

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Biologe Karsten Tauber

aus: Viernheim

Tag der mündlichen Prüfung:

**Herstellung eines autochthonen,
induzierbaren Tumormodells
&
Entwicklung eines PTD-Cre
Induktionssystems**

Gutachter: Prof. Dr. Günter Hämmerling

Prof. Dr. Christine Clayton

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. Günter Hämmerling für die Annahme als Doktorand und seine Betreuung während der Anfertigung dieser Dissertation bedanken.

Dr. Thomas Schüler danke ich für hilfreiche Denkanstöße, experimentelle Einfälle und Korrekturlesen meines Manuskripts.

Bei Sonja Banko, Elke Deibel, Angelika Frenznick, Andrea Hagman, Manuela Jaster und Marika Krudwig möchte ich mich für die Pflege meiner Mauslinien bedanken.

Sabine Schmitt führte mich in die Mikroinjektionstechnik ein und unterstützte mich bei der Herstellung transgener Mauslinien.

Prof. Dr. Hermann Gröne half mir bei der Bewertung der in der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Histopathologie von Frau Schmitt und Frau Moll angefertigten histologischen Präparate.

Den restlichen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Immunologie möchte ich für die Bereitstellung von Methoden, Reagenzien und einem angenehmen Arbeitsklima danken.

Und ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Familie und an meine Freundin für Korrekturen am Manuskript und aufmunternde Worte.

1. Einleitung	1
1.1. Transgene Tiermodelle in der Tumorummunologie	1
1.1.1. Konditionelle und konstitutive Tumormodelle	2
1.1.2. Molekulare Mechanismen der SV40 TAg-induzierten Tumorbildung im Tiermodell	4
1.1.3. Das Tet on/off-System	7
1.1.5. Das Cre/loxP-System	9
1.1.6. Das Flp/frt-System	13
1.1.7. Proteintranslokation	14
1.2 Aufgabenstellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Material	17
2.1.1. Chemikalien	17
2.1.2. Enzyme	17
2.1.3. Gebrauchswaren	17
2.1.4. Verwendete Kits	17
2.1.5. Geräte	18
2.1.6. Puffer und Lösungen	18
2.1.7. Medien	21
2.1.7.1. Medien für Bakterien	21
2.1.7.2. Medien für die Zellkultur	22
2.1.8. Bakterienstämme	22
2.1.9. Mauslinien	23
2.1.10. Antikörper	23
2.1.11. PCR-Primer	24
2.1.12. Plasmide	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken	26
2.2.1.1. Glycerindauerkulturen von <i>E.coli</i>	26
2.2.1.2. Präparation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.2.1.3. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	27
2.2.1.4. DNA-Minipräparation durch alkalische Lyse	27
2.2.1.5. DNA-Midipräparation durch alkalische Lyse	27
2.2.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.2.1.7. Phenol-Chloroform-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen	29
2.2.1.8. DNA-Präzipitation	29
2.2.1.9. Restriktionsverdau	30
2.2.1.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.2.1.11. Ligation von DNA-Enden	31
2.2.1.12. Dephosphorylierung von DNA-Enden	32
2.2.1.13. Auffüllen und Abdauen überhängender DNA-Enden	32
2.2.1.14. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	32
2.2.1.15. Herstellung nicht-radioaktiver Digoxigenin (DIG) DNA-Sonden	33
2.2.1.16. Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)	33
2.2.1.17. Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden	34
2.2.1.18. Signaldetektion nach der Sondenhybridisierung	34
2.1.1.19. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (Western Blot)	35
2.2.1.20. Polymerasekettenreaktion (PCR)	36

2.2.2. Zellbiologische Arbeitstechniken	38
2.2.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
2.2.2.2. Quantitativer Nachweis von Rekombination im Durchflusszytometer	38
2.2.3. Methoden zur Arbeit mit Mäusen	39
2.2.3.1. Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen und Leber	39
2.2.3.2. Perfussion einer Maus	39
2.2.3.3. Herstellung einer Milz- oder Lymphknotenzellsuspension	39
2.2.3.4. Herstellung einer Leberzellsuspension	40
2.2.3.5. Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL)	40
2.2.3.6. Aufbau einer Mikroinjektionsanlage	40
2.2.3.7. Herstellung von Injektions- und Haltekapillaren	41
2.2.3.8. Präparation von Zygoten aus trächtigen Mäusen	41
2.2.3.9. Mikroinjektion der Transgenkassetten	42
2.2.3.10. Zygotentransfer in scheinsschwangere Ammenmäuse	42
2.2.3.11. Hydrodynamische Schockinjektion in die Schwanzvene	43
2.2.3.12. Aktivierung von CreERT ² durch dermale Applikation von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	43
2.2.3.13. Nachweis von Alanin-Aminotransferase-Aktivität (ALT) im Mausplasma	43
2.2.4. Proteinbiochemische Methoden	44
2.2.4.1. Expression rekombinanter Fusionsproteine in <i>E.coli</i>	44
2.2.4.2. Aufreinigung der Fusionsproteine durch Säulenchromatographie	44
2.2.4.3. Dialyse der Fusionsproteine nach Aufreinigung	45
2.2.4.4. Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen	45
2.2.5. Histologische Methoden	46
2.2.5.1. Einfrieren von Organen für Kryoschnitte	46
2.2.5.2. Einfrieren von Haut	46
2.2.5.3. Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten	47
2.2.5.4. Immunhistochemische Färbung von Zellen	47
2.2.5.5. Nachweis von β -Galaktosidase-Aktivität in	48
Reporter-mäusen (Rosa26)	48
2.2.5.6. Herstellung von Paraffin-Schnitten und anschließender HE-Färbung	48
2.2.6. Durchflusszytometrie	49
3. Ergebnisse	50
3.1. Herstellung der transgenen Mauslinien	50
3.1.1. Klonierung der transgenen Konstrukte	50
3.1.1.1. Klonierung des Tyrosinase-Promotors (Tyr)	50
3.1.1.2. Klonierung des Tyrosinase-CreERT ² -Konstruktes (TyrCreERT ²)	51
3.1.1.3. Klonierung des UbiquitinC-floxstop-TAg-Konstruktes (UfT)	52
3.1.1.4. Klonierung des Tyrosinase-floxstop-TAg-Konstruktes (TfT)	53
3.1.1.5. Klonierung des KeratinIV-floxstop-TAg-Konstruktes (KST)	54
3.1.1.6. Übersicht der transgen-positiven Tiere nach Oozyteninjektion	55
3.1.1.7. Nachweis von Rekombination durch PCR-Analyse	56
3.1.2. Induktion von CreERT ² durch dermale Applikation von 4-Hydroxytamoxifen	57
3.1.2.1. Induktion von CreERT ² in doppeltransgenen KeratinIV-CreERT ² xRosa26 Mäusen	58

3.1.2.2. Induktion von CreERT ² in doppeltransgenen Tyrosinase-CreERT ² xRosa26-Mäusen.....	59
3.1.2.3. Immunhistologische Detektion der Cre-Rekombinase.....	60
3.1.3. Tumorentstehung in vivo	61
3.1.3.1. Tumorentstehung in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen.....	61
3.1.3.2.1. Histopathologie der Gewebeschnitte rekombinierter Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Mäuse.....	64
3.1.3.2.2. Immunhistochemischer Nachweis des TAg-Proteins im Gewebe rekombinierter Ubiquitin-floxstop-TAgxCre- deleter Mäuse.....	65
3.1.3.3. Tumorenstehung in rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen	66
3.1.3.4. Histopathologie der Gewebeschnitte rekombinierter Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Mäuse	67
3.1.3.5. Tumorentstehung in rekombinierten KeratinIV-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen	68
3.1.3.6. Ergebnisse der in vivo-Onkogenexpression	68
3.1.3.7. Ergebnis der in vivo-Reportergeninduktion.....	69
3.1.3.8. Übersicht über die entstandenen Tumoren	70
3.1.3.9. Zusammenfassung aus der Arbeit mit den neuen transgenen Mauslinien	71
3.2. Entwicklung eines PTD-Cre Induktionssystems	73
3.2.1. Klonierung der PTD-Cre Konstrukte	74
3.2.2. Ergebnisse der Proteinexpression und –aufreinigung	75
3.2.3. In vitro-Rekombination in CV1-5B Zellen.....	78
3.2.3.1. PTD-Cre vermittelte in vitro-Rekombination	79
3.2.3.2. Immunhistochemischer Nachweis der Cre-Rekombinase	80
3.2.3.2.1. Konzentrationsabhängigkeit der Translokation	80
3.2.3.2.2. Kinetik der Translokation.....	81
3.2.3.2.3. Lokalisation in HeLa-Zellen.....	82
3.2.4. Quantifizierung der Translokationseffizienz	83
3.2.4.1. Konzentrationsabhängigkeit der Rekombination	84
3.2.4.2. Kinetik der Rekombinationseffizienz	87
3.2.5. PTD-NLS-Cre vermittelte Rekombination ex vivo.....	90
3.2.5.1. Ex vivo-Rekombination in verschiedenen Subpopulationen von Rosa26-Milzzellen	91
3.2.5.2. Ex vivo-Rekombination in verschiedenen Subpopulationen von RA/EG-Milzzellen.....	92
3.2.6. Rekombination in vivo.....	94
3.2.6.1. Rekombination in Organen von Rosa26-Mäusen nach intraperitonealer (ip) Injektion mit itat-NLS-Cre.....	95
3.2.6.2. Rekombination in Rosa26-Mäusen nach intravenöser (iv) Hydroschock Injektion mit itat-NLS-Cre	97
3.2.6.3. Vergleich der Rekombinationseffizienzen in vivo nach intraperitonealer und intravenöser Injektion.....	98
3.2.7. Induktion von Hepatokarzinomen in vivo im Albumin-floxstop-TAg Modell (AST-Modell).....	101
3.2.7.1. Darstellung der Alanin-Aminotransferase-Titer (ALT) im Blut von AST-Mäusen nach Injektion mit itat-NLS-Cre	102
3.2.7.2. In vivo-Tumorentstehung in AST-Mäusen nach Injektion mit itat-NLS-Cre	104

3.2.7.3. Histopathologie der Gewebeschnitte PTD-Cre induzierter Albumin-floxstop-TAg Mäuse	105
4. Diskussion	106
4.1. Erzeugung neuer transgener Mauslinien	106
4.1.1. Klonierung der Transgene	107
4.1.2. Entstehung von Tumoren in Ubiquitin-floxstop-TAg-, Tyrosinase-floxstop-TAg-, und KeratinIV-floxstop-TAg-Linien nach Verpaarung mit Cre-deleter-Tieren	109
4.1.3. Gewebsspezifische Induktion eines Reportergens in Tyrosinase-CreERT ² xRosa26-Mäusen	112
4.2. Entwicklung eines PTD-Cre Induktionssystems (PTD = Proteintranslokationsdomäne).....	113
4.2.1. Herstellung der rekombinanten PTD-Cre Konstrukte	114
4.2.2. Aufreinigung der rekombinanten Proteine	115
4.2.3. Rekombination in vitro	117
4.2.4. PTD-Cre vermittelte Rekombination ex vivo / in vivo.....	120
4.2.5. In vivo-Tumorinduktion im Albumin-floxstop-TAg-Modell (AST-Modell)	123
4.2.6. Induzierbare Modellsysteme.....	125
4.2.7. PTD-Cre Fusionsproteine	128
5. Zusammenfassung	131
6. Literaturverzeichnis	132
7. Anhang	146
7.1. Zusammenstellung aktueller Tumormodellsysteme.....	146
7.2. Übersicht über verschiedene PTD-Sequenzen.....	148
8. Abkürzungsverzeichnis	149
9. Abbildungsverzeichnis	151
10. Tabellenverzeichnis.....	153

Summary

The generation of my inducible tumour-model required the production of four different transgenic mouse lines. Tumour-formation was shown in two out of three conditional floxstop-TAg tumour-lines after cross-breeding to Cre-recombining mice (= Cre-deleter). Six out of nine double-transgenic Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter pups developed various tumours (fibro-, osteosarcomas, hepatocarcinomas and leukemias) after a latency of nine to twelve months. In addition TAg-protein was detected in recombined tissue. In five out of twelve double-transgenic Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter pups malignant melanomas of the eyes arose after a latency of nine to eleven months. These tumours reflected tissue-specific oncogene-expression under the expression-control of the tyrosinase-promotor (see "3.1.3.3."). KeratinIV-floxstop-TAgxCre-deleter cross-breeding resulted in three double-transgenic pups. Up to completion of my thesis none of these animals showed any sign of tumour-formation. The Tyrosinase-CreERT²-line demonstrated its ability to mediate tissue-specific recombination in double-transgenic TyrosinaseCreERT²xRosa26 mice (see "3.1.2.2."). In these mice I was able to show selective recombination in hair-follicle cells after inducing recombinase activity. Besides no background-expression of cre-recombinase was detectable in non-induced animals.

Further on I established a PTD-Cre induction system. For this purpose I produced seven different recombinant PTD-Cre proteins. These proteins demonstrated their ability to translocate into and mediate recombination in reporter-cells in vitro, ex vivo in primary cells and in vivo (see "3.2.3., 3.2.4., 3.2.5." and "3.2.6."). Injecting itat-NLS-Cre protein into Rosa26-reporter mice led to in vivo-recombination in peripheral blood cells, spleen, lymph nodes and liver. Intravenous injections with itat-NLS-Cre in tumour-induction experiments resulted in an increase of alanine-aminotransferase-levels in transgenic Albumin-floxstop-TAg mice. For the first time ever, I have shown formation of hepatocarcinomas in Albumin-floxstop-TAg mice after intravenous injection of itat-NLS-Cre protein. Moreover six months after injection all AST-animals of control-group I developed hepatocarcinomas.

Zusammenfassung

Zur Herstellung meines induzierbaren Tumormodells erzeugte ich vier verschiedene neue transgene Mauslinien. In zwei von drei konditionellen floxstop-TAg Tumorkonstruktionen zeigte ich Tumorentstehung durch Verpaarung mit Cre-rekombinierenden Mäusen. Sechs von neun Nachkommen doppeltransgener Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del. Mäuse entwickelten nach einer Latenzzeit von neun bis zwölf Monaten verschiedene Tumoren (Fibro-, Osteosarkome, Hepatokarzinome und Leukämien). Dabei wurde das TAg-Protein in rekombiniertem Gewebe nachgewiesen. Bei fünf von zwölf doppeltransgenen Nachkommen aus Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Verpaarungen konnten nach einer Latenzzeit von neun bis elf Monaten maligne Melanome der Augen diagnostiziert werden. Dabei zeigte sich die gewebsspezifische Onkogenexpression unter der Expressionskontrolle des Tyrosinasepromotors (siehe „3.1.3.3.“). Aus KeratinIV-floxstop-TAgxCre-del. Verpaarungen wurden bislang drei doppeltransgene Nachkommen geboren, die bei Abschluss dieser Arbeit noch keine Tumoren entwickelten. Die Tyrosinase-CreERT²-Linie demonstrierte ihre Fähigkeit zu gewebsspezifischer Rekombination in doppeltransgenen TyrCreERT²xRosa26-Mäusen (siehe „3.1.2.2“). Dabei konnte ich die selektive Rekombination nach Induktion der Rekombinase in Haarfollikelzellen zeigen. Außerdem fehlte jegliche Hintergrundexpression der Rekombinase in nicht-induzierten doppeltransgenen Tieren.

Weiterhin entwickelte ich ein PTD-Cre Induktionssystem. Dazu stellte ich sieben verschiedene PTD-Cre Proteine rekombinant her. Diese Proteine demonstrierten ihre Fähigkeit zur Translokation und Rekombination in vitro in Reporterzellen, ex vivo in Primärzellen und in vivo (siehe „3.2.3., 3.2.4., 3.2.5.“ und „3.2.6.“). Injektionen mit itat-NLS-Cre Protein in Rosa26-Reportermausen führten zu in vivo-Rekombination in Milz, Lymphknoten, Leber und peripheren Blutlymphozyten. In Tumorinduktionsexperimenten mit Albumin-floxstop-TAg Tieren resultierten itat-NLS-Cre Injektionen in ansteigenden Amino-Alanin-Transferase Blutwerten. Außerdem zeigte ich erstmalig die Entstehung von Hepatokarzinomen nach intravenöser Injektion mit itat-NLS-Cre in Albumin-floxstop-TAg Mäusen. Dabei entwickelten alle drei AST-Tiere der Kontrollgruppe I Hepatokarzinome.

1. Einleitung

1.1. Transgene Tiermodelle in der Tumorimmunologie

Zur Erforschung der Ursachen von Krebs und der Entwicklung möglicher Therapieansätze werden in der Tumorimmunologie bereits seit den 50er Jahren Tierversuche durchgeführt. Dabei fanden Transplantationstumoren, die aus Zellsuspensionen von Tumoren angefertigt und anschließend subkutan oder intravenös in Mäuse injiziert wurden, Verwendung. Der Vorteil solcher Transplantationstumoren liegt im schnellen Tumorwachstum sowie der einfachen Manipulierbarkeit der Tumorzellen vor der Applikation.

Allerdings ist dieses System ein artifizielles Modell, das nicht die klinische Tumorentwicklung widerspiegelt. Dies beruht u. a. auf dem ektopischen Tumorwachstum (= gr. „nicht am Entstehungsort“) von Transplantationstumoren. So können z. B. Kolonkarzinomzellen nach subkutaner Injektion unter der Haut auswachsen und einen Tumor bilden. Außerdem gehen humane Tumoren i. d. R. auf transformierte Einzelzellen zurück, in denen es zu einem Verlust über die Zellzykluskontrolle gekommen ist (Jonkers & Berns 2002). Die Nachkommen einer solchen Zelle müssen zusätzlich multiple Mutationen anhäufen bevor sie zu Krebszellen werden, weshalb man auch von einer stufenweisen Tumorentstehung spricht. Diesen Vorgang bezeichnet man als Tumorprogression, die sich über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis zu einigen Jahren erstrecken kann. Dabei wird das umgebende Gewebe i. d. R. nicht transformiert. Für die Tumorentstehung gibt es verschiedene Initiatoren. Mutagene Substanzen sowie nicht-mutagene Wirkstoffe, sogenannte Tumorpromotoren, können die Tumorentstehung und -progression in Gang setzen oder beschleunigen. Die genetische Veränderung kann dabei durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, z. B. kanzerogene Substanzen (beispielsweise Aflatoxin, Benzol oder Phenol), Strahlung (z. B. UV-B-Strahlung) oder durch Tumoviren (z. B. Papillomvirus, Rous-Sarcom-Virus). Man spricht auch von autochthoner Tumorentstehung (= gr. „aus sich selbst heraus“), da sich die Primärtumoren am Ort ihrer Entstehung ausbilden. Im Unterschied dazu sind Transplantationstumorzellen bereits vollständig transformiert und wachsen extrem schnell. Dadurch können u. U. wichtige Reaktionen entstehender Tumoren und dem Immunsystem in Tierexperimenten mit Transplantationstumoren nicht beobachtet werden.

Diese Reaktionen beinhalten u. a. die Fähigkeit der Tumoren, sich der T-Zell vermittelten Immunantwort zu entziehen. Sie erreichen dies u. a. durch Herunterregulation von MHC-Antigen Komplexen auf der Tumorzelloberfläche (Möller et al. 1991/Rivoltini et al. 1995/Garrido et al. 1997), der Sezernierung von immunsuppressiven Molekülen wie TGF- β (Ranges et al. 1987/Torre-Amione et al. 1990) und IL-10 (Becker et al. 1994/Matsuda et al. 1994) oder der Induktion von Toleranz tumorreaktiver T-Lymphozyten (Wallich et al. 1985/O'Connell et al. 1996/Hahne et al. 1996). Um neue Ansatzmöglichkeiten für die Immuntherapie im humanen System zu erhalten, ist es daher unumgänglich, regulierbare und gewebsspezifische, autochthone Tiermodellssysteme zu entwickeln und erforschen. Der Vorteil bei der Verwendung muriner Modellssysteme beruht auf der immer besseren Manipulationsmöglichkeit des Mausgenoms (Nagy 2000) sowie der Tatsache, dass das gesamte Mausgenom durchsequenziert ist. Im Laufe der Entwicklung von Methoden zur gezielten Veränderung des Erbgutes ist es seit 1981 möglich, rekombinante DNA in Pronuklei von Oozyten zu injizieren und dadurch transgene Tiere herzustellen (Costantini & Lacy 1981). Mittlerweile sind Forscher in der Lage, jedes beliebige Gen selektiv ausschalten zu können (Capecchi 1989) bzw. an jeder Stelle des Genoms durch homologe Rekombination Gene einzuführen (Thomas & Capecchi 1987/Mansour 1990/Liu et al. 2003).

1.1.1. Konditionelle und konstitutive Tumormodelle

Klinisch-relevante Tumormodelle weisen dieselben chromosomalen Veränderungen auf, die auch in humanen Tumoren zu finden sind (Hann & Balmain 2001). Ergebnisse aus Experimenten in entsprechenden Tiermodellen können Aufschluss über humanrelevante Fragestellungen geben. In solchen Modellssystemen erfolgt die Tumorinduktion i. d. R. durch die gewebsspezifische Expression eines transgenen Onkogens. Dadurch ist man in der Lage, Tumorentstehung auf bestimmte Gewebe zu beschränken. Mutierte oder überexprimierte Produkte von Onkogenen greifen dabei in die Regulation der Mitose ein. Dies kann durch veränderte Wachstumssignale erfolgen, wie z. B. der von Thrombozyten produzierte Wachstumsfaktor PDGF (= engl. „platelet-derived growth factor“) oder ErbB, der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors EGF (= engl. „epidermal growth factor“). Diese Gene sind dominant, d. h. ein mutiertes Allel ist ausreichend, um in der Zelle eine Prädisposition zu erzeugen, die letztendlich zu Krebs führen kann. Weitere potentielle Onkogene sind Tumorsuppressorgene, deren Genprodukte gewöhnlich die Mitose regulieren. Hierzu zählen z. B. das Retinoblastomprotein und das Protein p53.

Da die Tumorentstehung ein autochthones Ereignis ist, wurden, um diese Entstehung im Tiermodell darzustellen, zwei verschiedene Systeme entwickelt. Dies sind das konditionelle und das konstitutive System. In konstitutiven Modellen erfolgt die Expression eines Onkogens postnatal und ist nicht regulierbar. Der Hauptvorteil des konstitutiven Systems liegt in der raschen Entstehung von Tumoren (Bradl et al. 1991/ Mintz et al. 1992, 1993). Allerdings ist dieses System aufgrund der konstitutiven Expression des Onkogens nicht auf die humane Situation übertragbar, da das entwickelnde Immunsystem der Maus bereits während der ersten zwei Wochen nach der Geburt mit tumorigenen Zellen konfrontiert wird. Dies kann zu neonataler Toleranz (Alferink et al. 1998) oder Anergie reaktiver Lymphozyten führen. Außerdem erfolgt die Tumorentstehung in konstitutiven System systemisch, d. h., dass nahezu alle Zellen eines Gewebes zu Tumorzellen transformieren. Im humanen System ist Tumorentstehung jedoch ein sporadischer, in Einzelzellen erfolgender Vorgang, der im adulten Organismus auftritt. Das bedeutet, dass nicht ein Organ zu einem Tumor transformiert wird, sondern, dass einzelne Zellen aufgrund genetischer Veränderungen beginnen, sich unkontrolliert zu teilen. Aus dieser unkontrollierbaren Proliferationsaktivität heraus kann es zur Tumorentstehung kommen (Jonkers & Berns 2002).

Um die sporadische Tumorentstehung und die beteiligten Reaktionen im Modellsystem nachzuahmen, wurden konditionelle Modellsysteme entwickelt. Der Vorteil dieser Systeme liegt in der Möglichkeit, im adulten Tier zu einem beliebigen Zeitpunkt die Onkogenexpression gewebsspezifisch zu induzieren (Berns 1999/Meuwissen et al. 2001). Dabei kommt es nicht zu einer Proliferationsaktivität in kompletten Geweben, sondern zu autochthoner Tumorentstehung, die auf wenigen, zu Tumorzellen transformierten Zellen basiert. Zur Tumorformation müssen dabei drei Grundbedingungen auf zellulärer Ebene gegeben sein: Das Onkoprotein muss exprimiert werden, es müssen multiple Genmutationen in der zur Tumorzelle transformierenden Zelle vorliegen und die Zelle muss mitotisch aktiv sein (Jonkers & Berns 2002). Diese Grundbedingungen sind im konditionellen Tumorsystem gegeben. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Tumorentstehung beim Menschen und im konditionellen Mausmodell lassen sich hier gewonnene Erkenntnisse als Basis zur Entwicklung neuer Therapieansätze nutzen.

1.1.2. Molekulare Mechanismen der SV40 TAg-induzierten Tumorbildung im Tiermodell

Zur Erzeugung von Tumoren in Modellen finden meist virale Onkogene Verwendung. Ihre Expression führt zu einer Störung der Mitosesteuerung, wodurch es zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen kommt. Eines der wirkungsvollsten Onkogene ist das T-Antigen (= TAg) des Simian Virus 40 (= SV40). Mitarbeiter der Abteilung für Molekulare Immunologie konnten im RIP-TAg Insulinommodell (Ganss et al. 1998) und im AST-Hepatokarzinommodell (Sacher 2000) in vivo-Tumorentstehung demonstrieren. Dabei wurden Zellen durch Expression des TAg-Onkogens zu Tumorzellen transformiert, aus denen sich im späteren Verlauf Insulinome bzw. Hepatokarzinome entwickelten. Außerdem wurde in diversen Publikationen Tumorentstehung unter Verwendung des SV40 TAg-Onkogens in konstitutiven und konditionellen Systemen gezeigt (Mintz et al. 1992, 1993/Lakso et al.1992/Maroulakou et al. 1994/ Ewald et al. 1996/Berkovich et al. 2001). Ein Vorteil bei der Verwendung des SV40 TAg als Onkogen im Tiermodell beruht auf der Präsentation von TAg-Antigenen durch die MHC I und II-Komplexe (MHC = engl. „major histocompatibility complex“) transformierter Zellen. Diese Präsentation ist ähnlich der Präsentation von tumorassoziierten Transplantationsantigenen (TATA = engl. „tumor associated transplantation antigens“) im humanen System, die ein Ansatzpunkt für die Immuntherapie ist.

Zur Tumorinduktion muss das TAg-Protein sowohl an das Retinoblastomprotein pRB als auch an das Protein p53 binden. Diese Proteine spielen wichtige regulatorische Rollen bei der Steuerung der Mitose. Während einer normalen Mitose bindet pRB in der G₀-Phase an den eukaryotischen Transkriptionsfaktor E2F und wirkt negativ regulierend. Gegen Ende der G₀-Phase wird pRB durch cyclinabhängige Proteinkinasen (CdK = engl. „Cyclin dependant kinase“) phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Die Bindung zu E2F geht verloren, wodurch die Zelle über die G₁/S-Phase in die G₂-Phase überwechselt und eine Zellteilung vollzieht. Währenddessen wird pRB durch Protein-Phosphatasen dephosphoryliert und kann in diesem aktiven Zustand wieder an E2F binden. Dadurch wird eine weitere Zellteilung unterbunden (Knippers 1997). Im Fall eines TAg-Tumormodells kommt es durch das irreversible Binden von TAg an pRB zu einer Arretierung der Zellen in der S-Phase der Mitose.

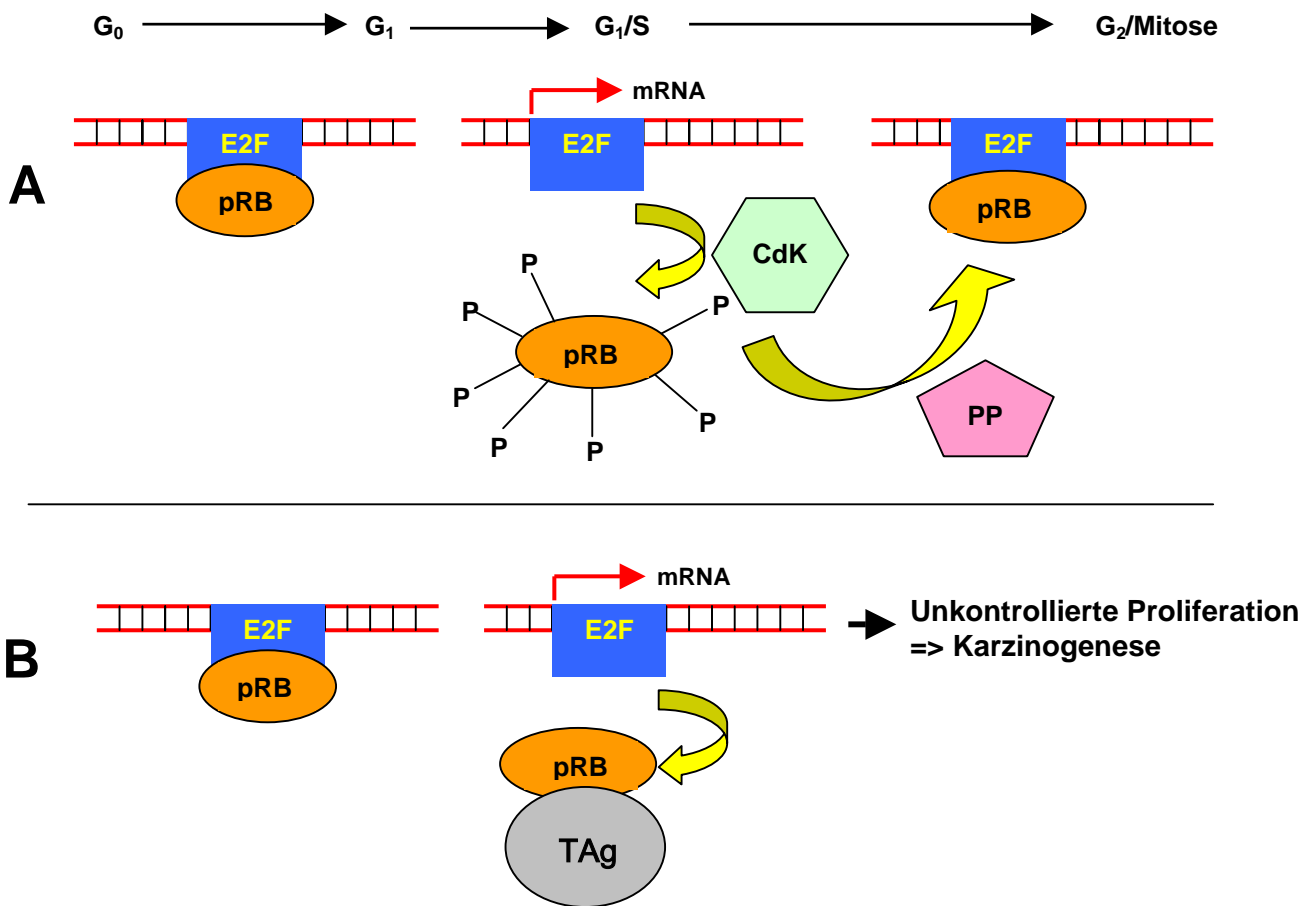


Abb. 1 Übersicht über die molekulare Interaktion von E2F, pRB und TAg sowie die Auswirkungen auf den Zellzyklus. **A** Während einer normalen Mitose wird pRB durch Phosphorylierung reversibel inaktiviert. Dadurch kann E2F als Transkriptionsfaktor die Transkription von zellzyklusregulierenden Genen steuern. Gegen Ende der G₁-Phase wird pRB wieder dephosphoryliert und kann durch Binden an E2F die Transkription anderer Gene unterbrechen. **B** Die irreversible Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins durch die Bindung von TAg arretiert die Zelle in der S-Phase des Zellzyklus. Die Folge ist eine unkontrollierte Proliferation, bei der ebenfalls die Möglichkeit zur Apoptose ausgeschaltet ist. Dadurch bedingt können weitere Mutationen der DNA auftreten, ohne dass die zelleigenen Reparatursysteme den Schaden beheben können, was letztlich zur Entstehung von Tumoren führt. (E2F = Transkriptionsfaktor / pRB = Retinoblastomprotein / Cdk = Cyclinabhängige Proteinkinase / P = Phosphat-Gruppen / PP = Protein-Phosphatase).

In Abbildung 1 wird die Interaktion des TAg Onkogens mit dem Retinoblastomprotein pRB während der Mitose veranschaulicht. Dabei kommt es durch die kontinuierliche Expression des eukaryotischen Transkriptionsfaktors E2F zu einer unkontrollierbaren Proliferationsaktivität der Zelle, die letztlich zur Entstehung von Tumoren führen kann. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von TAg ist die Tatsache, dass auch andere wichtige zelluläre Regulatoren wie p53 beeinflusst werden. Das Protein p53 übt mehrere Aufgaben in der Zelle aus. So sorgt es durch Binden an den Promotorbereich des Cdk-Inhibitors P21 für dessen Expression.

Das Protein p21 hemmt die DNA-Replikation und arretiert durch Binden an Cdk den Zellzyklus in der G₁-Phase. Außerdem kann p53 bei schweren Schädigungen der DNA (z. B. bei Auftreten von multiplen Mutationen) den Zelltod durch Apoptose induzieren.

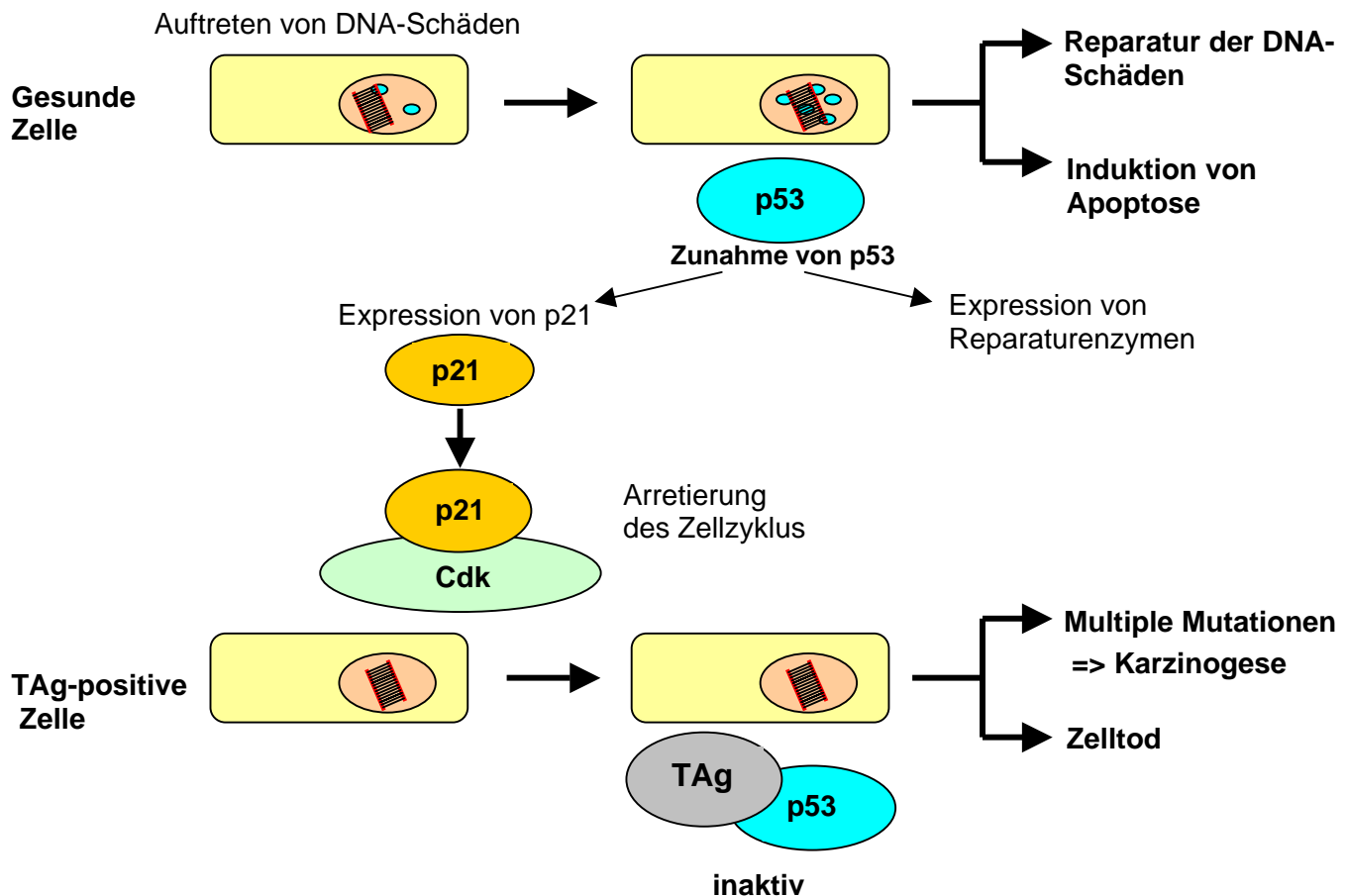


Abb. 2 Funktion des p53 Proteins während des Auftretens von DNA-Schädigungen innerhalb des Zellzyklus. Kommt es im Laufe der Mitose zum Auftreten von DNA-Schädigungen, so wird verstärkt p53 exprimiert. Diese Zunahme wiederum führt zur Expression von p21 und Reparaturenzymen. Das Protein p21 sorgt durch Binden an Cdk für einen Arrest der Mitose in der G₁-Phase und ermöglicht so eine Behebung der Schäden. Falls dies nicht möglich ist, vermittelt p53 den Zelltod durch Apoptose. In einer TAg-positiven Zelle jedoch ist p53 durch das Binden an dieses Protein inaktiv. Die Folge ist ein Wegfall der Mitosearretierung, der Expression von Reparaturenzymen oder der Induktion von Apoptose. Die Zelle teilt sich „normal“ und kann durch Anhäufung multipler Mutationen zur Tumorzelle transformieren. (Cdk = Cyclinabhängige Proteinkinase / TAg = SV40 T-Antigen).

Das SV40 TAg sorgt durch Binden an p53 für dessen Inaktivierung. Die Folge ist ein Wegfall an natürlichen Zellzyklusinhibitoren, da kein p21 exprimiert wird. Somit kann die Zelle nicht mehr durch Apoptose an unkontrollierter Proliferation gehindert werden. Dabei ist die simultane Inaktivierung von pRB und p53 essentiell. In Experimenten mit mutiertem TAg-Protein, welches selektiv entweder nur pRB oder p53 inaktivierte, konnte eine deutliche zeitliche Verzögerung der Tumorbildung beobachtet werden (R. Ganss, persönliche Kommunikation).

Im Folgenden sollen die wichtigsten konditionellen Systeme erläutert werden.

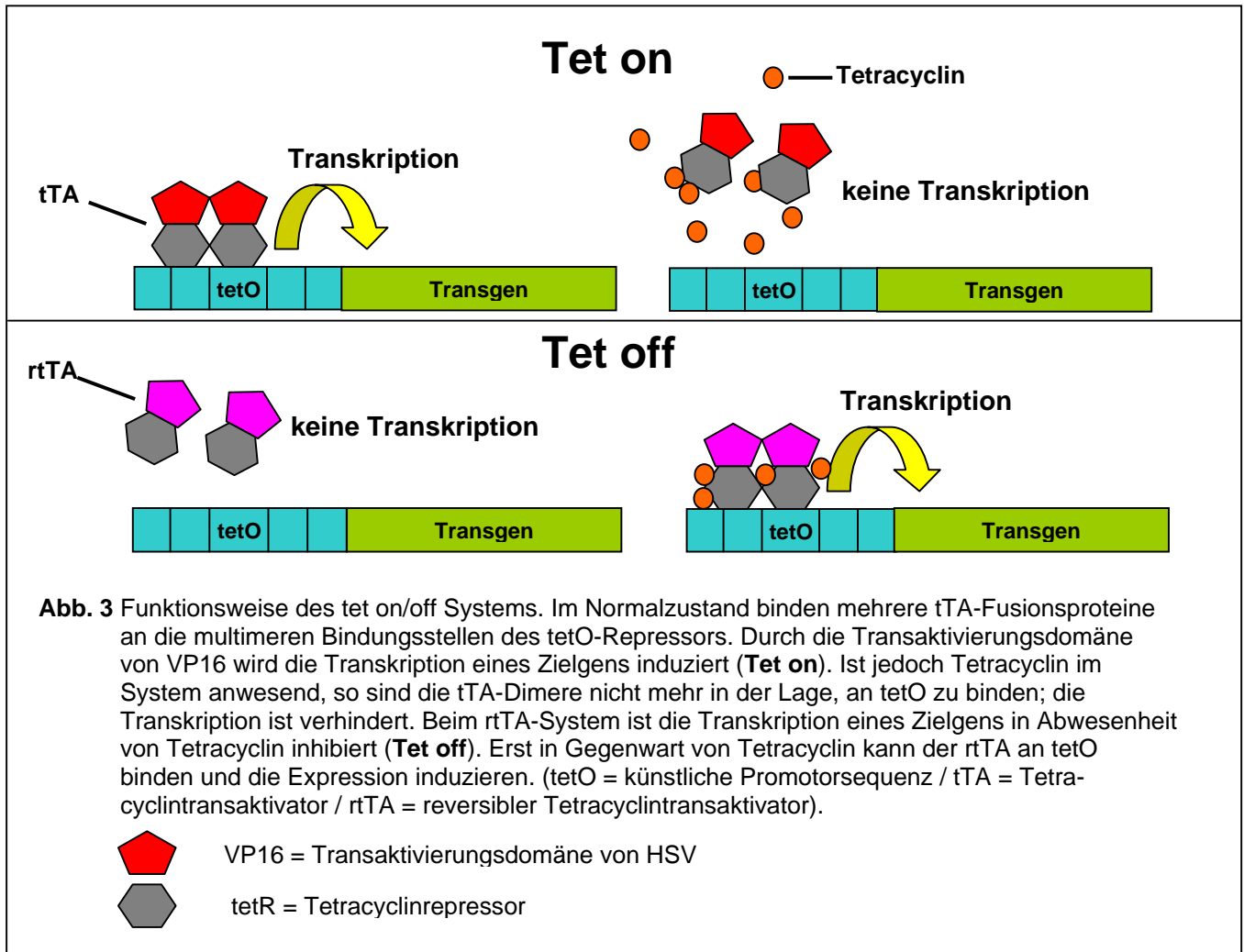
1.1.3. Das Tet on/off-System

Das Tet on/off System wurde zur konditionellen Steuerung von Transgenen entwickelt und besteht aus zwei Elementen (Gatz et al. 1988/Gossen et al. 1992). Diese beiden Elemente sind ein Fusionsprotein (tTA), bestehend aus dem Tetracyclin-Repressor (tetR) und einer Transaktivierungsdomäne des Herpes simplex Proteins VP16, sowie einer künstlichen Promotorsequenz. Diese Promotorsequenz ist einem Transgen vorgeschaltet und besteht aus multimeren Tetracyclin-Repressor Bindungsstellen (tetO). Im Tet on-System erfolgt durch Binden des tetR-Proteins an die tetO-Bindungsstellen des Promotors die Transkription des Transgens (Furth et al. 1994). Die Transkription kann durch Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin reversibel blockiert werden. Dabei bindet Tetracyclin an tTA und bewirkt eine Konformationsänderung. Dadurch kann der tTA nicht länger an die tetO-Sequenz binden und die Transkription des Transgens wird unterdrückt.

In Analogie zum tTA-System wurde ein weiteres tetracyclin-induzierbares System, das Tet-off System, etabliert. Dabei wurde durch Mutagenese ein reverser, tetracyclin-abhängiger Transaktivator (rtTA) entwickelt (Gossen et al. 1995/Kistner et al. 1996). Im Gegensatz zu tTA benötigt rtTA Tetracyclin zum Binden an tetO, um die Transkription eines Transgens zu veranlassen. Allerdings zeigt der rtTA eine höhere Grundexpression und eine geringere Induktionseffizienz als tTA. Aus Experimenten mit rtTA zeigte sich außerdem, dass das virale VP16-Protein in größeren Mengen toxisch auf die umgebenden Zellen wirkte. Dies führte zum Austausch der VP16-Domäne gegen synthetische Aktivierungsdomänen (Baron et al. 1997). Nachteilig bei der Verwendung des Tet on/off Systems ist, dass sich Tetracyclin im Knochenmark einlagert. Das bedeutet, dass ein Absetzen von Tetracyclin nicht zu einer sofortigen Inhibition/Aktivierung der Transkription durch die Depotwirkung des eingelagerten Tetracyclins führt.

Um eine Universalmaus zur temporalen Kontrolle von Transgenen zu entwickeln, untersuchte man zunächst verschiedene konstitutive, virale Promotoren für den tTA (Furth et al. 1994). Dazu wurden tTA-transgene Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die ein Reportergen unter der Kontrolle des tetO-Promotors trugen.

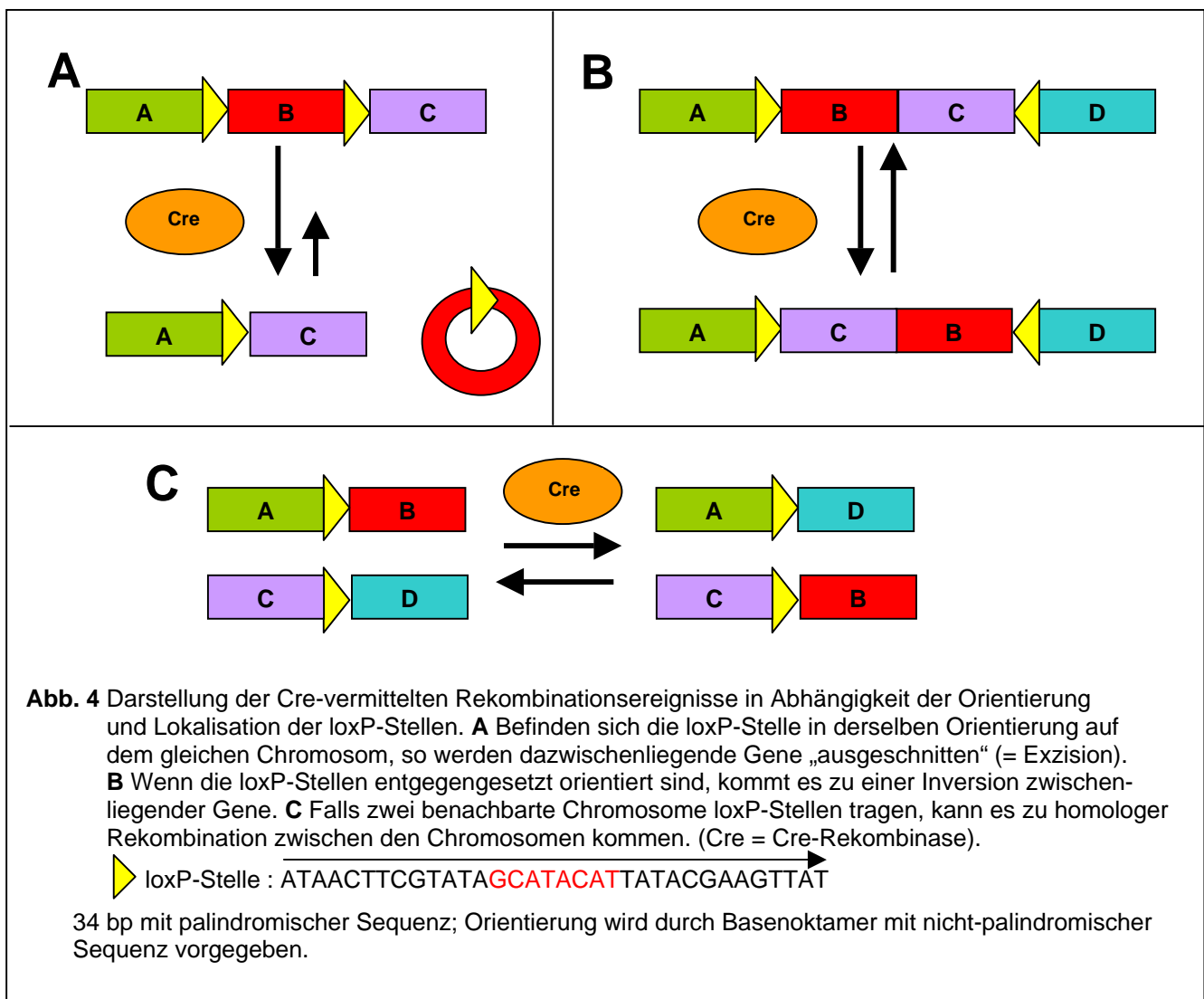
Hierbei traten Probleme durch die hohe Hintergrundexpression des Transgens auf (Kistner et al. 1996). Eine Erklärung hierfür könnte im chromosomalen Umfeld der Transgene liegen, da durch benachbarte endogene Enhancer auch das Transgen transkriptionell aktiv wäre.



Die obige Abbildung veranschaulicht die Funktionsweisen des Tet on- und des Tet off-Systems. Im Tet on-System erfolgt die Transkription eines Zielgens in Abwesenheit von Tetracyclin, wohingegen die Transgengtranskription im Tet off-System durch Tetracyclin induziert wird. Beide Systeme sind reversibel, d. h. man kann durch die Zugabe oder das Absetzen von Tetracyclin die Zielgenexpression steuern.

1.1.5. Das Cre/loxP-System

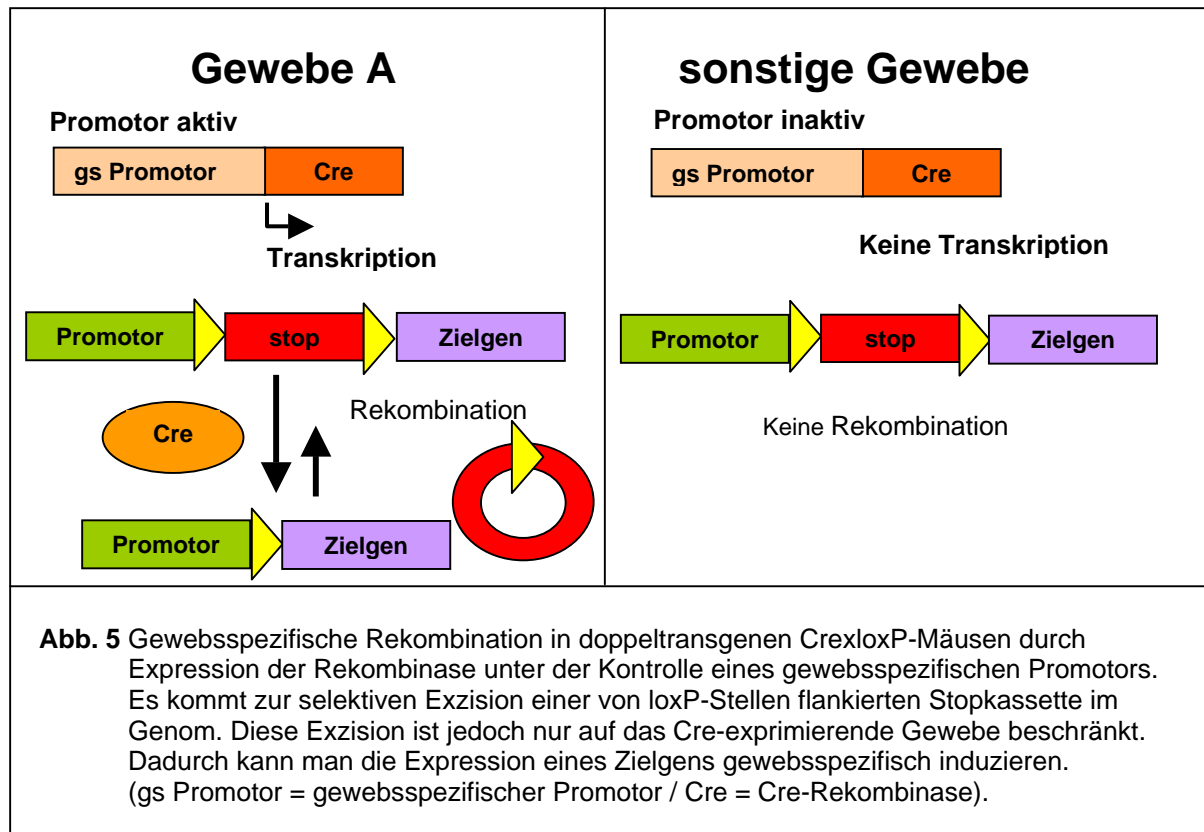
Das Cre/loxP-System ermöglicht eine Vielzahl von molekularbiologischen Manipulationsmöglichkeiten des Mausgenoms (Nagy 2000). Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich, die Expression von Genen konditionell zu beeinflussen. Dabei bedient man sich der Fähigkeit der aus dem Bakteriophagen P1 stammenden Cre-Rekombinase (Cre = engl. „cyclization recombinase“), sequenzspezifische Rekombination zu vermitteln. Die Rekombinase erkennt dabei spezielle, 34bp lange loxP-Sequenzen (loxP = engl. „locus of X-over of P1“) im Genom und vermittelt Rekombination zwischen zwei loxP-Stellen (Brandon et al. 1995). Dadurch kann man konditionell Genexpression ein- oder ausschalten, Punktmutationen einführen oder chromosomale Mutationen (Deletionen, Duplikationen oder Translokationen) durchführen (Buchholz et al. 2000).



