gefloxt (Plasmid 2488)	Abt. Schütz, DKFZ
VIP36-GFP (Plasmid 4426)	T. Lau, Abt. Marks, DKFZ
18, 304-308, 330-332, 2481, 2482, 2585, 2586, 2490-2499; 4401-4413	K. Müller, Abt. Marks, DKFZ

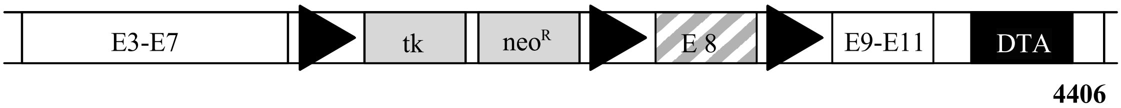
Kurze Beschreibung der Konstrukte für das Ausschalten des 12R-LOX-Gens (*ALOX12B*) mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems:

4406 (Targeting-Vektor):

Basisvektor: pBluescript KS^{+}

Gesamtgröße: 14 kb

Resistenz: Ampicillin



E3-E7: dieser genomische Bereich umfaßt Exon 3 bis Exon 7 und beginnt am Ende des Introns 2 und endet im Intron7

E9-E11: Dieser genomische Bereich umfaßt Exon 9 bis Exon 11 und beginnt am Ende des Introns 7 und endet im Intron 11

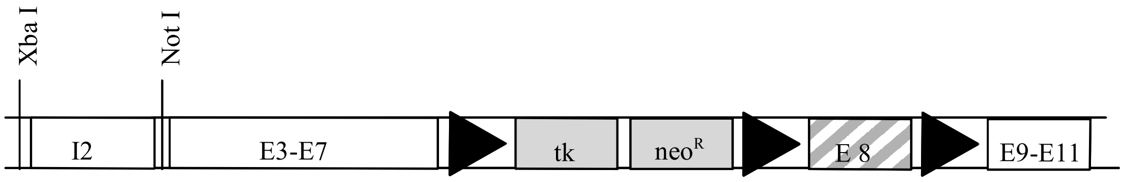
Das Konstrukt kann mit Not I oder Xho I für die Elektroporation linearisiert werden.

4412 (Positivkontrolle der 5`-Region):

Basisvektor: pCR-XL-TOPO

Gesamtgröße: 13.5 kb

Resistenz: Kanamycin



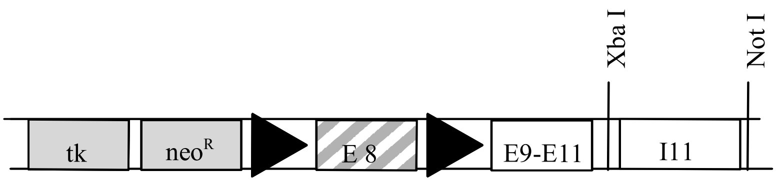
4412

4413 (Positivkontrolle der 3`-Region):

Basisvektor: pCR-XL-TOPO

Gesamtgröße: 13.5 kb

Resistenz: Kanamycin



4413

4.8. Organismen

4.8.1. Bakterien (Escherichia coli)

SURE 2 supercompetent cells	Stratagene, Heidelberg
One Shot (TOP 10)	Invitrogen, Leek, Niederlande
Cre-Deleters	Niamh Keon, Abt. Angel, DKFZ

4.8.2. Maus-Stämme

B6D2F2	BRL, Füllinsdorf, Schweiz
C57BL/6	Charles River, Sulzfeld
DBA/2	BRL, Füllinsdorf, Schweiz
NMRI	BRL, Füllinsdorf, Schweiz

4.8.3. Mauskeratinozyten-Linien

Zellinie	Etablierung aus	ras-Mutation	Tumore in Nacktmäusen	Referenz/Herkunft
Carc B	spontanem Spindelzellkarzinom	ja, homozygot	maligne	Bremner et al., 1990
MCA3D	primären, neonatalen Keratinozyten (Ca^{2+}-, DMBA- und TPA behandelt)		benigne	Kulesz-Martin et al., 1983 erhalten von DaVonne Zentner, USA
Reb	neonataler NMRI-Epidermis	ja		Krieg et al., 1991
SP-1	DMBA/TPA induziertem Papillom	ja, heterozygot	benigne	S.H. Yuspa, MD, USA
SP-1 #3				Adam Glick, MA, USA

4.8.4. Sonstige Zellinien

$BMGE^+$ (Bovine mammary gland epithelial cells)	Schmid et al., 1983 Prof. Franke, DKFZ
HaCaT	Boukamp et al., 1988
EcoPack2 293	Clontech, Heidelberg

4.9. Zellkulturmaterialien

Actrapid-Insulin, 40 iE/ml; 1,4 mg	Novo Nordisk, Schweden
Dihydrofuran (DHF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
DMEM	Flow Laboratories, Meckenheim
Fötales Kälberserum	Gibco BRL, Basel, CH
Fötales Kälberserum, low Ca^{2+}	Abt. Marks, DKFZ, Heidelberg
G418	Sigma, Deisenhofen
Gewebekulturschalen	TPP, Schweiz
Hanks Salzlösung ohne Ca^{2+}, Mg^{2+} und Phenolrot (1 x konzentriert)	Biochrom, Berlin
Hanks Salzlösung (10 x konzentriert)	Biochrom, Berlin
Hormonsolvent	Sigma, Deisenhofen
Hydrocortison	Fluka, Neu-Ulm
$K_3[Fe(CN)_6]$	Merck, Darmstadt
K4[Fe(CN)6]·3 H_2O	Merck, Darmstadt
MEM-Vitamine (100 x konzentriert)	Biochrom, Berlin
MEM-Aminosäuren (50 x konzentriert)	Biochrom, Berlin
MEM-nichtessentielle Aminosäuren (100 x)	Biochrom, Berlin
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	Merck, Darmstadt
N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
NaOH (1M)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydrogencarbonat (7,5 %)	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom, Berlin
Objektträger für den Bewuchs mit Zellen	ICN Biomedicals, Eschwege
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom, Berlin
Percoll	Pharmacia, Freiburg
Phenolrot (0,5% w/v)	Biochrom, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Poly-L-Ornithin	Sigma, München

Prolactin	Sigma, München
Quadriperm-Schalen zur Zellkultur auf Objektträgern	Vivascience, Bezug über Renner, Dannstadt
Trypanblau (0,5 % w/v, in physiologischer Kochsalzlösung)	Biochrom, Berlin
Trypsin (2,5 % in PBS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom, Berlin
Zellkulturröhrchen (50 ml, 15 ml)	TPP, Schweiz

4.10. Materialien für histologische Untersuchungen

4.10.1. Gewinnung von Histologien

Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
Deckgläschen	Langenbrinck, Emmendingen
Mayer's Färbelösung (Hämalaun-Lösung)	Merck, Darmstadt
Objektträger Superfrost	Neolab, Heidelberg
4% Paraformaldehyd in PBS	frisch angesetzt und filtriert
Tissue Tek	Vogel, Gießen

4.10.2. Antikörper

guinea pig anti mouse Keratin 5	Lutz Langbein, DKFZ
rabbit anti mouse involucrin	Fiona Watt, Imperial Cancer Research Fund, London
rabbit anti mouse Ki-67	Dianova, Hamburg (550-67)
Anti Guinea Pig Alexa Fluor 488	Mobitec, Göttingen

Cy3-goat anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg
Goat anti rabbit IgG-HRP	Dianova, Hamburg (111-035-003)

4.10.3. <u>Immunhistochemie und Immunfluoreszenz</u>

Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, München
ELISA-BSA	Sigma, München
Eosin Certistain Eosin G	Merck, Darmstadt
Euktitt	Kindler, Freiburg
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Hämalaun (Hämatoxylin) Gill No. 2	Sigma, München
Rattenserum	Sigma, München
Ziegenserum	Sigma, München

4.11. Materialien für den Comet-Assay

Comet-Objektträger	Trevigen, USA
Low-melting Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
SybrGreen	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

4.12. Materialien für das RevTet-System

RevTet-System	Clontech, Heidelberg
Plasmid 301 (pRevTRE)	Clontech, Heidelberg
Plasmid 302 (pRevTet-On)	Clontech, Heidelberg
Plasmid 303 (pRevTRE-Luc)	Clontech, Heidelberg

Plasmid 304 (pRevTRE-m12R-LOX)	Karsten Müller, DKFZ Heidelberg
Plasmid 307 (pRevTRE-mp12S-LOX)	Karsten Müller, DKFZ Heidelberg
Keratinozytenlinie MCA3D	DaVonne Zentner, USA
Verpackungszellinie EcoPack2 293	Clontech, Heidelberg

5. METHODEN

5.1. Arbeiten zur DNA-Analyse

5.1.1. Allgemeines

5.1.1.1. DNA-Agarosegelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Zur Charakterisierung wurden DNA-Fragmente in Agarose-Flachbett-Gelen unterschiedlicher Größen (8 x 10 cm, 15 x 10 cm, 15 x 30 cm) entsprechend ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gelmatrix- und Elektrophoreselaufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Die Agarosekonzentration wurde je nach den zu erwartenden Fragmentgrößen zwischen 0,7 - 1,4 % variiert und die Suspension wurde dann in einem Mikrowellengerät aufgekocht. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromidlösung [10 mg EtBr/ml H_2O] pro 100 ml Gelvolumen wurde die gelöste Agarose in eine abgedichtete Horizontalgelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit Stopper/Gelladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße für 1 - 2 Std. bei 10 V/cm. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht photographiert.

Verwendete Puffer:

1x TBE:	100 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5
1x TE:	20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7-8
Gelladepuffer:	50 % Glycerol, 15 mM EDTA, 0,15 % Bromphenolblau, 0,15 % Xylencyanol, pH 7,4 Alternativ wurden Gelladepuffer von den Herstellern der Restriktionsendonukleasen verwendet
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml TE-Puffer

5.1.1.2. Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte (OD)

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA sowie DNA wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht der Konzentration von 50 µg/ml für dsDNA, sowie 40 µg/ml für RNA und etwa 33 µg/ml für Oligonukleotide bzw. ssDNA. Berechnungsformel:

c[pg/µl] =	OD_{260}	x	Verdünnungsfaktor	x	50	(dsDNA)
					40	(RNA)
					33	(ssDNA bzw. Oligonukleotide)

Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluß über den Verunreinigungsgrad durch Proteine. Dieser Quotient sollte bei reinen Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

5.1.1.3. Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit einem Standard im Agarosegel

Verschiedene Volumina der zu untersuchenden Nukleinsäure wurden zusammen mit verschiedenen Volumina eines Standards bekannter Konzentration in einem Agarosegel getrennt. Durch Intensitätsvergleich der Banden wurde die Konzentration abgeschätzt.

5.1.1.4. Isolierung von DNA aus ES-Zellen

Wenn DNA aus ES-Zellen gewonnen werden soll, so ist es vorteilhaft, die Zellen bei der letzten Passage auf gelatiniserten Zellkulturschalen auszusäen, um die Kontamination mit Feeder-Zellen auf ein Minimum zu beschränken. Sind die Zellen ausreichend konfluent, wird das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend der Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben. Dem Lyse-Puffer wurde vorher Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Pro 60 mm Schale wurden 2,5 ml Lyse-Puffer verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 3-18h wurde 1 ml einer 5M NaCl-Lösung hinzugefügt, um die Proteine zu fällen. Dazu wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Röhrchen mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol versetz, um die DNA zu fällen. Das daraufhin sichtbare DNA-Knäuel wurde mit einer Pipettenspitze in 70% Ethanol überführt und darin vorsichtig gewaschen. Der Waschschritt wurde nochmal wiederholt, dann wurde die DNA in ein Eppendorf-Tube überführt, in der Speedvac von Ethanolresten befreit und in TE-Puffer aufgenommen.

Verwendete Puffer:

Lyse-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 ; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl

5.1.2. Klonierung

5.1.2.1. Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen zur Analyse von DNA wurden unter den von den Herstellern angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Zum Schneiden von 1 µg Plasmid-DNA in der entsprechenden Verdünnung der von den Herstellern mitgelieferten Puffer wurde mit der 2- bis 5-fachen Enzymmenge (2 - 5 U) für 1 - 2 Std. inkubiert. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach dem angegebenen Aktivitätsoptimum der Restriktionsenzyme.

5.1.2.2. DNA-Isolierung aus Agarosegelen mittels QIAquick-Gel-Extraktions-Kit (Qiagen)

Das Prinzip der QIAEX-DNA-Gelextraktion nach einer modifizierten Methode von Vogelstein und Gillespie (1979) beruht auf dem Schmelzen der Agarose und einer selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an Silikapartikel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die Elution der DNA erfolgt dann bei niedrigen Salzkonzentrationen.

Die zu extrahierende DNA-Bande wurde unter langwelligem UV-Licht (366 nm) nach der Gelelektrophorese ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Pro 100 mg Agarosegel wurden dann 300 µl QG-Solubilisierungspuffer zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 50°C inkubiert und in Abständen von 2 min wiederholt gemischt, wobei die gelbe Farbe des Indikators erhalten bleiben muß. Bei DNA-Fragmenten <500 bp und >4 kb werden pro 100 mg Agarosegel 100 µl Isopropanol hinzugefügt. Der Ansatz wird auf die Säulen gegeben und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Dem eigentlichen Waschen der Säule mit 750 µl PE-Puffer kann eine zusätzliche Reinigung mit QG-Solubilisierungspuffer für extrem empfindliche Anwendungen vorausgehen. Zur Entfernung von Spuren des PE-Puffers wird zweimal zentrifugiert, bevor die DNA mit 30 – 50 µl Puffer EB, Puffer TE oder H_2O eluiert wird.

5.1.2.3. Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Bei Verwendung von komplementären Oligonukleotiden zur Insertion von Schnittstellen oder loxP-Sequenzen in ein Plasmid, mußten diese vorher erhitzt und langsam wieder abgekühlt werden, um eine korrekte Hybridisierung zu gewährleisten. Um dieses zu erreichen, wurde ein äquimolares Gemisch der Oligonukleotide in ein kochendes Wasserbad eingebracht, das anschließend abgeschaltet wurde. Nach dem Abkühlen wurden die Oligonukleotide entnommen. In einigen Fällen wurde auch ein PCR-Cycler verwendet, in dem ein entsprechender Temperaturverlauf gespeichert wurde.

5.1.2.4. SAP-Behandlung linearisierter Vektoren

Nach der Linearisierung der Klonierungsvektoren mit Restriktionsendonukleasen wurden die 5'-terminalen Phosphatreste durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (SAP) entfernt, um eine Rezirkularisierung bei der nachfolgenden Ligation zu vermeiden. Dazu wurde die linearisierte Plasmid-DNA (1-10 µg) mit 10x SAP-Puffer und mit H_2O auf ein Volumen von 15-80 µl gebracht. Nach Zugabe von 1-8 µl SAP (1 Einheit/µl) wurde der Ansatz bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch 15 minütige Inkubation bei 65°C gestoppt.

5.1.2.5. Phosphorylierung der 5'-Enden mit Polynukleotidkinase (PNK, Roche)

Synthetische Oligonukleotide besitzen keine 5'-terminalen Phosphatreste. Sollen zwei komplementäre, synthetische Oligonukleotide nach dem Annealing-Schritt in einen linearisierten und mit SAP behandelten Vektor ligiert werden, müssen die Oligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert werden. Dies geschieht mit der Polynukleotidkinase (PNK). Diese akzeptiert doppelsträngige und in geringerem Umfang auch einzelsträngige Nukleotidsequenzen als Substrat.

Bis zu 20 pmol 5'-Enden wurden in einem Volumen von 20 µl mit der gleichen Molarität von ATP und 10x Phosphorylierungspuffer 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz rasch abgekühlt und ein Teil wurde für die Ligation eingesetzt.

5.1.2.6. TOPO TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die mittels Taq DNA-Polymerase amplifizierte DNA besitzt an den 3'-Enden ein zusätzliches Desoxyadenosin. Daher konnten diese DNA-Fragmente direkt in den pCRII-TOPO oder pCR TOPO-XL-Vektor (4.7), der linearisiert mit einem 3'-überhängenden Desoxythymidin vorlag, kloniert werden. Die TA-Klonierung wurde mit Hilfe des TOPO TA-Cloning Kits von Invitrogen (4.5) durchgeführt. Danach wurden 10 ng (normalerweise 0,5 bis 2 µl des PCR-Ansatzes) eines höchstens einen Tag alten PCR-Produkts zu 1 µl pCR-TOPO Vektor gegeben und mit sterilem Wasser auf 5 µl aufgefüllt. Dann wurde gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Transformation wurden 2 µl einer Ligationsreaktion zu One Shot cells (kompetenten E. coli Bakterien von Invitrogen) pipettiert. Die Transformation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion konnten rekombinante Plasmide leicht auf den X-Gal und Ampicillin enthaltenden LB-Platten identifziert werden. Der hier eingesetzte Bakterienstamm INVaF' exprimiert kein $lacI^q$-Gen (lac-Repressor) und benötigt so kein IPTG zur Induktion.

5.1.2.7. Ligation

Für die Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden in linearisierte Plasmide wurden verschiedene Kits verwendet (4.5). Die jeweilige Durchführung („blunt"- oder „sticky-end"-Ligation) entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Wenn bei der Ligation eine Rezirkularisierung des Vektors möglich gewesen wäre oder synthetische Oligonukleotide verwendet werden sollten, mußte der Phosphorylierungsgrad der Enden bei der Ligation berücksichtigt werden (5.1.2.4, 5.1.2.5). Oligonukleotide mußten vorher hybridisiert werden (5.1.2.3).

5.1.2.8. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Für die Transformation wurden kompetente Bakterien der Firmen Stratagene (SURE) oder Invitrogen (One Shot) verwendet. 20 µl der bei -70°C gelagerten Sure II Bakterien-Suspension (Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Bei Verwendung der One Shot-Bakterien (Invitrogen) kann dieser Schritt entfallen. Ein Aliquot des Ligationsansatzes (normalerweise 10 - 100 ng ligierte Plasmid-DNA) wurden mit der Zellsuspension vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 s bei 42°C und 2 min Inkubation auf Eis ohne Schütteln wurde die Suspension mit 250 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) versetzt und für 30 - 60 min bei 37°C geschüttelt. Aliquots von 50 - 200 µl dieser Transformationsansätze wurden auf vorbereiteten Selektions-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Herangewachsene Einzelkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und in Flüssigkultur unter Selektionsbedingungen vermehrt.

Während der Inkubationsphase wurde bei Transformationen von Plasmiden mit der Möglichkeit der "Blau-Weiß-Selektion" (Maniatis et al., 1989) 20 µl einer 0,1 M IPTG- und 40 µl einer 2 %igen X-Gal-Lösung auf Selektions-LB-Platten verteilt. Die Insertion der zu klonierenden DNA-Fragmente ließ sich später anhand der weißen Färbung der Kolonien erkennen. Die Insertion findet im lacZ-Gen statt, wodurch dieses inaktiviert und die Blaufärbung der Kolonie verhindert wird.

5.1.2.9. Kultivierungsbedingungen für Bakterien

Plasmid-DNA kann als extrachromosomale DNA in Bakterien vermehrt werden. Dazu werden die Bakterien entweder auf Agar oder in einer Flüssigkultur vermehrt.

Material und Medien für die Bakterienkultur:

LB-Medium:	25 g Luria Broth Base/l H_2O, autoklavieren
LB-Agar:	37 g Luria Agar/l H_2O, autoklavieren
Zusätze für Selektionsmedien:	Carbenicillin (Ampicillin-Derivat) 50 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml

5.1.2.10. Plasmidpräparation im kleinen Maßstab

Zur schnellen Charakterisierung rekombinanter Plasmide und zur Gewinnung kleiner Mengen an Plasmid-DNA wurde der QIAprep Spin Columns Kit (Qiagen) verwendet. Diese Plasmidpräparation basiert auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Die Aufreinigung gelingt durch Adsorption der DNA an eine Silikamembran in Gegenwart hoher Salzkonzentration.

Eine 5-10 ml Übernachtkultur wurde 5 min bei 1000 x g zentrifugiert (3000 Upm, Biofuge B), das Bakteriensediment in 250 µl Puffer P1 resuspendiert, mit 250 µl P2 5 min bei Raumtemperatur lysiert und durch 5 min Inkubation auf Eis nach Zugabe von 350 µl N3 präzipitiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 15000 x g (15300 Upm, SIGMA 2K-15) wurde der klare Überstand auf die Säulen aufgetragen und 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Nach dem Waschen der Säulen mit 500 µl PB und 750 µl PE wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation mit 50 – 100 µl TE-Puffer (pH 8,5) eluiert.

5.1.2.11. Plasmidpräparation im großen Maßstab

Zur Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde der Plasmid-Maxipräparations-Kit von Qiagen benutzt.

Eine 250 - 500 ml Übernachtkultur wurde bei 4400 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge Beckman J2-21; Rotor JA-10, 5000 Upm) und das Bakteriensediment vorsichtig in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurde die Suspension vorsichtig durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei nur die Plasmid-DNA freigesetzt wird. Anschließend wurden 10 ml Puffer P3 zugegeben, die Suspension durch mehrmaliges Umdrehen des Polypropylengefäßes durchmischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der durch Zentrifugation bei 13800 x g für 45 min bei 4°C (Zentrifuge Beckman J2-21, Rotor JA-17, 10000 Upm) erhaltene klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen und auf eine mit 10 ml Puffer QBT voräquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Puffer QC wurde die gereinigte Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert und aus dem Eluat mit 0,7 Volumen Isopropanol mindestens 20 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation bei 15000 x g, 4°C, für 30 min (Zentrifuge Beckman J2-21, Rotor JS-13.1, 9500 Upm) wurde das erhaltene DNA-Sediment zweimal mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 200 µl Puffer EB resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung dieser DNA-Aufarbeitung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}). Die Ausbeute betrug in der Regel 0,5 - 1 mg Plasmid-DNA je 500 ml Bakterienkultur.

5.1.3. <u>Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden</u>

5.1.3.1. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierungsreaktion wurde mit dem Megaprime DNA Labelling Kit von Amersham durchgeführt. Die von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelte Methode beruht auf einer statistischen Hybridisierung von verschiedenen Random-Hexanukleotiden an einzelsträngige DNA und deren Primerfunktion für die Klenow-Polymerase. Als Substrate dienen dATP, dGTP, dTTP und [α-^{32}P]dCTP, so daß bei der Synthese komplementärer DNA-Stränge eine Vielzahl von radioaktiv markierten Teilstücken der gesamten DNA-Vorlage entstehen.

25 - 50 ng DNA wurden mit 5 µl der Random-Primer vermischt, auf ein Endvolumen von 33 µl mit Wasser verdünnt und für 5 min bei 95 - 100°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis und kurzem Zentrifugieren wurden 10 µl 5x Labeling-Puffer, 5 µl [α-^{32}P]dCTP (50 µCi) und 2 µl Klenow-Enzym (1 U/µl) hinzugefügt, gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Abtrennung der nichteingebauten Nukleotide mittels Gelfiltration wurde die Reaktion gestoppt.

5.1.3.2. Reinigung der markierten DNA-Sonden

Die Trennung der markierten DNA von den nichteingebauten Nukleotiden erfolgte mittels Gelfiltration über G50-Sephadexsäulen ("Nick Columns") der Firma Pharmacia. Nach Äquilibrierung der Säule mit 3 ml TE-Puffer (pH 7,5) wurde der Markierungsansatz auf die Gelmatrix pipettiert, einmal mit 400 µl TE-Puffer gewaschen und die markierte DNA mit weiteren 400 µl TE-Puffer eluiert. Abschließend wurde die spezifische Aktivität eines Aliquots des Eluats durch Messung der Cerenkov-Zerfälle/Minute mit einem speziellen Meßprogramm des Szintillationszählers (Beckman) bestimmt.

5.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, DNA-Fragmente zwischen zwei antiparallel zueinander gelegenen Primern exponentiell zu amplifizieren. Dabei können durch die verwendeten Primer andere oder zusätzliche Nukleotide in das PCR-Produkt eingeführt werden oder die Enden des DNA-Fragments mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen modifiziert werden (*in vitro*-Mutagenese). Die PCR wurde unter anderem zur Klonierung von cDNA in eukaryotische Expressionsvektoren, zum Nachweis spezifischer Sequenzen in Plasmid-DNA und genomischer DNA und in der RT-PCR-Technik zum Nachweis der mRNA-Expression eingesetzt.

5.1.4.1. PCR zur Amplifikation und Modifizierung von DNA

Um spezifische Sequenzen in Plasmid-DNA und genomischer DNA nachzuweisen, genügt der Einsatz einer DNA-Polymerase ohne Proofreading-Aktivität. Eine solche Polymerase ist die Taq DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*.

Für eine Standard-Reaktion zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden 1 pg – 1 ng der DNA, 5 µl 10x Taq-Puffer (0,2 mg BSA/ml, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, Triton-X100 0,1 %, 10 mM Tris-HCl pH 9,0), 1 µl dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid), jeweils 2 µl des 5'- und des 3'-spezifischen Primers (10 pmol/µl) zusammenpipettiert, mit 38,5 µl H_2O auf ein Gesamtvolumen von 49,5 µl gebracht und gemischt. Als letztes wurden 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, Qbiogene101, Heidelberg) hinzugefügt und vermischt. Bei der Amplifikation von genomischer DNA wurde die DNA-Menge auf 100 pg – 10 ng erhöht. Die Standard-Bedingungen (Temperaturprogramm Taq56) für die Amplifikation im Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research) waren: Anfängliche Denaturierung von 5 min bei 95°C, dann über 30 Zyklen jeweils 94°C für 1,5 min (Denaturierung), 56°C für 1,5 min (Annealing) und 72°C für 2,5 min (Elongation, Polymerase-Reaktion). Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit von der Länge und den Schmelzpunkten des Primerpaares gewählt. Nach dem letzten Zyklus wurden die Reaktionsansätze für weitere 10 min bei 72°C gehalten, um alle unvollendeten Elongationen abzuschließen. Dabei synthetisiert die Taq-Polymerase auch ein zusätzliches Desoxyadenosin an das 3'-Ende der amplifizierten DNA-Fragmente. Alle verwendeten Temperaturprogramme sind in der Tab. 1 festgehalten.

Tab. 1 Temperaturprogramme, die für die unterschiedlichen PCR-Varianten eingesetzt wurden

PCR-Programm	**KM1**	**HF 68**	**Taq54**	**Taq56**
Anfängliche Denaturierung	94°C; 5 min	94°C; 15 s	95°C; 5 min	95°C; 5 min
Denaturierung	94°C; 1 min	94°C; 10 s	94°C; 1,5 min	94°C; 1,5 min
Annealing	60°C; 1 min		54°C; 2,5 min	56°C; 2,5 min
Extension	72°C; 1 min	68°C; 8 min	72°C; 1:30 min	72°C; 1:30 min
Zyklen	36	35	30	30
Abschließende Reaktion	72°C; 10 min	72°C; 10 min	72°C; 10 min	72°C; 10 min

Anschließend wurden zur Analyse der PCR 5 - 25 µl der Ansätze im Agarosegel mittels Elektrophorese überprüft. Eine Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels PCR Product Purification Kit (Roche), durchgeführt nach den Angaben des Herstellers, oder durch Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion (5.1.2.2) der Banden.

5.1.4.2. Quantitative Real-time PCR mittels LightCycler (Roche)

Die quantitative Real-time PCR beruht darauf, daß während der PCR die Amplifikation der Zielsequenz in Echtzeit gemessen werden kann. Dadurch erhält man die Reaktionskinetik, aus der man mit mathematischen Verfahren und dem Vergleich mit einer „Eichkurve“ auf die anfänglich vorhandenen Templat-Moleküle zurückrechnen kann. Deshalb werden beim LightCycler Glaskapillaren als Reaktionsgefäße verwendet, die eine Fluoreszenzmessung der Proben erlauben. Als Fluoreszenzfarbstoff wird SybrGreen verwendet, der erst nach Bindung an einen DNA-Doppelstrang und entsprechender Anregung die charakteristische Strahlung emittiert. Der Anstieg der Strahlungsintensität während einer PCR ist damit direkt proportional zur gebildeten Produktmenge.

Für die quantitative Real-time PCR mit dem LightCycler (Roche) wurde der FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) verwendet. Von der cDNA, die nach der reversen Transkription (5.2.4) erhalten wurde, wurden Verdünnungen von 10^{-1} hergestellt. 2 µl davon wurden für jede Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 20 µl als Templat eingesetzt. Nach den Empfehlungen des Herstellers wurden Primerkonzentrationen von je 0.5 µM und eine $MgCl_2$–Konzentration von 4 mM eingestellt. Das Temperaturprogramm bestand aus einer anfänglichen Denaturierung bei 95°C für 10 min, gefolgt von 44 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 15 s, Annealing (Temperaturen siehe Tabelle) für 10 s und Elongation bei 72°C für 20 s Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Analyse der Schmelzkurven (95°C für 1 s, 65°C für 15 s und anschließendes Erhitzen auf 95°C mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/s) mit dem LightCycler und durch Gelelektrophorese überprüft. Die Bestimmung der Kopienzahl erfolgte über eine Eichreihe mit Plasmidkonzentrationen von 10^1 bis 10^5 Kopien pro Reaktion. Für jede Zielsequenz wurde ein spezifisches Plasmid für die Eichreihe verwendet, das die entsprechende cDNA-Sequenz enthielt. Die Fluoreszenzdaten wurden mit Hilfe der Gerätesoftware über die „second derivative maximum“-Methode in Kopienzahlen umgerechnet. Jeweils ein Primer pro Paar überspannte eine Intron/Exon-Spleißstelle. Dadurch konnten eventuelle DNA-Verunreinigungen keine Vorlage für die Amplifikation darstellen. Jede PCR mit dem LightCycler wurde unabhängig wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen. Die LOX-Kopienzahl jeder cDNA-Präparation wurde mit Hilfe der β-Actin-Kopienzahl normalisiert. Die Expression dieses Haushaltsgens wurde mit den LightCycler in gleicher Weise wie die LOX-Expression bestimmt.

Tab. 2 LightCycler-Bedingungen und Produktgrößen

Target (Maus)	**Primer**	**Annealing [°C]**	**Plasmid für Eichreihe**	**Kopienzahl/ pg**	**Produkt größe [bp]**
β-Actin	1919/1920	63	4418/1	1,656E+5	307
*e*12S-LOX transgen	88/1658	63	4417/13	2,078E+5	380
*e*12S-LOX gesamt	1922/1923	63	2122	1,168E+5	338
*p*12S-LOX	1903/1904	63	2111	1,168E+5	233
12R-LOX	1928/1929	60	2347/2	1,187E+5	310
*l*12S-LOX	1930/1931	61	2113	1,168E+5	307
8S-LOX	1901/1902	63	2406	1,47E+5	201
*e*LOX-3	1911/1912	68	2517	1,638E+5	249
5S-LOX	1913/1914	68	-	-	252

5.1.4.3. PCR zum Nachweis der korrekten Integration des Targeting-Konstruktes nach homologer Rekombination

Für die Screening-Schritte wurde das Expand Long Template PCR System (Roche) verwendet. In einem ersten Analyseschritt wurde die homologe Rekombination mit einer PCR unter Verwendung der Primer 1604 und 1603 nachgewiesen.

Verwendete PCR-Bedingungen:

Gesamtvolumen	50 µl
Templat	100-200 ng genomische DNA
Primer	Jeweils 1,5 µl der Primer 1604 und 1603 [10 pmol/µl]
Puffer	Nr. 2
dNTPs	2,5 µl einer Mischung von 10 mM für jedes Nukleotid
PCR-Kit	Expand Long Template PCR System, Roche (Kat. Nr. 1 681 842)
PCR-Programm	ko1
Positivkontrolle	1 µl kok
Produktgröße	3,2 kb
Die Herstellung der Reaktionsgemische erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.	

Das PCR-Programm ko1:

Deckel-heizung	105°C
Temp.	Berechnet für den Gefäßinhalt
Schritt	
1	94°C für 2:00
2	94°C für 0:15
3	65°C für 0:30
4	68°C für 5:30
5	GOTO 2, 10 REPEATS
6	94°C für 0:15
7	65°C für 0:30
8	68°C für 5:30 +0:20 each cycle
9	GOTO 6, 20 REPEATS
10	68°C für 6:00
11	HOLD 4°C

Klone, für die in diesem Schritt ein positives Ergebnis erhalten wurde, wurden auf Insertion der dritten loxP-Sequenz mit den Primern 1297 und 248 untersucht:

Gesamtvolumen	50 µl
Templat	100-200 ng genomische DNA
Primer	Jeweils 1,5 µl der Primer 1297 und 248 [10 pmol/µl]
Puffer	Nr. 2
dNTPs	2,5 µl einer Mischung von 10 mM für jedes Nukleotid
PCR-Kit	Expand Long Template PCR System, Roche (Kat. Nr. 1 681 842)
PCR-Programm	ko1 (siehe oben)
Positivkontrolle	1 µl kok
Produktgröße	2,9 kb
Die Herstellung der Reaktionsgemische erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.	

5.1.4.4. PCR zum Nachweis Cre-mediierten Deletion

Bei drei verwendeten loxP-Sequenzen sollten nach Cre-Transfektion drei Rekombinationsprodukte auftreten (Abb. 8, Abb. 25). Um diese voneinander unterscheiden zu könne, wurde folgende PCR verwendet:

Gesamtvolumen	50 µl
Templat	100-200 ng genomische DNA
Primer	Jeweils 1,5 µl der Primer 1627 und 1624 [10 pmol/µl]
Puffer	Nr. 2
dNTPs	2,5 µl einer Mischung von 10 mM für jedes Nukleotid
PCR-Kit	Expand Long Template PCR System, Roche (Kat. Nr. 1 681 842)
PCR-Programm	ko1 (5.1.4.3)
Positivkontrolle	1 µl kok
Produktgröße	0,3 (Typ I-Deletion); 0,83 (Typ II-Deletion) oder 4 kb (nichtrekombiniert)
Die Herstellung der Reaktionsgemische erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.	

5.1.4.5. Reinigung von PCR-Produkten mittels High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

Diese Reinigung beruht auf einer modifizierten Methode von Vogelstein und Gillespie (1979). Zur Reinigung von PCR-Produkten mittels High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) werden 100 µl der PCR mit 500 µl Bindungspuffer vermischt und auf eine Säule gegeben, die dann 30 s bei 13000 Upm zentrifugiert wird. Nach Verwerfen des Eluats wird die Säule mit 500 µl Waschpuffer zentrifugiert. Das Eluat wird erneut verworfen und der Waschvorgang mit 200 µl Waschpuffer wiederholt. Anschließend wird das gereinigte PCR-Produkt mit 50 µl Elutionspuffer von Roche oder von Qiagen eluiert.
Dieser Kit kann bei gleicher Durchführung auch dazu eingesetzt werden, DNA-Fragmente aus einem Restriktionsendonukleasen-Verdau zu reinigen.

5.1.5. Die Southern-Blot-Methode

Der DNA-Transfer und die Hybridisierung zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen erfolgte nach der von Southern (1975) etablierten Methode. Nach Restriktionsverdau genomischer DNA und gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 0,8% Agarosegel wurde das Gel unter UV-Licht photographiert, die Markerbanden mit Tusche markiert und das Gel für 10 min einer milden Säurebehandlung in 0,25 N HCl unterworfen, was zu einer partiellen Depurinisierung der DNA führte. Dadurch wurde die DNA bei der anschließenden Denaturierung für 3 x 15 min in 0,4 N NaOH in kleinere und somit leichter zu transferierende Einzelstrangfragmente zerlegt. Nach der folgenden Neutralisierung für 10 min in 20x SSC erfolgte der DNA-Transfer (Blot) aus dem Gel mittels Kapillarkraft auf eine Nylonmembran. Dafür wurden in ein mit 20x SSC gefülltes, als Pufferreservoir dienendes Tablett 2 bis 3 Schwämme gelegt, darüber zwei auf Schwammgröße zurechtgeschnittene Whatman 3 MM Papiere, das vorbehandelte Gel und darauf die mit 20x SSC benetzte Nylonmembran (PALL).
Darauf folgten drei auf Gelgröße zurechtgeschnittene ebenfalls in 20x SSC getränkte 3 MM Papiere, 8 trockene 3MM Papiere, mehrere Lagen herkömmliches Filterpapier (2 cm) und Hostesspapier (8 cm). Abschließend wurde der ganze Aufbau mit einer Glasplatte und Gewichten beschwert. Nach 12-16 h war der DNA-Transfer vollzogen. Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung im UV-Stratalinker (1200 x 100 µJoules) kovalent an die Nylonmem-

bran gebunden. Der Filter mit der DNA wurde nun in eine Glasröhre überführt und in 6-10 ml Hybridisierungs-puffer (H7-Mix) für mindestens 4 h vorhybridisiert, um unspezifische Bindungen der radioaktiven Probe an die Membran zu vermeiden. Für die eigentliche Hybridisierung wurde diese Lösung durch eine Hybridisierungslösung gleicher Zusammensetzung ersetzt, welche zusätzlich die zuvor 10 min bei 95°C denaturierte radioaktive DNA-Probe (Endkonz. 2×10^6 cpm/ml enthielt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C in einem Rollhybridisierungsofen. Danach wurde die Membran mit Waschlösung 1 (2 x15 min bei Raumtemperatur, 1 x 20 min bei 60°C) und vorgewärmter Waschlösung 2 (1 x 20 min bei 60°C) gewaschen. Der Filter wurde noch feucht in Folie eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolien zur Detektion von Hybridisierungssignalen mit Röntgenfilmen belegt. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke für 1 bis 6 Tage bei -80°C.

Verwendete Puffer:

Depurinisierungslösung:	0,25 M HCl
Denaturierungslösung:	0,4 M NaOH
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natrium-Citrat, pH 7,0
Waschlösung 1:	2x SSC, 0,1% SDS
Waschlösung 2:	0,5x SSC, 0,5% SDS
Waschlösung 3:	0,1x SSC, 0,5 % SDS

5.1.6. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977) wurde mit Hilfe des Big Dye Kits der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die Reaktion gliedert sich in die Denaturierung der dsDNA, die Hybridisierung der Primer an die Zielsequenz (Annealing) und der Elongation (Polymerase-Reaktion). Durch den Einsatz von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Didesoxyterminatoren wird die wachsende Kette durch den Einbau der ddNTP gleichzeitig abgebrochen und markiert. Die vier verschiedenen ddNTP sind hierbei mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent verbunden. Da jeder Farbstoff bei Anregung mit einem Laser Licht verschiedener Wellenlängen emittiert, kann die Reaktion mit allen vier Terminatoren in einem Gefäß durchgeführt werden. Die automatische Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit Hilfe von Kapillarelektrophorese und Laser-gestützter Detektion der fluoreszenzmarkierten Fragmente in einem ABI Prism 310 (Perkin Elmer).

Für die Sequenzreaktion wurden je nach Größe der zu sequenzierenden Bereiche 0,3 - 1,2 µg (bei direkter Sequenzierung von PCR-Produkten ohne vorherige Klonierung 50 ng) DNA eingesetzt. Diese wurde mit 1 µl Primer (10 pmol/µl) und 2 µl Reaktionsmix (modifizierte Taq-DNA-Polymerase, dNTP, ddNTP an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, 5x Reaktionspuffer) vermischt und mit H_2O auf 10 µl eingestellt. Die anschließende Reaktion lief im Thermocycler in Abhängigkeit von der Primerlänge unter den in Tab. 3 aufgeführten Bedingungen ab.

Tab. 3 Für unterschiedliche Primerlängen benutzte Temperaturprogramme bei der Sequenzierreaktion

Primerlänge [Basen]	**18 - 20**	**20 - 24**
Denaturierung Annealing Extension	96°C; 0:15 min 55°C; 0:08 min 60°C, 1 min	96°C; 0:15 min 58°C; 0:08 min 60°C; 1 min
Zyklen	30	30

Nach dieser Reaktion wurde die DNA nach Zugabe von 90 µl H_2O, 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 250 µl Ethanol durch Zentrifugation bei 15300 Upm für 15 min (Zentrifuge Sigma 2K-15) gefällt. Das Sediment wurde durch zweimaliges Resuspendieren in 70 %iger Ethanollösung und anschließendes Zentrifugieren gewaschen. Danach wurde der Überstand abgenommen und der Ansatz wurde für 5 - 10 min an der Luft trocknen gelassen. Schließlich wurde die DNA in 20 µl TSR-Puffer (Template Suppressor Reagent) aufgenommen. In dieser Form kann der Reaktionsansatz bei -20°C für einige Wochen aufgehoben werden, bevor er analysiert wird. Vor der Sequenzanalyse wurde die Probe 3 min bei 90°C denaturiert, kurz abgekühlt und in spezielle Analysegefäße überführt. Die Sequenzanalyse erfolgte dann im Genetic Analyzer ABI Prism 310.

5.2. Arbeiten zur RNA-Analyse

5.2.1. Allgemeines

5.2.1.1. RNA-Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Für die Auftrennung von RNA aus verschiedenen Geweben und Zellinien wurden ebenfalls 1,4 %ige Agarose-Flachbett-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 90 ml destilliertem Wasser aufgekocht und mit 10 ml 10x Stammlösung des MOPS-Gel- und Laufpuffers versetzt. Die RNA-Proben in DEPC-Wasser wurden mit dem gleichen Volumen FA-Mix als Denaturierungspuffer und Stopperlösung versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert und gelelektrophoretisch für 1 - 1,5 Std. bei 10 V/cm aufgetrennt.

Verwendete Puffer:

DEPC-H_2O:	0,1% Diethylpyrocarbonat, autoklavieren
1x MOPS:	40 mM MOPS, 10 mM Na-Acetat x 3 H_2O, 1 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 7,0 eingestellt
RNA-Probenpuffer (FA-Mix):	66 % Formamid, 8 % Formaldehyd, 0,01 % Bromphenolblau, 0,1 mg/ml Ethidiumbromid, 1x MOPS-Puffer

5.2.1.2. Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte (OD)

Siehe 5.1.1.2

5.2.1.3. Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit einem Standard im Agarosegel

Siehe 5.1.1.3

5.2.2. Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

5.2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen mittels RNA-Clean (Hybaid)

Die Extraktion von RNA aus Gewebekulturzellen erfolgte nach einer modifizierten Methode der Guanidiniumisothiocyanat/Phenol/Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987) mit Hilfe von RNA-Clean (Hybaid).

Gewebekulturzellen wurden zweimal mit 10 ml 1x PBS gewaschen, nach der Zugabe von 5 ml Extraktionslösung pro 10 cm Petrischale mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt und das Lysat in Glaspipetten mehrmals auf- und abgezogen. Nach der Überführung der Homogenate in Corex-Röhrchen und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,1 Volumen Chloroform/ml Extraktionspuffer zugesetzt, geschüttelt und mindestens 5 min bei Raumtemperatur oder auf Eis inkubiert. Eine Phasentrennung in eine RNA enthaltende wässrige Oberphase, sowie eine Interphase und organische Phase mit DNA und Proteinen wurde durch 15 min Zentrifugation mit 12000x g bei 4°C erreicht. Die Präzipitation der RNA aus der abgenommenen wässrigen Phase erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol, 30 minütiger Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 12000x g und 4°C. Das RNA-Sediment wurde danach zweimal mit 800 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (5.1.1.2). Außerdem wurde die Qualität der isolierten Gesamt-RNA im Agarosegel (5.2.1) überprüft.

Bei einigen Aufarbeitungen wurden DNA-Verunreinigungen durch eine DNAse-Behandlung entfernt. Dazu wurde die RNA mit 1x DNAse-Puffer und 5 U DNAse I (RNAse frei) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

5.2.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen mittels RNeasy (Qiagen)

Die Vorbereitung der Puffer entsprach den Anweisungen des Herstellers. Die RNA-Isolierung ging von frischen oder bei -80°C gelagerten Zellkulturschalen bzw. -flaschen aus. Diese waren nach Entfernen des Mediums 2 mal mit PBS gewaschen und gut abgesaugt worden. Die Zellernte und -lyse in 100 mm Schalen (bis etwa 10^7 Zellen /Schale) wurde mit 600 µl Puffer RLT unter Einsatz eines Zellschabers durchgeführt. Mit einer Pipette wurden die Zellen gut vereinzelt. Das Lysat wurde auf eine beschriftete QIAshredder Säule geben, die in einem Auffanggefäß steckt. Anschließend wurde in einer Tischzentrifuge 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Homogenat wurde 1 Volumen 70% Ethanol geben und mit der Pipette gemischt. Dieses Gemisch wurde in 700 µl Aliquots auf eine RNeasy Mini Säule geben und 15 s bei mindestens 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen (15 s bei mindestens 10000 rpm). Für den DNAse-Verdau auf der Säule wurden 10 µl DNase mit 70 µl Puffer RDD vorsichtig durch Drehen gemischt. Dieser DNase-Inkubationsmix wurde direkt auf die Membran gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen (15 s bei mindestens 10000 rpm) und das Auffanggefäß verworfen. Dann wurde mit 500 µl Puffer RPE unter Benutzung eines neuen Auffanggefäßes gewaschen (15 s bei mindestens 10000 rpm). Danach folgte mit 500 µl Buffer RPE ein Waschschritt mit anschließendem Trocknen des Säulenmaterials (2 min bei maximaler Geschwindigkeit). Zur Elution mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser wurde die Säule auf ein frisches Reaktionsgefäß gesteckt und 1 min bei mehr als 10000g zentrifugiert. Wenn die Ausbeute 30 µg RNA überstiegen hatte, so wurde der Elutionsschritt wiederholt. Dann wurde die RNA-Konzentration durch Messung der $OD_{260/280}$ bestimmt und die Qualität durch Gelelektrophorese überprüft.

5.2.2.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen und Tumoren der Maus

Die verschiedenen Organe sowie Hauttumore (Papillome und Karzinome, die nach dem Promotions-Initiationsmodell (5.5.3) erzeugt worden waren) wurden der kurz zuvor getöteten Maus entnommen und in einem Eppendorfgefäß in Flüssigstickstoff eingefroren. Zur Zerkleinerung wurden die gefrorenen Organe und Tumore im Kugel-Dismembrator pulverisiert und direkt in 3-5 ml RNA-Clean gegeben. Hierbei richtete sich das Volumen an RNA-Clean nach der Größe der Gewebeprobe. Anschließend wurden 0,2 Volumen Chloroform zur Probe pipettiert und 15 s lang geschüttelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 5.2.2.1 beschrieben.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Maushaut wurden die Mäuse nach Rasieren des Rückenfells durch Genickbruch getötet. Die Rückenhaut wurde mit einer Schere abgetrennt und mit der Dermis nach unten auf ein Filterpapier aufgezogen. Zur Isolierung von RNA wurde die Haut sofort auf einen -70°C-Kühltisch gelegt. Die gefrorene Epidermis wurde mit einem Skalpell abgeschabt und direkt in RNA-Clean gegeben. Für drei Rückenhäute wurden dabei 5 ml RNA-Clean verwendet. Die Gewebe-Suspension wurde danach in einem Douncer homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat in 15 ml Corex-Gläser gegeben und mit 0,75 ml Chloroform versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 5.2.2.1 beschrieben.

5.2.3. Die Northern-Blot-Methode

Der Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen mittels komplementärer, radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte mittels der als Northern-Blot-Verfahren bezeichneten Methode (Alwine et al., 1977). Dabei wurden je nach Durchführung 10 – 14 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 10 - 14 µl zunächst in einem 1,4 %igem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und photographiert. Das Gel wurde anschließend dreimal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, für 20 min einer milden Alkalibehandlung in 50 mM NaOH, 10 mM NaCl unterzogen und 2 x 15 min in 1x GS-Puffer neutralisiert. Danach erfolgte der Transfer (Blot) in 1x GS-Puffer aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond-N^+, Amersham) mittels Kapillarkraft. Der Blotaufbau, die Hybridisierung und das Waschen wurden durchgeführt, wie es unter 5.1.5 beschrieben ist. Im Gegensatz zur Southern Blot-Methode erfolgte jedoch ein abschließender stringenter Waschschritt mit Waschlösung 3 bei 60°C.
Nachdem die Filter in Folie eingeschweißt waren und zur Detektion von Hybridisierungssignalen ein Röntgenfilm aufgelegt war, erfolgte die Exposition abhängig von der Stärke der Signale für 1 - 10 Tage bei -70°C.

Verwendete Puffer:

2 M $NaHPO_4$:	1 M Na_2HPO_4 x 2 H_2O mit 4 ml H_3PO_4, auf pH 7,2 eingestellt
Hybridisierungs-Puffer (H7-Mix):	0,5 M $NaHPO_4$, 1 % BSA, 7 % SDS, 1 mM EDTA
20x SSC-Puffer:	3 M NaCl, 0,3 M Natrium-Citrat, pH 7,0
FAI-Puffer:	50 mM NaOH, 10 mM NaCl
40x Genescreen (GS)-Puffer:	25 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (1:1), pH 6,5
Waschlösung 1:	2x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung 2:	0,5x SSC, 0,5 % SDS
Waschlösung 3:	0,1 % SSC, 0,5 % SDS

5.2.4. Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die Herstellung einzelsträngiger cDNA aus Gesamt-RNA durch reverse Transkription (RT) für eine nachfolgende Amplifikation von Zielsequenzen mittels PCR (5.1.4.1, 5.1.4.2) wurde mit dem GeneAmp RNA PCR Core Kit der Firma Perkin Elmer durchgeführt.
Dazu wurden 1 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 3 µl eingestellt und 10 min zur Auflösung von Sekundärstrukturen bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf 4°C wurden die Komponenten des Kits folgendermaßen hinzugegeben: 4 µl $MgCl_2$-Lösung, 8 µl dNTP (je 2,5 mM), 2 µl 10x PCR II-Puffer, 1 µl Oligo(dT)-Primer (50 µM), 1 µl RNase- Inhibitor (20 U/µl) und 1 µl MuLV (Murine Leukemia Virus)-Reverse Transkriptase (50 U/µl). Nach dem Mischen wurde der Reaktionsansatz zunächst 10 min bei Raumtemperatur belassen und dann im Thermocycler erst 15 min bei 42°C inkubiert und anschließend die Reverse Transkriptase 5 min bei 99°C inaktiviert.

5.3. Arbeiten zur Protein-Analyse

5.3.1. Allgemeines

5.3.1.1. Proteinisolierung aus Zellen

Zur Gewinnung von cytosolischem Protein aus Zellkulturschalen wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS pro 10 cm Schale gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschallbehandlung (Sonoplus Bandelin, Berlin; 10 Impulse, period. 40%) in Homogenisierungspuffer. Zellen von insgesamt 3 Schalen wurden hierzu in 400 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde unter dem Mikroskop überprüft. Durch Zentrifugation für 15 min bei 10000x g und 4°C wurde das cytosolische Protein von anderen Zellbestandteilen getrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, hiervon wurden 10 µl für die Proteinbestimmung (5.3.1.2) und 30 µl für die Western-Blot-Analyse aliquotiert.

Homogenisierungspuffer für:

Zytosolisches Protein: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA pH 7,4 + 10 µl Leupeptin/ml Puffer

Gesamtprotein: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA pH 7,4, 1% Tween + 10 µl Leupeptin/ml Puffer

5.3.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, daß im sauren Milieu die anionische Form des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 durch ionische Wechselwirkungen mit den kationischen Aminogruppen der Aminosäuren Arginin und Lysin, die im Protein enthalten sind, stabilisiert wird. Zusätzliche Stabilisierung erhält dieser Farbstoff-Protein-Komplex durch hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals Kräfte mit Histidin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninresten (Compton und Jones, 1985). Dabei verschiebt sich das Absorptions-maximum des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 von 465 nm nach 595 nm. Dies führt zu einer intensiven Blaufärbung.

Das eingesetzte Volumen der zu bestimmenden Probe sollte 1–10 µg Protein enthalten. Zunächst wurde mit einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) eine Eichgerade erstellt. Standard und Probe wurden jeweils mit H_2O auf 10 µl aufgefüllt. Hierzu wurden 990 µl Bradfordlösung (Bradfordkonzentrat von Biorad 1:4 (v/v) mit H_2O verdünnt) pipettiert und gemischt. Nach 60 min bei RT erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm in 1 ml Plastikküvetten. Der Proteingehalt einer Probe wurde dann anhand der BSA-Eichgerade ermittelt.

Bradfordlösung: Bradfordkonzentrat (Biorad) 1:4 (v/v) in H_2O verdünnt

5.3.2. Bestimmung der 12-Lipoxygenase-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung der 12-Lipoxygenase in transfizierten Zellinien erfolgte über die Quantifizierung der bei Inkubation des cytosolischen Proteins mit Arachidonsäure gebildeten 12-HETE über Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).

5.3.2.1. Oxygenierung von Arachidonsäure und Lipidextraktion

Zu 250 µg cytosolischem Protein in einem Volumen von 250 µl 12-LOX-Inkubationspuffer wurden 5 µl 5 mM Arachidonsäure (Endkonz. 100 µM) gegeben. Das Gemisch wurde 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 40 µl 1 N Ameisensäure pH 3.1 gestoppt. Durch Zugabe von 20 µl Trimethylphosphit und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die entstandenen Hydroperoxide (HPETEs) zu den korrespondierenden Hydroxiden (HETEs) reduziert. Nach Überführen der Proben in Zentrifugenröhrchen wurde einmal mit 250 µl 12-LOX-Inkubationspuffer und zweimal mit je 1 ml Essigsäureethylester nachgespült. Die Phasen wurden vereinigt, gemischt und für 10 min bei 4°C und 3000x g zentrifugiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die Extraktion mit 2 ml Essigsäureethylester wiederholt. Die organischen Phasen wurden vereint und in einer Speed-Vac-Apparatur unter Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 400 µl Ethanol für die Chromatographie aufgenommen und bis zur HPLC-Analyse eingefroren.

<u>Puffer für die Oxygenierungsreaktion:</u>

12-LOX-Inkubationspuffer:	50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4
Arachidonsäure-Substrat:	5 mM Arachidonsäure in Ethanol
Stoppuffer:	1 N Natriumformiat (NaCOOH) mit Ameisensäure auf pH 3,1 eingestellt
Reduktionsreagenz:	Trimethylphosphit ($C_3H_9O_3P$)

<u>Puffer für die Lipidextraktion:</u>

Extraktionsmittel:	Essigsäureethylester
Lösungspuffer:	750 µl 100% Ethanol + 4,25 ml 0,1 N Natriumformiat (mit Ameisensäure auf pH 3,1 eingestellt)

5.3.2.2. Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)-Analyse der 12-Lipoxygenase-Produkte

Die Analyse der im Aktivitätstest gebildeten HETEs erfolgte durch Straight-phase (SP)-HPLC. Die HETEn konnten aufgrund ihrer chromophoren Eigenschaften bei einer Wellenlänge von 235 nm detektiert werden. Die in EtOH gelösten HETE-Fraktionen wurden in der Speed-Vac-Zentrifuge unter Vakuum bis zur Trockene eingeengt und die Rückstände in 25 µl SP-Laufmittel aufgenommen. Die Lösung wurden manuell in das HPLC-System injiziert. Vor der Chromatographie wurde die ZorbaxSil-Säule bei einer Flußrate von 0,5 ml/min mit dem

SP-Laufmittel 4-6 h äquilibriert. Zur Überprüfung der Äquilibrierung wurden 22,5 µl Standardmix als externer Standart, bestehend aus je 200 ng 12-, 15- und 8-HETE sowie je 200 ng 13- und 9-HODE, aufgetragen und eluiert. Die Flußrate während der Chromatographie der Proben betrug 1,0 ml/min.

Der gebildete HETE-Typ wurde durch Vergleich der Retentionszeiten mit dem externen HETE/HODE-Standard bestimmt. Die Mengen an HETEn wurden anhand der Peakfläche bestimmt.

Daten zur SP-HPLC

Säulenmaterial:	ZorbaxSil
Säulenfüllhöhe.	250,0 mm
Säulendurchmesser:	4,6 mm
Gelpartikelgröße:	5,0 µm
Säulenvolumen:	4,2 ml
Flußrate:	1,0 ml/min
SP-Laufmittel:	n-Hexan : 2-Propanol : Essigsäure : H_2O = 98,5:1,5:0,1:0,025 (v/v/v/v)

5.3.3. Bestimmung der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen

5.3.3.1. Transfektion und Aufarbeitung der Zellen

Für die Transfektion mit den verschiedenen GFP-Fusionsproteinen wurden die SP1 #3-Zellen in einer Dichte von $4x10^5$/Objektträger (ICN, Eschwege) ausgesät. Die Objektträger befanden sich in Quadriperm-Schalen (Renner, Dannstadt) mit je 5 ml Medium pro Objektträger. Die Durchführung der Transfektion mit den GFP-Konstrukten ist in 5.4.2.3 aufgeführt.

Für die Fixierung der Zellen wurde 2% PFA in PBS bei 60°C gelöst und abgekühlt. Die Objektträger wurden für 5 min in PBS getaucht und mit Bleistift beschriftet. Dann wurden die Objektträger nochmals für 5 min in PBS getaucht, bevor sie für 60 min in 2% PFA in PBS bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Daran schloß sich ein zweimaliges jeweils fünfminütiges Waschen in PBS an. Anschließend wurde in einer feuchten Kammer 20 µl Hoechst Dye 33258 [2 µg/ml] zur Zellkernfärbung auf jedes Feld des Objekträgers gegeben und nach 5 min

wieder abgesaugt. Durch zweimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurde der überschüssige Farbstoff dann entfernt.
Zum Einbetten wurde Fluorescent Mounting Medium (Dako) verwendet. Die Objektträger wurden dunkel bei 4°C gelagert.

5.3.3.2. Aufarbeitung der transfizierten Zellen bei gleichzeitiger Färbung der Actin-Filamente

Zu Kernfärbung wurde der Hoechst Dye 33258 und zur Färbung der Actin-Filamente wurde Phalloidin-TRITC P1951 (Sigma, München) verwendet. Für die Transfektion mit den verschiedenen GFP-Fusionsproteinen wurden die Zellen in einer Dichte von $4x10^5$/Objektträger (ICN, Eschwege) ausgesät. Die Objektträger befanden sich in Quadriperm-Schalen (Renner, Dannstadt) mit je 5 ml Medium pro Objektträger. Die Durchführung der Transfektion ist in 5.4.2.3 aufgeführt.
Für die Fixierung der Zellen wurde 3,5% PFA in PBS bei 60°C gelöst und abgekühlt. Die Objektträger wurden für 5 min in PBS getaucht und mit Bleistift beschriftet. Dann wurden die Objektträger nochmals für 5 min in PBS getaucht, bevor sie für 5 min in 3,5% PFA in PBS bei 4°C und anschließend in frischer PFA-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Daran schloß sich ein zweimaliges jeweils fünfminütiges Waschen in PBS an.
Anschließend wurde in einer feuchten Kammer 20 µl Hoechst Dye 33258 [2 µg/ml] zur Zellkernfärbung auf jedes Feld des Objekträgers gegeben und nach 5 min wieder abgesaugt. Durch zweimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurde der überschüssige Farbstoff dann entfernt.
Dann wurden die Zellen mit einer Lösung von Phalloidin-TRITC [5 ng/µl, wobei die methanolische Stammlösung von 1 µg/µl mit PBS 200fach verdünnt worden war] für 40 min bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurde zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen.
Zum Einbetten wurde Fluorescent Mounting Medium (Dako) verwendet. Die Objektträger wurden dunkel bei 4°C gelagert.

5.3.3.3. Auswertung im Fluoreszenzmikroskop

Es wurden von jedem geeigneten Gesichtsfeld alle Fluorochrome mit den jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie eine Phasenkontrast-Darstellung photografiert. Dafür wurde ein Zeiss Axioskop 2 mit den Filtersätzen 488010 (GFP) sowie 488002 (Hoechst 33258) verwendet. Die Bilder wurden mit einer Zeiss AxioCam aufgenommen, die von der

Software AxioVision 2.0 gesteuert wurde. Die Auflösung betrug 1312x1030 Punkte bei 24 Bit Farbtiefe. Überlagerungsbilder wurden mit Adobe Photoshop 4.0 erstellt.

5.3.3.4. Auswertung im konfokalen Laserscanning-Mikroskop

Die Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop Zeiss LSM 510 wurden in Zusammenarbeit mir Herrn Dr. Spring, Abt. Strukturelle Genomanalyse (Prof. Franke), aufgenommen. Auch hier wurden von jedem Gesichtsfeld die jeweiligen Fluorochrome (ohne Hoechst 33258) sowie eine Phasenkontrast-Darstellung photographiert. Die Auflösung der Aufnahmen betrug 2048x2048 Punkte.Die verschiedenen Kanäle wurden für die Darstellungen mit dem Zeiss LSM5 Image Browser V2.80 und Adobe Photoshop 4.0 übereinandergelegt.

5.4. Zellkultur-Arbeiten

5.4.1. <u>Allgemeines</u>

5.4.1.1. Kultivierungsbedingungen für die verschiedenen Zellinien

<u>Medium für die Aussaat frisch isolierter primärer Keratinozyten:</u>

4 x MEM (minimal essential medium mit vierfacher Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen):

40 ml	10 x Hanks Salzlösung
16 ml	MEM-Vitamine (100 x)
32 ml	MEM Aminosäuren (50 x)
16 ml	MEM-nichtessentielle Aminosäuren (100 x)
5 ml	N-Acetyl-L-alanyl-glutamin (200 mM)
16 ml	Natriumbicarbonat (7,5 %)
5 ml	Penicillin/Streptomycin (100 x)

auf 500 ml mit H_2O bidest auffüllen

pH-Wert mit 1N NaOH auf pH 7,2 einstellen

Das Medium durch Zugabe von FKS zum Vollmedium komplettieren

Medium für primäre Keratinozyten:

4 x MEM low Ca^{2+}:

400 ml 1 x Hanks Salzlösung ohne Ca^{2+}, Mg^{2+} und Phenolrot

16 ml MEM-Vitamine (100 x)

32 ml MEM Aminosäuren (50 x)

16 ml MEM-nichtessentielle Aminosäuren (100 x)

4 ml N-Acetyl-L-alanyl-glutamin (200 mM)

16 ml Natriumbicarbonat (7,5 %)

5,3 ml Penicillin/Streptomycin (100 x)

4-6 ml NaOH (1N) (pH-Wert mit 1N NaOH auf pH 7,2 einstellen)

5 ml $MgCl_2$ (20 g/l)

1 ml Phenolrot (0,5%)

Das Medium durch Zugabe von FKS und low Ca^{2+} FKS (insgesamt 50 ml mit einer resultierenden Ca^{2+}-Konzentration von 0,05 mM) zum Vollmedium komplettieren.

Medium für BMGE-Zellen (KE-Medium):

400,0 ml Dulbecco's MEM (80%), 4,5% Glucose

5,0 ml 200 mM N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin

5,0 ml 100 mM Na-Pyruvat

100 ml FKS (20%)

1 µg/ml KE-Hormone:

1,0 ml Prolactinlösung (6 mg Prolactin in 1 ml Hormonsolvent; 416 µl davon in 5 ml DMEM)

1,0 ml Insulinlösung (1 ml Insulin in 2 ml DMEM)

2,0 ml Hydrocortisonlösung (2,5 mg Hydrocortison in 1 ml Ethanol)

Medium für MCA3D-Zellen:

91% Minimum Essential Alpha Medium, Gibco (#22561-021)

8% Fötales Kälberserum

Antibiotika

Medium für SP1 #3:

4xMEM low Ca^{2+} mit 10% teilweise entcalcifiziertem fötalem Kälberserum ad 0,05 mM Ca^{2+} (siehe Medium für primäre Keratinozyten)

+ 1 ng/ml Keratinocyte Growth Factor (KGF)

+ 4 µg/ml Hygromycin

Medium für EcoPack2 293:

90% DMEM mit 4,5 g Glucose

10% FKS

4 mM Glutamin

Pen/Strep

1 mM Na-Pyruvat

Medium für CHO-AA8-Luc:

90% EMEM α-Modifikation

10% Fötales Kälberserum (Tetrazyklinfrei)

2 mM L-Glutamin

Pen/Strep

100 µg/ml Hygromycin B

100 µg/ml G418

Die Maus-Keratinozyten (4.8.3) wurden im Brutschrank bei 34°C und 5% CO_2, alle anderen Zellinien (4.8.4) wurden bei 37°C und 5% CO_2 kuliviert.

5.4.1.2. Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

Unter dem Mikroskop wird mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei ein 16teiliges Feld einem Volumen von 0,1 µl entspricht. Die Verdünnung durch die Färbelösung muß berücksichtigt werden (Lindl, 1987).

5.4.1.3. Passagieren und Ablösen von Zellen

Die Zellen wurden nach Erreichen eines Monolayers in der Zellkulturflasche bzw. –schale zur Stammerhaltung oder für Versuchszwecke passagiert. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsinlösung (1 ml pro 10 ml Kulturschale) bis zu ihrem Ablösen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 3 - 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Volumen mit der gewünschten Zellzahl wurde in frische Zellkulturschalen/-flaschen überführt, die mit frischem Medium (37°C) gefüllt waren. Anschließend wurden die Zellen wieder im Brutschrank bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert.

Verwendete Lösungen:

PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4, pH 7,2
Trypsin/EDTA:	0,125 % Trypsin; 0,05 % EDTA in PBS

5.4.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellkulturen haben in der Regel eine endliche Lebensdauer und könnten daher nicht beliebig oft passagiert werden. Daher wurden mehrere Aliquots von Zellen einer möglichst niedrigen Passagennummer in flüssigem Stickstoff bei –196°C konserviert.

Als Konservierungsmedium wurde Wachstumsmedium mit einem Zusatz von 10% DMSO als Gefrierschutzmittel verwendet. Für die Konservierung wurde die Zellzahl auf 2–8 x 10^6 Zellen/ml Konservierungsmedium eingestellt. Die Zellen wurden in Aliquots von je 1-1,8 ml in Kryogefäße aufgeteilt und 2 h bei 4°C gelagert. Anschließend wurden sie mit 1°C/min auf –196°C gekühlt. Nach 2 – 4 Tagen wurde ein Aliquot aufgetaut und auf seine Vitalität getestet.

Das Auftauen von kryokonservierter Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Zur Entfernung von DMSO wurden die Zellen zentrifugiert (1000x g/RT/10min), das Zellsediment in eine Zellkulturflasche mit 10 ml Kulturmedium überführt und im Brutschrank inkubiert. Bei erfolgreicher Rekultivierung war die Zellkulturflasche (F [cm^2] = 75) nach 3-7 Tagen konfluent bewachsen.

5.4.1.5. Isolierung von Klonen

War nach einer gewissen Selektionszeit in der Kulturschale ein Einzelklon zu erkennen, wurde dieser mit Hilfe eines Klonierungsringes isoliert. Als Klonierungsringe dienten kleine

Glaszylinder, die unten offen und plan geschliffen waren. Sie wiesen einen Durchmesser von ca. 5 mm auf. Vorher wurden sie in einem geeigneten Behältnis auf eine dünne Schicht zähflüssigen Paraffins gestellt und autoklaviert. Nach dem Absaugen des Mediums und dem Waschen mit PBS konnte der Klonierungsring zur Umschließung des Klons verwendet werden. In den Ring wurde die Trypsinlösung gegeben und so die Zellen abgelöst. Diese wurden anschließend in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben und sukzessive in größere Kulturgefäße passagiert.

5.4.1.6. Ca^{2+}-Entzug aus Serum

Um einer Differenzierung der primären Mauskeratinozyten vorzubeugen, sollte die Ca^{2+}-Konzentration im Medium bei 0,05-0,08 mM liegen (Ca^{2+}-Konzentration im unbehandelten Normalserum: etwa 3 mM). Daher mußten dem fötalen Kälberserum durch Ionenaustausch ein Teil der Ca^{2+}-Kationen entzogen werden. Das verwendete Kationenaustauschsystem heißt Chelex (Biorad) und besteht aus einem Polystyrolharz mit Sulfonsäure-Gruppen.

Der Ionenaustausch begann mit der Regeneration der Sulfonsäure-Gruppen. Dazu wurden 200 g Chelex in eine Saugflasche eingewogen und in etwa 2 l H_2O bidest suspendiert und unter Rühren am Wasserstrahlvakuum entgast. Nach dem Absetzen wurde das Wasser bis zum Harzsediment vorsichtig abgesaugt und durch 1 l HCl (1 M) ersetzt und für 15 min gerührt. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgesaugt und das Harz 3-4 mal mit H_2O bidest gewaschen, bis der pH-Wert bei etwa 3 lag. Anschließend wurde das Ionenaustauschmaterial mit 1 l 0,5 M NaOH für 15 min gerührt und ebenfalls 3-4 mal mit H_2O bidest gewaschen. Danach wurde 4 mal mit 1x PBS gewaschen bis der pH-Wert bei 9 lag. Daraufhin wurde das FKS auf den Ionenaustauscher gegeben, von dem der Überstand möglichst genau abgesaugt wurde, und für 30-60 min gerührt. Auf einer separaten Saugflasche mit Fritte, die mit PBS angefeuchtet wurde, wurde das FKS wieder abgezogen, ohne daß das Chelex trocken läuft. Die Konzentration von Ca^{2+} mußte bestimmt und das low Ca^{2+} FKS steril filtriert werden. Vor Zugabe des FKS zum Kulturmedium mußte durch Zusetzen von unbehandeltem FKS die Ca^{2+}-Konzentration in den gewünschten Bereich gebracht werden. 200 g regeneriertes Chelex können dazu verwendet werden, 3 mal aus je 500 ml FKS das Ca^{2+} zu entziehen. Danach muß der Ionenaustauscher verworfen werden.

5.4.2. Transfektion von Plasmid-DNA in Zellen

5.4.2.1. Calciumphosphat-Methode

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in HACaT-, EcoPack2 293 oder HEK 293-Zellen wurde der auf der Calciumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1988) beruhende Mammalian Transfection Kit der Firma Stratagene verwendet. Die DNA wird dabei in Form von feinkörnigen Calciumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endozytose aufgenommen.
10 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA, vorgelegt in einem Volumen von 215 µl H_2O, wurde mit 25 µl der Lösung 1 und mit 250 µl der Lösung 2 versetzt, gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur zur Bildung der DNA/Calciumphosphatkristalle inkubiert. Zur Transfektion der HaCaT-Zellen wurden 1 x 10^6 Zellen (EcoPack2 293 und HEK 293: 1,4 x 10^6 Zellen) pro 100 mm Kulturschale ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 bis zur Subkonfluenz inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurden 5 ml frisches Medium zugesetzt. Danach wurde die DNA/Calciumphosphat-Lösung tropfenweise unter Schwenken der Kulturschale zugegeben und die Zellen für 16-24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Bei den HaCaT-Zellen erfolgte nach 24 h ein DMSO-Schock für 4 min bei Raumtemperatur. Der DMSO-Anteil am Medium betrug hierbei 28%. Die Transfektion wurde durch einen Mediumwechsel mit einem einmaligen PBS-Waschschritt beendet. Für die Transfektionskontrolle wurde der Vektor pcDNA3-β-Gal (4.7) verwendet.

5.4.2.2. Polyornithin-Methode

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen frisch auf 100 mm Schalen ausgesät, um eine Konfluenz von etwa 50-80% am Tag der Transfektion zu erreichen. Vor der Transfektion wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Hierauf wurde Transfektionslösung 1 bestehend aus 5,4 ml Medium pro 100 mm-Schale, 6,6 µl Polyornithin (12 µg/ml) sowie 30 µg der zu transfiziernden DNA zu den Zellen gegeben und 4 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurdem 5 ml Transfektionslösung 2 (28% DMSO im Medium) pro Schale hinzugegeben und 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 2mal mit Medium gewaschen und bei 37°C und 5% CO_2 für 48 h inkubiert, wobei nach 24 h das Medium nochmals gewechselt wurde. Für die Transfektionskontrolle wurde das Plasmid pcDNA3-β-Gal verwendet (4.7).

Zur Erhöhung der transienten Proteinexpression wurde mit 24 µg pAdVantage Vector (Vektor 50, 4.7) pro 30 µg Konstrukt-DNA kotransfiziert.

5.4.2.3. Fugene 6-Methode

Eine durchweg gute Transfektionseffizienz, vor allem bei der Zellinie SP1 #3, zeigte das Reagenz Fugene 6 von Roche. Es handelt sich dabei um ein Reagenz, das nichtliposomale Lipide enthält. Damit wurde die Zelline SP1 #3 vor allem zur Untersuchung der Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen auf Objektträgern (ICN, Eschwege) in Quadriperm-Schalen (Renner, Dannstadt) transfiziert.
Die Durchführung entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Pro Objekträger wurde 1 µg DNA und 6 µl Fugene 6 in 250 µl serumfreiem Optimem-Medium (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Nach 24-48 Stunden Transfektionszeit wurden die Zellen dann aufgearbeitet. Außerdem wurde diese Methode verwendet, um Verpackungszellinien für retrovirale Vektoren in 100 mm-Schalen zu transfizieren. Dafür wurden 2 Tage vor der Transfektion 1,1 x 10^6 Zellen ausgesät. Am Tag vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Schließlich wurden sie nach dem Protokoll des Herstellers mit 4 µg Plasmid-DNA und 12 µl Fugene6-Lösung transfiziert. Ein anschließender Mediumwechsel war nicht nötig.

5.4.2.4. Überprüfung der Transfektionseffizienz

Die Transfektion eines β-Galaktosidase-Expressionsplasmids und der anschließende Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität durch Anfärben der Rezipientenzellen diente bei allen Transfektionsexperimenten als Effizienzkontrolle. Nur die Zellen, welche die Plasmid-DNA (pcDNA3-β-Gal) aufgenommen haben, exprimieren die β-Galaktosidase, die X-Gal zu D-Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indol umsetzt. In Gegenwart einer Mischung aus Ferri- und Ferrocyaniden oxidiert dieses Indol zum Indoxyl, welches durch Selbstkopplung ein Indigoderivat bildet (Pearson et al., 1963; Marks, 1976). Diese fällt als blauer Niederschlag in der Zelle aus. Anhand der Anzahl der blau-gefärbten Zellen, kann die Transfektionseffizienz bestimmt werden.
Die mit pcDNA3-β-Gal transfizierten Zellen wurden 48 h nach Transfektion zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und im 10 ml Ethanol 5 min lang bei RT fixiert. In dieser Zeit wurde die Färbelösung hergestellt. Dazu wurden pro 60 mm Schale 3 ml PBS, 15 µl X-Gal (20 mg/ml DHF), 30 µl einer 0,5 M $K_4[Fe(CN)_6]$-Lösung, 30 µl einer 0,5 M $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung und

6 µl einer 1 M $MgCl_2$-Lösung gemischt. Anschließend wurde der fixierte Monolayer mit 5 ml PBS gewaschen und in Färbelösung 1 - 24 h lang (je nach Zellinie) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der blau gefärbten Zellen unter dem Mikroskop näherungsweise bestimmt. Der Quotient aus der Anzahl der blau-gefärbten Zellen durch die Gesamtzahl der Zellen (blau-gefärbt und nicht-gefärbt) multipliziert mit dem Faktor 100 ergibt die Transfektionseffizienz in Prozent.

Verwendete Lösungen:

X-Gal-Stammlösung:	2% (w/v) in Dimethylformamid, lichtgeschützt bei –20°C lagern
$K_3[Fe(CN)_6]$-Stammlösung:	500 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, lichtgeschützt bei +4°C lagern
$K_4[Fe(CN)_6]$-Stammlösung:	500 mM $K_4[Fe(CN)_6]$,·3 H_2O lichtgeschützt bei +4°C lagern
$MgCl_2$-Stammlösung:	1 M $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$, bei +4°C lagern

5.4.2.5. Stabile Transfektion von Zellen

Die Isolierung von stabilen Klonen nach einer Transfektion (5.4.2.1, 5.4.2.2) setzt voraus, daß sich auf dem zu transfizierendem Plasmid ein Gen für eine bestimmte Antibiotika-Resistenz z.B. für Geniticin befindet. Ist dies nicht der Fall, muß mit einem zweiten Plasmid mit Antibiotika-Resistenz-Gen (z.B. pSVneo) kotransfiziert werden. Zellen, die diese Antibiotika-Resistenz in ihr Genom eingebaut haben, wachsen dauerhaft in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums.

Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion (Schalen konfluent bewachsen) trypsiniert und verdünnt wieder ausgesät (1:3 - 1:10). Die Aussaat erfolgte mit Komplettmedium ohne Zusatz von Geniticin G418, um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Ab diesem Zeitpunkt wurde Komplettmedium unter Zugabe von Geniticin bis zu einer Endkonzentration von 100-400 µg Geneticin/ml Medium verwendet. Nach 4-5 Tagen begann das Absterben der nicht transfizierten bzw. nur transient transfizierten Zellen. Die Selektion konnte insgesamt 2-4 Wochen dauern. Während dieser Zeit durfte das Geniticin nicht abgesetzt werden. Diejenigen Zellklone, die übrig blieben hatten die Information für die Geniticin-Resistenz stabil in ihr Genom integriert.

Zum Passagieren und Ablösen der Einzelklone wurden Ringe aus Glas oder Teflon mit einem Durchmesser von 5-10 mm und einer Höhe von 5-7 mm mit einer Pinzette über die Klone gelegt. Danach wurden 50-100 µl Trypsinlösung (2.9) in die Ringe gegeben und für 5 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein Well einer 24 Wellplatte mit

G418/Komplettmedium (1 ml/Well) pipettiert. Nach 24 h wurde kontrolliert, ob die Klone angewachsen waren und das Medium gewechselt. Nachdem die Wellplatten konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen nach 3.19.1 in die nächst größeren Schalen und schließlich in 100 mm-Schalen transferiert. Die stabilen Klone wurden möglichst ständig oder zumindest in regelmäßigen Abständen mit G418 unter Selektiondruck gesetzt.

5.4.3. Infektion mittels retroviraler Vektoren

Um die Probleme einer geringen Transfektionseffizienz zu umgehen, wurde eine retrovirale Infektionsmethode etabliert. Damit dabei auch eine möglichweise nachteilige Wirkung der LOX-Expression auf die Zellen vermieden wird, wurde ein Tetrazyklin-induzierbares System verwendet. Ein solches System wird von Clontech unter dem Namen „RevTet-System“ angeboten. Die dafür notwendigen Vorbereitungen und Arbeiten sind im folgenden aufgeführt.

5.4.3.1. Einstellen der optimalen Konzentration für Selektionsantibiotika

Die zu infizierende Zellinie MCA3D wurde in einer Dichte von 5 x 10^5 Zellen in 4 ml Medium pro 60 mm Schale ausgesät und mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen inkubiert (G418: 200 – 2000 µg/ml; Hygromycin: 25 – 500 µg/ml; inklusive antibiotikafreie Kontrollen). Das Ausmaß des Absterbens wurde täglich notiert (Tötungskurve). Für G418 und Hygromycin wurden dann für die folgenden Konzentrationen diejenigen verwendet, bei denen die Zellen nach 7 Tagen Selektion gerade abgestorben waren.

5.4.3.2. Bestimmung des Verunreinigungsgrades des fötalen Kälberserums mit Tetrazyklin

Durch die Verwendung von Antibiotika in der Rinderzucht und die Sensitivität des Tet-on/off-Systems, kann eine Beeinflussung der Experimente durch das Kälberserum in den Zellkulturmedien nicht ausgeschlossen werden. Die Kontamination des Serums mit Tetrazyklin muß überprüft und im Zweifelsfalle ein speziell für das Tet-on/off-System vertriebenes Serum verwendet werden.

Für dieses Experiment wurde die Zelline CHO-AA8-Luc verwendet, bei der die Expression von Luciferase unter Zugabe von Tetrazyklin abgeschaltet werden kann. Die Zellen wurden sowohl in Standard-Serum als auch in Tet-on/off-System geprüftem Serum kultiviert. Letzterem wurde Doxyzyklin in Endkonzentrationen von 0 – 1 µg/ml zugesetzt und die Luciferase-Expression mittels Luciferase-Assay (5.4.3.3) untersucht.
Am ersten Tag dieses Versuches wurden die Zellen in einer Dichte von $3x10^5$/60 mm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und dabei die Kontrollzellen auf das tetrazyklinfreie Serum gesetzt. Am folgenden Tag wurde den Kontrollzellen das Doxyzyklin in den verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurde der Luciferase-Assay (5.4.3.3) durchgeführt.

5.4.3.3. Luciferase-Assay

Für die Bestimmung der Luciferase-Expression wurde das Luciferase-Assay-System von Promega verwendet. Die Vorbereitung der Puffer und Kitkomponenten erfolgte nach den Angaben des Herstellers, jedoch wurde vom Luciferase Assay Reagent, das das Luciferase-Substrat Luciferin enthält, nur die Hälfte eingesetzt.
Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurde der Zellrasen mit wenig Lyse-Puffer benetzt (50-150 µl/35 mm-Schale), mit einem Schaber entfernt, in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde es 10-15 s gevortext, 1-2 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. In Luminometer-Tubes, in denen 50 µl des Assay Reagents vorgelegt worden waren, wurden 5 µl des Überstandes überführt, kurz gevortext und sofort in einem Berthold-Luminometer gemessen. Zu Auswertung wurden in einem Diagramm die relativen Lichteinheiten (RLU) gegen die Doxyzyklin-Konzentration aufgetragen.

5.4.3.4. Virusproduktion

Zur Produktion von Retroviren, die eine bestimmte Erbinformation übertragen sollten, wurde die Verpackungszellinie EcoPack2 293 mit speziellen Vektoren mittels Calciumphosphat-Methode (5.4.2.1) oder Fugene (5.4.2.3) transfiziert. Diese Verpackungszellinie produziert nach 12-48 Stunden replikationsinkompetente Viren, die nur Maus und Ratte infizieren können.

5.4.4. Etablierung einer permanenten Zellinie aus primären Keratinozyten

5.4.4.1. Anhäufung von Spontanmutationen während der Kultur

Die Etablierung einer Zellinie setzt voraus, daß unter den Kulturbedingungen die Zellen sich teilen können und immortal sind. Dazu ist meist eine Veränderung des Genoms durch Mutation nötig. Bei einer langdauernden Kultivierung der primären Keratinozyten (Gewinnung siehe 5.5.1) kann es im Laufe der Zeit zu spontanen Mutationen kommen, die einen Wachstumsvorteil und eine Immortalisierung der betreffenden Zellen bewirken. Daher wurden die primären Keratinozyten unter low Ca^{2+}-Bedingungen in Kultur gehalten. Das Medium wurde 2mal wöchentlich gewechselt, die Deckel der Kulturschalen und die Bleche des Brutschranks wurden einmal pro Woche ausgetauscht. Als Medium wurde 4x MEM low Ca^{2+}/10 % FKS verwendet, der Inkubator wurde bei 34°C und 5 %CO_2 gehalten. Wenn sich ein Klon vermehrt hatte, wurde er wie in 5.4.2.5 beschrieben isoliert und expandiert.

5.4.4.2. Immortalisieren mit SV40-DNA

Zur beschleunigten Immortalisierung primärer Keratinozyten wurden diese mit SV40-large-T-antigen-DNA (pRNS-1; Plasmid 20) transfiziert. Das verwendete Transfektionsreagenz war DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Roche). DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat) ist ein kationisches Lipid, das nach Ultrabeschallung Liposomen bildet, die mit DNA spontan stabile Komplexe bilden. Diese Komplexe können mit der Zellmembran fusionieren und auf diese Weise die DNA in das Zytoplasma freisetzen.
Für die Transfektion wurden Schalen mit ca. 70 % Konfluenz benötigt. Es wurden für eine 100 mm-Schale eine Lösung aus 75 µl DOTAP [1 mg/ml] in 250 µl HBS (20 mM HEPES pH 7,4; 150mM NaCl) hergestellt. Diese Lösung wurde mit einer Lösung aus 25 µg pRNS-1 in 250 µl HBS gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden dem Gemisch 10 ml Kulturmedium zugesetzt und dieser Ansatz wurde in der Schale gegen das vorhandene Kulturmedium ausgetauscht. Nach 24 h wurden die Zellen mit frischem Medium ernährt. 48 h nach Beendigung der Transfektion wurde die Selektion mit 400 µg Geneticin/ml Medium gestartet. Nach 2 weiteren Tagen wurde die Geneticin-Konzentration auf 100 µg/ml herabgesetzt. Die Isolierung von Klonen sollte nach der Anleitung in 5.4.2.5 durchgeführt werden.

5.4.5. Comet-Assay

Ein besonders vielfältiges Instrument zur Bestimmung von Gentoxizität stellt der Comet-Assay dar; er wird auch als Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; single cell gel electrophoresis) bezeichnet. Die behandelten Zellen werden dabei in low-melting-Agarose eingegossen, lysiert und einer Gelelektrophorese unterworfen. Dabei wird die Wanderung von DNA-Fragmenten aus dem Kern heraus detektiert, die zu einem kometenartigen Erscheinungsbild führt. Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Reparaturprozesse sind die Hauptursachen für die bei der anschließenden alkalischen Behandlung freigesetzten Fragmente. Die Messung des DNA-Gehalts in Kopf und Schweif des Kometen dient der Messung der DNA-Schädigung.
Für den Comet-Assay wurde die permanente Mauskeratinozytenline Reb sowie primäre neonatale Keratinozyten verwendet. Diese Zellen wurden in Suspension für 2 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Zur Hemmung von Reparaturprozessen wurden für einige Versuche gleichzeitig 10 mM Hydroxyharnstoff (HU) und 1,8 mM 1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (Ara-C) hinzugefügt. Danach wurde das Inkubationsmedium durch Zentrifugation bei 4°C für 10 min entfernt und das Sediment in kaltem, frischem Medium resuspendiert. Zur Verhinderung von Reparaturprozessen bzw. von neuen DNA-Schäden wurde unter Rotlicht und auf Eis weitergearbeitet. 50 µl der Zellsuspensionen wurden mit 350 µl einer auf 42°C temperierten 0,7%igen Agarose-Lösung (Biozym, Hess. Oldendorf) vermischt und davon 50 µl auf gekühlte Comet-Slides (Trevigen, USA) gegeben. Nach dem Aushärten wurden die Zellen über Nacht lysiert. Die „unwinding"-Zeit zur Trennung und zum Entpacken der Doppelstränge im stark alkalischen Elektrophoresepuffer betrug 1 h. Die anschließende 20minütige Elektrophorese fand bei 25 Volt und 300 mA statt. Dann wurden die Objektträger getrocknet. Für die Auswertung wurden die Objektträger mit SybrGreen (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) angefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dazu wurde die Software Komet 3.0 (Kinetic Imaging, Bromborough, UK) benutzt und der Parameter Olive Tail Moment betrachtet. Er stellt das Produkt aus gewanderter DNA-Menge und dem Abstand zwischen Kopf und Schwerpunkt des Schweifes dar.

Verwendete Puffer:

Elektrophoresepuffer: 12 g NaOH/l, 0,372 g Na_2EDTA/l

Lysepuffer: 2,5M NaCl, 10mM Tris Base, 100mM Na_2EDTA, 1% Na-N-Laurylsarcosin, pH 10 einstellen
vor Gebrauch frisch zusetzen: 1% Triton X-100, 10% DMSO

5.5. Arbeiten mit Mäusen

5.5.1. Isolierung neonataler differenzierungsspezifischer Keratinozyten

5.5.1.1. Gewinnung von Keratinozyten aus neonataler Maushaut

Neugeborene NMRI-Mäuse (1-2 Tage alt) wurden dekapitiert, Extremitäten abgeschnitten und zuerst mit 70% Ethanol, dann mit einfach konzentriertem PBS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Nach Enthäuten der Mäuse wurden die Häute auf Plastikpetrischalen mit der Dermisseite nach unten ausgebreitet und nach 20 min auf eine kalte 0,25%ige Trypsinlösung übertragen. Dabei schwammen die Häute auf der Trypsinlösung mit der Dermisseite nach unten, ohne daß die Protease in direkten Kontakt mit der Epidermis gelangte. Nach 16 stündiger Inkubation bei 4°C wurden die Häute zum Abstoppen der Trypsinreaktion in 4x MEM/10% FKS gelegt.

Die Epidermis wurde anschließend mit Hilfe einer Pinzette von der Dermis abgezogen und in 4x MEM/10% FKS überführt. Die weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die vereinigten Epidermen wurden mit der Schere zerkleinert und für 25 min in Vollmedium langsam auf einem Magnetrührer gerührt. Mittels Filtration über zwei Nylonnetze (Maschen-durchmesser: 1 mm bzw. 200 µm) wurden die verbliebenen Zellaggretate von der Zellsuspension getrennt. Die Zellen wurden dann 10 min bei 400x g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Zellsuspension auf den Percollgradienten aufgetragen wurde.