Die loxP-Stellen sind palindromische Sequenzen mit einem zentralen, nicht-palindromischen Basenoktamer, das die Orientierung vorgibt. Dementsprechend kann man verschiedene Rekombinationsereignisse in Abhängigkeit von der Orientierung und der Lokalisation der loxP-Stellen unterscheiden (Abremski et al. 1983/Guo et al. 2002). Da nach erfolgter Rekombination die loxP-Stellen wieder hergestellt sind, ist eine Rück-Rekombination möglich (Kilby et al. 1993). Eine Ausnahme stellt der knock-out von Genen durch Exzision dar (knock-out = Entfernen von Genen). Diese Reaktion ist durch die intramolekulare Hinreaktion und den Verlust der ausgeschnittenen Bereiche während Mitose ein irreversibler Vorgang. Deshalb eignet sich diese Eigenschaft des Cre/loxP-Systems zur konditionellen Steuerung von Zielgenen im Tiermodell.

Zur Herstellung gewebsspezifischer knock-out Mäuse werden grundsätzlich zwei Mauslinien benötigt. Dies sind zum einen eine Cre-transgene Linie, in der die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors exprimiert wird, und zum anderen eine loxP-transgene Linie, bei der durch homologe Rekombination zwei loxP-Stellen in gleicher Orientierung in Introns eines Zielgens inseriert wurden. Die Nachkommen einer solchen Kreuzung werden aufgrund der gewebsspezifischen Expression der Cre-Rekombinase nur in bestimmten Geweben die loxP-Stellen rekombinieren (Feil et al. 1996) und somit die Expression bestimmter Gene eliminieren. In der Tumorforschung lassen sich durch knock-out Strategien Onkogene konditionell aktivieren (Bex et al. 2002). Dazu induziert man Rekombination in einer Mauslinie, die z. B. ein gewebsspezifisches floxstop-Onkogen-Transgen trägt. Die floxstop-Kassette verhindert eine Transkription des Onkogens in nicht-induzierten Tieren. Cre-vermittelte Exzision der Stop-Kassette induziert die Onkogenexpression, die zur Tumorentstehung führen kann. Durch die zeitliche Steuerung der Onkogenexpression in solchen Modellen ist man in der Lage, Tumorentstehung und -progression besser erforschen zu können.

Aufschluss über erfolgte Rekombination in vivo erhält man durch Kreuzung von Cre-transgenen Tieren mit Mäusen, die ein Reporter-gen tragen (Soriano 1999/Akagi et al. 1997/Michael et al 1999). In diesen Linien ist das Reporter-gen durch eine von loxP-Stellen flankierte Stopkassette transkriptionell inaktiv, obwohl ein konstitutiv aktiver Promotor vorgeschaltet ist. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird die Stopkassette entfernt und die Reporterproteinexpression induziert.



Durch die beschriebenen Eigenschaften des Cre/loxP-Systems ist derzeit eine Vielzahl an Cre- und loxP-Mauslinien verfügbar, sodass man von einem regelrechten „Cre-Zoo“ (Rajewsky et al. 1996) sprechen kann. Einen Überblick über derzeit existente Cre/loxP-Linien gibt es im Internet (www.mshri.on.ca/nagy/cre.htm).

Zur Vermeidung von Hintergrund-Rekombination durch konstitutive Cre-Expression wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um eine konditionell-induzierbare Cre-Rekombinase zu erhalten. Der vielversprechendste Ansatz lag in der Erzeugung eines Fusionsproteins, bestehend aus der Cre-Rekombinase und einer Hormonbindungsdomäne. Dazu wurden verschiedene Hormonbindungsdomänen mit Cre fusioniert, so z. B. die Domäne des Östrogenrezeptors (ER), des Progesteronrezeptors (PR) oder des Glukocorticoidrezeptors (GR). Um einer Aktivierung der Fusionsproteine durch endogene Hormone vorzubeugen, wurden in die Gensequenzen der Bindungsdomänen Mutationen eingeführt. Dadurch können diese Proteine nur durch Hormonantagonisten, wie Tamoxifen oder RU486, nicht jedoch durch körpereigene Steroidhormone induziert werden (Vegeto et al. 1992/Littlewood et al. 1995).

Die in vivo Induktionsfähigkeit von CreER-Fusionsproteinen wurde im Rosa26-Reportersystem (lacZ-Reportersystem) in verschiedenen Geweben demonstriert (Feil et al. 1996/ Brocard et al. 1997/Schwenk et al. 1998/Danielian et al. 1998/Kellendonk et al. 1999). Bei der Induktion muss auf die Dosierung der Hormonantagonisten geachtet werden, da sich hohe Dosen an Induktor störend, bisweilen auch toxisch auswirken können (Danielian et al. 1998/Vasioukhin et al. 1999). Außerdem wurde beobachtet, dass die Cre-Rekombinase in Säugerzellen wachstumshemmend und DNA-schädigend wirken konnte (Loonstra et al. 2001).

Um das Cre/loxP-System weiter zu verbessern bzw. um die Induktion durch Erhöhen der Bindungsaffinität der Hormonbindungsdomäne für den Induktor sensibler zu gestalten, wurden weitere Modifikationen im Bereich der Hormonbindungsdomäne (Feil et al. 1997/ Kellendonk et al. 1999/Indra et al. 2000/Sohal 2001/Vallier et al. 2001) und im Cre-Gen eingeführt (Bucholz & Stewart 2001/Shimshek et al. 2002/Casanova et al. 2002). Daraus resultierte das in dieser Arbeit verwendete CreERT²-Fusionsprotein (Feil et al. 1997).

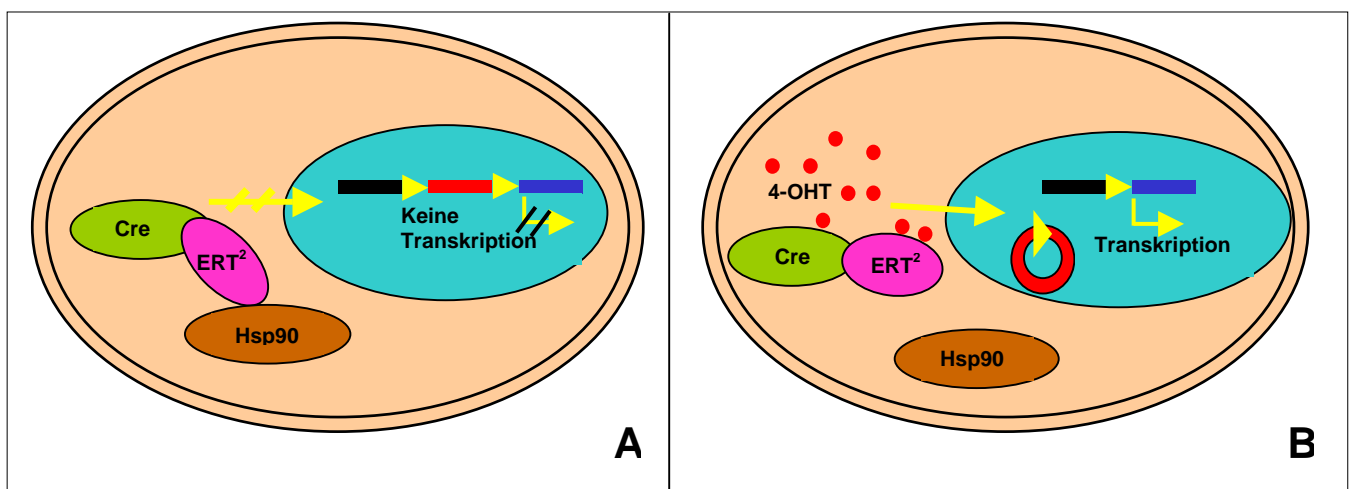


Abb. 6 Darstellung der 4-Hydroxytamoxifen-vermittelten Induktion der Rekombinaseaktivität von CreERT². In nicht-induziertem Zustand (**A**) liegt das Cre-Fusionsprotein im Komplex mit Hsp90 im Cytosol vor und ist durch sterische Gründe an einem Eindringen in den Nukleus verhindert. Wenn 4-OHT (**B**) an die Östrogenrezeptordomäne bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins. Hsp90 wird freigesetzt und die Cre-Rekombinase kann in den Zellkern translozieren. Dort erkennt sie loxP-Stellen im Genom und rekombiniert die dazwischenliegenden Gene. (Cre = Cre-Rekombinase / ERT²=zweifach mutierter Östrogenrezeptor / Hsp90= Heatshock Protein 90 / 4-OHT= 4-Hydroxytamoxifen).

► loxP-Stelle; 34 bp mit palindromischer Sequenz; Orientierung wird durch Basenoktamer mit nicht-palindromischer Sequenz vorgegeben.

In Abbildung 6 wird die konditionelle Induktion eines CreERT²-Fusionsproteins erläutert. Dabei erfolgt durch Exzision einer von loxP-Sequenzen flankierten Stopkassette die Transkription eines inaktiven Zielgens. Die Bezeichnung ERT² bedeutet, dass es sich hierbei um einen Tamoxifen induzierbaren, zweifach mutierten Östrogenrezeptor handelt (Feil et al. 1997). Man erkennt, dass die Expressionskontrolle des Zielgens in diesem Ansatz durch die subzelluläre Lokalisation der Rekombinase posttranslational beeinflusst wird.

Bei der Verwendung des Cre/loxP-Systems konnte außerdem beobachtet werden, dass es nicht zu 100%iger Rekombination in Zielgeweben kommt. Somit führt Cre-vermittelte Rekombination eines floxstop-Transgens nur zu sporadischer Transkription in einigen Zellen. Handelt es sich bei dem Zielgen z. B. um ein Onkogen, kommt es dementsprechend zu sporadischer Onkogenexpression, die vergleichbar mit der klinischen Situation der Tumorentstehung ist (Vooijs et al. 2001). Aus diesem Grund eignet sich das Cre/loxP-System zur Erzeugung eines Tumormodells, das die humane Tumorentstehung reflektiert.

1.1.6. Das Flp/frt-System

Ein weiteres konditionelles Rekombinationssystem ist das Flp/frt-System. Dieses Rekombinationssystem entstammt der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Rekombination wird durch Erkennen von sogenannten frt-Stellen (= engl. „Flp recognition target“) durch die Flp-Rekombinase, in Analogie zum Cre/loxP-System, vermittelt. Da das Cre/loxP-System jedoch mit deutlichem Abstand weiter entwickelt ist und in stärkerem Maße in der Forschung Verwendung findet, wird nicht näher auf das Flp/frt-System eingegangen.

1.1.7. Proteintranslokation

Einige Proteine sind in der Lage, mittels spezieller Signalsequenzen in lebende Zellen zu translozieren (Frankel & Pabo 1988/Green & Loewenstein 1988). Diese sogenannten Proteintranslokationsdomänen (= PTD) sind deshalb ein interessantes molekularbiologisches Werkzeug, da sie eine fusionierte Fracht, wie z. B. funktionell aktive Proteine bis zu einer Größe von 120kDa bzw. Latex- oder Eisenpartikel mit einem Durchmesser bis zu 4nm in lebende Zellen einschleusen können (Fawell et al. 1994/Nagahara et al. 1998/Schwarze et al. 1999/Wadia et al. 2002). Der Translokationsvorgang in Zellen scheint ein energieunabhängiger Vorgang zu sein, da das Eindringen sowohl bei 37°C als auch bei 4°C stattfindet (Prochiantz et al. 1996/Lundberg et al. 2003). Die meisten PTD-Sequenzen stammen aus evolutionsbiologisch stark konservierten Proteinen, den DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (Pooga et al. 1998). Beispiele hierfür sind u. a. die Antp-Sequenz von *Drosophila* (Joliot et al. 1991/Prochiantz et al. 1996/Derossi et al. 1996), die VP22-Sequenz von HSV (Elliott & O'Hare 1997) und die tat-Sequenz des HIV-1 (Frankel & Pabo 1988/Green & Loewenstein 1988). Den Proteintranslokationsdomänen ist gemein, dass sie zahlreiche positiv geladene Aminosäuren, wie z. B. Lysin, Arginin und Histidin, tragen. Durch Interaktion der positiven Ladungen dieser Aminosäuren mit den negativen Ladungen der Phosphatgruppen der Nukleotide können Proteine, die eine PTD tragen, an DNA binden.

Ferner wurden auch DNA-bindende Antikörper beschrieben, die ebenfalls eine PTD tragen (Alarcon-Segovia et al. 1978, 1996/Yanase et al. 1997/Avrameas et al. 1998). Eine Zusammenstellung diverser PTD-Sequenzen befindet sich im Anhang (siehe „7.2.“). Seit kürzerer Zeit existieren auch verschiedene künstliche PTD (Antopolsky et al. 1999/Lindberg et al. 2001/Lindgren et al. 2001/Kilk et al. 2001). So wurde von mehreren Gruppen gezeigt, dass u. a. argininreiche Peptide ebenfalls in der Lage sind, durch Membranen zu translozieren (Rothbard et al. 2000/Futaki et al. 2001/Suzuki et al. 2001).

Der Mechanismus der Translokation ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Die zahlreichen Publikationen über Proteintranslokation führen zu zwei Modellvorstellungen. Eine Theorie propagiert eine Interaktion der Translokationssequenzen mit extrazellulären Strukturen. Durch Binden an diese Strukturen und nachfolgende Endocytose sollen die Proteine in die Zellen gelangen (Suzuki et al. 2002/Lundberg et al. 2003/Console et al. 2003).

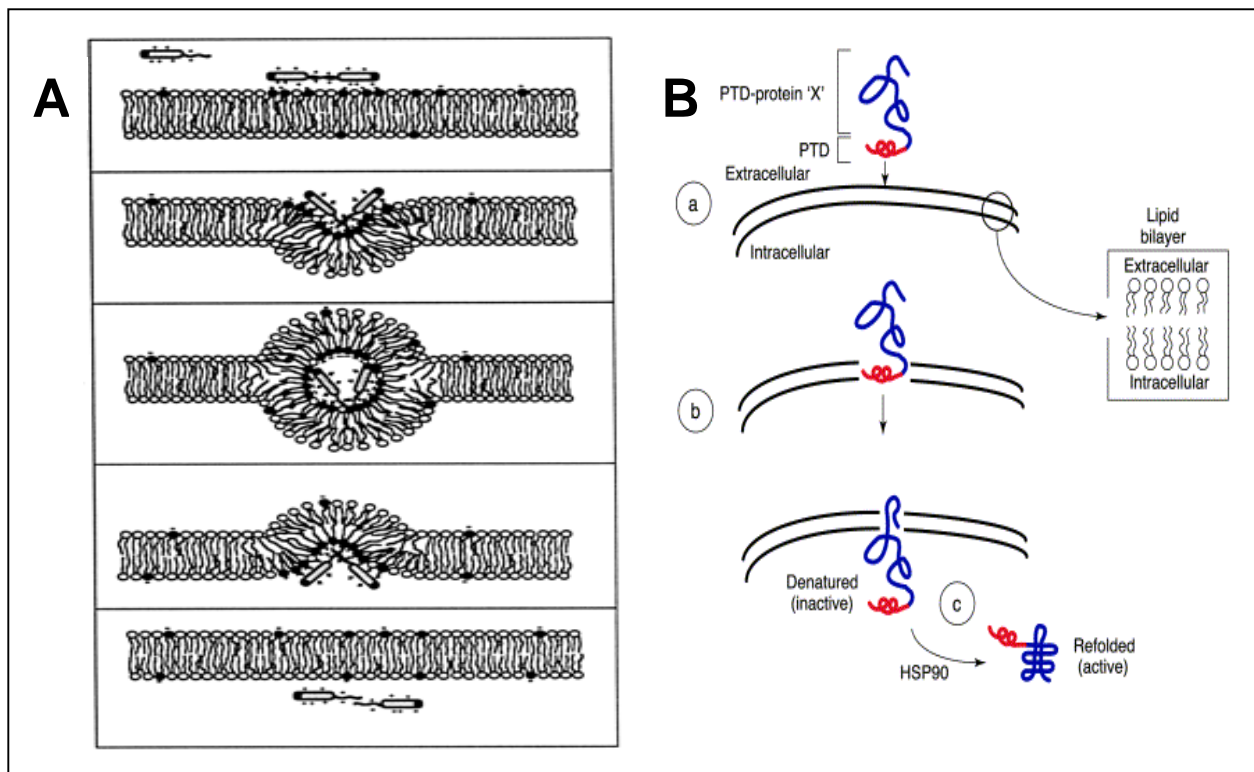


Abb. 7 Darstellung des möglichen Translokationsvorganges durch Interaktion der PTD mit der Zellmembran. In der Modellvorstellung von Prochiantz et al. (1998) kommt es durch Interaktion der positiven Ladungen der Aminosäuren der PTD mit den negativen Ladungen auf der Außenseite der Zellmembran zur Formation einer invertierten Micelle. Innerhalb dieser wird der PTD-Cargo-Komplex nach Verschmelzung der Micelle mit der Membraninnenseite in das Cytoplasma der Zelle entlassen (A). Ähnlich ist die Erklärung von Schwarze et al. (1999, 2000). Hier wird ein denaturiertes, hochenergetisches Fusionsprotein transloziert. Dabei interagiert die PTD mit der Membran, wodurch das PTD-Cargo Fusionsprotein in das Zellinnere gelangt. Dort wird das Protein durch Hsp90 zurückgefaltet und erlangt somit wieder biologische Aktivität (B).

Eine zweite Theorie basiert auf einer Wechselwirkung der elektrostatischen Ladungen zwischen der PTD, die aus positiv geladenen Aminosäuren besteht, und den negativen Ladungen auf der Außenseite der Membranen, wie in Abbildung 7 verdeutlicht (Derossi et al. 1996/Prochiantz 1996/Schwarze et al. 1999, 2000/Ziegler et al. 2003). Durch diese Interaktion kommt es zur Formierung einer invertierten Micelle, wodurch das PTD-Konstrukt in die Zelle gelangt.

1.2 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Verwendung des Cre/loxP-Systems ein konditionelles, autochthones Tumormodell zu entwickeln. Dabei sollte die Onkogenexpression unter der Kontrolle des Tyrosinase- bzw. des KeratinIV-Promotors erfolgen. Der Tyrosinase-Promotor ist exklusiv in tyrosinase-positiven Zellen der Epidermis und im Pigmentepithel der Retina aktiv (Klüppel et al. 1991/Beermann et al. 1992/Ganss et al. 1994). Der KeratinIV-Promotor vermittelt Expression in der Epidermis und in KerIV-positiven Zellen der Trachea (Indra et al. 1999/Berton et al. 2003/Suzuki et al. 2003). Somit sollte die Onkogenexpression zur Entstehung von Haut- und Augentumoren führen. Der Vorteil eines Hauttumormodells, im Gegensatz zu einem System, bei dem Tumoren in den inneren Organen entstehen, besteht darin, dass man die Tumorbildung in der Haut von außen erkennen kann. Die Einführung des neuen Tumormodells erforderte die Herstellung konditioneller floxstop-TAg-transgener Tumormauslinien und den Nachweis ihrer Tumorinduktionsmöglichkeit. Ebenso sollte eine neue Cre-transgene Induktorlinie hergestellt werden, mit deren Hilfe gewebsspezifische Rekombination induzierbar wäre.

Außerdem sollte ein alternatives Induktionssystem, basierend auf rekombinanten PTD-Cre Fusionsproteinen, zur Induktion der Onkogenexpression entwickelt werden. Dazu mussten verschiedene PTD-Cre Proteine hergestellt, aufgereinigt und in vitro miteinander verglichen werden. Das am zuverlässigsten in vitro-rekombinierende PTD-Cre Protein sollte im Anschluss in vivo eingesetzt werden. Weiterhin sollte durch Applikation von PTD-Cre Proteinen die Entstehung eines Hepatokarzinoms im Albumin-floxstop-TAg-Modell (AST) induziert werden.

Derzeit werden Tumoren in diesem System entweder durch Verpaarung mit Cre-rekombinierenden (= Cre-deleter) Mäusen oder durch Applikation gentechnisch veränderter Adenoviren, die das Cre-Gen tragen, induziert. Nach Injektion der rekombinanten Adenoviren kommt es allerdings zu einer Immunreaktion gegen das Virus. Diese unerwünschte Nebenreaktion soll durch die Verwendung von PTD-Cre-Proteinen umgangen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Es werden Chemikalien und Grundsubstanzen der Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), und Roth (Karlsruhe) verwendet.

2.1.2. Enzyme

Der überwiegende Teil der Restriktionsenzyme und anderer DNA/RNA modifizierender Enzyme, wie T₄-DNA-Ligase, CIP (= „Calf Intestine Phosphatase“), Klenow-Enzym, Taq-DNA-Polymerase, DNase, RNaseA, Reverse Transkriptase, wird von der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen. Vereinzelt werden Enzyme der Firmen Roche (Mannheim), Promega (Mannheim), New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Amsterdam, Niederlande) und Gibco BRL (Eggenstein) verwendet.

2.1.3. Gebrauchswaren

Die Plastikartikel für die Zellkultur und die molekularbiologischen Arbeiten werden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Greiner (Frickenhäuser), Falcon (Becton Dickinson), Nalgene, Nunc, und Renner (Darmstadt) bezogen.

2.1.4. Verwendete Kits

DNA Labelling and Detection Kit-Nonradioactive (Boehringer)	Digoxigenin-Markierung von DNA zur Verwendung als Hybridisierungssonde im Southern Blot
Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen über Säulen
Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)	PCR-Reaktionen bis zu 5 kb mit geringer Fehlerrate durch proofreading-Aktivität einer beigemengten Pwo-Polymerase
FluoReporter lacZ Assay Kit (Molecular Probes)	Nachweis über Cre-vermittelte Rekombination in CV1-5B- und Rosa26-Zellen
ECL Kit (Pharmingen)	Detektion von proteingebundenen Antikörpern im Western Blot
Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem)	Inhibition von Proteasen bei der Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

2.1.5. Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank 3029	Forma Scientific
Elektrophoresekammern	PeqLab
Eismaschine Wessamat	Zuck (Leimen)
FACScan	Becton Dickinson
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Messer Griesheim (Düsseldorf)
Fluoreszenz-Mikroskop Axiophot 2	Zeiss
Kaltlichtlampe KL 1500-Z	Schott (Göttingen)
Kryostat 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr / Bosch
Lumi-Imager	Boehringer Mannheim
Magnetrührer, Heizplatte MR 3002	Heidolph
Mikroskop	Olympus
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 761 Calimetric	Knick
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Schüttelinkubator Incubator Shaker	New Brunswick Scientific GmbH
(Schüttel-) Wasserbad	Köttermann (Hänigsen)
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik; Janke+Kunkel
Spannungsgeräte Biometra P25	Biotron (Göttingen)
Binokular	Leitz
Sterilbank Biogard Hood	Baker Company Inc. (Maine, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson (Connecticut, USA)
Waagen	Satorius (Göttingen); Mettler
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus Christ (Osterode)
Zentrifuge Omnifuge 2,0 S	Heraeus Sepatech (Osterode)
Zentrifuge TJ-6	Beckmann (Palo Alto, CA, USA)
Zentrifuge Sorvall RC5C Plus	Kendro

2.1.6. Puffer und Lösungen

Die Lösungen werden mit doppelt deionisiertem, autoklaviertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Für Elektrophoresepuffer wird einfach deionisiertes Wasser verwendet. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt werden, ist der Konzentrationsfaktor in Klammern angegeben. Lösungen, die autoklaviert werden (121°C; 25 min), sind mit * gekennzeichnet. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, ist die Lagertemperatur in Klammern angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf Gewicht pro Volumeneinheit (w/v).

Material und Methoden

Anodenpuffer:	25mM Tris/HCl; 10% Methanol; pH 10,4
Avertin-Narkose (~10 Mäuse):	180µl Avertin in 10ml 0,9% NaCl-Lösung
CIP-Puffer (10x) (-20°C):	100mM Tris/HCl; pH 7,5; 100mM MgCl ₂
Ca ²⁺ -deprived Medium:	100µM L-Asparaginsäure; 200µM L-Threonin; 300µM L-Serin; 500µM Glycin; 600µM L-Alanin; 900µM L-Glutaminsäure; 900µM L-Glutamin; 20mM D(+)-Glucose; 20mM Fructose; 197mM Sucrose; 3mM KCl; 700µM NaH ₂ PO ₄ ; 500µM MgCl ₂ ; 1mM HEPES; 24mM NaHCO ₃ ; pH 7,4
Collagenaselösung:	0,005% Collagenase A in Ca ²⁺ -deprived Medium
Denaturierungslösung:	500mM NaOH; 1M NaCl
Denhardt's (-20°C)*:	1% Ficoll; 1% BSA; 1% Polyvinylpyrrolidon
Detergenzlösung:	100mM Phosphatpuffer; 2mM MgCl ₂ ; 0,02% NP-40; 0,01% Natrium-deoxycholat; pH 7,3
Dialysepuffer 1:	600mM NaCl; 20mM HEPES; pH 7,4
Dialysepuffer 2:	600mM NaCl; 20mM HEPES; 50% Glycerin; pH 7,4
dNTP-Mix (10x) (-20°C):	2mM dATP; 2mM dTTP; 2mM dCTP; 2mM dGTP
FACS-Puffer:	4% FCS in PBS; 10mM HEPES; 1,5µM Propidiumiodid; pH 7,2
Fixierlösung :	2% Formaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd; 5mM EGTA; 2mM MgCl ₂
FDG-Lösung:	2mM FDG in ddH ₂ O
GBBS-Puffer:	137mM NaCl; 5mM KCl; 1,6mM CaCl ₂ ; 0,9mM MgCl ₂ ; 0,3mM MgSO ₄ ; 0,2mM KH ₂ PO ₄ ; 1,7mM Na ₂ PO ₄ ; 2,7mM NaHCO ₃ ; 5,5mM D(+) Glucose; 50mM HEPES; pH 7,4
Gewebepuffer (Southern Blot):	100mM Tris/HCl pH 8,5; 200mM NaCl; 5mM EDTA; 0,2% SDS
Hybridisierungslösung (-20°C):	5x Denhardt's; 4x SSPE; 1% SDS; 100µg/ml Heringssperma-DNA
KaAc/HCOOH-Puffer (4°C):	3M KaAc; 5% HCOOH
Kathodenpuffer:	25mM Tris/HCl; 15mM Aminocaprinsäure; 10% Methanol; pH 9,4
Konzentrierter Anodenpuffer:	300mM Tris/HCl; 10% Methanol; pH 10,4
Ladepuffer (-20°C):	0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylen Cyanol FF; 15% Glycerol
Ligationspuffer (10x) (-20°C):	500mM Tris/HCl pH 7,5; 100mM MgCl ₂ ; 20mM DTT; 20mM Spermidin
Lysepuffer (DNA):	200mM NaOH; 1% SDS
Neutralisierungslösung:	500 mM Tris/HCl; 3M NaCl; pH 7,4

Material und Methoden

NaOH/SDS-Puffer:	200mM NaOH; 1% SDS
NBT-Lösung:	75 mg/ml in DMF
PBS (10x)*:	1,3M NaCl; 1M Na ₂ HPO ₄ ; 1M NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,0
PCR-Puffer (10x):	100mM Tris (pH 8,3); 500mM KCl; 25mM MgCl ₂ ·6H ₂ O
Prähybridisierungslösung:	2% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Hybridisierungslösung
Prälyse-Puffer :	50mM Glukose; 25mM Tris/HCl; 10mM EDTA; pH 8,0
Protein-Lysepuffer:	500mM NaCl; 50mM NaH ₂ PO ₄ ; 10mM Imidazol; 5mM Tris; pH 7,8
Protein-Waschpuffer:	500mM NaCl; 50mM NaH ₂ PO ₄ ; 20mM Imidazol; 5mM Tris; pH 7,8
Protein-Elutionspuffer:	500mM NaCl; 50mM NaH ₂ PO ₄ ; 250mM Imidazol; 5mM Tris; pH 7,8
100mM Phosphatpuffer:	100mM Na ₂ HPO ₄ ; 100mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,3
Puffer-1 (SB):	100mM Tris/HCl; 150mM NaCl; pH 7,5
Puffer-2 (SB):	2% Blockierungsreagenz (Boehringer) in Puffer-1
Puffer-3 (SB):	100mM Tris/HCl; 100mM NaCl; 50mM MgCl ₂ ; pH 9,5
B ⁺ (10x):	100mM Tris/HCl; 100mM MgCl ₂ ; 1mg/ml BSA; pH 7,5
G ⁺ (10x):	100mM Tris/HCl; 100mM MgCl ₂ ; 500mM NaCl; pH 7,5 1mg/ml BSA
O ⁺ (10x):	500mM Tris/HCl; 100mM MgCl ₂ ; 1M NaCl; 1mg/ml BSA; pH 7,5
R ⁺ (10x):	100mM Tris/HCl; 100mM MgCl ₂ ; 1M KCl; 1mg/ml BSA; pH 8,5
Y ⁺ /Tango (2x):	66mM Tris-Acetat; 20mM Mg-Acetat; 132mM Ka-Acetat; 0,2mg/ml BSA; pH 7,9
Sammelgelpuffer :	250mM Tris/HCl; 0,8% SDS; pH 6,8
SDS-Laufpuffer :	25mM Tris/HCl; 190mM Glycin; 0,1% SDS
SDS-Probenpuffer (2x):	125mM Tris/HCl; 10% β-Mercaptoethanol; 0,025% Bromphenolblau; 10% Glycerin
SSC (20x):	3M NaCl; 300mM Natriumcitrat; pH 7,0
SSPE (20x):	3,6M NaCl; 200mM NaH ₂ PO ₄ ; 20mM EDTA; pH 7,0
TAE (10x):	400mM Tris/HAc; 50mM NaAc; 10mM EDTA; pH 7,4
Tamoxifenlösung:	10% 4-Hydroxytamoxifen in DMSO
TE (10x):	100mM Tris/HCl; 100mM EDTA; pH 8,0
Trenngelpuffer :	1,5M Tris/HCl; 0,4% SDS; pH 8,8
Waschlösung:	0,3x SSC; 0,1% SDS

X-Gal-Lösung: 5mM $K_2[Fe(CN)_6]$; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]$; 2mM $MgCl_2$; 20mM Tris; 0,02% NP-40; 0,01% Natriumdeoxycholat; 1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid (= X-Gal) in 100mM Phosphatpuffer; pH 7,3

2.1.7. Medien

Die für die Zell- und Bakterienkultur verwendeten Medien und Medienzusätze werden von den Firmen Gibco BRL (Eggenstein), Difco (Detroit/USA), Sigma (München) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

2.1.7.1. Medien für Bakterien

5x LB-Medium:

Trypton :	50 g/l
Hefeextrakt:	25 g/l
NaCl :	50 g/l

Antibiotika Stammlösungen:

Amp ⁵⁰	(50 mg/ml Ampicillin in H ₂ O)
Kan ⁷⁰	(70 mg/ml Kanamycin in H ₂ O)
Cam ⁵⁰	(50 mg/ml Chloramphenicol in EtOH)

Das Luria-Bertoni (= LB) -Medium für die Bakterienkultur wird mit ddH₂O angesetzt, der pH auf 7,5 eingestellt und anschließend autoklaviert (25min; 121°C).

Zum Gießen von Agarplatten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt. Nach Abkühlen auf Handwärme wird das Medium in 10cm Petrischalen gefüllt (ca. 20 ml/Schale). Die Platten werden danach mit leicht geöffnetem Deckel unter die Sterilbank gestellt, bis der Agar erstarrt und ausreichend getrocknet ist. Für Selektiv-Medium bzw. -Agar wird nach dem Abkühlen auf ca. 60°C das entsprechende Antibiotikum aus der Stammlösung zugesetzt. Die Platten können bei 4°C ca. drei Monate gelagert werden.

2.1.7.2. Medien für die Zellkultur

Die Grundmedien werden durch Zugabe von Medienzusätzen aus Stammlösungen komplettiert. Das fetale Kälberserum wird vor Gebrauch für 45min bei 56°C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. L-Glutamin ist instabil und wird dem angesetzten Medium nach zwei Wochen erneut zugesetzt.

RPMI oder DMEM Standard-Medium:

RPMI 1640 oder DMEM (1000mg/l Glucose) (Gibco, Eggenstein)

<u>Zusatz</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Hersteller</u>
FCS	10%	(Gibco, BRL)
L-Glutamin (200mM)	2mM	(Gibco, Eggenstein)
Na-Pyruvat (100mM)	1mM	(Gibco, Eggenstein)
Pen/Strep (10mg/ml)	100 U/ml	(Linaris)
2-Mercaptoethanol (20µM)	0,1mM	(Merck, Darmstadt)
HEPES (1M; pH 7,3)	10mM	(Roth, Karlsruhe)

2.1.8. Bakterienstämme

DH1: F⁻ glnV44 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) relA1 spoT1?
rfdD1?

XL1-Blue: F⁺ Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi1
hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) glnV44 relA1 lac

NovaBlue: F⁺ proA⁺B⁺ lacI^q ZΔM15::Tn10(tet^R) endA1 hsdR17 (r_{k12}⁻m_{k12}⁺) supE44
thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac

BL21(DE3)pLysS: F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁺) gal dcm (DE3) pLysS (cam^R)

2.1.9. Mauslinien

Inzuchtstamm	Name	Referenz
	C57BL/6	Wiga
Verwendete Mauslinien	Cre-deleter	Schwenk et al. 1995
	Rosa26	Soriano et al 1999
	KerIVCreERT ²	Feil et al. 1996
	RA/EG	Constien et al. 2001

Die C57BL/6 Inzuchttiere dienten als Zygotenspender zur Herstellung transgener Linien. Zur Kontrolle der Tumorinduktion wurden die neuen transgenen Mauslinien mit Cre-deleter Mäusen verpaart. Diese Tiere tragen das Gen der Cre-Rekombinase in der Keimbahn auf dem X-Chromosom und sind in der Lage, Rekombination in allen Geweben zu vermitteln. Die Rosa26-Tiere, ebenso wie die RA/EG-Mäuse, tragen eine von loxP-Stellen flankierte Stopkassette vor einem Reporter gen. Erfolgte Rekombination führte zur Expression der Reporterproteine. Die KerIVCreERT²-Mäuse dienten als Kontrolltiere zur neu entwickelten Induktor-Linie. Im Gegensatz zu den neuen transgenen Tieren, die die Cre-Rekombinase nach Aktivierung exklusiv in tyrosinase-positiven Zellen der Haut bzw. im Pigmentepithel der Retina exprimierten, ist das Cre-Protein in den KerIVCreERT²-Mäusen nach Induktion in der Epidermis und in keratin-positiven Zellen der Trachea exprimiert.

2.1.10. Antikörper

Antikörper	aus	Spezifität	Isotyp	Herkunft
α-Cre	Kaninchen	polyclonal	IgG	Novagen
α-TAg	Kaninchen	polyclonal	IgG	Dr. R. Ganss
α- Kaninchen -POD	Ziege	monoclonal	IgG (H+L)	Novagen
α-His ₅	Maus	monoclonal	IgG1	Qiagen
α-CD4-PE	Ratte	polyclonal	IgG _{2a}	Pharmingen
α-CD8-PE	Ratte	polyclonal	IgG _{2a}	Pharmingen
α-CD11c-PE	Hamster	polyclonal	IgG1	Pharmingen
α-CD19-PE	Ratte	polyclonal	IgG _{2a}	Pharmingen
α-CD31-PE	Ratte	polyclonal	IgG _{2a}	Pharmingen
α- Kaninchen-Alexa 488	Ziege	monoclonal	IgG(H+L)	Molecular Probes

Anti-Cre und anti-His₅ werden als Primärantikörper im Western Blot eingesetzt. Zur Detektion der gebundenen Primärantikörper wird ein α-Kaninchen-Antikörper, der Peroxidase (= POD) markiert ist, verwendet. Die restlichen Antikörper, außer Alexa488, der FITC-gekoppelt ist, sind PE-markiert.

2.1.11. PCR-Primer

Primer zum Erstellen der DNA-Konstrukte :

5' floxstop (72-mer)	5'-AAGCTTGAATTCTCGCGAATAAATTTCGTATA GCATACATTATACGAAGTTATGGCCTGAACTGC CAGCTGGC-3'
3' floxstop (84-mer)	5'-CTGCAGAATTCTCGCGATAAATTTCGTATAAT GTATGCTATACGAAGTTATTAACCTTACCTGCATA AAAAACCTCCACACCTCCC-3'
5' floxTAginvers (72-mer)	5'-GAATTCGTCGACGGTACCATAAATTTCGTATA GCATACATTATACGAAGTTATCGCCTCGGCCTCTGAGCT AT-3'
3' floxTAginvers (78-mer)	5'-GAATTCCTCGAGTCTAGAATAAATTTCGTATAG CATACATTATACGAAGTTATAGACATGATAAGATACATTG ATGAGT-3'

Primer zum Nachweis von Rekombination der loxP-Stellen im Mausgenom :

5' floxstop-del-TAg (19-mer)	5'-GTTCGACGGTATCGATAAGC-3'
3' floxstop-del-TAg (19-mer)	5'-CAGAAGCCTCCAAAGTCAG-3'

Folgende Primer wurden zur Herstellung der rekombinanten PTD-Cre Konstrukte benutzt :

5' NLS-Cre (57-mer)	5'-TAAATTGGACATGGTGGGAATTCGCGACCTT GCGCTTCTTCTTAGGGCTAGCCATATG-3'
3' Cre-KFGF (72-mer)	5'-TTTGCTAGCTCTAGATGCTAGTACCAGTCGT ACTACTCGCAGTCGTCGCCTCGAGATCGCCATCTTCCAG- 3'
3' Cre-Arg8x (60-mer)	5'-TTTGCTAGCTCTAGATGCTGCTGCTGCTGCT GCTGCTGCCTCGAGATCGCCATCTTCCAG-3'
3' Cre-itat (69-mer)	5'-TTTGCTAGCTCTAGATGCTCTTGCCTGTCTT GCTGCTGCTCTTGCGTACACGAGATCGCCAT CTTCCAG-3'
5' tatNLS-Cre (75-mer)	5'-TTTGCTAGCTACGGAAGGAAGAAGAGAAGA CAAAGGAGAAGACCTAAGAAGAAGAGAAAGGT CGCGAATTCCACC-3'
5' Arg8xNLS-Cre (66-mer)	5'-TTTGCTAGCAGAAGAAGAAGGAGGAGGAGG AGACCTAAGAAGAAGAGAAAGGTCGCGAATTC CACC-3'
5' itatNLS-Cre (75-mer)	5'-TTTGCTAGCTACGCAAGAGCAGCAGCAAGA CAGGCAAGAGCACCTAAGAAGAAGAGAAAGGT CGCGAATTCCACC-3'
3' Cre (33-mer)	5'-TTTGCTAGCTCTAGAGAGATCGCCATCTTCC AG-3'

2.1.12. Plasmide

Übersicht über die zur Herstellung der transgenen Konstrukte verwendeten Ausgangsplasmide aus der Plasmidbank der Abteilung für Molekulare Immunologie.

Name	Resistenz/en	Größe	Herkunft
pAT	Amp ^R /Kan ^R	3851bp	Novagen
pBSSK II (+)	Amp ^R	2958bp	MBI
pCreERT ²	Amp ^R	6090bp	Dr. K. Khazaie
pET28a (+)	Amp ^R /Kan ^R	5369bp	Novagen
pGK-Cre	Amp ^R	4848bp	Dr. T. Bucher
pfsT	Amp ^R	6678bp	Dr. T. Sacher
pHsTyr4	Amp ^R	14100bp	Dr. R. Ganss
pKCR	Amp ^R	4736bp	G. Küblbeck
pKerIV	Amp ^R	5360bp	G. Küblbeck
pL31	Amp ^R	4200bp	G. Küblbeck
pUbiquitinC 4b	Amp ^R	4260bp	Prof. Dr. P. Angel

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1. Glycerindauerkulturen von *E.coli*

Die Bakterienstämme werden auf (Selektiv-) Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Zur langfristigen Lagerung werden 800µl einer über Nacht-Bakterienflüssigkultur mit 200µl Glycerin (entsprechend 20%) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Entnahme wird mit einem sterilen Skalpell ein kleines Stückchen der gefrorenen Bakterien abgeschabt und zum Animpfen einer Flüssigkultur verwendet.

2.2.1.2. Präparation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Mit einer Einzelkolonie DH1 Zellen wird eine über Nacht-Kultur in 50ml LB Medium herangezogen. Am folgenden Morgen inokuliert man 400ml frisches LB Medium mit 10ml der über Nacht-Kultur. Die Bakterien lässt man im Schüttelinkubator ca. 3h bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (= OD_{600nm}) von 0,6-0,8 wachsen, aliquotiert sie in 50ml Falcon-Röhrchen und zentrifugiert sie ab (2500rpm; 10min; 4°C). Die folgenden Arbeiten werden steril und bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Nach Resuspension der Zentrifugate in je 16,5ml eiskaltem, frisch hergestelltem Rf 1 werden die Suspensionen für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend werden sie erneut abzentrifugiert (2500rpm; 10min; 4°C), in je 4ml Rf 2 resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Die Fraktionen werden vereint und mit gekühlten Pipettenspitzen in 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten Zellen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.3. Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen

Ein Aliquot (50µl) eingefrorener, kompetenter Zellen wird für fünf Minuten auf Eis aufgetaut, mit einem Mikroliter (1µl) eines Ligationsansatzes gemischt und fünf weitere Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und nach weiterer, zweiminütiger Inkubation bei 4°C auf einer (Selektiv-) Agarplatte ausplattiert.

2.2.1.4. DNA-Minipräparation durch alkalische Lyse

Ein 14ml Zellkulturröhrchen wird mit fünf Millilitern (5ml) Bakterienmedium gefüllt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Die Kultur wächst über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C. Zur Minipräparation zentrifugiert man einen Milliliter der Kultur ab (5min; 13000rpm) und resuspendiert das Zentrifugat in 150µl Prälyse-Puffer. Durch Zugabe von 300µl Lyse-Puffer und anschließender fünfminütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen lysiert. Die weitere Zugabe von 250µl KAc/HCOOH-Puffer führt zur Neutralisierung der Lösung, wodurch Proteine und genomische DNA präzipitieren. Nach 15min Inkubation auf Eis wird die Probe abzentrifugiert (5min; 13000rpm) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zugabe von 400µl Isopropanol führt zur Präzipitation der DNA durch Entzug der Hydrathülle. Die Plasmid-DNA wird abzentrifugiert (5min; 13000rpm), das Zentrifugat an der Luft getrocknet und in 30µl TE gelöst.

2.2.1.5. DNA-Midipräparation durch alkalische Lyse

Benötigt man eine größere Menge Plasmid-DNA, so wird eine Midipräparation von Bakterien durchgeführt. Dazu werden 500ml Selektivmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wird abzentrifugiert (15min; 3000rpm; 4°C) und das Bakterienzentrifugat in 4,5ml Prälyse-Puffer in 50ml Falconröhrchen resuspendiert. Durch Zugabe von 10ml Lyse-Puffer werden die Bakterien lysiert (5min; 4°C). Zum Neutralisieren der Lösung pipettiert man 7,5ml KAc/HCOOH-Puffer hinzu und präzipitiert unter mehrmaligem Schwenken Proteine und genomische DNA.

Nach 15min Inkubation auf Eis wird die Probe abzentrifugiert (5min; 6000rpm) und der Überstand durch einen locker mit Glaswolle gestopften Trichter filtriert. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt (5min; Raumtemperatur), abzentrifugiert (5min; 6000rpm) und in 2ml TE resuspendiert. Weitere Verunreinigungen werden durch Umfällung mit 2ml einer 4M LiCl-Lösung präzipitiert, und der Überstand nach Zentrifugation (5min; 6000rpm) in 20ml eiskaltem 100%igem Ethanol gefällt (15min; -20°C). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5min; 6000rpm) wird das Zentrifugat mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 1ml TE aufgenommen. In einem 1,5ml Reaktionsgefäß erfolgt nach Zufügen von 5µl RNase (10mg/ml) der Verdau noch vorhandener RNA (30min; 37°C). Durch weitere Zugabe von 8µl einer 4M Natriumacetat-Lösung (pH 5,6) pro 100µl DNA-Lösung wird die Plasmid-DNA ausgefällt, dreimal mit Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform extrahiert. Anschließend fällt man die DNA mit Isopropanol und wäscht das Zentrifugat mit 70% Ethanol. Das getrocknete Zentrifugat wird abschließend in 0,1-1ml TE aufgenommen.

2.2.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Spektroskopische Konzentrationsbestimmung: Die Basen der DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260nm, das zu Konzentrationsbestimmung von nukleinsäurehaltigen Lösungen benutzt werden kann. Das Spektrum einer 1:200 Verdünnung wird im Bereich 300-220nm gegen H₂O gemessen. Die Extinktion sollte zwischen 0,1-1,5 liegen, da in diesem Bereich Extinktion und Nukleinsäurekonzentration proportional zueinander sind.

Zur Umrechnung gilt:

- 1 OD₂₆₀ = 50µg dsDNA/ml
- 1 OD₂₆₀ = 40µg ssDNA/ml
- 1 OD₂₆₀ = 33µg ssOligonukleotide/ml

Da die aromatischen Aminosäurereste in Proteinen bei 280nm absorbieren, kann eine Verunreinigung der isolierten Nukleinsäuren nach der Warburg'schen Formel $[(1,45 \times OD_{280}) - (0,74 \times OD_{260}) = \text{mg Protein/ml}]$ berechnet werden. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} einer sauberen DNA-Präparation sollte bei ca. 1,8 liegen.

Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit Markerbanden im Gel: Diese Methode liefert einen Schätzwert der DNA-Konzentration und gibt Auskunft über die Plasmid- bzw. Fragmentgröße und Nukleinsäureverunreinigungen wie RNA oder chromosomale DNA. Dazu wird eine definierte Menge Größenmarker und 5µl Proben-DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Intensitäten von Probe bzw. Referenzbande des Markers unter UV-Licht verglichen. Die 3kb-Bande dient als Anhaltspunkt, da sie 10% (entsprechend 100ng) der aufgetragenen Marker-DNA enthält.

2.2.1.7. Phenol/Chloroform-Extraktion nukleinsäurehaltiger Lösungen

Die Methode dient der Abtrennung von verunreinigenden Proteinen aus einer nukleinsäurehaltigen Lösung. Zur DNA-Lösung wird ein Volumen Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol (25: 24: 1) gegeben und gemischt, bis sich eine Emulsion bildet. Die Emulsion wird zentrifugiert (13000rpm; 2min; Raumtemperatur) und die obere wässrige Phase ohne das weiße Proteinpräzipitat in der Interphase in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Aus der Lösung extrahiert man, wie oben beschrieben, mit 1Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24: 1) die von Proteinen gereinigte DNA und nimmt sie in TE- Puffer auf.

2.2.1.8. DNA-Präzipitation

Ethanol-fällung: Zu nukleinsäurehaltigen Lösungen werden $\frac{1}{10}$ Volumen 3M NaAc-Lösung (pH 6,0) und zwei Volumen Ethanol gegeben. Nach gründlichem Mischen inkubiert man die Lösung für 15min auf Eis und zentrifugiert sie anschließend ab (13000rpm; 10min). Das erhaltene Zentrifugat wird mit 70% Ethanol gewaschen (2min; Raumtemperatur), erneut abzentrifugiert (13000rpm; 3min), getrocknet (37°C; 5min) und in TE auf-genommen.

Isopropanol-fällung: Diese Fällung erfolgt wie in der Ethanol-fällung beschrieben. Nach Zugabe von 3M NaAc (pH 6,0) werden 0,7Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Präzipitation, Waschen und Trocknen der DNA erfolgen analog zur Ethanol-fällung.

2.2.1.9. Restriktionsverdau

Für analytische Zwecke werden 1µg Plasmid-DNA mit 1-5U (= engl. „Einheiten“) Restriktionsenzym in einem Volumen von 30µl für mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Präparative Verdaue erfolgen in Volumina von 50µl mit ca. 10µg DNA und 10U Restriktionsenzym, wobei die Inkubationszeit zwischen drei Stunden bis über Nacht bei 37°C liegt (bzw. je nach Restriktionsenzym u. U. bei 58°C).

Gemäß der Aktivitäten der Enzyme werden die Restriktionsverdaue in verschiedenen Puffertypen (O⁺, B⁺, R⁺, G⁺, Y⁺ sowie spezielle Puffer für einzelne Restriktionsenzyme) durchgeführt. Der Verdau genomischer DNA erfolgt mit zusätzlichen 5mM Spermidin im Ansatz über Nacht.

2.2.1.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch Säulenzentrifugation (Qiaquick spin columns): Man schneidet DNA-Bande bei 366nm unter dem UV-Transilluminator aus dem Gel aus, wiegt sie und löst das Gelstück in 300µl Puffer QG pro 100µg Gel vollständig auf (56°C; 10min). Die Lösung wird anschließend auf eine Zentrifugensäule gegeben und abzentrifugiert (13000rpm; 1min). Die Säule wird mit 750µl PE gewaschen, zentrifugiert (13000rpm; 1min) und verbliebener Waschpuffer durch eine zweite Zentrifugation entfernt (13000 rpm; 1min). Das DNA-Fragment wird mit 50µl Elutionspuffer (EB) von der Säulenmatrix gelöst (5min; Raumtemperatur) und durch erneute Zentrifugation eluiert (13000rpm; 1min). Zur Kontrolle analysiert man 5µl des Fragments auf einem Agarosegel.

Durch Elektroelution: DNA, die für eine Mikroinjektion in Zygoten zur Herstellung transgener Mäuse vorgesehen ist, wird mittels Elektroelution extrahiert. Das Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande wird aus einem Agarosegel ausgeschnitten und in ein TAE-gefülltes Glasröhrchen des Obergefäßes der Elektroelutionsapparatur blasenfrei transferiert. Am unteren Ende ist das Röhrchen mit Hilfe eines Gummiringes durch ein DEAE-Papier verschlossen und durch einen Dialyseschlauch geschützt.

Das Obergefäß mit der Kathode wird auf das Untergefäß (enthält die Anode) gesetzt, beide Kammern mit TAE-Puffer gefüllt und die DNA aus dem Gel auf das DEAE-Papier transferiert (200V; 10-12min; 10-12mA pro Glasröhrchen). Das DEAE-Papier wird entnommen, für 30min bei RT getrocknet und für 20 Sekunden in 100% Ethanol geschwenkt. Nach zehnminütigem Trocknen wird das Papier für ca. 20 Sekunden in TE (pH 8,0) geschwenkt und erneut für 30min getrocknet. Nach einem zweiten Waschschrift in 100% Ethanol wird das DEAE-Papier mit dem DNA-enthaltenden Teil zurechtgeschnitten. Der DNA-enthaltene Abschnitt wird in ein 500µl Eppendorfröhrchen, in dessen Boden vorher ein Loch geschnitten wurde, gegeben und in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen gesetzt. Das Papier wird mit 30µl einer 1,5M NaCl/TE-Lösung beträufelt, beide Gefäße mit Parafilm abgedichtet und für 30min in einem 65°C Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation(13000rpm; 3min) wird der Elutionsschritt wiederholt und das Endvolumen durch Zugabe von 70µl ddH₂O verdünnt, um ein Ausfällen des Natriumchlorids bei der nachfolgenden Ethanolfällung zu verhindern. Dazu erfolgt Zugabe von 300µl eiskaltem 100%igem Ethanol für 15min bei -80°C. Nach einer Zentrifugation (13000rpm; 3min; 4°C) wird der Überstand verworfen, das Zentrifugat mit 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Danach nimmt man es in 50µl Mikroinjektions-puffer auf. Zur Kontrolle der DNA werden 5µl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach Konzentrationsbestimmung wird die Konzentration der DNA-Lösung auf 2-6ng/µl eingestellt und kann nach Sterilfiltrieren durch einen 0,22µm Porenfilter in befruchtete Mausoozyten mikroinjiziert werden.

2.2.1.11. Ligation von DNA-Enden

Bei der Ligation von zwei DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wird das Insertfragment in einem dreifachen Überschuss zu dephosphorylierter Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgt durch Zugabe von T₄-DNA-Ligase in einem speziellen Ligationspuffer für 1h bei 16°C in einem Volumen von 10µl.

2.2.1.12. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation von linearisierten Vektoren zu verhindern, wird die 5'-Phosphatgruppe an den DNA-Enden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP = engl. „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“) entfernt. In der Regel werden nach Ende des präparativen Restriktionsverdau 1-10U CIP pro 1µg DNA direkt in den Verdau pipettiert und für 30min bei 37°C inkubiert. Die vollständige Dephosphorylierung wird durch eine Kontrollligation des Vektorfragments getestet.

2.2.1.13. Auffüllen und Abdauen überhängender DNA-Enden

Überhängende 5'-Enden: Um für bestimmte Ligationen glatte Enden (= blunt ends) zu erzeugen, werden bei 5'-Überhängen die auf dem Gegenstrang fehlenden Basen aufgefüllt. Dazu pipettiert man direkt im Anschluss an präparative Verdau Deoxynukleotide (= dNTP) in einer Endkonzentration von 0,2mM/dNTP und Klenow-Polymerase (2-5U/µg DNA) dazu und inkubiert den Ansatz für 10min bei Raumtemperatur.

Überhängende 3'-Enden: Zur Herstellung von glatten Enden wird hier das überstehende 3'-Ende durch die Exonukleaseaktivität der T₄-DNA-Polymerase abgedaut. Dazu werden direkt im Anschluss an präparative Verdau 0,2mM dNTP-Mix und T₄-DNA-Polymerase (2-5U/µg DNA) hinzu pipettiert und 10min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.1.14. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

DNA-Fragmente im Bereich von 100bp bis ca. 12kb werden in Abhängigkeit ihrer Länge in Agarosegelen mit verschiedenen Konzentrationen (0,6-2%) elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu löst man Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen auf und gießt sie in eine Gelform. Zum Aussparen der Geltaschen wird ein Kamm in das flüssige Gel eingehängt. Nach Erkalten des Gels und Entfernen des Kamms wird das Gel mit den DNA-Proben beladen. Die DNA-Proben werden zuvor mit Ladepuffer gemischt, der ein Absacken der DNA in die Taschen gewährleistet, in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei einer Spannung von 20-110 Volt durchgeführt.