5.5.1.2. Dichtegradientenzentrifugation von primären Keratinozyten

Keratinozyten verschiedener Differenzierungsstadien können aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt werden (Gross et al., 1987). Die epidermalen Zellsuspensionen wurden durch Zentrifugation über einen Percollgradienten in unterschiedlichen Fraktionen aufgetrennt. Percoll wurde durch Zusatz von 1/9 Volumen 10x PBS isoosmotisch gemacht. Die Verdünnungen (70%, 60%, 40%, 30%) wurden durch entsprechende Mischungen des isoosmotischen Percolls mit einfach konzentriertem PBS hergestellt. In 50 ml Polycarbonatröhrchen wurden jeweils nacheinander 12 ml 40% Percoll (Dichte: 1,05 g/ml), 12 ml 60% Percoll (Dichte: 1,075 g/ml) und 8 ml 70% Percoll (1,085 g/ml) untereinander geschichtet, ohne die einzelnen Lösungen zu vermischen. Die Zellen aus 5.5.1 wurden in 5 ml 30% Percoll (1,035 g/ml) auf den Gradienten aufgetragen. Anschließend wurde der Gradient bei Raumtemperatur für 25 min und 1200x g in einem Festwinkel-Rotor zentrifugiert. Die Beschleunigung erfolgte dabei schrittweise. Die Zentrifuge lief ohne Abbremsen aus. Die Keratinozyten sammeln sich je nach ihrer Dichte an den Interphasen der einzelnen Percollschichten. Dabei erhält man vier Fraktionen, wobei die Fraktion I Keratinozyten des *Stratum granulosum* enthält, die Fraktion II frühe granuläre Zellen und Keratinozyten des *Stratum spinosum* und die Fraktionen III und IV proliferationsfähige Keratinozyten des *Stratum basale.* Die einzelnen Subfraktionen (I-IV) wurden mit einer Pipette abgenommen und jeweils zweimal mit dem vierfachen Volumen an 1x PBS Percoll-frei gewaschen. Aus den so gewonnenen Zellfraktionen (I-IV) wurde die RNA nach 5.2.2 extrahiert.

5.5.2. <u>Gewinnung von hyperplastischer und chronisch-hyperplastischer Epidermis</u>

Zur Gewinnung von hyperplastischer Epidermis wurde auf die rasierte Rückenhaut von NMRI- oder B6D2F2xDBA/2-Mäusen 10 nmol TPA, gelöst in 100 µl Aceton, appliziert. Im Abstand von verschiedenen Zeitintervallen nach der Behandlung (5 min bis 4 Tage) wurden die Tiere getötet, ihre die Rückenhaut isoliert und auf einem Papierfilter ausgebreitet auf einem Kühltisch bei -70°C eingefroren.

Zur Gewinnung von chronisch-hyperplastischer Epidermis von NMRI-Mäusen wurde auf die rasierte Rückenhaut 14 Wochen lang zweimal wöchentlich 10 nmol TPA, gelöst in 100 µl

Aceton, gegeben. Anschließend wurden die Tiere getötet, ihre die Rückenhaut isoliert und auf einem Papierfilter ausgebreitet auf einem Kühltisch bei -70°C eingefroren.

5.5.3. Erzeugung von Papillomen und Karzinomen sowie Karzinogenese-Experimente unter Verwendung des Initiations-Promotions-Protokolles

Die Untersuchung der Tumorentwicklung in der Haut transgener Mäuse erfolgte mit Hilfe des Initiations-Promotions-Protokolles der Mehrstufen-Maushautkarzinogenese (Fürstenberger und Marks, 1981). Die Initiation erfolgte durch die einmalige Applikation von 100 nmol 7,12-Dimethyl-benz(a)anthracen (DMBA), gelöst in 100 µl Aceton, auf die 3 Tage zuvor rasierte Rückenhaut von 7 Wochen alten weiblichen Mäusen. Nach einer Woche wurde die Rückenhaut zweimal wöchentlich 25 Wochen lang mit 2,5, 5, bzw. 10 nmol des Tumorpromotors 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), gelöst in 100 µl Aceton, behandelt. Je nach verwendetem Mausstamm bildeten sich nach 7 bis 15 Wochen Papillome. Ein Teil dieser gutartigen Tumore bildete sich nach Beendigung der Promotionsbehandlung innerhalb von 20 Wochen zurück. Karzinome entstanden 25 bis 30 Wochen nach Beginn der TPA-Behandlung aus den nach dieser Zeit verbleibenden Papillomen, den sogenannten irreversiblen Papillomen.
Die ersten Papillome wurden direkt nach Beendigung der Promotionsbehandlung, d.h. 26 Wochen nach Initiation, geerntet. Die Tiere wurden durch Strecken getötet und die Papillome vorsichtig mit dem Skalpell entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Irreversible Papillome und Karzinome wurden 40 Wochen nach Beginn der Behandlung auf gleiche Weise entnommen. Alle entnommenen Tumore wurden histologisch charakterisiert.

5.5.4. Ödem-Experimente

Zur Untersuchung der Ödembildung (Wassereinlagerung) in der Maushaut wurde Mäusen 0,04 nmol, 0,2 nmol und 1 nmol TPA, gelöst in Aceton sowie Aceton alleine auf die Ohren appliziert. Nach 6 h wurden die Tiere getötet, die Ohren mit einem speziell angefertigten

Stanzeisen (∅ 0,8 cm) ausgestanzt und die Stanzbiopsien gewogen. Für jeden TPA-Wert wurden 6 Ohren (3 Tiere) untersucht.

5.6. Arbeiten mit histologischen Schnitten

5.6.1. Allgemeines

5.6.1.1. Einbetten von Gewebe für Paraffinschnitte

Das Gewebe wurde direkt nach der Entnahme in frisch angesetzter und filtrierter 4%iger Paraformaldehydlösung in PBS über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeproben gewässert, entwässert und in Paraffin eingegossen. Anschließend wurden von den Paraffinblöcken mit Hilfe eines Leica RM-2155 Gerätes 4 µm dicke Schnitte angefertigt.

5.6.1.2. Einbetten von Gewebe für Gefrierschnitte

Das Gewebe wurde direkt nach der Entnahme in mit Tissue-Tek (Vogel) gefüllte Kryostatschälchen (Vogel) gebracht und ausgerichtet. Dann wurden die Proben in iso-Pentan getaucht, das in einem Bad mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Als die Proben durchgefroren waren, wurden sie direkt in flüssigem Stickstoff gekühlt und dann bei -80°C gelagert.
Anschließend wurde von dem eingebetteten Gewebe im gefrorenen Zustand mit einem Leica CM3050 Schneidgerät 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden bei Raumtemperatur trocknen gelassen und bis zur weiteren Verwendung unter Vermeidung von Feuchtigkeitszutritt bei -80°C eingefroren.

5.6.1.3. Hämalaun-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

Für die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden Paraffinschnitte verwendet. Diese wurden durch 2maliges Waschen für je 10 min in Xylol, und durch die Ethanolreihe: 100% Ethanol (5 min, 2mal), 96% Ethanol (2 min, 2mal), 70% Ethanol (2 min, 2mal) sowie zwei-minütiges Waschen in Aqua bidest entparaffiniert. Anschließend wurde je nach gewünschter Intensität 4-6 min mit Hämalaun (Accustain hematoxylin solution Gill No. 2, Sigma) gefärbt und durch einminütiges Spülen mit Leitungswasser die Färbung gestoppt. Dann wurde 20 s In HCl-Ethanol differenziert und 10 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurde mit einer 0,5%igen Eosin-Lösung (Certistain Eosin G, Merck) für 1 min gefärbt. Diese Färbung wurde durch 3maliges Eintauchen in Aqua bidest beendet. Dann wurde die Probe sukzessive in 70%, 96%, 100% Ethanol und Xylol je 2mal für 2 min entwässert und in Eukitt mit einem Deckglas eingebettet.

5.6.2. Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten

Bei der Immunhistochemie von Gefrierschnitten wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte 2. Antikörper benutzt. Bei dieser Durchführung werden die bei –70°C gelagerten Gewebeschnitte zuerst auf Raumtemperatur gebracht, mit einem Pap-Pen (Vogel) umkreist, je nach verwendetem Antikörper (Tab. 4) wurde das Gewebe fixiert und 10 min in PBS gewaschen. Zur Verringerung unspezifischer Bindungen wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Blockierungspuffer inkubiert. Als Blockierungspuffer wurde je nach Antikörper BSA, Ratten- oder Ziegenserum verwendet (Tab. 4). Mit diesem Blockierungspuffer wurden auch die beiden Antikörper in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:200 verdünnt (Tab. 4). Der nächste Schritt war die Inkubation mit dem 1. Antikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist. Die Dauer der Inkubation betrug etwa 16 h bei 4°C in einer feuchten Kammer. Dann wurden die Gewebeschnitte 3mal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der 2. Antikörper auf die Schnitte gegeben und in einer dunklen, feuchten Kammer für 1 Stunde inkubiert. Dieser bindet spezifisch an dem 1. Antikörper. Ungebundene Antikörper wurden dann erneut durch dreimaliges Waschen in PBS für 5 min entfernt. Daran schloß sich eine Gegenfärbung mit Hämalaun an. Dazu wurden die Schnitte für 45 s in frisch filtriertes saures Hämalaun getaucht und anschließend für 1 min mit Leitungswasser gewässert. Dann wurden die Proben zur Differenzierung für 20 s in HCl-Alkohol getaucht und für 10 min mit Leitungswasser gewässert. Zum Schluß wurden die Gewebeschnitte mit Fluorescent Mounting Medium (Dako) und Deckgläsern eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

Tab. 4 Verwendung der Antikörper

Verwendeter Antikörper	**Verdün-nung**	**Blockierungspuffer**	**Fixierung des Gewebes**
guinea pig anti mouse Keratin 5	1:250	1% ELISA-BSA in PBS, 0,1% Tween 20	Bei –20°C für 10 min in Aceton
rabbit anti mouse involucrin	1:800	10% Ziegenserum in PBS	
Anti Guinea Pig Alexa Fluor 488	1:400	1% ELISA-BSA in PBS, 0,1% Tween 20	
Cy3-goat anti-rabbit IgG	1:400	10% Ziegenserum in PBS	

5.6.3. Immunhistochemie mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern an Gefrierschnitten

Bei dieser Durchführung werden die bei –70°C gelagerten Gewebeschnitte zuerst auf Raumtemperatur gebracht, mit einem Pap-Pen (Vogel) umkreist, das Gewebe fixiert (Tab. 5) und 10 min in PBS gewaschen. Dann wurden die endogenen Peroxidasen durch 10 minütige Inkubation in frisch angesetztem 3% H_2O_2 in Methanol inaktiviert. Danach wurde je 5 min in H_2O bidest und PBS gewaschen. Zur Verringerung unspezifischer Bindungen wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Blockierungspuffer inkubiert (Tab. 5). Mit diesem Blockierungspuffer wurden auch die beiden Antikörper in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:200 verdünnt (Tab. 5). Der nächste Schritt war die Inkubation mit dem 1. Antikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist. Die Dauer der Inkubation betrug etwa 16 h bei 4°C in einer feuchten Kammer. Dann wurden die Gewebeschnitte 3mal 10 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der 2. Antikörper auf die Schnitte gegeben und in einer dunklen, feuchten Kammer für 1 Stunde inkubiert. Dieser bindet spezifisch an den 1. Antikörper und ist mit einer Peroxidase gekoppelt. Ungebundene Antikörper wurden dann erneut durch dreimaliges Waschen in PBS für 10 min entfernt, bevor das Substrat für die Peroxidase hinzugegeben wurde. Es handelte sich hierbei um Diaminobenzidin (DAB, Sigma). Die Substratreaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und nach ausreichender Färbung durch dreimaliges je 3 minütiges Wässern gestoppt. Daran schloß sich eine Gegenfärbung mit Hämalaun an. Dazu wurden die Schnitte für 45 s in frisch filtriertes saures Hämalaun getaucht und anschließend für 1 min gewässert. Dann wurden die Proben zur Differenzierung für 20 s in HCl-Alkohol getaucht und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Entwässerung wurde durch Eintauchen in 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 100 % EtOH für je 2 min durchgeführt. Zum Schluß wurden die Gewebeschnitte für 5 min in Xylol getaucht und dann mit Eukitt (Vogel) und Deckgläsern eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit einem Ölimmersionsmikroskop.

Tab. 5 Herkunft der Antikörper und Verwendung

Verwendeter Antikörper	**Verdünnung**	**Blockierungspuffer**	**Fixierung des Gewebes**
rabbit anti mouse Ki-67	1:50	1% ELISA-BSA in PBS	5 min kalter Methanol, anschließend 10 min kaltes Aceton
Goat anti rabbit IgG-HRP	1:100	1% ELISA-BSA in PBS	

5.7. Sonstiges

5.7.1. Formel zur Umrechnung von Upm in g

$$g = 1{,}12 * r_{max} * \left(\frac{Upm}{1000}\right)^2$$

r_{max} = Maximaler Radius [mm]

5.7.2. Formeln für die Statistik und Fehlerrechnung

Rechenvorgang	Fehlerfortpflanzung
$y = x_1+x_2$	$\sigma_y^2 = \sigma_{x_1}^2 + \sigma_{x_2}^2$
$y = x_1/x_2$	$(\sigma_y/y)^2 = (\sigma_{x_1}/x_1)^2 + (\sigma_{x_2}/x_2)^2$

Standardabweichung $S = \sqrt{[n\Sigma x^2-(\Sigma x)^2]/[n(n-1)]}$

5.7.3. Computeranalysen von Sequenzdaten

Die Computeranalysen der DNA-Sequenzen wurden mit dem Rechenprogramm HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) auf dem Großrechner der Zentralen Datenverarbeitung des DKFZ durchgeführt.

6. ERGEBNISSE

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung epidermaler LOXn mit Schwerpunkt auf der 12R-LOX und der *e*12S-LOX in normaler, TPA-stimulierter und neoplastischer Epidermis.

6.1. Zelluläre Lokalisation von LOX-GFP-Fusionsproteinen

Es gibt Hinweise, daß LOXn in spezifischen Zellkompartimenten lokalisiert sind und in Abhängigkeit von extrazellulären Stimuli an bestimmte Strukturen translozieren können. Von der 5-LOX ist z.B. bekannt, daß sie nach Aktivierung mit Ca^{2+}-Ionophoren an die Kernmembran wandert (Woods et al., 1993). Die jeweilige Lokalisation in der Zelle kann Hinweise auf die Funktion der LOXn geben. Unter diesem Gesichtspunkt wurden die intrazelluläre Verteilung der verschiedenen LOX-Isoformen in Kerationzyten mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen untersucht.

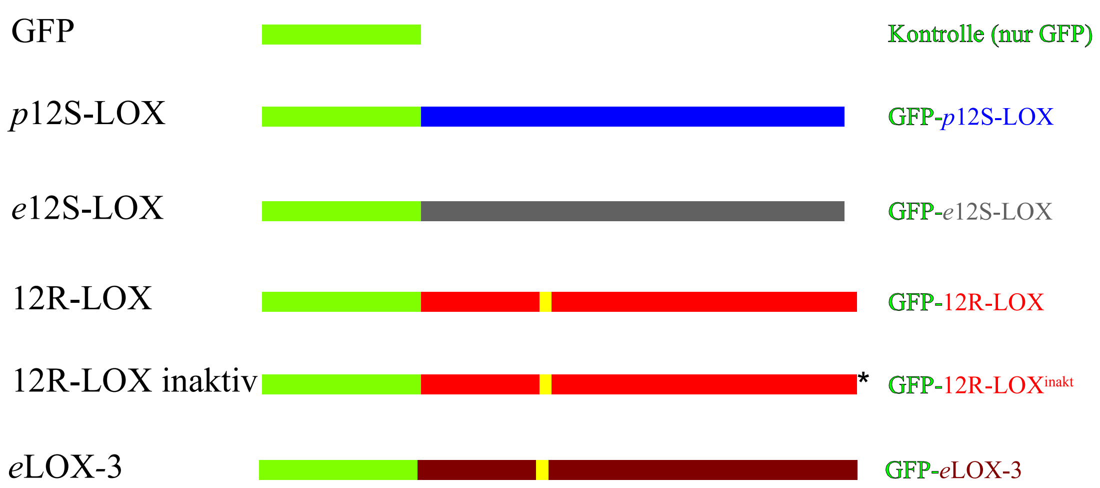


Abb. 10 Schematische Darstellung der verwendeten GFP-Konstrukte
*Das *-Symbol kennzeichnet die Mutation des C-terminalen Isoleucins zu Lysin (I701K), die zum Verlust der katalytischen Aktivität führt.*

Hierzu wurden Konstrukte verwendet, die eine Expression N-terminaler GFP-LOX-Fusionsproteine ermöglichen (Abb. 10). Mit diesen wurden Keratinozyten transfiziert und die Lokalisationen fluoreszenzmikroskopisch erfaßt (Abb. 11).

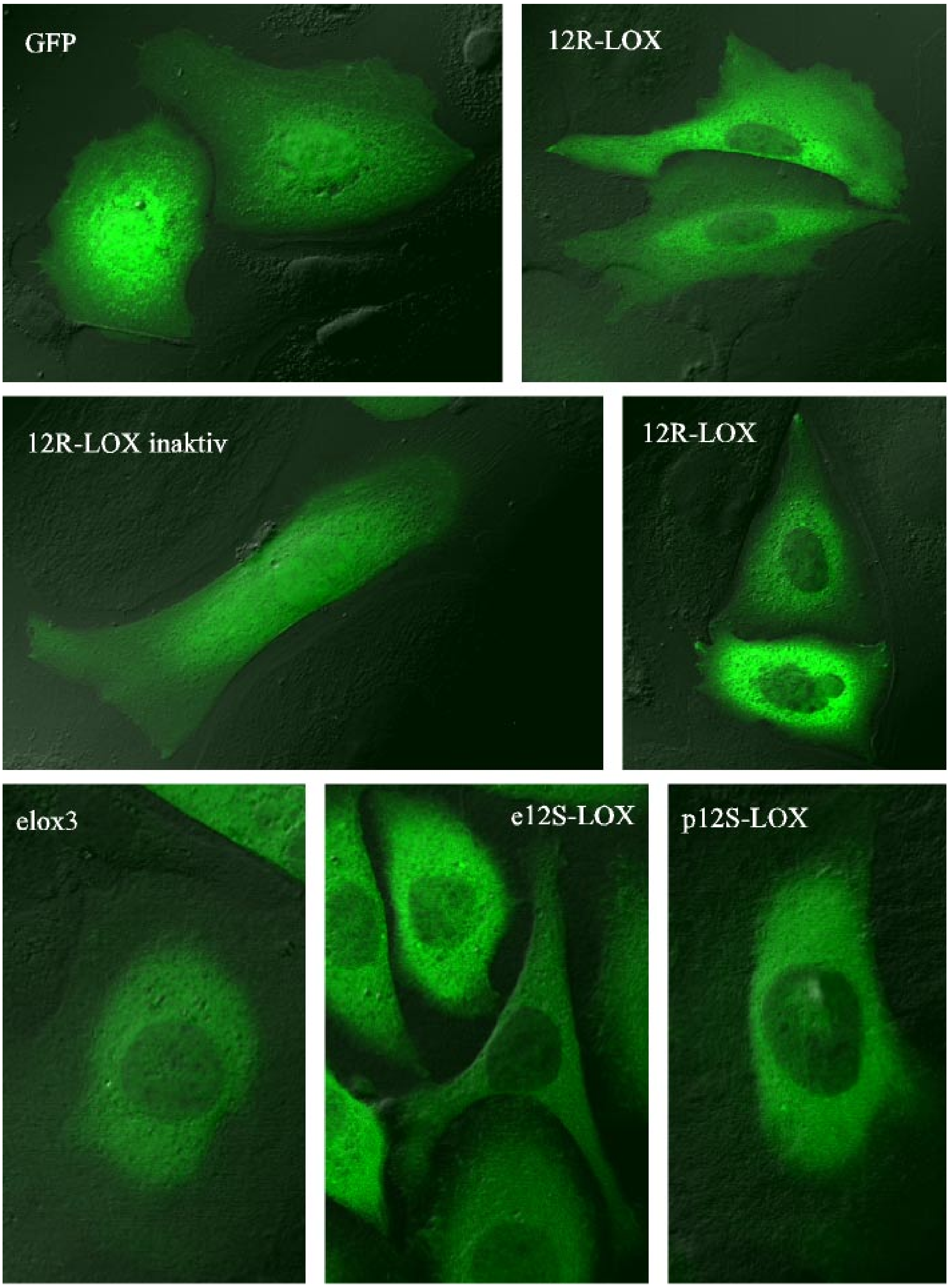


Abb. 11 Lokalisation der GFP-LOX-Fusionsproteine in Keratinozyten
SP1#3-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und am nächsten Tag mit Expressionsvektoren für GFP-Fusionsproteine mit den angegebenen LOXn mittels der Fugene6-Methode transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit 2%iger PFA-Lösung fixiert und in Fluorescent Mounting Me-

dium eingebettet (5.3.3.1). Für die Aufnahmen wurde ein konfokales Laserscanning-Mikroskop verwendet. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem geringen Anteil des Phasenkontrastkanals überlagert, um die Zellumrisse anzudeuten (5.3.3.4).

Man erkennt, daß das Markerprotein GFP alleine sowohl im Zytoplasma als auch im Kern gleichmäßig vorhanden ist. Das GFP-12R-LOX-Fusionsprotein kommt dagegen nur in geringen Mengen im Kern vor, so daß dieser scharf vom Zytoplasma, in dem das Fusionsprotein stark vertreten ist, abgegrenzt wird. Die zytosolische Verteilung ist jedoch nicht homogen. Es werden kernnahe Bereiche bevorzugt, wobei aber auch dort korpuskuläre Aussparungen beobachtet werden. An den Zellausläufern läßt sich dagegen öfter eine örtlich begrenzte Anhäufung des GFP-12R-LOX-Fusionsproteins nachweisen (unteres der beiden 12R-LOX-Teilbilder). Zerstört man die katalytische Aktivität der 12R-LOX durch Mutation des C-terminalen Isoleucins (GFP-12R-LOX inaktiv; I701K), so geht das Verteilungsmuster in den meisten – aber nicht allen - Zellen verloren. Auch die *e*LOX-3, *e*12S-LOX und *p*12S-LOX kommen vorwiegend zytoplasmatisch vor und ihre Verteilungsmuster ähnelt dem der 12R-LOX. Bei dem GFP-*p*12S-LOX-Fusionsprotein fiel auf, daß bei etwa einem Drittel der untersuchten Zellen ein Fluoreszenzsignal zu sehen war, das wie ein Schleier den Zellkern durchzieht.

Die vorwiegend kernnahe Lokalisation mit korpuskulären Aussparungen deutet auf eine Lokalisation der epidermalen LOXn am Endoplasmatischen Retikulum (ER) hin. Um dies zu prüfen, wurde das ER mit Hilfe des Markerproteins VIP36 (Dahm et al., 2000) angefärbt (Abb. 12).

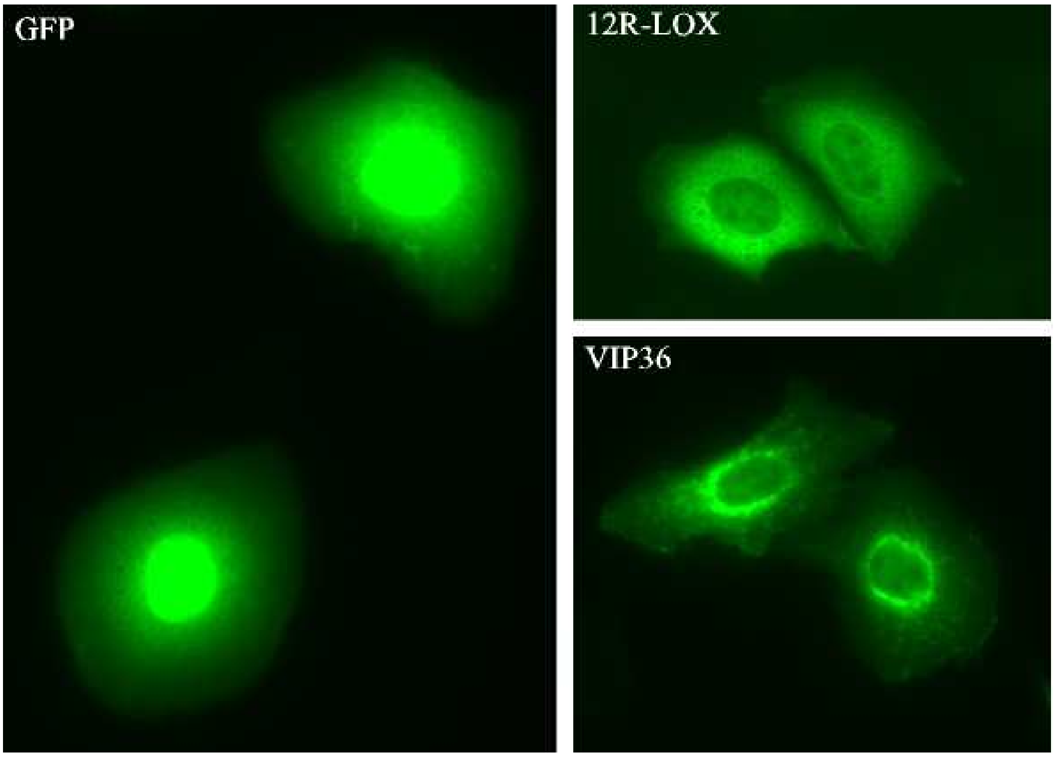


Abb. 12 Lokalisation von GFP alleine, GFP-12R-LOX und VIP36-GFP in Keratinozyten
SP1#3-Zellen wurden ausgesät, transfiziert und eingebettet, wie es in Abb. 11 beschrieben ist. Dann wurde die GFP-Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (5.3.3.3).

Abb. 12 zeigt für 12R-LOX- und VIP36-GFP kein identisches Fluoreszenzmuster. Damit kann eine Kolokalisation der 12R-LOX mit dem ER ausgeschlossen werden. Eine andere Möglichkeit wäre eine Affinität der LOXn zu Strukturen des Zellgerüstes wie den Actinfilamenten. Um diese Hypothese zu testen, wurden die Actinfilamente mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin gefärbt, dessen rote Fluoreszenz sich mit der GFP-Fluoreszenz zu einer Gelbfärbung überlagert, wenn eine Kolokalisation vorliegt (Abb. 13).

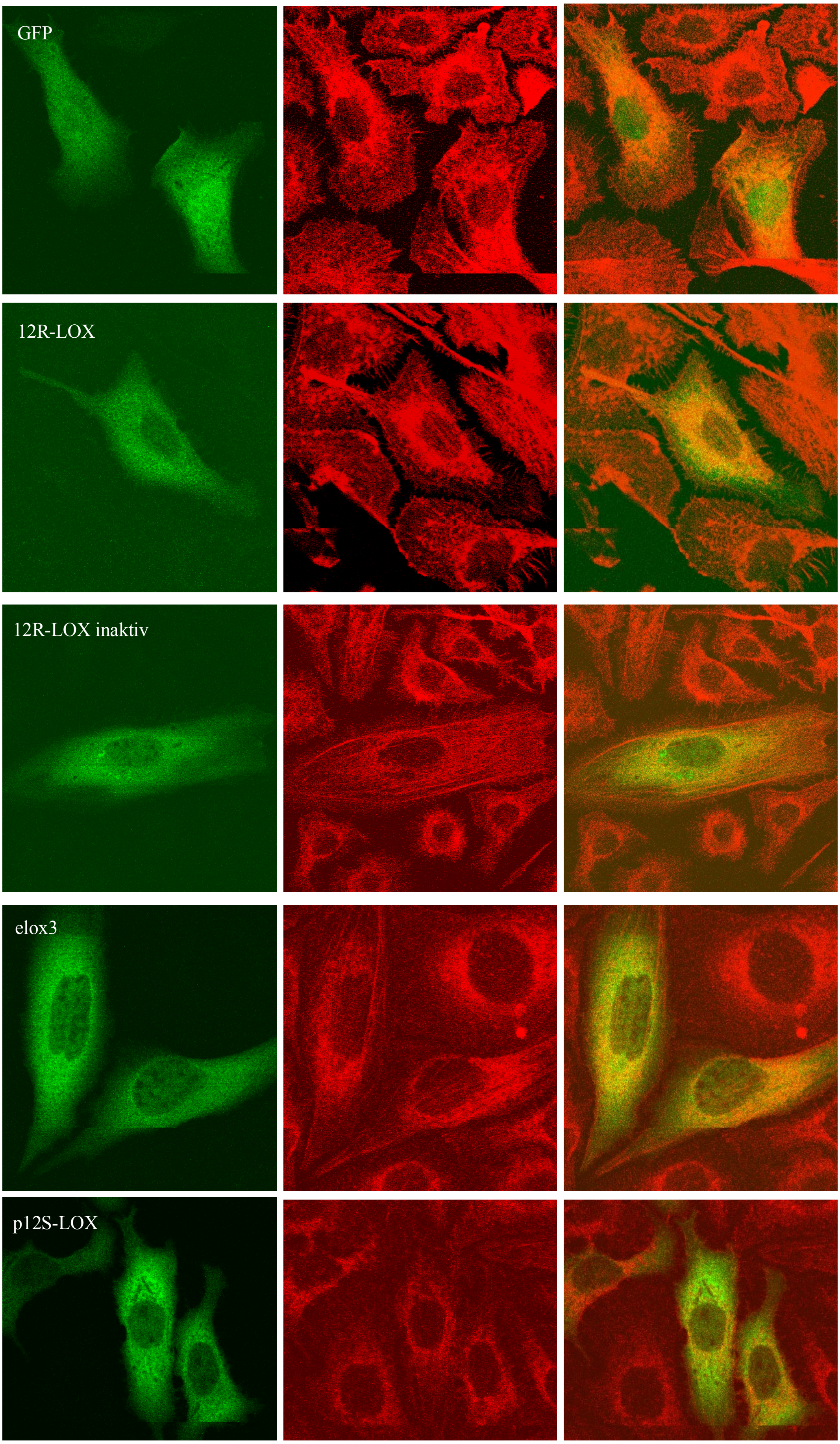

GFP
12R-LOX
12R-LOX inaktiv
elox3
p12S-LOX

Abb. 13 (vorherige Seite) Lokalisation von GFP und GFP-LOX-Fusionsproteinen (grün) und von Actin-Filamenten (rot) nach Phalloidin-Färbung
SP1#3-Zellen wurden ausgesät und transfiziert, wie es in Abb. 11 beschrieben ist. Nach 24 h wurden sie mit 3,5%iger PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurden sie mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin gefärbt und in Fluorescent Mounting Medium eingebettet (5.3.3.2). Die Objektträger wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops photographiert (5.3.3.4). Die erste Spalte zeigt die GFP-, die zweite die TRITC-Fluoreszenz und die dritte stellt eine Überlagerung dieser beiden Kanäle dar.

Abb. 13 zeigt, daß keine der getesteten LOXn mit Actin-haltigen Zellstrukturen kolokalisierte. Die faserigen Strukturen des Actin-Skeletts finden sich nicht in der Verteilung der GFP-LOX-Fluoreszenz wieder. Da beide aber bevorzugt im kernnahen Bereich zu finden sind, kommt es dennoch zu Gelbfärbungen, die aber nicht auf eine spezifische Kolokalisation hindeuten.

6.2. Überexpression von Lipoxygenasen in Keratinozytenlinien

Die Analyse der Funktion epidermaler LOXn in Keratinozyten *in vitro* ist erschwert durch die Tatsache, daß in den derzeit vorhandenen immortalen und tumorigenen Mauszellinien keines der Enzyme konstitutiv exprimiert ist oder sich durch externe Stimuli induzieren läßt. Darüber hinaus war es nicht möglich, aus primären Keratinozyten von Mäusen, welche die *e*12S-LOX unter der Kontrolle des Keratin 6-Promotors exprimieren, Linien herzustellen, die das Enzym exprimiert hätten. Aus diesem Grund wurde versucht, LOX-Überexpressionskonstrukte stabil in Keratinozyten einzubringen. Die Transfektion von Plasmid-DNA und die Transduktion mittels viraler Vektoren sind dafür geeignete Methoden.

6.2.1. <u>Konstrukte zur Überexpression von Lipoxygenasen in Keratinozytenlinien</u>

Es wurden Überexpressionskonstrukte hergestellt, die nach Transfektion von Keratinozyten für die Expression von LOXn sorgen und mit Hilfe einer Neomycin-Resistenz die Selektion stabiler Zellinien ermöglichen sollten. Mit Konstrukten, die den starken viralen Promotor pCMV benutzen, konnten nach Transfektion und Selektion in Gegenwart von Neomycin keine Zellen isoliert werden, in denen mit Hilfe von RT-PCR LOX-mRNA nachweisbar war. Entweder wurde in diesen Transfektanten, bedingt durch die starke LOX-Expression, eine Negativ-Selektion ausgelöst oder der pCMV wurde abgeschaltet. Daher wurden neue Konstrukte hergestellt, die die Expression unter der Kontrolle schwächerer, keratinozytenspezifischer Promotoren erlauben.

6.2.1.1. Konstruktion der Überexpressionsvektoren K14.12R-LOX (2492/39), K5.12R-LOX und K5.*p*12S-LOX sowie deren Testung

Der Überexpressionsvektor 2492/39 trägt Neomycin- und Ampicillinresistenz sowie die 12R-LOX-cDNA unter der Kontrolle des bovinen Keratin 14-Promotors (pK14) (Wang et al., 1997). Die Klonierung wurde mit den in 5.1.2 aufgeführten Standardmethoden durchgeführt und ist schematisch in Abb. 14 dargestellt.

Im Expressionsvektor pcDNA3.1(-) wurde der pCMV durch Schneiden mit Nru I/EcoRV entfernt und eine anschließende Religation der glatten Enden durchgeführt (→ 18/1). Über EcoRI/Hind III-Schnittstellen wurde der Promotor pK14 mitsamt seiner 3'-gelegenen Polyadenylierungsregion in das Konstrukt 18/1 eingefügt (→ 19/7). Anschließend erfolgte nach BamH I-Verdau der Einbau der 12R-LOX-cDNA (→ 2492/39). Die BamH I-flankierte 12R-LOX-cDNA wurde durch Amplifikation der kodierenden Sequenz, die das Plasmid 2347 enthält, mit dem Primerpaar ol 1257/1256 hergestellt. Anschließend wurde das Konstrukt durch Restriktionsanalyse und komplette Sequenzierung überprüft.

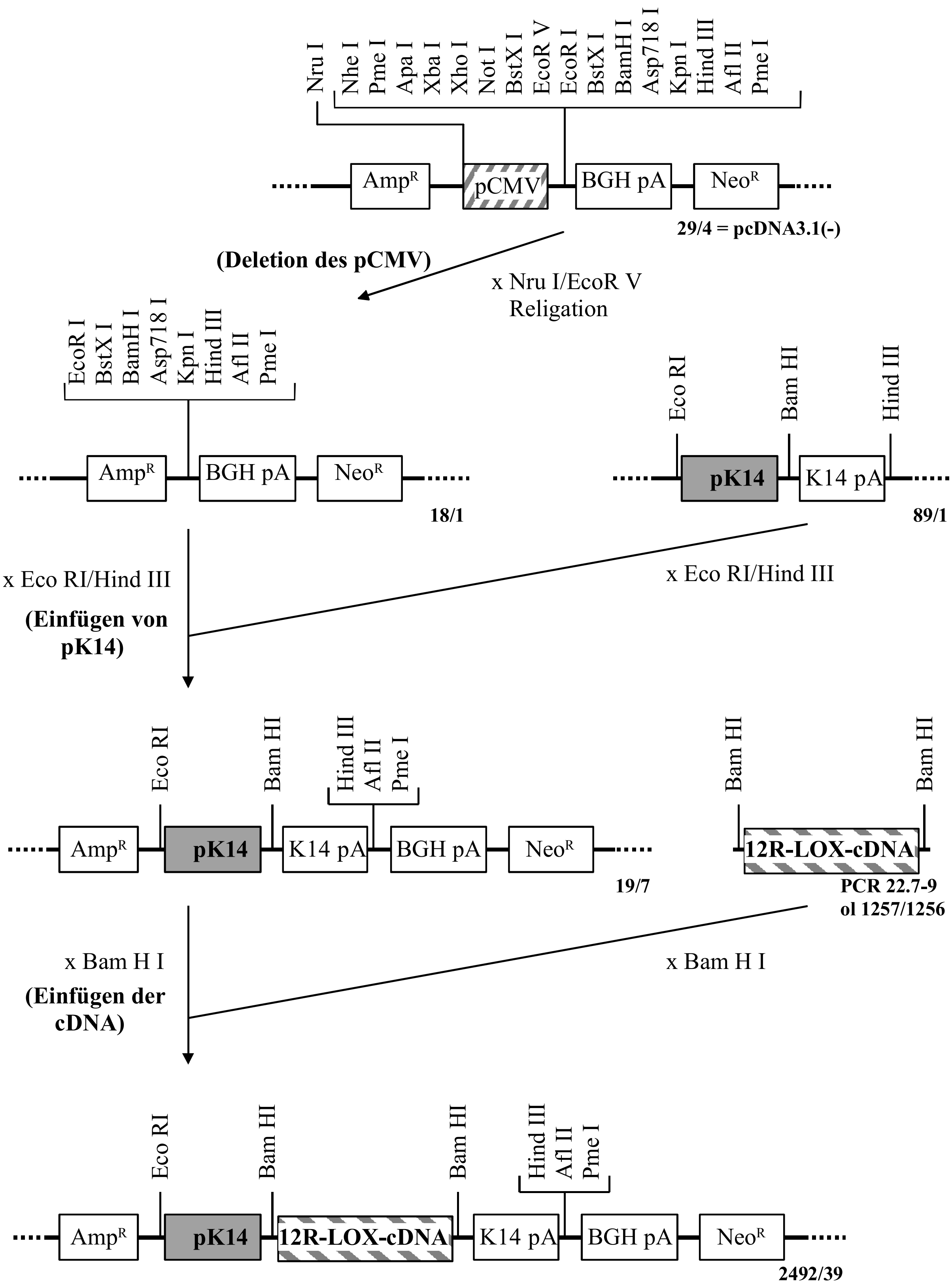


Abb. 14 Klonierungsschema für das Konstrukt K14.12R-LOX (2492/39) zur stabilen Überexpression der Maus-12R-LOX in Keratinozyten
Der pCMV wurde entfernt, anschließend wurde der pK14 samt pA-Sequenz eingefügt. In die Bam HI-Schnittstelle zwischen Promotor und pA-Sequenz wurde die 12R-LOX-cDNA insertiert. Der Vektor pcDNA3.1(-) erhielt die Bezeichnung 29/4, das Plasmid 89/1 (K14-

Promotorkonstrukt) wurde von Herrn Blessing (Mainz) zur Verfügung gestellt. Die PCR 22.7-9 wurde mit dem Advantage HF-Polymerase-Mix (Clontech) und den Primern ol 1257/1256 bei einer Annealing-Temperatur von 68°C (Temperaturprogramm HF68) durchgeführt. Neo^R=Neomycin-Resistenz, pCMV=CMV-Promotor, pK14=Promotor des Rinder-Keratins 14, pA=Poly-Adenylierungssequenz, BGH=Rinder-Wachstumshormon

Parallel dazu wurden mit K5.12R-LOX (Plasmid 4402) und K5.*p*12S-LOX (Plasmid 4401) weitere Überexpressionskonstrukte hergestellt. Hierbei wurde ein trunkierter Rinder-Keratin 5-Promotor mit einer Größe von 1,3 kb verwendet (Brown et al., 1998). Die Klonierungsschemata sind in Abb. 15 dargestellt.

Das promotorlose Plasmid 18/1 (siehe Abb. 14), das jedoch die Polyadenylierungssequenz des Rinder-Wachstumshormons enthielt, wurde unter Verwendung der Eco RI-und Hind III-Schnittstellen mit neuen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen (Abb. 15, Plasmid 2495). In die so geschaffenen Eco RI-und Xho I-Schnittstellen wurde der K5-Promotor eingefügt (→ 2496). Die kodierende Sequenz der Maus-*p*12S-LOX wurde mit dem Primerpaar ol 1281/1282 aus dem Plasmid 2011 und die der Maus-12R-LOX mit den Primern ol 1283/1284 aus dem Plasmid 2347 amplifiziert. Die Primer brachten dabei flankierende Xho I– und Not I-Schnittstellen in die PCR-Produkte ein. Dadurch wurde das Einfügen in das entsprechend geschnittene Plasmid 2496 möglich und die Überexpressionskonstrukte K5.*p*12S-LOX (4401/6) bzw. K5.12R-LOX (4402) konnten auf diese Weise komplettiert werden. Anschließend wurden die Konstrukte durch Restriktionsanalyse und komplette Sequenzierung überprüft.

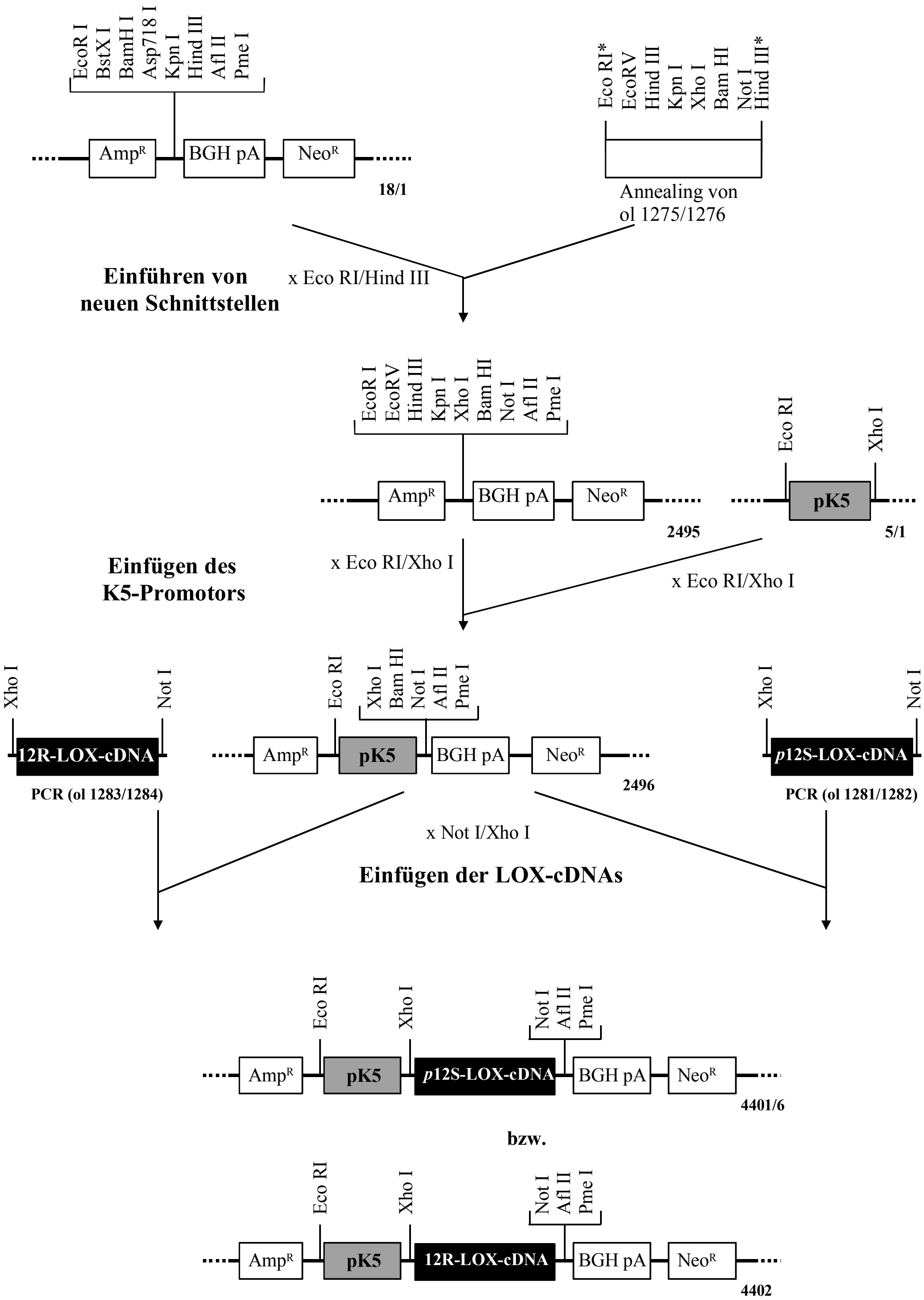


Abb. 15 Klonierungsschema für die Konstrukte K5.p12S-LOX (4401/6) und K5.12R-LOX (4402) zur stabilen Überexpression in Keratinozyten
Das promotorlose Konstrukt 18/1 wurde mit neuen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen, bevor der pK5 eingefügt werden konnte. Als letzes wurden die LOX-cDNAs insertiert. Die LOX-cDNAs wurden durch PCRs mit dem Advantage HF-Polymerase-Mix (Clontech) und den Primern ol 1281/1282 bzw. ol 1283/1284 bei einer Annealing-Temperatur von 68°C (Temperaturprogramm HF68) hergestellt. Neo^{R}=Neomycin-Resistenz, pCMV=CMV-Promotor,

pK5=Promotor des Rinder-Keratins 5, pA=Poly-Adenylierungssequenz, BGH=bovines Wachstumshormon

Das Überexpressionskonstrukt 2492/39 (K14.12R-LOX) wurde zur Funktionsüberprüfung transient und stabil in die Kuheuter-Epithelzellinie BMGE mittels Polyornithin-Methode transfiziert. Durch RT-PCR-Analyse war sowohl nach transienter als auch nach stabiler Transfektion nur eine äußerst schwache mRNA-Expression der 12R-LOX festzustellen (nicht gezeigt). Daher wurden die Transfektionsexperimente mit HaCaT-Zellen wiederholt, also menschlichen Keratinozyten, in denen der K14-Promotor aktiv ist. Es blieb jedoch, auch nach 3'-RACE-Analysen, bei unbefriedigenden Ergebnissen (nicht gezeigt).