Für präparative Gele erfolgt die Elektrophorese mit max. 7V/cm Gellänge. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 15min in eine Schale mit Ethidiumbromid-Lösung (1xTAE; 0,5µg/ml ETBr) gelegt. Ethidiumbromid interkaliert in DNA, wodurch die DNA-Banden auf dem UV-Transilluminator bei 366nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

2.2.1.15. Herstellung nicht-radioaktiver Digoxigenin (DIG) DNA-Sonden

Zur Herstellung einer DIG-markierten Sonde für die Hybridisierung im Southern Blot wird der DIG-labeling Mix (Boehringer Mannheim) verwendet. Dazu denaturiert man ca. 50-500ng aufgereinigtes DNA-Fragment in 14µl TE für 10min bei 95°C, zentrifugiert bei 13000rpm für zehn Sekunden und kühlt das Gemisch anschließend auf Eis. Danach werden 2µl DLB, 1µl Random-Hexamere und 2µl dNTP-Markierungsgemisch hinzu pipettiert, gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1µl Klenow-Enzym gestartet. Die Markierungsreaktion erfolgt für 3h bis über Nacht bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch eine anschließende Gelfiltration über eine P60 Sepharosesäule entfernt und die DIG-markierte Sonde mit 400µl einer 50mM NaCl /TE Lösung eluiert.

2.2.1.16. Transfer von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Nach dem Verdau der genomischen DNA und der gelelektrophoretischen Auftrennung wird das Agarosegel auf einem Schüttelinkubator zur Denaturierung der DNA für 30min in Denaturierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgt eine Schüttelinkubation von zweimal 15min in Neutralisierungslösung. In einem Kapillarttransfer wird die DNA über Nacht aus dem Gel auf Nitrozellulosefilter übertragen. Dazu erfolgt der Aufbau der Transferapparatur folgendermaßen und unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen: auf einer Plastikwanne, die mit 20xSSC-Transferpuffer befüllt wird, ist eine Glasplatte befestigt. Darauf werden zuerst zwei Lagen Whatman-Papier, die in den Transferpuffer eintauchen, gelegt. Auf diese Papiere legt man das DNA-Gel, die mit TAE-Puffer vorbenetzte Transfermembran, 1-2 weitere Lagen Whatman-Papier und einen Stapel saugfähiger Papierhandtücher.

Die DNA wird durch den Flüssigkeitssog aus dem Reservoir in den Papierhandtuch-Stapel zum Filter gezogen und haftet an ihm fest. Am folgenden Tag wird der Nitrozellulosefilter für zwei Stunden im Vakuumofen bei 80°C gebacken und die DNA dadurch auf dem Trägermaterial fixiert.

2.2.1.17. Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden

Der Filter mit der DNA wird bei 65°C in einem Schüttelwasserbad mindestens 1h in 100ml Prähybridisierungslösung vorhybridisiert, um unspezifische Bindung der Sonde an den Filter zu minimieren. Die Prähybridisierungslösung kann 10-20x wiederverwendet und bei 4°C gelagert werden. Der Filter wird anschließend über Nacht bei 65°C im Schüttelwasserbad in 100ml Hybridisierungslösung inkubiert. Am Morgen nach der Hybridisierung wird der Nitrozellulosefilter zweimal für 15min in je 100ml vorgewärmter 65°C Waschlösung gewaschen und kann danach für die Signaldetektionsreaktion verwendet werden.

2.2.1.18. Signaldetektion nach der Sondenhybridisierung

Farbliche Detektion mit NBT/BCIP: Die Signale auf dem hybridisierten Nitrozellulosefilter werden bei RT detektiert, indem der Filter nach den Waschschritten zunächst 1min in Puffer-1 äquilibriert wird. Anschließend wird der Filter durch Schwenken in 30ml Puffer-2 (30min; Raumtemperatur) geblockt, um später unspezifisches Binden des Antikörpers zu verhindern. Puffer-2 kann 10-20x wiederverwendet und bei -20°C gelagert werden. Der Filter wird nach dem Blocken kurz in Puffer-1 gewaschen und für 30min in 10ml Puffer-1 mit 150mU/ml alkalische-Phosphatase gekoppeltem anti-DIG-Antikörper (α -DIG-AP) inkubiert. Nicht gebundene Antikörper entfernt man durch zweimaliges Waschen für 10min mit Puffer-1. Zur Farbentwicklung wird der Filter in Puffer-3 überführt und unter Lichtausschluß in die Färbelösung gelegt (20ml filtrierter Puffer-3 mit 90 μ l NBT- und 70 μ l BCIP-Lösung). Die blau-violetten Signale entwickeln sich innerhalb von 1-15 Stunden. Als Referenz dient ein DIG-markierter DNA-Größenmarker.

2.2.1.19. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (Western Blot)

Um rekombinant hergestellte Proteine bezüglich der Expression oder ihrer Molekülmasse bewerten zu können, findet der Western Blot Anwendung. Dazu werden jeweils 100µl der entsprechenden Proteinproben für fünf Minuten mit 100µl 2xSDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) bei 95°C auf dem Heizblock denaturiert. Parallel dazu wird ein Polyacrylamid-Gel gegossen. Dazu setzt man zuerst die Gelgießapparatur zusammen. Das Polyacrylamid-Gel besteht aus zwei Bereichen. Im unteren Bereich befindet sich das Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgt, und im oberen Bereich ist ein Sammelgel. Im Rahmen dieser Promotion wird ein 10%iges Trenngel verwendet; deshalb beziehen sich die folgenden Anweisungen entsprechend auf die Herstellung eines 10%igen Gels. Zuerst wird das Trenngel durch Zusammenpipettieren von 7,5ml Trenngelpuffer, 12,5ml 30%iger Acrylamidlösung, 10ml ddH₂O, 45µl TEMED und 45µl Ammoniumperoxidisulfat (= APS) hergestellt. Anschließend befüllt man mit diesem Gemisch die Gelgießapparatur, überschichtet es mit Isopropanol und lässt das Trenngel für ca. eine Stunde unter Luftabschluss polymerisieren. Danach mischt man das Sammelgel (2,5ml Sammelgelpuffer; 1,8ml 30%ige Acrylamidlösung; 6,2ml ddH₂O; 30µl TEMED und 30µl APS) und überschichtet damit das Trenngel. Abschließend steckt man einen Gelkamm in das noch flüssige Sammelgel, um Taschen im Gel zu erhalten, in die später die Proteinproben aufgetragen werden sollen.

Nach dem Aushärten wird das Gel mit den Glasplatten aus der Gelgießapparatur entnommen und in eine vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese wird mit SDS-Laufpuffer befüllt, sodass das Trenn- und Sammelgel in das Pufferreservoir reichen. Nach Aufbringen der Proteinproben werden die Proteine bei 70Volt und 500mA über Nacht aufgetrennt. Am folgenden Morgen entnimmt man die Gele und legt sie in eine Transferkammer. Dabei werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um sie später durch Antikörper- oder Coomassiefärbung detektieren zu können. Der Aufbau der Transferapparatur erfolgt folgendermaßen: Die erste Lage besteht aus drei in konzentriertem Anodenpuffer getränkten Whatmann-Papieren. Danach folgen sechs Papierschichten, die in Anodenpuffer befeuchtet wurden. Darauf legt man die Nitrozellulosemembran und das Acrylamidgel.

Um einen Transfer zu ermöglichen, muss die Nitrozellulosemembran vorher in Methanol und anschließend in ddH₂O angefeuchtet werden. Den Abschluss bilden drei Whatmann-Papiere, die vorher in Kathodenpuffer inkubiert wurden. Der Transfer dauert bei 50Volt und 180mA ca. 1,5h. Nach Ablauf des Transfers entnimmt man die Membran und führt i. d. R. eine Antikörperfärbung des Blots durch. Dazu wird die Membran zuerst in Blocklösung (5% Milchpulver in PBS) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Danach gibt man einen proteinspezifischen Primärantikörper hinzu (1:10000 in Blocklösung verdünnt) und inkubiert den Blot eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttelbrett. Nach dreimaligen Waschen in PBS/Tween-Lösung (je 10min; Raumtemperatur) wird ein peroxidase-markierter Sekundärantikörper hinzugegeben (1:5000 in Blocklösung verdünnt). Nachdem eine weitere Stunde inkubiert und ein letzter Waschschrift in Analogie zum ersten Waschen durchgeführt wurde, erfolgt die Detektion des Antikörpersignals. Dazu mischt man die Reagenzien des Chemolumineszenz-Sets (= ECL-Kit) im Verhältnis 1:1 und inkubiert mit dieser Lösung die Nitrozellulosemembran für ca. 1min bei Raumtemperatur. Abschließend erfolgt die Detektion des Signal unter Verwendung des Lumi-Imager-Systems.

2.2.1.20. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Sowohl für das Klonieren von DNA-Konstrukten als auch für Analyse und Expression von Transgenen im Mausgenom wird die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = engl. „polymerase chain reaction“) eingesetzt. Diese Methode erlaubt die spezifische Amplifikation einer definierten Region von DNA-Molekülen. Die PCR verläuft prinzipiell in drei Schritten, die in Zyklen immer wieder durchlaufen werden. Im ersten Schritt wird ein nachzu-weisendes Stück DNA (= „template“) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Durch Abkühlung auf eine Temperatur zwischen 45°C und 70°C wird kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden (= „Primer“) die sequenzspezifische Hybridisierung an die template-DNA ermöglicht (= „Annealing“). Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung der 3´-Enden der angelagerten Primer entlang der template-DNA mit Hilfe der Taq-Polymerase (= „Elongation“). Da die Primer so gewählt werden, dass die neu entstandenen DNA-Stränge beider template-Stränge zueinander teilweise komplementär sind, erhält man durch den zyklischen Ablauf der drei Schritte eine Verdopplung der DNA-Moleküle pro Zyklus.

Übersicht über ein Standard-PCR-Programm:

- | | | |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------|
| 1. Schritt (Denaturierung) : | 95°C | 5min |
| 2. Schritt (Denaturierung) : | 95°C | 30sec bis 1min |
| 3. Schritt (Annealing) : | variiert | variiert |
| 4. Schritt (Elongation) : | 72°C | variiert |
| 5. zurück zu Schritt 2 : | Anzahl der Zyklen variiert | |
| 6. Schritt (Auffüllen) : | 72°C | 10min |
| 7. Schritt : | 4°C | unbegrenzt |

Verwendete Reaktions-Bedingungen der einzelnen Primer-Paare:

Primerpaar (5' / 3' Primer)	Annealing	Elongation	Zyklen	Produktgröße (bp)
Präparative PCR				
Floxstop5' / Floxstop3'	50°C 30 sec	40sec	35x	949bp
5'NLS-Cre/3'Cre-KFGF 5'NLS-Cre/3'Cre-Arg8x 5'NLS-Cre/3'Cre-itat 5'NLS-Cre/3'Cre 5'tat-NLS/3'Cre 5'Arg8x-NLS/3'Cre 5'itat-NLS/3'Cre	62°C bzw. 68°C / 1min	je 1min	je 44x	ca. 1140bp
Analytische PCR				
5'TfT / 3'TAg	60°C / 30sec	30sec	34x	unrekombiniert : 1456bp rekombiniert : 484bp
5' UfT / 3'TAg	59°C / 30sec	40sec	40x	unrekombiniert : 1330bp rekombiniert : 474bp

2.2.2. Zellbiologische Arbeitstechniken

2.2.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche werden abtrypsiniert, der Trypsinverdau mit FCS-haltigem Medium abgestopt und die Zellen abzentrifugiert (10min; 1500rpm; 4°C). Das Zellzentrifugat resuspendiert man in 400µl gekühltem Medium und aliquotiert es in vorgekühlte Kryoröhrchen. Anschließend werden die Röhrchen sofort bei -80°C eingefroren. Nach einem Tag werden die Zellen zur langfristigen Lagerung in Flüssigstickstoff (-196°C) transferiert. Zum Auftauen entnimmt man die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff, wärmt sie an (2min; Raumtemperatur) und taut sie zügig in einem Wasserbad bei 37°C auf. Die Zellen werden in frisches Medium überführt, abzentrifugiert (1500rpm; 10min), erneut in Medium resuspendiert und ausplattiert.

2.2.2.2. Quantitativer Nachweis von Rekombination im Durchflusszytometer

Zur Erfassung der Rekombination wird der enzymatische Umsatz von Fluorescein-di-β-D-Galaktopyranosid (= FDG) zu Fluorescein durch β-Galaktosidase gemessen. Das FDG-Substrat ist ein farbloser Zucker. Nach Umsetzung entsteht ein grüner Fluoreszenz-farbstoff, der im Durchflusszytometer quantitativ erfasst werden kann. Um erfolgte Rekombination in vitro und in vivo zu erfassen, werden die Zellen in Eppendorf-röhrchen abzentrifugiert und in 50µl FACS-Puffer (ohne Propidiumiodid) aufgenommen. Nach einer zehnmütigen Inkubation im Wasserbad bei 37°C werden 50µl der Fluorescein-di-β-D-Galaktopyranosid-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird eine weitere Minute bei 37°C erwärmt und die Substratumsetzung durch Zugabe von 900µl eiskaltem FACS-Puffer gestoppt. Danach werden die einzelnen Proben in 5ml-Röhrchen überführt, bei 4°C gesammelt und abschließend im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.3. Methoden zur Arbeit mit Mäusen

2.2.3.1. Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen und Leber

Die zur Southern Blot-Analyse benötigte genomische DNA wird aus einem Stückchen Schwanzspitze von Mäusen isoliert. Das Schwanzgewebe wird in 700µl Gewebepuffer aufgenommen und mit einer Schere zerkleinert. Danach werden 10µl Proteinase K-Lösung (10mg/ml) hinzupipettiert und über Nacht bei 56°C inkubiert. Am folgenden Tag wird die Probe abzentrifugiert (1500rpm; 5min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 400µl Isopropanol und mehrmaligem Schwenken wird die genomische DNA als Flocke ausgefällt. Sie wird mit einer Glaskapillare aufgenommen und in 70% Ethanol bzw. 100% Ethanol gewaschen. Die an der Glaskapillare anhaftende DNA wird an der Luft für fünf Minuten getrocknet und das Kapillarenende in ein Reaktionsgefäß abgebrochen. Anschließend gibt man TE-Puffer hinzu und bringt die DNA durch Inkubation auf einem Schüttelinkubator bei 65°C wieder in Lösung.

2.2.3.2. Perfussion einer Maus

Die zu perfundierende Maus erhält eine Lethalnarkose durch intraperitoneale Injektion (= ip.) mit Avertin (20µl pro Gramm Körpergewicht). Anschließend öffnet man sie mit einem durchgehenden Schnitt von der Schwanzwurzel bis zum Kehlkopf. Nach Entfernung der Rippen und des Brustkorbs sticht man eine Kanüle in die linke Herzvorkammer ein und schaltet die Perfussionspumpe bei einer Pumpleistung von 15ml/min an. Bei korrekter Durchführung sieht man ein Anschwellen und Verfärben von Leber und Lunge. Um eine Schädigung der Gewebestrukturen zu vermeiden, wird die hintere Hohlvene (= Vena cava) durchtrennt. Dadurch kann das Blut austreten und alle Organe werden ausreichend perfundiert.

2.2.3.3. Herstellung einer Milz- oder Lymphknotenzellsuspension

Die Organe werden entnommen und anschließend zerkleinert. Im Fall einer Milzszellsuspension geschieht dies durch Passieren des Organs durch ein Metallsieb. Eine Lymphknotenzellsuspension erhält man, indem man die Lymphknoten auf einen Objektträger platziert und anschließend mit einem zweiten Objektträger zerreibt.

Die erhaltenen Suspensionen werden einmal mit eiskaltem DPBS gewaschen, zentrifugiert (2000rpm; 10min) und abschließend in entsprechenden Puffern oder Medien aufgenommen.

2.2.3.4. Herstellung einer Leberzellsuspension

Die Maus wird durch eine ip.-Injektion mit Avertin in eine Lethalnarkose versetzt. Anschließend erfolgt eine Perfussion des Tieres mit einer auf 37°C vorgewärmten Collagenase-Lösung für 20 Sekunden. Unter einer Sterilbank entnimmt man die Leber, entfernt die Gallenblase und zerkleinert das Organ. Die Fragmente werden in einem Erlenmeyerkolben mit 30ml einer GBBS/Collagenase-Lösung für 30 Minuten bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Letzte größere Organteile werden durch ein Metallsieb passiert und durch einen 70µm-Filter abfiltriert. Nach einer abschließenden Zentrifugation (1500rpm; 10min; 37°C) wird das Zentrifugat in Puffer aufgenommen.

2.2.3.5. Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL)

Zur Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (= PBL) setzt man eine Maus unter eine Rotlicht-Wärmelampe. Durch die Erwärmung des Tieres tritt die Schwanzvene deutlich sichtbar hervor und kann mit einem Skalpell angeritzt werden. Von dem austretenden Blut werden zwei bis drei Tropfen in einem Eppendorfröhrchen mit Heparinpuffer (400µl) aufgefangen. Die Abtrennung der Lymphozyten von den Erythrozyten erfolgt durch Gradientenzentrifugation. Dazu pipettiert man Ficoll-Lösung in ein Falconröhrchen und überschichtet sie anschließend mit dem entnommenen Blut. Danach erfolgt ein Zentrifugationsschritt (30min; 2000rpm) und die Lymphozyten können abschließend aus der Interphase isoliert werden.

2.2.3.6. Aufbau einer Mikroinjektionsanlage

Ein inverses Stereomikroskop mit einer 5-200fachen Vergrößerung wird mit zwei Mikromanipulatoren bestückt. Mit ihnen werden die Injektions- und Haltekapillare gesteuert. Die Kapillare sind durch mit Paraffinöl gefüllte Schläuche mit einem Paraffinöl-Reservoir verbunden.

Über Rändelschrauben und Kolben an den Enden der Schläuche kann Sog oder Druck auf die Kapillare ausgeübt werden. Dadurch kann man einzelne Oozyten mittels leichtem Unterdruck an der Haltekapillare fixieren. Der Objektisch ist mit einem Einsatz für eine Petrischale mit einem Durchmesser von 6cm ausgestattet.

2.2.3.7. Herstellung von Injektions- und Haltekapillaren

Injektionsnadeln: Die Glaskapillaren werden in einen Mikropipetten-Ausziehgerät eingespannt und nach Erhitzen ausgezogen. Die Rohlinge werden an der Spitze gebrochen. Ihr Innendurchmesser beträgt dadurch ca. 15µm. Anschließend werden sie in einem Winkel von 50° geschliffen. Die Spitze der Nadel wird zusätzlich um 30° abgebogen.

Haltenadeln: Die Haltenadeln werden ebenfalls mit einem Mikropipetten-Ausziehgerät gezogen. Die Nadeln werden bei einem Innendurchmesser von 90-100µm gebrochen und die Spitze auf einen Innendurchmesser von 15-20µm zusammenschmolzen.

2.2.3.8. Präparation von Zygoten aus trächtigen Mäusen

Damit eine genügend große Anzahl von befruchteten Eizellen zur Verfügung steht, superovuliert man die Weibchen, aus denen die Zygoten präpariert werden. Als Zygotenspender werden zehn (C57BL/6) F₁-Weibchen verwendet. Ihnen wird drei Tage vor der Präparation 5-10U Gonadotropin in 500µl PBS ip. zur Eireifung und einen Tag vor der Präparation 5-10U Chorionic-Gonadotropin in 500µl PBS ip. zum Eisprung gespritzt. Anschließend erfolgt die Verpaarung der Weibchen mit F₁-Männchen (C57BL/6). Am darauf folgenden Tag werden die Weibchen bezüglich eines Vaginalpfropfs getestet, wobei positive Weibchen mit CO₂ getötet, geöffnet und ihre Eileiter mit einem Stück Uterus entnommen werden. Dazu wird der Uterus 1cm vor dem Eileiter mit einer Pinzette gefasst, Fettgewebe und Mesometrium abgestreift und hinter der Pinzette und dem Eileiter direkt am Ovar durchtrennt. Die Eileiter werden in Blockschälchen mit M₂-Medium, das Hyaluronidase enthält (300µg/ml), transferiert.

Unter einem Binokular werden die in der Ampulle des Eileiters sichtbaren Zygoten freipräpariert, indem man mit einer Pinzette die Ampulle abklemmt und mit einer zweiten Pinzette die Ampulle aufreißt. Die Eizellen werden mit einer Glaskapillare aufgesammelt und zweimal in M_2 -Medium gewaschen. Bis zur Injektion der DNA in den Pronukleus werden sie in eine Tropfenkultur M_{16} -Medium transferiert und bei 37°C aufbewahrt.

2.2.3.9. Mikroinjektion der Transgenkassetten

Die linearisierten Transgenkassetten werden in einer Konzentration von $2\text{-}6\text{ng}/\mu\text{l}$ in den Pronukleus der Zygote injiziert. Dies erfolgt unter einer Mikroinjektionsanlage. Dabei werden mit einer Haltekapillare die zu manipulierenden Eizellen fixiert. Die Injektion der Transgenkassetten erfolgt durch Einstechen einer Injektionskapillare in den Pronukleus der Oozyten und nachfolgender Aktivierung einer Spezialinjektionspumpe. Bei korrekter Durchführung (= Injektion in den Pronukleus) kann man ein Anschwellen desselben unter dem Stereomikroskop sehen.

2.2.3.10. Zygotentransfer in scheinchwangere Ammenmäuse

Drei Tage vor der Präparation der Zygoten aus den C57Bl/6 Mäusen werden 20 NMRI-Weibchen im Alter von 10-20 Wochen zum Austragen der injizierten Zygoten mit vasktomierten Männchen verpaart. Am folgenden Morgen werden die Weibchen auf Vorhandensein eines vaginalen Pfropfs getestet und positive Weibchen bis zum Transfer der Zygoten gesondert gehalten. Zum Transfer der Zygoten werden die Ammenmäuse durch ip.-Injektion von Ketanest/Rompun narkotisiert. Der Rücken wird zwischen Rippenbogen und Beckenkamm beidseitig rasiert und die Maus auf den Bauch gelegt. Die Haut wird mit einem sagitalen Schnitt von ca. 1cm neben der Wirbelsäule unmittelbar hinter dem Rippenbogen geöffnet. Der Hautschnitt wird über den Fettkörper oberhalb des Uterus geschoben, die Bauchdecke mit einer spitzen Uhrmacher-Pinzette gefasst und mit einem Schnitt geöffnet. Der am Ovar anliegende Fettkörper wird mit einer stumpfen Pinzette gefasst und zusammen mit Ovar, Ovidukt und Uterushorn aus der Bauchhöhle disloziert. Der Fettkörper wird mit einer Arterienklemme fixiert. Anschließend werden die manipulierten Eizellen unter einem Binokular direkt in den Uterus transferiert (ca. 10 Zygoten pro Transfer).

Die Arterienklemme wird entfernt und der Uterus mit Ovar, Ovidukt und Fettkörper reponiert. Nach Vernähen der Bauchhaut wird der Hautschnitt mit einer Wundklammer geschlossen. Die Mäuse werden bis zum Aufwachen aus der Narkose unter einer Rotlichtlampe platziert, um sie so vor Unterkühlung zu schützen.

2.2.3.11. Hydrodynamische Schockinjektion in die Schwanzvene

Bei der Hydrodynamischen Schockinjektion wird einer Maus ein Flüssigkeitsvolumen entsprechend ca. 8% ihres Körpergewichtes in einer Zeitspanne von unter fünf Sekunden intravenös in die Schwanzvene injiziert. Dabei wird die Flüssigkeitsmenge des Blutkreislaufs verdoppelt und es kommt zu einem Rückstau der Flüssigkeit, die in dehnbare Organe umgeleitet wird. Dies sind primär Leber und Milz. Nach einem Anschwellen dieser Organe wird die Flüssigkeit letztlich durch das Lymphdrainagesystem aufgenommen und adsorbiert. Diese Injektionsart dient vornehmlich dazu, Plasmid-DNA oder Proteine gezielt in die Leber zu applizieren.

2.2.3.12. Aktivierung von CreERT² durch dermale Applikation von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)

Zur Induktion von CreERT² in doppeltransgenen Mäusen (KerIVCreERT²xRosa26 bzw. TyrCreERT²xRosa26) werden die Mäuse am Bauch rasiert. Anschließend trägt man eine 4-Hydroxytamoxifen-Lösung auf die rasierte Stelle auf, verteilt sie und hält die Maus solange ruhig, bis die Lösung in die Haut eingezogen ist.

2.2.3.13. Nachweis von Alanin-Aminotransferase-Aktivität (ALT) im Mausplasma

Als Nachweis einer Leberschädigung durch Tumorentstehung wird der Anstieg der Konzentration des leberspezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (= ALT bzw. GPT für Glutamat-Pyruvat-Aminotransferase) im Blut verwendet. Die Blutabnahme erfolgt an der Schwanzvene nach Erwärmung der Mäuse unter Rotlicht. Dazu wird die Vene mit einer Kanüle punktiert und das austretende Blut in ein Kapillarröhrchen mit Heparin aufgenommen. Zur Bestimmung des ALT-Gehaltes wird das Blut auf Reaktionsstreifen aufgebracht.

Der Reaktionsstreifen enthält L-Alanin, α -Ketoglutarat, Laktat-Dehydrogenase (= LDH) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid (= NADH). Der Nachweis von ALT beruht auf der Umsetzung von L-Alanin und α -Ketoglutarat zu L-Glutamin und Pyruvat. Letzteres wird durch LDH unter Oxidation von NADH zu L-Laktat reduziert. Der Verbrauch von NADH auf dem Reaktions-streifen wird im Reflovet photometrisch detektiert und korreliert mit der ALT-Konzentration im Plasma.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Expression rekombinanter Fusionsproteine in *E.coli*

Zur Proteinexpression wird eine über Nacht-Vorkultur mit protein-exprimierenden BL21(DE3)pLysS-Bakterien in LB_{Kan/Cam/Glucose}-Medium angesetzt und bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Am folgenden Morgen wird die Expressionskultur mit einer OD_{600nm} von ca. 0,02 – 0,025 angeimpft. Bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,8 erfolgt die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1mM/ml. Nach einer weiteren Inkubation von vier bis fünf Stunden werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 6000rpm für 15 Minuten geerntet und bis zur weiteren Proteinaufbereitung bei -20°C gelagert.

2.2.4.2. Aufreinigung der Fusionsproteine durch Säulenchromatographie

Um die rekombinanten Proteine aufzureinigen, werden die nach Expression erhaltenen Zellzentrifugate in Lysepuffer mit Proteaseinhibitor-Cocktail III (10 μ l pro 1ml Lysepuffer) und Lysozym (1mg pro 1ml Lysepuffer) resuspendiert und 15min auf dem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Benzonase (1:1000) und weiterer Inkubation auf dem Überkopfschüttler für 15min werden die Zellen mit Ultraschall behandelt, um für eine Totallyse zu sorgen. Dazu werden die Zellen für zwei Minuten durch Schockwellen mit 50%iger Auslastung auf Eis behandelt. Anschließend werden die Proben abzentrifugiert (6000rpm; 15min; 4°C) und der proteinhaltige Überstand mit Nickelmatrix (1ml Matrix pro 5ml Überstand) für mindestens eine Stunde bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert.

Da die Fusionsproteine zusätzlich ein Pentahistidinmotiv (= His₅-Motiv) tragen, sind sie durch Ionenwechselwirkungen in der Lage, an Ni²⁺-Ionen der Säulenmatrix zu binden. Nach erfolgreichem Binden an die Matrix wird das Gemisch auf Aufreinigungssäulen aufgebracht. Beim Durchlaufen der Lösung durch die Säule setzt sich die Matrix mit den gebundenen Proteinen ab. Danach erfolgt ein Waschschriff der Säule mit Waschpuffer (ca. 10x Säulenvolumen). Die Proteine werden abschließend mit Elutionspuffer (ca. 15ml) von der Matrix abgelöst und gesammelt.

2.2.4.3. Dialyse der Fusionsproteine nach Aufreinigung

Die nach der Aufreinigung erhaltene Proteinlösung muss vor Gebrauch dialysiert werden, um störende Pufferbestandteile zu entfernen. Dazu wird die Lösung in Dialyseschläuche mit einer Porengröße von 10kDa gefüllt und über Nacht bei 4°C in Dialysepuffer 1 inkubiert. Da die danach erhaltene Konzentration an Protein meist relativ gering ist, erfolgt eine zweite Dialyse in Glycerol-enthaltendem Puffer. Dieser bewirkt eine drastische Reduktion des Volumens der Proteinlösung im Dialyseschlauch, sodass man i. d. R. mit Proteinkonzentrationen von 50µM und mehr rechnen kann. Außerdem lassen sich die Proteine in diesem Puffer für bis zu sechs Monate ohne merklichen Verlust der enzymatischen Aktivität bei -20°C lagern. Vor der Verwendung der Proteine müssen diese um den Faktor vier mit ddH₂O und anschließend mit PBS um den Faktor 1:2,5 verdünnt werden, damit man eine isotone Lösung erhält. Bei der Verwendung der Proteine in Experimenten muß man beachten, dass es z. T. Unterschiede in der Rekombinationseffizienz zwischen verschiedenen Chargen von Präparationen gibt. Diese Effizienzunterschiede können im Bereich von +/- 15% Rekombination liegen.

2.2.4.4. Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen

Um die Endkonzentration an aufgereinigtem Protein zu ermitteln, misst man die Absorption der Lösung bei 280nm im Photometer und berechnet die Konzentration einer 1:400 Verdünnung der Proteinlösung nach folgender Gleichung:

$$\text{Absorption}_{280\text{nm}} \times 0,74 \times 400 (\text{Verdünnungsfaktor}) = \text{Konzentration in mg/ml}$$

2.2.5. Histologische Methoden

2.2.5.1. Einfrieren von Organen für Kryoschnitte

Ein Schockgefrieren von entnommenen Organen der Maus in flüssigem Stickstoff führt oft zum Zerplatzen der Organe. Daher werden die Organe zur Anfertigung von Kryoschnitten mit Hilfe von Isopentan eingefroren, was ein Zerspringen weitestgehend verhindert und morphologisch bessere Schnitte liefert. Dazu wird ein Becherglas mittlerer Größe in ein Styroporgefäß mit Flüssigstickstoff gestellt und durch ein flaches Metallgewicht am Boden gehalten. Ein zweites, kleineres Becherglas wird mit 20ml Isopentan gefüllt, das Isopentan in Flüssigstickstoff auf -30° bis -50°C abgekühlt und auf Eis gestellt. Die Organe der Maus werden entnommen und in Isopentan eingefroren (ca. 2-5min). Anschließend wird das kleine Becherglas mit den Organen in das große Becherglas gestellt und weiter abgekühlt (5-10min). Bevor das Isopentan zu frieren beginnt, werden alle Organe entnommen und direkt in flüssigen Stickstoff transferiert. Die Lagerung der Organe erfolgt im Tiefkühlschrank bei -80°C . Weiche Organe wie Pankreas, Thymus und Lymphknoten werden nicht direkt in Isopentan eingefroren, sondern zuvor in kleinen Plastikschälchen in 200-500 μl Einfriermedium (= OCT) eingebettet. Die Plastikschalen werden nach dem Einfrieren kurz angetaut, sodass die OCT-Blöcke entnommen und ohne Schale bei -80°C gelagert werden können.

2.2.5.2. Einfrieren von Haut

Um Haut einzufrieren, werden die Mäuse getötet und auf einem Präparationsbrett aufgespannt. Nachdem man die einzufrierende Hautstelle rasiert hat, wird ca. ein Quadratzentimeter Hautgewebe herausgeschnitten. Damit sich das Gewebe beim Einbetten in OCT nicht zusammenrollt, wird es mit vier dünnen Kanülen auf einem Stück Kork aufgespannt und in flüssigem Stickstoff kurz tiefgefroren. Danach entfernt man möglichst schnell die Kanülen, bettet die Haut in OCT ein und transferiert das Plastikschälchen mit dem Gewebe sofort wieder in flüssigen Stickstoff.

2.2.5.3. Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Von den eingefrorenen Organen werden Kryoschnitte (5-15µm Dicke) angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte werden 30min bei Raumtemperatur luftgetrocknet, für 10min fixiert (entweder in MeOH oder in Fixierlösung) und erneut 10min luftgetrocknet. Die Schnitte können danach sofort gefärbt oder für einige Monate bei -20°C gelagert werden. Eingefrorene Schnitte lässt man 5min antauen und refixiert sie für 10min in MeOH oder Fixierlösung. Danach erfolgt zweimaliges Waschen in PBS (je 5min; Raumtemperatur) und einmaliges Permeabilisieren der Schnitte in PBS-Tween (10min; 0,01% Tween; Raumtemperatur). Danach werden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in PBS inkubiert und, um unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 5% Schweineserum in PBS geblockt. Der Primärantikörper (1:3000 verdünnt) wird auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wird ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Schnitte werden für 1h mit dem Zweitantikörper (1:500 in PBS) inkubiert, dreimal gewaschen, (evtl. mit DAB-Substrat behandelt, falls ein biotinylierter Zweitantikörper verwendet wird) und abschließend mit Acrytol beschichtet und eingedeckelt.

2.2.5.4. Immunhistochemische Färbung von Zellen

Zum intrazellulären Nachweis translozierter PTD-Cre-Rekombinase in Zellen werden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ~80% in Zellkulturflaschen gezüchtet und geerntet. Danach erfolgt Inkubation mit PTD-Cre Proteinen und anschließendes dreimaliges Waschen der Zellen mit DPBS, um anhaftende Proteine zu entfernen. Daraufhin werden die Zellen auf Objektträgern ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgt Fixierung der Zellen mit -20°C kaltem Methanol, gefolgt von dreimaligem Waschen mit eiskaltem DPBS. Im nächsten Schritt werden die Zellen für 30min mit Blocklösung (PBS; 1% Milchpulver) auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen mit einem polyklonalen α -Cre-Primärantikörper (1:1000; PBS; 1% Milchpulver) für 90min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach drei darauf folgenden Waschschrritten mit DPBS werden die Zellen mit einem α -Kaninchen-Alexa488 FITC-markierten Sekundärantikörper behandelt (1:200; PBS; 1% Milchpulver; 60min; Raumtemperatur). Nach einem letzten Waschschrritt mit DPBS werden die Objektträger mit „Vectashield Solution“ (mit DAPI) beschichtet und anschließend gedeckelt. Die Auswertung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.2.5.5. Nachweis von β -Galaktosidase-Aktivität in Reporter-mäusen (Rosa26)

Um die Aktivität eines Reportergens zu detektieren, werden Kryoschnitte der Organe von Rosa26-Reporter-mäusen bezüglich Umsetzung eines farblosen Substrats zu einem blauen Farbstoff getestet. Dazu werden die Kryoschnitte mit Fixierlösung nachfixiert und zweimal gewaschen (PBS; 2mM MgCl₂; 5min; Raumtemperatur). Anschließend erfolgt die Inkubation über Nacht bei 37°C in X-Gal-Reaktionslösung. Am nächsten Tag werden die Schnitte erneut gewaschen (PBS; 2mM MgCl₂; 5min; Raumtemperatur), fünf Minuten mit ddH₂O gespült und für eine Minute mit Neutralrot gegengefärbt. Im Anschluss werden die Schnitte dreimal mit ddH₂O gewaschen, jeweils mit 70% und 100% EtOH für je fünf Minuten dehydriert und nach Entwässerung mit Xylol und Übersichten mit Acrytol eingedeckelt.

2.2.5.6. Herstellung von Paraffin-Schnitten und anschließender HE-Färbung

Alle Paraffinschnitte mit nachfolgender Hämalaun-Eosin-Färbung (= HE-Färbung) werden in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie von Prof. Gröne am DKFZ angefertigt. Direkt nach der Organentnahme werden die Organe mit 4% Formalin in PBS fixiert. Nach dem Einbetten in Paraffin werden 5 μ m-dicke Schnitte angefertigt, für zweimal 10 Minuten mit Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe (je 2 Minuten: 2x100%; 2x96%; 1x80%; 1x70%; 1xVE-H₂O) entwässert. Die HE-Färbung ist eine Doppelfärbung mit Hämalaun (H) und Eosin (E). Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff, der allgemein negativ geladene Strukturen (Nuklei) blau anfärbt. Eosin dagegen führt zu einer rötlichen Gegenfärbung des Plasmas und Bindegewebes. Die Schnitte werden 5min in Hämalaun inkubiert, anschließend weitere 5min mit Leitungswasser gebläut und dann für 15min mit Anilinblau-Eosin angefärbt.

Nach zweimaligem Spülen mit ddH₂O (für je 30sec) und Entwässerung der Schnitte mit 96% Ethanol (2x2min), 100% Ethanol (2x2min) und Xylol (2x2min) werden die Schnitte abschließend mit Acrytol eingedeckelt.

2.2.6. Durchflusszytometrie

Zur selektiven Erfassung bestimmter Zellpopulationen werden die zu testenden Zellen geerntet, in FACS-Puffer ohne Propidiumiodid aufgenommen und gewaschen. Anschließend inkubiert man sie im Dunkeln für 20 Minuten mit 100µl der entsprechenden Antikörper in Verdünnungen (1:10 bis 1:100) bei 4°C. Danach werden die Zellen einmal in 100µl FACS-Puffer ohne Propidiumiodid gewaschen und in FACS-Puffer aufgenommen. Im Anschluss an die Antikörperfärbung kann noch eine weitere Färbung der Proben, z. B. einem weiteren Antikörper oder mit Fluorescein-di-β-D-Galaktopyranosid, erfolgen. Die Messung der Proben wird an einem FACScan Durchflusszytometer, die Auswertung der Messungen mit der Software CellquestPro durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung der transgenen Mauslinien

Ein Ziel dieser Arbeit lag in der Herstellung eines induzierbaren, autochthonen Tumormodells. Dazu wurden verschiedene transgene Mauslinien erzeugt, die sich in zwei Kategorien unterteilen ließen. Dies waren einerseits die konditionellen Tumorkonstrukte Ubiquitin-floxstop-TAg (UfT), Tyrosinase-floxstop-TAg (TfT) und KeratinIV-floxstop-TAg (KST) und andererseits die induzierbare Tyrosinase-CreERT²-Linie (TyrCreERT²).

3.1.1. Klonierung der transgenen Konstrukte

Da in meinem Modellsystem die Expression des TAg-Onkogens gewebsspezifisch in der Haut und in den Augen erfolgen sollte, mussten Promotoren mit entsprechenden Expressionsmustern ausgewählt werden. Dazu wurden der Tyrosinase-Promotor, der in tyrosinase-positiven Zellen der Haut und im Pigmentepithel der Retina exprimiert wird, bzw. der KeratinIV-Promotor verwendet, der in der Epidermis und in KerIV-positiven Zellen der Trachea exprimiert ist. Dies bedeutete, dass in den beiden konditionellen Tumorkonstrukten Tyrosinase-floxstop-TAg (TfT) und KeratinIV-floxstop-TAg (KST) die Gewebsspezifität der Onkogenexpression determiniert war. Somit sollte Rekombination in diesen Linien zu Tumorentstehung in der Haut bzw. in den Augen führen. In der Ubiquitin-floxstop-TAg Linie (UfT) sollte nach Rekombination die ubiquitäre Expression von TAg stattfinden, wodurch Tumorentstehung in verschiedenen Geweben zu erwarten sein sollte. Die vierte transgene Linie, die Induktor-Linie Tyrosinase-CreERT² (TyrCreERT²), sollte die Expression einer induzierbaren, gewebsspezifischen Cre-Rekombinase ermöglichen.

3.1.1.1. Klonierung des Tyrosinase-Promotors (Tyr)

Zur Herstellung des Tyrosinase-CreERT²-Konstruktes musste zunächst der Tyrosinase-Promotor in den pBlueScript II-Vektor (= pBS) kloniert werden. Da der gesamte Promotor-Enhancer-Bereich von 6,2kb verwendet werden sollte und durch Vorhandensein multipler Restriktionsschnittstellen nicht komplett aus dem Plasmid pBs-Tyr4 ausgeschnitten werden konnte, musste diese Klonierung in mehreren Schritten vorgenommen werden.

Aus pHs-Tyr4 wurden deshalb zwei Fragmente herausgeschnitten. Dies waren der Enhancer-Bereich durch *NotI/SalI*- sowie der 5'-Promotorbereich durch *SalI/XbaI*-Doppelverdau. Die am 3'-Bereich des Promotors fehlenden 361bp wurden durch PCR-Amplifikation mittels angehängter *XbaI/NotI*-Schnittstellen hergestellt. Anschließend klonierte ich die Plasmide pTyr-Enhancer und pTyr-Promotor. Bei pTyr-Enhancer wurde der 3,6kb große *NotI/SalI*-Enhancer-Bereich in pBS kloniert. In einem zweiten Vektor erfolgte die Vereinigung von 5'-Promotorbereich (2,2kb) und 3'-Promotorfragment (361bp). Letztlich wurde der komplette Promotor (2,5kb) durch *SalI/XhoI*-Doppelverdau aus pTyr-Promotor ausgeschnitten und in pTyr-Enhancer kloniert.

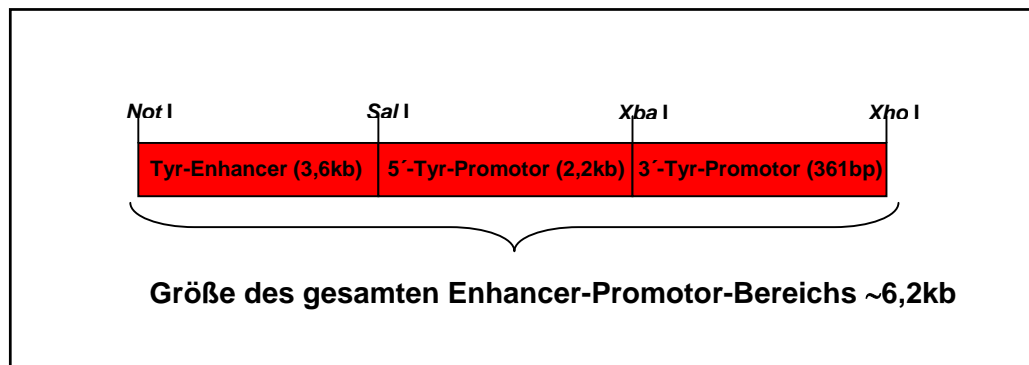


Abb. 8 Tyrosinase Enhancer-Promotor-Konstrukt / Größe ~6,2kb.

3.1.1.2. Klonierung des Tyrosinase-CreERT²-Konstruktes (TyrCreERT²)

Das Tyrosinase-CreERT²-Konstrukt setzte sich aus vier Genabschnitten zusammen. Dies waren der Tyrosinase-Promotor (6,2kb), ein Intronabschnitt (640bp), das Gen für CreERT² (2kb) und ein Polyadenylierungssignal (850bp). Dazu wurde zuerst das Polyadenylierungssignal aus pL31 mit *SacI/XbaI* ausgeschnitten und die überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase abgedaut. Dieses Fragment wurde durch blunt-end Ligation in pBSSKII in eine ebenfalls mit Klenow-Polymerase behandelte *SalI*-Schnittstelle kloniert. Im daraus resultierenden Plasmid pBS-poly(A) wurden korrekt inserierte Klone durch Kontrollrestriktion mit *KpnI* detektiert und zur weiteren Klonierung verwendet. Danach wurde der Intronabschnitt aus pKCR3 mit *BamHI/EcoRI* isoliert und in pBS-poly(A) über entsprechende Schnittstellen ligiert.

Die für CreERT² kodierende Sequenz wurde aus pCreERT² (Feil et al. 1997) durch *EcoRI*-Verdau ausgeschnitten und in pBS-Intron-poly(A) kloniert. Durch Restriktionsanalyse mit *BamHI* wurde überprüft, welche Klone in der richtigen Orientierung (von 5' nach 3') inseriert waren. Zur Ligation des Tyrosinase-Promotors wurde dieser zuerst mit *XhoI* verdaut und das Ende mit Klenow-Polymerase abgedaut. Danach erfolgte ein zweiter Verdau mit *NotI*. Der Zielvektor pBS-Intron-CreERT²-poly(A) wurde zuerst mit *BclI* geschnitten, mit Klenow-Polymerase abgedaut und anschließend mit *NotI* in Analogie zum Tyrosinase-Promotor behandelt.

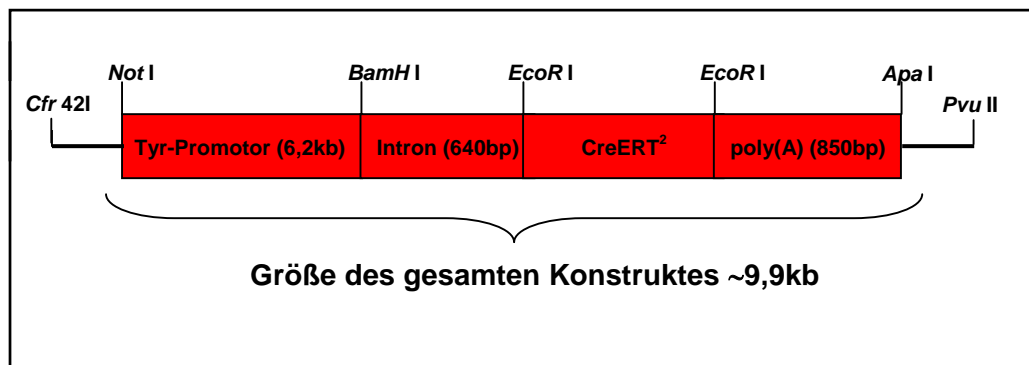


Abb. 9 Tyrosinase-CreERT²-Transgenkassette / Größe ~9,9kb.

Zur Injektion in Mausoozyten wurde das komplette Transgen mit *Cfr42 I/PvuII* aus dem Plasmid pBS-Tyrosinase-Intron-CreERT²-poly(A) ausgeschnitten.

3.1.1.3. Klonierung des UbiquitinC-floxstop-TAg-Konstruktes (UfT)

Das Transgen für Mäuse, die ein ubiquitär induzierbares Tumorigen tragen sollten, wurde durch Klonierung des UbiquitinC-Promotors mit einer loxP-stop-loxP-TAg-Kassette (= floxstop-TAg-Kassette) hergestellt. Diese Mäuse sollten später mit TyrosinaseCreERT²-Tieren gekreuzt werden. In den daraus resultierenden doppeltransgenen Nachkommen könnte die gewebsspezifische Induktion der Cre-Rekombinase erfolgen, die letztlich zur Entstehung von Hauttumoren führen sollte. Dazu erfolgte zuerst der Verdau von pUbiquitinC-4b mit *HindIII* und anschließender Ligation des Promotorfragmentes in pBSSKII. Zur Orientierungskontrolle wurden die erhaltenen Klone mit *SaII* verdaut. Danach wurde die floxstop-TAg-Kassette aus pfloxstopTAg mit *ClaI/XbaI* aus-geschnitten und die Enden mit Klenow-Polymerase abverdaut. Das Fragment wurde in pBS-UbiC in eine abverdauten *XhoI*-Schnittstelle inseriert und die Orientierung über *NotI*-Restriktion überprüft.

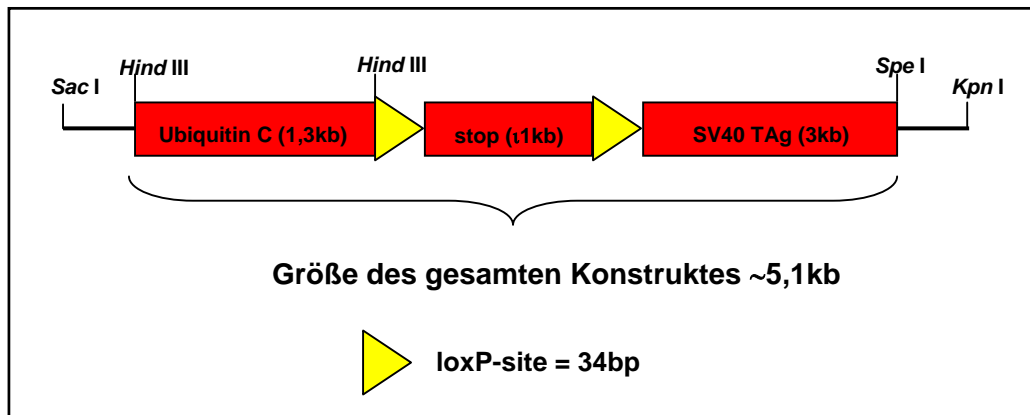


Abb. 10 Ubiquitin-floxstop-TAg-Transgenkassette / Größe ~5,1kb.

Zur Injektion in Mausoozyten wurde das komplette Transgen mit *SacI/KpnI* aus dem Plasmid pBS-UbiC-floxstop-TAg ausgeschnitten.

3.1.1.4. Klonierung des Tyrosinase-floxstop-TAg-Konstruktes (TfT)

In Analogie zur bereits beschriebenen Klonierung des Ubiquitin-floxstop-TAg Konstruktes erfolgte die Herstellung von Tyrosinase-floxstop-TAg. Zuerst wurde der Tyrosinase-Promotor mit *XhoI* verdaut und das Ende mit Klenow-Polymerase abgedaut. Danach erfolgte ein zweiter Verdau mit *NotI*, damit das 6,2kb-Fragment in pBS (*BclI* geschnitten; mit Klenow-Polymerase abverdaut und mit *NotI* geschnitten) kloniert werden konnte. Anschließend wurde die floxstop-TAg-Kassette wie vorhergehend beschrieben ausgeschnitten und in eine abgedaute *SmaI*-Schnittstelle kloniert.

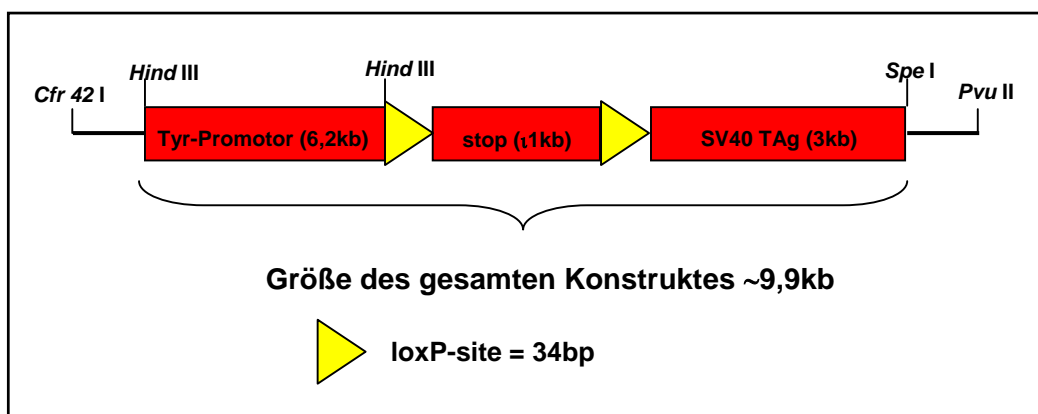


Abb. 11 Tyrosinase-floxstop-TAg-Transgenkassette / Größe ~9,9kb.

Zur Injektion in Mausoozyten wurde das komplette Transgen mit *Cfr42 I/PvuII* aus dem Plasmid pBS-Tyr-floxstop-TAg ausgeschnitten.

3.1.1.5. Klonierung des KeratinIV-floxstop-TAg-Konstruktes (KST)

Die Idee zur Klonierung des KeratinIV-floxstop-TAg-Konstruktes (KST) lag in der Beobachtung, dass Mäuse, die das TAg-Onkogen konstitutiv unter der Kontrolle des KeratinIV-Promotors exprimierten, sehr schnell Hauttumoren entwickelten. Im Verlauf meiner Promotion zeigte sich, dass die Tumorentwicklung in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del. und Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Tieren längere Zeit in Anspruch nahm. Aus diesem Grund sollte mit der KST-Linie eine Tumorkonstruktion erzeugt werden, in der es zu einer schnelleren Tumorentstehung käme. Zur Klonierung von KerIV-floxstop-TAg wurde der KeratinIV-Promotor mittels *BglII*-Verdau aus pKerIV herausgeschnitten, mit Klenow-Polymerase behandelt und in pBSSKII (*ApaI* geschnitten und abgedaut) kloniert.

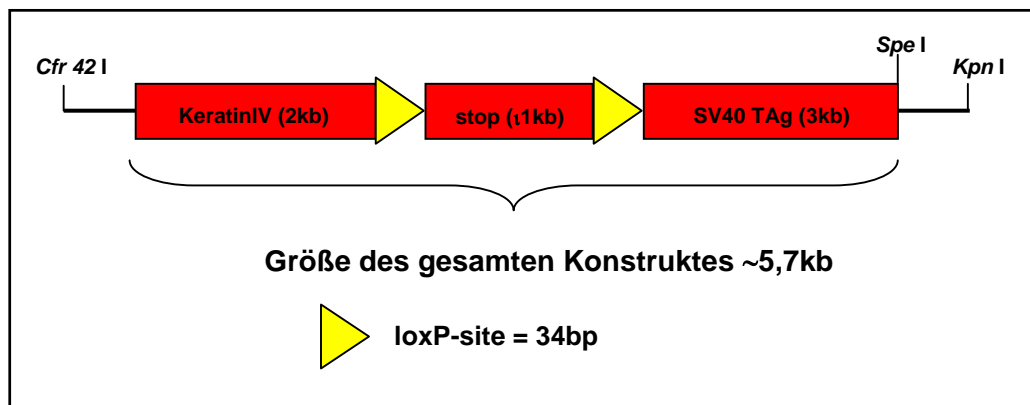


Abb. 12 KeratinIV-floxstop-TAg-Transgenkassette / Größe ~5,7kb.