6.2.2. Konstruktion retroviraler Vektoren und Infektion von Keratinozyten

Die negativen Erfahrungen mit LOX-Überexpression *in vitro* ließen zwei Probleme vermuten, nämlich eine zu geringe Transfektionseffizienz der Expressionskonstrukte und LOX-Expression als Selektionsnachteil. Diesen beiden Problemen sollte mit dem RevTet-System (Clontech) Abhilfe geschaffen werden. Dieses System nutzt retrovirale Vektoren, um mit hoher Effizienz stabil exprimierende Zellen zu erhalten. Diese Expression ist mit Hilfe von Tetrazyklin oder Doxyzyklin induzierbar bzw. reprimierbar (Tet on/Tet off), um Adaptation oder Selektion zu verhindern (siehe 2.2.1, 2.2.2).

Die kodierenden Bereiche der cDNAs der Maus-12R- und -*p*12S-LOX wurden zur Herstellung der Plasmide 304/26 und 307/2 in den Vektor pRevTRE kloniert (Abb. 16). Dazu wurden sie unter Einführung von Sal I- und Cla I- bzw Hind III- und Cla I-Schnittstellen amplifiziert, verdaut und in den entsprechend geschnittenen Vektor pRevTRE (Clontech, Heidelberg) eingefügt.

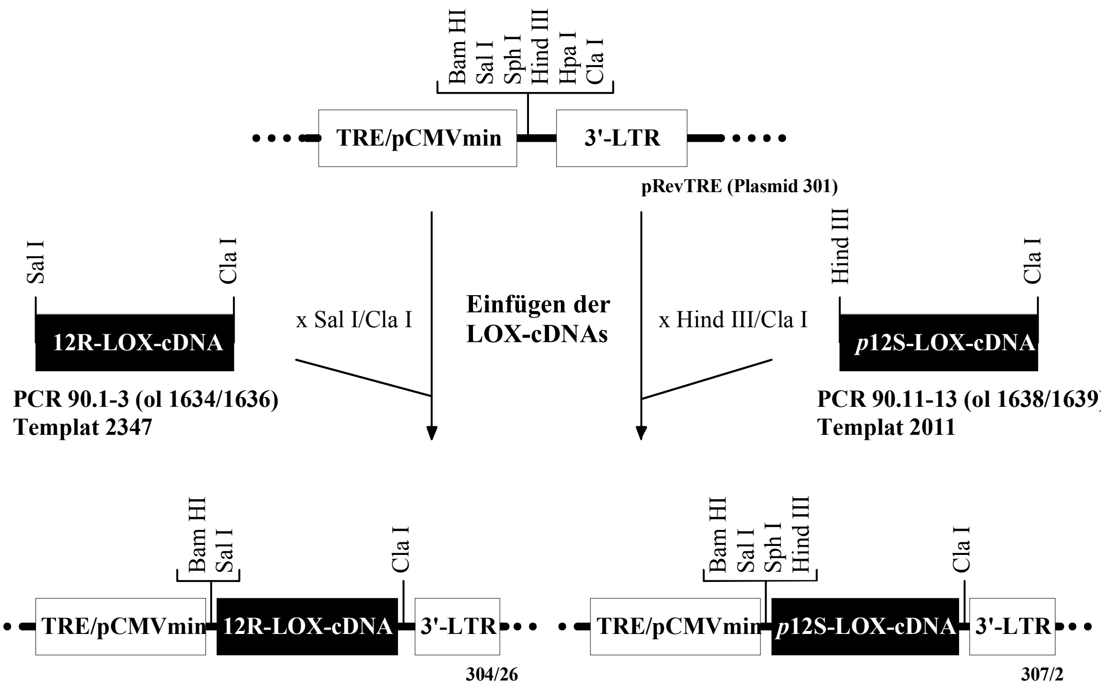


Abb. 16 Klonierungsschema für die Konstrukte 304/26 und 307/2 zur Herstellung retroviraler Vektoren
Der VektorpRevTRE erhielt die Bezeichnung 301. Die LOX-cDNAs wurden mittels PCR-Amplifikation mit Schnittstellen versehen und in den entsprechend geschnittenen Vektor eingefügt. Die PCR 90.1-3 und 90.11-13 wurde mit dem Advantage HF-Polymerase-Mix (Clontech) und den Primern ol 1634/1636 bzw. ol 1638/1639 bei einer Annealing-Temperatur von 68°C (Temperaturprogramm HF68) hergestellt. Die Vorlagen 2347 bzw. 2011 stammen von Herrn Peter Krieg. 3'-LTR=3'-Long Terminal Repeats, pCMVmin=minimaler CMV-Promotor, TRE=Tetrazyklin-responsives Element

Zur weiteren Vorbereitung wurden für die Zielzellinie MCA3D (4.8.3) die optimalen Konzentrationen für die Selektion mit G418 und Hygromycin anhand einer Tötungskurve bestimmt (5.4.3.1, nicht gezeigt). 600 µg G418 bzw. 200 µg Hygromycin pro ml Kulturmedium führten innerhalb von 7 Tagen zum vollständigen Abtöten nicht-resistenter Zellen. Für eine Induzier- bzw. Reprimierbarkeit mit niedrigem Hintergrund mußte das Kälberserum, das für die Kulturmedien verwendet wurde, frei von Tetrazyklin sein. Da Tetrazyklin zuweilen in der Rindermast angewendet wird, wurde das Ausmaß der Verunreinigung mit einer Reporterzellinie ermittelt (Abb. 17).

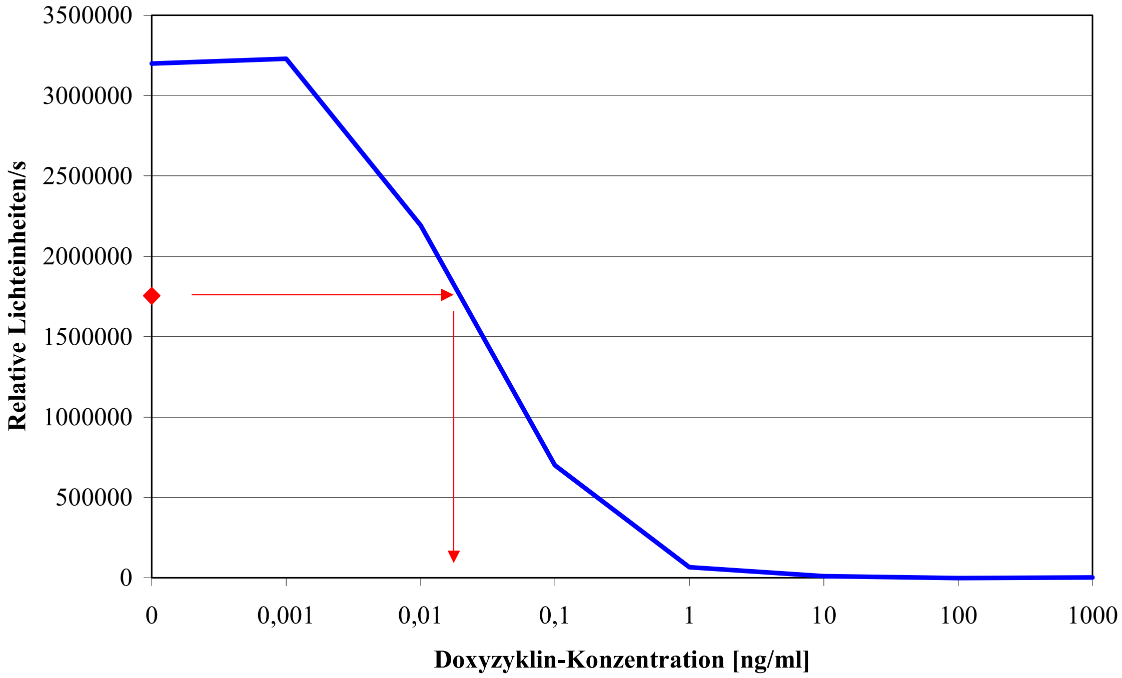


Abb. 17 Ermittlung des Tetrazyklin-Gehaltes im Kälberserum (rote Raute) als Doxyzyklin-Äquivalente (blaue Kurve)
CHO-AA8-LUC-Zellen (Tet-off) wurden in einer Dichte von $3x10^5$/60 mm-Schale ausgesät. Zur Ermittlung der Doxyzyklin-Äquivalente wurde ein Teil der Zellen am folgenden Tag auf tetrazyklinfreies Medium gesetzt und nach 24 h mit Doxyzyklin-Konzentration von 0-1 µg/ml inkubiert. Nach 2 weiteren Tagen wurde ein Luciferase-Assay (Promega) mit allen Schalen nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (5.4.3.3). Dabei wurden die Zellen mit einem Lyse-Puffer abgeschabt und zentrifugiert. 5 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Substrat gemischt und sofort vermessen.

Der Tetrazyklin-Gehalt bewegte sich in einer Größenordnung von 10 pg Dox-Äquivalenten/ml. Für das Tet-on-System wurde Tet-freies Serum verwendet, um eine ständig vorhandene Basis-Expression zu vermeiden.

Mit der Verpackungszellinie EcoPack2 293 wurden durch Fugene 6-Transfektion des Vektors pRevTetOn ecotrope Retroviren hergestellt, die das reverse Tet-Repressor-Protein übertragen sollten. Der virushaltige Überstand wurde für 24 h in verschiedenen Konzentrationen auf die MCA3D-Zellen gegeben und die Selektion mit G418 mit der oben genannten Konzentration von 600 µg/ml Medium nach weiteren 24 h begonnen. Nach 7 Tagen waren die Zellen in nichtinfizierten Kontrollschalen abgestorben, während mit steigendem Anteil virushaltigen Infektionsmediums die Anzahl der resistenten Klone zunahm. 20 dieser Klone wurden expandiert und in flüssigem Stickstoff konserviert.

Es wurden mehrere Infektionen der so erhaltenen MCA3D-Tet-on-Klone mit einem Luciferase-Virus durchgeführt, die aber nicht zufriedenstellend verliefen. Das Luciferase-Virus wurde nach Transfektion der Verpackungszellinie EcoPack2 293 mit einem käuflichen Plasmid erhalten. Für zukünftige Versuche wäre z.B. der Virustiter zu erhöhen.

6.3. Konditionaler Knockout der 12R-Lipoxygenase in der Maus

Neben der spezifischen Überexpression stellt die gezielte Ausschaltung eines Gens eine wichtige Methode zur Funktionsanalyse dar, insbesondere wenn der Knockout konditional gestaltet wird. Im folgenden wird der konditionale Knockout der 12R-LOX mit Hilfe des Cre/loxP-Systems (2.2.4) beschrieben.

6.3.1. Klonierung des Targeting-Vektors

Als Grundlage zur Erstellung des Targeting-Konstrukts diente der Cosmid-Klon 2463, der den gesamten Bereich des 12R-LOX-Gens umfaßt. Der Klon war aus einer genomischen Bibliothek des Mausstammes SV129/ola durch Screening mit einer spezifischen cDNA-Sonde isoliert worden. Das 12R-LOX-Gen wurde in 2 Teilen aus diesem Cosmid-Klon kloniert. Die einzelnen Schritte beeinhalteten Subklonierungen, Herstellung von PCR-Fragmenten und das Einbringen von Schnittstellen und Erkennungssequenzen mittels Insertion komplementärer Oligonukleotide. Dabei wurde ausgenutzt, daß Sal I- und Xho I-Schnittstellen, sowie BamHI- und Bcl I-Schnittstellen miteinander kompatibel, aber nach der Ligation nicht mehr schneidbar sind. Ziel der Klonierung war es, in Intron 7 die gefloxte Resistenzkassette und in Intron 8 die dritte loxP-Sequenz einzubringen. Im Intron 7 standen Acc I-Erkennungssequenzen und im Intron 8 eine BamHI-Schnittstelle zur Verfügung. Bei der Klonierung mußte die Linearisierbarkeit des Targeting-Konstruktes für die Elektroporation und die Möglichkeit einer detaillierten Southern Blot-Analyse der rekombinanten Klone gewährleistet sein. Die Homologiesequenz für das Targeting-Konstrukt hat einen Anteil von etwa 50 % am gesamten Gen. Durch die Sequenzierung der beiden Subklone, die größere Bereiche als die spätere Homologiesequenz enthielten, wurde die Basenabfolge des Gens fast vollständig entziffert.

Bei der Klonierung des Targeting-Vektors traten unerwartete Probleme auf, die dazu führten, daß die Klonierungsstrategie geändert werden mußte. So war der Anteil an repetitiven Sequenzen in Intron 2 zu hoch für die gewünschte Spezifität einer Targeting-Sequenz. Gelegentlich zeigten sich Abweichungen von Genkarten, die als Grundlage für die Planung der Klonierungsstrategie verwendet wurden. Auch aus Gründen verbesserter Selektion (Diphterietoxin A für die Negativselektion) oder risikoärmerer Rekombinationsvorgänge (Beginn der Homologiesequenz in einem Intron) wurde die Klonierungsstrategie geändert. Das schließlich angewendete Verfahren zeigen die Abb. 18 - Abb. 20.

Am Anfang stand die Herstellung des ersten genomischen Subklons 2481/1 aus einem 7,5 kb BamHI-Fragment des Cosmids 2463, das vom Beginn des Introns 2 bis zum Intron 8 reicht, und BamHI-geschnittenem Vektor pBlueskript KS^+ (2,97 kb) (Abb. 18). Im nächsten Schritt wurde der 3'-Bereich des klonierten Genabschnittes deletiert, um repetitive Sequenzen im Intron 2 zu entfernen (→Plasmid 2485/14). Dafür wurden die EcoRV-Schnittstellen im Klonierungsbereich des Vektors pBluescript und im Exon 3 des 12R-LOX-Gens geschnitten und die beiden glatten Enden direkt religiert. Um den Beginn der Homologieregion dennoch in einem Intron vorliegen zu haben, wurde an derselben Stelle wieder ein kurzes PCR-generiertes Stück eingefügt, dessen 3'-Ende nun abermals im Introns 2, diesmal aber stromabwärts der repetitiven Sequenzen liegt (→2490/1). Ein gewünschter Nebeneffekt war dabei das Zerstören der Xho I-, Acc I- und Sal I-Erkennungssequenzen des Vektors. Im Plasmid 2490/1 mußte anschließend in dem Teil des Klonierungsbereiches vom Vektors pBluescript, der am 3'-Ende des Genfragmentes liegt, eine BamHI-Schnittstelle deletiert und EcoR I- sowie Xho I-Erkennungssequenzen eingefügt werden (→2491/28).

Im nächsten Schritt wurden die Homologiesequenzen dieses Plasmids mit einem weiteren genomischen Subklon der 12R-LOX komplettiert, der im Plasmid 2482/1 vorlag (Abb. 19). Das Konstrukt 2482/1 wurde vorher durch die Ligation des PCR-Fragments (PCR 11.1), das von Intron 6 (ol 230) bis Intron 11 (ol 248) reicht, in den Vektor pCRII-TOPO erhalten. Bei der Vereinigung der beiden genomischen Subklone 2491/28 und 2482/1 mit Hilfe der Enzyme EcoR I und Acc I gingen 222 bp zwischen den beiden Acc I-Schnittstellen im Intron 7 verloren. In das Intron 8 dieses Konstruktes 2493/2 wurde nun die einzelne loxP-Sequenz eingefügt. Dabei wurde gleichzeitig die BamHI-Schnittstelle zerstört (→2498/26). Um die Religation des Plasmids 2493/2 zu verhindern, wurden die 5'-Phosphate mit einer alkalischen Phosphatase aus Krabben (SAP, Roche) entfernt. Da die einzufügende loxP-Sequenz durch das Annealing zweier synthetisch hergestellter Oligonukleotide erhalten wurde, mußten dort

die 5'-Hydroxylgruppen mit der Polynukleotid-Kinase (Roche) phosphoryliert werden, damit die erforderlichen Phosphatgruppen für die Ligation der DNA-Fragmente vorlagen.
Um die Insertion der gefloxten Resistenzkassette vorzubereiten (Abb. 20), wurde die Acc I-Schnittstelle im Intron 7 durch eine Sal I-Schnittstelle ergänzt (→4404/9). Im vorletzten Schritt wurde die gefloxte tk-neo-Resistenzkassette 2488/1 (erhalten von H. Reichardt, Abt. Schütz, DKFZ) mit ihren Xho I-Schnittstellen in die Sal I-Sequenz von 4404/9 eingefügt (→4405/89). Um die Religation der geschnittenen Plasmide 2498/26 und 4404/9 zu vermeiden, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Im ersteren Fall mußte dieses durch die Phosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppen der Oligonukleotide ol 1279 und 1280 ausgeglichen werden. Zum Schluß wurde der Negativselektionsmarker Diphterietoxin A (DTA) (Plasmid 2489, erhalten von Niamh Keon, Abt. Angel, DKFZ) an das 3'-Ende von 4405/89 angehängt. Nach jedem Klonierungsschritt wurden die Übergänge sequenziert, um die korrekte Insertion der Fragmente bzw. die fehlerfreie Basenabfolge der loxP-Sequenzen zu verifizieren. Das fertige Targeting-Konstrukt bekam den Namen 4406. Es konnte mit Xho I oder Not I für die Elektroporation linearisiert werden und ermöglichte die erforderlichen Screening-Strategien, die in den folgenden Kapiteln beschrieben sind.

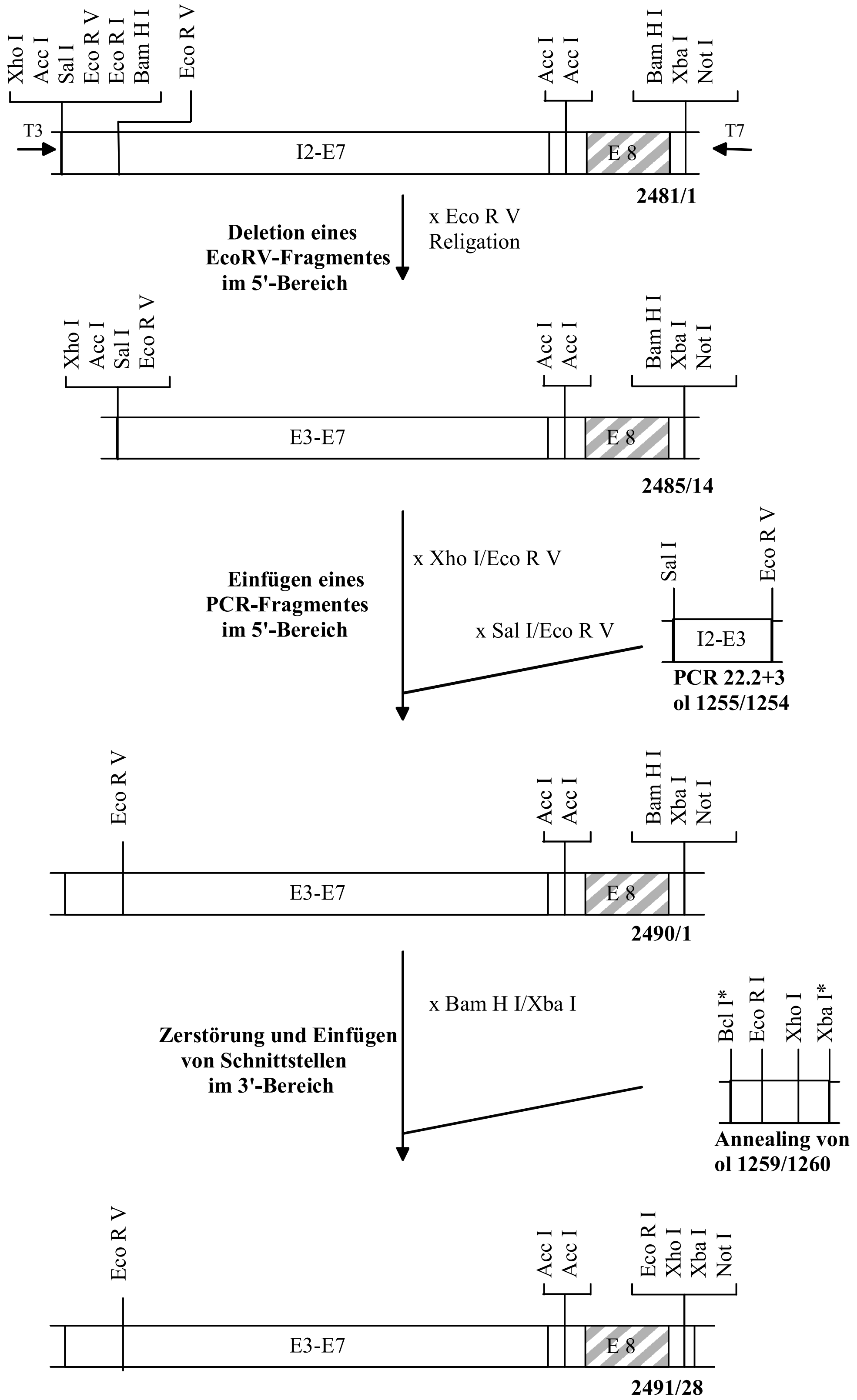


Abb. 18 *1. Teil des Klonierungsschema des Targeting-Vektors*
*Nach Einfügen des ersten genomischen Subklons in den Vektor pBluescript KS+ wurde der Beginn der späteren Homologieseqenz durch Deletion und anschließendes Einfügen eines kleineren Teilstücks an das Ende des Introns 2 gelegt. Anschließend wurden die Schnittstellen im 3'-Bereich den späteren Bedürfnissen angepaßt. * kennzeichnet Überhang des betreffenden Enzyms (keine vollständige Erkennungssequenz!); E = Exon; I = Intron*

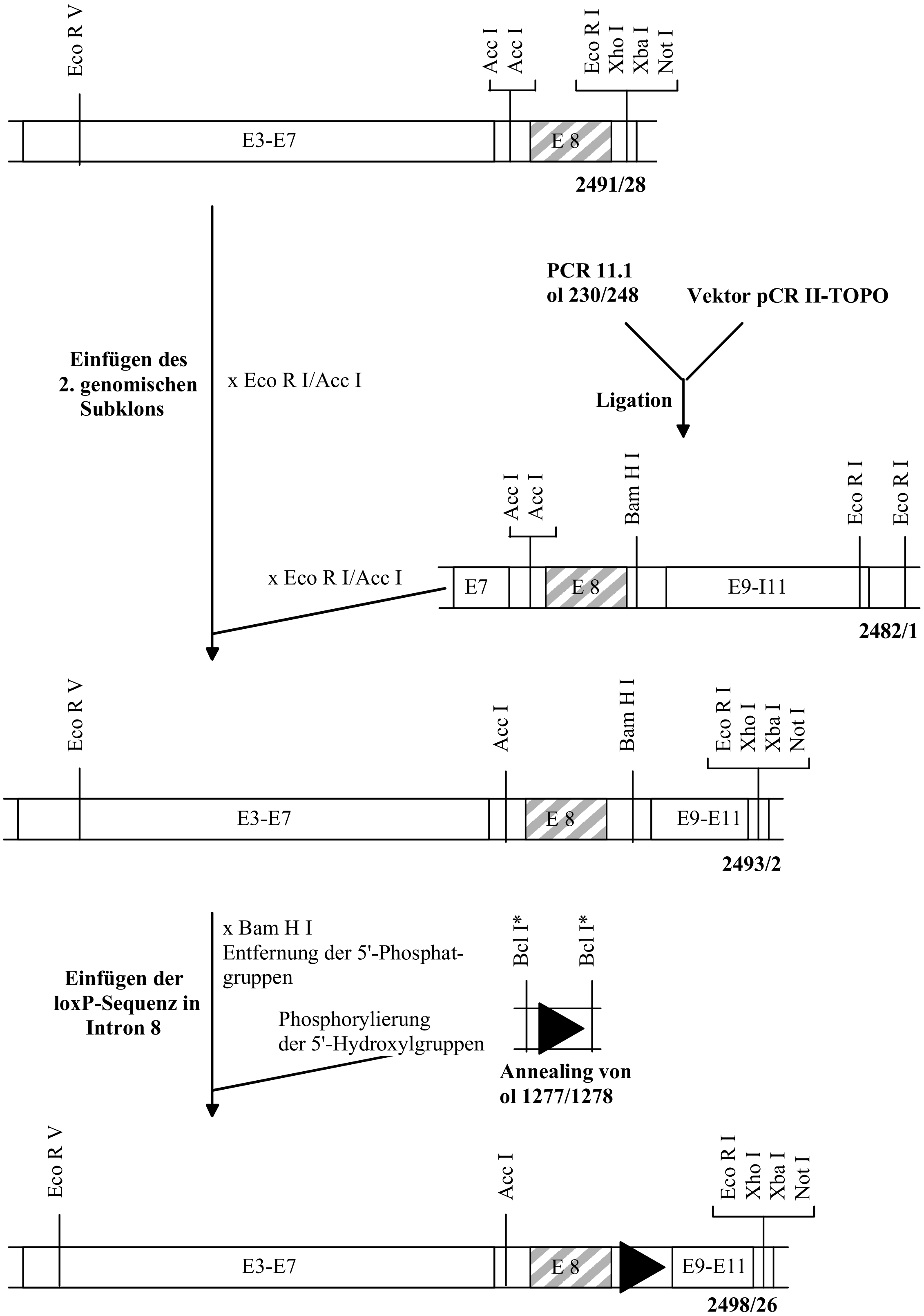


Abb. 19 2. Teil des Klonierungsschema des Targeting-Vektors
*Es wurde ein zweiter genomischer Subklon über PCR generiert (Polymerase Expand Long von Roche mit den Primern ol 230/248 und dem Temperaturprogramm ko1) und über EcoRI- und Acc I-Schnittstellen in das Plasmid 2491/28 eingefügt. Danach wurde eine loxP-Sequenz in das Intron 8 eingefügt. Das schwarze Dreieck symbolisiert die loxP-Sequenz. * kennzeichnet Überhang des betreffenden Enzyms (keine vollständige Erkennungssequenz!); E = Exon*

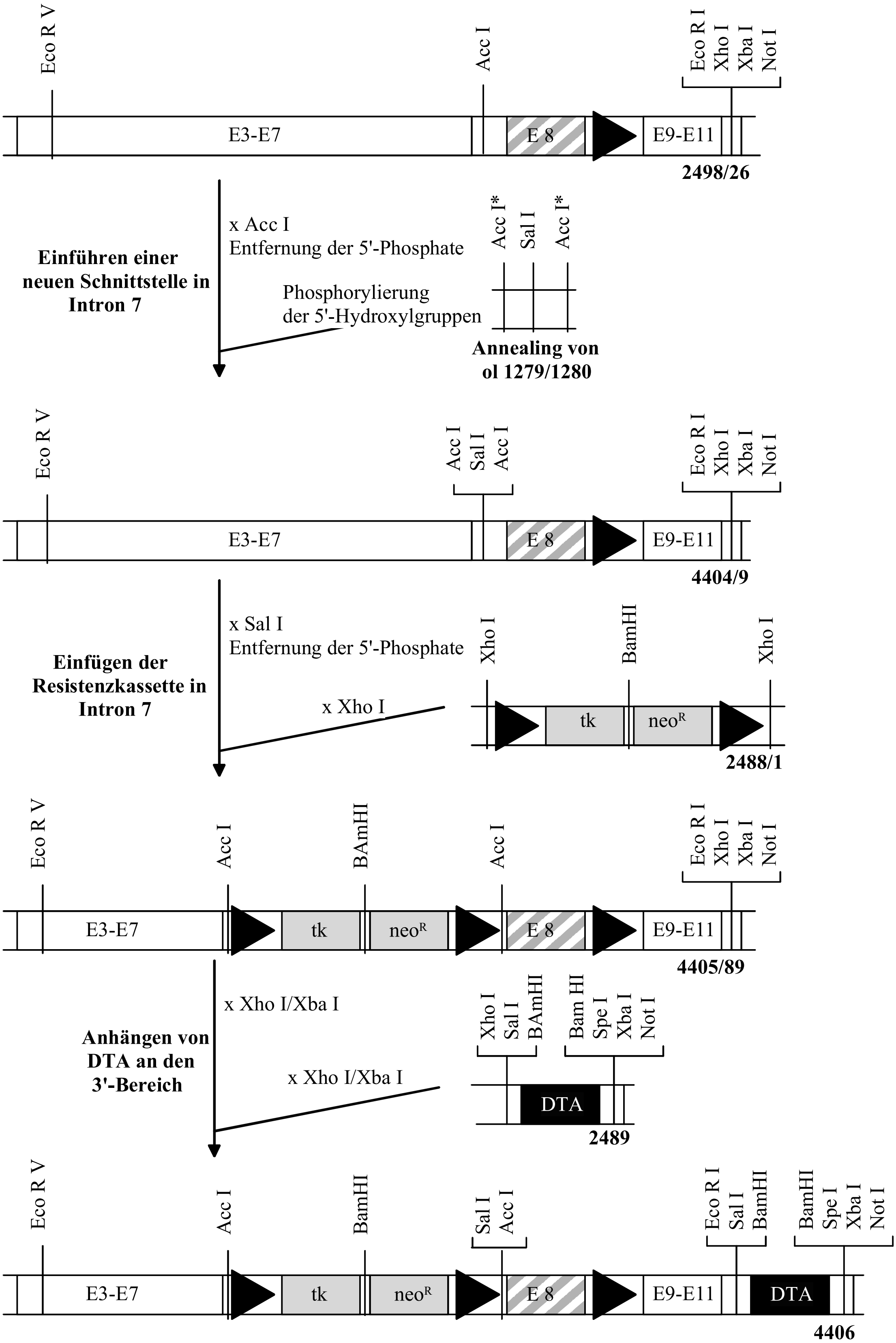


Abb. 20 3. Teil des Klonierungsschema des Targeting-Vektors
*In die Acc I- wurde eine Sal I-Schnittstelle eingefügt, in die später die tk-neo-Resistenzkassette insertiert wurde. Das Anhängen des Diphterietoxins A (DTA) in den 3'-Bereich komplettierte den Targeting-Vektor 4406. * kennzeichnet Überhang des betreffenden Enzyms (keine vollständige Erkennungssequenz!); tk = Thymidinkinase; neo^R = Neomycin-Resistenz; E = Exon*

Der Targeting-Vektor 4406 enthält eine Homologiesequenz von 5,85 kb, die von der Selektionskassette aus tk und neo^R in einen Arm von 2,95 kb (5'-Bereich) und einen Arm von 2,9 kb (3'-Bereich) unterteilt wird (Abb. 21). neo^R vermittelt Resistenz gegenüber Neomycin und dient der Positivselektion nach der homologen Rekombination, tk codiert für die Thymidin-Kinase und soll für die Negativselektion mit Gancyclovir nach Cre-Elektroporation der ES-Zellen benutzt werden. Die Selektionskassette wird von loxP-Sequenzen flankiert. Die dritte loxP-Sequenz wurde in Intron 8 in eine BamHI-Schnittstelle insertiert, die dabei deletiert wurde. Der Gen-Knockout findet also durch Deletion des Exons 8 statt, das für die Eisenbindungsdomäne der LOX kodiert. Am Ende der Homologiesequenz wurde die cDNA für das Diphterietoxin A (DTA) eingefügt, das für das Absterben von Klonen mit nichthomologer Rekombination sorgen sollte, ohne daß die Gabe eines zusätzlichen Antibiotikums nötig gewesen wäre (Abb. 21).

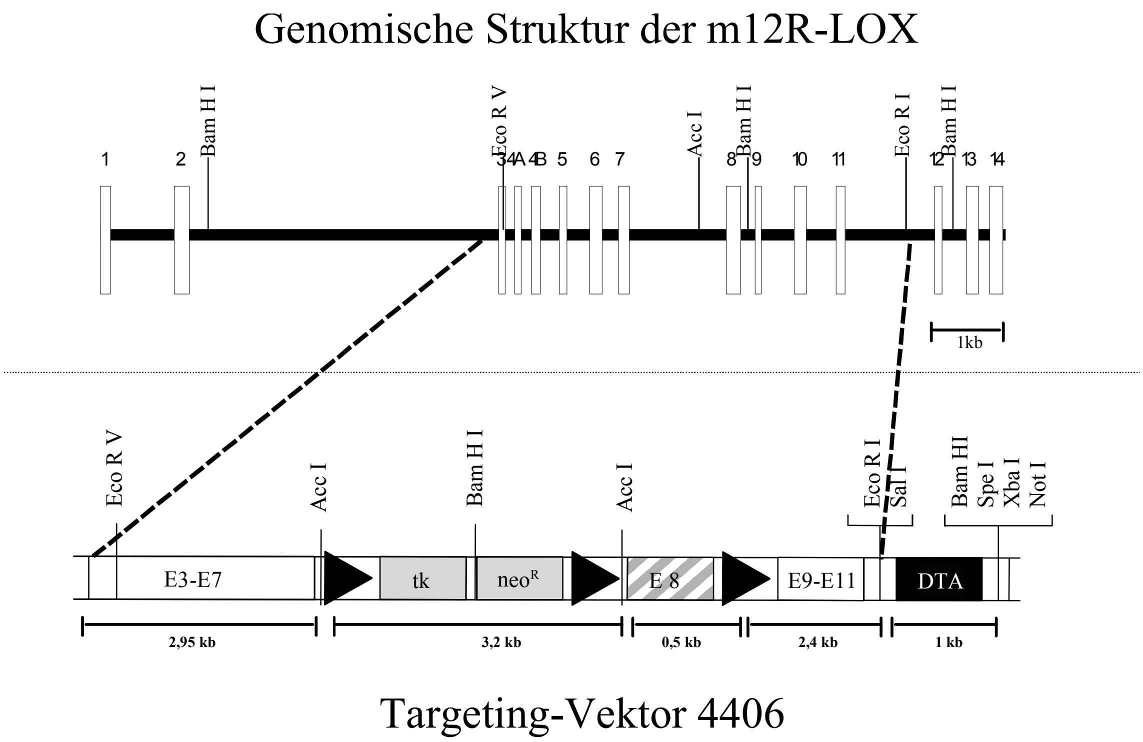


Abb. 21 Überblick über den Aufbau des Targeting-Vektors und die Homologiesequenz

Nachdem publiziert worden war, daß es einen Zusammenhang zwischen dem Ausfall der katalytischen Aktivität der 12R-LOX und dem Auftreten einer kongenitalen Ichthyose gibt (Jobard et al., 2002), wurde ein Targeting-Konstrukt für den konstitutiven Knockout des 12R-LOX-Gens hergestellt. Dies würde eine schnelle Durchführung ohne Cre-Elektroporation und

erneute Selektion ermöglichen – ohne jedoch die Vorteile des konditionalen Vorgehens bieten zu können.
Ausgehend von dem Konstrukt 2493, das ebenso für das konditionale Vorgehen benutzt worden war, wurde das Exon 8 deletiert und durch neue Schnittstellen ersetzt (→ 4408/3). In diese wurde das Neomycin-Resistenz-Gen eingebaut. Die Ligation der Schnittstellen für Bam HI mit denen für Bcl I bzw. Bgl II ermöglichte die Zerstörung der Bam HI-Erkennungssequenzen. Dadurch konnte die Screening-Strategie mittels Southern Blot-Analyse beibehalten werden, die für den konditionalen Knockout vorbereitet worden war (6.3.3). Anschließend wurde das Gen für DTA an den 3'-Bereich des Plasmids 4409/11 angehängt und lieferte so den Targeting-Vektor 4410/4. Dieser Vektor wurde jedoch nicht für weitere Experimente genutzt.

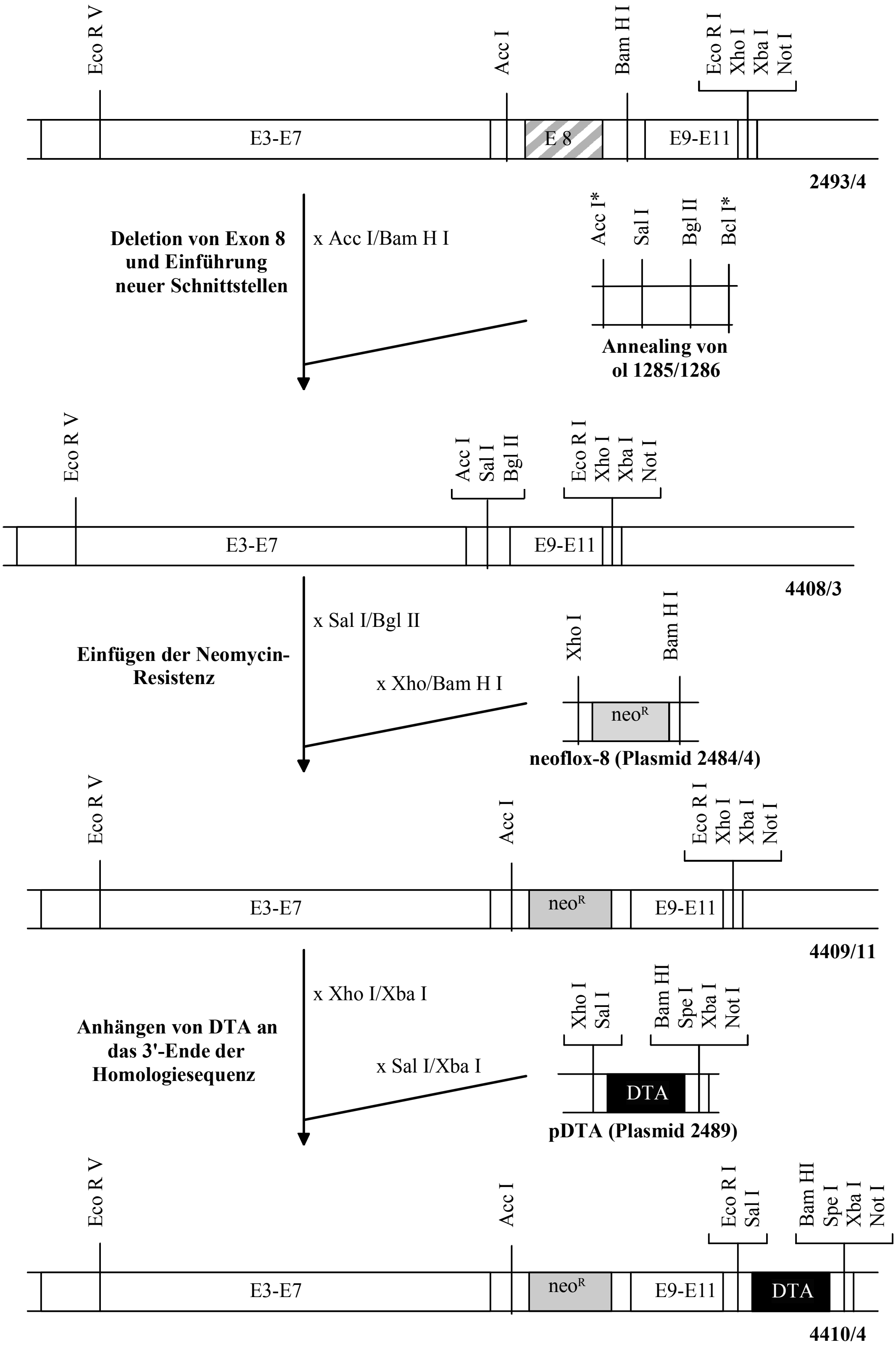


Abb. 22 Herstellung eines Targeting-Vektors für den konstitutiven Knockout des 12R-LOX-Gens
*Das Exon 8 des Plasmids 2493/4 (entspricht 2493/2; siehe Abb. 19) wurde durch neue Schnittstellen ersetzt, in die das Neomycin-Resistenzgen (neo^R) eingefügt wurde. Das Anhängen des Diphterietoxins A (DTA) in den 3'-Bereich komplettierte den Targeting-Vektor 4410/4. * kennzeichnet Überhang des betreffenden Enzyms (keine vollständige Erkennungssequenz!); E = Exon*

6.3.1.1. Testung des Targeting-Konstruktes 4406 in Bakterien

Es ist möglich, die Funktionalität der loxP-Sequenzen im vorhinein zu testen: Hierzu werden Cre-exprimierende Bakterien mit dem Targeting-Vektor transformiert. Die Analyse der Plasmidpräparationen zeigt, ob eine Cre-vermittelte Deletion möglich ist. Die lange Verweildauer der Plasmide in diesen Bakterien hatte bei einem derartigen Experiment dafür gesorgt, daß die Plasmidpräparationen alle eine Typ I-, also eine vollständige Deletion aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

6.3.2. Entwicklung der Screening-Strategie

Die homologe Rekombination stellt einen seltenen Prozeß dar, der trotz Selektion eines verläßlichen Screenings bedarf. Ähnlich verhält es sich mit den Cre-vermittelten Deletionen. Gute Screening-Verfahren sind daher eine Voraussetzung für diese Art von Knockout-Experimenten. Dabei sollte ein schnelles PCR-Verfahren von einem Southern Blot-Verfahren ergänzt werden. Es ist darauf zu achten, daß Primer und Sonden außerhalb der Homologiesequenz liegen, um nichthomolog rekombinierte Klone erkennen zu können.

6.3.2.1. Screening für homolog rekombinierte Klone mittels PCR

Für das PCR-Screening wurde eine zweistufige Strategie angewendet. Mit einer PCR unter Verwendung der Primer 1604 und 1603 sollten Klone mit homologer Rekombination identifiziert werden. Im zweiten Schritt wurde mit den Primern 1297 und 248 geprüft, ob auch die dritte loxP-Sequenz durch die Rekombination in das Genom integriert wurde (Abb. 23).

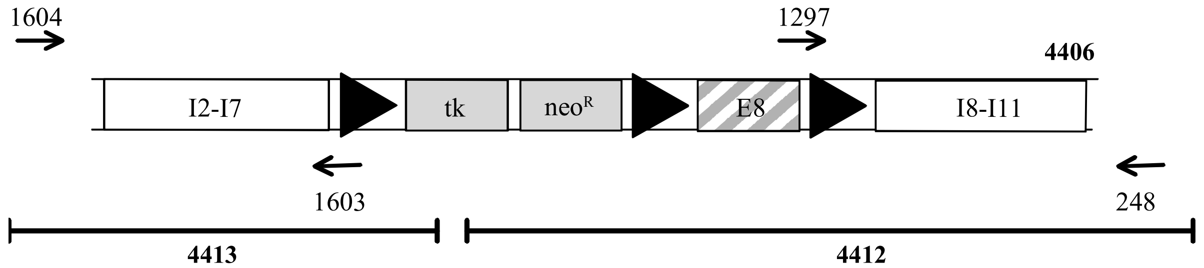


Abb. 23 Lokalisation der Screening-Primer
Die schematisch dargestellte DNA-Sequenz stellt die Homologieregion des Targeting-Vektors 4406 dar. Die Primer 1604 und 248 binden außerhalb der Homologieregion. Die Dreiecke sym-

bolisieren loxP-Sequenzen, der schraffierte Bereich stellt das Exon 8 dar. Die beiden Balken am unteren Bildrand veranschaulichen die DNA-Bereiche, die in den Konstrukten 4412 und 4413 enthalten sind. Diese wurden zur Herstellung der PCR-Positivkontrolle kok verwendet.

Jeweils ein Primer dieser beiden Primerpaare – nämlich ol 1604 und ol 248 - lagen außerhalb der Homologiesequenz und sorgten dafür, daß nur homolog rekombinierte Klone ein positives Ergebnis zeigen konnten. Die dabei zu erwartenden Produktgrößen sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Die Primer 1603 and 1297 wurden dagegen über die Insertionsstelle der Selektionskassette gelegt und konnten daher nicht im Wildtyp-Lokus binden (Abb. 23, Tab. 6). Ein PCR-Produkt von 3,2 kb bei Verwendung der Primer 1604 und 1603 sowie ein PCR-Produkt von 2,9 kb bei Verwendung der Primer 1297 und 248 identifiziert eindeutig Klone, die eine vollständige homologe Rekombination der Targeting-DNA aufweisen.