Anschließend wurde die floxstop-TAg-Kassette mit *Clal/XbaI* ausgeschnitten und in pBS-KerIV (*Clal/XbaI*) ligiert. Zur Injektion in Mausoozyten wurde das komplette Transgen mit *Cfr 42I/KpnI* aus dem Plasmid pBS-KerIV-floxstop-TAg ausgeschnitten.

Durch Klonierung wurden vier neue transgene Konstrukte hergestellt:

- **Tyrosinase-CreERT² (TyrCreERT²)**
- **Ubiquitin-floxstop-TAg (UfT)**
- **Tyrosinase-floxstop-TAg (TfT)**
- **KeratinIV-floxstop-TAg (KST)**

3.1.1.6. Übersicht der transgen-positiven Tiere nach Oozyteninjektion

Zur Herstellung der vier neuen transgenen Mauslinien (TyrosinaseCreERT², Ubiquitin-floxstop-TAg, Tyrosinase-floxstop-TAg und KerIV-floxstop-TAg) injizierte ich die vier Transgene in Mausoozyten und transferierte anschließend die manipulierten Oozyten in Ammenmäuse. Tabelle 1 zeigt die Relation zwischen einzeltransgen-positiven F₁-Nachkommen (= founder-Tiere) und der Anzahl an manipulierten Oozyten.

Transgen	UfT	TfT	KST	TyrCreERT ²	Summe
Embryonen transferiert	758	495	1283	437	2973
Anzahl an Nachkommen	98 = 12,9%	31 = 6,26%	97 = 7,6%	22 = 5%	248 = 8,34%
Transgenpositiv = founder	#29473 #29486 #29493 #29506 #29508	#23037 #23038 #23039	#21150 #21156 #21159 #21164 #21169 #21212 #21224 #21225	#59224 #58225 #58231 #58236 #58238	21 Tiere

Tabelle 1 Zusammenstellung der transgen-positiven Tiere nach Mikroinjektion der Konstrukte in Mausoozyten.

Die Relation von manipulierten und transferierten Oozyten zu transgen-positiven Tieren liegt zwischen 5% und 13%. Dies entspricht dem durchschnittlichen Ergebnis transgen-positiver Tieren nach Oozytentransfer manipulierter Zellen, die in der Größenordnung von ~10% liegt.

Es konnten von allen injizierten Transgenkassetten mehrere einzeltransgen-positiv F₁- Nachkommen (= founder-Linien) erhalten werden.

3.1.1.7. Nachweis von Rekombination durch PCR-Analyse

Zum Funktionsnachweis der Transgene wurden TyrosinaseCreERT² Mäuse mit Rosa26-Tieren bzw. die floxstop-TAg-transgenen Tiere (=> Ubiquitin-floxstop-TAg, Tyr-floxstop-TAg und KerIV-floxstop-TAg) mit Cre-rekombinierenden Mäusen (= Cre-del.) gekreuzt. Die Nachkommen aus Verpaarungen mit Rosa26-Tieren sollten die gewebsspezifische Induzierbarkeit des CreERT²-Proteins unter der Expressionskontrolle des Tyrosinase-Promotors demonstrieren (siehe „3.1.2.“). Im Gegensatz dazu sollten sich in den Nachkommen aus floxstopTAgxCre-del. Verpaarungen Tumoren durch Exzision der Stopkassetten der Transgene entwickeln (siehe „3.1.3.“). Die Identifizierung doppeltransgener Tiere erfolgte durch Southern-Blot. Da durch die Cre/loxP-vermittelte Rekombination multiple Transgenkopien als Concatemere entfernt wurden und lediglich eine einzige, transkriptionell aktive TAg-Genkopie im Genom zurückblieb, erschien das TAg-Signal nach Sondenhybridisierung jedoch sehr schwach. Um alle doppeltransgenen Tiere zu erfassen und erfolgte Rekombination nachzuweisen, wurde eine analytische PCR etabliert. Dabei wurden Primerpaare verwendet, die spezifisch am 3'-Ende des Promotors und am 5'-Ende des TAg-Gens hybridisierten. Nach erfolgter Rekombination war die Stopkassette entfernt und das PCR-Produkt erschien um 1.000 Basen kleiner als in nicht-rekombinierten Tieren.

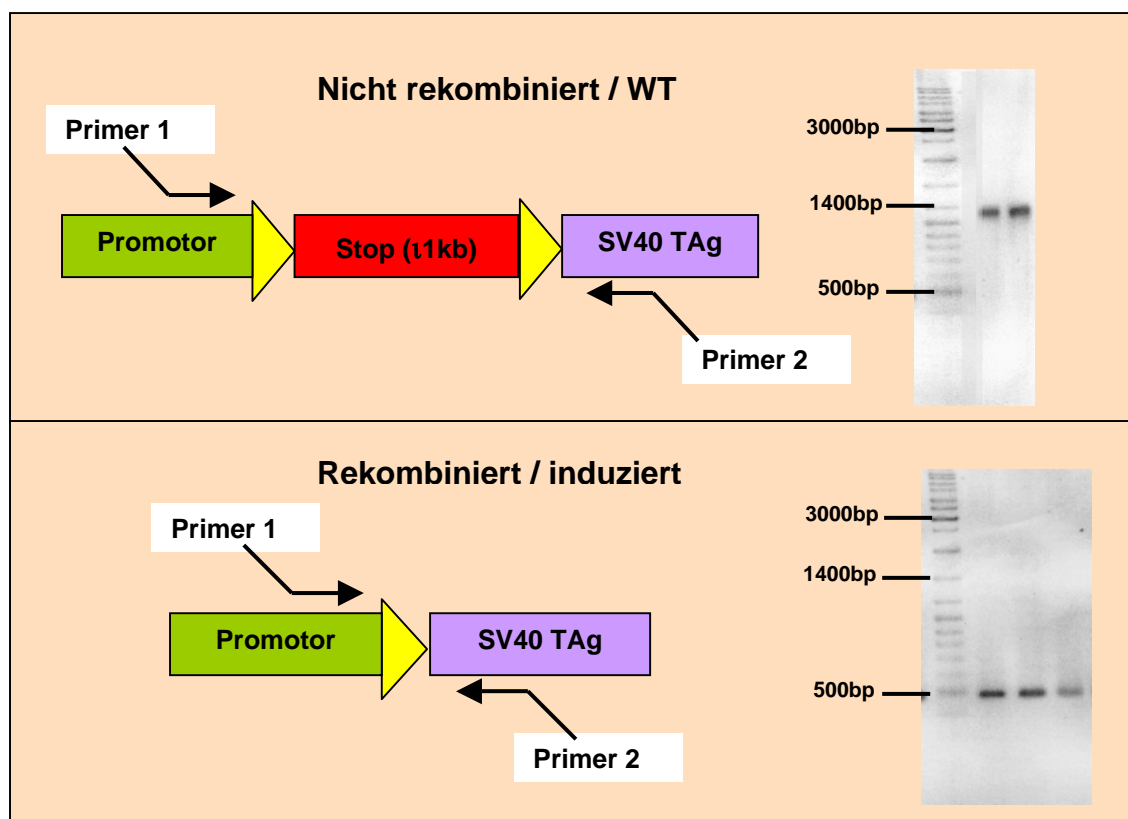
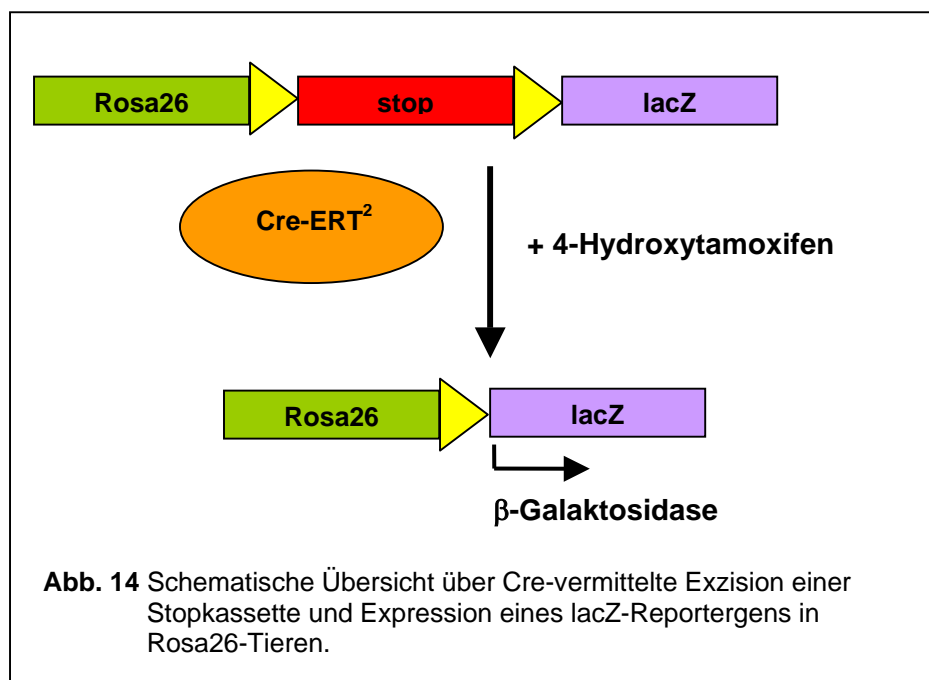


Abb. 13 Nachweis von in vivo-Rekombination durch analytische PCR.
(WT = Wildtypkontrolle).

3.1.2. Induktion von CreERT² durch dermale Applikation von 4-Hydroxytamoxifen

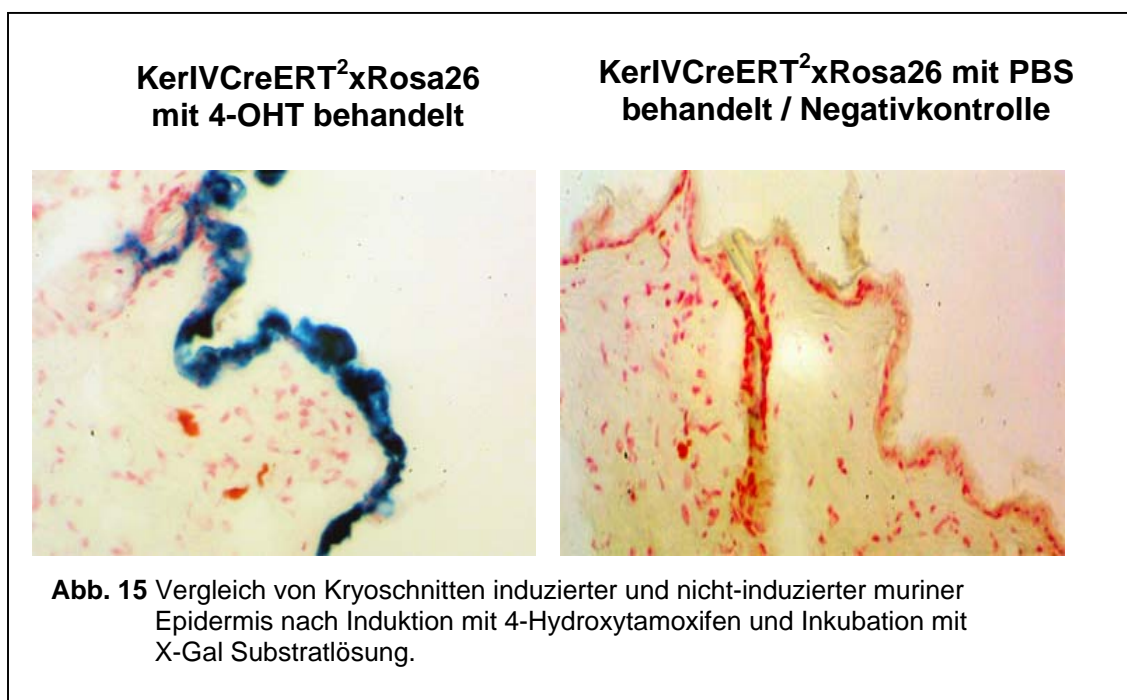
Zum Nachweis der gewebsspezifischen Induzierbarkeit des CreERT²-Proteins wurden TyrCreERT² Tiere mit Rosa26 Reporter-mäusen gekreuzt. Diese Rosa26-Tiere tragen eine floxstop-lacZ Reporter-Kassette in ihrem Genom. Den aus diesen Verpaarungen resultierenden doppeltransgenen Nachkommen wurde 4-Hydroxytamoxifen (10% in DMSO) lokal auf rasierte Hautstellen aufgetragen. Durch das DMSO konnte das Hormon die Hautbarriere passieren und in die dermalen Zellschichten gelangen. Im Cytosol der Zellen, welche das Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und Östrogenrezeptordomäne trugen, verursachte 4-Hydroxytamoxifen durch Binden eine Konformationsänderung. Dadurch konnte die Rekombinase in den Zellkern translozieren und rekombinatorisch aktiv werden. Dies führte zur Exzision der floxstop-Kassette, sodass eine funktionelle mRNA transkribiert und das Reporterenzym exprimiert werden konnte.



Das Reporterenzym β -Galaktosidase setzte das farblose Substrat X-Gal in einen blauen Niederschlag um, der dadurch eine farbliche Detektion von Zellen, in denen Rekombination erfolgt war, ermöglichte. Die Gewebsspezifität wurde in diesem Experiment durch die CreERT²-Mäuse definiert. Das bedeutete, dass Rekombination nach dermalen Applikation des Hormons in Haarfollikelzellen von TyrCreERT²xRosa26-Mäusen stattfand.

3.1.2.1. Induktion von CreERT² in doppeltransgenen KeratinIV-CreERT²xRosa26 Mäusen

Als Positivkontrolle der Rekombination nach Induktion der Cre-Rekombinase mit 4-Hydroxytamoxifen (= 4-OHT) dienten KeratinIVCreERT²xRosa26-Mäuse (Feil et al. 1997). Diese doppeltransgenen Tiere exprimierten das CreERT²-Gen unter der Kontrolle des KeratinIV-Promotors, welcher in der Epidermis und in KeratinIV-positiven Zellen der Trachea aktiv war. Somit sollten KerIVCreERT²x Rosa26-Mäuse nach dermalen Applikation des Induktors ausschließlich im epidermalen, induzierten Hautbereich Cre-Aktivität zeigen.



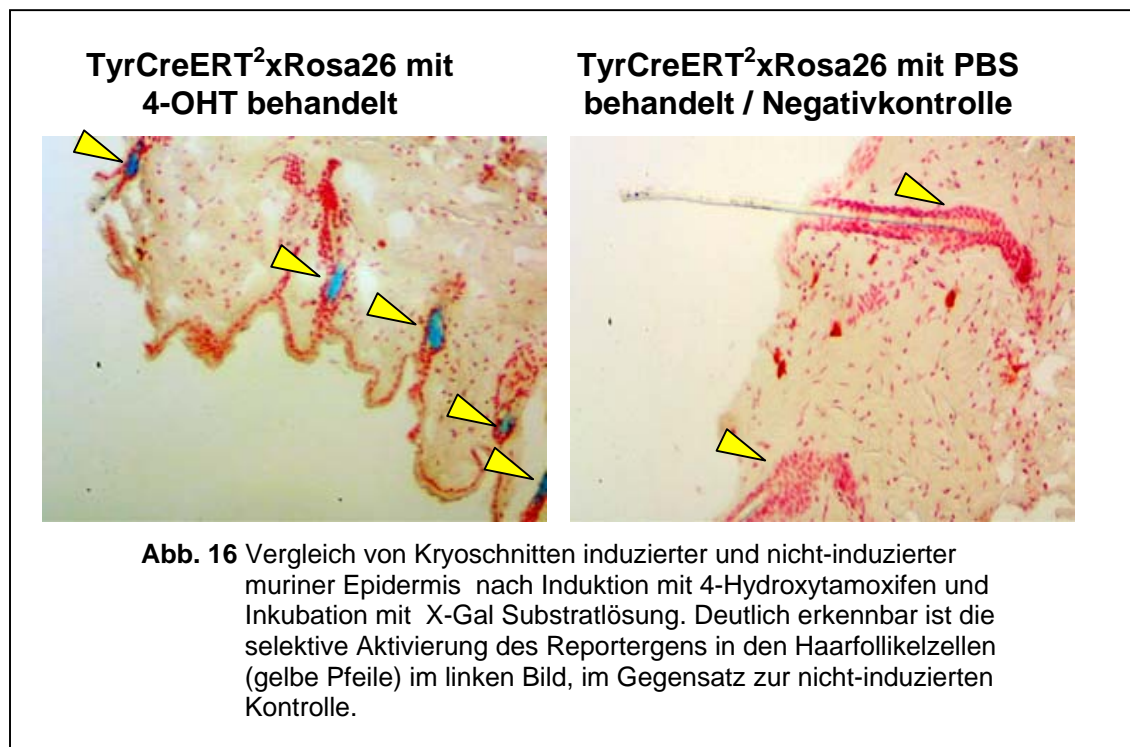
Man konnte eine starke Färbung in der Epidermis sehen. Die zeigte erfolgte Rekombination durch Expression des Reporterenzym und daraus resultierender Umsetzung des Substrats an.

Die Induktion von CreERT² mit 4-Hydroxytamoxifen in doppeltransgenen KerIVCreERT²xRosa26 Mäusen führte zu Rekombination im induzierten Hautsegment.

In nicht-induzierten Tieren konnte keine Hintergrundexpression des Reporterenzym beobachtet werden.

3.1.2.2. Induktion von CreERT² in doppeltransgenen Tyrosinase-CreERT²xRosa26-Mäusen

Diese neue Induktor-Linie trug das Gen für CreERT² unter der Expressionskontrolle des Tyrosinasepromotors, der in tyrosinase-positiven Zellen der Epidermis und im Pigmentepithel der Retina exprimiert war. Die Gewebeschnitte der Haut von TyrCreERT²xRosa26 Mäusen sollten deshalb nach erfolgter Induktion rekombinierte Haarfollikelzellen aufweisen, in denen es zur Substratumsetzung des farblosen X-Gal Substrats in einen blauen Niederschlag gekommen war.

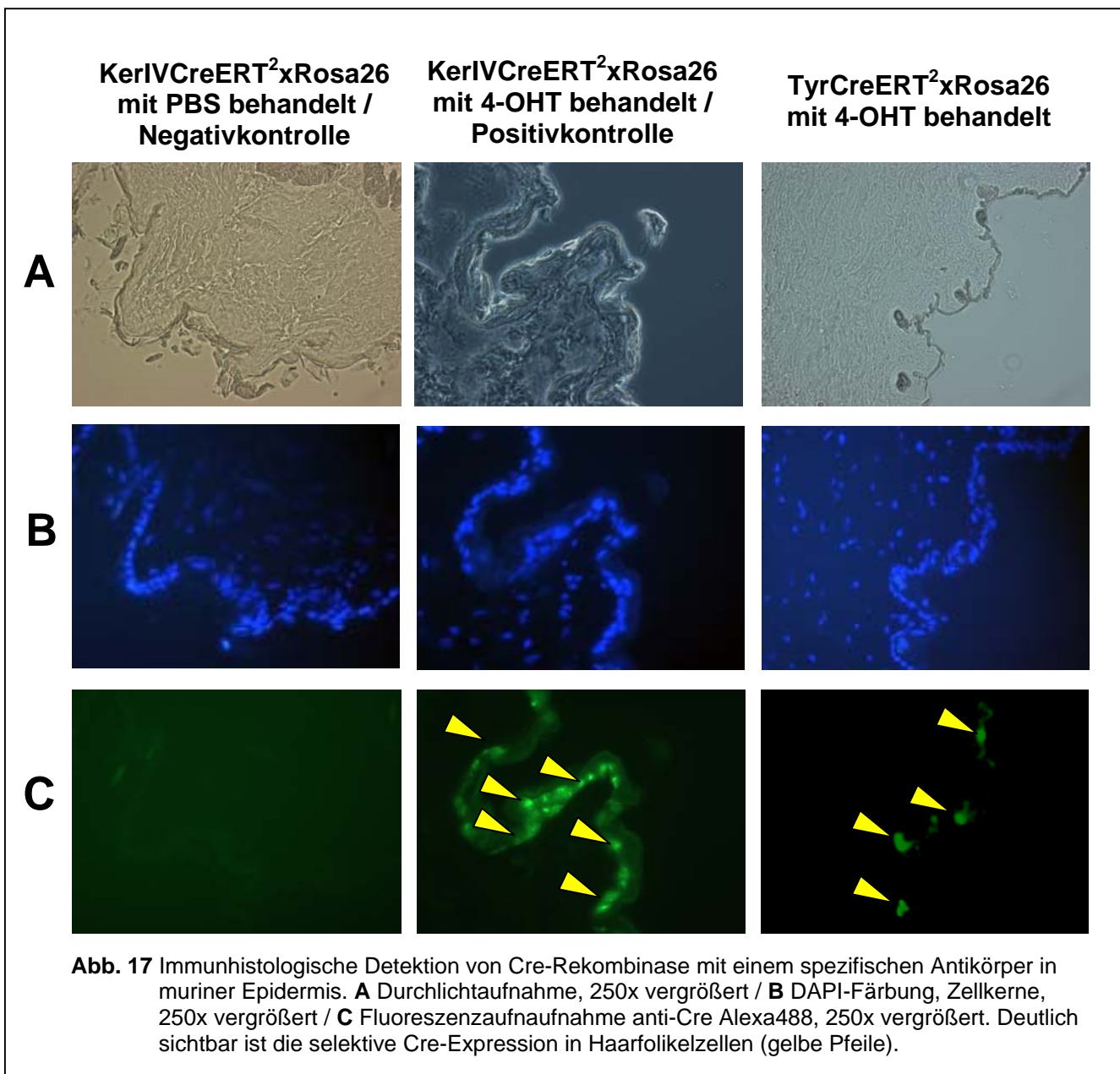


Dieses Experiment zeigte, dass die Induktion durch dermale Applikation von 4-Hydroxytamoxifen zu einer selektiven Aktivierung des Reportergens in Haarfollikelzellen führte.

Die Induktion von CreERT² in doppeltransgenen TyrCreERT²xRosa26 Mäusen zeigte die gewebsspezifische Induktion der Rekombinase entsprechend dem Expressionsmuster des Tyrosinase-Promotors.

3.1.2.3. Immunhistologische Detektion der Cre-Rekombinase

Die immunhistologische Detektion der Cre-Rekombinase erfolgte in Gewebeproben der Haut nach Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen. Die Proben wurden dazu auf dem Kryostat zu Dünnschnitten aufgearbeitet. Im Anschluss daran erfolgte Inkubation mit einem Cre-spezifischen Antikörper und anschließender Detektion von gebundenen Primärantikörper mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Detektierte Cre-Rekombinase bzw. an Cre-Protein gebundene Antikörper wurden als grüne Signale im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.



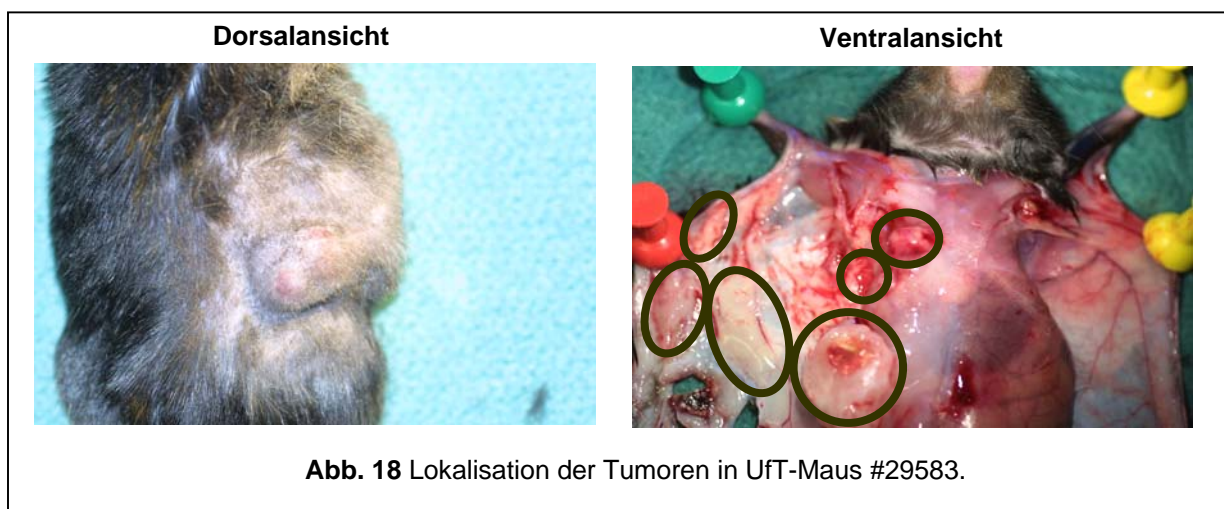
Die Lokalisation der Cre-Rekombinase induzierter TyrosinaseCreERT²xRosa26 Tiere entsprach dem gewebsspezifischen Expressionsmuster des Promotors.

3.1.3. Tumorentstehung in vivo

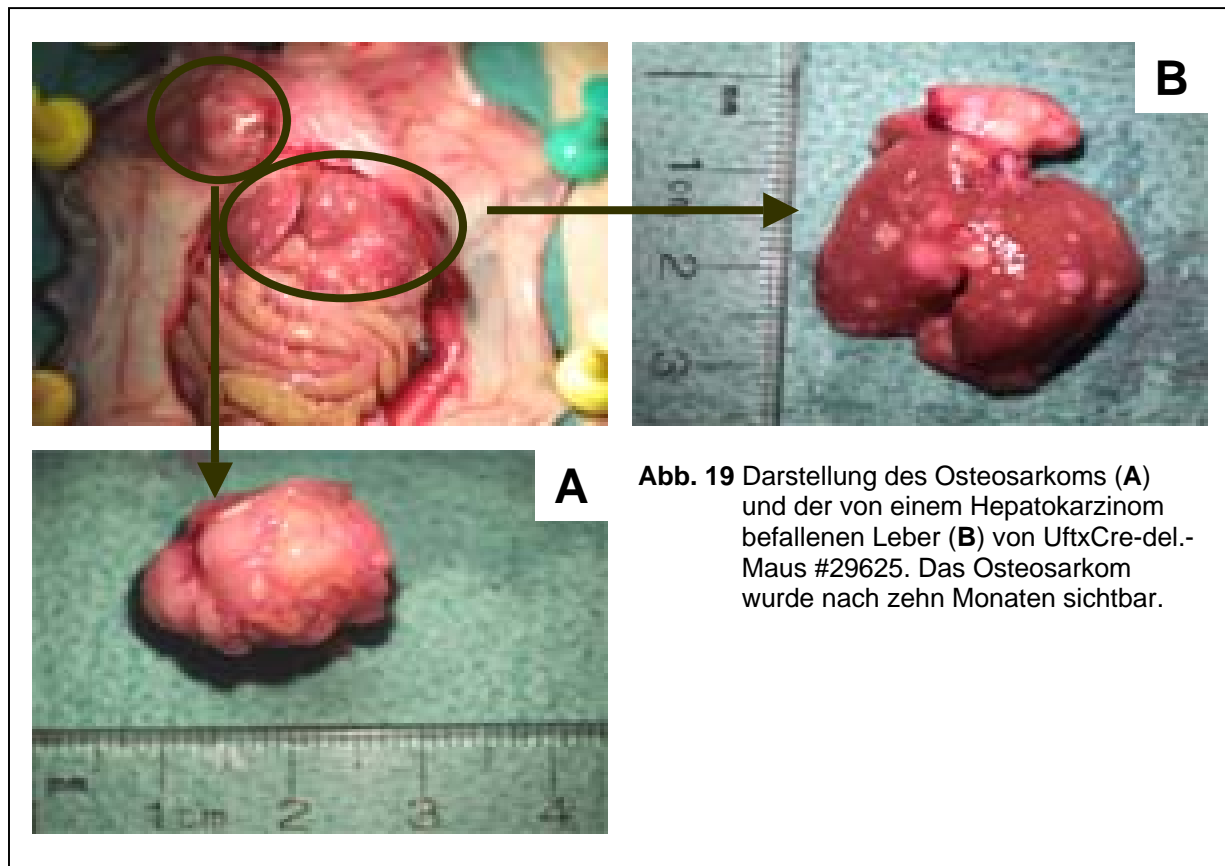
Da in den konditionellen floxstop-TAg-Linien Tumorbildung erzielt werden sollte, mussten sie bezüglich der Induzierbarkeit der Onkogenexpression getestet werden. Dazu wurden Ubiquitin-floxstop-TAg-, Tyr-floxstop-TAg- und KerIV-floxstop-TAg-Mäuse mit Cre-rekombinierenden (= Cre-deleter) Tieren verpaart. Diese Tiere trugen das Cre-Gen in der Keimbahn. Das bedeutete, dass sie in allen Körpergeweben vorhandene loxP-Stellen des Genoms rekombinierten. Aufgrund dieser Eigenschaft sollte es zu Tumorbildung in doppeltransgenen Tieren kommen.

3.1.3.1. Tumorentstehung in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen

Nach zwölf Monaten entwickelte eine rekombinierte Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del.-Maus, #29583 aus der Linie 29486, äußerlich sichtbare Tumoren. Das Tier wurde fünf Tage nach Sichtbarwerden der Tumoren eingeschläfert und es konnten sechs unterschiedlich große solide Tumoren isoliert werden. Die Tumoren befanden sich subkutan im Bauchbereich, an den Flanken sowie im Axillarbereich. Weitere Tumoren waren auf der Innenseite der mittleren und unteren Rippenbögen lokalisiert. Es handelte sich bei den gefundenen Tumoren um Fibrosarkome mit typischer spindelförmiger Form der Tumorzellen.

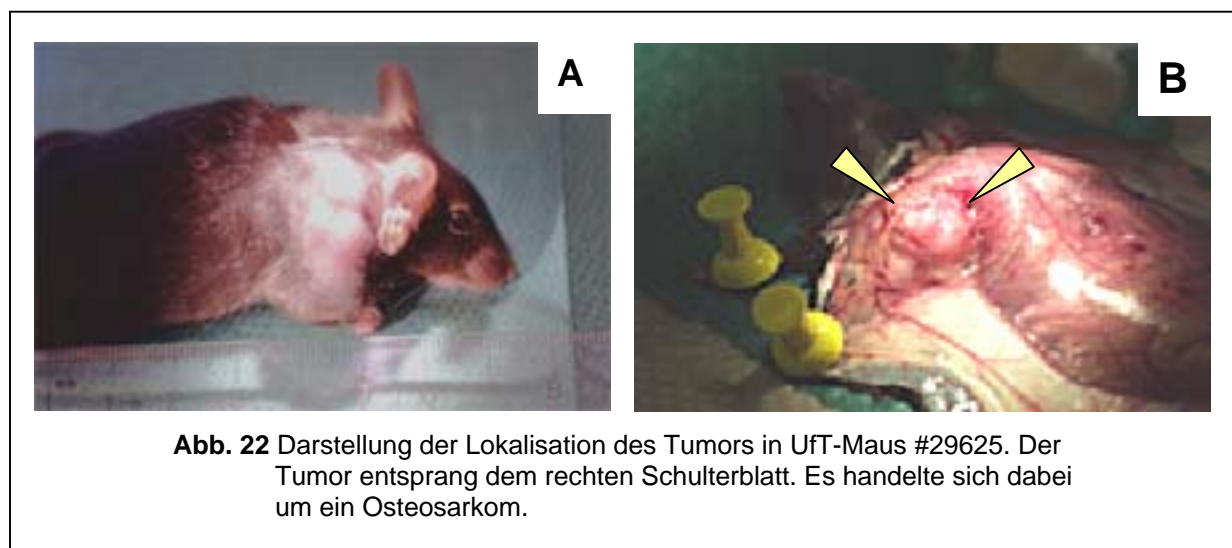


Eine zweite Uft-Maus, #29625, entwickelte nach zehn Monaten einen großen Tumor im Bereich der rechten Schulter. Im Gegensatz zu #29583 konnten makroskopisch keine weiteren Tumoren entdeckt werden. Eine Ausnahme bildete die von einem Hepatokarzinom befallene Leber.

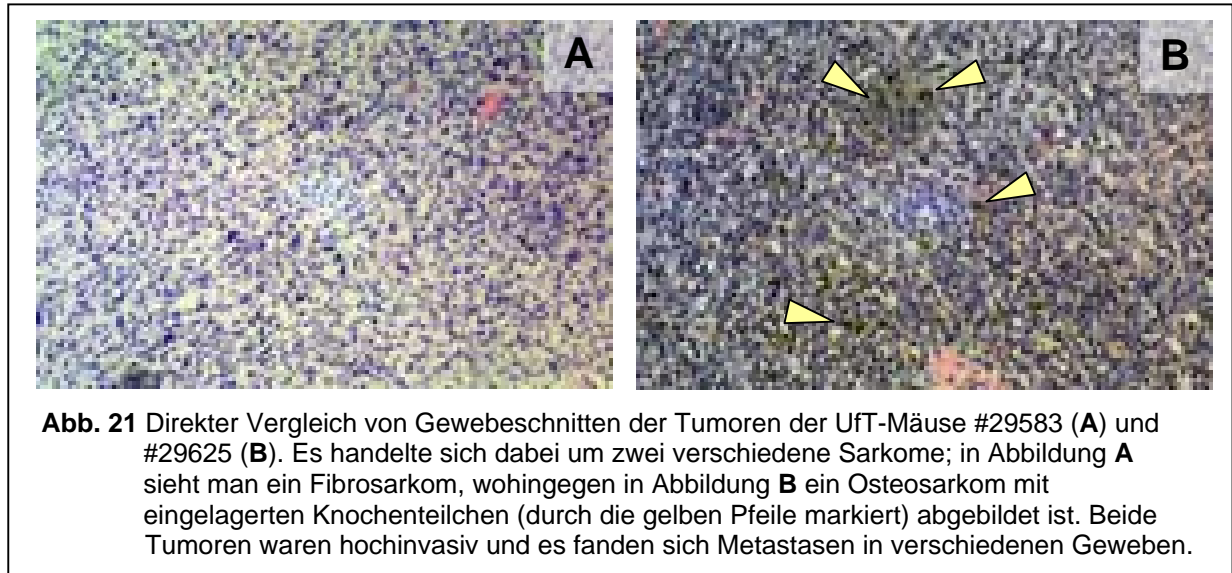


Auffällig bei diesem Tier war die ebenfalls rasche Progression des Tumors. Innerhalb von nur vier Tagen nach Sichtbarwerden wurde die Maus getötet und die Organe entnommen. Die hier gefundenen Tumoren waren ein Osteosarkom und ein Hepatokarzinom.

In einem weiteren Tier, #29693, konnte nach einer Latenzzeit von neun Monaten die Entstehung eines Osteosarkoms diagnostiziert werden. Ebenso wie Maus #29625 entwickelte auch dieses Tier zusätzlich ein Hepatokarzinom.



Osteosarkome entspringen primär aus Knochen und besitzen in den Tumor eingelagerte Osteoblasten, die Knochensubstanz im Tumor produzieren. Im Fall der gezeigten Maus #29625 wuchs der Primärtumor aus dem rechten Schulterblatt heraus. Bei einer weiteren, ein Osteosarkom entwickelnden UfT-Maus (#29693) entstammte der Primärtumor aus dem Schlüsselbein.



In zwei weiteren Mäusen, #29672 und #29570, konnten sowohl Fibrosarkome als auch Leukämien mit deutlich vergrößerten Milzen der betroffenen Tiere diagnostiziert werden.

Sechs von neun rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen entwickelten Tumoren. Davon entstammten vier Tiere derselben founder-Linie (29486).

3.1.3.2.1. Histopathologie der Gewebeschnitte rekombinierter Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Mäuse

Die Anfertigung der histopathologischen Sektionen erfolgte durch Frau Schmitt und Frau Moll. Die Erstellung der Befunde und die abschließende Beurteilung durch Herrn Professor Gröne aus der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie.

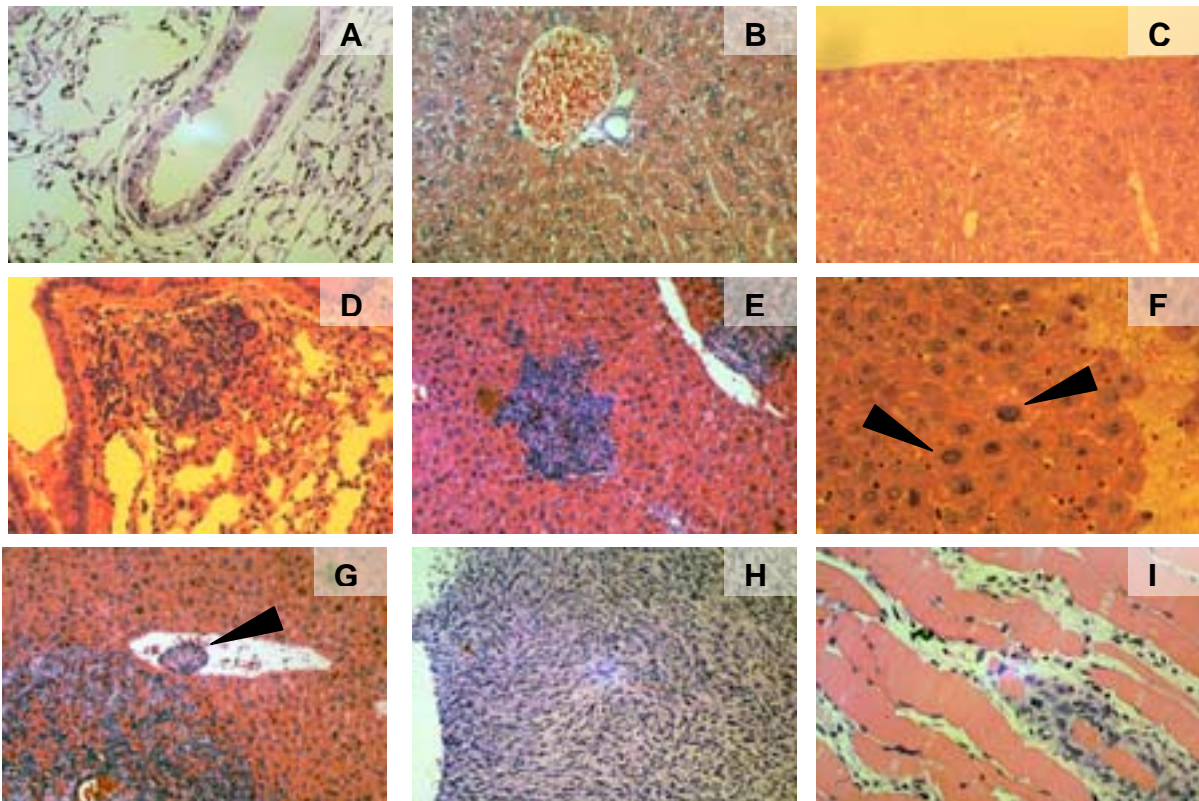


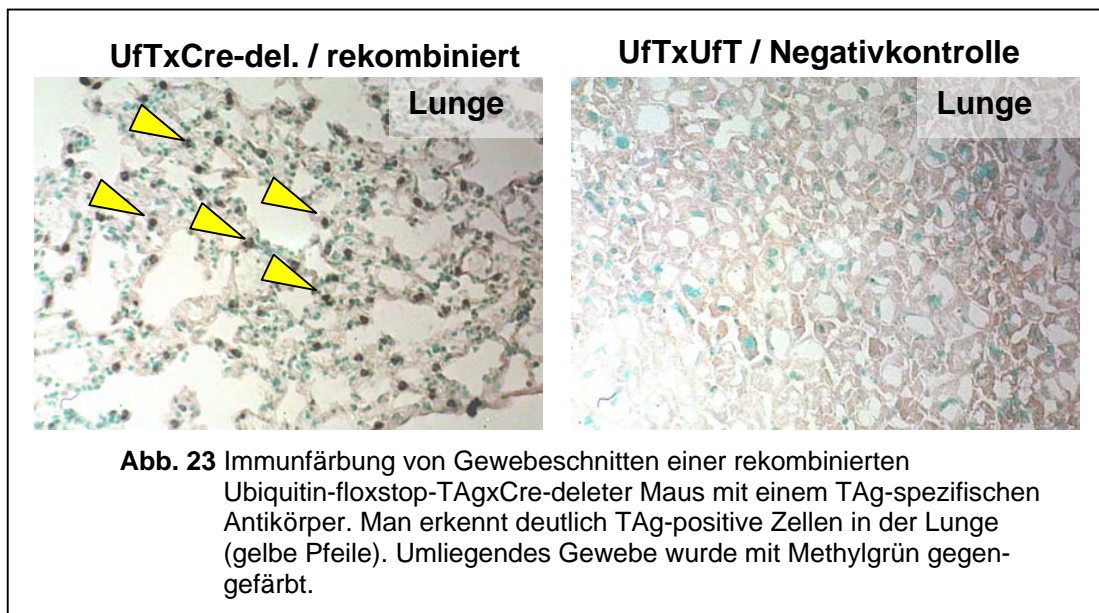
Abb. 20 Darstellung der histopathologischen Gewebeschnitte der tumorigenen UfT-Mäuse #29583 und #29625. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollgeweben (**A**, **B** und **C**) konnte man eindeutige, maligne Veränderungen der Organe erkennen. Man sieht in den Abbildungen **A** und **D** jeweils Lungengewebe; in **D** ist ein Tumorherd mit stark mitotischen Zellen sichtbar. Die Abbildungen **B**, **C**, **E** und **F** demonstrieren Gewebeschnitte der Leber; im Unterschied zu gesundem Gewebe (**B** und **C**) sind im Tumorgewebe Dysplasie-Bereiche mit z. T. stark vergrößerten Nuklei (Pfeile) auffällig. Die Ausbreitung der Tumorzellen erfolgte durch Metastasierung, wie in **G** sichtlich; hier sieht man eine adhärenente Metastase (Pfeil) in einem Gefäß innerhalb der Leber. Die Schnitte **H** und **I** entstammten einem soliden Tumor. Es handelte sich dabei um ein hochinvasives Fibrosarkom, was auf Abbildung **I** deutlich wird. Hier kann man die Invasion von gesundem Muskelgewebe durch Tumorzellen sehen.

In rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del. Mäusen konnten vier verschiedene Tumoren diagnostiziert werden: Fibrosarkome, Osteosarkome, Hepatokarzinome und Leukämien.

Bei fünf von sechs tumorentwickelnden Tieren fanden sich Metastasen.

3.1.3.2.2. Immunhistochemischer Nachweis des TAg-Proteins im Gewebe rekombinierter Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Mäuse

Um zu beweisen, dass es sich bei den gefundenen Tumoren nicht um Alterstumoren, sondern um TAg-transformierte Tumoren handelte, wurde der immunhistochemische Nachweis von TAg-Protein erbracht. Dies erfolgte exemplarisch in Kryoschnitten von Lungengewebe der rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Maus #29583 (= UfTxCre-del. / rekombiniert) mit einem TAg-spezifischen Antikörper. Der zur Signaldetektion eingesetzte Sekundärantikörper war biotinyliert und zeigte TAg-proteingebundenen Primärantikörper nach Färbung mit DAB-Substrat als dunkle Bereiche auf den Schnitten an. Als Negativkontrolle wurde Gewebe einer nicht-rekombinierten UfTxUfT Maus verwendet.



Auf den Gewebeschnitten der doppeltransgenen, rekombinierten UfT-Maus konnten deutliche TAg-Signale erkannt werden. Dabei zeigte sich, dass in nahezu allen Zellen TAg-Protein exprimiert wurde. TAg-Signale wurden nur in rekombinierten Tieren detektiert.

In Gewebeschnitten rekombinierter Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Tiere wurde das TAg-Protein nachgewiesen.

3.1.3.3. Tumorentstehung in rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen

Nach einer Latenzzeit von neun bis elf Monaten entwickelten fünf doppeltransgene Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Nachkommen Augentumoren. Dabei zeigte sich eine extrem rasche Progression der Tumoren, die dazu führte, dass die Mäuse ca. drei Tage nach den ersten phänotypischen Auffälligkeiten der Augen getötet werden mussten. Drei Tiere waren Nachkommen der founder-Linie 23038; zwei weitere Tiere entsprangen der Linie 23039.

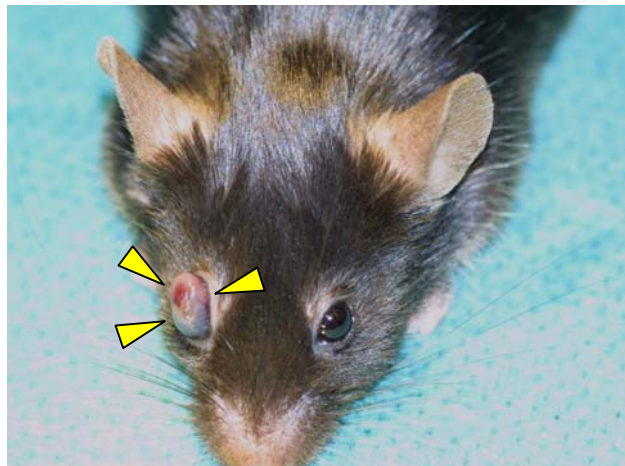


Abb. 24 Darstellung des Augentumors (gelbe Pfeile) von TftxCre-del.-Maus #23227 in Lateralansicht.

Entsprechend der Gewebsspezifität des Tyrosinase-Promotors erfolgte in rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen die Expression des Onkogens in tyrosinase-exprimierenden Zellen. Im vorliegenden Fall ging die Tumorentstehung auf das Pigmentepithel der Retina zurück. Die Entwicklung eines Hauttumors konnte aufgrund der raschen Tumorprogression in den Augen und der daraus resultierenden Tötung der Tiere nicht beobachtet werden.

Fünf von zwölf rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen entwickelten Melanome der Augen.

3.1.3.4. Histopathologie der Gewebeschnitte rekombinierter Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Mäuse

Der klinische Befund der vorliegenden Gewebeschnitte diagnostizierte ein malignes Melanom, entspringend aus dem Pigmentepithel des rechten Auges der doppeltransgenen Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Maus #23227.

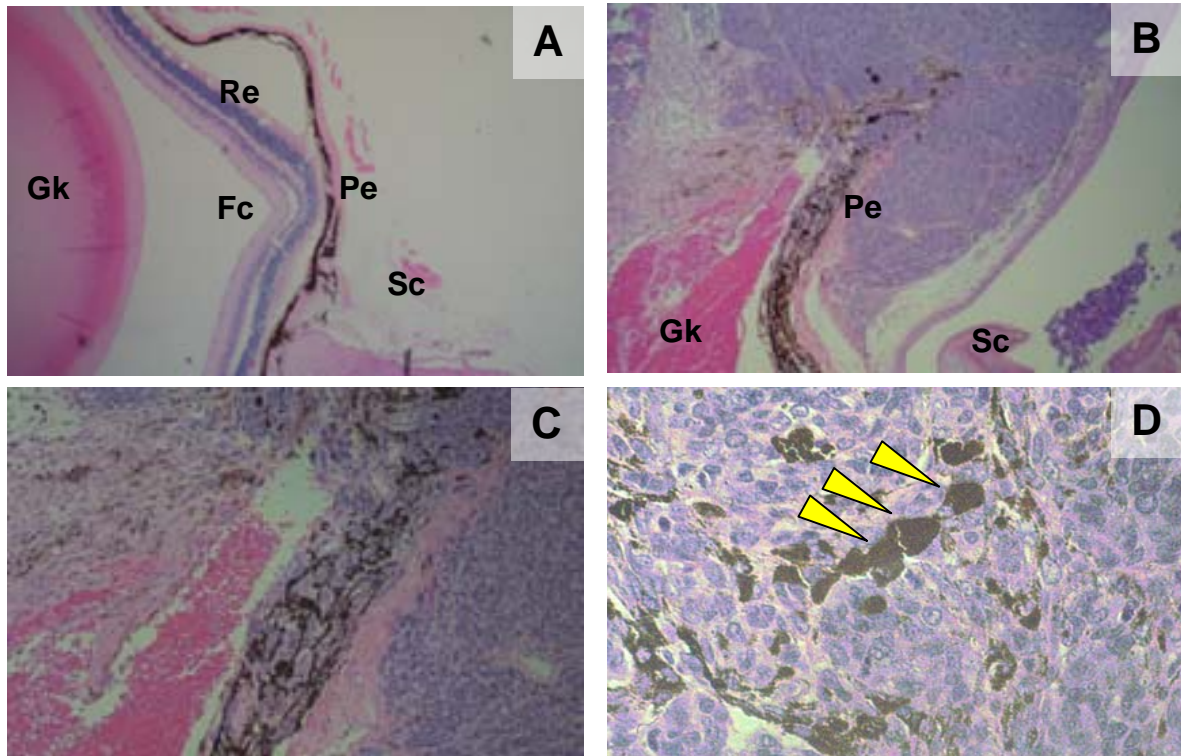


Abb. 25 Vergleich der Histopathologie des tumorentwickelnden Auges von Tft-Maus #23227 (**B, C, D**) mit einem gesunden Auge (**A**). Man erkennt im gesunden Organ die deutliche räumliche Gewebestruktur des Auges. Die Retina (Re) wird durch die Pigmentepithelschicht (Pe) zur Sclera (Sc) hin abgegrenzt. Im Gegensatz dazu erkennt man auf den Gewebeschnitten des tumorigenen Auges eine deutliche Proliferation der melanintragenden Pigmentepithelzellen (**B, C**) und deren Invasion in das umliegende Gewebe. Die Organstruktur ist nicht mehr gegeben. Außerdem kann man Makrophagen erkennen, die aufgrund aufgenommener Melanocyten schwarz erscheinen (gelbe Pfeile) (**D**). (Gk = Glaskörper / Fc = Fovea centralis / Re = Retina / Pe = Pigmentepithel / Sc = Sclera).

Das tumorigene Gewebe erschien amelanotisch, da die Tumorzellen Melanin abstießen, das wiederum von Makrophagen aufgenommen wurde. Identische histopathologische Diagnosen wurden auch bei weiteren tumorentwickelnden Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Tieren gestellt.

Es konnte gewebsspezifische Tumorentstehung entsprechend des Expressionsmusters des verwendeten Tyrosinase-Promotors demonstriert werden.

3.1.3.5. Tumorentstehung in rekombinierten KeratinIV-floxstop-TAgxCre-deleter Mäusen

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Dissertation waren drei doppeltransgene Mäuse aus zwei verschiedenen founder-Linien geboren. Allerdings konnte nach vier Monaten noch keine Tumorentstehung beobachtet werden. Da die Tumorentstehung in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAg und Tyrosinase-floxstop-TAg-Tieren sehr lange Zeit in Anspruch nahm, ist ein längerer Beobachtungszeitraum der rekombinierten KeratinIV-floxstop-TAgxCre-del.-Tiere notwendig.

3.1.3.6. Ergebnisse der in vivo-Onkogenexpression

Konstrukt	Anzahl an Nachkommen xCre-deleter	Doppeltransgene Tiere	Linie	Tumordiagnose positiv
Ubiquitin-floxstop-TAg	94	9 = 9,6%	29473	1 / 2
			29486	4 / 4
			29493	1 / 3
Tyrosinase-floxstop-TAg	125	12 = 9,6%	23037	0 / 3
			23038	3 / 5
			23039	2 / 4
KeratinIV-floxstop-TAg	76	3 = 3,9%	21164	0 / 2
			21169	0 / 1

Tabelle 2 Ergebnisse der in vivo-Onkogenexpression in Nachkommen aus Verpaarungen der floxstop-TAg Tumorkonstrukte mit Cre-deleter Tieren.

Die Bezeichnung „Doppeltransgene Tiere“ bezieht sich auf Tiere aus Verpaarungen mit Cre-rekombinierenden Tieren (Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del., Tyr-floxstop-TAgxCre-del. und KerIV-floxstop-TAgxCre-del.). Auffällig war die relativ geringe Anzahl an doppeltransgenen Tieren. Eine detaillierte Aufstellung über die Nachkommen gibt Tabelle 2. Darin wird die Anzahl an einzel- und doppeltransgenen Tieren nach Konstrukt und Geschlechtern getrennt aufgeführt (m = male [männlich] / f = female [weiblich]).

Konstrukt x Cre-deleter	Gesamtzahl an Nachkommen	Anzahl an einzeltransgenen Nachkommen		Anzahl an doppeltransgenen Nachkommen	Anzahl an nicht-transgenen Nachkommen Cre ⁻ /TAg ⁻
		Cre ⁺	TAg ⁺	Cre ⁺ /TAg ⁺	
Ubiquitin-floxstop-TAg	94	m 7	m 6	m 2	50
		f 26	f 6	f 7	
Summe	94 = 100%	33 = 35,1%	12 = 12,8%	9 = 9,6%	50 = 53,2%
Tyrosinase-floxstop-TAg	125	m 3	m 8	m 8	88
		f 10	f 4	f 4	
Summe	125 = 100%	13 = 10,4%	12 = 9,6%	12 = 9,6%	88 = 70,4%
KeratinIV-floxstop-TAg	76	m 3	m 7	m 0	52
		f 5	f 6	f 3	
Summe	76 = 100%	8 = 10,5%	13 = 17,1%	3 = 3,9%	52 = 68,4%

Tabelle 3 Übersicht über die Nachkommen aus Verpaarungen der floxstop-TAg Linien mit Cre-deleter Tieren. Aufgeführt ist die geschlechtsspezifische Anzahl an einzel- und doppeltransgenen Nachkommen sowie der daraus resultierende prozentuale Anteil aus allen Verpaarungen.

Diese Tabelle zeigt, dass der Anteil der doppeltransgenen Tiere im Verhältnis zu einzeltransgenen niedrig ausfiel. Gemäß der Mendel'schen Regeln sollten 25% der Nachkommen aus den Verpaarungen beide Transgene tragen. Anhand der vorliegenden Tabellen ist ersichtlich, dass von den Nachkommen aus Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter und Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Verpaarungen ein Anteil von je 9,6% der Tiere doppeltransgen war, wohingegen nur 4% der Nachkommen aus KeratinIV-floxstop-TAgxCre-deleter Verpaarungen beide Transgene aufwiesen.

3.1.3.7. Ergebnis der in vivo-Reportergeninduktion

In Analogie zur Darstellung der in vivo-Onkogenexpression werden hier die Ergebnisse der Verpaarungen von verschiedenen Tyrosinase-CreERT²-founder Tieren mit Rosa26-Reportermäusen dargestellt.

Konstrukt	Anzahl an Nachkommen xRosa26	Reportergenexpression induziert
Tyrosinase-CreERT ²	30	58224 => 8 / 10
		58225 => 1 / 1
		58231 => 5 / 7
		58236 => 8 / 10
		58238 => 2 / 2

Tabelle 4 Übersicht über doppeltransgene Nachkommen aus Tyrosinase-CreERT²xRosa26 Verpaarungen.

Aus den fünf verschiedenen Tyrosinase-CreERT²-founder Linien wurden dreißig doppeltransgene Nachkommen geboren. Alle induzierten doppeltransgenen Tiere zeigten die gewebsspezifische Expression des Reportergens. Die nicht-induzierten Kontrollen zeigten keinerlei Reportergenexpression. Ebenso fehlte jegliche Hintergrundaktivität des Reportergens.

3.1.3.8. Übersicht über die entstandenen Tumoren

Die folgenden Tabellen zeigen die verschiedenen, in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAg bzw. Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Tieren entstandenen Tumoren.

Linie	Mausnummer	Zeitpunkt der Tumordiagnose	Lokalisation der Tumoren	Art der Tumoren	Metastasen
29486	#29523	12 Monate	Drei Tumoren im Bauch- und Rückenbereich	Osteosarkom Hepatokarzinom	Lunge
	#29625	10 Monate	Schulterblatt	Osteosarkom Hepatokarzinom	
	#29693	9 Monate	Schlüsselbein	Osteosarkom Hepatokarzinom	Lunge
29473	#29570	11 Monate	Drei Tumoren im Bauch- und Rückenbereich / Milz	Fibrosarkom Leukämie	Leber
	#29672	11 Monate	Zwei Tumoren am Bauch / Milz	Fibrosarkom Leukämie	Leber
29493	#29583	11 Monate	Sechs Tumoren im Bauch- und Rückenbereich	Fibrosarkom Hepatokarzinom	Lunge

Tabelle 5.1 Übersicht über die entstandenen Tumore in doppeltransgenen Nachkommen aus Verpaarungen der konditionellen Ubiquitin-floxstop-TAg-Linien mit Cre-deleter Tieren.

Aus diesen Tabellen wird ersichtlich, dass man in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del. Mäusen die Entstehung verschiedener Tumoren in unterschiedlichen Geweben beobachten konnte. Dies war auf die Expressionskontrolle durch den Ubiquitin-Promotor zurückzuführen. Es fiel auf, dass alle tumorentwickelnden Tiere der Linie 29486 Osteo- und Hepatokarzinome entwickelten.

In rekombinierten Nachkommen der Linie 29473 wurden ausschließlich Fibrosarkome und Leukämien diagnostiziert. Im Gegensatz dazu wiesen rekombinierte Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Tiere maligne Melanome der Augen auf (siehe „3.1.3.4.“). Somit konnte für die Tyrosinase-floxstop-TAg-Linien gewebsspezifische Tumorentstehung entsprechend des Expressionsmusters des Tyrosinasepromotors demonstriert werden.

Linie	Mausnummer	Zeitpunkt der Tumordiagnose	Lokalisation der Tumoren	Art der Tumoren	Metastasen
23038	#23086	11 Monate	Auge	Melanom	
	#23087	11 Monate	Auge	Melanom	
	#23091	10 Monate	Auge	Melanom	Lunge
23039	#23227	9 Monate	Auge	Melanom	
	#23105	10 Monate	Auge	Melanom	Lunge

Tabelle 5.2 Übersicht über die entstandenen Tumoren in doppeltransgenen Nachkommen aus Verpaarungen der konditionellen Tyrosinase-floxstop-TAg-Linien mit Cre-deleter Tieren.

3.1.3.9. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Arbeit mit den neuen transgenen Mauslinien

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung neuer transgener Mauslinien. Diese Linien bestanden aus drei konditionellen floxstop-TAg-Tumormauslinien und einer CreERT²-Induktor-Linie. Nach erfolgreicher Klonierung und Mikroinjektion der transgenen Konstrukte in Oozyten konnten von jedem Konstrukt mehrere einzeltransgen-positive Linien erhalten werden (siehe „3.1.1.2.“). Die verschiedenen konditionellen Tumorkonstrukte (Ubiquitin-floxstop-TAg, Tyrosinase-floxstop-TAg und KeratinIV-floxstop-TAg) wurden mit Cre-rekombinierenden Mäusen zur Induktion der Onkogenexpression verpaart. Dabei zeigte sich eine Latenzzeit von neun bis zwölf Monaten bis es zu Tumorentstehung kam. Im Vergleich der Linien miteinander war die Tumorzinzidenz bei rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del.-Tieren am höchsten. Bei sechs von neun Tieren kam es zur Tumorbildung (siehe „3.1.3.6.“). Nach Auftreten äußerlich sichtbarer Tumoren erfolgte die weitere Progression extrem schnell, weshalb die Tiere nach vier bis sieben Tagen getötet werden mussten.

Entsprechend der Spezifität des im Ubiquitin-floxstop-TAg-Modell verwendeten Ubiquitin-Promotors, der Expression in allen Geweben ermöglichte, konnte man hier Tumorentstehung in verschiedenen Organen bzw. das Auftreten verschiedener Tumoren beobachten. Bei den diagnostizierten Tumoren handelte es sich um Fibrosarkome, Osteosarkome, Hepatokarzinome und Leukämien. In fünf von sechs tumorentwickelnden Tieren konnten Metastasen gefunden werden. In rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Tieren dauerte es neun bis elf Monate bis man Tumorentstehung feststellen konnte. Die phänotypischen Anzeichen hierfür waren Augentumoren. Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Dissertation entwickelten fünf von zwölf rekombinierten Tieren Tumoren. Der in diesem System verwendete Tyrosinase-Promotor ist exklusiv in tyrosinase-positiven Zellen der Haut und im Pigmentepithel der Retina aktiv. Dementsprechend handelte es sich bei den entstandenen Augentumoren um Melanome, was durch die Diagnose von Herrn Prof. Gröne aus der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie bestätigt wurde. Bei zwei der rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Tiere wurden außerdem Metastasen in der Lunge gefunden. Aus der dritten Tumortalie, der KeratinIV-floxstop-TAg Linie, wurden nach Verpaarung mit Cre-rekombinierenden Mäusen drei doppeltransgene Nachkommen geboren. Bislang kam es in diesen Tieren jedoch noch nicht zur Tumorentstehung.

Es wurde außerdem eine Induktor-Linie erzeugt, die Tyrosinase-CreERT²-Linie. In dieser induzierbaren Linie wurde die Expression der Cre-Rekombinase durch den Tyrosinase-Promotor kontrolliert. Das CreERT²-Protein lag in nicht-induziertem Zustand als inaktives Fusionsprotein im Cytosol vor. Die Aktivierung erfolgte durch dermale Applikation von 4-Hydroxytamoxifen (siehe Seite 11). Zur Kontrolle der gewebsspezifischen Expression wurden einzeltransgen-positive Tyrosinase-CreERT² Tiere der verschiedenen Linien mit Rosa26-Mäusen, die eine floxstop-lacZ-Kassette in allen Geweben tragen, gekreuzt. Alle, mit 4-Hydroxytamoxifen induzierten, doppeltransgenen Nachkommen zeigten eine gewebsspezifische Aktivierung des Reportergens in Haarfollikelzellen der Haut (siehe „3.1.2.2.“). Außerdem konnte keine Hintergrundexpression der Cre-Rekombinase beobachtet werden.

3.2. Entwicklung eines PTD-Cre Induktionssystems

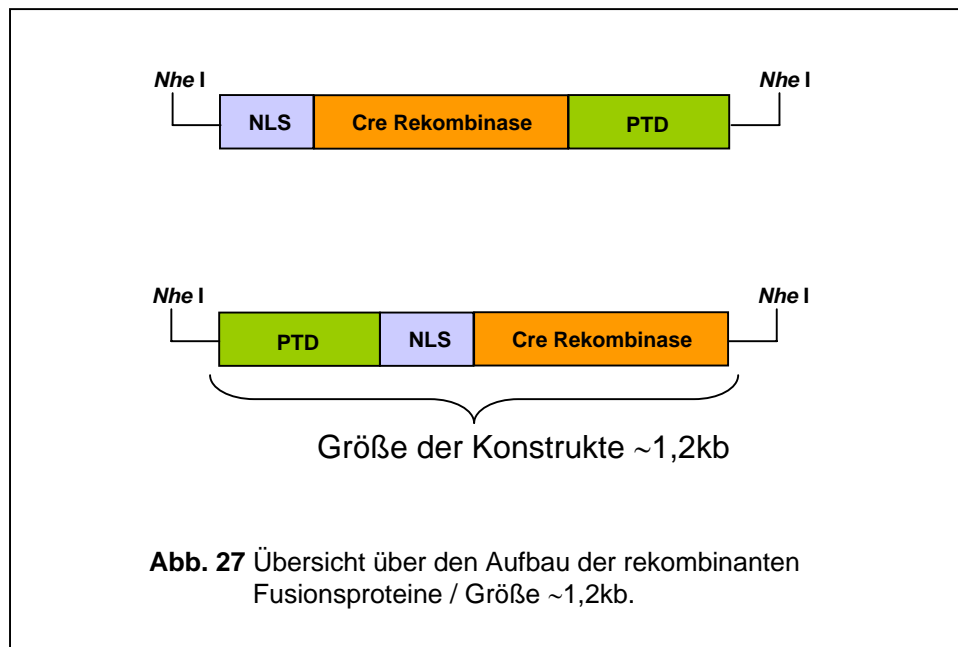
Wie in der Aufgabenstellung beschrieben, sollte ein alternatives Induktionssystem, basierend auf Fusionsproteinen, die aus einer Proteintranslokationssequenz (PTD), einer nukleären Lokalisierungssequenz (NLS) und der Cre-Rekombinase bestanden, hergestellt werden. Das Ziel der Entwicklung dieses PTD-Cre Induktionssystems lag darin, in vivo-Rekombination zu vermitteln und dadurch Tumorentstehung induzieren zu können. Ein positiver Nebeneffekt dieses Ansatzes lag in der Einsparung der zeit- und kostenaufwendigen Kreuzungsexperimente von konditionellen floxstop-TAg-Tumormäusen mit Induktor-Mäusen, da in diesem experimentellen Ansatz lediglich eine einzige konditionelle Mauslinie zur Induktion von Tumorentstehung benötigt wird. Zur Herstellung der neuen Proteine wurden mehrere unterschiedliche Genkonstrukte kloniert, in spezielle, proteinexprimierende Bakterienstämme transformiert und die gewünschten Proteine aufgereinigt. Die Unterschiede zwischen den hergestellten Proteinen lagen in der Verwendung verschiedener Translokationssequenzen. Dies waren die Peptidsequenzen des Kaposi-Fibroblast Growth Factor (KFGF), eines Argininoktamers (Arg8x), der HIV1-tat Sequenz (tat) und einer am Computer optimierten tat-Sequenz (itat = improved tat) (Ho et al. 2001). Weiterhin unterschieden sich die Fusionsproteine durch die Lokalisation der Translokationssequenzen. Diese befanden sich entweder amino- oder carboxyterminal fusioniert. Die verwendete nukleäre Lokalisationssequenz entstammte dem SV40.

Aufbau der Fusionsproteine	Sequenzen der Translokationspeptide
NLS-Cre-KFGF	AAVALLPAVLLA
NLS-Cre-Arg8x	RRRRRRRR
NLS-Cre-itat	YARAAARQARA
tat-NLS-Cre	YGRKKRRQRRR
itat-NLS-Cre	YARAAARQARA
Arg8x-NLS-Cre	RRRRRRRR
NLS-Cre	keine PTD
Cre*	

Abb. 26 Übersicht über die verwendeten Peptidsequenzen und ihre Lokalisation in den verschiedenen Fusionsproteinen. Das als Negativkontrolle verwendete Cre-Protein (*) war kommerziell verfügbar (Novagen). SV40 NLS-Sequenz = PKKKRKV.

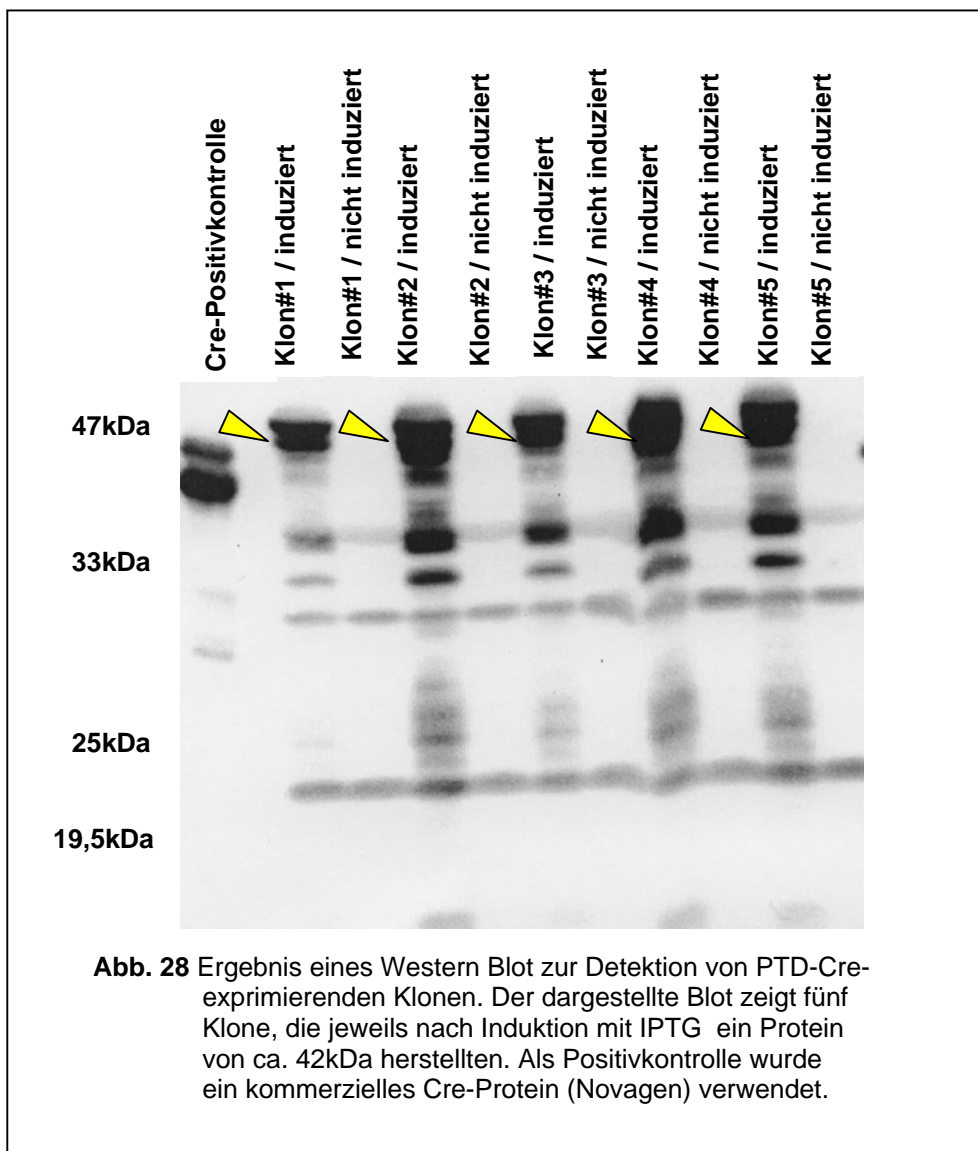
3.2.1. Klonierung der PTD-Cre Konstrukte

Die Klonierung der PTD-Cre Konstrukte erfolgte nach folgendem Schema: Zuerst wurden die einzelnen Sequenzen über Polymerasekettenreaktion mit angehängten *NheI*-Schnittstellen amplifiziert. Die Verwendung der Taq-Polymerase in der Durchführung der PCR sorgte dafür, dass die Produkte unmittelbar im Anschluss der Reaktion kurze Adenin-Thymidin-Überhänge besaßen. Dadurch konnte man sie im Anschluss direkt in den pAT-Vektor klonieren, der komplementäre Thymidin-Adenin-Überhänge aufwies. Dies hatte den Vorteil, dass man in diesem Vektor die DNA für weitere Klonierungen anreichern konnte. Die daraus resultierenden pAT-PTD-Cre-Vektoren wurden mit *NheI* verdaut und die PTD-Cre-Fragmente in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pET28a in korrekter Orientierung des Leserasters kloniert. In diesem Vektor ließ sich die Expression rekombinanter Proteine durch Induktion mit IPTG steuern und sorgte außerdem für die Synthese eines aminoterminalen Histidinpentamers (His₅-tag), das die spätere Aufreinigung der Fusionsproteine ermöglichte. Abschließend erfolgte die Transformation der Vektoren in proteinexprimierende *E.coli*-Zellen, die das Protein nach Induktion synthetisierten.

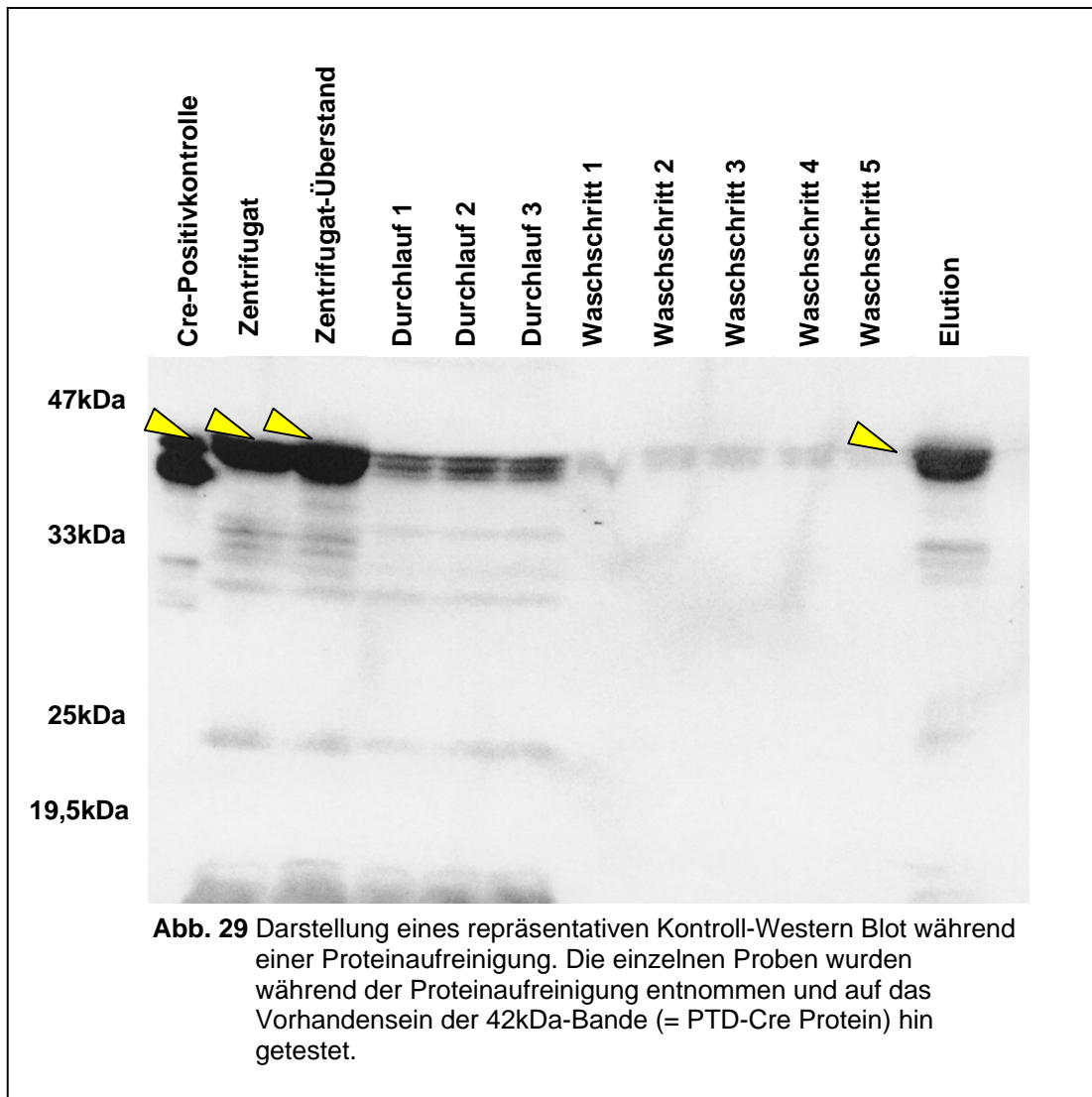


3.2.2. Ergebnisse der Proteinexpression und –aufreinigung

Zur Selektion nach proteinexprimierenden Klonen erfolgte zuerst eine Proteinexpression im Miniaturmaßstab. Im direkten Anschluss daran wurden Proben der verschiedenen Klone auf die Produktion der Fusionsproteine hin im Western Blot getestet. Die Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte unter Verwendung eines spezifischen α -Cre-Antikörpers. Klone, die nach Induktion mit IPTG das gewünschte Fusionsprotein mit einer Größe von ca. 42kDa synthetisierten, wurden als Glycerol-Dauerkultur eingefroren und dienen als Ausgangsmaterial zur Proteinherstellung.



Nach der Selektion exprimierender Klone erfolgte die Proteinexpression in größerem Maßstab. Die nachfolgende Darstellung eines Western Blot demonstriert eine repräsentative Proteinaufreinigung.



Während der Proteinaufreinigung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Diese Probenentnahmen dienten der Qualitätskontrolle und erfolgten nach Lyse und Zentrifugation der proteinexprimierenden Bakterien, aus dem Überstand der lysierten Zellen, von den verschiedenen Durchlauf fraktionen nach Passage der Nickelchelatsäule, von den Waschsritten und letztlich aus der Elutionsfraktion. Hiermit wurde überprüft, ob während der Aufreinigung reines Fusionsprotein angereichert wurde bzw. ob bestimmte Arbeitsschritte noch Verbesserungen bedurften. Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgten zwei Dialysen, um störende Salze aus der Proteinlösung zu entfernen und um das Volumen der Eluate zu reduzieren.

Die folgende Tabelle stellt die Ausbeuten an Fusionsproteinen nach Säulen- chromatographie und anschließenden Dialysen dar.

PTD-Konstrukt	[c] nach Dialyse 1	[c] nach Dialyse 2	Molarität [μM]
NLS-Cre-KFGF	1,68mg/ml 1,3mg/ml 2mg/ml	4,73mg/ml 2mg/ml nicht durchgeführt	118,25 μM 50 μM 50 μM
NLS-Cre-Arg8x	1,77mg/ml 1,8mg/ml	5,18mg/ml nicht durchgeführt	129,5 μM 45 μM
NLS-Cre-itat	1,66mg/ml 3,7mg/ml	5,14mg/ml nicht durchgeführt	128,5 μM 92,5 μM
tat-NLS-Cre	0,89mg/ml 0,58mg/ml 0,58mg/ml	1,96mg/ml 1,6mg/ml 2,12mg/ml	49 μM 40 μM 53 μM
itat-NLS-Cre	0,9mg/ml 1,48mg/ml 0,4mg/ml	1,92mg/ml 2,44mg/ml 1,08mg/ml	48 μM 61 μM 27 μM
Arg8x-NLS-Cre	0,26mg/ml 0,15mg/ml 0,31mg/ml	0,7mg/ml 0,6mg/ml 0,97mg/ml	17,5 μM 15 μM 24,25 μM
NLS-Cre	0,515mg/ml 1,4mg/ml 0,51mg/ml	1,5mg/ml 2,16mg/ml 2,07mg/ml	37,9 μM 54 μM 50,5 μM

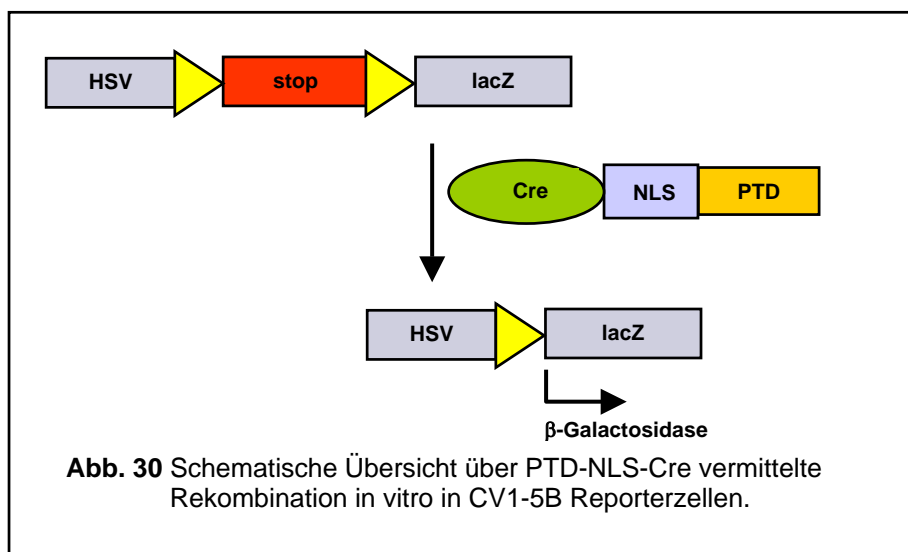
Tabelle 6 Darstellung der Proteinausbeuten nach Säulen chromatographie. Die Ausgangsvolumina der *E. coli*-Expressionkulturen betragen jeweils drei Liter. ([c] = Konzentration).

Die erzielten Ausbeuten an aufgereinigten, rekombinanten PTD-Cre Fusionsproteinen variierten sehr stark. So betrug die minimale Konzentration 0,75mg pro ein Liter Expressionskultur für Arg8x-NLS-Cre, wohingegen die maximal erreichte Menge an Protein 18,5mg pro ein Liter Expressionskultur für NLS-Cre-itat betrug. Es fiel allgemein auf, dass die Proteine mit einer carboxyterminal fusionierten Protein-Translokationsdomäne höhere Proteinausbeuten lieferten als die Konstrukte, bei denen die PTD aminoterminal lokalisiert war.

Es wurden alle sieben verschiedenen PTD-Cre Fusionsproteine in reiner Form und ausreichenden Quantitäten aufgereinigt.

3.2.3. In vitro-Rekombination in CV1-5B Zellen

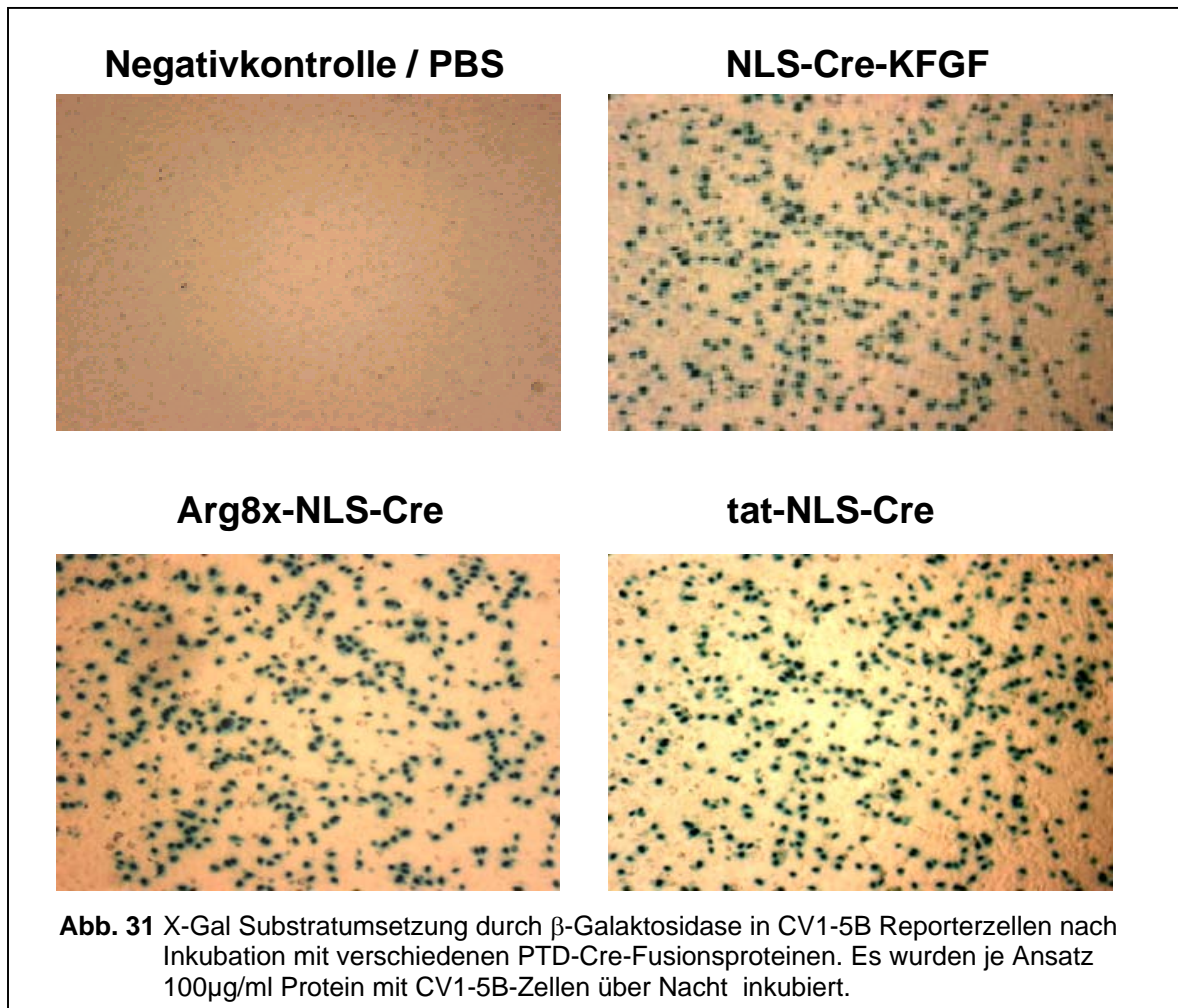
Als primäres Testsystem für die Rekombinationsfähigkeit der PTD-NLS-Cre Fusionsproteine dienten CV1-5B-Reporterzellen (Kellendonk et al. 1996). Es handelt sich dabei um Affennierenfibroblasten, die eine floxstop-lacZ Kasette tragen. Nach erfolgter Rekombination wurde dieses Reporter-gen transkribiert und man konnte Rückschlüsse auf die Effizienz der Rekombination durch die Aktivität des exprimierten Reporterproteins, der β -Galaktosidase, ziehen.



Im experimentellen Ansatz erfolgte die Exzision der floxstop-Kassette durch Inkubation der CV1-5B Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Fusionsproteinen und unterschiedlich langen Inkubationszeiträumen. Außerdem wurden Inkubationen bei 37°C und bei 4°C durchgeführt. Die immunhistochemische Detektion der Fusionsproteine wurde am Beispiel der Inkubation von Reporterzellen mit itat-NLS-Cre (siehe „3.2.2.3.1.“) und NLS-Cre-KFGF (siehe „3.2.2.3.2.“) demonstriert. Diese Experimente sollten die intrazelluläre Lokalisation der PTD-Cre Proteine zeigen und ihre Fähigkeit, in die Nuklei der Zellen zu gelangen, beweisen.

3.2.3.1. PTD-Cre vermittelte in vitro-Rekombination

Das Enzym β -Galaktosidase vermittelt die Umsetzung des farblosen Substrats X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid) zu einem blauen Farbstoff. Die Expression dieses Enzyms resultierte aus der Entfernung der Stopkassette des Reporterkonstruktes in CV1-5B Zellen und ließ Rückschlüsse über stattgefundene Rekombination in vitro zu.



In den Abbildungen kann man sehen, dass es in den mit PTD-Cre Proteinen inkubierten Zellen zu Rekombination und daraus resultierend zur Aktivierung des Reportergens gekommen war. Dies wurde durch die Umsetzung des farblosen Substrates X-Gal in einen blauen Niederschlag demonstriert. Das kommerzielle Cre-Protein, das als Negativkontrolle eingesetzt wurde, zeigte keine Reportergenaktivierung.

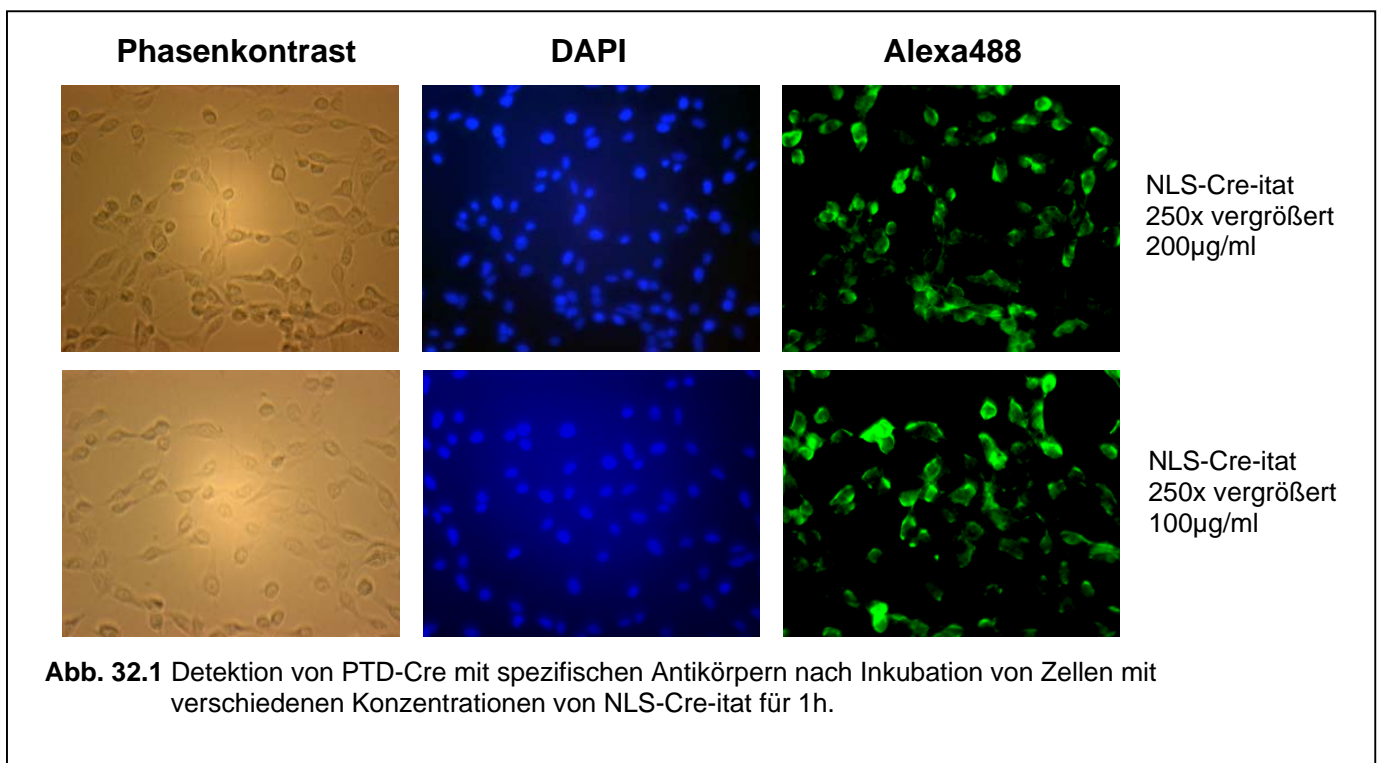
Es kam zur Substratumsetzung in Zellen, die mit PTD-Cre inkubiert wurden. Dies zeigte PTD-vermittelte Translokation und in vitro-Cre-Rekombination.

3.2.3.2. Immunhistochemischer Nachweis der Cre-Rekombinase

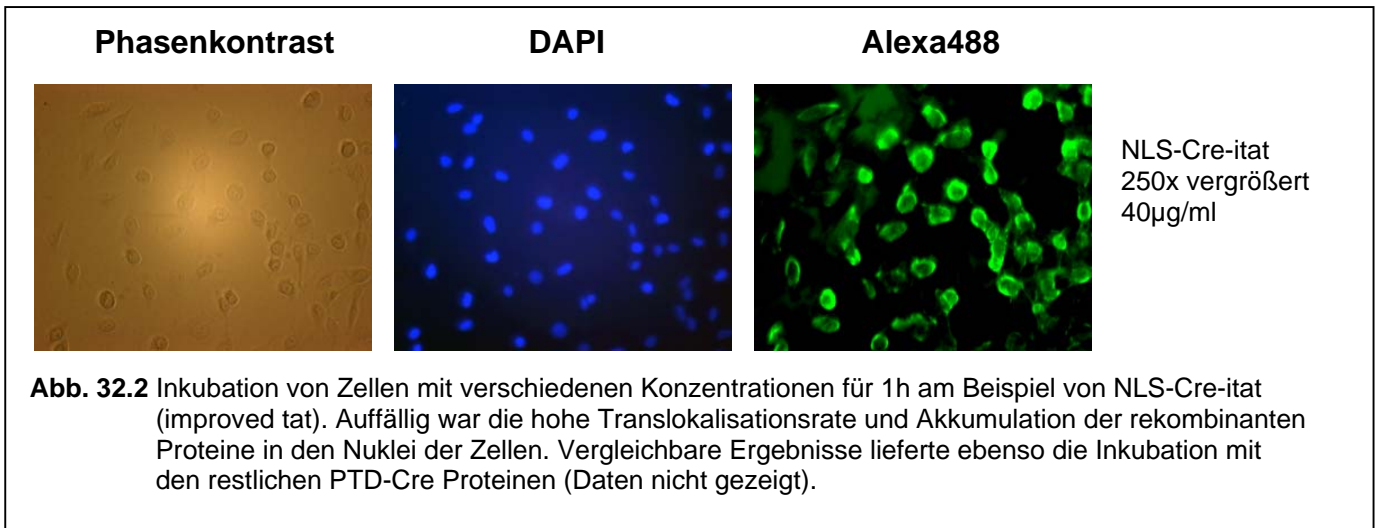
Die Detektion der intrazellulären Lokalisation der PTD-Cre Fusionsproteine erfolgte mit einem Cre-spezifischen Primärantikörper. Der verwendete Sekundärantikörper war FITC-gekoppelt und konnte als grünes Signal im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Da die Fusionsproteine eine nukleäre Lokalisierungssequenz (= NLS) trugen, sollten die Signale der DAPI (= Kern-) und der Alexa-Färbung identisch sein.

3.2.3.2.1. Konzentrationsabhängigkeit der Translokation

Zur Kontrolle, ob die rekombinanten Fusionsproteine in der Lage waren, in lebende Zellen zu translozieren, ließ ich CV1-5B-Zellen auf speziellen Objektträgern anwachsen. Danach erfolgte Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Fusionsproteine. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, gewaschen, permeabilisiert und eine Immunfärbung mit einem Cre-spezifischen Antikörper vorgenommen.



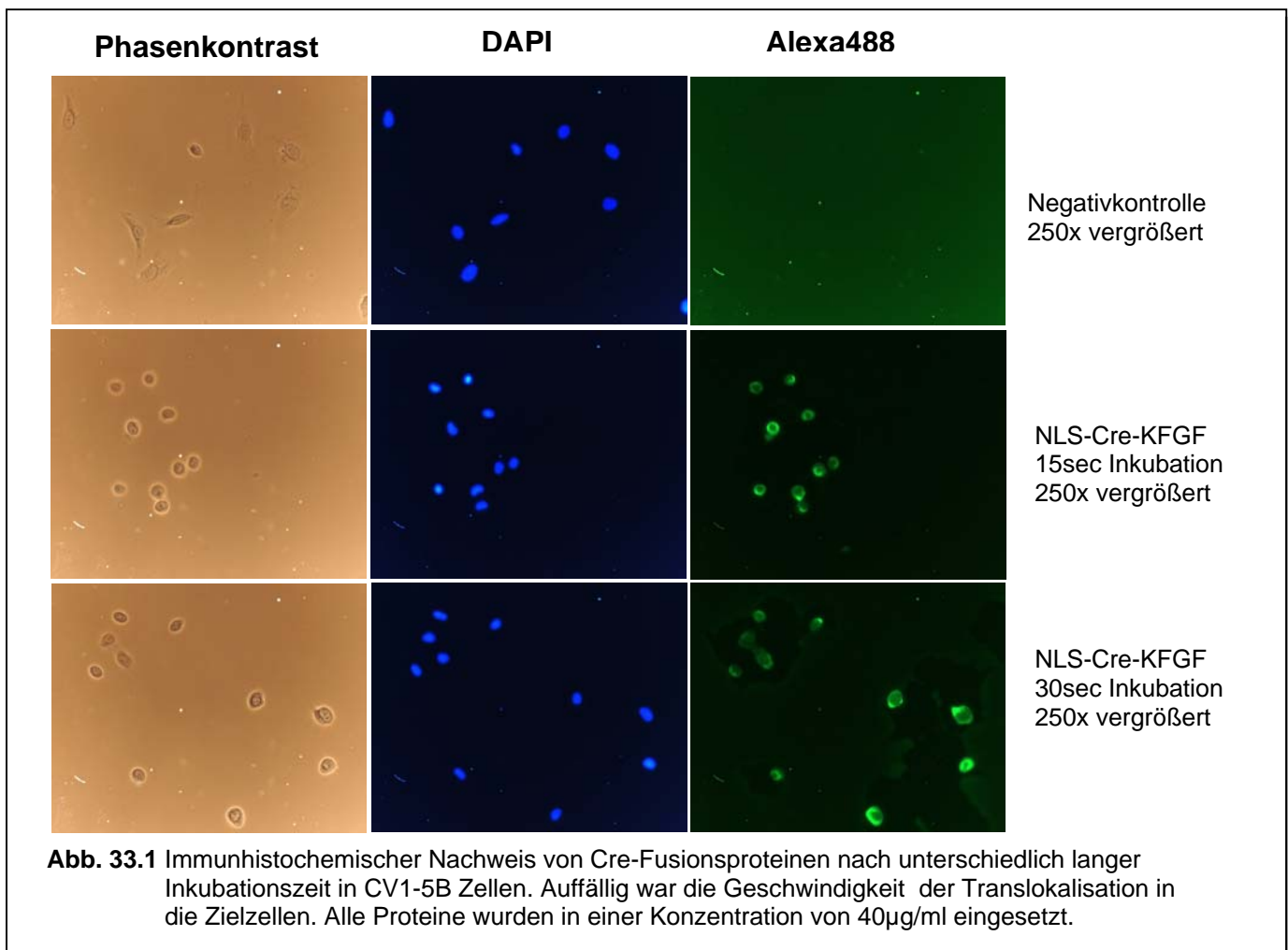
Das kommerzielle Cre-Protein, das als Negativkontrolle eingesetzt wurde, konnte nicht im immunhistochemischen Nachweis detektiert werden.

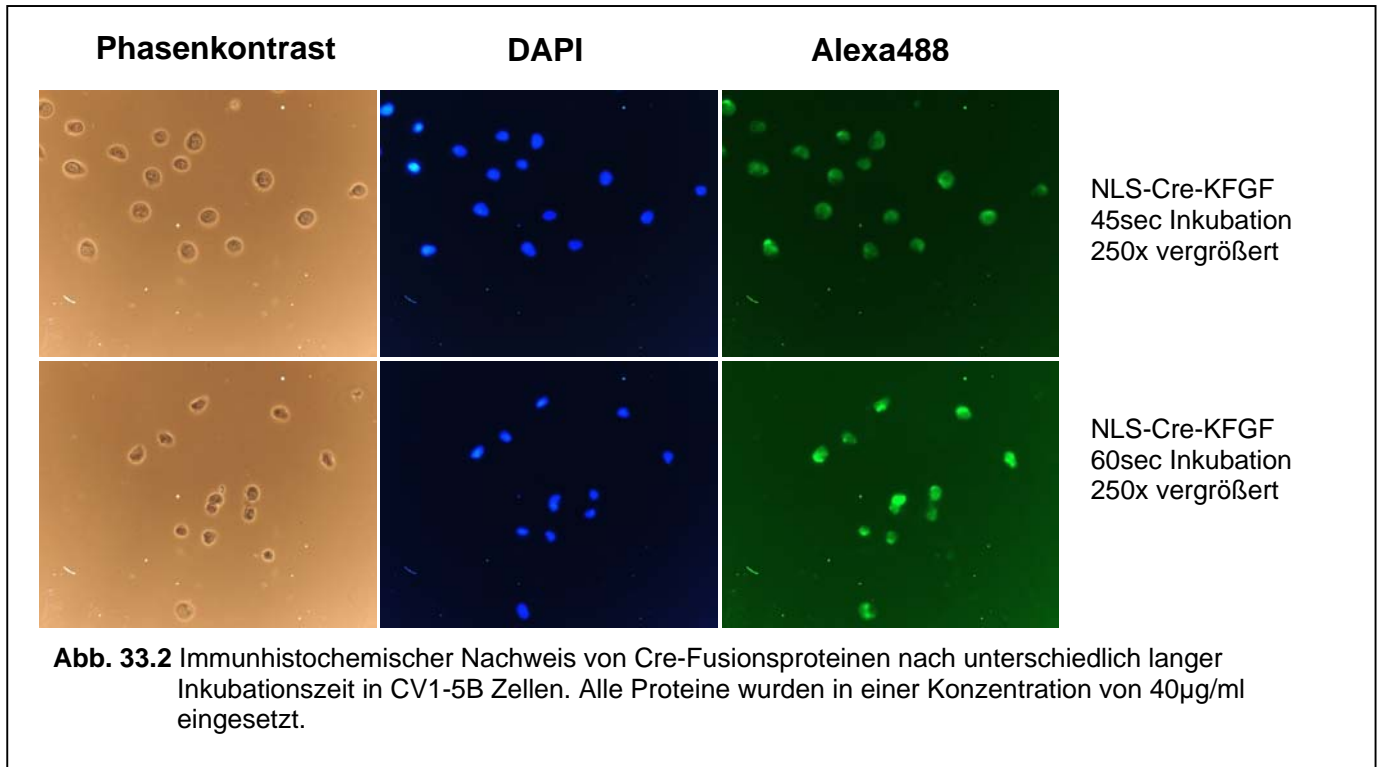


Alle Fusionsproteine translozierten in Zellen und akkumulierten in den Nuklei. Dabei gab es keine Differenzen bezüglich der Translokationsrate zwischen den verschiedenen PTD.

3.2.3.2.2. Kinetik der Translokation

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in „3.2.3.2.1.“ beschrieben.

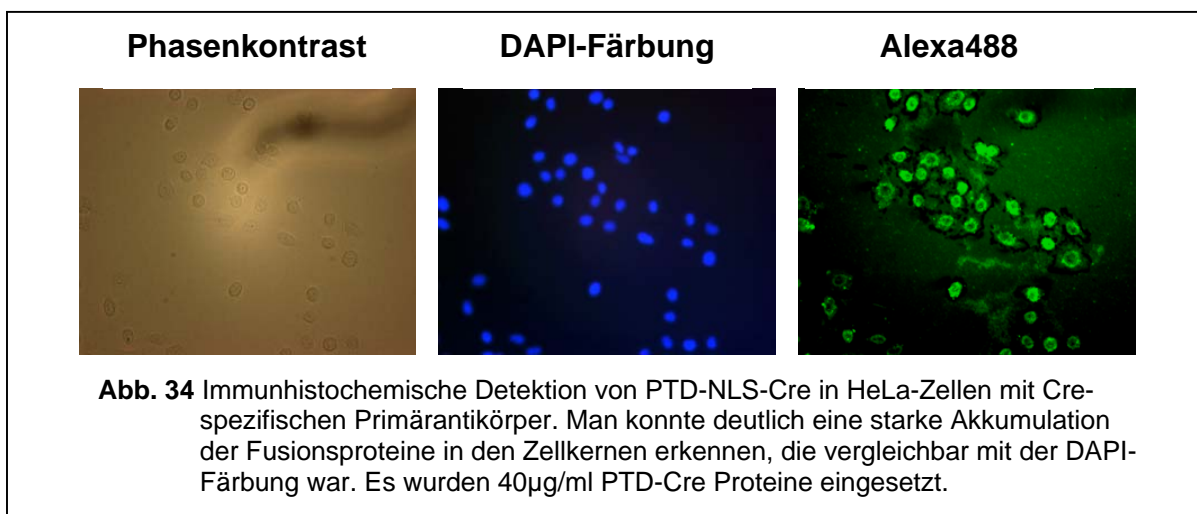




Alle Fusionsproteine translozierten in Zellen und akkumulierten in den Nuklei nach Inkubation von nur 15 Sekunden.

3.2.3.2.3. Lokalisation in HeLa-Zellen

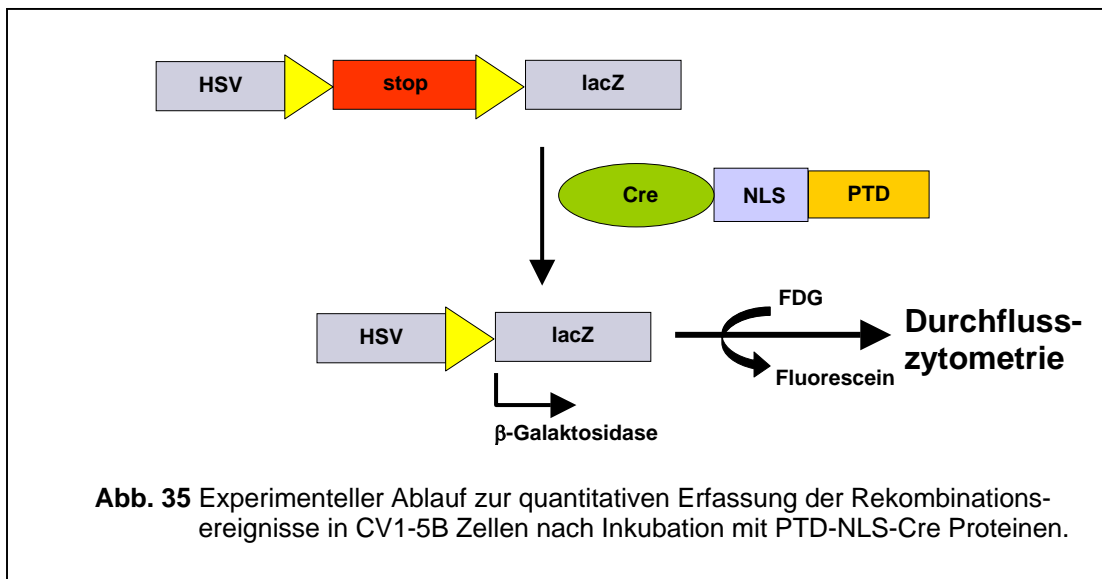
Um zu demonstrieren, dass die gezeigten Translokationsergebnisse nicht zelltypspezifisch für die benutzten CV1-5B-Zellen waren, wurden HeLa-Zellen, d. h. keine Reporterzelllinie, mit PTD-Cre Proteinen inkubiert.



Die Fähigkeit zur Translokation der Fusionsproteine war nicht auf eine bestimmte Zelllinie beschränkt.

3.2.4. Quantifizierung der Translokationseffizienz

Um die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen an PTD-Cre bzw. die Kinetik der Rekombination quantitativ zu erfassen, fand der „lacZ-FluoReporter-Assay“ (Molecular Probes) Verwendung. Hierbei wurde der farblose Zucker Fluorescein-di- β -D-Galaktopyranosid (= FDG) als Substrat durch die nach Rekombination exprimierte β -Galaktosidase in den grünen Farbstoff Fluorescein umgesetzt.



Im Unterschied zu den bereits gezeigten Fluoreszenzfotos, die die Lokalisation der Fusionsproteine demonstrierten, erfolgte in diesen Experimenten die quantitative Erfassung der Rekombinationseffizienzen der einzelnen Fusionsproteine im Durchflusszytometer. Dabei wurden sowohl die Auswirkungen verschieden hoher Konzentrationen als auch die Geschwindigkeit der Translokation erfasst. Außerdem wurden die Effizienzen der Translokation nach Inkubation bei 4°C gemessen, um mögliche Rückschlüsse auf den Translokationsmechanismus der Proteine in die Zellen (energieabhängig bzw. – unabhängig) zu erhalten.