Tab. 6 Produktgrößen der PCRs

5'-Primer	3'-Primer	Produkt nach homologer Rekombination	Wildtyp-Produkt
1604	1603	3,2 kb	-
1297	248	2,9 kb	-

Es wurden zwei weitere Plasmide (4412 and 4413) kloniert, um für das Screening mittels PCR eine Positivkontrolle zur Verfügung zu haben. Diese Plasmide enthielten einen Teil der 5`-Region bzw. der 3`-Region des 12R-LOX-Gens, der außerhalb der Homologiesequenz des Targeting-Vektors lag. In diesen Bereichen liegt die Bindungsstelle der Primer 1604 und 248 (Abb. 23). Um geeignete Schnittstellen für die Herstellung der Konstrukte zu haben, wurde die Targeting-Sequenz subkloniert. Sie wurde mittels PCR amplifiziert (ol 1606/1605) und über den 3'-A-Überhang direkt in den Vektor pCR TOPO-XL kloniert. Für die weiteren Schritte wurden beide Orientierungen des PCR-Produktes im Vektor benötigt, weil die notwendigen Schnittstellen nur auf einer Seite in der Vektorsequenz vorkamen. Die Orientierung, die für das Einfügen des 3'-Bereiches vorgesehen war, konnte nur in einer am 5'-Ende trunkierten Form kloniert werden (Abb. 24). Die flankierenden Regionen wurden anschließend mit Hilfe der Primer ol 1609/1611 (5'-Bereich) und ol 1612/1614 (3'-Bereich) über PCR amplifiziert und über die so eingeführten Not I und Xho I-Schnittstellen an das jeweilige Ende der Targeting-Sequenz angefügt.

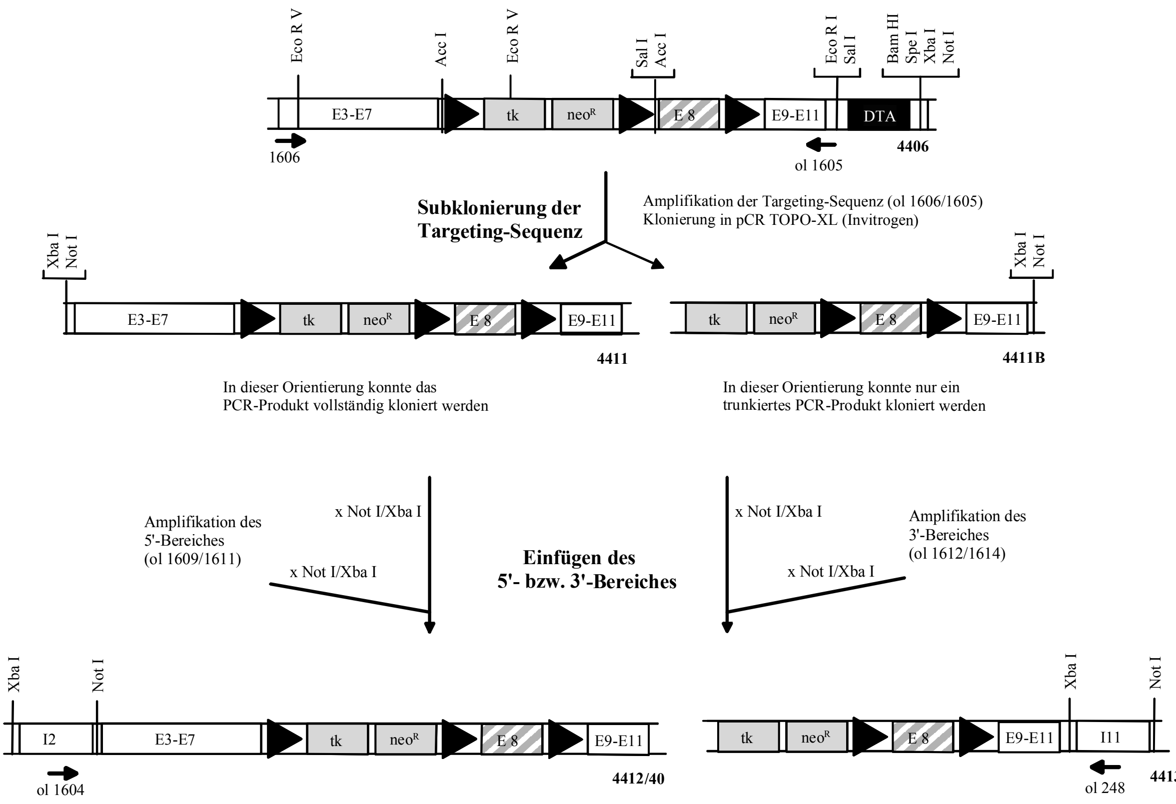


Abb. 24 Klonierung der Plasmide 4412 und 4413 zur Herstellung der PCR-Positivkontrolle
*Der Homologiebereich und die Resistenzkassetten des Targeting-Vektors 4406 wurden amplifiziert (Primerpaar ol 1606/1605; Polymerase-Mix Expand Long, Temperaturprogramm ko1). Das Amplikon wurde in den Vektor pCR TOPO-XL kloniert. Über Xho I/Not I-Schnittstellen dieses Vektors wurde je nach Orientierung des Amplikons ein zusätzlicher, über PCR amplifizierter 3'- bzw. 5'-Bereich eingefügt. * kennzeichnet Überhang des betreffenden Enzyms (keine vollständige Erkennungssequenz!); tk = Thymidinkinase; neo^R = Neomycin-Resistenz; E = Exon*

Ein Gemisch der beiden Plasmide und genomischer DNA diente als Positivkontrolle, die „kok" (Knockout Kontrolle) genannt wurde. Bei der Herstellung des Gemisches wurde auf die Einhaltung des Verhältnisses von Target-DNA und genomischer DNA geachtet. Es wurden jeweils 0,3 pg von 4412 und 4413 pro 100 ng genomischer DNA in 1 µl H_2O für die PCR eingesetzt.

6.3.2.2. Screening für Cre-vermittelte Deletionen nach Cre-Elektroporation mittels PCR

Die Cre-vermittelte Rekombination zwischen den drei loxP-Sequenzen liefert drei verschiedene Deletionstypen, die in Abb. 25 schematisch dargestellt sind. Die Rekombination zwischen den distalen loxP-Sequenzen führt zur Typ I-Deletion, die sowohl das umschlossene Exon 8 als auch die Resistenzkassette umfaßt und somit einem konstitutiven Knockout entspricht. Bei der Typ II-Deletion findet zwischen den loxP-Sequenzen, welche die Resistenzkassette flankieren, eine Rekombination statt. Dabei bleibt das gefloxte Exon 8 übrig. Dies ist die Voraussetzung einen konditionalen Knockout mit der gesteuerten Rekombination in der Maus. Eine Typ III-Deletion betrifft das Exons 8 bei Erhalt der Resistenzkassette. Sie ist von keinerlei praktischem Nutzen und sollte durch die Selektion mit Gancyclovir bei keinem der Klone zu finden sein.

Das Ziel war zunächst eine Typ I-Deletion für einen konditionalen Knockout zu erhalten. Daneben sollten Klone mit einer Typ II-Deletion identifiziert und konserviert werden.

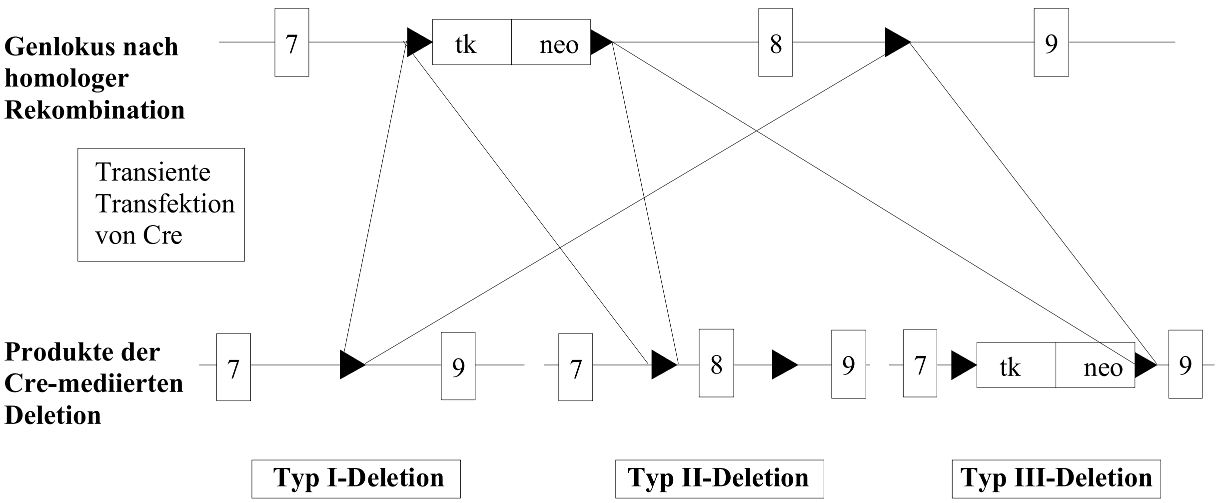


Abb. 25 Mögliche Deletionen im rekombinierten Lokus des 12R-LOX-Gens nach Cre-Elektroporation

Um den Deletionstyp erkennen zu können, wurde der komplette Bereich zwischen den äußeren loxP-Sequenzen amplifiziert und die Größe des Produktes bestimmt. Die Lage der Primer 1627 und 1624 ist Abb. 26 zu entnehmen.

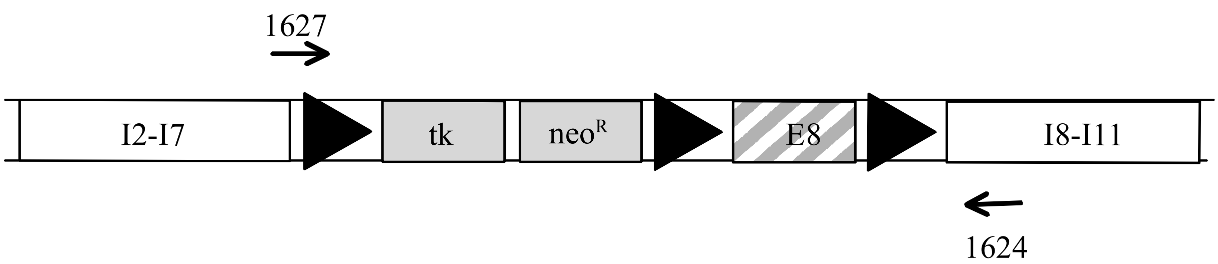


Abb. 26 Lage der Primer für das Screening der Cre-mediierten Deletion

Aus der Größe des Amplikons (Tab. 7) ist der Deletionstyp zweifelsfrei abzulesen.

Tab. 7 Produkte der PCR

5'-Primer	3'-Primer	Produkt bei Typ I-Deletion	Produkt bei Typ II-Deletion	Produkt bei nicht-rekombiniertem Locus
1627	1624	302 bp	830 bp	4 kb

6.3.3. Entwicklung der Screening-Strategie mittels Southern Blot-Analyse

Zur zusätzlichen Analyse der Klone wurde ein Screening mittels Southern Blot etabliert. Dabei wurden die DNAs mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten. Durch die Insertion der Selektionskassette war eine weitere Erkennungssequenz für dieses Enzym hinzugekommen, durch die Insertion der dritten loxP-Sequenz hingegen war eine Schnittstelle zerstört worden. Wie auch bei dem Screening mittels PCR wurde darauf geachtet, daß nur eine Insertion am richtigen Lokus (homologe Rekombination) erkannt wird. Die Sonde A für die Hybridisierung der Blots lag dementsprechend außerhalb der Homologiesequenz des Targetingkonstruktes (Abb. 27, Tab. 8). Außerdem wurde eine Sonde B hergestellt, die innerhalb der Homologiesequenz lag und als Ergänzung zu Sonde A fungierte, bzw. nach Cre-Elektroporation den Deletionstyp noch exakter zu identifizieren vermochte als Sonde A (Abb. 27, Tab. 9).

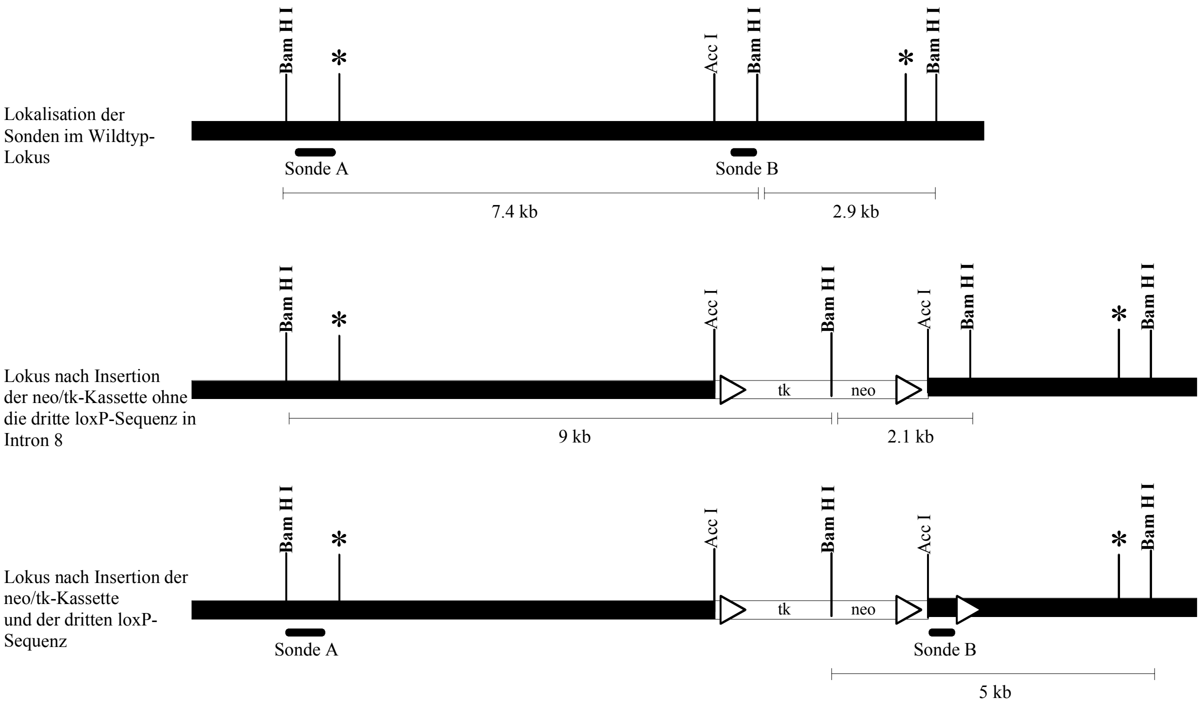


Abb. 27 Lokalisation der Sonden und Größe der so markierten DNA-Fragmente
*Das *-Symbol kennzeichnet den Beginn und das Ende der Homologieregion.*

Tab. 8 Markierte DNA-Fragmente nach Southern Blot-Analyse unter Verwendung von Sonde A

Genlokus	**Markiertes Fragment**
Wildtyp	7,4 kb
Integration der tk/neo-Kassette	9 kb
Typ I-Deletion	9,5 kb
Typ II-Deletion	7,2 kb

Tab. 9 Markierte DNA-Fragmente nach Southern Blot-Analyse unter Verwendung von Sonde B

Genlokus	**Markiertes Fragment**
Wildtyp	7,4 kb
Integration der tk/neo-Kassette ohne die dritte loxP-Stelle	2,1 kb
Integration der tk/neo-Kassette und der dritten loxP-Stelle	5 kb
Integration der isolierten loxP-Site ohne die tk/neo-Kassette	10,3 kb
Typ I-Deletion	Kein Produkt
Typ II-Deletion	10,3 kb

Die Sonden A und B wurden durch die Amplifikation des von den Oligonukleotiden 1204 und 1210 bzw. 708 und 225 begrenzten Bereiches hergestellt. Es wurde das Temperaturprogramm TAQ 56 (Tab. 1) mit der Taq-Polymerase von Qbiogene benutzt. Wie aus Tab. 8 und Tab. 9 ersichtlich, sollte man mittels Southern Blot-Analyse der BamHI-Fragmente mit beiden Sonden die Klone eindeutig identifizieren können.

6.3.4. <u>Herstellung und Analyse der ES-Klone</u>

Das Screening-Protokoll, die Primer, Sonden und der Targeting-Vektor wurden zu der Firma Mice&More, Hamburg, geschickt. Diese führte in Zusammenarbeit mit der estländischen Firma Visgenyx die homologe Rekombination und die Cre-vermittelte Deletion in ES-Zellen der Linie E14 durch.

Nach der Elektroporation des Targeting-Konstruktes 4406 in ES-Zellen und der Selektion mit G418 wurden in Estland 300 Klone isoliert. Unter diesen befanden sich 4 Klone, bei denen die homologe Rekombination nachgewiesen werden konnte. Diese 4 Klone wurden von mir mit Hilfe des PCR- (Abb. 28) und Southern Blot-Screenings (Abb. 29, Abb. 30) näher charakterisiert. Hierzu wurden entsprechend der unter 6.3.2.1 entwickelten Strategie die Primerpaare ol 1604/1603 und ol 1297/248 eingesetzt.

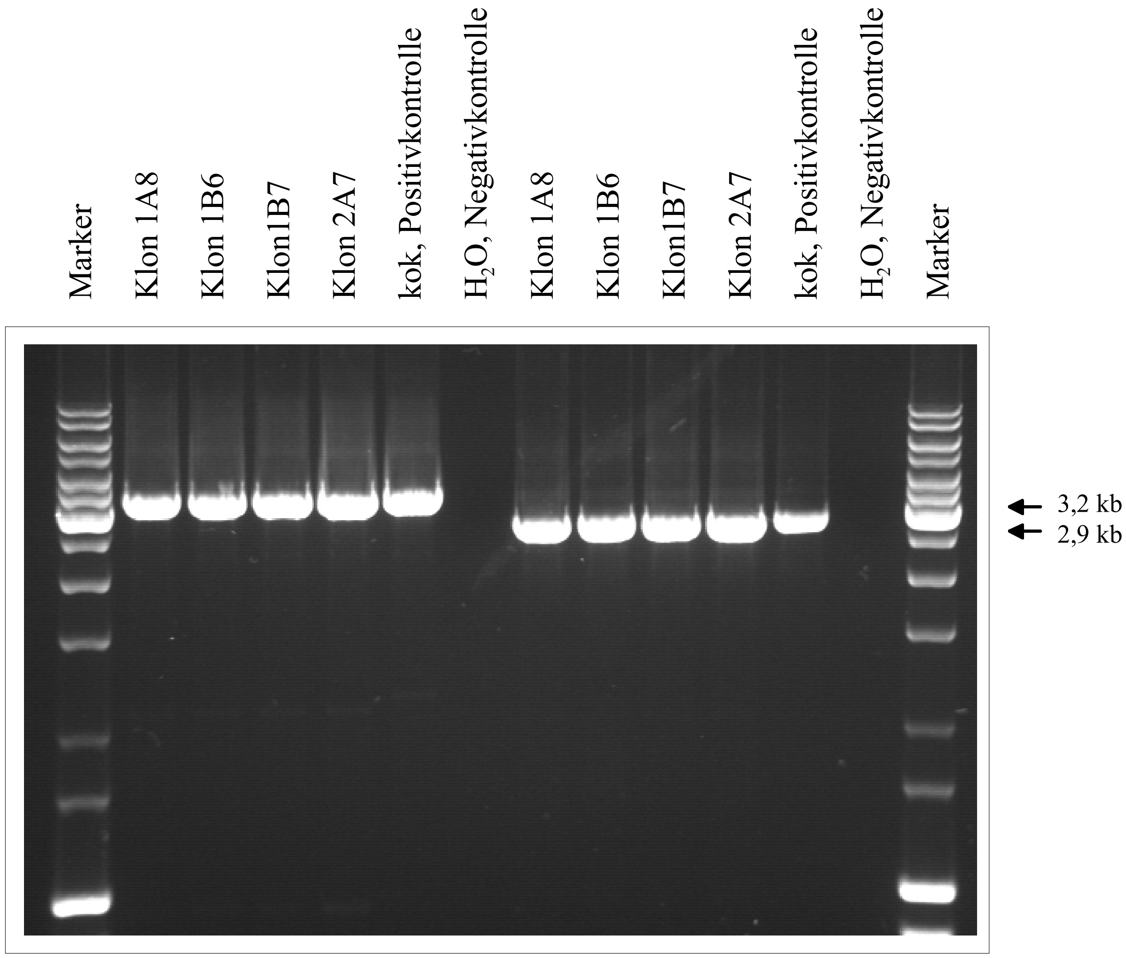


Abb. 28 Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen mittels PCR
Die ES-Zellen wurden mit dem Targeting-Konstrukt elektroporiert und anschließend mit G418 selektioniert. Enstandene Zellklone wurden isoliert und expandiert. Anschließend wurde DNA aus den Klonen gewonnen. Je etwa 200 ng dieser DNA wurden für eine PCR mit den Primerpaaren ol 1604/1603 (linke Bildhälfte, Spuren 2-7, Produktgröße: 3,2 kb) und ol 1297/248 (rechte Bildhälfte, Spuren 8-13, Produktgröße: 2,9 kb) eingesetzt, wie sie in 6.3.2.1 näher beschrieben sind. 10 µl der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,4 %igen, Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und aufgrund ihrer Größe charakterisiert. Die Abbildung zeigt unter UV-Licht photographierte Elektrophoresegele.

Bei der PCR-Analyse (Abb. 28) der DNA aus den 4 Klonen wurden Amplikons von 3,2 und 2,9 kb erhalten. Diese spezifischen Produktgrößen waren nur bei erfolgreicher homologer Rekombination zu erwarten. Darüber hinaus spricht das klare Ergebnis für die Qualität des etablierten Screening-Verfahrens. Die positiven ES-Zellklone wurden weiterhin mit der Southern Blot-Analyse auf homologe Rekombination untersucht. Das Ergebnis zeigt Abb. 29.

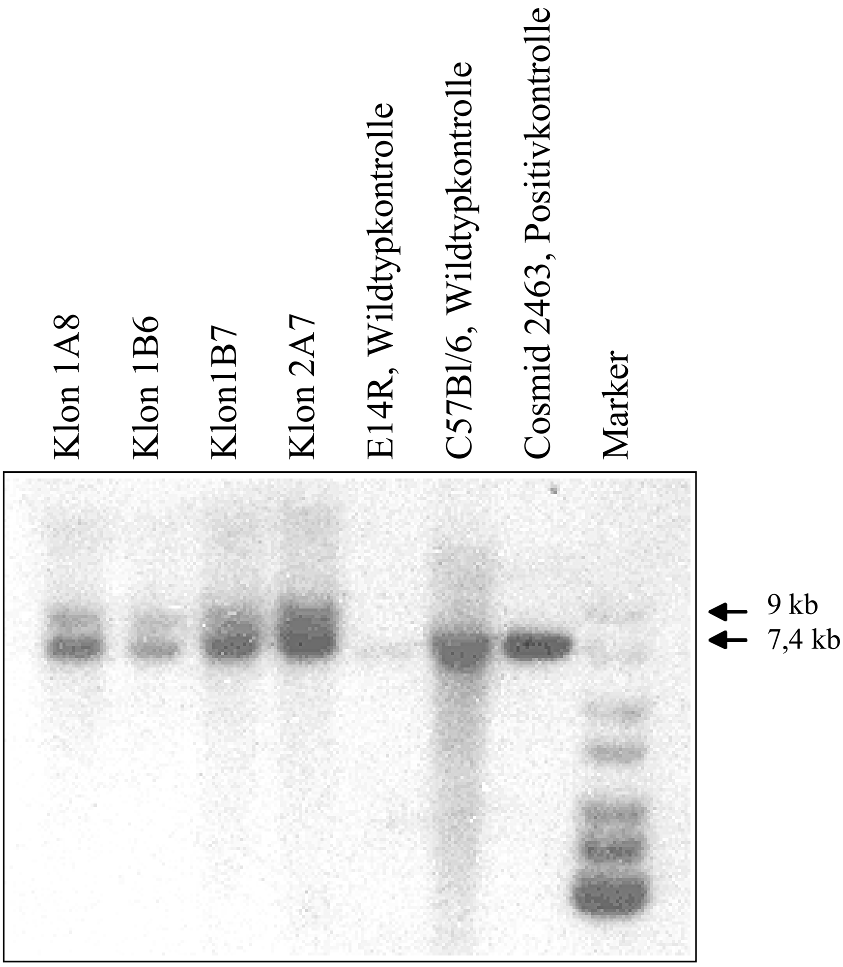


Abb. 29 Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen mittels Southern Blot-Analyse unter Verwendung von Sonde A
Die ES-Zellen wurden mit dem Targeting-Konstrukt elektroporiert und anschließend mit G418 selektioniert. Entstandene Zellklone wurden isoliert und expandiert. Anschließend wurde DNA aus den Klonen gewonnen. Je etwa 4 µg dieser DNA wurden über Nacht mit BamHI verdaut und in einem 0,7%igen Agarosegel getrennt. Der Transfer auf die Membran (5.1.5), die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde (5.1.3) mit 25 ng der Sonde A als Vorlage und die Hybridsierung (5.1.5) wurden nach den jeweiligen Standardprotokollen durchgeführt. Die hybridisierte Membran wurde zur Exposition eines Filmes bei –70°C für eine Woche verwendet. Die Abbildung zeigt ein gescanntes Bild des belichteten Filmes. Die Bandengröße bei Wildtyp-DNA (E14R, C57Bl/6 und Cosmid 2463) beträgt 7,4 kb. Nach homologer Rekombination wird eine Bande von 9 kb sichtbar.

Die Sonde A (siehe Schema Abb. 27) lieferte das erwartete BamHI-Fragment von 9 kb, das die homologe Rekombination anzeigte. Das 7,4 kb BamHI-Fragment ist charakteristisch für DNA des Wildtypallels. Die Rekombination findet immer nur in einem Allel - also heterozygot - statt. Daher sollte die Wildtyp-Bande und die Rekombinations-Bande in einem ausgeglichenen Mengenverhältnis auftreten. Die Southern Blot-Analyse sprach aber eher für einen 2-3 fachen Überschuß der Wildtyp-Bande.

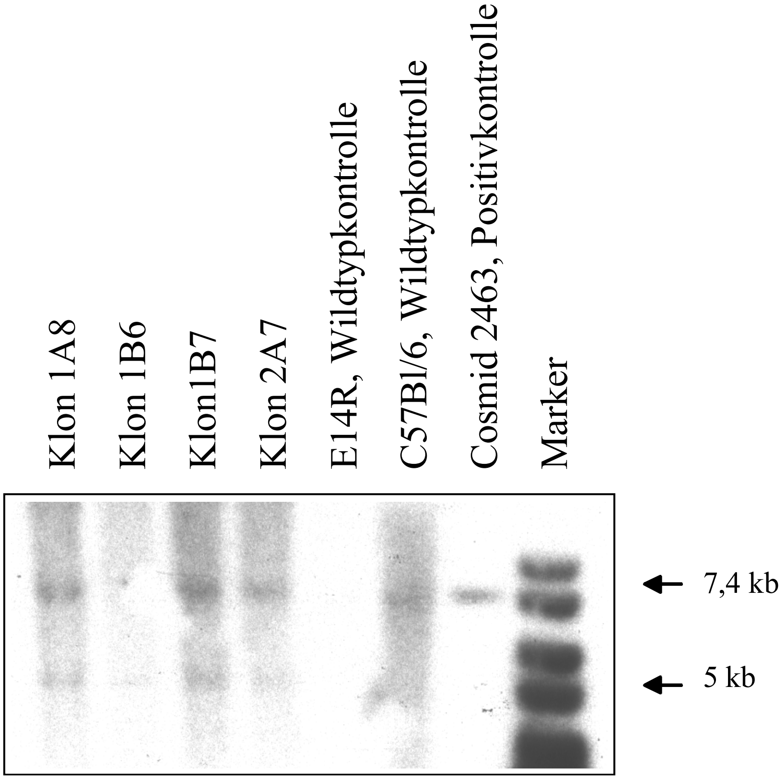


Abb. 30 Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen mittels Southern Blot-Analyse unter Verwendung von Sonde B
Die ES-Zellen wurden mit dem Targeting-Konstrukt elektroporiert und anschließend mit G418 selektioniert. Entstandene Zellklone wurden isoliert und expandiert. Anschließend wurde DNA aus den Klonen gewonnen. Je 4 µg dieser DNA wurden über Nacht mit BamHI verdaut und in einem 0,7%igen Agarosegel getrennt. Der Transfer auf die Membran (5.1.5), die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde (5.1.3) mit 25 ng der Sonde B als Vorlage und die Hybridsierung (5.1.5) wurden nach den jeweiligen Standardprotokollen durchgeführt. Die hybridisierte Membran wurde zur Exposition eines Filmes bei –70°C für eine Woche verwendet. Die Abbildung zeigt ein gescanntes Bild des belichteten Filmes. Die Bandengröße bei Wildtyp-DNA (E14R, C57Bl/6 und Cosmid 2463) beträgt 7,4 kb. Nach homologer Rekombination wird eine Bande von 5 kb sichtbar.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei Verwendung der Sonde B erzielt (Abb. 30). Die Bande von 5 kb, die nach homologer Rekombination zu erwarten war, trat zusammen mit der für Wildtyp-DNA typischen Bande von 7,4 kb auf. Auch hier zeigte sich ein Überschuß der Wildtyp-Bande.

6.3.5. Analyse der ES-Klone nach Cre-vermittelter Deletion

Nach Betrachtung der Zellmorphologie wurde der Klon 2A7 für die Cre-Elektroporation ausgewählt. Nach der Cre-vermittelten Deletion konnten bisher nur Klone isoliert werden, die eine Typ I-Deletion, also den konstitutiven Knockout aufwiesen. Die DNA, die in Estland aus den Zellklonen isoliert worden war, war von sehr schlechter Qualität. Trotzdem konnte eine PCR-Analyse durchgeführt werden (Abb. 31). Hierzu wurde das Primerpaar ol 1627/1624 eingesetzt, das nach 6.3.2.2 eine Deletionstyp-spezifische Bande bei 302 oder 830 bp generiert.

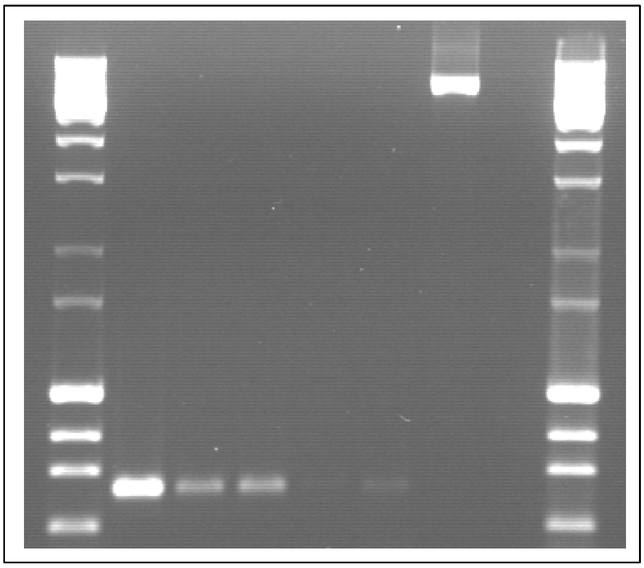


Abb. 31 Nachweis auf Cre-mediierte Deletion in ES-Zellen mittels PCR-Analyse
Der homolog rekombinierte ES-Zellklon 2A7 wurden mit einem Cre-Expressionsvektor elektroporiert und anschließend mit Gancyclovir selektioniert. Entstandene Zellklone wurden isoliert und expandiert. Anschließend wurde DNA aus den Klonen gewonnen. Je 200 ng dieser DNA wurden für eine PCR mit dem Primerpaar ol 1627/1624 eingesetzt, wie es in 6.3.2.2 näher beschrieben ist. 10 µl der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1.4 %igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und aufgrund ihrer Größe charakterisiert. Die Abbildung zeigt unter UV-Licht photographierte Elektrophoresegele. Bei einer Typ I-Deletion ist eine Bande bei 302 bp, bei einer Typ II-Deletion ist eine Bande bei 830 bp zu erwarten. Die Positivkontrolle kok ergibt eine Bande bei 4 kb, weil sie keine Deletion aufweist. Sie dient dazu, den Erfolg der Amplifikation anzuzeigen.

Es wurde nur eine schwache PCR-Bande bei 302 bp erhalten, die für eine Typ I-Deletion typisch ist. Diese Bande wies eine von Klon zu Klon schwankende Intensität auf. Eine Southern Blot-Analyse konnte nicht durchgeführt werden, da nur geringe DNA-Mengen zur Verfügung standen. Der weiteren Charakterisierung dienten ES-Zell-Klone, die in Zusammenarbeit mit der Abteilung „Transgen-Service“ des DKFZ expandiert worden waren. Abb. 32 zeigt exemplarisch an 2 Klonen, daß die ES-Klone vital und frei von jeder erkennbaren Kontamination durch andere Zellen waren.

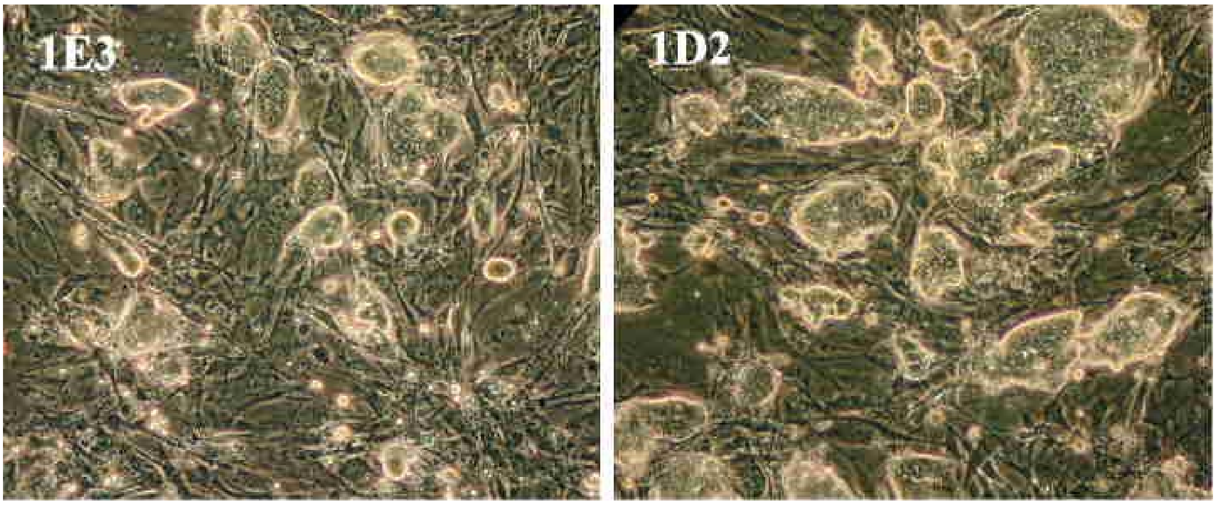


Abb. 32 Lichtmikroskopische Aufnahme von ES-Zell-Klonen
Die ES-Zellen wurden aufgetaut und auf embryonalen Fibroblasten-Feeder-Zellen ausgesät, die nach UV-Bestrahlung nicht mehr teilungsfähig waren. Die Feeder-Zellen sind auf dem Boden der Kulturschale zu erkennen. Die kleinen ES-Zellen wachsen auf dieser Feeder-Zellschicht in kugeligen Haufen, die das Licht stark brechen. Die Photographie der Zellen entstand bei einer 200-fachen Vergrößerung. Die ES-Zellen haben die maximale Konfluenz erreicht und wurden nach der Aufnahme dieser Bilder in eine andere Schale passagiert.

Mit DNA aus diesen Klonen wurden PCR- und Southern Blot-Analysen durchgeführt. Abb. 33 zeigt die entsprechende Wiederholung der PCR-Analyse von Abb. 31. Eine deutliche Bande des für die Typ I-Deletion spezifischen Produktes bei 302 bp ist mit der DNA von Klon 1B8 zu sehen. Eine schwache Bande lieferte auch Klon 1D2, während die anderen Klone negativ waren.

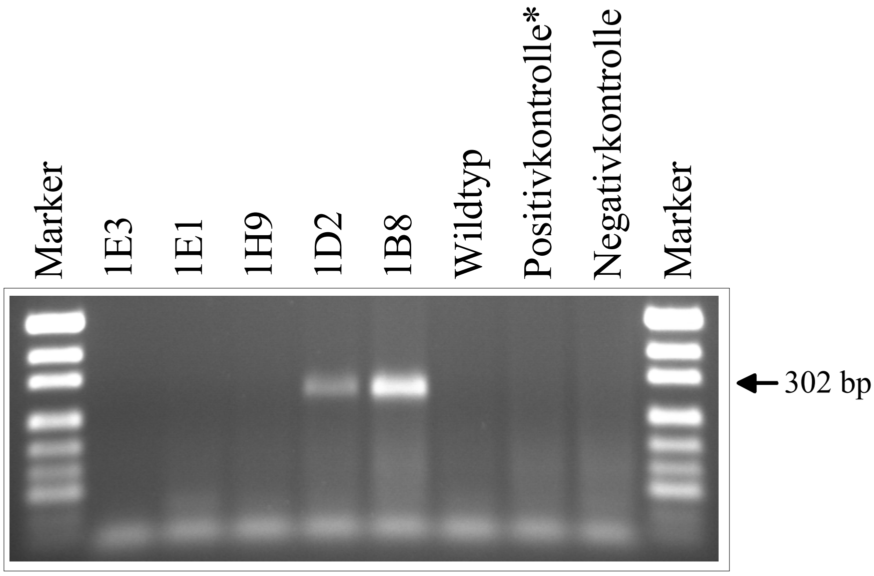


Abb. 33 Nachweis der Cre-mediierten Deletion in ES-Zellen mittels PCR-Analyse
*Aus den ES-Klonen, die im DKFZ expandiert worden waren, wurde DNA isoliert und wie in der Legende zu Abb. 31 beschrieben mittels PCR analysiert. Als Positivkontrolle für den Erfolg der Amplifikation wurde auch hier kok verwendet. Das *-Symbol zeigt an, daß die spezifische Bande bei 4 kb erhalten wurde, in diesem Bildausschnitt jedoch nicht zu sehen ist. Mit Wildtyp-DNA wird kein Signal erhalten, weil der Primer ol 1627 über die Insertionsstelle der gefloxten Resistenzkassette gelegt wurde.*

Um zu bestätigen, daß das Signal bei 302 bp in der Tat von einem korrekt homolog rekombinierten Lokus stammte, wurde eine PCR-Analyse mit dem Primerpaar ol 1627/248 durchgeführt (siehe Abb. 23 und Abb. 26). Ol 248 liegt außerhalb der Homologiesequenz. Daher sollte die Größe des PCR-Produktes bei einer homologen Rekombination und einer Cre-vermittelten Typ I-Deletion 2,9 kb betragen. Abb. 34 zeigt das Ergebnis.

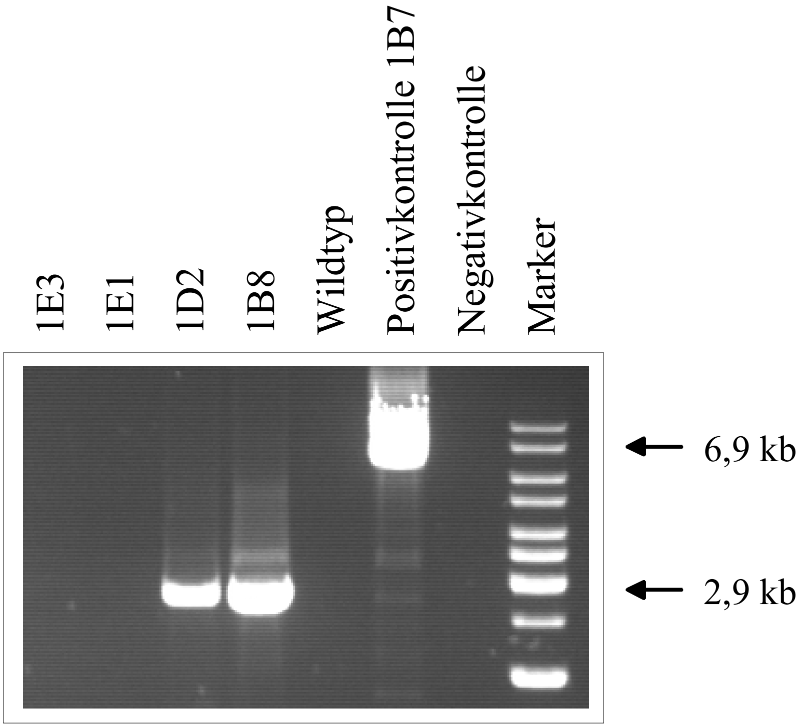


Abb. 34 Nachweis auf Cre-mediierte Deletion in ES-Zellen mittels PCR-Analyse
Von der aus den im DKFZ expandierten ES-Klonen wurde DNA isoliert und je 200 ng für eine PCR mit dem Primerpaar ol 1627/248 eingesetzt, wie es in 6.3.2.1 näher beschrieben ist. 10 µl der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,4 %igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und aufgrund ihrer Größe charakterisiert. Die Abbildung zeigt unter UV-Licht photographierte Elektrophoresegele. Als Positivkontrolle wurde DNA des homolog rekombinierten Klons 1B7 verwendet, der keine Deletion aufweist. Er liefert eine Bande bei 6,9 kb und dient zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation. Weil ol 1627 über der Insertionsstelle der gefloxten Resistenzkassette liegt, ergibt Wildtyp-DNA keine Bande.

Das PCR-Produkt von 2,9 kb rührt von einem Allel her, das eine homologe Rekombination und eine Cre-vermittelte Deletion aufweist. Als Positivkontrolle für die PCR wurde DNA aus dem Klon 1B7 verwendet, der zwar eine homologe Rekombination, aber keine Deletion aufweist und deshalb ein Produkt von 6,9 kb liefert. Die PCR-Banden waren jedoch auffallend schwach und verloren bis zur letzten DNA-Isolierung weiter an Intensität. Um dieser Sache nachzugehen, wurde eine weitere PCR mit den Primern ol 1604/248 (Abb. 23) durchgeführt. Dieses Primerpaar liegt auf beiden Seiten vollständig außerhalb der Homologiesequenz und sollte im Gegensatz zu den bisher verwendeten Primerpaaren auch im Wildtyp-Allel binden und ein PCR-Produkt generieren. Die PCR würde somit 2 Produkte liefern, ein 6,7 kb großes Produkt des Wildtyp-Allels und ein 6,1 kb großes Produkt des Transgens.

Der Größenunterschied der Produkte aus Wildtyp- und rekombiniertem Allel sind jedoch zu gering, um sie durch Gelelektrophorese trennen zu können. Eine Unterscheidung ist nur durch einen Restriktions-Verdau möglich, wobei die Wildtyp-Bande von 6,7 kb mit BamHI zwei

Fragmente von 3,7 und 2,9 kb liefern sollte. Das rekombinierte Produkt wird durch BamHI nicht verdaut, da bei der Insertion der loxP-Sequenz in Intron 8 deren Erkennungsstelle zerstört wurde. Wie in Abb. 35 gezeigt, enthält lediglich das PCR-Produkt von Klon 1B8 geringe Mengen des 6,1 kb großem rekombinierten Produktes. Der überwiegende Anteil stammt vom Wildtyp-Allel. Neben den 4 Klonen und einer Negativkontrolle wurden bei dieser PCR genomische DNA von Wildtyp-Mäusen als Wildtyp-Kontrolle und das Cosmid 2463 als Positivkontrolle für die PCR verwendet. Das Kontrollcosmid 2463 lieferte ebenfalls eine Wildtyp-Bande, die durch BamHI jedoch nicht vollständig verdaut wurde. Daher kann man in dieser Spur noch eine schwache Bande der Größe 6,7 kb erkennen.

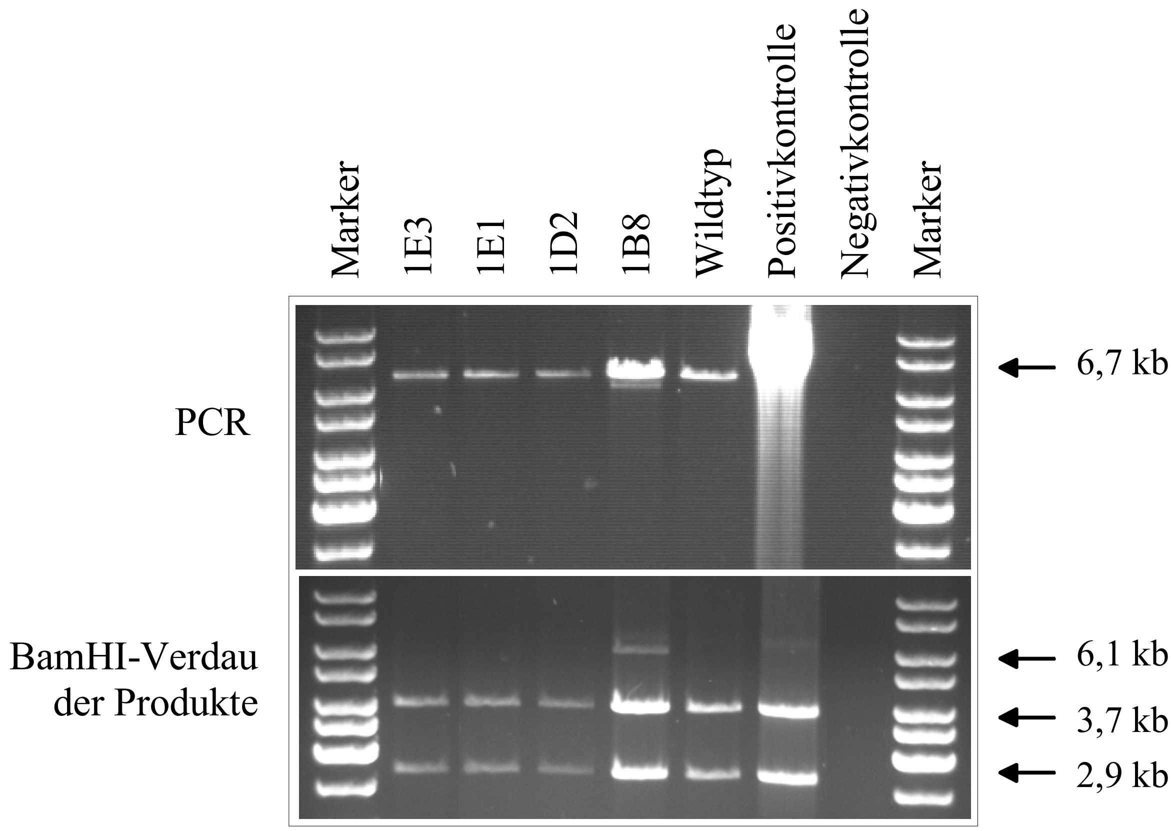


Abb. 35 Test auf den Wildtyp-Anteil in den DNA-Präparationen mittels PCR und anschließendem BamHI-Verdau
Aus den im DKFZ expandierten ES-Klonen wurdeDNA isoliert. Je 200 ng dieser DNA wurden für eine PCR mit dem Primerpaar ol 1604/248 eingesetzt, wie es in 6.3.2.1 näher beschrieben ist. 10 µl der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,4 %igen, Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und aufgrund ihrer Größe charakterisiert (oberes Teilbild). Ein weiteres Aliquot der PCR-Produkte wurde mit BamHI geschnitten und dann elektrophoretisch getrennt (unteres Teilbild). Die Abbildung zeigt unter UV-Licht photographierte Elektrophoresegele. Als Positivkontrolle wurde das Cosmid 2463 verwendet, welches das 12R-LOX-Gen enthält und damit als weitere Wildtypkontrolle dienen kann.

Mit diesem Experiment wurden deutliche Hinweise geliefert, daß das Wildtyp-Allel in den DNA-Isolaten den weitaus größten Teil ausmachte und daß in einigen Präparationen sogar das Wildtyp-Allel alleine vorkam. Eine Bestätigung sollte die Southern Blot-Analyse mit Sonde A bringen (vergleiche 6.3.3). In Abb. 36 erkennt man bei allen Klonen nur das 7,5 kb große Fragment des Wildtyps. Der Klon 2A7, mit dem die Cre-vermittelte Deletion durchgeführt wurde und der damit der Ursprungsklon aller anderen ist, wurde als Kontrolle mitgeführt. Nur er lieferte die 9 kb Bande der homologen Rekombination. Bei keinem anderen Klon war eine rekombinante Bande zu erkennen. Eine Typ I-Deletion wäre bei Verwendung der Sonde A durch ein Signal bei 9,5 kb gekennzeichnet, wie in Kapitel 6.3.3 aufgeführt ist. Dieses Signal war in keinem Klon nachweisbar.

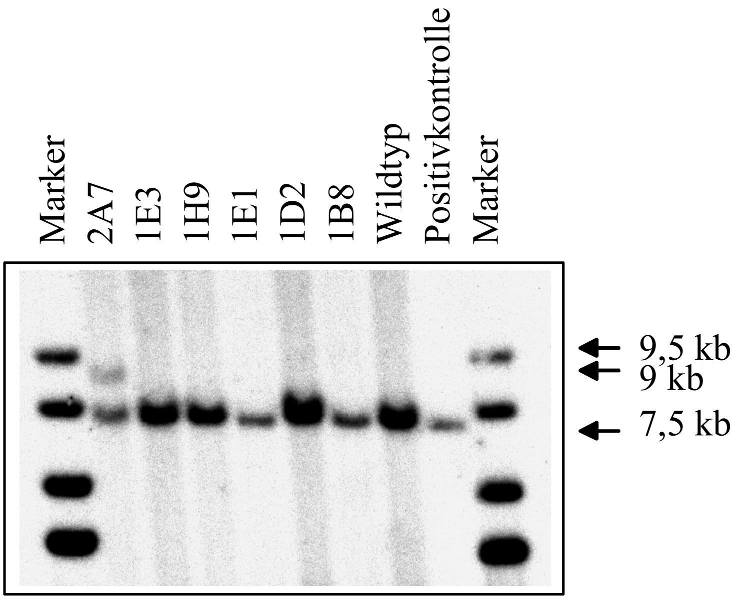


Abb. 36 Nachweis der Cre-vermittelten Deletion mittels Southern Blot-Analyse
Aus den im DKFZ expandierten ES-Klonen wurde DNA isoliert. Je 4 µg dieser DNA wurden über Nacht mit BamHI verdaut und in einem 0,7%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Der Transfer auf die Membran (5.1.5), die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde (5.1.3) mit 25 ng der Sonde A als Vorlage und die Hybridsierung (5.1.5) wurden nach den jeweiligen Standardprotokollen durchgeführt. Die hybridisierte Membran wurde zur Exposition eines Filmes bei –70°C für eine Woche verwendet. Die Abbildung zeigt ein gescanntes Bild des belichteten Filmes. Die Bandengröße bei Wildtyp-DNA beträgt 7,5 kb. Nach homologer Rekombination wird eine Bande von 9 kb sichtbar, wie bei dem Klon 2A7 zu erkennen ist, aus dem alle anderen Klone durch Cre-Elektroporation hervorgegangen sind. Nach einer Typ I-Deletion sollte bei 9,5 kb eine Bande sichtbar werden.

Die Southern Blot-Analyse konnte mit Ausnahme des Klons 2A7 nur noch das Wildtyp-Allel nachweisen. Eventuell vorhandene rekombinierte Allele liegen unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode.

6.3.6. Generierung chimärer Mäuse

In der Zwischenzeit wurden in Estland Blastozysteninjektionen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

Tab. 10 Verlauf der von Mice&More durchgeführten Blastozysteninjektionen

Blastozysten-injektion vom	**ES-Zellklon**	**Anzahl der retransferierten Blastozysten**	**Anzahl der Ammen**	**Geburts-datum der Tiere**	**Anzahl der geborenen Tiere**	**davon chimär**
25.07.01	1D2	14	2			
01.08.01	1H9	21	3			
18.10.01	1H9	55	4	04. und 06.11.01	6	
21.10.01	1B8	24	2			
20.11.01	1B8	6	1	09.12.01	2	
27.11.01	1B8	11	1			
29.11.01	1B8	12	3	18.12.01	4	
30.11.01	1B8	7	1	19.12.01	1	
04.12.01	1B8	5	1	21.12.01	1	
06.12.01	1B8	20	2	25.12.01	3	
07.12.01	1B8	15	1	26.12.01	4	
10.01.02	1B8	30	3	27.01.02	10	1 ♂ (10% agouti); 1 ♀ (90% agouti)

Die ES-Zellen stammten von der Mauslinie 129 ab, deren Fellfarbe agouti (ein verwaschener Braunton) ist. Die Blastozysten wurden Weibchen der Linie C57Bl/6 entnommen, die ein schwarzes Fell haben. Die nach einer erfolgreichen Blastozysteninjektion entstehenden chimären Tiere sollen also eine Fellfarbe haben, die sich aus variierenden Anteilen von agouti und schwarz zusammensetzt. Je größer der Agouti-Anteil ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission des Transgens.
Die beiden chimären Tiere (Abb. 37), die aus der Blastozysteninjektion vom 10.01.02 (siehe Tab. 10) hervorgegangen waren, werden derzeit im Zentralen Tierlabor des DKFZ verpaart, um die Keimbahntransmission nachzuweisen.

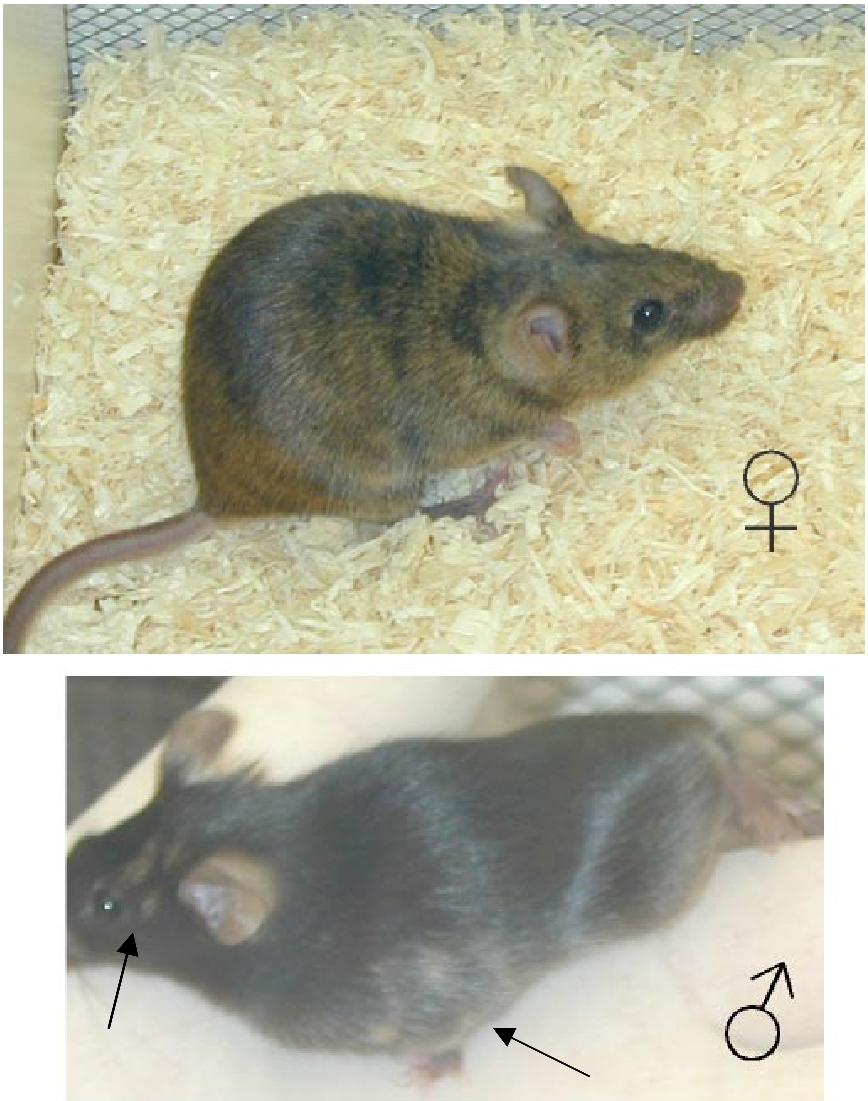


Abb. 37 Chimäre Tiere nach Blastozysteninjektion mit dem ES-Zellklon 1B8
Es handelt sich um die beiden in Tab. 10 aufgeführten Tiere. Die Pfeile im unteren Teilbild weisen auf die Körperpartien, bei denen die Agouti-Färbung sichtbar ist.

6.4. *e*12S-LOX-überexprimierende Mauslinien

Die mRNA der Epidermis-Typ 12S-LOX (*e*12S-LOX) wird in normaler Maus-Epidermis sehr stark exprimiert. Diese Expression wird nach einer einmaligen TPA-Applikation reprimiert. In Papillomen und Karzinomen, die nach dem Inititations-Promotionsmodell erzeugt worden waren, war keine *e*12S-LOX-mRNA nachweisbar (Müller et al., 2002). Transgene Mäuse, welche die *e*12S-LOX in Tumoren und in hyperproliferativer Epidermis überexprimieren, könnten daher Hinweise auf eine Funktion dieses Isoenzyms bei der Tumorentstehung liefern. Das Zytokeratin 6 wird in einigen Zellen des Haarfollikels sowie in hyperproliferativer interfollikulärer Epidermis und in epidermalen Tumoren exprimiert (Ramirez et al., 1995). Die folgenden Versuche wurden mit transgenen Mäusen gemacht, welche *e*12S-LOX unter der Kontrolle des Rinder-Keratin 6-Promotors exprimieren (Heidt 1999; Müller et al., 2002; Abb. 38).

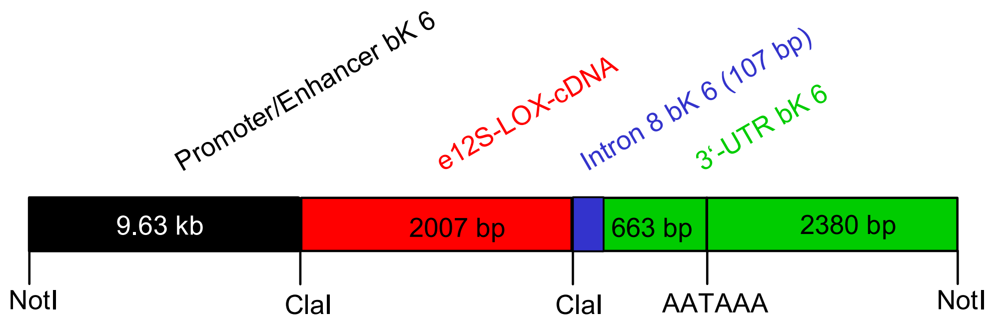


Abb. 38 Konstrukt zur Herstellung von transgenen e12S-Lipoxygenase-überexprimierenden Tieren (Heidt, 1999)

Die zwei transgenen homozygoten Linien K6.*e*12S-LOX/9 und K6.*e*12S-LOX/50 zeigten eine schwache bzw. starke Expression des Transgens und wurden näher charakterisiert.

6.4.1. <u>Gewinnung primärer Keratinozyten</u>

Um ein Zellkulturmodell zu erhalten, wurden aus den Linien K6.*e*12S-LOX/9 und K6.*e*12S-LOX/50 primäre Keratinozyten nach der von Fürstenberger et al. (1986) beschriebenen Methode gewonnen (vergleiche auch 5.5.1.1 und 5.5.1.2). Die Dichtegradientenzentrifugation der epidermalen Zellen ergab drei proliferativ aktive Zellfraktionen IIIa, III und IV sowie die Fraktionen I und II, die unterschiedlich weit differenzierte, postmitotische Zellpopulationen enthielten (Abb. 39). Die Basalzellfraktionen wurden getrennt kultiviert und untersucht.

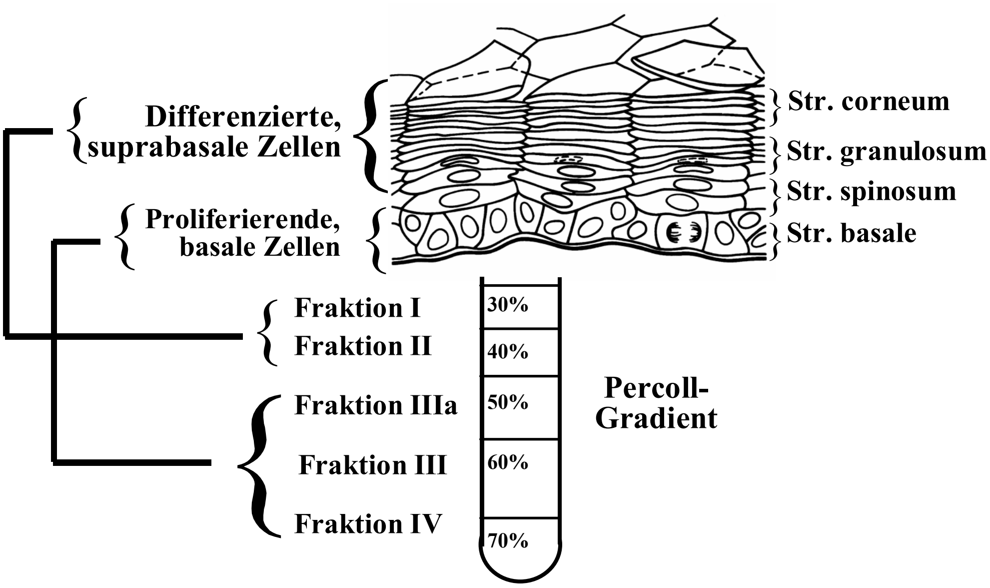


Abb. 39 Differenzierungsspezifische Fraktionen epidermaler Zellen
Neonatale Keratinozyten wurden durch Trypsinierung isoliert und mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation in die gezeigten 5 Fraktionen getrennt (Fürstenberger et al., 1986). Str.=Stratum

6.4.1.1. Untersuchung primärer Keratinozyten der Linie K6.*e*12S-LOX/9 auf *e*12S-LOX-mRNA-Expression

Bei der Kultivierung von Keratinozyten, die aus der Haut entnommen wurden, kommt es zum Anschalten der Expression von Genen, u.a. des hyperproliferativen Keratin-6-Gens (Ramirez et al., 1995). Daher war zu erwarten, daß das *e*12S-LOX-Transgen in primären Keratinozyten exprimiert wird. Hierzu wurden die primären Keratinozyten der Linie K6.*e*12S-LOX/9 unter niedrigen Ca^{2+}-Konzentrationen (0,06 mM) kultiviert. 48 bzw. 72 h nach Aussaat wurde die RNA isoliert und anschließend eine RT-PCR durchgeführt. Die Fraktionen der Epidermis, die nach der Dichtegradientenzentrifugation eingefroren und nicht kultiviert worden waren, bildeten die Kontrolle (Abb. 40).

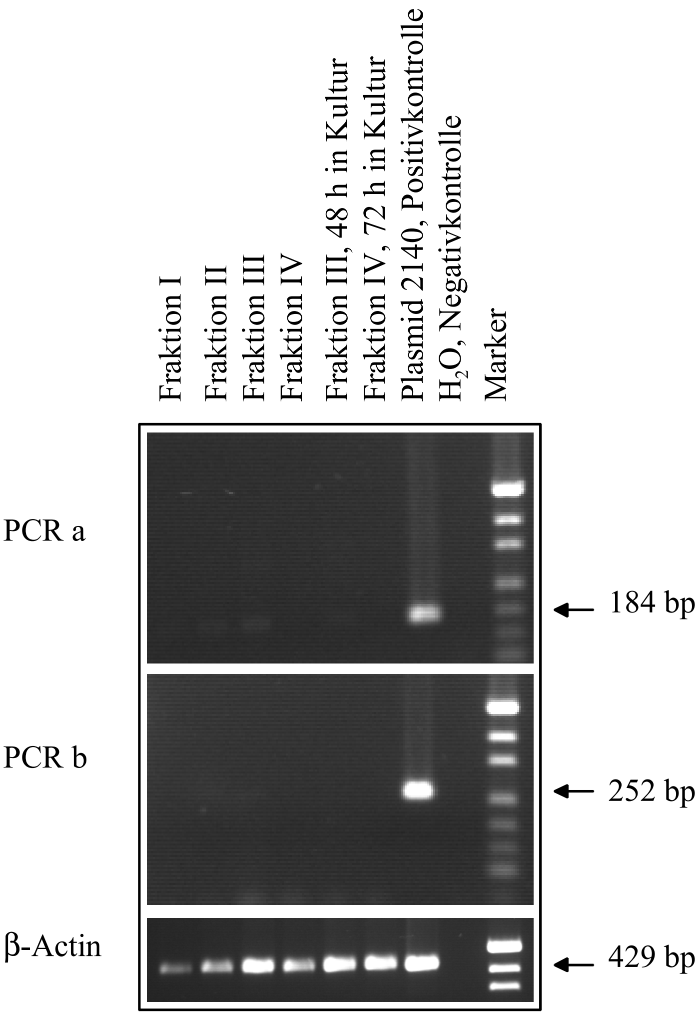


*Abb. 40 RT-PCR-Analyse der Expression der transgenen e12S-LOX in verschiedenen Fraktionen aus Epidermis der Mauslinie K6.*e*12S-LOX/9*

Die Haut von Mäusen der Linie K6.e12S-LOX/9 im Alter von 2-4 Tagen wurde isoliert und Dermis und Epidermis wurden durch Trypsinierung getrennt. Die Epidermis wurde disaggregiert und die erhaltene Zellsuspension durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation in Fraktionen aufgetrennt (5.5.1). Aus Zellen der verschiedenen Fraktionen wurde die RNA isoliert (5.2.2.1), mit Hilfe von oligo-(dT)-Primern revers transkribiert (5.2.4) und eine PCR (5.1.4.1) durchgeführt. Aus 1 µl der cDNA-Präparationen wurde ein spezifisches Fragment (184 bp) der e12S-LOX-cDNA mit den Primern ol 70/73 (PCR a), bzw. ein Fragment (252 bp) aus dem 5'-Bereich des K6.e12S-LOX-Überexpressionskonstruktes mit den Primern ol 183/69 (PCR b) und einer Taq-Polymerase (Qbiogene, Heidelberg) in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert (oberes Teilbild). Als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge wurde eine spezifisches Fragment (429 bp) des β-Actins mit den Primern ol 24/25 mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Temperaturprogramme TAQ56 bzw. TAQ54 bestehen aus einer Denaturierung bei 94°C für 90 Sekunden, dem Annealing-Schritt bei 56°C bzw. 54°C für 90 Sekunden und der Extension bei 72°C für 2,5 Minuten über 30 Zyklen hinweg. 10 µl der PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,4 %igen, Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Die Abbildung zeigt unter UV-Licht photographierte Elektrophoresegele.

Entgegen den Erwartungen war keine mRNA-Expression in den kultivierten Keratinozyten nachweisbar. Die frisch isolierten Keratinozyten waren erwartungsgemäß negativ, weil der K6-Promotor in normaler Epidermis inaktiv ist.

6.4.1.2. Etablierung einer Zellinie durch lange Kultivierung

Von primären Keratinozyten der Mauslinie K6.*e*12S-LOX/9 wurde durch wiederholtes Passagieren und Kultivieren unter niedrigen Ca^{2+}-Konzentrationen (0,06 mM) eine immortale Linie erhalten.
Die RT-PCR-Analyse zeigte jedoch keine Expression des Transgens und auch der Test auf *e*12S-LOX-Aktivität im Zellysat verlief negativ (Daten nicht gezeigt). Von K6.*e*12S-LOX/50-Keratinozyten konnte keine immortale Linie isoliert werden.

6.4.2. Charakterisierung der Epidermis transgener Tiere

Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zeigten die transgenen Tiere der Linien K6.*e*12S-LOX/9 und K6.*e*12S-LOX/50 makroskopisch keinen Hautphänotyp. Daher wurde die Haut auf mikroskopischer Ebene näher untersucht.
Zuvor wurden die Mäuse der Linien K6.*e*12S-LOX/9 und K6.*e*12S-LOX/50 und des Wildtyps mit einer epikutanen Applikation von TPA (5 nmol/0,1 ml Aceton) bzw. Aceton als Kontrolle (0,1 ml) behandelt. Während Keratin 6 in Kontrollepidermis nur in differenzierten Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide exprimiert ist, kommt es nach TPA-Behandlung zu einer Expression im gesamten Epithel. Ein ähnliches Expressionsmuster sollte daher für die transgene *e*12S-LOX gelten (vergleiche auch 6.4.5).
Das Ergebnis ist in Abb. 41 zusammengefaßt. Danach war in der Kontrollepidermis der Linie K6.*e*12S-LOX/9 keine *e*12S-LOX-mRNA-Expression meßbar. Nach TPA-Applikation war das Transgen jedoch induziert. Bei der stärker überexprimierenden Linie K6.*e*12S-LOX/50 erkennt man in der Epidermis eine leichte Expression, die nach TPA-Behandlung sehr stark angestiegen war.

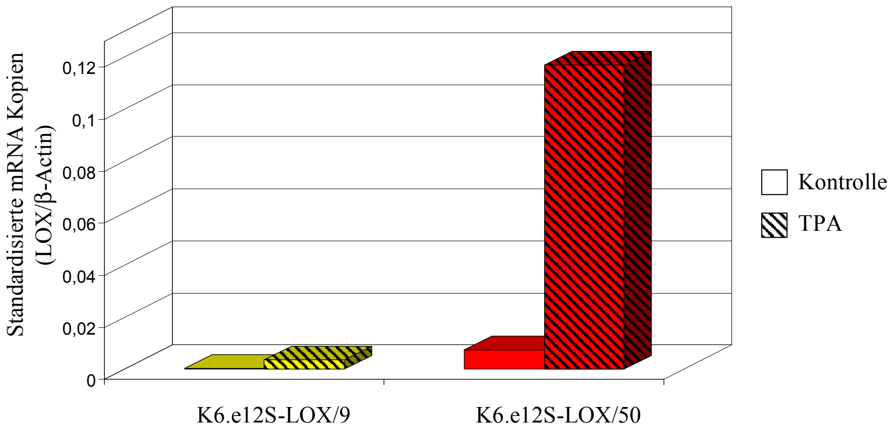


Abb. 41 Effekt von TPA auf die Expression der transgenen e12S-LOX
Durch quantitative real-time RT-PCR wurde die mRNA Kopienzahl der transgenen e12S-LOX in TPA-behandelter Epidermis (schraffierte Säulen) und in Aceton-behandelter Epidermis (nicht-schraffierte Säulen) der transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 (gelb) und K6.e12S-LOX/50 (rot) ermittelt. Rasierte Rückenhaut von je 3 Tieren der Linien K6.e12S-LOX/9 und K6.e12S-LOX/50 wurde mit 5 nmol TPA bzw. Aceton als Lösungsmittelkontrolle behandelt. 24 h nach der Aceton-Behandlung bzw. 48 h nach der TPA-Behandlung wurde die Haut präpariert und schockgefroren. Die RNA wurde mit dem RNA-Clean-Reagenz isoliert (5.2.2.3) und mit oligo (dT)-Primern revers transkribiert (5.2.4). Die Durchführung der real-time PCR kann aus 5.1.4.2 und Tab. 2 entnommen werden.

Von der TPA-behandelten Rückenhaut und von Kontrollhäuten wurden Gewebeschnitte angefertigt und mit Hämalaun/Eosin (HE) gefärbt, um einen eventuellen Unterschied auf mikroskopischer Ebene erkennen zu können. Entsprechend dem sehr geringen Expressionsniveau in Kontrollhaut beider transgener Linien liessen sich in HE-gefärbten Schnitten keine Unterschiede zwischen Kontrollhäuten von Wildtyp- und transgenen Mäusen finden (Abb. 42). Die TPA-Behandlung sollte zur Aktivierung des K6-Promotors führen und die Transgen-Expression steigern. Jedoch waren auch in diesen Häuten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Mauslinien zu erkennen. Die interfollikuläre Epidermis und die Hautanhangsgebilde waren morphologisch völlig identisch.

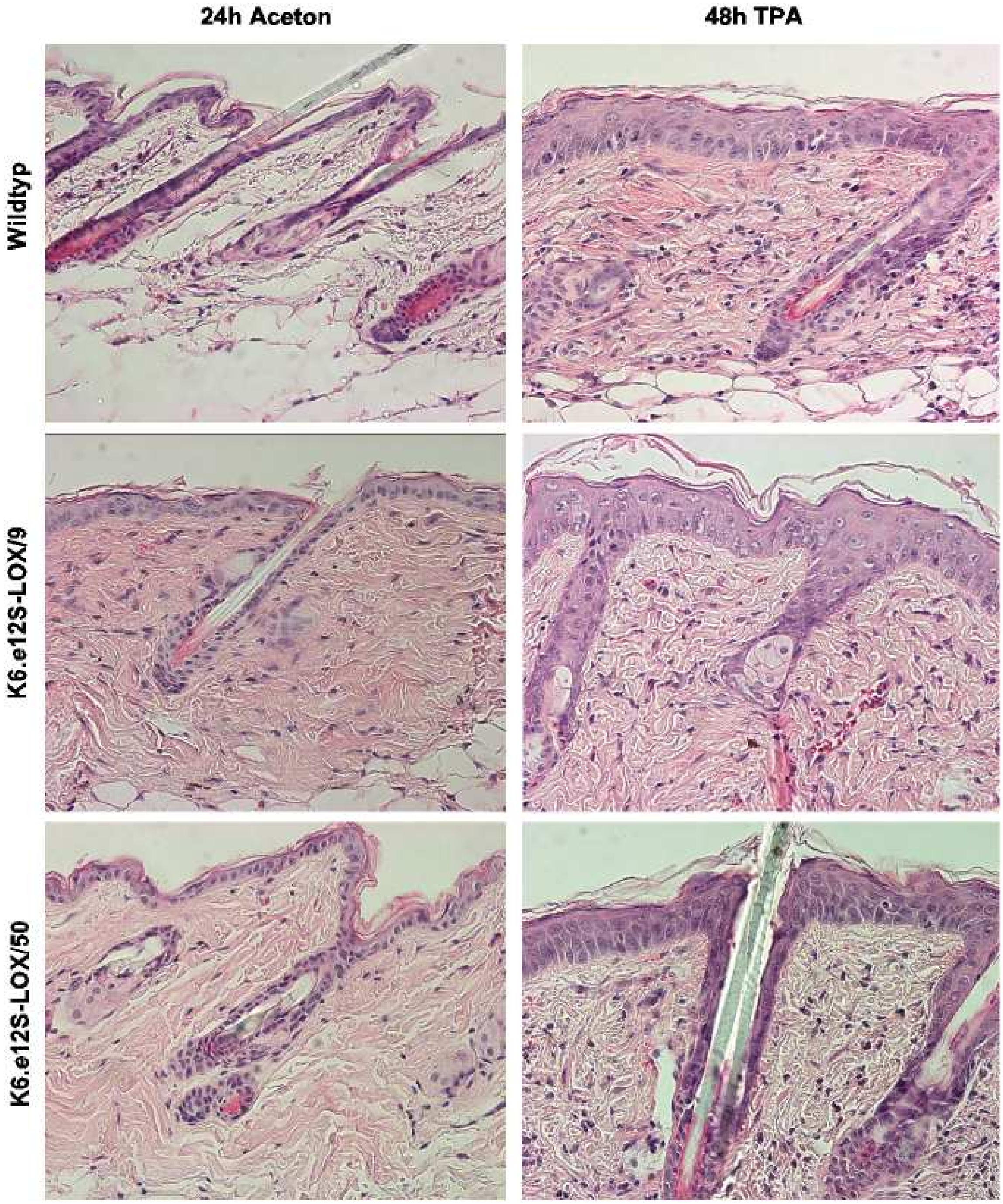


Abb. 42 Effekt von TPA auf die Haut der transgenen Mauslinien K6.e12S-LOX/9 und K6.e12S-LOX/50 sowie des Wildtyps
Die Rückenhaut von 7 Wochen alten Tieren wurde rasiert und am Tag darauf mit 10nmol TPA, gelöst in 100 µl Aceton, bzw. Aceton alleine behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und Rückenhautbiopsien entnommen. 4 µm Schnitte wurden mit Hämalaun und Eosin gefärbt (5.6.1.3). Die Bilder wurden unter einem Lichtmikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung unter Ölimmersion aufgenommen.

Um die Proliferationsaktivität zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung von Ki67 durchgeführt (Abb. 43). Dieses Protein wird nur während der DNA-Replikation im Zellkern exprimiert und dient somit zum Nachweis proliferierender Zellen.

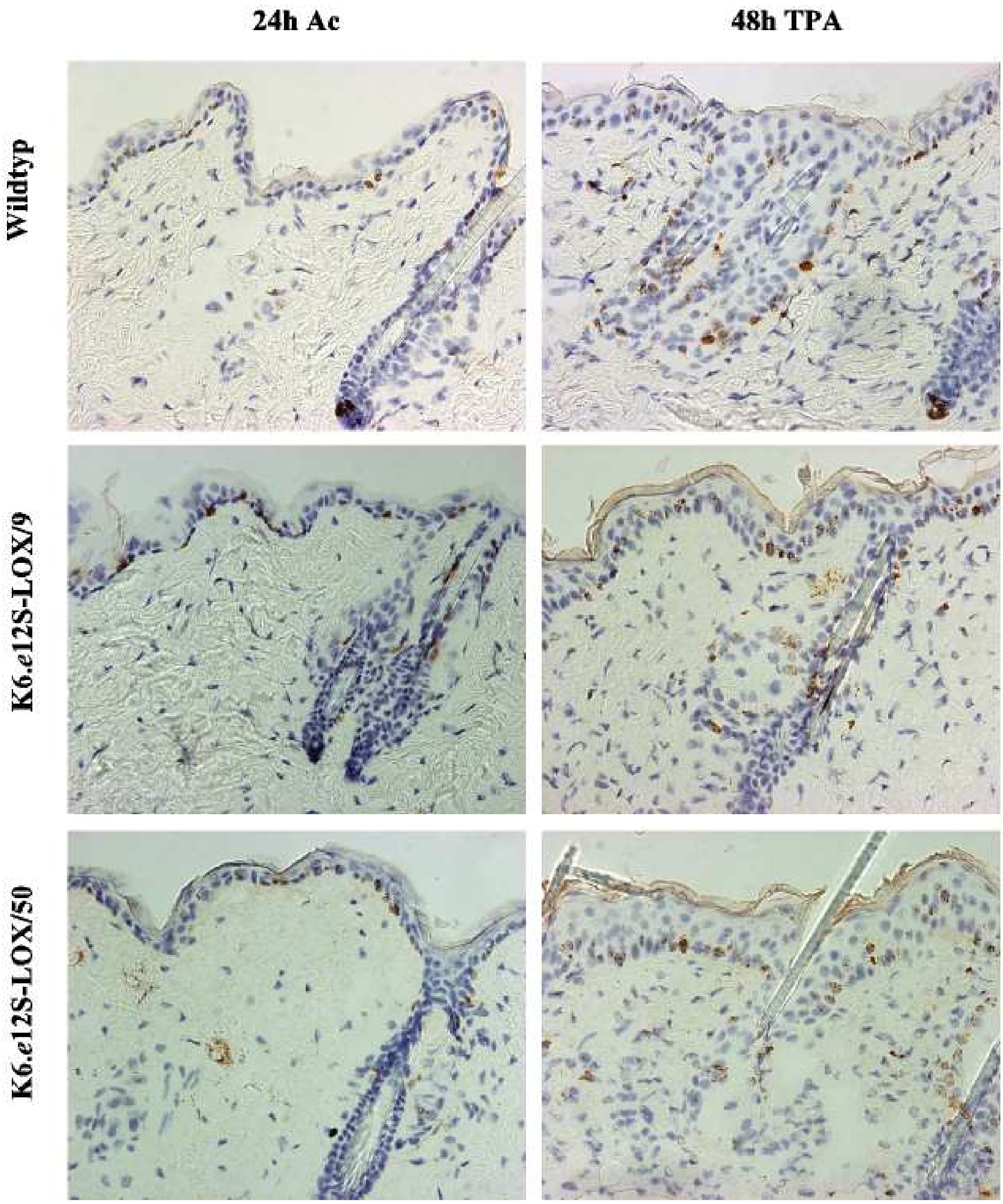


Abb. 43 Effekt von TPA auf die Ki67-Expression in der Haut der transgenen Mauslinien K6.e12S-LOX/9 und K6.e12S-LOX/50 und des Wildtyps
Die Tiere wurden wie für Abb. 42 beschrieben behandelt. Gefrierschnitte von Rückenhautbiopsien wurden mit einem Peroxidase-gekoppelten Ki67-Antikörper und Hämalaun gefärbt (5.6.3). Die

Bilder wurden unter einem Lichtmikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung unter Ölimmersion aufgenommen.

Die in Abb. 43 gezeigten Gewebeschnitte lassen Ki67-positive Basalzellen in der interfollikulären und follikulären Epidermis erkennen. Die Zahl der Ki67-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Basalzellen, d.h der Proliferationsindex, ist in Abb. 44 dargestellt.

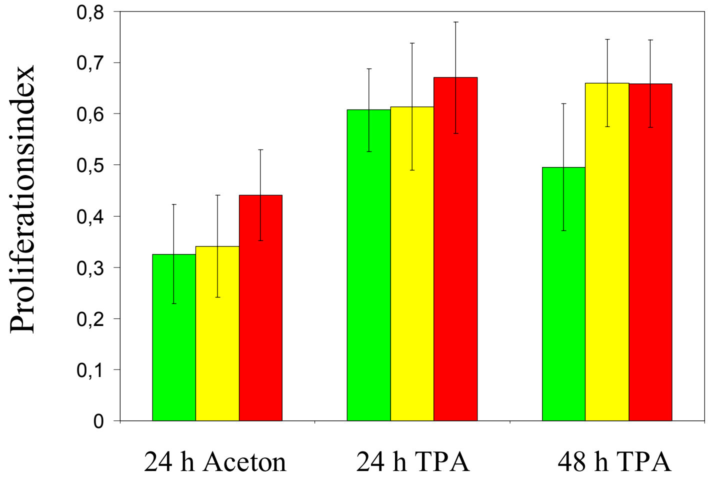


Abb. 44 Effekt von TPA auf den Proliferationsindex in der Epidermis von Wildtyp-Mäusen (grün) und Mäusen der transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 (gelb) und K6.e12S-LOX/50 (rot)
Wie in Abb. 43 beschrieben, wurden immunhistochemische Färbungen von Ki67 angefertigt. Die Hautschnitte der beiden transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 und K6.e12S-LOX/50 sowie des Wildtyps stammten von jeweils 3 Individuen für jede Behandlung. In insgesamt 432 Gesichtsfelder wurden die interfollikulären Ki67-positiven Zellkerne und Gesamtzahl der interfollikulären Zellkerne ermittelt. Der Proliferationsindex wurde ermittelt als das Verhältnis Ki67-positiver Zellkerne zu der Gesamtzahl an Zellkernen. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Der Proliferationsindex der Linie K6.*e*12S-LOX/50 24 h nach Aceton- oder TPA-Behandlung unterschied sich signifikant ($P<0{,}001$) von dem des Wildtyps und der Linie K6.*e*12S-LOX/9. Der Wert für 48 h nach TPA-Behandlung war für beide transgenen Linien signifikant höher als der des Wildtyps ($P<0{,}0001$).

Mit Hilfe von Markerproteinen für die Keratinozytendifferenzierung wurde untersucht, ob die transgene Expression von *e*12S-LOX einen Einfluß auf Differenzierung hatte. Als basal exprimiertes Markerprotein wurde Keratin 5 und als Marker der suprabasalen Zellschichten Involucrin untersucht.

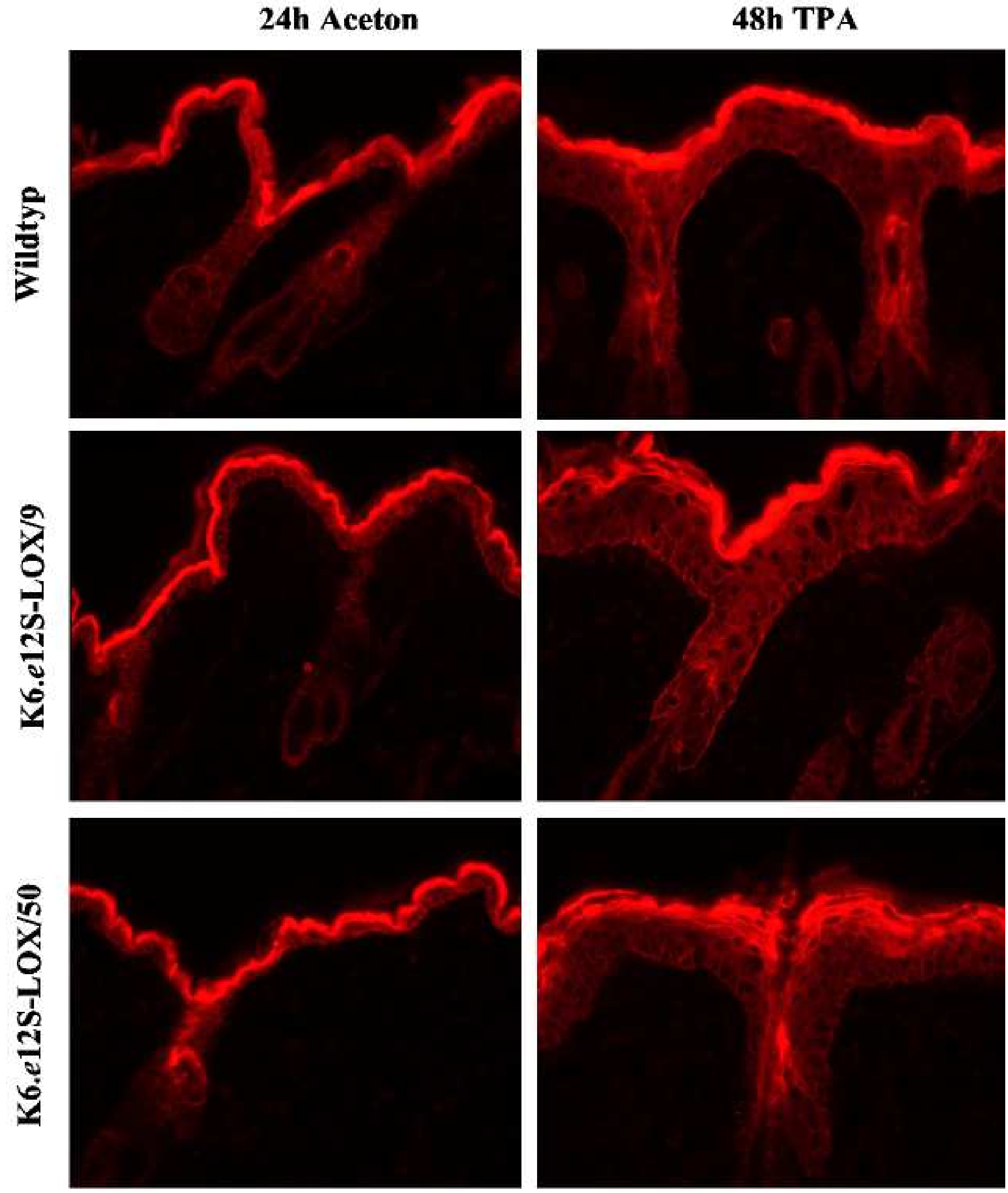


Abb. 45 Effekt von TPA auf die Involucrin-Expression in der Epidermis der transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 und K6.e12S-LOX/50 und des Wildtyps
Die Tiere wurden wie für Abb. 42 beschrieben behandelt. Gefrierschnitte von Rückenhautbiopsien wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Involucrin-Antikörper angefärbt (5.6.2). Die Bilder wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung unter Ölimmersion aufgenommen.

Sowohl die Keratin 5- (nicht gezeigt) als auch die Involucrinexpression (Abb. 45) wiesen keine Unterschiede zwischen transgenen Linien und Wildtypmäusen auf.

6.4.3. Ödem-Experimente

Da vermutet wird, daß LOX-Produkte wie z.B. 12-HETE Mediatoren von Entzündungsreaktionen sind (Wollard et al., 1989), wurde überprüft, ob die transgene Expression der *e*12S-LOX epidermale Entzündungsreaktionen beeinflußt. Hierzu wurde ein Standardtest für Entzündungen, der Ödemtest, durchgeführt. Gemessen wurde die Ödembildung am Mausohr über das Gewicht von Biopsien, die mit einem definierten Stanzeisen den zuvor getöteten Mäusen entnommen worden waren.