3.2.4.1. Konzentrationsabhängigkeit der Rekombination

Zur Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Rekombination wurden Reporterzellen mit verschiedenen hohen Konzentrationen an PTD-Cre Proteinen und anschließend mit FDG-Substrat inkubiert. Danach erfolgte die quantitative Erfassung von grünen, d. h. rekombinierten, Zellen im Durchflusszytometer. Die gezeigte Negativkontrolle waren CV1-5B Zellen, die ohne PTD-Cre Protein, aber mit FDG-Substrat, inkubiert wurden, um mögliche Hintergrundrekombination zu detektieren.

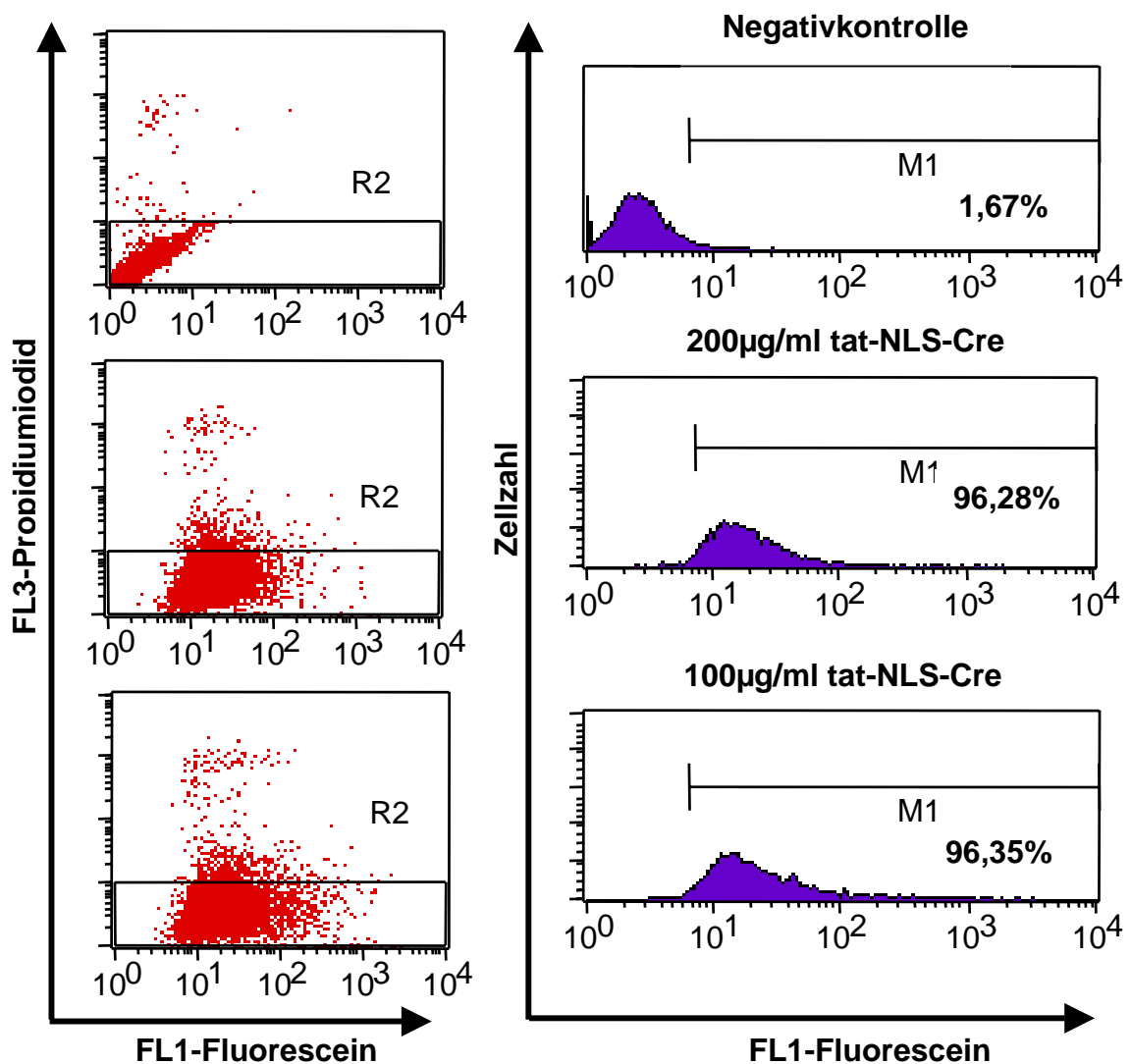
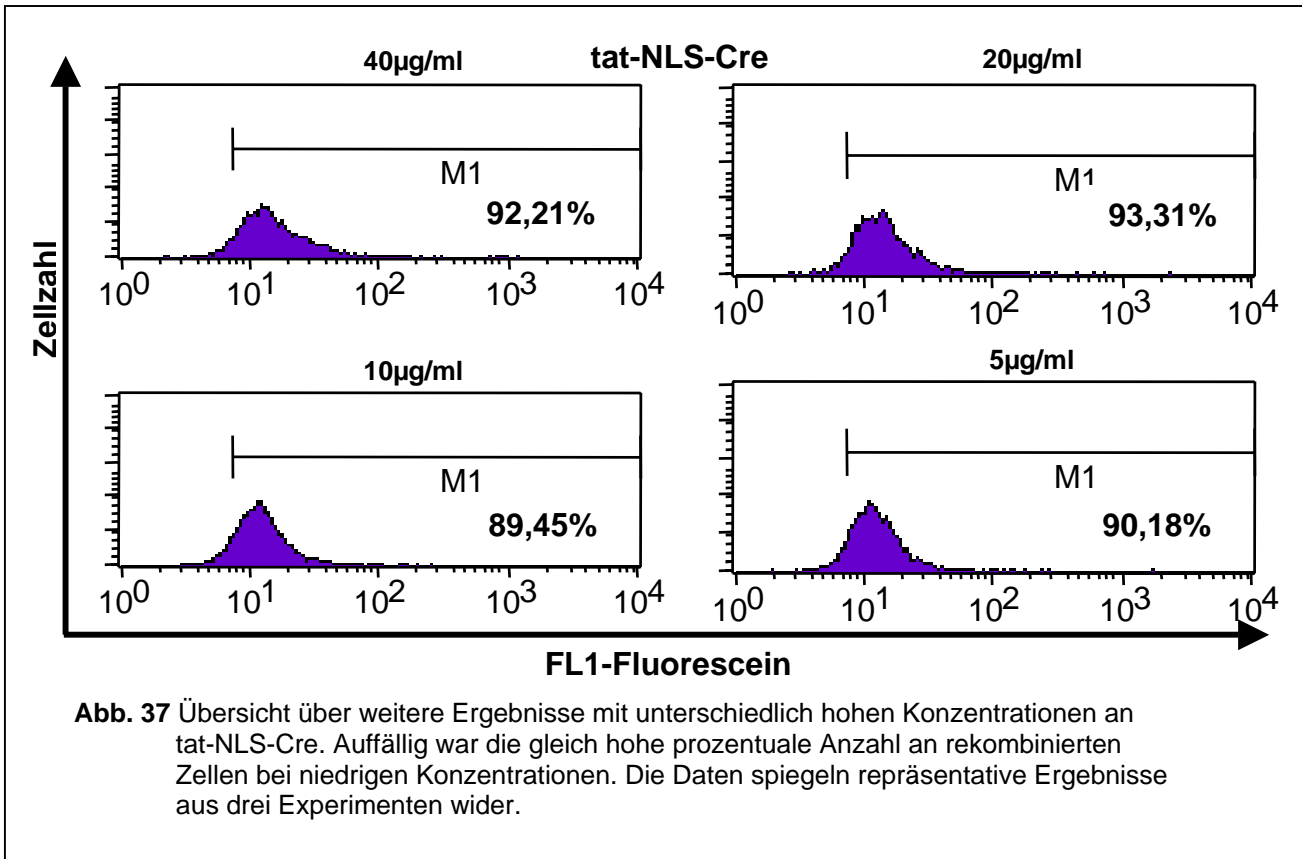


Abb. 36 Vergleich der Durchflusszytometrie-Ergebnisse von rekombinierten CV1-5B Zellen nach über Nacht-Inkubation mit 200 µg/ml bzw. 100 µg/ml tat-NLS-Cre. Deutlich erkennbar war die Zunahme an Fluorescein-positiven, d. h. an rekombinierten, Zellen, im Vergleich zu Zellen, die ohne Protein inkubiert wurden. Die Negativkontrolle wurde ohne PTD-NLS-Cre, aber mit FDG-Substrat, inkubiert um Hintergrundrekombination detektieren zu können.

Außerdem erfolgte eine Diskriminierung von lebenden und toten Zellen (= propidiumiodid-positive Zellen). Auf den Abbildungen konnte man eine eindeutige Zunahme von fluoreszierenden Zellen nach erfolgter Rekombination erkennen.



Unter Berücksichtigung der erhaltenen Werte über die Konzentrationsabhängigkeit der Translokationseffizienzen konnte man einen Vergleich der Rekombination der einzelnen Fusionsproteine in graphischer Form darstellen.

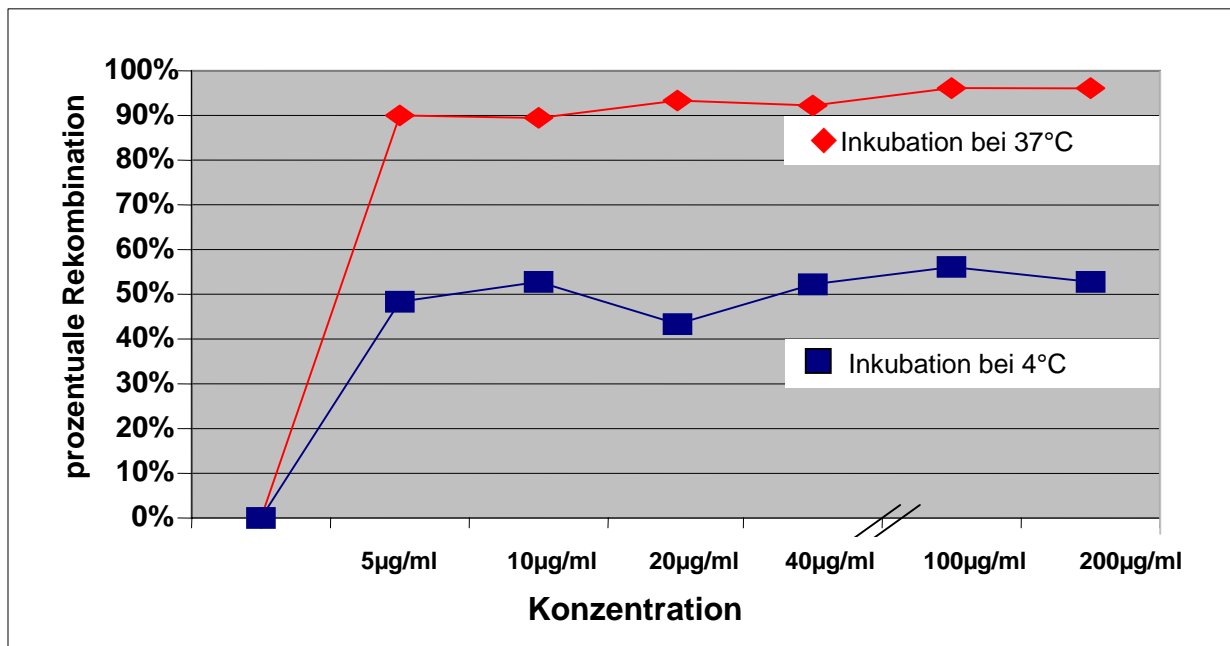


Abb. 38 Darstellung der prozentualen Rekombination in CV1-5B Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von tat-NLS-Cre bei 37°C und bei 4°C.

Ergebnisse

Dabei wurden auch Daten hinzugezogen, die Translokationsraten bei Inkubation der CV1-5B Zellen mit Proteinen bei 4°C zeigten. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass Translokation in Zellen auf rezeptor- bzw. energieunabhängigem Weg stattfand.

NLS-Cre-KFGF	[c]	4°C	37°C	tat-NLS-Cre	[c]	4°C	37°C
	5µg/ml	33,05%	60,96%		5µg/ml	48,47%	90,18%
	10µg/ml	53,05%	69,35%		10µg/ml	53,05%	89,45%
	20µg/ml	43,44%	71,08%		20µg/ml	43,44%	93,31%
	40µg/ml	54,86%	66,78%		40µg/ml	52,25%	92,21%
	100µg/ml	51,66%	55,94%		100µg/ml	56,05%	96,35%
	200µg/ml	73,63%	58,59%		200µg/ml	52,96%	96,28%
NLS-Cre-Arg8x	[c]	4°C	37°C	itat-NLS-Cre	[c]	4°C	37°C
	5µg/ml	55,92%	77,82%		5µg/ml	54,81%	93,65%
	10µg/ml	55,27%	78,95%		10µg/ml	53,64%	95,20%
	20µg/ml	61,00%	79,54%		20µg/ml	53,76%	94,84%
	40µg/ml	61,53%	75,44%		40µg/ml	47,03%	96,02%
	100µg/ml	61,01%	73,57%		100µg/ml	52,88%	93,50%
	200µg/ml	60,12%	79,43%		200µg/ml	53,36%	97,18%
NLS-Cre-itat	[c]	4°C	37°C	NLS-Cre	[c]	4°C	37°C
	5µg/ml	33,10%	92,00%		5µg/ml	53,34%	59,47%
	10µg/ml	39,17%	95,44%		10µg/ml	60,40%	58,58%
	20µg/ml	31,44%	94,16%		20µg/ml	62,89%	70,58%
	40µg/ml	55,92%	93,28%		40µg/ml	55,56%	77,04%
	100µg/ml	55,27%	94,80%		100µg/ml	66,84%	83,17%
	200µg/ml	61,00%	95,46%		200µg/ml	85,14%	81,35%
Arg8x-NLS-Cre	[c]	4°C	37°C				
	5µg/ml	56,10%	79,63%				
	10µg/ml	56,74%	82,24%				
	20µg/ml	54,69%	79,01%				
	40µg/ml	82,03%	87,52%				
	100µg/ml	76,43%	85,97%				
	200µg/ml	60,34%	80,44%				

Tabelle 7 Tabelle der quantitativen Rekombinationseffizienzen der verschiedenen Fusionsproteine nach Inkubation bei 37°C und 4°C. Die gezeigten Daten spiegeln repräsentative Ergebnisse aus drei Experimenten wider. ([c] = Konzentration).

Alle Fusionsproteine vermittelten hohe Rekombinationsraten in Reporterzellen.

Dies zeigte sich auch nach Inkubation bei 4°C. Allerdings lagen hier die Rekombinationseffizienzen unter den erfassten Werten nach Inkubation bei 37°C.

3.2.4.2. Kinetik der Rekombinationseffizienz

Die Messung der Kinetik der Rekombination erfolgte wie in „3.4.2.1.“ beschrieben. Die gezeigte Negativkontrolle waren CV1-5B Zellen, die ohne PTD-Cre Protein, aber mit FDG-Substrat, inkubiert wurden, um mögliche Hintergrundrekombination zu detektieren.

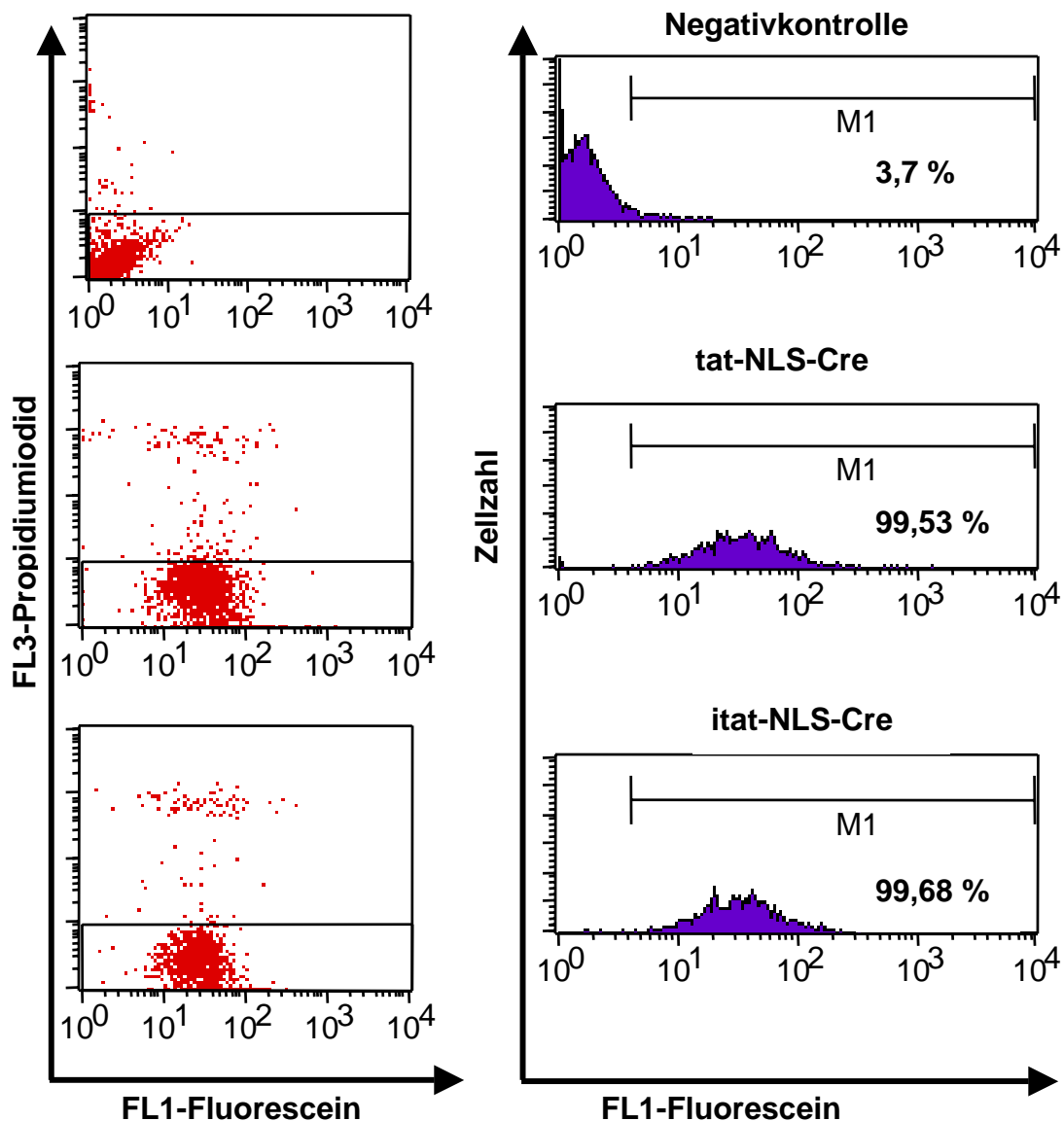
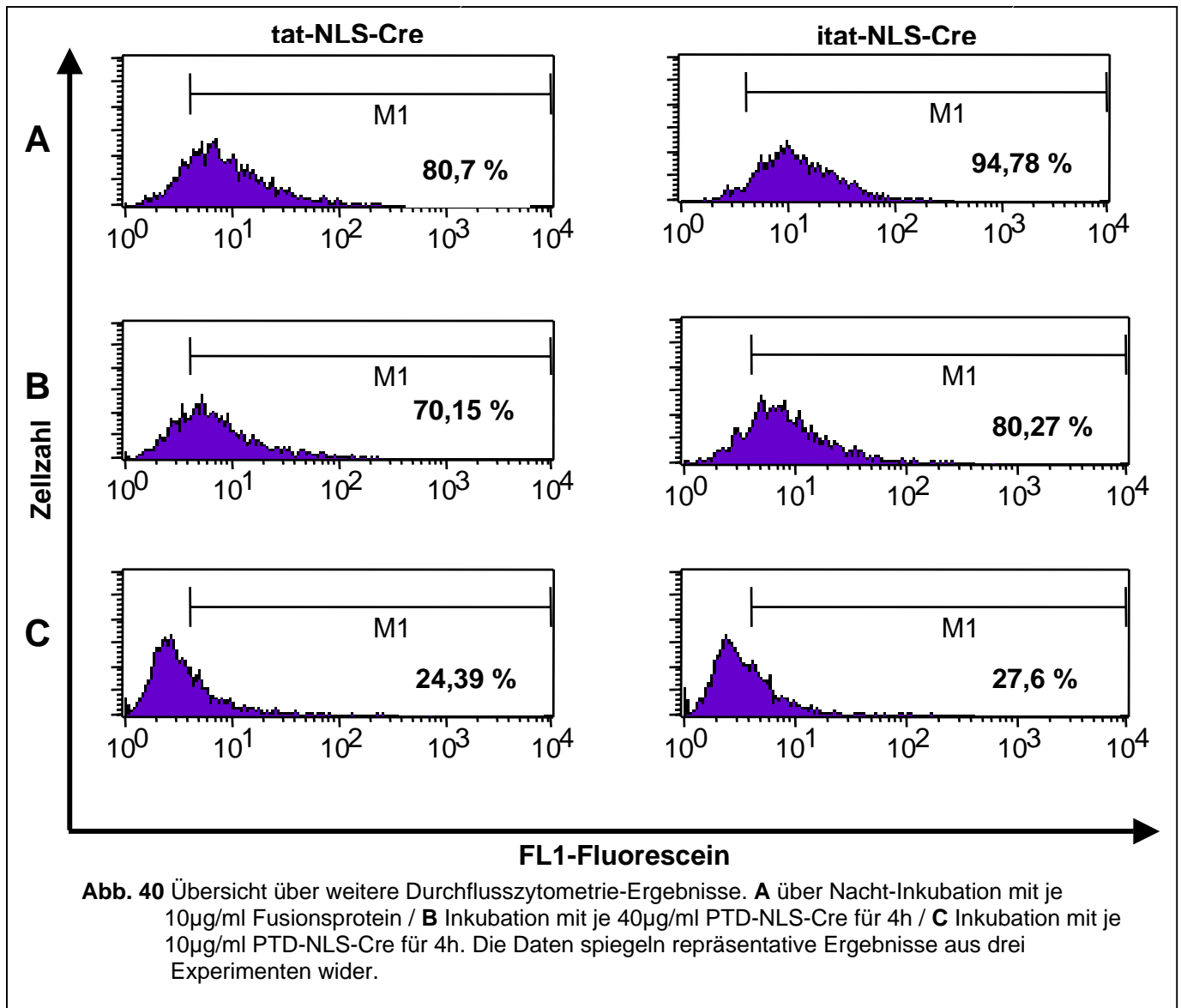


Abb. 39 Vergleich der Durchflusszytometrie-Ergebnisse von *tat-NLS-Cre* und *itat-NLS-Cre* nach über Nacht-Inkubation mit CV1-5B-Reporterzellen. Die eingesetzten Konzentrationen an Protein betragen je 40 µg/ml. Die Negativkontrolle waren CV1-5B Zellen die ohne Protein, aber mit FDG-Substrat, inkubiert wurden um mögliche Hintergrundrekombination zu detektieren.

Man konnte eine Zunahme von fluorescein-positiven, d. h. rekombinierten Zellen, nach Inkubation mit PTD-Cre-Proteinen erkennen. Außerdem erfolgte eine Diskriminierung von lebenden und toten Zellen (= propidiumiodid-positive Zellen).



Im Vergleich der Rekombinationseffizienzen von tat-NLS-Cre und itat-NLS-Cre sah man keine signifikanten Unterschiede in den Rekombinationsraten dieser beiden Proteinen. Lediglich bei über Nacht-Inkubation mit Konzentrationen von 10µg/ml und bei vierstündiger Inkubation mit 40µg/ml zeigte das itat-NLS-Cre Protein höhere Rekombinationseffizienzen als das tat-NLS-Cre Protein.

Die Darstellung der Rekombinationseffizienzen bezüglich der Kinetik der Translokation wird in Abbildung 41 gezeigt.

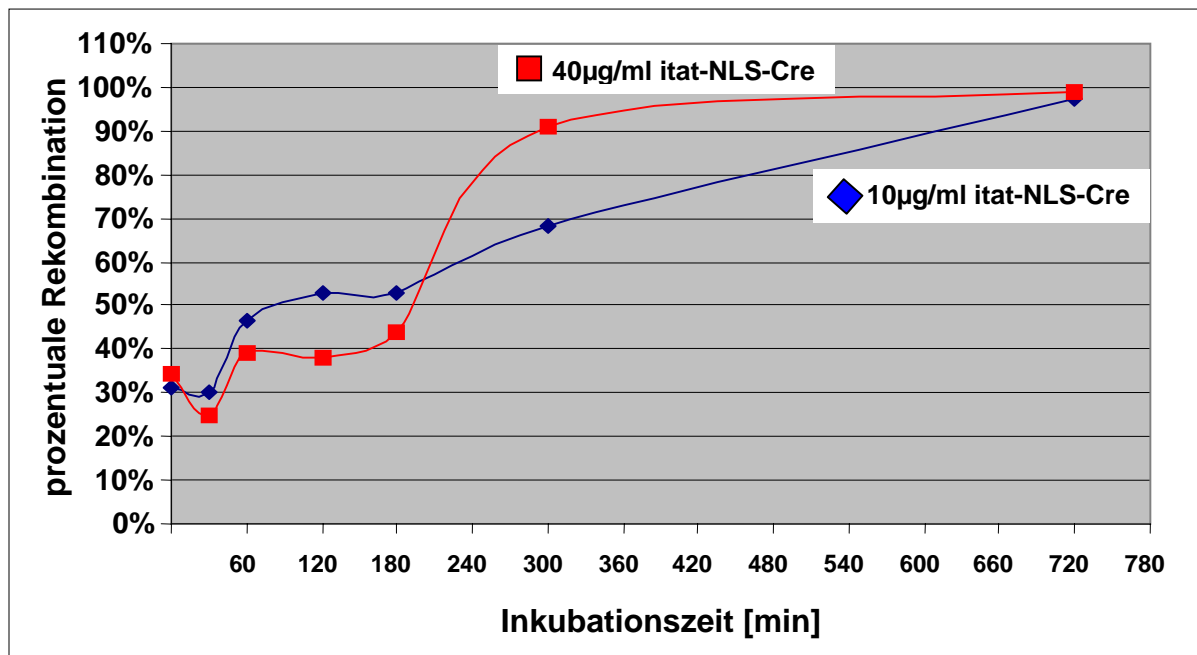


Abb. 41 Darstellung der prozentualen Rekombination in CV1-5B Zellen nach unterschiedlich langer Inkubation mit itat-NLS-Cre.

Die folgenden Tabellen zeigen repräsentative in vitro-Rekombinationseffizienzen aus drei unabhängigen Kinetikexperimenten.

NLS-Cre-KFGF	[t]	10µg/ml	40µg/ml	itat-NLS-Cre	[t]	10µg/ml	40µg/ml
	1min	29,19%	27,12%		1min	33,74%	33,36%
	30min	27,35%	16,68%		30min	33,06%	31,64%
	60min	37,11%	30,06%		60min	59,58%	49,59%
	120min	34,75%	30,48%		120min	50,34%	54,73%
	180min	35,29%	24,20%		180min	66,71%	69,39%
	300min	67,56%	92,14%		300min	72,34%	98,97%
	720min	97,46%	99,36%		720min	80,70%	99,53%

NLS-Cre-Arg8x	[t]	10µg/ml	40µg/ml	itat-NLS-Cre	[t]	10µg/ml	40µg/ml
	1min	35,74%	37,10%		1min	35,29%	32,70%
	30min	31,53%	26,89%		30min	33,33%	33,32%
	60min	37,00%	30,51%		60min	61,99%	42,07%
	120min	46,39%	38,57%		120min	55,29%	53,21%
	180min	42,61%	51,98%		180min	69,45%	56,37%
	300min	69,26%	86,20%		300min	56,73%	95,85%
	720min	96,67%	97,80%		720min	94,78%	99,68%

Tabelle 8.1 Übersicht über die quantitativen Rekombinationseffizienzen der verschiedenen Fusionsproteine nach unterschiedlich langer Inkubation. Die gezeigten Daten spiegeln repräsentative Ergebnisse aus drei Experimenten wider. ([t] = Inkubationszeit).

NLS-Cre-itat	[t]	10µg/ml	40µg/ml	NLS-Cre	[t]	10µg/ml	40µg/ml
	1min	31,30%	34,20%		1min	30,02%	35,94%
	30min	30,14%	24,86%		30min	40,13%	32,53%
	60min	46,59%	38,98%		60min	54,95%	48,95%
	120min	53,13%	37,95%		120min	57,82%	57,05%
	180min	53,07%	43,69%		180min	62,37%	63,66%
	300min	68,03%	90,98%		300min	63,37%	97,03%
	720min	97,07%	98,76%		720min	97,79%	99,83%

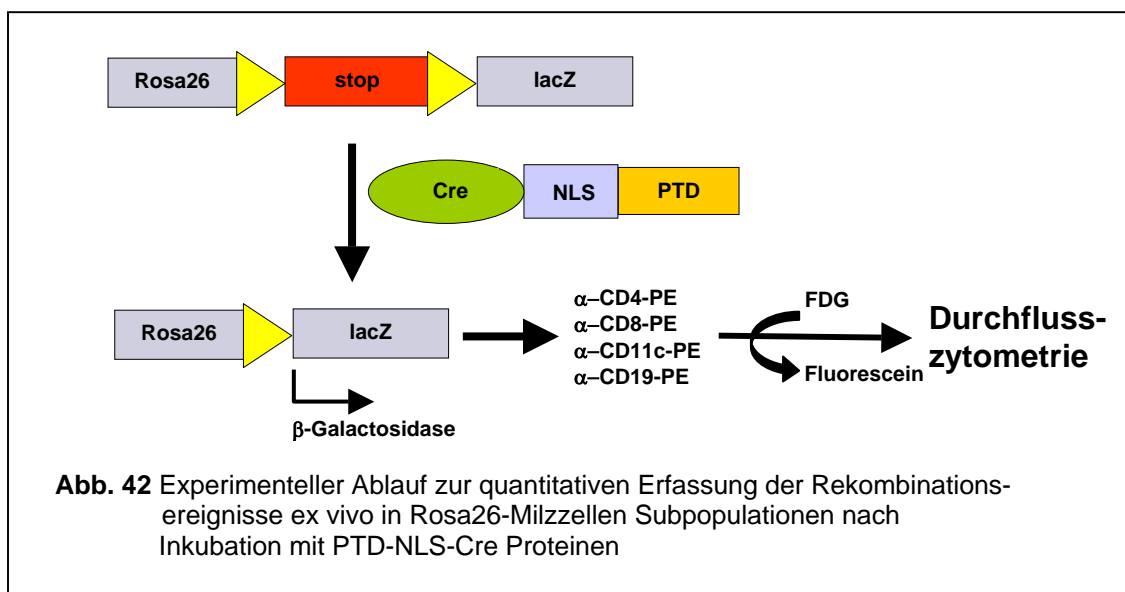
Tabelle 8.2 Übersicht quantitativer Rekombinationseffizienzen der verschiedenen Fusionsproteine nach unterschiedlich langer Inkubation. Die gezeigten Daten spiegeln repräsentative Ergebnisse aus drei Experimenten wider. ([t] = Inkubationszeit).

Die Proteine translozierten sehr schnell in die Zellen.

Erst nach Inkubationszeiten >300min zeigten die Ansätze, die mit 40µg/ml PTD-Cre inkubiert wurden, deutlich erhöhte Rekombinationseffizienzen.

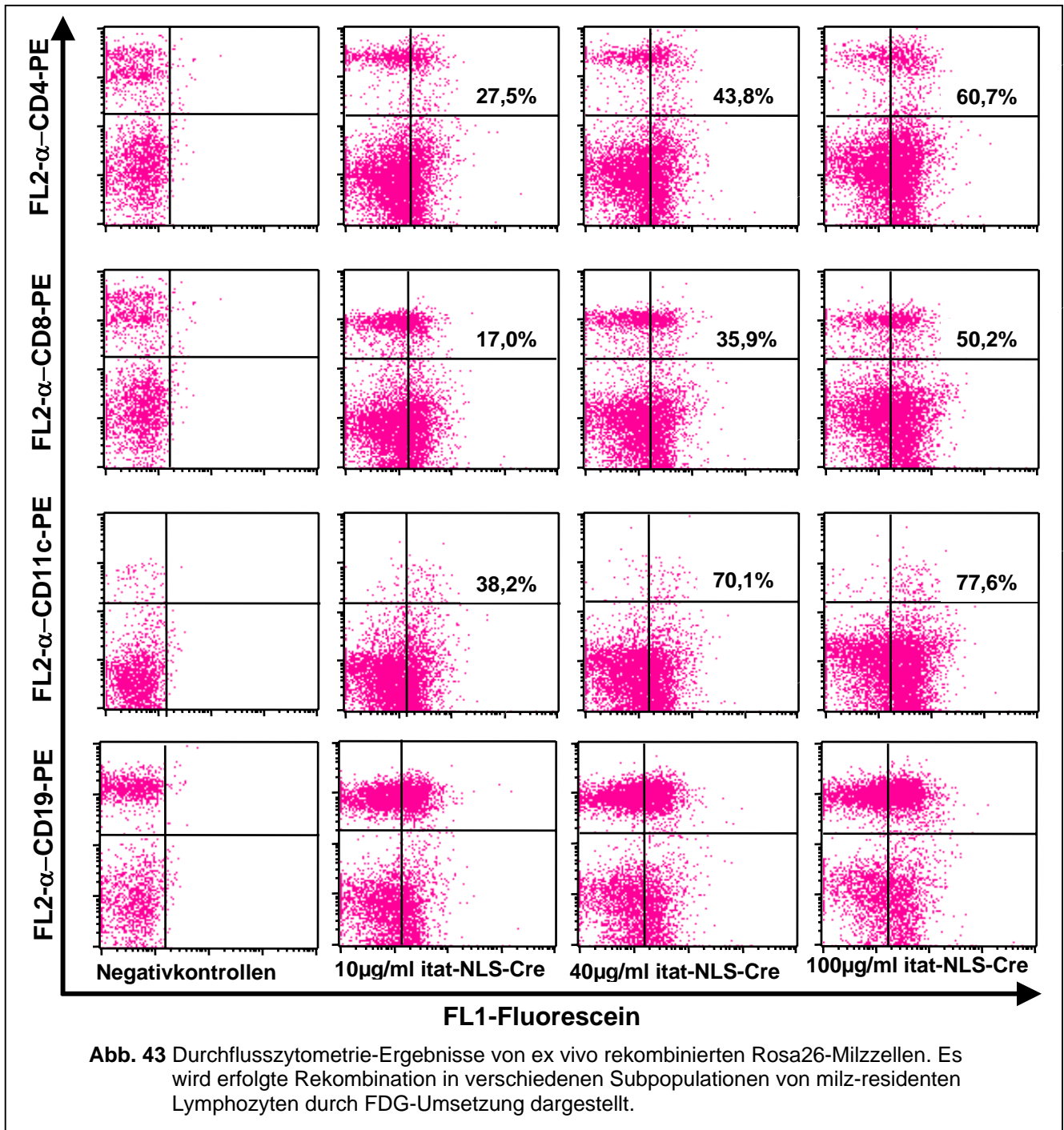
3.2.5. PTD-NLS-Cre vermittelte Rekombination ex vivo

Um zu demonstrieren, dass das neu entwickelte PTD-Cre Rekombinationssystem auch ex vivo-Rekombination in frisch isolierten primären Zellen ermöglichen konnte, wurde einer Rosa26-Maus die Milz entnommen, eine Einzelzellsuspension angefertigt und aliquotiert. Die einzelnen Proben wurden für fünf Stunden bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen an PTD-NLS-Cre inkubiert. Danach wurden die Lymphozyten-Subpopulationen mit PE-gekoppelten Antikörpern markiert, um die quantitativen Rekombinationseffizienzen der verschiedenen Zellpopulationen im Durchflusszytometer erfassen zu können.



3.2.5.1. Ex vivo-Rekombination in verschiedenen Subpopulationen von Rosa26-Milzzellen

Die dargestellten Ergebnisse der Durchflusszytometrie demonstrieren quantitative ex vivo-Rekombination in verschiedenen Subpopulationen von Rosa26-Milzzellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von itat-NLS-Cre.



Die gezeigten Negativkontrollen waren Rosa26-Milzzellen, die ohne PTD-Cre Protein, aber mit FDG-Substrat, inkubiert wurden, um mögliche Hintergrundrekombination zu detektieren.

Die Ergebnisse demonstrierten die Fähigkeit der Fusionsproteine, in frisch isolierte Primärzellen zu translozieren und Rekombination zu vermitteln. Durch das dabei aktivierte Reporter-gen und dessen Genprodukt (= β -Galaktosidase) ließ sich die Rekombinationseffizienz durch die Umsetzung eines farblosen Substrates in einen Fluoreszenzfarbstoff quantitativ erfassen. In den Abbildungen konnte man die rekombinierten Zellen in den jeweiligen rechten oberen und unteren Quadranten sehen. Von Interesse waren besonders die rechten oberen Quadranten. Dort wurde die subpopulationsspezifische Rekombination von murinen Milzzellen demonstriert. Die Prozentangaben bezogen sich dabei jeweils nur auf die jeweilige Subpopulation (CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, CD11c⁺-Dendritischen Zellen oder CD19⁺B-Zellen).

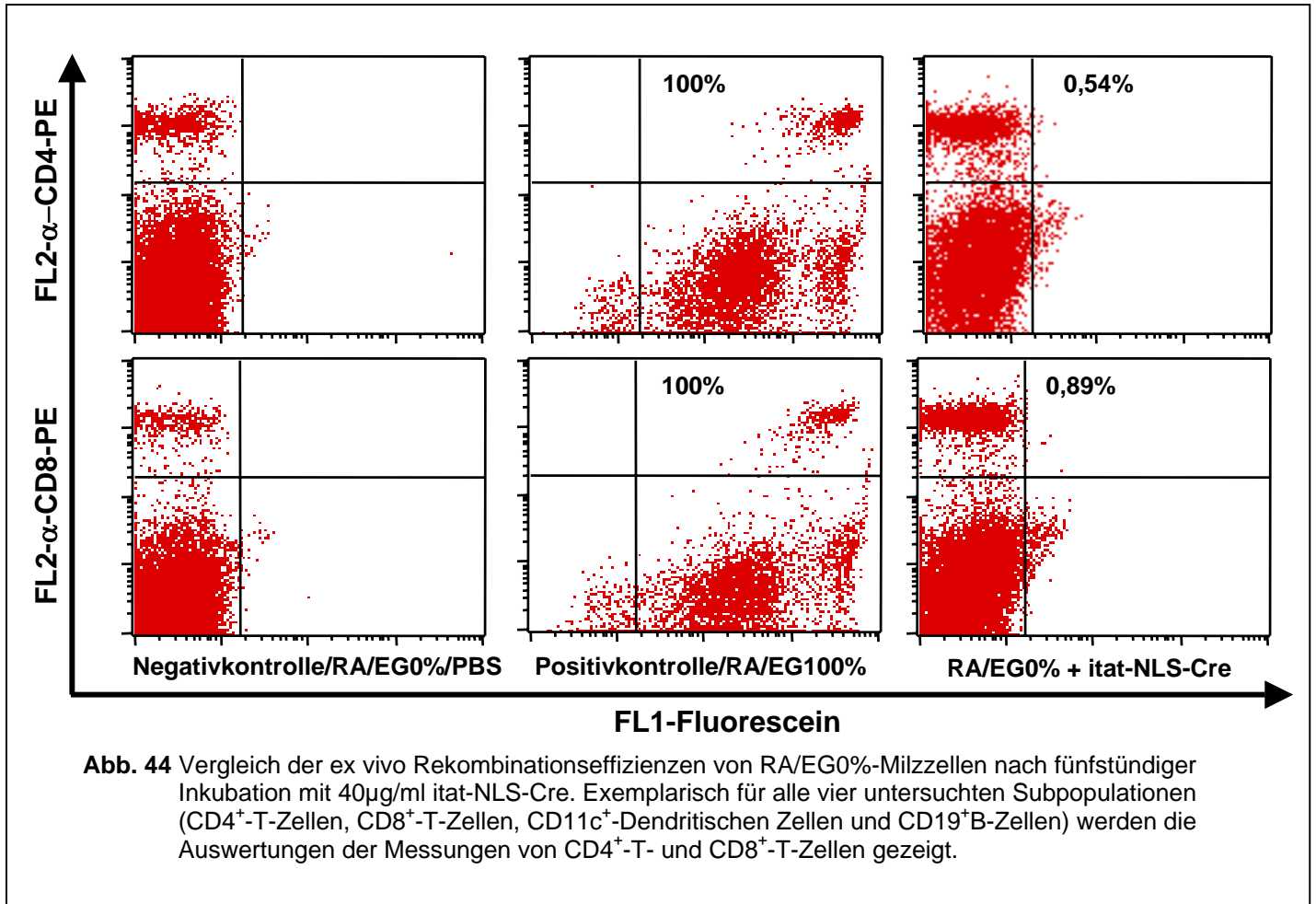
Inkubation primärer Rosa26-Milzzellen mit itat-NLS-Cre führte zu ex vivo-Rekombination.

Dabei zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Rekombination.

3.2.5.2. Ex vivo-Rekombination in verschiedenen Subpopulationen von RA/EG-Milzzellen

Um die Rekombinationsfähigkeit der PTD-Cre Fusionsproteine in einem anderen Reportersystem zu testen, wurden Milzzellen von RA/EG-Mäusen (Constien et al. 2001) ex vivo mit itat-NLS-Cre inkubiert. Diese Reportermauslinie trägt eine von loxP-Stellen flankierte Stopkassette vor dem EGFP-Gen, das aus der Leuchtqualle *Aequorea victoria* stammte. Das Genprodukt, das sogenannte „enhanced green fluorescence protein“, vermittelt eine grüne Fluoreszenz der Zellen nach erfolgter Rekombination, die man unter dem Fluoreszenzmikroskop oder im Durchflusszytometer erfassen kann. Die Reporter-kassette unterliegt der Expressionskontrolle des ubiquitär aktiven Rage-Lokus (Rage = engl. „receptor for advanced glycated end products“). Im RA/EG-Modell existieren zwei verschiedene Mauslinien. Dies sind die RA/EG0%- und die RA/EG100%-Linien. Der Unterschied zwischen den beiden Linien besteht darin, dass die RA/EG0%-Linie eine floxstop-EGFP-Kassette trägt, wohingegen die RA/EG100%-Tiere aus Verpaarungen mit Cre-rekombinierenden Mäusen entstammen und demzufolge in allen Geweben rekombiniert sind.

Die RA/EG100%-Linie diente als Positivkontrolle, da sie in allen Geweben grün fluoresziert. Zur Erfassung der ex vivo-Rekombination im RA/EG-System wurde die Milz einer RA/EG0%-Maus entnommen, eine Einzelzellsuspension angefertigt und anschließend mit Fusionsprotein inkubiert.



Nach einer Immunfärbung der Zellen sollten die einzelnen, grün fluoreszierenden Lymphozyten-Subpopulationen quantitativ im Durchflusszytometer erfasst werden. In den gezeigten Darstellungen der Durchflusszytometrie-Ergebnisse waren jeweils die rechten oberen Quadranten interessant, da sie die prozentuale Rekombinationseffizienz der einzelnen Subpopulationen von Milzzellen widerspiegeln. Allerdings konnte im RA/EG-System in vier untersuchten Subpopulationen an Milzzellen (CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, CD11c⁺-Dendritischen Zellen oder CD19⁺B-Zellen) keine Rekombination erfasst werden.

Es konnte keine Rekombination nach Inkubation von RA/EG-Milzzellen mit itat-NLS-Cre beobachtet werden.

3.2.6. Rekombination in vivo

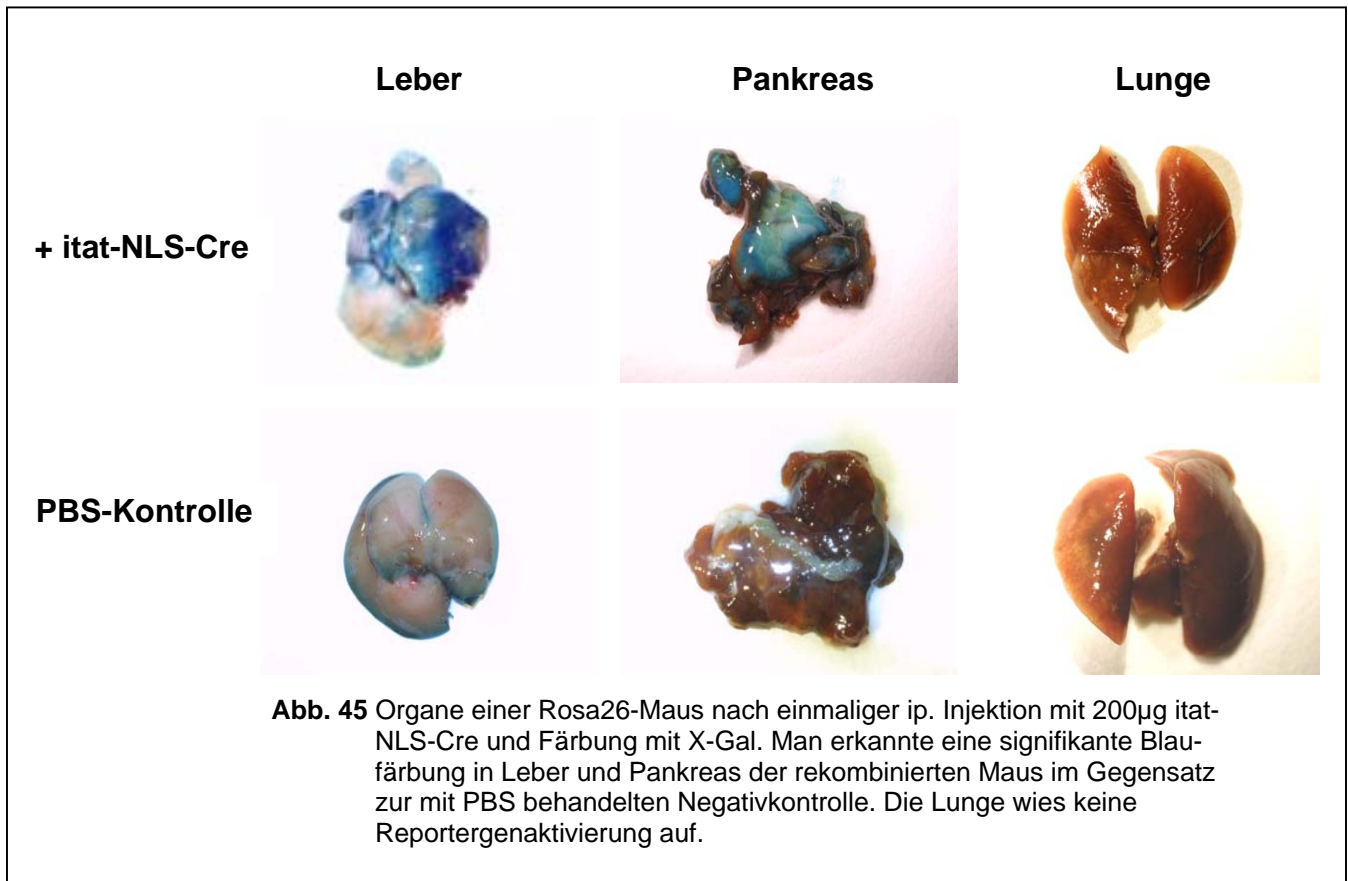
Durch Exzision einer Stopkassette und daraus resultierender Aktivierung eines Zielgens in vivo sollte die Verwendbarkeit der PTD-NLS-Cre Fusionsproteine im Tiermodell demonstriert werden. Dazu wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. So sollte die Rekombination qualitativ anhand von rekombinierten, durch Aktivierung des lacZ-Reportergens und Umsetzung des X-Gal-Substrates, blaugefärbten Organen in Rosa26-Reporter-mäusen demonstriert werden. Außerdem wurde die quantitative Darstellung der Rekombination nach Durchführung unterschiedlicher Applikationsmethoden (intraperitoneale und intravenöse Hydrodynamische Schockinjektion) von itat-NLS-Cre durch durchflusszytometrische Messung rekombinierter Zellen gezeigt. Die quantitativ untersuchten Organe und Gewebe umfassten dabei Leber, Milz, Lymphknoten und periphere Blutlymphozyten (= PBL).

Von besonderem Interesse war die Aktivierung des Reportergens in der Leber. Der Hintergrund dafür lag in der Verfügbarkeit eines induzierbaren, autochthonen Hepatokarzinom-Modellsystems. Dieses Albumin-floxstop-TAg Modell (= AST), wurde von Dr. T. Sacher (2000) aus der Abteilung für Molekulare Immunologie entwickelt. AST-Mäuse tragen eine von loxP-Sequenzen flankierte Stopkassette mit dahinterliegendem SV40 TAg-Gen unter der Expressionskontrolle des leberspezifischen Albuminpromotors. Es wurde von Sacher (2000) gezeigt, dass rekombinierte Mäuse durch TAg-Expression in der Leber Hepatokarzinome entwickelten.

In diesem System wurde Tumorentstehung bislang durch Verpaarung von Albumin-floxstop-TAg Tieren mit Cre-rekombinierenden Mäusen oder durch Applikation gentechnisch modifizierter Adenoviren, die das Cre-Gen tragen, erzielt. Dabei kam es zum Auftreten von Entzündungen, die unerwünschte Nebenreaktionen darstellten. Mit meinen PTD-Cre Proteinen sollte in Albumin-floxstop-TAg Tieren die Entstehung von Hepatokarzinomen unter Vermeidung von Entzündungsreaktionen induziert werden.

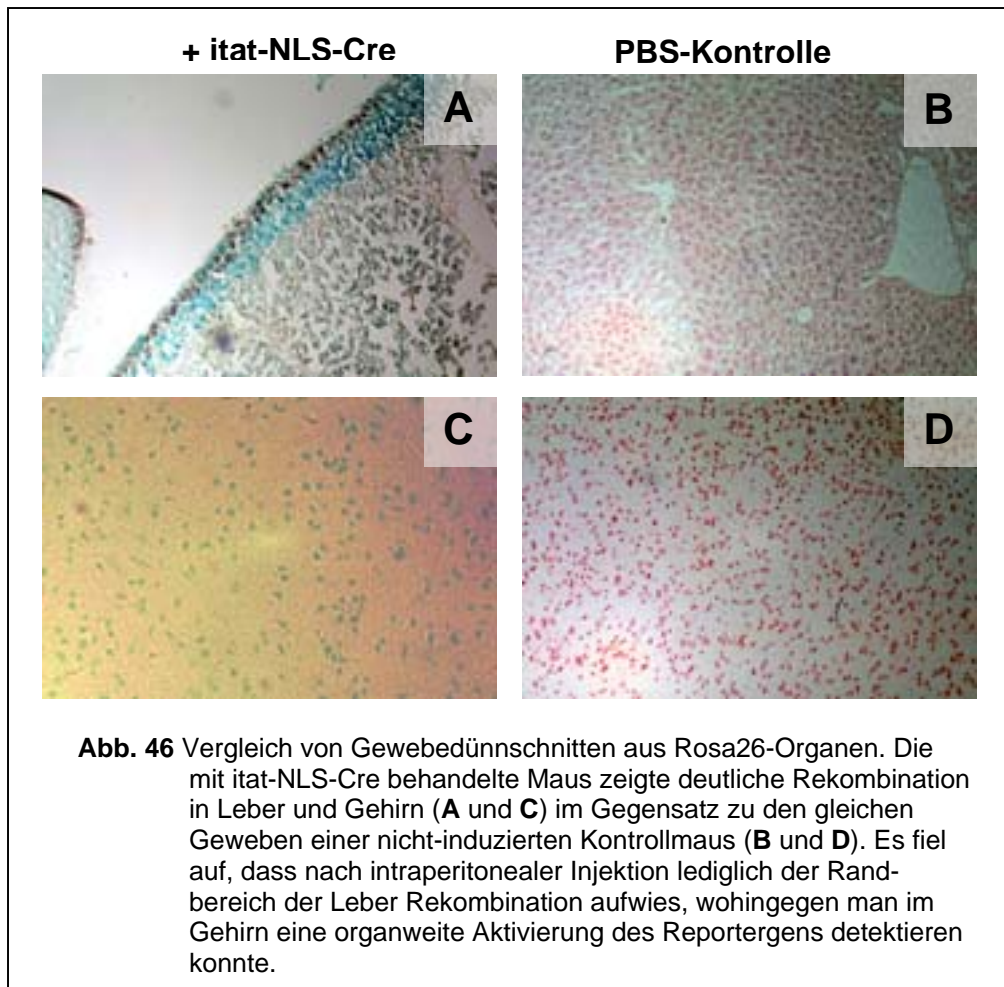
3.2.6.1. Rekombination in Organen von Rosa26-Mäusen nach intraperitonealer (ip) Injektion mit itat-NLS-Cre

Zu einem ersten Nachweis der in vivo-Rekombination der Fusionsproteine wurde einer Rosa26-Maus eine einmalige intraperitoneale Injektion mit 200µg itat-NLS-Cre in einem Volumen von 2ml PBS verabreicht. Zwei Tage nach der Injektion wurde die Maus getötet, perfundiert, die Organe (Herz, Leber, Lunge, Gehirn, Milz, Niere, Hoden und Pankreas) entnommen und in X-Gal-Substratlösung inkubiert.