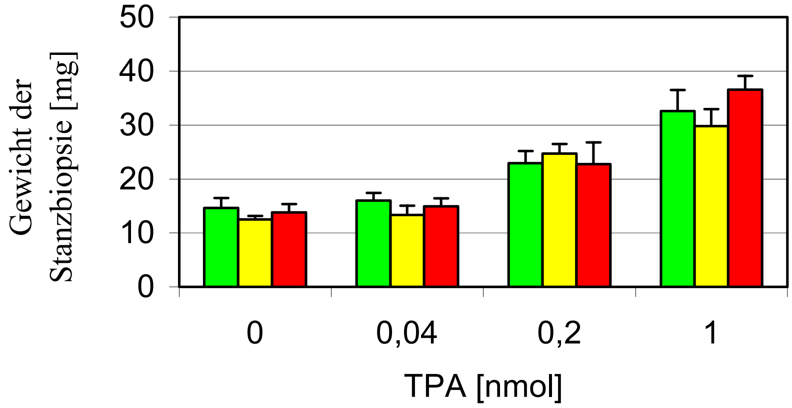
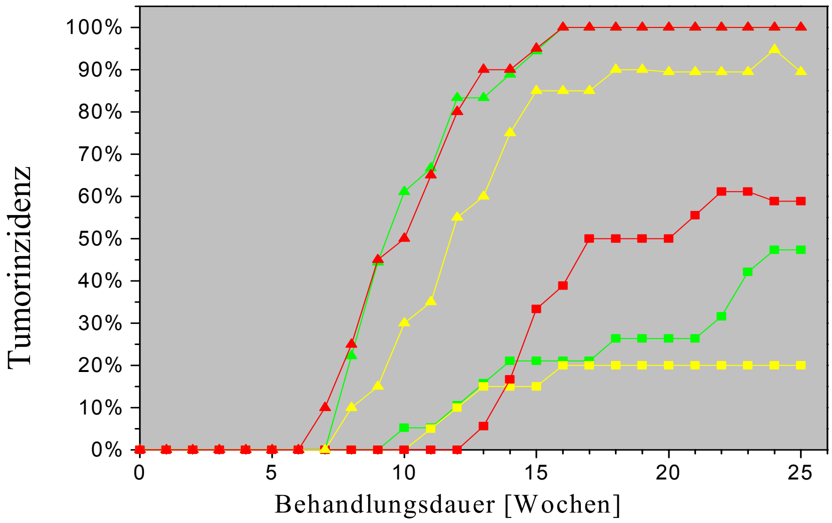


Abb. 46 Effekt von TPA auf die Ödembildung am Mausohr des Wildtyps (grün) und der beiden transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 (gelb) und K6.e12S-LOX/50 (rot)
Die Ohren 7 Wochen alter Mäuse wurden mit Aceton (0,01 ml) oder steigenden Konzentrationen von TPA (0,04-1 nmol/0,01 ml Aceton) behandelt. 6 Stunden später erfolgte nach Tötung der Tiere die Wägung von Stanzbiopsien (5.5.4). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen von beiden Ohren dreier Tiere pro Behandlungsgruppe.

Wie in Abb. 46 dargestellt war kein signifikanter Unterschied bei der Bildung des TPA-induzierten Ödems zwischen den verschiedenen Mauslinien und Wildtyp-Tieren zu erkennen.

6.4.4. Karzinogenese-Experimente

Im Verlauf der Tumorentwicklung wird die Expression der *e*12S-LOX vollständig unterdrückt (vergleiche Müller et al., 2002). Danach könnte man vermuten, daß diese LOX-Isoform eine antitumorigene Wirkung hat. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden mit den transgenen Tieren, welche die *e*12S-LOX unter der Kontrolle des K6-Promotors exprimierten, Initiations-Promotions-Experimenten (5.5.3) durchgeführt. Die Ergebnisse der Tumorversuche sind in Abb. 47 dargestellt.



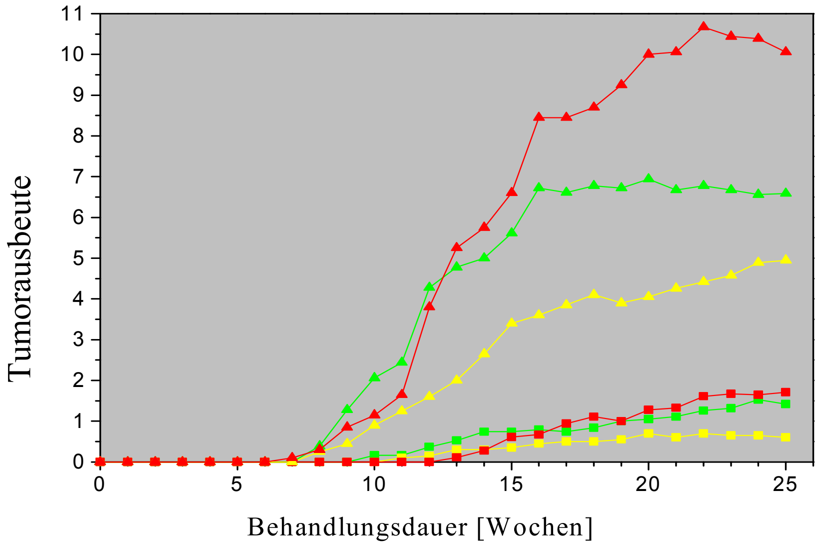


Abb. 47 Tumorbildung beim Wildtyps (grün) und den transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 (gelb) und K6.e12S-LOX/50 (rot) nach Anwendung des Initiations-Promotions-Protokolls
Auf die rasierte Rückenhaut 7 Wochen alter Mäuse wurden 100 nmol DMBA in Aceton aufgetragen. Eine Woche später beginnend wurde 2mal wöchenlich mit 2,5 nmol (□) oder 10 nmol (Δ) TPA in Aceton behandelt (5.5.3). Wöchentlich wurden die Papillome gezählt. Die Tumorinzidenz (oberes Diagramm) ist der prozentuale Anteil der Tumorträger, die Tumorausbeute (unteres Diagramm) der Mittelwert der Tumore pro überlebendem Tier. Pro Behandlungsgruppe wurden 20 Mäuse verwendet.

Für den schwachen Überexprimierer K6.*e*12S-LOX/9 war eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Tumorbildung zu erkennen. Dies traf für alle TPA-Dosen von 2,5 und 10 nmol (Abb. 47) sowie von 5 nmol (nicht gezeigt) zu. Die Linie K6.*e*12S-LOX/50 hingegen zeigte bei allen TPA-Konzentrationen eine verstärkte Tumorbildung. Bei niedrigen TPA-Dosen war besonders die Tumorinzidenz, bei hohen TPA-Dosen vor allem die Tumorausbeute deutlich erhöht.

6.4.5. mRNA-Expression in Haut und Tumoren

Es sollte überprüft werden, ob die unterschiedliche Tumorantwort der transgenen Linien auf die unterschiedliche Expression des Transgens zurückzuführen war. Um herauszufinden, inwiefern sich die Expression der verschiedenen LOX-Isoformen während der Tumorgenese verändert, wurde die Menge der mRNAs in Papillomen und der sie umgebenden Haut ermittelt.

Wegen der zu geringen Isoenzym-Spezifität der erhältlichen Anti-LOX-Antikörper konnte die Expressionsanalyse nur auf mRNA-Ebene durchgeführt werden. Da die LOX-Expression niedrig ist und die Biopsien von Haut und Tumoren nur geringe RNA-Mengen liefern, wurde ein quantitatives real-time RT-PCR-Verfahren entwickelt, das die Northern Blot-Analyse ersetzte. Dabei wurde der LightCycler von Roche mit Primern verwendet, von denen mindestens einer über eine Spleiß-Stelle gelegt wurde, um auch bei potentiellen DNA-Verunreinigungen keine störenden Produkte zu liefern (5.1.4.2).

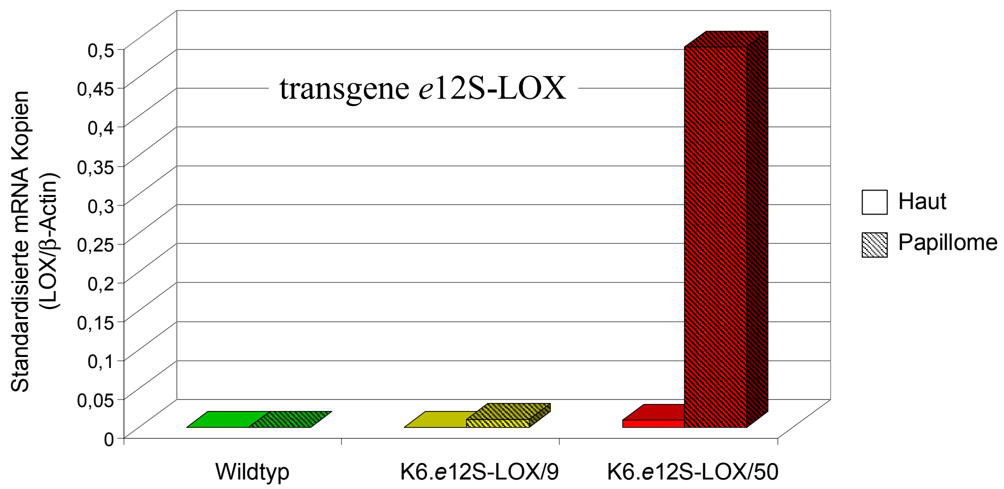


Abb. 48 mRNA-Expression von transgener e12S-LOX in Wildtyp- und transgenen Tieren
Durch quantitative real-time RT-PCR wurde die mRNA Kopienzahl der transgenen e12S-LOX in Papillomen (schraffierte Säulen) und in der umgebenden Haut (nichtschraffierte Säulen) nach Anwendung des Initiations-Promotions-Protokolls bei Wildtyp-Mäusen (grün) sowie den transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 (gelb) und K6.e12S-LOX/50 (rot) ermittelt. Bei den Tieren der Linien K6.e12S-LOX/9, K6.e12S-LOX/50 und des Wildtyps wurde im Alter von 7 Wochen die Tumorgenese durch 100 nmol DMBA initiiert und für 25 Wochen 2 mal wöchentlich durch 10 nmol TPA promoviert (5.5.3). Aus den Papillomen wurden 2 Wochen nach der letzten TPA-Behandlung die RNA (von je 2-3 Tieren mit jeweils 3-5 Papillomen) isoliert (5.2.2.3) und mit oligo (dT)-Primern revers transkribiert (5.2.4). Die Durchführung der real-time PCR kann aus 5.1.4.2 und Tab. 2 entnommen werden. Gezeigt sind Mittelwerte von je 2 PCRs mit je einer mRNA-Präparation. Andere mRNA-Präparationen ergaben ähnliche Ergebnisse.

Die Daten in Abb. 48 belegen, daß bei Mäusen der Linie K6.*e*12S-LOX/9 das Transgen in der Haut nicht und in Papillomen schwach exprimiert war. Dagegen war in Papillomen der Linie K6.*e*12S-LOX/50 eine sehr starke Transgenexpression nachweisbar. Die schwache Expression des Transgens in der Haut dieser Tiere war vermutlich Folge der K6-Promotor-Aktivität in follikulärer Epidermis. In Wildtyp-Epidermis war erwartungsgemäß keine transgene *e*12S-LOX-mRNA nachweisbar.

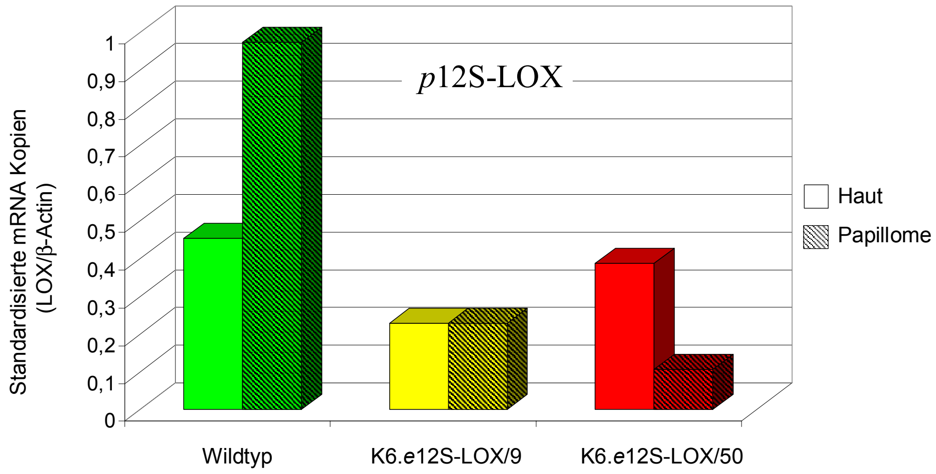


Abb. 49 mRNA-Expression von p12S-LOX in Wildtyp- und transgenen Tieren
Für Details siehe Abb. 48.

In Abb. 49 ist der analoge Versuch für *p*12S-LOX dargestellt. Hier zeigte sich eine starke mRNA-Expression in der Haut von Wildtyp-Tieren, die in Papillomen noch einmal deutlich erhöht war. In der Haut und den Papillomen von Mäusen der Linie K6.*e*12S-LOX/9 war die Expression gleich, jedoch insgesamt gegenüber dem Wildtyp deutlich vermindert. Die Haut von Mäusen der Linie K6.*e*12S-LOX/50 zeigte ein dem Wildtyp vergleichbares Expressionsniveau, das aber in Papillomen stark erniedrigt war.

Ein weiteres LOX-Isoenzym, das untersucht wurde, ist die *l*12S-LOX (Abb. 50). Während die Expression in den Häuten aller Tiere sehr klein war, zeigte sie im Vergleich zum Wildtyp in Papillomen der Linie K6.*e*12S-LOX/50 eine deutliche und in Papillomen der Linie K6.*e*12S-LOX/9 sogar eine starke Erhöhung.

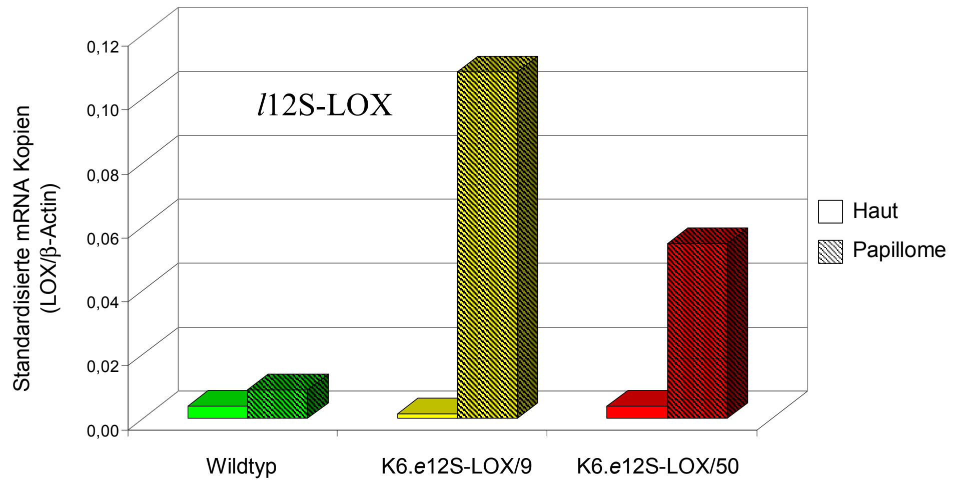


Abb. 50 mRNA-Expression von l12S-LOX in Wildtyp- und transgenen Tieren
Für Details siehe Abb. 48.

Bei der Isolierung der Gewebeproben wurde darauf geachtet, daß keine eitrigen oder entzündeten Areale aufgearbeitet wurden. Die in Abb. 50 gezeigte mRNA-Expression der *l*12S-LOX fand daher wahrscheinlich in Zellen der Haut statt.

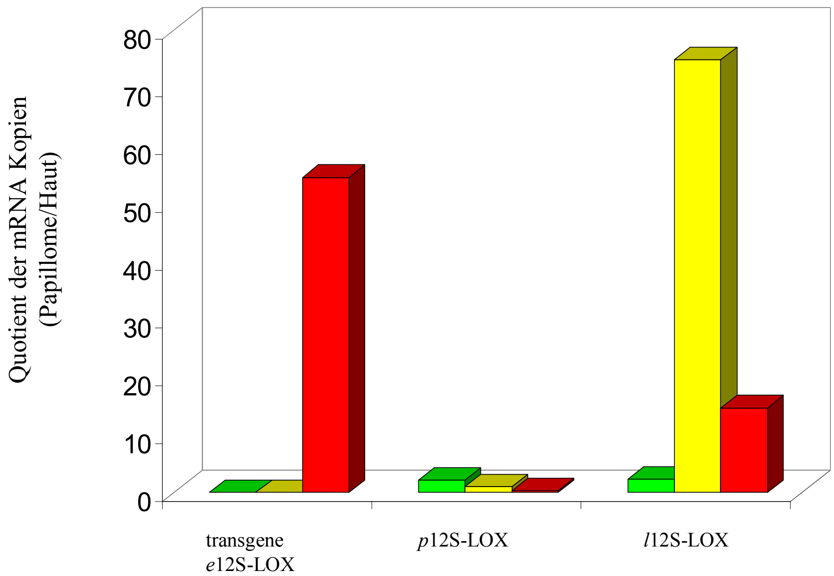


Abb. 51 Effekt der Tumorgenese auf die mRNA-Expression verschiedener epidermaler 12S-LOXn
Gezeigt ist das Verhältis der durch quantitative real-time RT-PCR ermittelten mRNA-Kopienzahl epidermaler 12S-LOXn in Papillomen zur umgebenden Haut für Wildtyp-Mäuse (grün) sowie die transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 (gelb) und K6.e12S-LOX/50 (rot). Für Durchführung und experimentelle Details siehe Abb. 48.

Um Expressionsunterschiede im Verlauf der Tumorentstehung darzustellen, ist in Abb. 51 der Quotient mRNA-Kopienzahl in Papillomen / mRNA-Kopienzahl in der Epidermis abgebildet. Für die Berechnung wurden die Werte aus Abb. 48, Abb. 49 und Abb. 50 verwendet. Bei Wildtyp-Mäusen ist keine deutliche Steigerung in der Expression eines 12S-LOX-Isoenzyms zu erkennen. Die transgene Linie K6.e12S-LOX/9 weist einen fast 80fachen Anstieg der *l*12S-LOX-mRNA-Kopien auf. Bei der Linie K6.*e*12S-LOX/50 ist dieser Anstieg deutlich schwächer, dafür steigt die Kopienzahl der transgenen *e*12S-LOX fast um den Faktor 60 an.
Jede der getesteten Mauslinien exprimierte eine LOX-Isoform besonders stark: Bei der Linie K6.*e*12S-LOX/9 herrschte die *l*12S-LOX vor, bei K6.*e*12S-LOX/50-Mäusen die transgene *e*12S-LOX, und bei Wildtyp-Tieren die *p*12S-LOX.
Die mRNA-Expression der anderen epidermalen LOXn, nämlich der 8S-LOX, 12R-LOX und *e*LOX-3 wurde ebenfalls bestimmt. Diese Isoenzyme zeigten jedoch keine signifikante Veränderung der Expressionsstärke. Alle Ergebnisse sind in Tab. 11 schematisch zusammengefaßt.

*Tab. 11 Expression von LOX-Isoenzymen in der Haut und in Papillomen von Wildtyp-Tieren und Mäusen der Linien K6.*e*12S-LOX/9 und K6.*e*12S-LOX/50*
Für Details siehe Abb. 48. „-“ = keine Expression nachweisbar

Isoenzym	Wildtyp		K6.*e*12S-LOX/9		K6.*e*12S-LOX/50	
	Haut	Papillome	Haut	Papillome	Haut	Papillome
8S-LOX	-	-	-	-	-	-
12R-LOX	+++	++++	+++	+++	+++	++++
*e*LOX-3	++	++	++	++	++	++
transgene *e*12S-LOX	-	-	-	+	+	++++
*p*12S-LOX	+++	+++++	+++	+++	++++	++
*l*12S-LOX	+	++	(+)	++++	+	+++

6.5. Gentoxische Potenz von Lipoxygenase-Produkten

Eine gentoxische Wirkung des LOX-Stoffwechsels könnte eine Erklärung sowohl für die erhöhte Tumorbildung bei der Mauslinie K6.*e*12S-LOX/50 (6.4.4) als auch für den Selektionsnachteil LOX-überexprimierender Keratinozyten *in vitro* (6.2.1) sein. Mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese, auch Comet-Assay genannt (5.4.5), ist es möglich, direkte Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Strangbrüche, die bei der Exzisionsreparatur gebildet werden, zu messen.

Daher wurden die LOX-Produkte 12-HPETE und 12-HETE und als Vergleich gentoxische Standardchemikalien mit primären Keratinozyten inkubiert und der Comet-Assay durchgeführt. Die erste Untersuchung wurde mit der permanenten Keratinozytenline Reb (Krieg et al., 1991) durchgeführt. Diese Zellinie sprach aber nur schwach auf Positivkontrollen MNNG und DMBA an (Daten nicht gezeigt). Daher wurde der Comet-Assay mit primären Keratinozyten etabliert, die metabolisch aktiver sind und die *in vivo*-Situation besser widerspiegeln. Das in Abb. 52 dargestellte Ergebnis zeigt eine deutliche gentoxische Wirkung von 12-HETE und insbesondere von 12-HPETE.

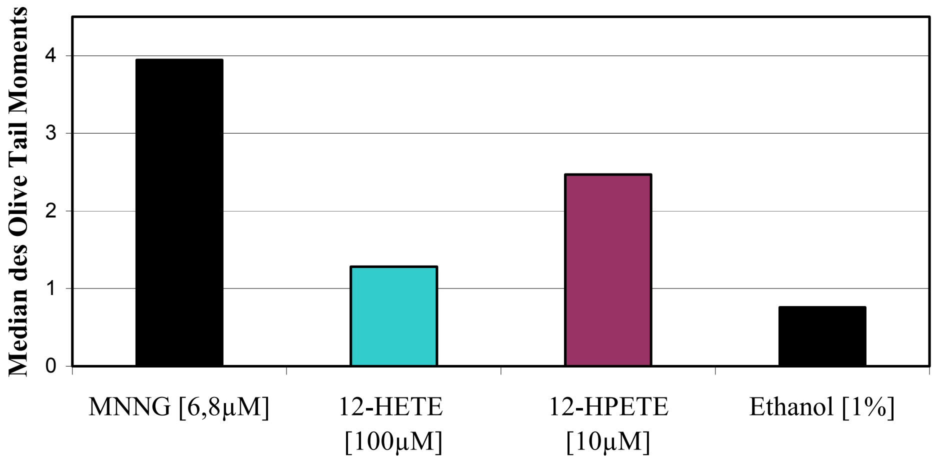


Abb. 52 Bestimmung der genotoxischen Potenz der Lipoxygenase-Produkte 12(R,S)-HETE und 12(R,S)-HPETE mittels Comet-Assay
Primäre Keratinozyten aus neonataler NMRI-Haut wurden 24 h nach Aussaat trypsiniert, und mit den Testsubstanzen für 2 h in Suspension inkubiert. Danach wurde ein Comet-Assay durchgeführt (vergleiche 5.4.5). Nach Anfärbung der Zellen mit SybrGreen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-

Mikroskops und der Software Komet 3.0 ausgewertet. Dargestellt ist jeweils der Median des Olive Tail Moments von mindestens 102 Zellen. Als Positivkontrolle diente 1 µg/ml (=6,8µM) N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), als Negativkontrolle das Lösungsmittel Ethanol.

Wurden in Gegenwart von Inhibitoren der DNA-Reparatur wie Ara-C (1,8 mM) und HU (10 mM) inkubiert, so ergaben sich noch deutlichere Effekte (Abb. 53). In denselben Konzentrationen erreichte 12-HETE nun das hohe Niveau der Positivkontrolle MNNG, während 12-HPETE noch stärker gentoxisch wirkte.

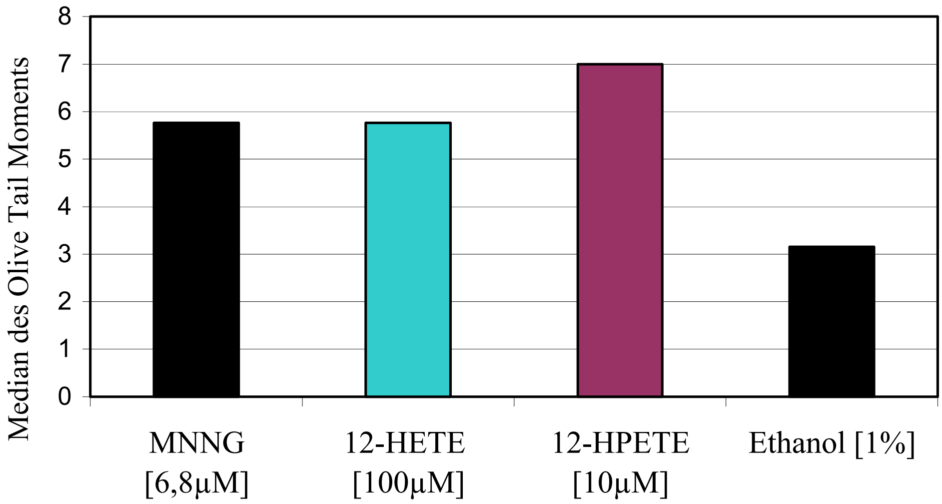


Abb. 53 Bestimmung der gentoxischen Potenz der Lipoxygenase-Produkte 12(R,S)-HETE und 12(R,S)-HPETE mittels Comet-Assay in Gegenwart der Reparaturinhibitoren Ara-C und HU Primäre Keratinozyten aus neonataler NMRI-Haut wurden mit 24 h nach Aussaat trypsiniert, und mit den Testsubstanzen und den Reparaturinhibitoren Ara-C (1,8 mM) und HU (10 mM) für 2 h in Suspension inkubiert. Danach wurde wie für Abb. 52 beschrieben fortgefahren.

Bei allen Durchführungen lag das „Olive Tail Moment" (5.4.5) der LOX-Produkte deutlich über der Lösungsmittelkontrolle und auf vergleichbarem Niveau wie die Positivkontrolle. Die Versuche zeigen, daß die 12-HPETE und 12-HETE gentoxische Substanzen sind.

7. DISKUSSION

Über die physiologische Rolle von epidermalen LOXn ist bisher nur wenig bekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf eine Beteiligung dieser Enzymgruppe bei Erkrankungen, die im Zusammenhang mit gestörter epidermaler Differenzierung und auch Krebs stehen (Jobard et al., 2002; Shureiqi und Lippman, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe neuer experimenteller Ansätze entwickelt bzw. eingesetzt, die das Ziel haben, die Funktionen der epidermalen LOXn aufzuklären. Dazu gehörte die Analyse der intrazellulären Lokalisation der LOX-Isoenzyme in Keratinozyten, die Herstellung von LOX-überexprimierenden Keratinozytenlinien sowie die Generierung einer 12R-LOX-Knockout-Maus mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems. Weiterhin wurde eine bereits bestehende *e*12S-LOX-überexprimierende Mauslinie charakterisiert, die der Erforschung dieses Isoenzyms bei der epidermalen Tumorentstehung dient. Schließlich wurde die gentoxische Wirkung der 12-LOX-Produkte mittels Comet-Assay untersucht.

7.1. Zelluläre Lokalisation von LOX-GFP-Fusionsproteinen

Die intrazelluläre Lokalisation eines Enzyms oder seine Translokation an subzelluläre Strukturen nach Stimulation erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion. Unter den Lipoxygenasen ist die 5S-LOX dafür bekannt, nach induzierter Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration vom Zytosol an die Kernmembran zu translozieren (Rouzer und Kargman, 1988). Für diese Fähigkeit wird ein Lokalisationssignal verantwortlich gemacht, das in der β-Barrel- (Chen et al., 1998; Chen und Funk, 2001) oder der katalytischen Domäne vorkommen soll (Healy et al., 1999). Auch die intrazelluläre Lokalisation epidermaler LOX-Isoenzyme wurde an unterschiedlichen Zelltypen untersucht (Hsi et al., 2001; Timar et al., 2000), aber noch nicht an Keratinozyten, dem Zelltyp, in dem sie *in vivo* vornehmlich exprimiert werden.

Deshalb wurden N-terminale Fusionsproteine von murinen LOX-Isoenzymen und GFP in die Mauskeratinozytenlinie SP1#3 transfiziert und die Lokalisation mit einem Fluoreszenz- oder einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die Epidermis-Typ LOXn in Keratinozyten im Zytoplasma, jedoch nicht im Kern vorkommen. Dabei wurden einige Unterschiede zwischen den einzelnen LOXn festgestellt. Die *e*12S-LOX und die *p*12S-LOX kamen relativ gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor, wobei der Kern ausgespart blieb. Die 12R-LOX ergab ein ähnliches Muster wie die *e*12S-LOX, bevorzugte jedoch den kernnahen Bereich deutlich und zeigte eine Feinstruktur ausgesparter Stellen. Eine katalytisch inaktive 12R-LOX-Mutante zeigte dagegen eine gleichmäßige Verteilung zwischen Kern und Zytoplasma ähnlich wie GFP alleine.

Danach hätte die katalytische Aktivität der 12R-LOX einen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung. Ähnliches konnte für die 15-LOX-1 gezeigt werden, bei der die Assoziation mit Membranen des ER und der Mitochondrien von der katalytischen Aktivität abhängt (Grullich et al., 2001). Eine Assoziation der 12R-LOX mit dem ER oder Actinfasern konnte durch Kolokalisationsexperimente mit einem spezifischen Markerprotein bzw. –peptid ausgeschlossen werden. Interaktionen von LOX-Isoenzymen mit zellulären Proteinen sind jedoch schon beschrieben worden. So wurde die Assoziation der *p*12S-LOX mit Keratin 5, lamin A, Integrin β4 und dem Phosphoprotein C8FW entdeckt (Tang et al., 2000). Die 5S-LOX interagiert mit dem Coactosin-ähnlichen Protein (Provost et al., 2001).

Bei der *e*LOX-3 fällt ähnlich wie bei der 12R-LOX eine kernorientierte Lokalisation auf. Beide Isoenzyme besitzen eine Extradomäne, die bei keiner anderen LOX zu finden ist. Ob diese Domäne einen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung hat, wird zur Zeit mit Hilfe von Mutanten, bei denen diese Domäne deletiert ist oder diese Domäne zusätzlich eingeführt wurde, untersucht.

7.2. Überexpression von LOXn in Keratinozytenlinien

Die meisten Untersuchungen, die sich mit der Aufklärung von funktionellen Zusammenhängen in Zellen befassen, werden an Zellkulturen durchgeführt. Allerdings gibt es Einschränkungen für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation in einem Organismus. Für die Analyse der LOX-Funktion in Keratinozytenkulturen gab es bisher keine Modelle.

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Herstellung solcher Modellsysteme. Ein großes Hindernis stellte die äußerst geringe Transfektionseffizienz in Keratinozyten dar. Mit keinem käuflichen Transfektionsreagenz konnte ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden, und auch eine Selektion der transfizierten Zellen führte nicht zu einem Erfolg. Die für die Transfektion verwendeten Plasmide trugen zur Steuerung der Expression die virale Sequenz pCMV. Offenbar sind Keratinozyten in der Lage, diesen starken, unphysiologischen Promotor abzuschalten (Herweijer et al., 2001). Jedoch wurden auch bei Verwendung physiologischer Keratinpromotoren keine Transfektanten mit nachweisbarer LOX-Expression erhalten.

Ein anderer Grund könnte darin liegen, daß die konstitutive LOX-Expression eine Negativselektion zur Folge hatte, z.B. durch verminderte Proliferation und terminale Differenzierung. Ähnliches konnte bereits für die 15-LOX-2 gezeigt werden (Tang et al., 2002). Auf diese Möglichkeit weisen auch *in vivo*-Untersuchungen hin: mit Ausnahme der *e*12S-LOX finden sich die Epidermis-Typ-LOXn vorwiegend in suprabasalen differenzierten Keratinozyten (Heidt et al., 2000).

Um eine negative Selektion auszuschließen, wurde ein retrovirales System verwendet, bei dem die Expression des Transgens mit Tetrazyklin oder seinem Analogon Doxyzyklin steuerbar ist (Tet on/off). Gleichzeitig sollte dieses System für die effiziente Integration des Expressionskonstruktes in das Genom der Keratinozyten sorgen.

Es wurden Mauskeratinozyten isoliert, die den reversen Tet-Repressor exprimierten. Der Test auf Hintergrundexpression und Induzierbarkeit mit einem Reportergen zeigte aber, daß der Virustiter niedrig war. Dieses Problem stellt eine bekannte Schwäche der retroviralen Systeme dar (Olsen und Sechelski, 1995; Kobinger et al., 1997). Die Produktion und Reinigung der Viruspartikel muß daher weiter optimiert werden.

7.3. KonditionalerKnockout der 12R-LOX in der Maus

Die epidermale 12R-LOX ist bisher das einzige LOX-Isoenzym des Säugers mit R-Stereospezifität. Jedoch ist bisher nur wenig über seine Funktion bekannt, wenn man von Untersuchungen absieht, die eine Beteiligung bei der Entwicklung von Psoriasis und Formen kongenitalen Ichthyosen nahelegen (Baer et al., 1991; Baer et al., 1995, Fogh et al., 1989; Jobard et al., 2002). Um die Rolle der 12R-LOX bei Hauterkrankungen einschließlich Hautkrebs aufzuklären, sollte in dieser Arbeit ein Knockout-Mausmodell etabliert werden.

Zu diesem Zweck wurde ein Gen-Targeting-Konstrukt hergestellt, das neben der konventionellen Inaktivierung weitere gezielte Manipulationen des Gens zuläßt. Dies war mit Hilfe eines konditionalen Knockouts unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems möglich. Weil das konditionale Ausschalten ein zwar elegantes, aber auch zeitaufwendiges Verfahren darstellt, wurden zunächst Zellklone mit einem konstitutiven Knockout erzeugt. Derartige Klone fallen gewissermaßen als Nebenprodukt an. Wegen der konstitutiven Expression von 12R-LOX-mRNA in Epidermis, Vormagen, Trachea, Lunge und Gehirn des adulten Tieres sowie auch in embryonaler und neonataler Epidermis (Sun et al., 1998; Heidt 1999) war jedoch auch ein konditionaler Knockout wünschenswert.

Das Projekt setzte eine ausgeklügelte Strategie zur Herstellung des Targeting-Konstruktes voraus, die alle späteren Erfordernisse wie Genotypisierung und Manipulationsmöglichkeiten berücksichtigte. Es wurden Homologiebereiche von 5,85 kb integriert, die den Einbau des Targeting-Vektors über homologe Rekombination erst ermöglichen. Außerdem wurden verschiedene Positiv- und Negativ-Selektionsmarker für die Selektion homolog rekombinierter Klone (Neomycinresistenz, Diphterietoxin A) und die darauffolgende Isolierung von Klonen mit Cre-vermittelten Deletionen (Thymidin-Kinase) integriert. Durch das Einfügen von Cre-Erkennungsequenzen konnten diese „fremden“ DNA-Fragmente nachträglich entfernt werden. Das Ausschalten des Gens sollte letztlich über die Entfernung des Exons 8 bewerkstelligt werden, das für die Eisenbindungsdomäne im katalytischen Zentrum kodiert. Dazu wurde es wiederum von Cre-Erkennungssequenzen flankiert. Weil das Gen bei einem konditionalen Knockout bis zur Deletion in einem funktionell aktiven Zustand verbleiben muß, mußten entsprechende Vorsichtsmaßnahmen bei der Herstellung des Targeting-Vektors ergriffen werden. Für die Identifikation aller auftretenden Genotypen wurden spezifische Nachweismethoden entwickelt.

Die homologe Rekombination lieferte unter 300 untersuchten Klonen 4 Klone mit einer vollständige Integration des Targeting-Konstruktes. Die Ausbeute stimmte gut mit dem 100:1-Verhältnis von negativen und positiven Klonen überein, das bei einer problemlosen Durchführung erwartet werden kann (Torres und Kühn, 1997; persönliche Mitteilung Abt. Schütz, DKFZ). Daß bei diesen heterozygoten Zellen die transgene Bande im Southern Blot schon

schwächer erschien als die des Wildtyp-Allels, könnte an größenbedingten Transferunterschieden auf die Membran liegen.
Die Cre-vermittelte Deletion lieferte nur Klone mit der Typ I-Deletion, die für den konstitutiven Knockout verwendet werden können. Für die Typ II-Deletion, die das gefloxte Allel für den konditionalen Knockout bereitstellen soll, ist eine partielle Aktivität der Rekombinase Cre nötig. Wenn die transiente Cre-Expression in den homolog rekombinierten Klonen zu stark ist, wird die Isolierung derartiger Klone verhindert. Parallel zur Herstellung des konstitutiven Knockouts muß daher versucht werden, die Typ II-Deletion durch Elektroporation einer geringeren Menge des Cre-Expressionsplasmids zu erhalten.
Es wurde eine Kontamination der Klone mit Wildtyp-ES-Zellen nachgewiesen, deren Ursache in der Arbeit der Firmen Mice&More/Visgenyx liegt. Die Firma Mice&More konnte nicht erklären, wie es zu dieser Verunreinigung gekommen war, versicherte aber, daß dieses Phänomen schon öfter beobachtet wurde, die Generierung chimärer Tiere dadurch aber noch nie beeinträchtigt worden sei. Die Southern Blot-Analyse nach homologer Rekombination hatte jedoch auf mangelnde Stringenz der Selektionsbedingungen hingedeutet.
Durch Injektion der Zellklone mit Typ I-Deletion in Blastozysten wurden zwei chimäre Mäuse generiert, die den heterozygoten Knockout tragen sollten. Es handelt sich dabei um ein Männchen und ein Weibchen. Sie sind aus dem ES-Zellklon hervorgegangen, der den geringsten Anteil an Wildtyp-Kontamination hatte.
Auf den ersten Blick erscheint es verwunderlich, daß die chimären Mäuse unterschiedlichen Geschlechtes sind und dennoch beide eine Keimbahntransmission aufweisen könnten. ES-Zellinien, die immer von männlichen Embryonen abgeleitet werden, zeigen jedoch eine genetische Instabilität und erzeugen sowohl männliche als auch weibliche Nachkommen (Eggan et al., 2002). Desweiteren können hormonelle Effekte in denjenigen chimären Tieren in Betracht gezogen werden, die aus der Injektion weiblicher Blastozysten hervorgegangen sind. Die Wahrscheinlichkeit für eine Keimbahntransmission und die Vererbbarkeit des Knockout-Allels steigt mit wachsendem Anteil agouti-farbenen Fells und damit dem von ES-Zellen abgeleiteten Anteil des Körpers. In diesem Zusammenhang bestehen bei dem chimären Weibchen sehr gute Chancen für die Züchtung einer 12R-LOX-(-/-)-Mauslinie. Obwohl abwartet werden muß, welche Fellfarbe die Nachkommen der chimären Tiere besitzen, darf man auf ein Tiermodell zur Untersuchung von Proliferations- und Differenzierungsstörungen in der Haut hoffen.

7.4. Untersuchung K6.*e*12S-LOX-transgener Mauslinien

Die Beteiligung des LOX-Stoffwechsels an der Karzinogenese ist schon seit vielen Jahren belegt. So hemmen beispielsweise LOX-Inhibitoren die Maushautkarzinogenese im Initiations-Promotions-Modell (Fischer et al., 1987; Übersicht bei Marks und Fürstenberger, 1999). Bei 6 verschiedenen Isoenzymen, die in der Maushaut exprimiert werden, ist jedoch die differenzierte Betrachtung der einzelnen Vertreter notwendig, insbesondere da selektive Inhibitoren nicht zur Verfügung stehen.

Durch Untersuchung der spezifischen Produkte und der mRNA-Expression können Hinweise auf die Rolle von LOX-Isoenzymen bei der Tumorentstehung gewonnen werden. So wurde in verschiedenen menschlichen, aber auch in experimentell erzeugten Tumoren der Maus, eine Anhäufung der LOX-Produkte 8-, 12- und 15-HETE beobachtet (Bürger et al., 1999; Krieg et al., 1995).

Dies korreliert mit der mRNA-Expression der entsprechenden LOXn (Abb. 54). So ist die Konzentration der *p*12S-LOX-mRNA in hyperplastischer Haut und in Karzinomen besonders hoch. Die 8S-LOX-mRNA-Akkumulation erreicht in Papillomen ein Maximum und nimmt im Stadium irreversibler Papillome und Karzinome wieder ab.

Mit den Methoden der Gentechnologie können gezielte Funktionsanalysen durchgeführt werden. Nach der Ausschaltung des *p*12S-LOX-Gens zeigten Mäuse eine geringere Karzinomrate im Zweistufenmodell der Hautkarzinogenese (Virmani et al., 2001). Bei Mäusen, die die 8S-LOX überexprimierten, wurden keine Unterschiede bei der Bildung von Papillomen, aber eine stärkere Karzinombildung festgestellt (Muga et al., 2000b). Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß 8S-LOX und *p*12S-LOX bzw. ihre Produkte progressionsfördernd, also prokarzinogen wirken können.

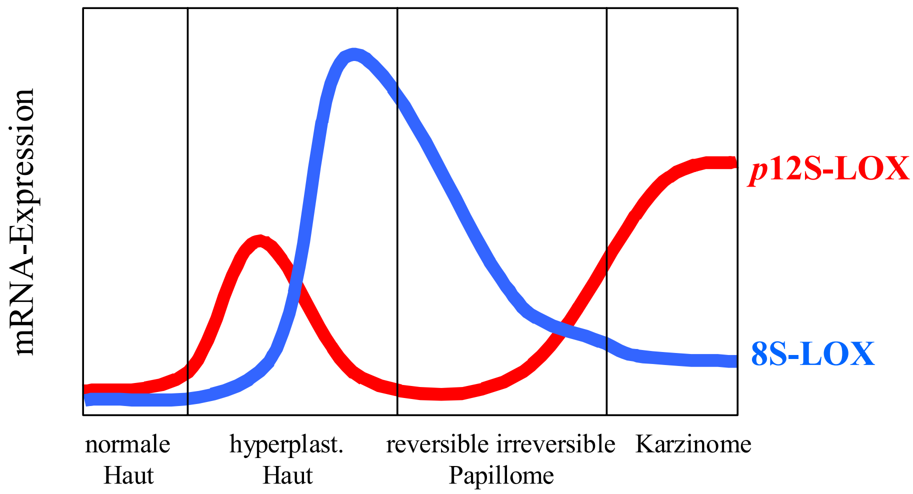


Abb. 54 Schematische Darstellung der Expression der p12S- und 8S-LOX im Verlauf der Tumorentstehung in der Maushaut (Abbildung nach P. Krieg, DKFZ)

In dieser Arbeit wurde die Rolle der *e*12S-LOX bei der Tumorentstehung mit Hilfe überexprimierender Mäuse untersucht. Die in normaler Epidermis konstitutive mRNA-Expression dieses Isoenzyms nahm im Gegensatz zu der von *p*12S- und 8S-LOX nach der Applikation von TPA ab und wurde sogar völlig unterdrückt. Besonders bemerkenswert ist, daß in Papillomen und Karzinomen keine Expression mehr nachweisbar war (Müller et al., 2002; Abb. 55). Für 12R-LOX und *e*LOX-3 wurde ein ähnlicher Expressionsverlauf gefunden (Abb. 55). Dies könnte auf eine antikarzinogene Wirkung dieser LOX-Isoenzyme hindeuten, die bei der Tumorentwicklung abgeschaltet wird. Auch für andere LOXn ist eine Hemmung der Expression während der Karzinogenese beschrieben worden. So ist die menschliche 15-LOX-2 bei benignen und malignen Prostataneoplasien herunterreguliert (Shappell et al., 1999; Jack et al., 2000). Die 15-LOX-1 zeigt eine verringerte Expression in Kolonkarzinomen (Shureiqi et al., 1999), wenngleich dieser Befund in einer anderen Studie nicht bestätigt wurde (Ikawa et al., 1999).

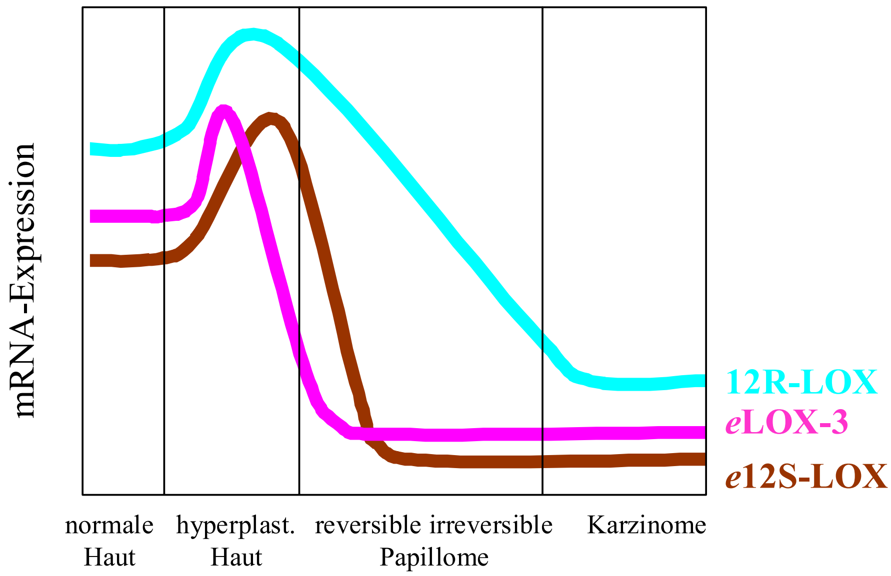


Abb. 55 Schematische Darstellung der Expression der e12S-, 12R-LOX sowie der eLOX-3 im Verlauf der Tumorentstehung in der Maushaut (Abbildung nach P. Krieg, DKFZ)

Hinweise auf die Mechanismen der pro-und antikarzinogenen Wirkung von LOXn wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel von *e*12S-LOX-transgenen Mäusen erhalten. Diese exprimierten das Transgen unter der Kontrolle des Keratin 6-Promotors (pK6) in hyperproliferativer Epidermis, also nach TPA-Behandlung und in Tumoren (Heidt 1999). Zwei Mauslinien mit unterschiedlich starker Expression des Transgens standen zur Verfügung. Beide zeigten keinen Hautphänotyp, sieht man von einer leicht erhöhten Proliferationsrate in normaler und TPA-behandelter Epidermis ab. Bei der Induktion von Papillomen nach dem Initiations-Promotions-Modell zeigten sich dagegen Unterschiede: die schwach exprimierende Linie lieferte weniger, die stark überexprimierenden Linie dagegen mehr Tumoren als der Wildtyp (Abb. 47).

Diese Unterschiede korrelierten mit unterschiedlichen LOX-Expressionsmustern in den Tumoren und der Haut. Die Veränderungen in der mRNA-Expression betrafen alle 12S-LOXn, die in der Epidermis exprimiert werden, nämlich *e*12S-LOX, *p*12S-LOX und die *l*12S-LOX. Verglichen mit der Haut, war bei den Wildtyp-Tieren die Expression der *p*12S-LOX in Papillomen leicht gesteigert, bei der schwach überexprimierenden Linie K6.*e*12S-LOX/9 war eine starke Expression von *l*12S-LOX zu verzeichnen und bei der stark überexprimierenden Linie K6.*e*12S-LOX/50 war erwartungsgemäß die transgene *e*12S-LOX am stärksten exprimiert

(Abb. 51). Es muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden, wie es zu der Veränderung im Expressionsmuster der *p*12S- und *l*12S-LOX kommt.

Die unterschiedlichen LOX-Expressionsmuster lassen sich mit den Substratspezifitäten und den Profilen der LOX-Produkte (Abb. 56; Siebert 2001) korrelieren. So ist bekannt, daß die *l*12S-LOX Linolsäure gegenüber Arachidonsäure bevorzugt, während die beiden anderen LOXn vorzugsweise Arachidonsäure metabolisieren (Bürger et al., 2000).

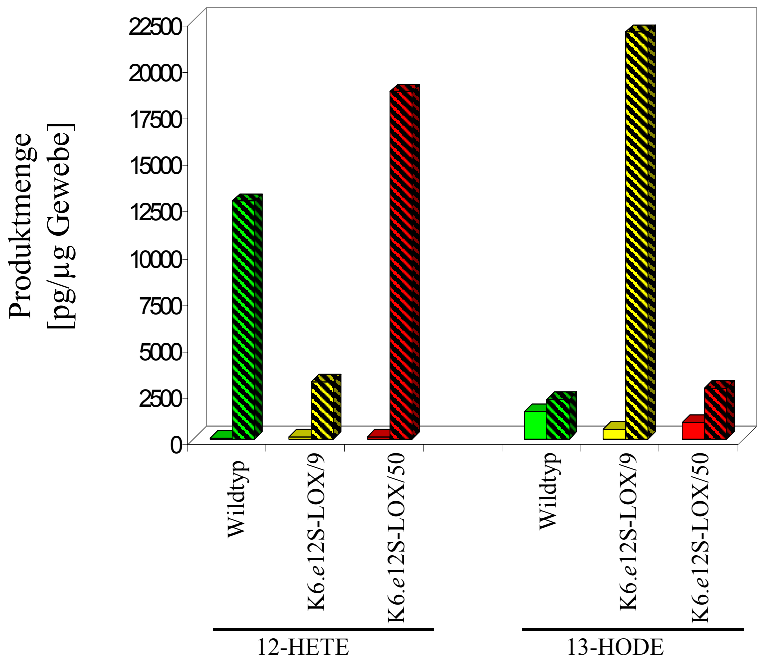


Abb. 56 Konzentration von LOX-Produkten in der Epidermis (nichtschraffierte Säulen) und den Papillomen (schraffierte Säulen) des Wildtyps (grün) und der transgenen Linien K6.e12S-LOX/9 (gelb) und K6.e12S-LOX/50 (rot) nach Anwendung des Initiations-Promotions-Protokolls (Siebert, 2001)
Nach Durchführung des Initiations-Promotions-Versuches und Entnahme der Papillome sowie der umgebenden Epidermis (5.5.3) wurde eine Lipidextraktion durchgeführt und der Gehalt von 12-HETE und 13-HODE als freie Fettsäuren und gebunden in Phospholipiden mittels HPLC-Analyse bestimmt und summiert.

Danach korrelierte die Überexpression der transgenen *e*12S-LOX mit einer Akkumulation von 12S-HETE, die stark erhöhte *l*12S-LOX-Expression mit einer Akkumulation des Linolsäureproduktes 13S-HODE (Abb. 56). Im Hinblick auf die eingangs skizzierte Arbeitshypothese ist die Beobachtung interessant, daß die Expressionserhöhung der *l*12S-LOX – dem Ortholog der menschlichen 15-LOX-1 - in der Haut von Mäusen eine antitumorigene Wirkung entfaltet, während die *p*12S-LOX protumorigen wirkt. Eine Aussage über die Wirkung der 8S-LOX, der 12R-LOX und der *e*LOX-3 war nicht möglich, da die Expressionsniveaus dieser drei LOXn und der 8-HETE-Spiegel sowohl in Tumoren als auch in der Haut nur wenig variierten.

Nimmt man für 12S-HETE und 13S-HODE eine antagonistische Wirkung bei der Tumorentwicklung an, so werden die Ergebnisse der Tumorversuche verständlich. 12-HETE kann die Karzinogenese durch vermehrte Expression von Tumorzell-Adhäsionsmolekülen (Chopra et al., 1991; Liu et al., 1995), Stimulation der Angiogenese (Nie et al., 1998) und Metastasierung (Tang et al., 1995) sowie Inhibition der Apoptose (Tang et al., 1996) beschleunigen. Außerdem stimuliert dieser Metabolit die Anheftung an Fibronectin und die Proliferation von Keratinozyten, hemmt aber deren terminale Differenzierung (Fischer et al., 1996; Hagerman et al., 1997). 13S-HODE dagegen kann antikarzinogene Effekte entfalten durch Hemmumg der Fibronectin-Anheftung (Fischer et al., 1996), Induktion von Apoptose, Zellzyklusarrest (Shureiqi et al., 1999; Shureiqi et al., 2000) und Differenzierung (Kamitani et al., 1998; Hill et al., 1998). Außerdem ist beschrieben, daß es die Rückbildung hyperproliferativer Epidermis des Meerschweinchens auslöst (Miller und Ziboh, 1990). Im Maushautkarzinogenese-Versuch wirkt eine arachidonsäurereiche Diät krebsfördernd, Linolsäure dagegen krebshemmend (Leyton et al., 1991; Fischer et al., 1996). Es ist möglich, daß auch hier 12S-HETE und 13S-HODE für die Effekte verantwortlich sind.
Dies sind die ersten *in vivo*-Untersuchungen, deren Beweiskette für die pro- bzw antikarzinogene Wirkung von LOX-Isoenzymen von der mRNA bis hin zu den LOX-Produkten und deren Wirkungen erweitert werden kann. Es wurde gezeigt, daß ein einzelnes Isoenzym bzw. dessen Produkte die Expression der anderen beeinflussen kann und die individuelle katalytische Aktivität für pro- bzw- antikarzinogene Wirkungen verantwortlich sind. Für chemopräventive Maßnahmen, die an dieser Enzymfamilie ansetzen, müssen diese Verflechtungen berücksichtigt werden.

7.5. Gentoxische Wirkung von LOX-Produkten

Für die prokarzinogene Wirkung des überschießenden LOX-Stoffwechsels kommen jedoch nicht nur hormonartige Wirkungen der Produkte in Frage, sondern auch unspezifische gentoxische Effekte von Lipidperoxiden, freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies, die als Zwischen- und Nebenprodukte entstehen.

Im Comet-Assay, der für primäre Mauskeratinozyten etabliert wurde, zeigten 12-HPETE und 12-HETE in Konzentrationen von 10 µM bzw. 100 µM deutliche gentoxische Wirkungen. In Gegenwart von Hemmstoffen der DNA-Reparatur nahm diese Gentoxizität im Vergleich zur Positivkontrolle MNNG noch einmal zu. In permanenten Keratinozytenlinien wurden dagegen nur äußerst schwache Effekte beobachtet. Primäre Keratinozyten zeichnen sich im Vergleich mit permanenten Keratinozytenlinien dadurch aus, daß sie eine höhere Fähigkeit zu Biotransformationen und zu Reparaturprozessen aufweisen. Die Reparaturinhibitoren Ara-C (Inhibition des DNA-Polymerisationsschrittes) und HU (Inhibition der Ribonukleotid-Reduktase) greifen erst in späte Prozesse der DNA-Reparatur ein und lassen die Exzision veränderter Basen, die zu Einzelstrangbrüchen führt, unbeeinflußt (Martin et al., 1999). Daß in diesem Fall mehr Strangbrüche als in der Positivkontrolle gemessen werden konnten, deutet auf den großen Anteil von Basenmodifikationen durch diese Hydroperoxy- bzw. Hydroxyfettsäuren hin.

Von Hydroperoxyfettsäuren ist bekannt, daß sie als Vorläufermoleküle für reaktive α,β-ungesättigte Aldehyde fungieren. Auf enzymatischem oder nichtenzymatischem Wege werden dabei vor allem 4-Hydroperoxy-2*E*-nonenal oder direkt 4-Hydroxy-2*E*-nonenal gebildet (Schneider et al., 2001). Auch die Produktion des 4-Oxo-2-nonenals durch LOXn ist beschrieben worden (Rindgen et al., 1999). 4-Hydroxy-2-nonenal kann entweder direkt oder über sein Epoxid mit der DNA reagieren. Die Epoxidierung kann z.B. durch Inkubation mit 9- und 13-HPODE oder einem Reaktionsgemisch aus Arachidon-, Linolsäure und pflanzlicher LOX erreicht werden (Chen und Chung, 1996). Damit liefern die Produkte des LOX-Stoffwechsels nicht nur die primären toxischen Verbindungen der Lipidperoxidation sondern können in einer unabhängigen Reaktion zur zusätzlichen Aktivierung dieser Noxen beitragen. Man kann vermuten, daß die größere Anzahl von Doppelbindungen in HPETEn im Vergleich zu HPODEn für mehr Schäden durch oxidativen Streß sorgen kann, indem sie antioxidativ wirksame Verbindungen wie Glutathion stärker depletiert. Mechanistische Grundlagen für die gentoxische Wirkung der Hydroxyfettsäuren müssen noch untersucht werden.

Bei der Reaktion von 4-Oxo-2-nonenal mit DNA entstehen sog. Ethenoaddukte, die als Maß für mutagene Aktivität verwendet werden können. Die erhöhten HETE-Spiegel in Papillomen gehen einher mit einer Anhäufung von promutagenen Etheno-DNA-Addukten (Nair et al., 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen ferner die Befunde über klastogene Effekte von 8- und 12-HPETE sowie 8- und 12-HETE (Bürger et al., 1999). Damit liegt die Annahme nahe, daß endogene Mutagene, deren Quelle der aberrante Arachidonsäurestoffwechsel ist, für die Progression von Papilomen zu Karzinomen verantwortlich sind.

8. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden Modelle entwickelt, an denen die noch weitgehend unbekannten zellulären Funktionen der epidermalen Lipoxygenasen (LOXn) untersucht werden können:

1. Mit Hilfe von GFP-LOX-Fusionsproteinen wurde die Bedeutung der katalytischen Aktivität und der Extradomäne, die bei den beiden Isoenzymen 12R-LOX und *e*LOX-3 vorkommt, für die intrazelluläre Verteilung der Enzyme nachgewiesen.
2. Die Herstellung LOX-überexprimierender Keratinozyten war – möglicherweise wegen des Abschaltens des Promotors oder der Negativselektion LOX-exprimierender Zellen – über eine Transfektion mit herkömmlichen Expressionsplasmiden nicht möglich. Für die virale Transduktion von Tetrazyklin-regulierbaren Expressionssystemen wurden die nötigen Vorarbeiten geleistet.
3. Es wurde der Knockout des 12R-LOX-Gens unter Verwendung des Cre/loxP-Systems bis zur Geburt chimärer Mäuse durchgeführt.
4. Bei der Charakterisierung von transgenen *e*12S-LOX-überexprimierenden Mäusen wurde eine gegenseitige Beeinflussung epidermaler 12S-LOXn in Bezug auf die mRNA-Expression nachgewiesen. Die Wechselwirkungen führten dazu, daß bei Tieren mit starker *l*12S-LOX und schwacher *e*12S-LOX-Expression die Empfindlichkeit gegenüber chemischer Karzinogenese (Inititations-Promotions-Modell) herabgesetzt war. Dieses korrelierte mit einer massiven Akkumulation des Linolsäure-Derivats 13-HODE, dem eine antikarzinogene Wirkung zugeschrieben wird. Eine erhöhte Tumorbildung ging mit der Überexpression von *p*12S-LOX oder *e*12S-LOX einher. Dies wiederum korrelierte mit einer Akkumulation des Arachidonsäure-Derivats 12-HETE, für das eine prokarzinogene Wirkung postuliert wird.
5. Mit Hilfe des Comet-Assays konnte für primäre Keratinozyten eine gentoxische Wirkung von HPETEn und HETEn gezeigt werden.

9. LITERATURVERZEICHNIS

Abe M., Klein M., Steel D., Thekkuveettil A., Shapiro E., Schwartz J.H., Feinmark S.J. (1995)
Stereochemistry of the Aplysia neuronal 12-lipoxygenase: specific potentiation of FMRFamide action by 12S-HETE
Brain Research 683: 200-208

Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R. (1977)
Method of detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes
Proceedings of the National Academy of Science USA 74 (12), 5350-5354

Baer A. N., Klaus M. V., Green F. A. (1995)
Epidermal fatty acid oxygenases are activated in non-psoriatic dermatoses
Journal of Investigative Dermatology 104: 251-255

Baer A. N., Costello P. B., Green F. A. (1991)
Stereospecifity of the products of the fatty acis oxygenases derived from psoriatic scales
Journal of Lipid Research 32: 341-347

Birnboim H. C., Doly J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acids Research 7, 1513-1522

Boeglin W. E., Kim R. Brash A. R. (1998)
A 12(R)-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression
Proceedings of the National Academy of Science USA 95:6744-6749.

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. (1988)
Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line
Journal of Cell Biology 106 (3): 761-771

Bradford M. (1976)
A rapid and sensitve methode for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding
Analytical Biochemistry 72: 246–254.

Brash A. R. (1999)
Lipoxygenases: Occurence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate
Journal of Biological Chemistry 274 (34): 23679-23682

Brown K., Strathdee D., Bryson S., Lambie W., Balmain A. (1998)
The malignant capacity of skin tumors induced by expression of a mutant H-*ras* tansgene depends on the cell type targeted
Current Biology 8: 516-524

Bürger F., Krieg P., Kinzig A., Schurich B., Marks F., Fürstenberger G. (1999)
Constitutive expression of 8-lipoxygenase in papillomas and clastogenic effects of lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in keratinocytes
Molecular Carcinogenesis 24: 108-117

Bürger F., Krieg P., Marks F., Fürstenberger G. (2000)
Positional and stereo selectivity of fatty acid oxygenation catalyzed by mouse 12S-lipoxygenase isozymes
Biochemical Journal 348: 329-355

Chen H.J., Okayama H. (1988)
Calcium phosphate-mediated gene transfer: a high efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA
Biotechniques 6: 632–638.

Chen H.-J.C., Chung F.-L. (1996)
Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide
Chemical Research in Toxicology 9: 306-312

Chen X.S., Zhang Y.Y., Funk C.D. (1998)
Determinants of 5-lipoxygenase nuclear localization using green fluorescent protein/5-lipoxygenase fusion proteins
Journal of Biological Chemistry 273 (47):31237-31244

Chen X.S., Funk C.D. (2001)
The N-terminal „beta-barrel“ domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation
Journal of Biological Chemistry 276 (1): 811-818

Chomczynski P., Sacchi N. (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction
Analytical Biochemistry 162, 156-159

Chopra H., Timar J., Chen Y.Q., Rong X.H., Grossi I.M., Fitzgerald L.A., Taylor J.D., Honn K.V. (1991)
The lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE induces a cytoskeleton-dependent increase in surface expression of integrin αIIbβ3 on melanoma cells
International Journal of Cancer 49: 774-786

Christopherson K.S., Mark M.R., Bajaj V., Godowski P.J. (1992)
Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a Drosophila ecdysone receptor and chimeric transactivators
Proceedings of the National Academy of Science USA 89 (14): 6314-6318

Compton S.J., Jones C.G. (1985)
Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay
Analytical Biochemistry 151: 369–374.

Dahm T., White J., Grill S., Füllekrug J., Stelzer E.H.K. (2001)
Quantitative ER<->Golgi transport kinetics and protein separation upon Golgi exit revealed by vesicular integral membrane protein 36 dynamics in live cells
Molecular Biology of the Cell 12: 1481-1498

Deussing J., Pauly-Evers M., Roth W., Saftig P., Peters C. (1997)
Manipulating the mouse genome
B.I.F. Futura 12: 162-171

Ding X.-Z., Tong W.-G., Adrian T.E. (2001)
12-Lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE stimulates human pancreatic cancer cell proliferation via protein tyrosine phosphorylation and ERK activation
International Journal of Cancer 94: 630-636

Eggan K., Rode A., Jentsch I., Samuel A., Hennek T., Tintrup H., Zevnik B., Erwin J., Loring J., Jackson-Grusby L., Speicher M.R., Kühn R., Jaenisch R. (2002)
Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation
Nature Biotechnology 20: 455-459

Feinberg A. P., Vogelstein B. (1983)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity
Analytical Biochemistry 132, 6-13

Fischer S.M., Fürstenberger G., Marks F., Slaga T.J. (1987)
Events associated with mouse skin tumor promotion with respect to arachidonic acid metabolism: a comparison between SENCAR and NMRI mice
Cancer Research 47: 3174-3179

Fischer S.M., Hagerman R.A., Li-Stiles E., Lo H.H., Maldve R.E., Belury M.A., Locniskar M.F. (1996)
Arachidonate has tumor-promoting action that is inhibited by linoleate in mouse skin carcinogenesis
Journal of Nutrition 126: 1099S-1104S

Fogh K., Herlin T., Kragballe K. (1989)
Eicosanoids in acute and chronic psoriatic lesions: Leukotriene B_4, but not 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid, is present in biologically active amounts in acute guttate lesions
Journal of Investigative Dermatology 92: 837-841

Fürstenberger G., Marks F. (1981)
Early prostaglandin E synthesis is an obligatory event in induction of proliferation in mouse epidermis in vivo by the phorbol ester TPA
Biochemical and Biophysical Research Communications 92: 749-756

Fürstenberger G., Groß M., Schweizer J., Vogt I., Marks F. (1986)
Isolation, characterization and in vitro cultivation of subfractions of neonatal mouse keratinocytes: effects of phorbol esters
Carcinogenesis 7: 1745-1753

Fürstenberger G., Gross M, Marks F. (1989)
Eicosanoids and multistage carcinogenesis in NMRI mouse skin: role of prostaglandins E and F in conversion (first stage of tumor promotion) and promotion (second stage of tumor promotion)
Carcinogenesis 10: 91-96

Fürstenberger G. (1990)
Role of eicosanoids in mammalian skin epidermis
Cell Biology Reviews RBC 24: 1-111; Springer International, University of the Basque Country, Bilbao

Fürstenberger G., Hagedorn H., Jacobi T., Besemfelder E., Stephan M., Lehmann W. D., Marks F. (1991)
Characterization of a 8-lipoxygenase activity induced by the phorbol ester tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse skin in vivo
Journal of Biological Chemistry 266 (24):15738-15745

Funk C.D., Keeney D.S., Oliw E.H., Boeglin W.E., Brash A.R. (1996)
Functional expression and cellular localization of a mouse epidermal lipoxygenase
Journal of Biological Chemistry 271: 23338-23344

Gallay P., Swingler S., Song J., Bushman F., Trono D. (1995)
HIV nuclear import is governed by the phophotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase
Cell 83: 569–576

Gillmor S. A., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. F. (1997)
The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity
Nature Structural Biology 4 (12): 1003-1009

Gödecke A., Flögel U., Zanger K., Ding Z., Hirchenhain J., Decking U. K. M., Schrader J. (1999)
Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms
Proceedings of the National Academy of Science USA 96: 10495-10500

Gossen M., Bujard H. (1992)
Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promotors
Proceedings of the National Academy of Science USA 89: 5547–5551

Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H. (1995)
Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells
Science 268: 1766–1769

Gross M., Fürstenberger G., Marks F. (1987)
Isolation, characterization, and in vitro cultivation of keratinocyte subfractions from adult NMRI mouse epidermis: epidermal target cells for phorbol esters
Experimental Cell Research 171: 460-474

Grullich C., Duvoisin R.M., Wiedmann M., van Leyen K. (2001)
Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte
FEBS Letters 489 (1): 51-54

Gu H., Marth J. D., Orban P. C., Mossmann H., Rajewski K. (1994)
Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting
Science 265 (5168), 103-106

Hada T., Ueda N., Takahashi Y., Yamamoto S. (1991)
Catalytical properties of human platelet 12-lipoxygenase as compared with the enzymes of other origins
Biochimica et Biophysica Acta 1083 (1): 89-93

Hagerman R.A., Fischer S.M., Locniskar M.F. (1997)
Effect of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on inhibition of expression of keratin 1 mRNA in mouse keratinocytes mimicked by 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid
Molecular Carcinogenesis 19: 157-164

Hasty P., Riviera-Perez J., Chang C., Bradley A. (1991)
Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells
Molecular Cell Biology 11 (9): 4509-4517

Healy A.M., Peters-Golden M., Yao J.P., Brock T.G. (1999)
Identification of a bipartite nuclear localization sequence necessary for nuclear import of 5-lipoxygenase
Journal of Biological Chemistry 274 (42): 29812-29818

Heidt M. (1999)
Epidermale Lipoxygenasen: normale und transgene Expression im Zusammenhang mit der Tumorentwicklung in der Maushaut
Dissertation, Abt. Marks, DKFZ, Heidelberg

Heidt M., Fürstenberger G., Vogel S., Marks F., Krieg P. (2000)
Diversity of mouse lipoxygenases: Identification of a subfamily of epidermal isoenzymes exhibiting a differentiation-dependent mRNA expression pattern
Lipids 35 (7): 701-707

Herweijer H., Zhang G., Subbotin V.M., Budker V., Williams P., Wolff J.A. (2001)
Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver
Journal of Gene Medicine 3 (3): 280-291

Hill E.M., Eling T., Nettesheim P. (1998)
Changes in the expression of 15-lipoxygenase and prostaglandin-H synthase during differentiation aof human tracheobronchial epithelial cells
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 18: 662-669

Hoess R. H., Abremski K. (1985)
Mechanism of strand cleavage and exchange in Cre-lox site-specific recombination system
Journal of Molecular Biology 181, 351-362

Hsi L.C., Kamitani H., Cornicelli J.A., Eling T.E. (2001)
Evaluation of the activity and localization of 15-lipoxygenase-1 after introduction into human colorectal carcinoma Caco-2 cells
Prostaglandins Leukotriens and other Essential Fatty Acids 64 (4-5): 217-225

Hussain H., Shornick L. P., Shannon V. R., Wilson J. D., Funk C. D., Pentland A. P., Holtzman M. J. (1994)
Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis
American Journal of Physiology 266: 243-253

Hwang D. H. (1982)
Characteristics of the formation of the platelet lipoxygenase product from endogenous arachidonic acid
Lipids 17(12): 845-847

Ikawa H., Kamitani H., Calvo B.F., Foley J.F., Eling T.E. (1999)
Expression of 15-lipoxygenase-1 in human colorectal cancer
Cancer Research 59: 360-366

Irvine R. F. (1982)
How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?
Biochemical Journal 204: 3-16

Jack G.S., Brash A.R., Olson S.J., Manning S., Coffey C.S., Smith J.A., Shappell S.B. (2000)
Reduced 15-lipoxygenase-2 immunostaining in prostate adenocarcinoma: correlation with grade and expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia
Human Pathology 31: 1146-1154

Jobard F., Lefèvre C., Karaduman A., Blanchet-Bardon C., Emre S., Weissenbach J., Özgüc M., Lathrop M., Prud'homme J.-F., Fischer J. (2002)
Lipoxygenase-3 (*ALOXE3*) and 12(R)-lipoxygenase (*ALOX12B*) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1
Human Molecular Genetics 11 (1): 107-113

Jostarndt K., Gellert N., Rubic T., Weber C., Kühn H., Johansen B., Hrboticky N., Neuzil J. (2002)
Dissociation of apoptosis induction and CD36 upregulation by enzymatically modified low-density lipoprotein in monocytic cells
Biochemical and Biophysical Research Communications 290 (3): 988-993

Jung S., Rajewski K., Radbruch A. (1993)
Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element
Science 259 (5097): 984-987

Kamitani H., Geller M., Eling T. (1998)
Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cell lines during apoptosis and cell differentiation
Journal of Biological Chemistry 273: 21569-21577

Kinzig A., Fürstenberger G., Bürger F., Vogel S., Müller-Decker K., Mincheva A., Lichter P., Marks F., Krieg P. (1997)
Murine epidermal lipoxygenase (Aloxe) encodes a 12-lipoxygenase isoform
Genomics 58: 158-164

Kobinger G.P., Mouland A.J., Lalonde J.P., Forget J., Cohen E.A. (1997)
Enhancement of retroviral production from packaging cell lines expressing the human immunodeficiency type 1 VPU gene
Gene Therapy 4 (8): 868-74

Krieg P., Schapke R., Fürstenberger G., Vogt I., Marks F. (1991)
TGF-beta 1 and skin carcinogenesis: antiproliferative effect in vitro and TGF-beta 1 mRNA expression during epidermal hyperproliferation and multistage tumorigenesis
Molecular Carcinogenesis 4 (2): 129-137

Krieg P., Kinzig A., Ress-Löschke M., Vogel S., Vanlandingham B., Stephan M., Lehmann W.D., Marks F., Fürstenberger G. (1995)
12-lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development
Molecular Carcinogenesis 14: 118-129

Krieg P., Siebert M. Kinzig A., Bettenhausen R. Marks F., Fürstenberger G. (1999)
Murine 12R-lipoxygenase: functional expression, genomic structure and chromosomal localization
FEBS Letters 446: 142-148

Kühn H., Belkner J., Zaiss S., Fahrenklemper T., Wohlfeil S. (1994)
Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis
Journal of Experimental Medicine 179 (6): 1903-1911

Kulesz-Martin M., Kilkenny A. E., Holbrook K. A., Digernes V., Yuspa S. H. (1983)
Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation
Carcinogenesis 4 (11): 1367-1377

Kulkarni A. P., Sajan M. (1999)
Lipoxygenase- Another pathway for glutathione conjugation of xenobiotics: A study with human term placental lipoxygenase and ethacrynic acid
Archives of Biochemistry and Biophysics 371 (2): 220-227

Lakso M., Sauer B., Mosinger B. Jr., Lee E. J., Manning R. W., Yu S. H., Mulder K. L., Westphal H. (1992)
Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice
Proceedings of the National Academy of Science USA 89 (14), 6232-6236

Leyton J., Lee M.L., Locniskar M.F., Belury M.A., Slaga T.J., Bechtel D., Fischer S.M. (1991)
Effects of type of dietary fat on phorbol ester-elicited tumor promotion and other events in mouse skin
Cancer Research 51:907-915

Lindl T., Bauer J. (1987)
Zell- und Gewebekultur
2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Liu B., Khan W.A., Hannun Y.A., Timar J.D., Taylor J., Lundy S., Butovich I., Honn K.V. (1995)
12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid and 13(S)-hydroxyoctadecadienoic acid regulation of protein kinase C-alpha in melanoma cells: role of receptor-mediated hydrolysis of inositol phospholipids
Proceedings of the National Academy of Science USA 92: 9323-9327

Mancini J. A., Abramovitz M., Cox M. E., Wong E., Charleson S., Perrier H., Wang Z., Prasit P., Vickers P. J.(1993)
5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein
FEBS Letters 318 (3): 277-281

Marks F. (1976)
Epidermal growth control mechanisms, hyperplasia, and tumor promotion in the skin
Cancer Research 36: 2636–2643

Marks F., Fürstenberger G. (1999)
Prostaglandins, Leukotriens and other Eicosanoids
Wiley-VCH; Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto

Martin F.L., Cole K.J., Orme M.H., Grover P.L., Phillips D.H., Venitt S. (1999)
The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis (‘comet’) assay in metabolically-competent MCL-5 cells
Mutation Research 445: 21-43

Mattioni T., Louvion J.F., Picard D. (1994)
Regulation of protein activities by fusion to steroid binding domains
Methods of Cell Biology 43: 335-352

McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Mjo M.P., Collins A. (1993)
The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review
Mutation Research 288: 47-63

Melan M.A., Nemhauser J.L., Petermann T.K. (1994)
Structure and sequence of the Arabidopsis thaliana lipoxygenase 1 gene.
Biochimica et Biophysica Acta 1210: 377-380.

Miller C.C., Ziboh V.A. (1990)
Induction of epidermal hyperproliferation by topical n-3-polyunsaturated fatty acids on guinea pig skin linked to decreased levels of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE)
Journal of Investigative Dermatology 94: 353-358

Müller, K. (1999)
Klonierung und Studien zur Expression des Rezeptors für Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in normaler und neoplastischer Haut von Mäusen sowie in Keratinozyten *in vitro*
Wissenschaftliche Abschlußarbeit, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Universität Kaiserslautern

Müller, K., Krieg, P., Marks F., Fürstenberger G. (2000)
Expression of $PGF_{2\alpha}$ receptor mRNA in normal, hyperplastic and neoplastic skin
Carcinogenesis 21 (5): 1063-1066

Müller K., Siebert M., Heidt M., Marks F., Krieg P., Fürstenberger G. (2002)
Modulation of epidermal tumor development caused by targeted overexpression of epidermis-type 12S-lipoxygenase
Cancer Research in press

Muga S.J., Thuillier P., Pavone A., Rundhaug J.E., Boeglin W.E., Jisaka M., Brash A.R., Fischer S.M. (2000a)
8S-lipoxygenase products activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and induce differentiation in murine keratinocytes
Cell Growth and Differentiation 11 (8): 447-454

Muga S.J., Kim E.J., Fischer S.M. (2000b)
Regulation of 8S-LOX in mouse skin
Proceedings of the American Association for Cancer Research 41: 84

Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder J. C. (1993)
Derivation of completely cell culture-derived mice from early passage embryonic stem cells
Proceedings of the National Academy of Science USA 90: 8424-8428

Nair J., Fürstenberger G., Bürger F., Marks F., Bartsch H. (2000)
Promutagenic etheno-DNA adducts in multistage mouse skin carcinogenesis: correlation with lipoxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism
Chemical Research in Toxicology 13 (8): 703-709

Nie D., Hillman G.G., Geddes T., Tang K., Pierson C., Grignon D.J., Honn K.V. (1998)
Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth
Cancer Research 58: 4047-4051

Östling O., Johansson K.J. (1984)
Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA-damages in individual mammalian cells
Biochemical and Biophysical Research Communications 123 (1): 291-298

Olsen J.C., Sechelski J. (1995)
Use of sodium butyrate to enhance production of retroviral vectors expressing CTFR cDNA
Human Gene Therapy 6 (9): 1195-1202

Pearson B., Wolf P.L., Vazquez J. (1963)
A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize β-galactosidase in tissues
Laboratory Investigation 12: 1249–1259.

Provost P., Doucet J., Hammarberg T., Gerisch G., Samuelson B., Radmark O. (2001)
5-lipoxgenase interacts with coactosin-like protein
Journal of Biological Chemistry 276 (19): 16520-16527

Ramirez A., Vidal M., Bravo A., Larcher F., Jorcano J.L. (1995)
A 5'-upsteam region of a bovine keratin 6 gene confers tissue-specific expression and hyperproliferation-related induction in transgenic mice
Proceedings of the National Academy of Science USA 92: 4783-4787

Rindgen D., Nakajima M., Wehrli S., Xu K., Blair I.A. (1999)
Covalent modifications to 2'-desoxyguanosine by 4-oxo-2-nonenal, a novel product of lipid peroxidation
Chemical Research in Toxicology 12: 1195-1204

Rouzer C.A., Kargman S. (1988)
Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187
Journal of Biological Chemistry 263 (22): 10980-10988

Samuelson B., Dahlen S. E., Lindgren J. A., Rouzer C. A., Shernan N. L. (1987)
Leucotrienes and Lipoxines: Structures, biosynthesis and and biological effects
Science 237:1171-1176

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; Proceedings of the National Academy of *Sciences of the USA 74 (12), 5463-5467*

Sauer B. (1992)
Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance
Journal of Molecular Biology 223 (4), 911-928

Schneider C., Tallman K.A., Porter N.A., Brash A.R. (2001)
Two distinct pathways of formation of 4-Hydroxynonenal
Journal of Biological Chemistry 276 (24): 20831-20838

Shappell S.B., Boeglin W.E., Olson S.J., Kasper S., Brash A.R. (1999)
15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma
American Journal of Pathology 155: 235-245

Shureiqi I., Wojno K., Poore J.A., Reddy R.G., Moussalli M.J., Spindler S.A., Greenson J.K., Normolle D., Hasan A.A.K., Lawrence T.S., Brenner D.E. (1999)
Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers
Carcinogenesis 20: 1985-1995

Shureiqi I., Chen D., Lee J.J., Yang P., Newman R.A., Brenner D.E., Lotan R., Fischer S.M., Lippman S.M. (2000)
15-LOX-1: A novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells
Journal of the National Cancer Institute 92: 1136-1142

Shureiqi I., Lippman S.M. (2001)
Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis
Cancer Research 61: 6307-6312

Siebert M. (2001)
Funktionelle Charakterisierung epidermaler 12-Lipoxygenasen und ihrer Rolle bei der Tumorentwicklung in der Maushaut
Dissertation, Abt. Marks, DKFZ, Heidelberg

Siebert M., Krieg P., Lehmann W.D., Marks F., Fürstenberger G. (2001)
Enzymatic characterization of epidermis-derived 12-lipoxygenase isozymes
Biochemical Journal 355: 97-104

Siedow J.N. (1991)
Plant lipoxygenase: Structure and function
Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:145-188

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988)
A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells
Experimental Cell Research 175 (1): 184-191

Sohlenius A. K., Wigren J., Backstrom K., Andersson K., DePierre J. W. (1995)
Synergistic induction of acyl-CoA oxidase activity, an indicator of peroxisome proliferation, by arachidonic acid and retinoic acid in Morris hepatoma 7800C1 cells
Biochimica et Biophysica Acta 1258: 247-264

Southern E. M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA-Fragments separated by gel electrophoresis; *Journal of Molecular Biology 98, 503-517*

Sternberg N., Hamilton D. (1981)
Bacteriophage P1 site-specific recombination I. recombinaton between loxP sites
Journal of Molecular Biology 150, 467-486

Su C., Oliw E.H. (1998)
Manganese lipoxygenase – Purification and characterization
Journal of Biological Chemistry 273: 13072-13079.

Tang D.G., Tarrien M., Dobrzynski P., Honn K.V. (1995)
Melanoma cell spreading on fibronectin induced by 12S-HETE involve both protein kinase C- and protein tyrosine-dependent focal adhesion formation and tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK)
Journal of Cell Physiology 165: 291-306

Tang D.G., Chen Y.Q., Honn K.V. (1996)
Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis
Proceedings of the National Academy of Science USA 93: 5241-5246

Tang K., Finley R.L., Nie D., Honn K.V. (2000)
Identification of 12-lipoxygenase interaction with cellular proteins by yeast two-hybrid screening
Biochemistry 39 (12): 3185-3191

Tang S., Bhatia B., Maldonado C.J., Yang P., Newman R.A., Liu J., Chandra D., Traag J., Klein R.D., Fischer S.M., Chopra D., Shen J., Zhau H.E., Chung L.W.K., Tang D.G. (2002)
Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells
Journal of Biological Chemistry 277 (18): 16189-16201

Temin H.M. (1985)
Reverse transcription in the eukaryotic genome: Retroviruses pararetroviruses, retrotransposons and retrotranscripts
Molecular Biology and Evolution 6: 455–468

Thomas K. R., Capecchi M. R. (1987)
Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells
Cell 51, 503-512

Thomas K. R., Deng C., Capecchi M. R. (1992)
High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors
Molecular Cell Biology 12 (7): 2919-2923

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. (2000)
Singel cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing
Environmental and Molecular Mutagenesis 35 (3): 206-221

Timar J., Raso E., Döme B., Li L., Grignon D., Nie D., Honn K.V., Hagmann W. (2000)
Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential
International Journal of Cancer 87: 37-43

Torres R. M., Kühn, R. (1997)
Laboratory protocols for conditional gene targeting
Oxford University Press, Oxford, New Yor: 167 Seiten

van Dijk K.W., Steketee K., Havekes L., Frants R., Hofker M. (1995)
Genomic and cDNA cloning of a novel mouse lipoxygenase gene
Biochimica et Biophysica Acta 1259: 4-8

Virmani J., Johnson E.N., Klein-Szanto A.J.P., Funk C.D. (2001)
Role of platelet-type 12S-lipoxygenase in skin carcinogenesis
Cancer Letters 162: 161-165

Wang X., Zinkel S., Polonsky K., Fuchs E. (1997)
Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormon transgene: Prospects for gene therapy
Proceedings of the National Academy of Science USA 94: 219-226

Willis A. (1987)
The eicosanoids: an introduction and an overview
Willis AL (ed) Handbook of eicosanoids: Prostaglandins and Related Lipids, Vol. IA. CRC Press, Boca Raton, 3-46.

Wollard P.M., Cunnigham F.M., Murphy G.M., Camp R.D., Derm F.F., Greaves M.W. (1989)
A comparison of the proinflammatory effects of 12(R)-and 12(S)-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid in human skin
Prostaglandins 38 (4): 465-471

Woods J.W., Evans J.F., Ethier D., Scott S., Vickers P.J., Hearn L., Heibein J.A., Charleson S., Singer I.I. (1993)
5-lipoxygenase and 5-Lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes
Journal of Experimental Medicine 178: 1935-1946.

Yamamoto S. (1992)
Mammalian lipoxygenases: molecular structure and functions
Biochimica et Biophysica Acta. 1128: 117-131.

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

11. TABELLENVERZEICHNIS

12. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
Ara-C	1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin
at	Atto (10^{-15})
b	bovin, Rinder-
BGH	Bovines Wachstumshormon
bK 6	Rinder-Keratin 6
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMV	Cytomegalie-Virus
CP-HPLC	Chiral-Phase HPLC
Cre	Rekombinase (causes recombination)
d.h.	das heißt
DMBA	Dimethylbenz[*a*]anthracene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxyzyklin
*e*12S-LOX	Epidermis-Typ 12S-Lipoxygenase
ELISA	Enzym-gekoppelter Immun-Essay
*e*LOX-3	Epidermis-Typ Lipoxygenase-3
env	envelope-Protein des retroviralen Capsids
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
GANC	Gancyclovir
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	human

h	Stunden
HE	Hämalaun/Eosin
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HU	Hydroxyharnstoff
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo (10^3)
k.o.	Knockout
K14	(Cyto-)Keratin 14
K5	(Cyto-)Keratin 5
K6	Keratin 6
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
*l*12S-LOX	Leukocyten-Typ 12S-Lipoxygenase
LDL	Low Densitiy Lipoproteins
LOX(n)	Lipoxygenase(n)
loxP	Location of Crossover in Bacteriophage P1
LPO	Lipidperoxidation
LTR	Long Terminal Repeats
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
µ	Mikro (10^{-6})
m	murin
M	molar (mol/l)
m	Milli (10^{-3})
min	Minuten
MNNG	N-Methy-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
n	Nano (10^{-9})

p	Pico (10^{-12})
*p*12S-LOX	Blutplättchen-Typ 12S-Lipoxygenase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pK6	Keratin 6-Promotor
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reverse-Phase HPLC
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rTetR	reverser Tet-Repressor
rtTA	reverser Tet-gesteuerter Transkriptionsaktivator
s	Sekunden
sog.	sogenannt
SP-HPLC	Straight-Phase HPLC
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tet-Repressor
tTA	Tet-gesteuerter Transkriptionsaktivator
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat
TRE	Tet-responsives Element
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

13. LEBENSLAUF

Karsten Müller
Grünewaldstraße 30
D-66879 Kottweiler-Schwanden
geboren am 12.05.1974 in Kaiserslautern
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1980-1984	**Grundschule** Ramstein-Miesenbach	
1984-1993	**Gymnasium** Landstuhl	
1993-1994	**Grundwehrdienst**	
10.1994-03.1999	**Studium der Lebensmittelchemie** an der Universität Kaiserslautern	
	10.1996	Staatl. Vorprüfung
	09.1998	1. Staatsprüfung
	10.1998-03.1999	**Wissenschaftliche Abschlußarbeit:** „Expression und Aktivität des Rezeptors für Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in normaler und neoplastischer Haut von Mäusen“ Abteilung „Biochemie der gewebsspezifischen Regulation“ (Prof. Dr. F. Marks), Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
05.1999-06.2002	**Promotion:** „Analyse der Funktion epidermaler 12-Lipoxygenasen in der Haut von Mäusen“ Abteilung „Biochemie der gewebsspezifischen Regulation“ (Prof. Dr. F. Marks), Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg	

Publikationen:

K. Müller, M. Siebert, M. Heidt, F. Marks, G. Fürstenberger, and P. Krieg (2002)
„Modulation of Epidermal Tumor Development Caused by Targeted Overexpression of Epidermis-type 12S-Lipoxygenase“
Cancer Research, in press

K. Müller, M. Heidt, M. Siebert, G. Fürstenberger, F. Marks, and P. Krieg (2002)
„Targeted Overexpression of e12S-Lipoxygenase in Mouse Skin: Modulation of Tumor Formation“
Proceedings of the American Association for Cancer Research **43**: 1010 (Posterpräsentation)

K. Müller, P. Krieg, F. Marks, and G. Fürstenberger (2000)
„Expression of $PGF_{2\alpha}$ Receptor mRNA in Normal, Hyperplastic and Neoplastic Skin“
Carcinogenesis **21** (5): 1063-1066

14. DANK

Im Laufe der Jahre haben viele Personen diese Arbeit beeinflußt und jeder hat auf seine Art zum Gelingen beigetragen. Allen – auch den namentlich nicht erwähnten - will ich von ganzem Herzen meinen Dank ausdrücken. Mein besonderer Dank gilt:

Den Abteilungs- und Gruppenleitern Prof. Dr. Friedrich Marks, Dr. Gerhard Fürstenberger, Dr. Peter Krieg, PD Dr. Karin Müller-Decker

Dr. Michael Rogers, Dr. Peter Schmezer, Peter Waas, Reinhard Gliniorz, Otto Zelezny, Dr. Lutz Langbein, Dr. Holger Reichardt, Dr. Niamh Keon, den Mitarbeitern der Abt. von Dr. Peter Angel

Franciscus van der Hoeven, Ulrich Kloz

Den Mitarbeitern der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern

Den Azubis Karin Schüßler, Christina Berg, und Sabrina Balaguer-Puig sowie den Praktikanten Malte Wittmann und Laleh Sinai

Meinen Laborkollegen (in alphabetischer Reihenfolge!) Corinna Bähr, Claudia Ehmann, Markus Heidt, Luis Jave Suarez, Ina Kutschera, Thorsten Lau, Anja Löffler, Gwendolin Manegold, Gitta Neufang, Melanie Neumann, Sandra Pfrang, Andrea Pohl-Arnold, Claudia Rappl, Malte Siebert, Brigitte Steinbauer, Ingeborg Vogt, Anette Zagorski

Meinen Eltern Helga und Bernd-Dieter, meiner Schwester Katrin und Maike Erler

Alle, die ich vergessen habe oder denen eigentlich mehr Platz hätte eingeräumt werden müssen, bitte ich um Nachsicht.