Auf den gezeigten Abbildungen erkennt man eine starke Blaufärbung der Leber und eine Färbung des Pankreas. Dies war auf in vivo-Rekombination durch Injektion mit itat-NLS-Cre zurückzuführen. Es fiel auf, dass es in einigen Organen zu keiner Blaufärbung, d. h. nicht zu Rekombination, gekommen war. Dies wurde bei Herz, Lunge und Hoden beobachtet. Die restlichen untersuchten Organe (Leber, Gehirn, Milz und Pankreas) wiesen eine Aktivierung des Reportergens auf. Im Anschluss an die Färbungen wurden Dünnschnitte der Organe angefertigt.

Intraperitoneale Injektion mit itat-NLS-Cre führte zu Rekombination in Organen von Rosa26-Reportermäusen.



Die in Abbildung 45 dargestellten Gewebeschnitte zeigten, dass es nach intraperitonealer Injektion mit 200µg itat-NLS-Cre in Rosa26-Reportermäusen zu Rekombination gekommen war. Es fiel auf, dass Rekombination in der Leber hauptsächlich im Randbereich erkennbar war, im Gehirn jedoch eine nahezu organweite Aktivierung des Reportergens gezeigt werden konnte. Die Rekombination im Gehirn demonstrierte die Fähigkeit des verwendeten PTD-Cre Proteins, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Gewebe	Herz	Leber	Lunge	Gehirn
Reportergen aktiv		+++		++
Gewebe	Milz	Hoden	Pankreas	Niere
Reportergen aktiv	++		+	

Tabelle 9 Zusammenstellung der untersuchten Organe bezüglich Reporterenzymaktivität. In vier der Geweben war Rekombination in unterschiedlich starker Ausprägung detektierbar (+ = schwach / ++ = mittel stark / +++ = stark ausgeprägt).

Das injizierte Protein war in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und Rekombination im Gehirn zu vermitteln.

3.2.6.2. Rekombination in Rosa26-Mäusen nach intravenöser (iv) Hydroschock Injektion mit itat-NLS-Cre

Nach intraperitonealer Injektion mit itat-NLS-Cre konnte in vivo-Rekombination lediglich in den äußeren Zellschichten der Leber beobachtet werden.

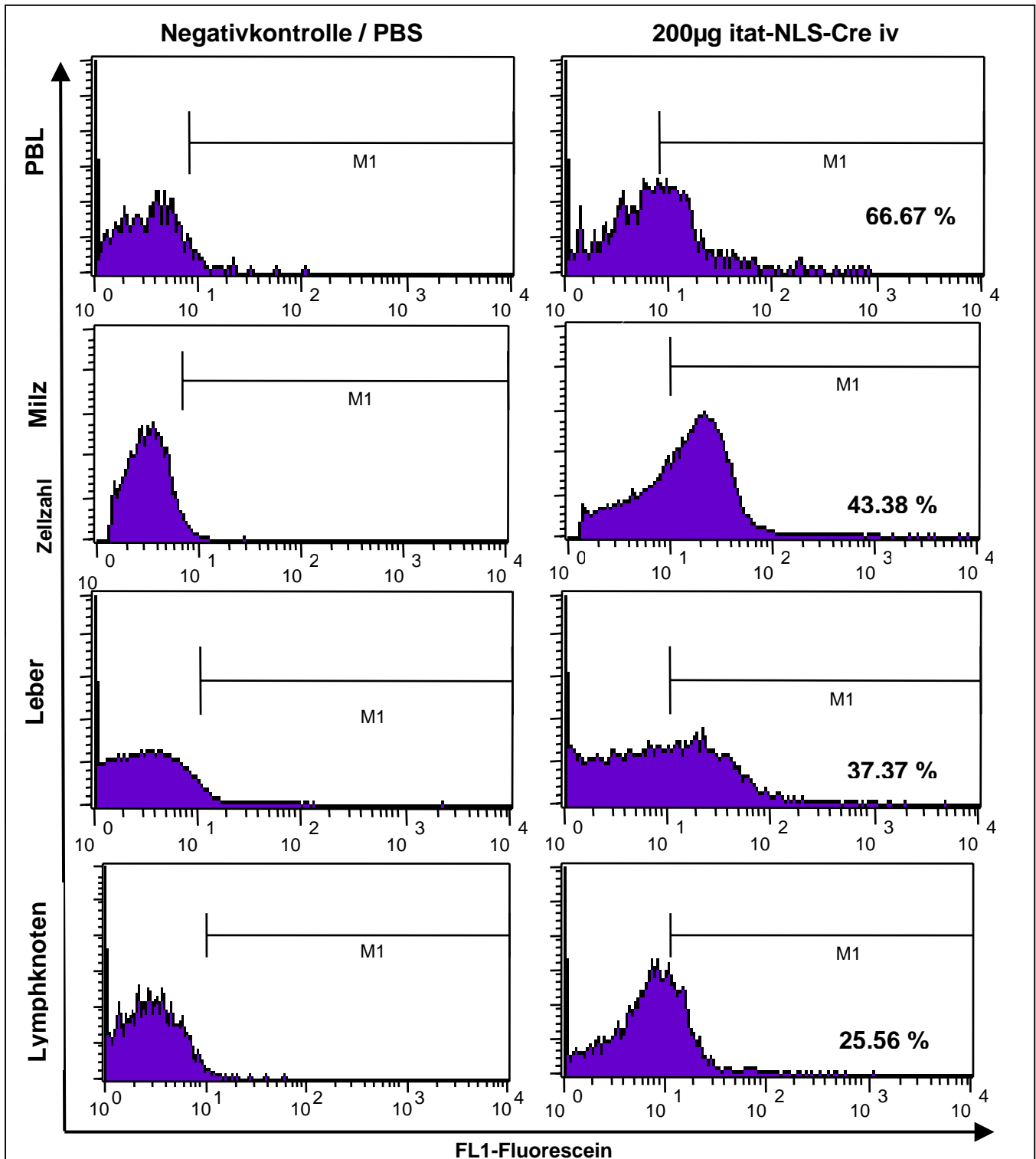


Abb. 47 Rekombination in Rosa26-PBL, Milzzellen, Leber und Lymphknoten nach intravenöser Hydroschock Injektion mit 200µg itat-NLS-Cre (improved tat-NLS-Cre). In 43,38% aller PBL, 66,67% aller Milzzellen, 37,37% der Leberzellen und in 25,56% der Zellen der Lymphknoten kam es zur Aktivierung des lacZ-Reportergens.

Eine mögliche Ursache für Substratumsetzung in den äußeren Zellschichten könnte darin liegen, dass die PTD-Cre Proteine nach intraperitonealer Injektion bzw. die X-Gal Substratlösung nicht ausreichend tief in die Gewebe eindringen konnten. Um ein stärkeres Expressionsmuster in der Leber und der Milz zu erhalten, fand daher die Hydrodynamische Schockinjektion Anwendung (siehe „2.2.3.11“). Diese Technik wurde in Publikationen beschrieben, in denen Plasmide hydrodynamisch injiziert und anschließend die Expression transfizierter Gene (z. B. Luciferase) in Leber und Milz nachgewiesen wurde (Liu et al. 1999/ Lecoq et al. 2003). Deshalb sollte es die Hydrodynamische Schockinjektion ermöglichen, PTD-Cre Proteine in großem Umfang in diese Organe zu applizieren. In meinen Experimenten wurde Mäusen ein Flüssigkeitsvolumen, das ca. 8% ihres Körpergewichtes entsprach, in einem Zeitraum unter fünf Sekunden intravenös injiziert. Dadurch kam es zu einem „Flüssigkeitsrückstau“, der durch Umleiten in dehnbare Organe, wie z. B. Leber und Milz, vom Blutkreislauf abgefangen wurde. Dadurch wurden große Mengen an PTD-NLS-Cre-Protein sehr schnell in diese Organe geschleust. Die Auswertung der Durchflusszytometriedaten nach intravenöser Hydrodynamischer Schockinjektion zeigten, dass es in den vier untersuchten Geweben (periphere Blutlymphozyten, Milz, Leber und Lymphknoten) zu Rekombination gekommen war. Dies wurde durch die Zunahme an Fluoreszenzsignalen gezeigt (vgl. Abbildung 47).

Hydrodynamische Schockinjektion mit itat-NLS-Cre führte zu Rekombination in peripheren Blutlymphozyten, Milz, Leber und Lymphknoten.

3.2.6.3. Vergleich der Rekombinationseffizienzen in vivo nach intraperitonealer und intravenöser Injektion

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in den Rekombinationseffizienzen von Milzzellen intravenöser Hydrodynamischer Schockinjektion bzw. intraperitonealer Injektion mit itat-NLS-Cre gab. Dazu wurde Rosa26-Mäusen je 200µg Fusionsprotein entweder intravenös (iv) oder intraperitoneal (ip) injiziert. Nach zwei Tagen wurden die Mäuse getötet, die Milzen und Lebern entnommen und, wie bereits in „3.2.5.“ beschrieben, aufbereitet. Man sah die rekombinierten Zellen in den rechten oberen und unteren Quadranten der einzelnen Abbildungen.

Um in diesem Experiment rekombinierte Milzzell-Subpopulationen zu erfassen, erfolgte eine selektive Antikörperfärbung von CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und CD11c⁺-Dendritischen Zellen. Außerdem wurden die Rekombinationseffizienzen in Hepatozyten nach intraperitonealer und intravenöser Injektion miteinander verglichen. Die prozentualen Ergebnisse der Durchflusszytometrie beziehen sich in Abbildung 48.1 jeweils auf die rechten oberen Quadranten. Dort liegen die Signale der rekombinierten Subpopulationen von Milzzellen.

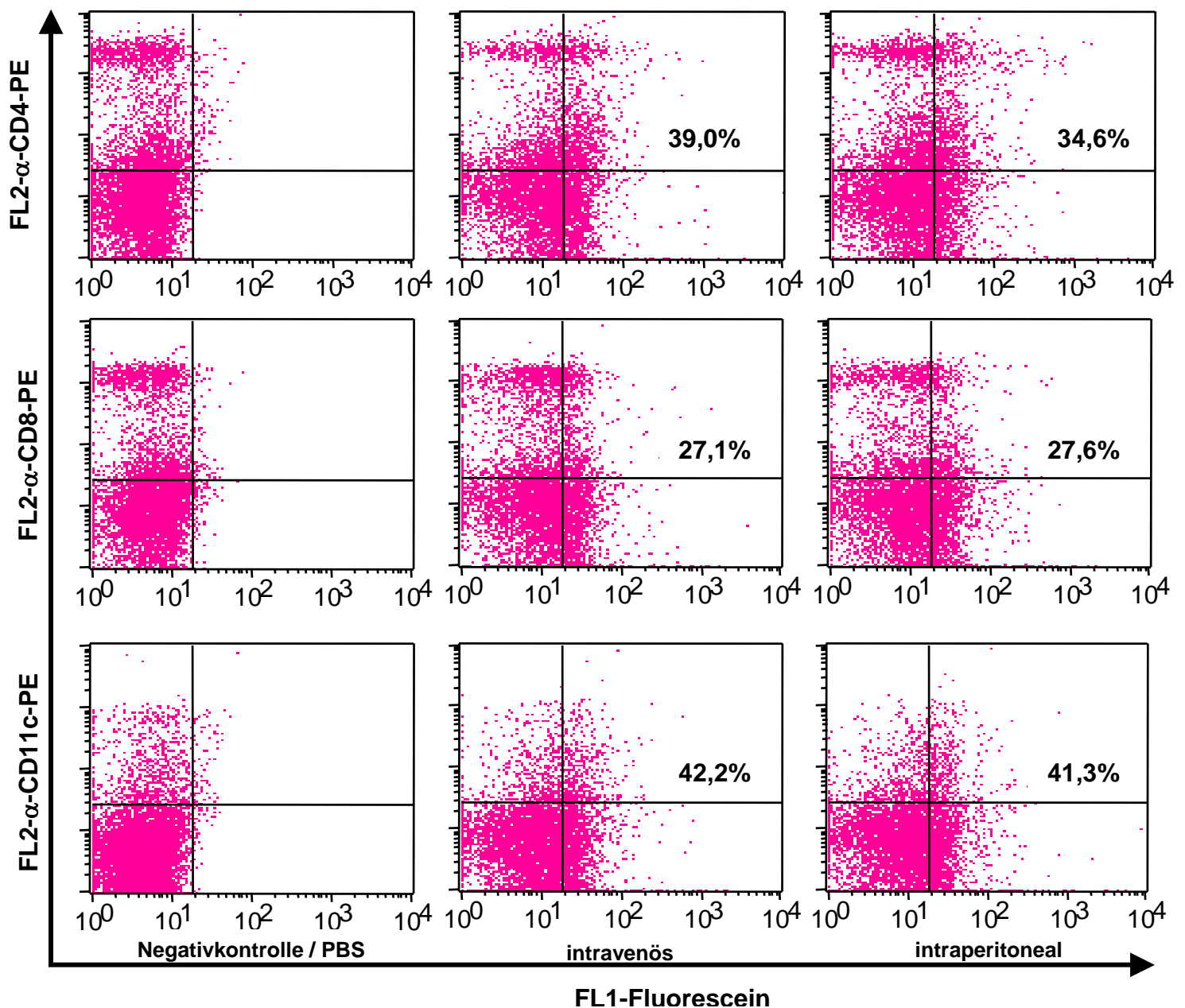


Abb. 48.1 Vergleich der in vivo-Rekombinationseffizienzen nach intravenöser (iv) und intraperitonealer (ip) Injektion von 200µg itat-NLS-Cre in CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und C11c⁺-Dendritischen Zellen der Milz.

Die gezeigten Negativkontrollen waren Rosa26-Milzzellen bzw. Hepatozyten, die ohne PTD-Cre Protein, aber mit FDG-Substrat, inkubiert wurden, um mögliche Hintergrundrekombination zu detektieren. Die Signale der rekombinierten Hepatozyten in Abbildung 48.2 liegen im rechten unteren Quadranten. Die Prozentangaben spiegeln die Rekombinationseffizienzen nach unterschiedlicher Applikation der itat-NLS-Cre Proteins wider. Die Auswertung der Durchflusszytometriedaten zeigte unterschiedlich hohe Rekombinationseffizienzen zwischen den einzelnen Subpopulationen der untersuchten Milzzellen. Allerdings lagen die Werte der intravenösen und intraperitonealen Applikationen der Proteine im Vergleich der jeweiligen Zelltypen sehr nahe beieinander, sodass keine signifikanten Unterschiede in der Applikationsmethode ersichtlich waren.

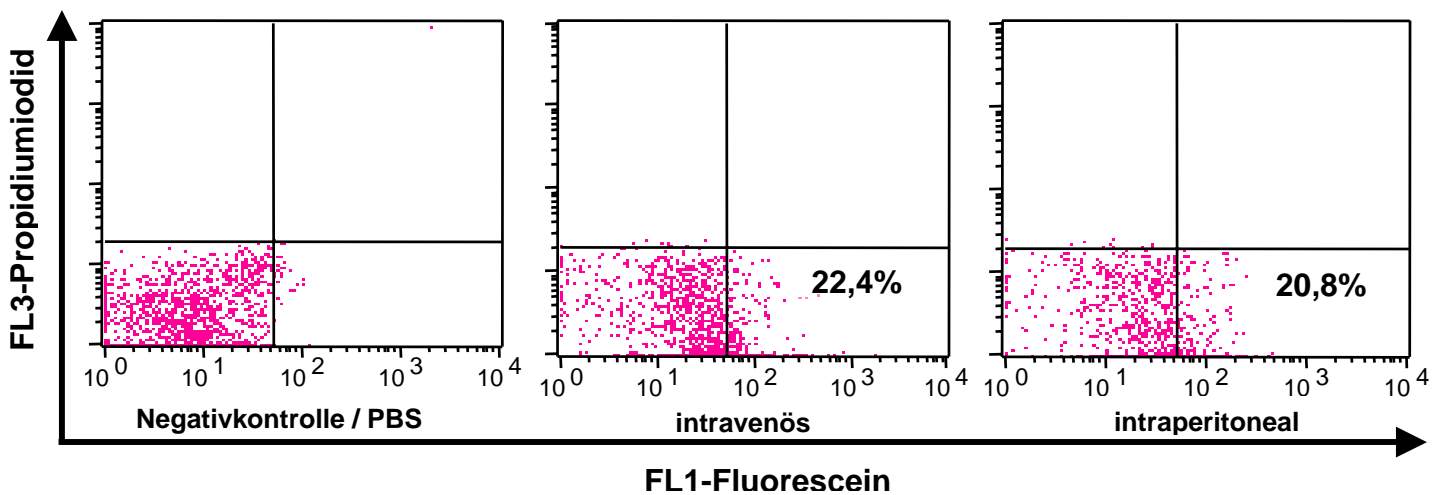


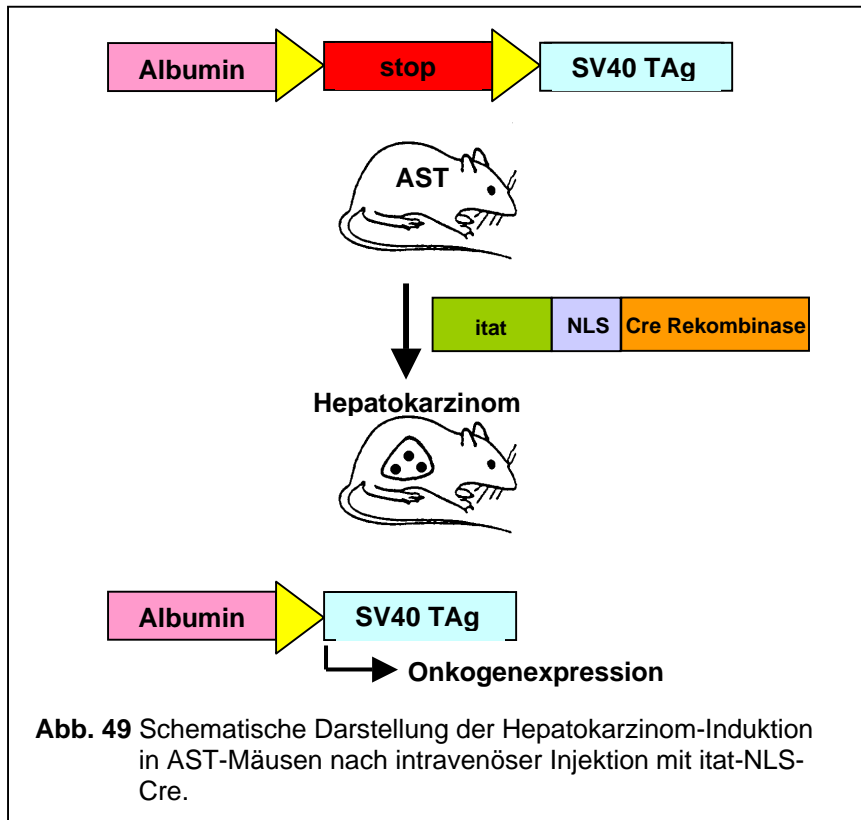
Abb. 48.2 Vergleich der in vivo-Rekombinationseffizienzen nach intravenöser (iv) und intraperitonealer (ip) Injektion mit 200µg itat-NLS-Cre in Rosa26-Hepatozyten.

Auf den hier gezeigten Abbildungen sieht man die quantitativen Rekombinationseffizienzen in Hepatozyten. Wie bereits beim Vergleich der Durchflusszytometriedaten der verschiedenen Subpopulationen von Milzzellen gezeigt wurde, waren auch in Leberzellen keine signifikanten Unterschiede zwischen intravenöser und intraperitonealer Injektion erkennbar. Somit ließ sich sagen, dass die Applikationsmethode keinen Einfluss auf die Rekombinationseffizienz in vivo hat.

Sowohl intraperitoneale als auch intravenöse Hydrodynamische Schockinjektion mit itat-NLS-Cre in Rosa26-Reportermause führte zu vergleichbar hohen Rekombinationseffizienzen.

3.2.7. Induktion von Hepatokarzinomen in vivo im Albumin-floxstop-TAg Modell (AST-Modell)

Ein Ziel der Entwicklung der rekombinanten Translokationsproteine, die Induktion von gewebsspezifischen, autochthonen Tumoren, sollte im Albumin-floxstop-TAg Modell demonstriert werden. Um die Entstehung von Hepatokarzinomen zu induzieren, erhielten AST-Mäuse intravenöse Injektionen mit itat-NLS-Cre.



Dazu wurden zwei Gruppen mit je drei AST-Mäusen gebildet :

- einmalige Hydrodynamische Schockinjektion von 200µg itat-NLS-Cre,
- dreimalige Hydrodynamische Schockinjektion von 3x200µg itat-NLS-Cre.

3.2.7.1. Darstellung der Alanin-Aminotransferase-Titer (ALT) im Blut von AST-Mäusen nach Injektion mit itat-NLS-Cre

Kommt es zu einer Leberschädigung, z. B. infolge von Tumorbildung, so werden erhöhte Mengen des Enzyms Alanin-Aminotransferase (= ALT) in das Blut abgegeben. Durch Messung der ALT-Titer in mit itat-NLS-Cre behandelten Tieren ließ sich die Tumorprogression nach erfolgter Induktion anhand eines Anstiegs der Enzymwerte im Blut verfolgen. Dazu wurde den behandelten Tieren im Abstand von je sieben Tagen Blut aus der Schwanzvene abgenommen. Diese Proben wurden anschließend auf ALT-Messstreifen pipettiert, die danach vollautomatisch im „Reflovet“ ausgewertet werden. Dabei dienten Anstiege der ALT-Titer im Blut über eine Schwelle von ca. 60U/l über mehrere Proben hinweg als Anzeichen für eine Leberschädigung durch Tumorentstehung.

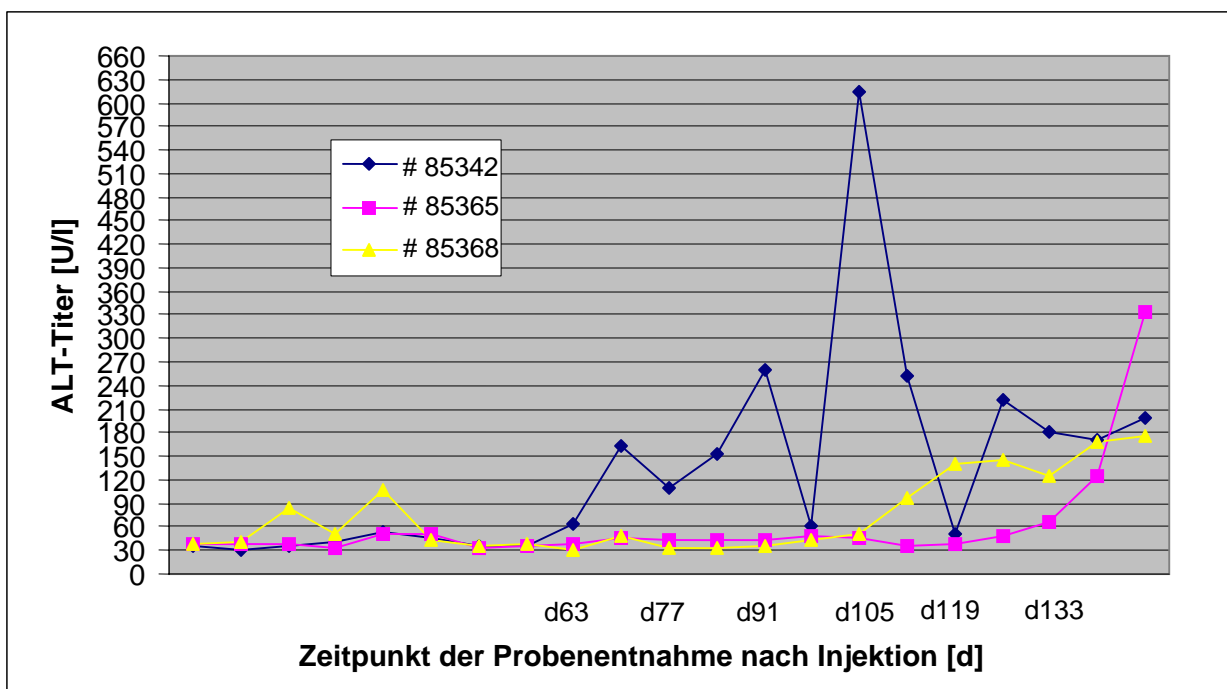


Abb. 50 Darstellung der ALT-Titer in AST-Tieren aus Gruppe I, die eine einmalige Injektion mit 200µg itat-NLS-Cre erhielten.

Innerhalb der ersten Gruppe fiel besonders das Tier #85342 auf, das ALT-Werte bis zu 614U/l aufwies und auch sonst deutlich erhöhte Enzymwerte ab d63 zeigte. Die beiden weiteren Tiere dieser Gruppe zeigten steigende Enzymwerte ab d105 (#85368) bzw. d119 (#85365) nach Injektion. Als Negativkontrolle diente AST-Maus #85354. Die Enzymwerte dieses Tieres sind in Abbildung 51 dargestellt.

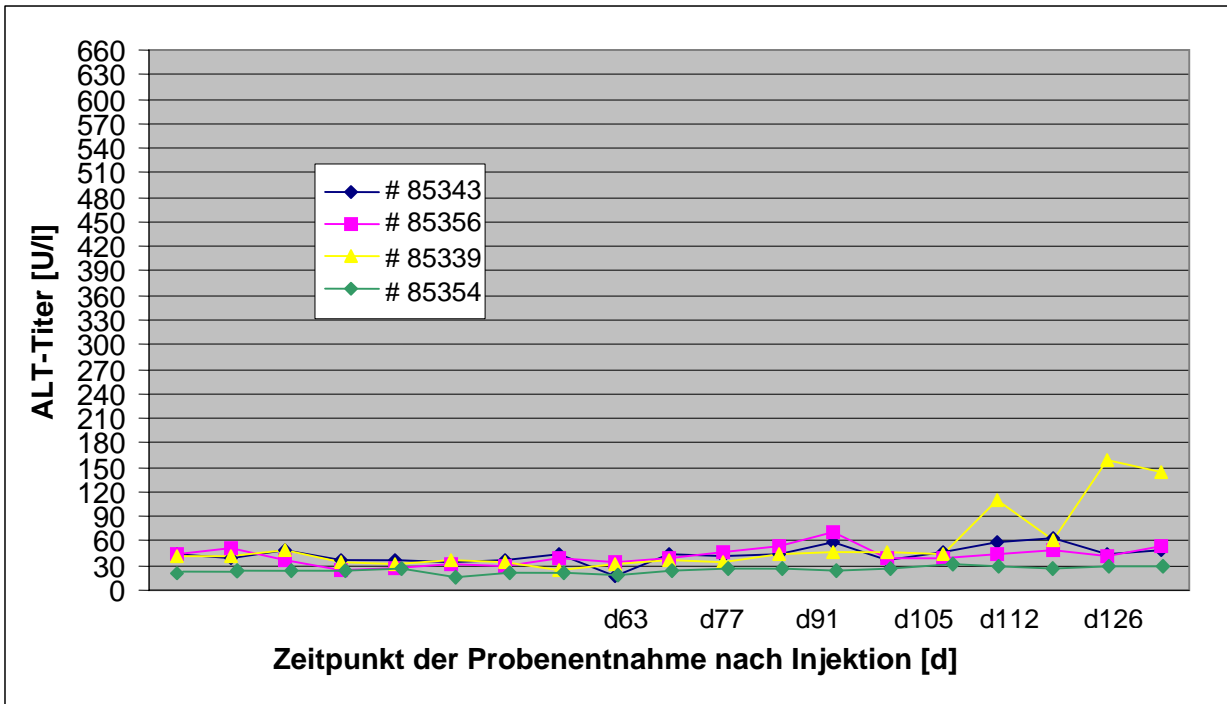


Abb. 51 Darstellung der ALT-Titer in AST-Tieren aus Gruppe II, die dreimalige Injektionen mit je 200µg itat-NLS-Cre erhielten.

In Gruppe II (dreimalige hydrodynamische Injektion mit je 200µg itat-NLS-Cre) zeigte bislang ein Tier, #85339, steigende Enzymwerte ab d119 nach Injektion. Die AST-Maus #85354 diente als Negativkontrolle, da sie dreimalige intravenöse Injektionen mit je 2ml PBS erhielt.

Alle drei Tiere, die eine einmalige Injektion mit itat-NLS-Cre erhielten, zeigten erhöhte ALT-Titer.

Eine mehrmalige Injektion von PTD-Cre führte nicht zu einer generellen Erhöhung der ALT-Werte.

3.2.7.2. In vivo-Tumorentstehung in AST-Mäusen nach Injektion mit itat-NLS-Cre

Um zu demonstrieren, dass man Tumorentstehung in vivo durch Injektion mit PTD-Cre Proteinen erzielen konnte, wurden Albumin-floxstop-TAg Mäuse in zwei Gruppen unterteilt. Den Tieren aus Gruppe I wurde einmalig 200µg itat-NLS-Cre intravenös injiziert, wohingegen die Tiere aus Gruppe II dreimalige Injektionen mit jeweils 200µg itat-NLS-Cre erhielten. An d170 p. i. wurden alle drei Tiere aus Gruppe I getötet und ihre Lebern bezüglich Tumorentstehung untersucht.

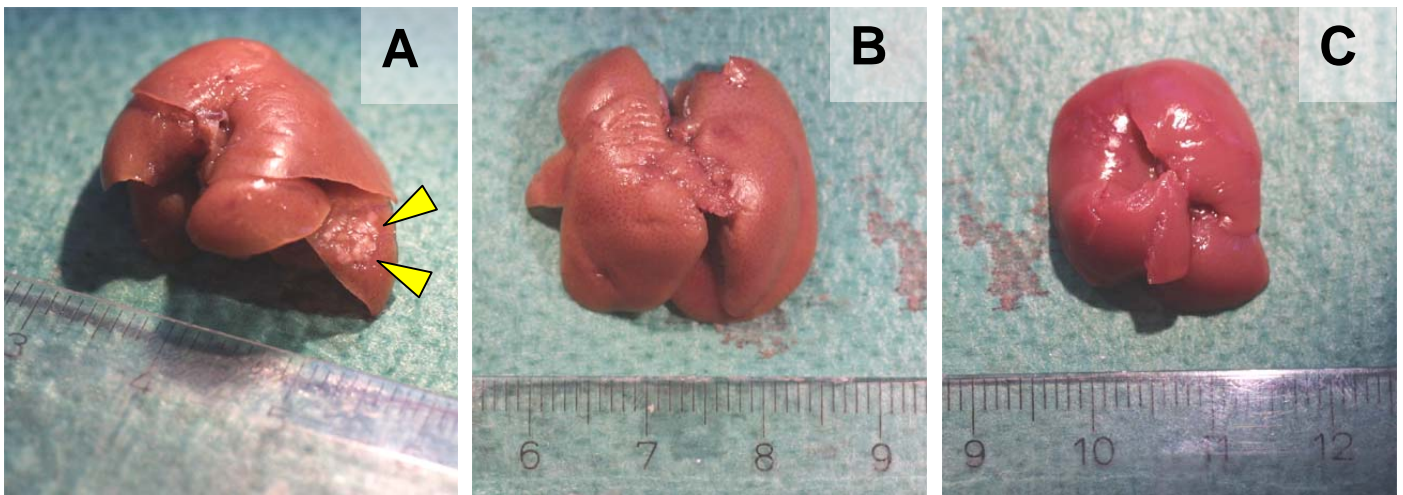


Abb. 52 In vivo-Tumorentstehung in Lebern von AST-Tieren nach einmaliger Injektion mit 200µg itat-NLS-Cre. Man konnte einen Tumorherd (gelbe Pfeile) in der Leber des Tieres #85365 erkennen (A), wohingegen die Lebern der Tiere #85368 (B) und #85342 (nicht gezeigt) keine makroskopischen Auffälligkeiten zeigten. Als Negativkontrolle wurde die Leber einer nicht-induzierten AST- Maus (C) verwendet.

Dabei zeigte sich, dass in Maus #85365 ein Tumorherd im Bereich der unteren Leberlappen gefunden werden konnte. Die beiden weiteren untersuchten AST-Mäuse, #85342 und #85368, zeigten keine makroskopischen Auffälligkeiten, die auf Tumorentstehung hinwiesen. Aus diesem Grund wurden histopathologische Gewebeschnitte angefertigt. Als Negativkontrolle diente die Leber einer nicht-induzierten AST-Maus.

Durch Injektion mit itat-NLS-Cre konnte in vivo-Tumorentstehung in Albumin-floxstop-TAg Mäusen induziert werden.

3.2.7.3. Histopathologie der Gewebeschnitte PTD-Cre induzierter Albumin-floxstop-TAG Mäuse

Die histopathologischen Gewebeschnitte der drei mit itat-NLS-Cre induzierten Albumin-floxstop-TAG Mäuse aus Gruppe I zeigten, dass bei allen Tieren Hepatokarzinome diagnostiziert werden konnten.

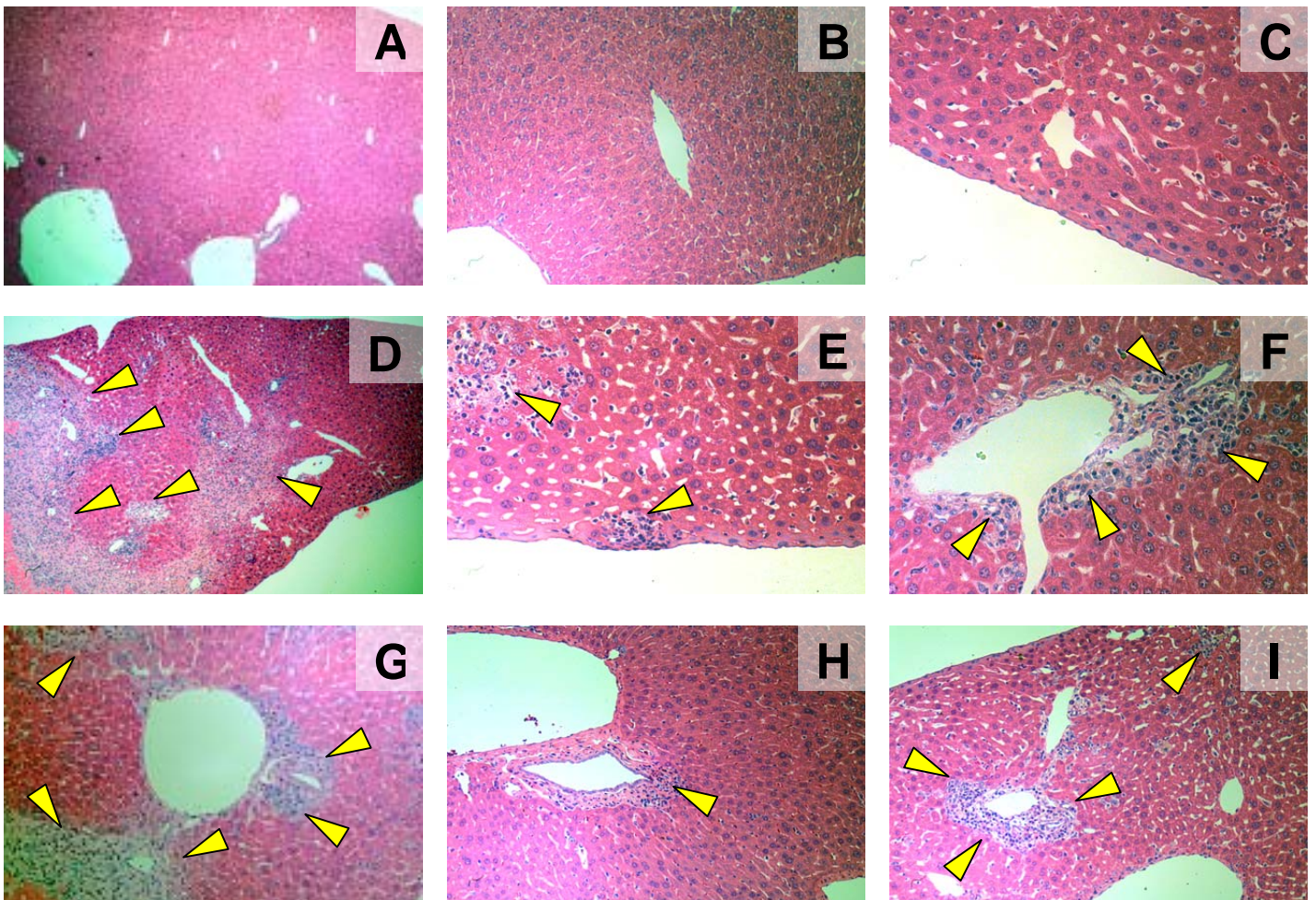


Abb. 53 Darstellung der histopathologischen Gewebeschnitte von Lebern aus induzierten Albumin-floxstop-TAG Mäusen (D - I) im Vergleich zur Leber eines nicht-induzierten Kontrolltieres (A - C). Die Gewebeschnitte D und E stammten aus Tier #85365, bei dem man nach Entnahme der Leber Tumorherde von außen sehen konnte. Im Gegensatz dazu zeigten die Lebern der Tiere #85342 (F und G) und #85368 (H und I) keine makroskopischen Auffälligkeiten bei Organentnahme. Die Gewebeschnitte zeigten jedoch Hepatokarzinom-entstehung (gelbe Pfeile) in allen drei, mit itat-NLS-Cre, induzierten AST-Tieren.

Hydrodynamische Schockinjektion mit itat-NLS-Cre führte bei allen drei Albumin-floxstop-TAG Tieren der Kontrollgruppe I zur Entstehung von Hepatokarzinomen.

4. Diskussion

4.1. Erzeugung neuer transgener Mauslinien

Ein Hauptziel der Tumorimmunologie ist es, mögliche Therapieansätze gegen Krebs zu entwickeln. Dabei fand lange Zeit die Verwendung von Transplantationstumoren im Tiermodell Anwendung. Dieser Modellansatz ist jedoch artifiziell und nicht vergleichbar zur humanen Tumorentstehung. Um der Forderung an ein humanvergleichbares Tumormodell gerecht zu werden, wurden transgene Tiermodelle entwickelt. Diese Modelle lassen sich in zwei Klassen unterteilen, die konstitutiv onkogen-exprimierenden und die konditionell induzierbaren Modelle. Bei den konstitutiven Modellen erfolgt die Onkogenexpression i. d. R. kurz nach der Geburt. Dadurch wird das sich entwickelnde Immunsystem der Maus bereits mit tumorigenen Zellen konfrontiert, was zu neonataler Toleranz, Anergie oder auch zu Aktivierung reaktiver Lymphozyten führen kann. Dies reflektiert jedoch nicht die klinische Tumorentstehung. Um eine möglichst „natürliche“ Tumorigenese im Modell imitieren zu können, wurden deshalb konditionelle Tumormodelle entwickelt. In diesen Systemen lässt sich die Onkogenexpression zu einem beliebig wählbaren Zeitpunkt induzieren, wodurch man in der Lage ist, die Reaktionen des ausdifferenzierten, adulten Immunsystems zu studieren.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, ein induzierbares, autochthones Tumormodell zu entwickeln. Die konditionelle Induktion der Onkogenexpression in diesem Modell sollte durch das Cre/loxP-Rekombinationssystem kontrolliert werden. Mit diesem System lassen sich durch die Cre-Rekombinase gezielte Genmanipulationen, wie z. B. die Exzision eines Gens durch Rekombination, darstellen. Durch in vivo-Exzision einer von loxP-Sequenzen flankierten Stopkassette lassen sich Onkogene konditionell aktivieren. In nicht-rekombiniertem Zustand ist die Onkogenexpression durch die Stopkassette unterbunden. Kommt es zu Cre-vermittelter Rekombination und damit zur Entfernung der Kasette, wird das Onkogen exprimiert, wodurch die Zelle zu einer Tumorzelle transformiert wird.

In meinem Tumormodell erfolgte die Onkogenexpression unter der Expressionskontrolle des KeratinIV- bzw. des Tyrosinase-Promotors, die beide Expression in der Haut bzw. auch im Pigmentepithel der Retina vermitteln. Demzufolge sollten in meinem Modell Haut- und Augentumore entstehen. In Publikationen über Hauttumormodelle fanden zumeist ein Tyrosinase-Minimalpromotor (ohne den Enhancer-Bereich) oder der Trp1- bzw. Trp2-Promotor (Trp = engl. „Tyrosinase related protein“) Verwendung. Da in diesen Publikationen konstitutive Systeme verwendet wurden, kam es sehr früh zur Onkogenexpression, weshalb die angeführten Promotoren sich als ausreichend stark onkogenexpression-vermittelnd erwiesen. Im neu entwickelten Tumormodell handelte es sich jedoch um ein konditionelles Modell. Deshalb musste ein starker Promotor verwendet werden, der ein Maximum an Expression erreichen sollte. Diese Voraussetzungen sollten der Tyrosinase- sowie der KeratinIV-Promotor erfüllen. Zur Tumorinduktion wurde das T-Antigen des Simian Virus 40 (= SV40 TAg) verwendet. Dieses Onkogen wurde bereits von Mitarbeitern der Abteilung zur Herstellung des konstitutiven RIP-TAg Insulinommodells (Ganss et al. 1998) und des konditionellen Albumin-floxstop-TAg Hepatokarzinom-Modells (Sacher 2000) verwandt. Dabei zeigte sich die zuverlässige Transformation gesunder Zellen zu tumorigenem Gewebe durch TAg-Expression. Weitere Publikationen, die TAg-vermittelte Tumorentstehung beschrieben, stammten u. a. von Mintz et al. (1992, 1993), Lakso et al. (1992), Maroulakou et al. (1994), Ewald et al. (1996) und Berkovich et al. (2001).

4.1.1. Klonierung der Transgene

Zur Herstellung des induzierbaren Tumormodells klonierte ich vier verschiedene Transgenkassetten. Um eine ausreichend starke Expression unter der Kontrolle des Tyrosinase-Promotors zu erhalten, sollte der gesamte Tyrosinase Promotor-Enhancer Bereich verwendet werden. Dieser Promotor wurde von Dr. R. Ganss aus der Abteilung für Molekulare Immunologie charakterisiert (Beermann et al. 1992/ Ganss et al. 1994). Die zur Erzeugung des Enhancer-Promotor-Konstruktes in mehreren Schritten durchgeführte Klonierung führte zur Erstellung des Tyrosinase-Konstruktes. Die hergestellten Transgen-Kassetten waren das Ubiquitin-floxstop-TAg-, das Tyrosinase-floxstop-TAg-, das KeratinIV-floxstop-TAg- und das Tyrosinase-CreERT²-Konstrukt.

Das Ubiquitin-floxstop-TAg Konstrukt sollte die Expression des Onkogens nach Rekombination ubiquitär, d. h. in allen Geweben, vermitteln. Im Gegensatz dazu sollte die TAg-Expression in den Tyrosinase-floxstop-TAg- und KeratinIV-floxstop-TAg-Konstrukten jeweils gewebsspezifisch erfolgen. Diese drei Konstrukte dienten der Herstellung von induzierbaren Tumormauslinien. Das vierte Konstrukt, das Tyrosinase-CreERT²-Konstrukt, wurde zur Herstellung einer Induktor-Linie verwendet. Diese Linie sollte die gewebsspezifische, konditionelle Rekombination einer von loxP-Sequenzen flankierten Stopkassette ermöglichen. Im Anschluss an die Klonierungen injizierte ich alle vier Transgene in Mausoozyten. Aus den geborenen Jungtieren resultierten fünf Ubiquitin-floxstop-TAg, drei Tyrosinase-floxstop-TAg-, acht KeratinIV-floxstop-TAg- und fünf Tyrosinase-CreERT²-einzeltransgene F₁-Nachkommen (= founder-Tiere) (siehe „3.1.1.6.“).

Um die Induktion der Onkogenexpression bzw. die Fähigkeit zu gewebsspezifischer Rekombination der verschiedenen Linien zu testen, erfolgten verschiedene Verpaarungen. Dabei wurden die Tumormauslinien mit Cre-rekombinierenden Mäusen (= Cre-deleter) gekreuzt, die das Cre-Gen in der Keimbahn trugen und somit Rekombination in allen Geweben vermittelten. In daraus resultierenden doppeltransgenen Nachkommen wurde somit die Onkogenexpression induziert. Zum Nachweis der gewebsspezifischen Induzierbarkeit der Cre-Rekombinase in den TyrosinaseCreERT²-Linien dienten Verpaarungen mit Rosa26-Mäusen, die ubiquitär eine von loxP-Stellen flankierte Stopkassette vor einem Reporter gen trugen. Nach Rekombination konnte man in TyrosinaseCreERT²xRosa26 Nachkommen die gewebsspezifische Expression des Reporterenzym nachweisen (siehe „3.1.3.6.“).

4.1.2. Entstehung von Tumoren in Ubiquitin-floxstop-TAg-, Tyrosinase-floxstop-TAg- und KeratinIV-floxstop-TAg-Linien nach Verpaarung mit Cre-deleter-Tieren

Von 94 Nachkommen aus Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del. Verpaarungen waren neun Mäuse doppeltransgen (siehe „3.1.3.6.“). Diese Tiere stammten aus drei verschiedenen founder-Linien. Nach neun bis zwölf Monaten entwickelten sechs dieser Mäuse Tumoren (siehe „3.1.3.1.“ und „3.1.3.7.“). Dabei handelte es sich um hochinvasive Fibro- und Osteosarkome, einhergehend mit Metastasierung in unterschiedlichen Organen sowie um Hepatokarzinome und Leukämien. Bedeutend war, dass in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del. Tieren verschiedene Tumoren gefunden wurden. Dies war durch das Expressionsmuster des, die Onkogenexpression kontrollierenden, UbiquitinC-Promotors erklärbar. Besonders auffällig war, dass alle tumorentwickelnden Tiere der founder-Linie 29486 Osteosarkome und Hepato-karzinome entwickelten. Es schien, als ob diese Linie genetisch prädisponiert zur Entwicklung dieser Tumoren war. Ebenso zeigte sich, dass beide Tiere aus Linie 29473 neben Fibrosarkomen auch Leukämien aufwiesen, im Gegensatz zu den anderen tumorentwickelnden Tieren .

Aus Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-deleter Verpaarungen resultierten zwölf doppeltransgene Mäuse von 125 Nachkommen (siehe „3.1.3.6.“). Bislang kam es bei fünf Tieren zur Entwicklung von Augentumoren nach einer Latenzzeit von neun bis elf Monaten (siehe „3.1.3.3.“ und „3.1.3.7.“). Die Tumorbildung in diesen Tieren entsprang dem Pigmentepithel der Retina und zeigte somit die gewebsspezifische Tumorentstehung entsprechend des Expressionsmusters des Tyrosinase-Promotors. Bei allen in Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Tieren diagnostizierten Tumoren handelte es sich um maligne Melanome. Auch konnten melanotische Metastasen in der Lunge zweier Tiere nachgewiesen werden.

Die Verpaarungen der KeratinIV-floxstop-TAg-founder mit Cre-rekombinierenden Tieren führten zu drei doppeltransgenen Tieren von insgesamt 76 Nachkommen (siehe „3.1.3.5.“). Allerdings konnte bei Abschluss dieser Arbeit noch keine Tumorentstehung beobachtet werden, sodass diese Tiere weiterhin beobachtet werden müssen.

Die Latenzzeit, bis es zu Tumorentstehung in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAg und Tyrosinase-floxstop-TAg Tieren kam, dauerte zwischen neun und zwölf Monaten. Um zu beweisen, dass es sich bei den gefundenen Tumoren um TAg-vermittelte und nicht um spontan auftretende Alterstumoren handelte, wurde der immunhistochemische Nachweis von TAg-Proteins exemplarisch in rekombiniertem Lungengewebe der rekombinierten UfTxCre-del. Maus #29583 erbracht (siehe „3.2.3.2.2.“). Dabei konnte TAg-Protein in nahezu allen Zellen des untersuchten Gewebes nachgewiesen werden und zeigte dadurch in vivo-Rekombination der floxstop-Kassette des Transgens.

Mögliche Gründe für die Latenzzeit, bis es zur Tumorentstehung kam, könnten im chromosomalen Umfeld der Transgenkassetten liegen. Durch die Mikroinjektionstechnik ist man zwar in der Lage, exogene Konstrukte in Oozyten einzuschleusen, man hat allerdings keinerlei Einfluss auf den Ort der Integration. Durch Integration der Transgene in transkriptionell inaktive Bereiche des Genoms wäre die Tumorinduktionsmöglichkeit verloren. Die Cre/loxP-vermittelte Rekombination selbst könnte ein weiterer möglicher Grund für die lange Latenzzeit sein. Vor der Rekombination können mehrere Transgenkassetten hintereinander auf demselben Chromosom vorliegen. Nach erfolgter Exzision durch die Cre-Rekombinase bleibt lediglich eine einzige Onkogenkopie zurück, da die restlichen Kassetten als Concatemere entfernt werden. Das Zusammentreffen der sporadischen Cre/loxP-vermittelten Rekombination und das Vorliegen einer einzigen transkriptionell aktiven TAg-Kopie könnte zu ungenügender Expression des Onkoproteins in rekombinierten Zellen führen. Zur TAg-vermittelnden Transformation einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle muss das TAg-Protein sowohl an das Retinoblastomprotein als auch an p53 binden. Falls nicht beide Zellzyklusregulatorproteine durch TAg inaktiviert werden, kann die Latenzzeit, bis es zu Tumorbildung kommt, stark erhöht sein (R. Ganss, persönliche Kommunikation). Außerdem ist die Latenzzeit von Modell zu Modell stark variabel. So beschrieb Hanahan (1985) die Entstehung von Insulinomen im konstitutiven RIP-TAg Modell vier Monate nach Geburt der Tiere. In E2F^{-/-} Tieren (Yamasaki et al. 1996) und bei p53^{+/-} Tieren (Donehower 1996) vergingen bis zu 18 Monate, ehe es zu Tumorentstehung kam.

Die geringe Menge an doppeltransgenen, rekombinierten Mäusen war auf die Zucht mit heterozygoten Tieren bzw. Probleme bei der Detektion des TAg-Sondensignals im Southern Blot zurückzuführen. Nach erfolgter Rekombination verblieb lediglich eine einzige Genkopie im Genom der Tiere, da weitere Kopien als Concatemere entfernt wurden. Eine einzige verbliebene TAg-Kopie vermittelte ein sehr schwaches Signal, weshalb doppeltransgene Tiere nicht als solche erkannt und deshalb getötet worden sein könnten. Um eine zuverlässige Methode zum Rekombinationsnachweis zu erhalten und alle rekombinierten Tiere detektieren zu können, wurde eine qualitative PCR etabliert (siehe „3.1.1.7.“). Ein weiterer Faktor, der die Ausbeute an doppeltransgenen Tieren beeinflusst haben könnte, kann auf der Inaktivierung des Mitoseregulators pRB durch das exprimierte Onkogen beruhen. So zeigten Lee et al. (1992), dass pRB^{-/-} Tiere bereits während der Embryonalphase starben. Da in meinem System die tumorentwickelnden Tiere aus Verpaarungen mit ubiquitär rekombinierenden Tieren hervorgingen, sollte in den Nachkommen die Onkogenexpression konstitutiv erfolgen. Dadurch wäre u. U. bereits während der Embryonalentwicklung die Inaktivierung des Retinoblastomproteins durch TAg gegeben, wodurch rekombinierte Tiere pränatal gestorben sein könnten.

Eine Besonderheit der gefundenen Tumoren (siehe „3.1.3.8.“) lag im Befund, dass in allen Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-deleter Tieren Sarkome diagnostiziert wurden. Diese Tumoren treten relativ selten auf. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Deaktivierung des pRB-Proteins liegen. So beobachteten Malkin (1993), Weinberg (1995) und Yamasaki et al. (1996) das Auftreten von Osteosarkomen, Sarkomen der Weichteile, Leukämien, Lungen- und Hepatokarzinomen sowie Retinoblastomen in E2F^{-/-} bzw. p53^{+/-} Tieren. In diesen Modellen waren dieselben Mitoseregulatorproteine deaktiviert, die in meinem Modell durch TAg angegriffen wurden (siehe „1.1.2.“). Eine ähnliche Zusammenstellung von Tumoren findet man in der klinischen Situation bei Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom, einem autosomal-dominanten erblichen Krebsyndrom, das bei einem Drittel aller Humantumoren zu finden ist (Ganten & Ruckpaul, 1998). Dabei ist bemerkenswert, dass Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom Mutationen im Tumorsuppressorgen P53 tragen (Hollstein et al. 1991). In über 52 Krebstypen wurden bislang Mutationen dieses Gens gefunden und Schätzungen gehen davon aus, dass in über 50% aller Humantumoren das P53-Gen Defekte aufweist (Attardi & Jacks, 1999). Dies unterstreicht die bedeutende Rolle des Tumorsuppressors p53 als Schutzmechanismus vor Krebs.

Zusammenfassend aus den Ergebnissen der Tumorinduktionsexperimente ließ sich feststellen, dass in Ubiquitin-floxstop-TAg und in Tyrosinase-floxstop-TAg Mäusen nach erfolgter Rekombination das TAg-Onkoprotein exprimiert wurde (siehe „3.1.3.2.2.“). Dies führte zu Tumorentstehung bei sechs von neun rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAg bzw. fünf von zwölf rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAg Mäusen. Dabei konnten in rekombinierten Ubiquitin-floxstop-TAg Tieren verschiedene Tumoren, nämlich Fibro- und Osteosarkome sowie Hepatokarzinome und Leukämien diagnostiziert werden, die in unterschiedlichen Geweben entstanden waren (siehe „3.1.3.1.“ und „3.1.3.8.“). In rekombinierten Tyrosinase-floxstop-TAg Mäusen kam es zur Entstehung maligner Melanome der Augen (siehe „3.1.3.3.“ und „3.1.3.8.“). Dabei zeigte sich die gewebsspezifische Tumorentstehung entsprechend dem Expressionsmuster des zur Onkogenexpression verwendeten Tyrosinase-promotors.

4.1.3. Gewebsspezifische Induktion eines Reportergens in Tyrosinase-CreERT²xRosa26-Mäusen

Um die gewebsspezifische Induktion der Cre-Rekombinase zu testen, wurden TyrosinaseCreERT²-Tiere mit Rosa26-Reportermäusen verpaart. Aus diesen Verpaarungen entstammten dreißig doppeltransgene Nachkommen, die auf fünf verschiedene TyrosinaseCreERT²-Linien zurückgingen. Zur Induktion der Cre-Rekombinase erfolgte dermale Applikation des Hormonantagonisten 4-Hydroxytamoxifen auf rasierten Hautstellen. Die im Anschluss hergestellten Gewebeschnitte zeigten selektive Rekombination in Haarfollikelzellen durch Umsetzung des farblosen Substrats X-Gal in einen blauen Niederschlag an (siehe „3.1.2.2.“). Somit konnte ich die gewebsspezifische Induktion des CreERT²-Proteins in vivo demonstrieren. Ein weiterer wesentlicher Aspekt war das Fehlen jeglicher Hintergrundaktivität der Cre-Rekombinase. In nicht-induzierten doppeltransgenen Tieren konnte keinerlei Substratumsetzung beobachtet werden.

Aus zeitlichen Gründen konnte die Verpaarung von Ubiquitin-floxstop-TAgxTyrCreERT²-Tieren zur Erzeugung doppeltransgener, konditioneller Tumormäuse im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr erfolgen.

4.2. Entwicklung eines PTD-Cre Induktionssystems (PTD = Proteintranslokationsdomäne)

Ein weiteres Ziel meiner Dissertation lag in der Entwicklung eines PTD-Cre Induktionssystems zur Onkogenexpression. Bislang werden in konditionellen Systemen zwei Tierlinien durch Kreuzung zu doppeltransgenen Nachkommen gezüchtet und anschließend z. B. für Tumorinduktionsexperimente verwendet. Dieser Ansatz beinhaltet drei „Problempunkte“. So entstehen räumliche Probleme, da i. d. R. große Mengen an Mäusen gehalten, gezüchtet und gekreuzt werden müssen. Weiterhin ist die hohe Anzahl an zu haltenden Tieren ein enormer Kostenfaktor und die Zucht vieler Mauslinien stellt außerdem einen erheblichen Zeitaufwand dar. Dieser Aufwand steht in geringer Relation zu den erhaltenen doppeltransgenen Tieren für Tumorinduktionsexperimente. Der PTD-Cre Ansatz sollte die aufgeführten Nachteile des bislang herkömmlichen tierexperimentellen Ablaufs eliminieren. Deshalb entwickelte ich ein neues, auf Proteintranslokation und Cre-vermittelter Rekombination basierendes Induktionssystem.

In verschiedenen Publikationen wurde u. a. gezeigt, dass ein PTD-Protein Konstrukt bis zu einer Größe von ca. 120kDa in lebende Zellen translozierte. Dabei kam es nicht zu einer Schädigung der Zelle bzw. wurde die enzymatische Aktivität des Proteins nicht beeinflusst. Außerdem konnten PTD-fusionierte Latex- oder Eisenpartikel mit einem Durchmesser bis zu vier Nanometern transloziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit nutzte ich verschiedene Translokationssequenzen dazu, rekombinante PTD-Cre-Konstrukte herzustellen und in Zellen einzuschleusen. Dazu stellte ich verschiedene Fusionsproteine her und verglich sie bezüglich ihrer Fähigkeit, Translokation und Rekombination in vitro zu vermitteln. Das am besten in vitro-rekombinierende Konstrukt wurde anschließend zur Durchführung verschiedener in vivo-Tierexperimente verwendet. Zur in vivo-Tumorinduktion wurde eine einzeltransgene Mauslinie verwendet, die eine gewebsspezifische floxstop-Kassette vor einem transkriptionell inaktiven TAg-Gen trug. Die Expression des Onkogens erfolgte durch intravenöse Injektion mit einem PTD-Cre Protein. Dieses Konstrukt war in der Lage, durch Zellmembranen zu translozieren und im Nukleus eine von loxP-Stellen flankierte Stopkassette zu rekombinieren. Durch diese Exzision wurde die Expression des TAg-Onkoproteins induziert.

4.2.1. Herstellung der rekombinanten PTD-Cre Konstrukte

Die Herstellung der rekombinanten PTD-Cre Konstrukte erfolgte durch PCR-Amplifikation des Cre-Gens unter Verwendung spezifischer Primer, die PTD-Sequenzextensionen trugen. Außerdem klonierte ich zwischen die PTD und das Cre-Gen die nukleäre Lokalisationssequenz des SV40 (NLS = engl. „nuclear localisation sequence“), damit das fertige Fusionsprotein später in den Zellkern translozieren konnte. Den gesamten Aufbau der DNA-Konstrukte erstellte ich modular. Somit waren die Sequenzen beliebig manipulierbar oder konnten unkompliziert ausgetauscht werden. Der zur Expression der Proteine verwendete Vektor verfügte über geeignete Klonierungsstellen und spezielle Antibiotikaresistenzen. Außerdem synthetisierte er Pentahistidinmotive an die Fusionsproteine, die dadurch über Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten. Insgesamt stellte ich sieben verschiedene Genkonstrukte her und transformierte diese in spezielle *E.coli*-Zellen, sogenannte BL21(DE3)pLysS-Zellen, die eine konditionelle Expression von exogenen Genen ermöglichten.

Bei der Transformation der *E.coli*-Expressionszellen mit aufgereinigtem und in den Expressionsvektor klonierten PCR-Produkt ergaben sich jedoch Probleme mit der Transformationseffizienz, da es nicht zu Wachstum von Einzelklonen auf Selektiv-Agrarplatten kam. Die Ursache dafür lag in einer zu geringen Ligationseffizienz, die durch eine zu geringe Ausbeute an PCR-Produkt verursacht wurde. Deshalb führte ich eine Zwischenklonierung ein, bei der im Anschluss an die PCR das entsprechende PTD-Cre-Produkt direkt, d. h. ohne Aufreinigung in einen sogenannten „rescue-vector“, durch AT-Klonierung ligiert wurde. Dabei nutzte ich die Fähigkeit der in der PCR verwendeten Taq-Polymerase, an neu synthetisierte PCR-Produkte kurze Adenin-Thymidin-Sequenzen anzuhängen. Der kommerziell verfügbare, linearisierte „rescue-vector“ (pAT, Novagen) trug komplementäre Thymidin-Adenin-Überhänge, wodurch man das PCR-Produkt ungeachtet dessen Orientierung in diesen Vektor klonieren konnte. In einem Zwischenschritt, bestehend aus Transformation und DNA-Midipräparation, erhielt ich ausreichende Mengen an reinen PTD-Cre Konstrukten für Ligationen in den Expressionsvektor. Die im Anschluss an diese Ligationen durchgeführten Arbeiten resultierten letztlich in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten sieben PTD-Cre Konstrukten.

4.2.2. Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Bevor ich die rekombinanten Proteine in größerem Maßstab aufreignigte, testete ich Einzelklone der verschiedenen Konstrukte bezüglich der Expression des PTD-Cre-Fusionsproteins mit einer Größe von 42kDa in Minikulturen. Dazu wurde die Expression der Fusionsproteine induziert und nach einer mehrstündigen Inkubation die Zentrifugate gesammelt. Nach einem Vergleich der Proteine durch Western Blot erfolgte die Auswahl von sieben verschiedenen Klonen (siehe „3.2.2.“). Diese Klone wurden als Glycerin-Dauerkulturen eingelagert und dienten als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der rekombinanten Fusionsproteine.

Bei der Expression der Proteine in größerem Maßstab ergaben sich einige Schwierigkeiten. Diese hingen mit der Aufreinigung der Proteine und dem Wachstum der Zellen nach induzierter Proteinexpression zusammen. So musste ein speziell auf diese Proteine zugeschnittenes Protokoll zur Induktion, Expression und Aufreinigung erstellt werden. Eine Hilfe hierbei waren bereits publizierte Aufreinigungsprotokolle ähnlicher Fusionsproteine, die sich allerdings nicht gänzlich umsetzen ließen. Der Versuch, die Proteine z. B. in denaturierter Form aufzureinigen, erwies sich als nicht durchführbar, da hierbei keine Proteine nach Aufreinigung über eine Nickelmatrix eluiert werden konnten. Im denaturierenden Ansatz war die Bindung der Proteine an die Nickelmatrix offensichtlich gestört, weshalb diese Methode nicht in Betracht kam. Die Alternative dazu, die Aufreinigung nativer Proteine, wurde in zahlreichen Modifikationen (Konzentration des Induktionssubstrates, Inkubationstemperatur der Expressionskultur, Zeitdauer der Expression, Zusammensetzung von Puffern etc.) zu einem Protokoll, das für eine ausreichend hohe Ausbeute an Fusionsproteinen sorgte, zusammengestellt (siehe „2.2.4.“). Allerdings waren die Proteinmengen nach der Aufreinigung der PTD-Cre Fusionsproteine unterschiedlich hoch. Sie lagen nach der ersten Dialyse zwischen 0,75mg für Arg8x-NLS-Cre und 18,5mg für NLS-Cre-itat pro Liter Expressionskultur. Auffällig war, dass die Konstrukte mit einer carboxy-terminal fusionierten Translokationsdomäne eine deutlich höhere Proteinmenge lieferten als die aminoterminal fusionierten Konstrukte (siehe Seite 76, Tabelle 6). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen kann nicht gegeben werden.

Nach der Aufreinigung mussten die Proteine dialysiert werden, um das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol zu entfernen, da dieses die weitere Verwendung in Experimenten störte. In ersten Dialyseversuchen präzipitierten jedoch ca. 90% der aufgereinigten Proteine. Durch die Verwendung eines Hochsalzpuffers und der damit verbundenen Ionenwechselwirkungen konnten die Proteine in der Lösung stabilisiert werden. Da die Dialysate jedoch eine sehr geringe Proteinkonzentration aufwiesen, musste eine Möglichkeit gefunden werden, um die Konzentration an Protein in Lösung zu erhöhen. Die geringe Proteinkonzentration ging auf die Elution von den Nickelsäulen während der Aufreinigung zurück. Um alle gebundenen Proteine zu eluieren, wurden relativ große Volumina an Elutionspuffer eingesetzt, da bei Versuchen mit geringen Mengen an Elutionspuffer ein Großteil der Proteine an der Matrix haften blieb.

Um alle gebundenen Proteine zu eluieren, verwendete ich daher ca. 15ml Elutionspuffer pro Elution. Dementsprechend groß waren die Volumina nach der Dialyse gegen den Hochsalzpuffer bzw. entsprechend niedrig fiel die Konzentration der Proteineluate aus. Um die Lösungen zu konzentrieren, testete ich verschiedene Möglichkeiten. So zeigte z. B. die Verwendung von Vivaspin-Konzentratoren, bei denen niedermolekulare Bestandteile von den Proteinen durch Zentrifugation der Dialysate in einem Spezialröhrchen mit integriertem molekularem Abtrenn-Filter separiert werden sollten, keinen Erfolg. Die Interaktion der Fusionsproteine mit der Filtermembran führte zu Präzipitation. Durch Einführung einer zweiten Dialyse unter Verwendung eines Hochsalzpuffers, der zusätzlich 50% Glycerol enthielt, konnten die Elutionsvolumina erheblich reduziert und die Endkonzentrationen an Proteinen in Lösung stark erhöht werden. Allerdings mussten die proteinhaltigen Lösungen vor ihrer Anwendung im Experiment zuerst verdünnt werden, damit man isotone Lösungen erhielt. Bei einer Verwendung der Proteinlösungen im Hochsalz/Glycerolpuffer (d. h. ohne zweite Dialyse) starben die Zellen ab bzw. hätte es zu Kreislaufversagen der Versuchstiere durch die hohe Salzkonzentration (600mM NaCl) und das enthaltene Glycerol kommen können.

4.2.3. Rekombination in vitro

Mit den aufgereinigten Proteinen wurden zuerst in vitro-Studien durchgeführt, um ihre Translokations- und Rekombinationsfähigkeit in Zellen zu testen und die Proteine zu charakterisieren. Dazu inkubierte ich adhärent wachsende CV1-5B Zellen, die eine floxstop-lacZ-Reporter-kassette trugen, mit den verschiedenen Proteinen. Erfolgte Rekombination in diesen Zellen führte zur Exzision der Stop-kassette und damit zur Expression des Reporterenzym β -Galaktosidase. Dieses Enzym ist in der Lage, das farblose Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff umzusetzen. Ich zeigte, dass es in den mit Protein behandelten Zellen zur Substratumsetzung kam, was auf erfolgte Rekombination zurückzuführen war (siehe „3.2.3.1.“). Um die Lokalisierung der rekombinanten Proteine in den Zellen bzw. in den Nuklei nachzuweisen, erfolgte die immunhistochemische Detektion der Cre-Rekombinase mit einem Cre-spezifischen Antikörper. Ich zeigte, dass alle Proteine in den Nuklei der Zellen akkumulierten. Dabei schien es keinerlei Konzentrationsabhängigkeit zu geben (siehe „3.2.3.2.“). Auffällig war außerdem, dass man nach einer Inkubationszeit von nur fünfzehn Sekunden die Proteine in allen untersuchten Zellkernen nachweisen konnte (siehe „3.2.3.2.3.“). Außerdem war die Translokationsfähigkeit nicht nur auf eine Zelllinie beschränkt, was durch die intrazelluläre Detektion der Cre-Fusionsproteine in Nuklei von HeLa-Zellen demonstriert wurde (siehe „3.2.3.2.3.“).

Aufbauend auf den qualitativen Ergebnissen sollten die quantitativen Rekombinationseffizienzen der PTD-Cre Proteine erfasst werden. Dazu musste ein neues Nachweisverfahren etabliert werden, mit dessen Hilfe man die verschiedenen Rekombinationseffizienzen der einzelnen Proteine im Durchflusszytometer messen und miteinander vergleichen konnte. Dieser Nachweis verlief in Analogie zum Rekombinationsnachweis durch X-Gal. Allerdings handelte es sich hierbei um ein anderes, ebenfalls farbloses Substrat, das durch die enzymatische Aktivität der nach Rekombination exprimierten β -Galaktosidase in einen Fluoreszenzfarbstoff gespalten wurde. Das in diesem Nachweis verwendete Substrat war Fluorescein-di- β -D-Galaktopyranosid (= FDG), ein farbloser Zucker, der in den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein umgewandelt wurde. Diese Fluoreszenz ermöglichte es, zwischen rekombinierten und nicht-rekombinierten Zellen in der Durchflusszytometrie zu diskriminieren.

Außerdem ließen sich durch die quantitative Erfassung die Rekombinationseffizienzen der einzelnen Fusionsproteine miteinander vergleichen. So zeigten alle Proteine in einer Konzentrationsabhängigkeitsstudie hohe Effizienzen bei Konzentrationen von 5µg/ml bis 200µg/ml bei einer über Nacht-Inkubation und einer Inkubationstemperatur von 37°C. Dabei lagen die gemessenen Effizienzen zwischen ~63% (NLS-Cre-KFGF) und ~94% (itat-NLS-Cre, tat-NLS-Cre und NLS-Cre-itat). Man konnte allerdings eine generell höhere Rekombination in den Konstrukten erkennen, die eine aminoterminal PT-D trugen. Eine Ausnahme der carboxyterminal-fusionierten Proteine stellte das Konstrukt NLS-Cre-itat dar. Dieses Protein zeigte, ebenso wie die aminoterminal fusionierten Proteine, Rekombinationseffizienzen in der Größenordnung von ~94% an aktiviertem Reporter gen.

In einem weiteren Experiment erfolgte die Inkubation der Zellen bei einer Temperatur von 4°C über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen der Proteine. Bei dieser Temperatur lag die Zellmembran in „gefrorenem“ Zustand vor und somit konnte keine Endozytose stattfinden. In diesem Experiment untersuchte ich, ob die Translokation ein rezeptor-vermittelter Vorgang oder ob der Prozess in sonstiger Form energieabhängig war. Die ermittelten Rekombinationseffizienzen lagen deutlich unter den nach Inkubation bei 37°C erhaltenen Werten. Trotzdem konnte Rekombination beobachtet und quantitativ erfasst werden. Die Werte lagen zwischen ~51% (NLS-Cre-KFGF) und ~64% (Arg8x-NLS-Cre). Diese Ergebnisse bestätigte die von anderen Gruppen ebenfalls beobachtete Unabhängigkeit von rezeptorvermittelter Aufnahme der PT-D-Cre Konstrukte.

Die durchgeführte Konzentrationsabhängigkeitsstudie lieferte erste Hinweise darauf, dass die itat-PT-D eine höhere Cre-Rekombinationseffizienz ermöglichte als die restlichen Translokationsdomänen. Es fiel außerdem auf, dass das Konstrukt NLS-Cre (NLS = nukleäre Lokalisierungssequenz) ebenfalls in der Lage war, in hohem Maße Rekombination zu vermitteln, obwohl dieses Protein keine PT-D trug. Die Translokation dieses NLS-Cre Proteins ließ sich mit der Modellvorstellung des Translokationsvorgangs von Derossi et al. (1996, 1998) und Prochiantz (Prochiantz 1996) erklären. Dabei kam es zu einer Interaktion der positiv-geladenen NLS-Aminosäuresequenz mit den negativen Ladungen der Zellmembranaußenseite.

Dadurch konnte das NLS-Cre Konstrukt unter Formierung einer invertierten Micelle in die Zelle translozieren (siehe Seite 15, Abbildung 7). Die von mir verwendete NLS stammte aus dem Simian Virus 40 und besteht aus positiv geladenen Aminosäuren (NLS = PKKKRKV; positiv geladene Aminosäuren sind K, R und H). Offensichtlich war die Interaktion der positiven Ladungen dieser Sequenzfolge ausreichend, um für eine Translokation zu sorgen.

Zur weiteren Charakterisierung der PTD-Cre Proteine erfolgten quantitative Kinetikstudien, um die Geschwindigkeit der Translokation zu erfassen. Hier konnte man sehen, dass die Proteine sehr schnell in die Zellen gelangten. Auffällig beim direkten Vergleich der Messwerte von Rekombination bei 10µg/ml bis 40µg/ml an eingesetzten Proteinen war, dass bis zu einer Inkubationsdauer von 180min die Ansätze mit einer geringeren Proteinkonzentration eine ähnlich hohe Rekombinationseffizienz aufwiesen als die mit 40µg/ml PTD-Cre inkubierten Ansätze. Hieraus zeigte sich, dass schon geringe Mengen an Protein ein hohes Maß an Rekombination ermöglichen. Erst bei Inkubationszeiten über 300 Minuten wiesen die Ansätze, die mit 40µg/ml PTD-Cre inkubiert wurden, z. T. deutlich höhere Rekombinationseffizienzen auf.

Im Vergleich der Ergebnisse aus den qualitativen (siehe „3.2.3.“) und den quantitativen Experimenten (siehe „3.2.4.“) konnte man eine Diskrepanz erkennen. So zeigte die qualitative Überprüfung der Translokationsfähigkeit, dass in jeder Zelle (= 100%) PTD-Cre Proteine nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu lag die quantitativ erfasste Rekombinationseffizienz bei den meisten PTD-Cre Konstrukten darunter. Dies bedeutete, dass PTD-Cre Proteine zwar in nahezu jede Zelle translozierten, es aber nicht in jeder Zelle zu Rekombination kam. Ein möglicher Zusammenhang des Mitosestadiums der inkubierten Zellen und PTD-Cre vermittelter Rekombination wurde von Lea et al. (2003) und Jo et al. (2003) untersucht. Beide Autoren zeigten, dass PTD-Cre vermittelte Rekombination sowohl in proliferierenden als auch in ruhenden Zellen stattfand. Ein Einfluss der Mitose auf die Proteintranslokation konnte somit ausgeschlossen werden. Der Unterschied zwischen Translokation und stattgefundenener Rekombination könnte demnach auf unterschiedliche Translokationsfähigkeit bzw. enzymatische Aktivität der PTD-Cre Proteine zurückzuführen sein.

So erschien es denkbar, dass die verschiedenen Fusionsproteine unterschiedlich schnelle Translokation vermittelten. Ebenso könnten die verschiedenen hohen Rekombinationseffizienzen mit einer variierenden Degradation zu erklären sein. Einige Fusionsproteine könnten aufgrund ihrer Konstruktion besser vor rascher Degradation geschützt sein bzw. schneller in den Nukleus translozieren als andere, schneller abgebaute Konstrukte. Außerdem konnte eine Interaktion der PTD mit dem enzymatischen Zentrum der Cre-Rekombinase nicht ausgeschlossen werden, wodurch die Rekombinationsfähigkeit u. U. beeinträchtigt wäre.

Zusammenfassend ließ sich aus den *in vitro*-Experimenten sagen, dass die Konstrukte, die eine itat-Translokationssequenz trugen, die höchsten quantitativen Rekombinationseffizienzen aufwiesen. Dies fiel besonders in den Konzentrationsabhängigkeitsexperimenten auf. Dabei wiesen die Reporterzellen, die mit den Konstrukten itat-NLS-Cre und NLS-Cre-itat inkubiert wurden, die höchsten Raten an aktiviertem Reporter gen auf. Allerdings zeigte auch die tat-PTD hohe Rekombinationseffizienzen. Die quantitativ erfassten Unterschiede, im Vergleich zu den Ergebnissen der itat-Konstrukte, bewegten sich in der Größenordnung von +/-5%. Die geringsten Rekombinationseffizienzen zeigte das NLS-Cre-KFGF Konstrukt.

4.2.4. PTD-Cre vermittelte Rekombination ex vivo / in vivo

Das itat-NLS-Cre Protein wurde im Anschluss an die *in vitro*-Versuche für *ex vivo*-Experimente verwendet. In diesen Experimenten testete ich die Rekombinationsfähigkeit dieses Proteins in primären Rosa26-Milzzellen. Dabei demonstrierte ich PTD-Cre-vermittelte Rekombination in verschiedenen Subpopulationen von CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, CD11c⁺-Dendritischen Zellen und CD19⁺-B-Zellen (siehe „3.2.5.1“). Die quantitativen Rekombinationseffizienzen für CD4⁺-T-Zellen lagen zwischen 27,5% und 60,7%, bei CD8⁺-T-Zellen zeigten sich Werte von 17% und 50,2%, die CD11c⁺-Dendritischen Zellen demonstrierten Rekombinationseffizienzen von 38,2% bis zu 77,6% und CD19⁺-B-Zellen zeigten Werte von 21% bis zu 54,6%. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit der Rekombinationseffizienz.

Um ex vivo-Rekombination in einem weiteren Modellsystem zu testen, wurden frisch isolierte Milzzellen von RA/EG0%-Mäusen mit itat-NLS-Cre inkubiert. Diese RA/EG0%-Tiere tragen eine floxstop-EGFP-Kassette unter der ubiquitären Expressionskontrolle des Rage-Promotors. Erfolgte Rekombination in diesen Tieren führt zur Expression des „enhanced green fluorescence protein“, das durch die grüne Fluoreszenz Rückschlüsse auf Rekombinationseffizienzen zulässt.

Die durchgeführte ex vivo-Rekombination mit frisch isolierten RA/EG0%-Milzzellen zeigte jedoch keinerlei messbare Rekombination (siehe „3.2.5.2.“). Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Milzzellen aus Rosa26-Mäusen, in denen eine signifikante Rekombination nachgewiesen werden konnte. Dieses Phänomen der „Nicht-Rekombination“ im RA/EG0%-, im Gegensatz zum Rosa26-System, konnte auch bei der Induktion von Rekombination in der Leber von RA/EG0%-Mäusen unter Verwendung gentechnisch veränderter Adenoviren, die das Cre-Gen tragen, beobachtet werden. Nach Injektion von bis zu 5×10^8 pfu (= engl. „plaque-forming unit“) Adeno-Cre kam es nur zu sporadisch rekombinierten, grün fluoreszierenden Zellen (S. Stahl, persönliche Mitteilung). Eine mögliche Erklärung könnte im Abstand der loxP-Stellen zueinander liegen. So zeigten Vooijs et al. (2001), dass sie unterschiedlich hohe Rekombinationseffizienzen beim Vergleich verschiedener Cre-rekombinierter floxstop-Tiere beobachten konnten. Die Rekombinationsunterschiede in den getesteten Tieren führten Vooijs et al. auf unterschiedlich große Abstände der loxP-Stellen zueinander zurück. Eine weitere Erklärung für das Fehlen von EGFP-positiven Zellen in RA/EG0% Tieren nach PTD-Cre Injektion könnte durch reaktive T-Zellen, die MHC-EGFP Komplexe auf rekombinierten Zellen erkannten, begründet sein. So konnte nicht ausgeschlossen werden, dass in mit itat-NLS-Cre behandelten Tieren rekombinierte Zellen eliminiert wurden. Im Gegensatz dazu könnten RA/EG100% Mäuse durch die konstitutive Expression und daraus resultierende Präsentation von EGFP neonatale Toleranz erworben haben, wodurch EGFP-positive Zellen in diesen Tieren nicht eliminiert wurden.

Erste in vivo-Versuche wurden in Rosa26-Reporter-mäusen durchgeführt, die eine intraperitoneale Injektion mit itat-NLS-Cre erhielten. Zwei Tage p. i. wurden die Tiere getötet und die Organe (Herz, Lunge, Leber, Gehirn, Milz, Niere, Hoden und Pankreas) in X-Gal Substratlösung inkubiert (siehe „3.2.6.1.“). Die dabei beobachtete Blaufärbung zeigte erfolgte Rekombination an.

Auf Gewebedünnschnitten der Leber konnte man eine Reporter-genaktivierung lediglich in den äußeren Zellschichten sehen. Auch im Gehirn war eine Aktivierung des Reportergens detektierbar, wodurch das PTD-Cre Protein seine Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, demonstrierte. Eine Blaufärbung im Organinneren konnte nur in den Gehirnsektionen beobachtet werden. Die Färbung der äußeren Zellschichten der Leber konnte entweder durch die intraperitoneale Injektion des itat-NLS-Cre Proteins oder in einer nicht vollständigen Durchdringung der Leber mit X-Gal Substratlösung liegen.

Um eine bessere Verteilung der PTD-Cre Proteine in der Leber zu erhalten, verwendete ich eine neue Applikationsmethode, die Hydrodynamische Schockinjektion (Liu et al. 1999/Yang et al. 2002/Chang et al. 20012/Lecocqet al. 2003/Zhang et al. 2000). Dabei injizierte ich einer Maus ein Flüssigkeitsvolumen, das ca. 8% ihres Körpergewichtes entsprach, in einem Zeitraum von unter fünf Sekunden intravenös. Dadurch kam es zu einem Rückstau der Flüssigkeit, die in dehnbare Organe (Leber und Milz) umgeleitet wurde. Somit konnte man mit dieser Injektionsmethode gezielt Proteine in die Leber applizieren. Die Anwendung der Hydrodynamischen Schockinjektion führte dazu, dass man nach Anfertigung und Färbung von Organdünnschnitten (Gehirn, Lunge, Leber und Milz) eine gleichmäßige Blaufärbung mit bloßem Auge sehen konnte. Allerdings zeigte die Betrachtung der Gewebeschnitte unter dem Mikroskop keine signifikante Erhöhung der Rekombination im Vergleich zu den Abbildungen in Abschnitt „3.2.6.1.“. Die im Anschluss durchgeführten quantitativen Vergleiche der in vivo-Rekombination nach intraperitonealer und intravenöser Injektion ergaben, dass es auf quantitativer Ebene keine Differenzen zwischen den beiden Injektionsmethoden gab (siehe „3.2.6.3.“).

So lagen die Rekombinationseffizienzen von CD4⁺-T-Zellen bei 39,0% (iv) bzw. 34,6% (ip), in CD8⁺-T-Zellen bei 27,1% (iv) bzw. 27,6% (ip) und in CD11c⁺-Dendritischen Zellen bei 42,2% (iv) bzw. 41,3% (ip). Die Rekombinationseffizienzen in Hepatozyten lagen bei 22,4% (iv) und 20,8% (ip). Es wurden außerdem die Gesamtrekombinationseffizienzen von peripheren Blutlymphozyten, Milz, Leber und Lymphknoten gemessen. Die dabei ermittelten Werte betragen für periphere Blutlymphozyten 66,67%, Milzzellen 43,38%, Leber 37,37% und Lymphknoten 25,56%.

4.2.5. In vivo-Tumorinduktion im Albumin-floxstop-TAg-Modell (AST-Modell)

Um Tumorentstehung durch in vivo-Rekombination in einem Mausmodell zu demonstrieren, injizierte ich das itat-NLS-Cre Protein intravenös in Albumin-floxstop-TAg-Mäuse. Diese Tiere tragen eine floxstop-TAg-Kassette unter der Expressionskontrolle des Albuminpromotors in ihrem Genom. Der Albuminpromotor ist exklusiv in Hepatozyten aktiv. Dementsprechend verursacht die Exzision der Stopkassette in diesem System die leberspezifische Expression des TAg-Onkogens, was zur Entstehung von Hepatokarzinomen führt. Für den experimentellen Ansatz wurden die AST-Tiere in zwei Gruppen unterteilt. Die Tiere aus Gruppe I erhielten eine einmalige Hydrodynamische Schockinjektion mit 200µg itat-NLS-Cre. Die Tiere der zweiten Gruppe erhielten drei Injektionen mit je 200µg itat-NLS-Cre. Zur Kontrolle der Tumorentstehung wurden die Enzymwerte der Alanin-Amino-Transferase (= ALT) im Blut verfolgt. Dieses Enzym wurde von Hepatozyten bei einer Leberschädigung z. B. durch Tumorformation freigesetzt. Dementsprechend sollte ein Anstieg der Enzymwerte über einen Normbereich von ca. 30-60 U/l mit erfolgter Tumorinduktion korrelieren. Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit demonstriert, konnte man bei allen drei Tieren aus Gruppe I einen Anstieg der Enzymwerte im Vergleich zu den Werten der Negativkontrolle #85354 erkennen. Dabei zeigte das Tier #85342 deutlich erhöhte ALT-Werte ab Tag 63 p. i., während das zweite Tier mit erhöhten Werten, #85368, erst ab Tag 105 p. i. steigende Titer aufwies. Das dritte Tier dieser Gruppe, #85368, mit zeigte einen Anstieg der ALT-Titer ab d119. Diese Erhöhungen der Titer im Blut ließen auf Tumorentstehung schließen. Bei den Tieren in Gruppe II konnten bislang nur bei einem Tier, #85339, erhöhte ALT-Werte ab d119 p. i. beobachtet werden.

Um in vivo-Tumorentstehung zu zeigen, wurden alle drei AST-Tiere aus Gruppe I getötet und ihre Lebern untersucht. Dabei konnte ein deutlich sichtbarer Tumorherd im unteren Leberlappen des Tieres #85365 gefunden werden (siehe „3.2.7.2.“). Die beiden AST-Mäuse #85342 und #85368 zeigten keine makroskopischen Veränderungen, die auf Tumorentstehung schließen ließen. Die Betrachtung der histopathologischen Gewebeschnitte zeigte jedoch, dass es in allen drei, mit itat-NLS-Cre induzierten Albumin-floxstop-TAg Tieren, zur Entstehung von Hepatokarzinomen gekommen war.

Auffällig war, dass die Tumoren hauptsächlich im Bereich der Gefäße zu finden waren. Dies ließ sich mit der angewendeten Hydrodynamischen Schockinjektion erklären. Durch diese Technik wurde das itat-NLS-Cre Protein direkt in die Leber appliziert und konnte so primär in Endothelien der Gefäße translozieren und dort rekombinieren.

Aus dem Fehlen eines generellen ALT-Anstiegs in Gruppe II, obwohl diese Tiere dreimalige itat-NLS-Cre Injektionen erhielten, könnte man schließen, dass nicht die Quantität an verabreichtem PTD-Cre Protein für Tumorinduktion im AST-Modell ausschlaggebend war. Eine weitere Möglichkeit für das Ausbleiben erhöhter Enzymwerte könnte darin liegen, dass die AST-Tiere aus Gruppe I aufgrund individueller genetischer Prädisposition (= entstammten einem Wurf) schneller einen Lebertumor entwickeln konnten, als die AST-Tiere aus Gruppe II, die einer anderen Verpaarung entstammten.

Allgemein kann die Latenzzeit, bis es zur Entstehung von Hepatokarzinomen in induzierten AST-Tieren kommt, relativ unterschiedlich sein. In rekombinierten Albumin-floxstop-TAgxCre-deleter Tieren mit konstitutiver TAg-Expression dauerte es drei bis vier Monate bis sich Tumoren entwickelten. Ähnliche Latenzzeiten ergaben sich bei Induktion der Onkogenexpression mit 5×10^8 pfu Adenoviren, die das Cre-Gen trugen. Die Injektion von $2,5 \times 10^8$ bzw. 1×10^8 pfu Adeno-Cre zeigten, dass ~50% bis ~80% der AST-Tiere Hepatokarzinome nach Latenzzeiten von vier bis sechs Monaten entwickelten (S. Stahl, persönliche Kommunikation). Somit müssen die verbliebenen AST-Tiere der Gruppe II weiterhin bezüglich steigender ALT-Titer beobachtet werden, da Tumorentstehung zu einem späteren Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann.

4.2.6. Induzierbare Modellsysteme

Derzeit existieren zahlreiche konstitutive und konditionelle Tumormodelle in der Forschung. Der Fokus meiner Dissertation lag auf der Herstellung eines Cre/loxP-induzierbaren Tumormodells. Deshalb soll an dieser Stelle auf die wichtigsten und für meine Arbeit relevanten Publikationen detaillierter eingegangen werden. Zur Herstellung meiner transgenen Konstrukte wählte ich den Tyrosinasepromotor und den KeratinIV-Promotor. Beides waren stark exprimierende und in der Haut aktive Promotoren, die gewebsspezifische Onkogenexpression ermöglichten. Publikationen, die sich mit der Expression von Genen unter der Kontrolle des Tyrosinasepromotors beschäftigten, stammten von Bradl et al. (1991), Beermann et al. (1992), Ganss et al. (1994), Chin et al. (1997, 1999) und Delmas et al. (2003).

Die Publikationen von Beermann et al. und Ganss et al. charakterisierten den Tyrosinasepromotor und stellten einen Zusammenhang der Promotorregion und einem cis-liegenden Enhancer-Element, das die Expression steuerte, dar. Da in meinem konditionellen Modell eine möglichst starke Onkogenexpression erzielt werden musste, sollte dies unter der Kontrolle des kompletten Tyrosinase-Promotor-Enhancer Bereiches erfolgen. Bradl et al. publizierten, dass die Expression des TAG-Onkogens in konstitutiven Tyrosinase-TAG Mäusen zur Bildung von Augentumoren und Melanomen führte. Dabei wurde außerdem die gewebsspezifische Onkogenexpression unter der Kontrolle des Tyrosinasepromotors demonstriert. Im konstitutiven Modell von Delmas et al. kam es zur gewebsspezifischen Exzision einer Stopkassette in Tyrosinase-CrexRosa26 doppeltransgenen Mäusen. Dabei wurde die selektive Expression des Reporterproteins in Haarfollikelzellen gezeigt.

Im Gegensatz zu diesen beiden konstitutiven Modellen stellten Chin et al. ein tetracyclin-(rtTA-)induzierbares Modell her. Durch Zugabe von Tetracyclin in das Trinkwasser von Tyrosinase-rtTA-H-Ras^{V12G}x Ink4a^{-/-} Tieren erfolgte Tumorentstehung durch Expression des mutierten Zellzyklusregulators H-Ras^{V12G}. Die Tumorentstehung in ihrem Modell bedingte das Vorliegen eines zusätzlichen Gen knock-outs des Tumorsuppressorgens Ink4a. Chin et al. zeigten, dass es bei 25% der induzierten Tiere zur Entstehung von Melanomen nach einer Latenzzeit von sechzig Tagen (+/- 26 Tage) kam.

Die Verwendung von Keratinpromotoren in transgenen Systemen wurde in den Veröffentlichungen von Indra et al. (1999), Berton et al. (2003) und Suzuki et al. (2003) beschrieben. Im Modell von Indra et al. wurde die gewebsspezifische Aktivierung des lacZ-Reportergens in konditionellen Keratin-CreERT²xRosa26 Tieren gezeigt. Dabei war die Verwendung einer tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase von besonderer Bedeutung, da man hier die Induktion der Rekombinase posttranskriptionell (vgl. Seite 12, Abbildung 6) steuern konnte. Berton et al. zeigten Hyperproliferation der Epidermis und Tumorentstehung in konstitutiven Keratin-CrexKeratin-Brca^{flox/flox} Tieren durch den knock-out des Brca-Gens. Das Modell von Suzuki et al. (2003) zeigten die Entstehung epidermaler Hyperplasien und Hyperkeratosis in Keratin-CrexKeratin-Pten^{flox/flox} Tieren durch Exzision des Pten-Gens.

Meine Wahl, das SV40 Tag als Onkogen zu verwenden, beruhte darauf, dass zu Beginn meiner Arbeit in den Publikationen von Bradl et al. (1991), Lakso et al. (1992), Ganss et al. (1998), Sacher (2000) und Ryschich et al. (2002) erfolgreich die Entstehung von Tumoren im Mausmodell unter Verwendung von TAg demonstriert wurde. Bradl et al. zeigten die Entstehung von Melanomen der Augen und der Haut durch konstitutive Expression von TAg. Die Veröffentlichungen von Ryschich et al. und Ganss et al. demonstrierten die Entstehung von Insulinomen im RIP-TAg-Modell (= Rat insulin promotor-TAg). Dabei entstanden Insulinome durch gewebsspezifische, konstitutive TAg-Expression unter der Kontrolle des Insulinpromotors. Das Modell von Sacher demonstrierte die Entstehung von Hepatokarzinomen in konditionellen Albumin-floxstop-TAg Tieren. Lakso et al. zeigten in ihrem konstitutiven Cre/loxP-Modell die Entstehung von TAg-vermittelten Augentumoren in rekombinierten CMV-Crex α -A-Crystalin-floxstop-TAg Tieren. Die Experimente von Sacher und Lakso et al. zeigten erstmals die in vivo-Exzision einer floxstop-Kassette und daraus resultierende Tumorentstehung.

In meinem Modell sollte die Induktion der Onkogenexpression durch eine konditionell induzierbare Cre-Rekombinase erfolgen. Eine solche posttranslationelle Regulierbarkeit von Proteinen wurde von Feil et al. (1996, 1997), Indra et al. (1999) und Felsher & Bishop (1999) beschrieben. Die Veröffentlichungen von Feil et al. und Indra et al. demonstrierten die Induktion von Zielgenexpression unter Verwendung einer tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase.

Dabei zeigten sie, dass ein Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und Östrogenrezeptorbindedomäne nach Induktion mit Tamoxifen bzw. 4-Hydroxytamoxifen in vivo-Rekombination vermittelte. Die beiden Publikationen von Feil et al. publizierten eine Verbesserung der Induktionsfähigkeit des CreERT²- im Vergleich zum CreERT-Protein. Dabei wurden im Bereich der Hormonbindedomäne drei Mutationen eingeführt, wodurch die Sensitivität des Rezeptors für den Hormonantagonisten zehnfach herabgesetzt werden konnte, gleichzeitig aber keine Hintergrundaktivierung des Fusionsproteins durch körpereigenes Östrogen detektiert wurde. Außerdem zeigten Feil et al. die gewebsspezifische Rekombination in der Basalschicht muriner Epidermis in Keratin-CreERTxRosa26 bzw. Keratin-CreERT²xRosa26 Tieren. Felsher & Bishop demonstrierten die Entstehung von prämaligen Lesionen der Suprabasalschicht der Haut unter Verwendung eines transgenen ERT-Myc Konstruktes. In nicht-induziertem Zustand lag das Fusionsprotein ERT-Myc inaktiv im Zytosol der Zelle vor. Durch Binden von Tamoxifen an den Östrogenrezeptor kam es zu einer Konformationsänderung, wodurch das Fusionsprotein, in Analogie zum bereits beschriebenen CreERT²-Fusionsprotein, in den Zellkern translozieren konnte (vgl. auch Seite 12, Abbildung 6) und die Zelle zu Hyperproliferation veranlasste.

In meiner Arbeit vereinigte ich die verschiedenen Ansätze der aufgeführten Publikationen zur Herstellung meines Tumormodells. So vermittelten sowohl der Tyrosinase- als auch der KeratinIV-Promotor die gewebsspezifische Expression des CreERT²-Proteins bzw. des TAg-Onkogens. Ebenso wie Bradl et al., Lakso et al., Ganss et al. und Ryschich et al. zeigte ich die Transformation von gesunden Zellen zu Tumorzellen durch TAg-Expression in rekombinierten Mäusen. Die konditionelle Induktion meines Modells sollte, in Anlehnung an die Erkenntnisse von Feil et al., Indra et al. und Felsher & Bishop, durch ein 4-Hydroxytamoxifen aktivierbares CreERT²-Protein erfolgen. Die konditionelle, gewebsspezifische Induzierbarkeit in meinen Tyrosinase-CreERT²-transgenen Mauslinien konnte nach Verpaarung mit Rosa26-Reportermäusen in doppeltransgenen Nachkommen demonstriert werden (siehe „3.1.2.“). Wie bereits in „4.1.2.“ beschrieben, konnte ich auch die Entstehung von Tumoren in meinen floxstop-TAg Linien zeigen. Die dabei gemachten Beobachtungen bezüglich der Tumortalenz und Art der diagnostizierten Tumoren korrelierte mit den Beobachtungen von Malkin (1993), Hollstein et al. (1994), Weinberg (1995), Yamasaki et al. (1996) und Donehower (1996).

4.2.7. PTD-Cre Fusionsproteine

Wie von Schwarze et al. (1999, 2000) gezeigt, war ein tat-FITC Konstrukt in nahezu 100% aller Blutzellen von C57BL/6-Mäusen nach intraperitonealer Injektion nachweisbar. Ebenso wurde FITC-Fluoreszenz in Milzzellen und im Gehirn demonstriert. Schwarze et al. konnten weiterhin zeigen, dass ein tat- β -Galaktosidase Konstrukt mit einer Molekülmasse von ca. 120kDa nach intraperitonealer Injektion in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden konnte. Die dabei untersuchten Organe umfassten Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Gehirn. Die Umsetzung des farblosen X-Gal Substrates in einen blauen Farbstoff durch β -Galaktosidase demonstrierte tat-vermittelte Translokation in alle Zellen der untersuchten Gewebe.

Diese Ergebnisse standen in Korrelation mit den Ergebnissen von Jo et al. (2001). Dabei wurde ein PTD-Cre Konstrukt verwendet, das die Translokationssequenz des Kaposi-Fibroblast Growth Factors (= KFGF) trug. Jo et al. zeigten Translokation des NLS-Cre-KFGF Konstruktes in 100% aller Zellen. Bei in vitro-Versuchen wurde die Rekombinationsfähigkeit dieses Konstruktes in Tex.loxP.EG-Zellen untersucht. Diese Reporterzellen waren T-Lymphozyten mit einer floxstop-EGFP-Kassette, in denen es nach erfolgter Rekombination zur Expression des EGF-Proteins (= engl. „enhanced green fluorescence protein“) kam. Nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von NLS-Cre-KFGF detektierten sie 50% bis 82% EGFP-positive Zellen. In ex vivo-Experimenten zeigten Jo et al. Rekombination in 50% aller mit NLS-Cre-KFGF inkubierten Rosa26-Milzzellen.

Eine weitere Publikation, in der Rekombination durch Verwendung von PTD-Cre Konstrukten beschrieben wurde, stammte von Peitz et al. (2002). Dabei verglichen sie die Rekombinationsfähigkeit verschiedener PTD-Cre Proteine, nämlich NLS-Cre-KFGF, tat-NLS-Cre und NLS-Cre, miteinander. Sie zeigten, dass tat-NLS-Cre die höchsten Rekombinationseffizienzen aufwies. Peitz et al. demonstrierten außerdem, dass ein NLS-Cre Protein (NLS = nukleäre Lokalisierungssequenz) bis zu 90% Rekombination in CV1-5B-Reporterzellen vermitteln konnte. Ebenso wie Peitz et al. konnte ich auch Rekombination eines NLS-Cre Proteins beobachten, was auf erfolgte Translokation zurückzuführen war. Dabei zeigte sich, dass die nukleäre Lokalisierungssequenz des SV40 ausreichte, um Translokation in Zellen zu vermitteln.

Allerdings lagen die von mir ermittelten Rekombinationseffizienzen für dieses Konstrukt in einer Konzentrationsabhängigkeitsstudie zwischen ~60% und ~80%. Die Fähigkeit von PTD-Cre Proteinen, in nahezu 100% aller Zellen, wie von Schwarze et al. und Jo et al. beschrieben, zu translozieren, konnte auch von mir beobachtet werden (siehe „3.2.3.2.“). Dies zeigte ich durch Detektion von translozierten Fusionsproteinen mit Cre-spezifischen Antikörpern nach Inkubation mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an PTD-Cre bzw. nach unterschiedlich langen Inkubationszeiträumen (siehe „3.2.3.2.1.“ und „3.2.3.2.2.“). Außerdem demonstrierte ich, dass die Translokationsfähigkeit nicht zelltypspezifisch für die verwendeten Reporterzellen war (siehe „3.2.3.2.3.“). Die höchsten Rekombinationseffizienzen in meinen Versuchen vermittelten die Konstrukte itat-NLS-Cre, NLS-Cre-itat und tat-NLS-Cre. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ho et al. (2001), die eine 33fach höhere Translokationsrate für die itat-PTD im Vergleich mit der tat-PTD zeigten, konnte ich keine Differenzen in dieser Größenordnung zwischen der Translokations- bzw. Rekombinationseffizienz dieser beiden PTD beobachten.

Das NLS-Cre-KFGF Konstrukt besaß gemäß meiner Daten - und übereinstimmend mit den Ergebnissen von Peitz et al. - die geringste in vitro-Rekombinationseffizienz. Dies stellte jedoch einen Widerspruch zu den Daten von Jo et al. dar, die hohe in vitro-Rekombinationseffizienzen in Tex.loxP.EG-Reporterzellen nach Inkubation mit NLS-Cre-KFGF zeigten. Ich verwendete in meinen Versuchen CV1-5B-Zellen, eine Affennierenfibroblasten-Zelllinie. Aus der Verwendung unterschiedlicher Reporterzelllinien heraus könnte die Diskrepanz der in vitro-Daten zu erklären sein. Obwohl Peitz et al. ihre Cre-Proteine (NLS-Cre-KFGF, tat-NLS-Cre und NLS-Cre) in Mäuse injizierten, konnten sie keine in vivo-Rekombination beobachten. Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen von Jo et al. und meinen eigenen Daten (siehe „3.2.6.“). Jo et al. zeigten, dass ein NLS-Cre-KFGF Protein sowohl nach intravenöser als auch nach intraperitonealer Injektion in Reporterermäusen zu Rekombination in zahlreichen Organen führte.

In meinen eigenen Experimenten mit Rosa26-Mäusen konnte ich die Aktivierung des Reporterenzym in Leber, Milz, Pankreas, Lymphknoten und Gehirn nach intraperitonealer bzw. intravenöser Injektion von itat-NLS-Cre Protein beobachten. In Herz, Niere, Lunge, Niere und Hoden konnte ich keine Unterschiede zwischen mit PTD-Cre und unbehandelten Kontrollmäusen beobachten.

Im Rahmen dieser Dissertation zeigte ich erstmalig in vivo-Tumorentstehung durch Injektion von rekombinantem itat-NLS-Cre Protein. Dieses Protein war durch die fusionierte itat-PTD in der Lage, nach intravenöser Injektion in Hepatozyten konditioneller Albumin-floxstop-TAg Mäuse zu translozieren. Im Anschluss an die Translokation sorgte die Cre-Rekombinase für die Exzision einer von loxP-Stellen flankierten Stopkassette. Dadurch wurde die Onkogenexpression in diesen Tieren induziert und resultierte in der Entstehung von Hepatokarzinomen.

Aufgrund der Fähigkeit der Proteintranslokationssequenzen, ein an sie fusioniertes „Frachtgut“ in verschiedene Zellen und Gewebe ohne Schädigung derselben einzuschleusen, öffnet sich dieser Technologie ein weites Anwendungsfeld. So werden z. B. die Einsatzmöglichkeiten von PTD-Cre Proteinen zur Induktion in Cre/loxP-konditionellen Tumorsystemen immer weiter ausgebaut und erforscht. Ebenso stellen die PTD eine Möglichkeit in der Applikation von Medikamenten dar, bei denen es derzeit Probleme mit der Applikationsroute oder Nebenwirkungen gibt. So wurde die therapeutische Verwendung eines Argininoktamer-CyclosporinA Konstruktes von Rothbard et al. (2000) publiziert. CyclosporinA ist ein effektives Medikament gegen Entzündungsreaktionen der Haut, wie z. B. Psoriasis oder Dermatitis. Bislang erfolgt die Applikation aufgrund der Undurchlässigkeit der Haut durch orale Aufnahme des Medikamentes. Dadurch kommt es zu einer systemischen Ausbreitung im Körper der Patienten und dem Auftreten nicht unerheblicher Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität. Deshalb ist die Einnahme von CyclosporinA über einen längeren Zeitraum medizinisch nicht vertretbar.

In Experimenten mit kontakt-induzierter Dermatitis in Nacktmäusen konnten Rothbard et al. zeigen, dass die dermale Applikation eines Argininoktamer-CyclosporinA Konstruktes zu einem Abklingen der Entzündungsreaktion führte. Dies bedeutete, dass dieses Konstrukt in der Lage war, durch die Hautbarriere zu translozieren und mit dermalen T-Lymphozyten zu interagieren. Translokationsversuche mit einem biotinylierten Argininoktamer-CyclosporinA Konstrukt und anschließender Detektion in Gewebeschnitten von Haut zeigten, dass dieses Konstrukt in allen Keratinozyten der Epidermis und ebenso in den meisten Zellen der Dermis detektierbar war. Außerdem Rothbard et al. eine identische Verteilung des Argininoktamer-CyclosporinA Konstruktes in menschlicher Haut, die auf Mäuse transplantiert wurde. Somit konnte erstmals eine medizinisch-relevante Nutzung der PTD-Technologie demonstriert werden.

5. Zusammenfassung

Zur Herstellung meines induzierbaren Tumormodells erzeugte ich vier verschiedene neue transgene Mauslinien. In zwei von drei konditionellen floxstop-TAg Tumorkonstruktionen zeigte ich Tumorentstehung durch Verpaarung mit Cre-rekombinierenden Mäusen. Sechs von neun Nachkommen doppeltransgener Ubiquitin-floxstop-TAgxCre-del. Mäuse entwickelten nach einer Latenzzeit von neun bis zwölf Monaten verschiedene Tumoren (Fibro-, Osteosarkome, Hepatokarzinome und Leukämien). Dabei wurde das TAg-Protein in rekombiniertem Gewebe nachgewiesen. Bei fünf von zwölf doppeltransgenen Nachkommen aus Tyrosinase-floxstop-TAgxCre-del. Verpaarungen konnten nach einer Latenzzeit von neun bis elf Monaten maligne Melanome der Augen diagnostiziert werden. Dabei zeigte sich die gewebsspezifische Onkogenexpression unter der Expressionskontrolle des Tyrosinasepromotors (siehe „3.1.3.3.“). Aus KeratinIV-floxstop-TAgxCre-del. Verpaarungen wurden bislang drei doppeltransgene Nachkommen geboren, die bei Abschluss dieser Arbeit noch keine Tumoren entwickelten. Die Tyrosinase-CreERT²-Linie demonstrierte ihre Fähigkeit zu gewebsspezifischer Rekombination in doppeltransgenen TyrCreERT²xRosa26-Mäusen (siehe „3.1.2.2“). Dabei konnte ich die selektive Rekombination nach Induktion der Rekombinase in Haarfollikelzellen zeigen. Außerdem fehlte jegliche Hintergrundexpression der Rekombinase in nicht-induzierten doppeltransgenen Tieren.

Weiterhin entwickelte ich ein PTD-Cre Induktionssystem. Dazu stellte ich sieben verschiedene PTD-Cre Proteine rekombinant her. Diese Proteine demonstrierten ihre Fähigkeit zur Translokation und Rekombination in vitro in Reporterzellen, ex vivo in Primärzellen und in vivo (siehe „3.2.3., 3.2.4., 3.2.5.“ und „3.2.6.“). Injektionen mit itat-NLS-Cre Protein in Rosa26-Reporter-Mäusen führten zu in vivo-Rekombination peripherer Blutlymphozyten, in Milz, Lymphknoten und Leber. In Tumorinduktionsexperimenten mit Albumin-floxstop-TAg Tieren resultierten itat-NLS-Cre Injektionen in ansteigenden Amino-Alanin-Transferase Blutwerten. Außerdem zeigte ich erstmalig die Entstehung von Hepatokarzinomen nach intravenöser Injektion mit itat-NLS-Cre in Albumin-floxstop-TAg Mäusen. Dabei entwickelten alle drei AST-Tiere der Kontrollgruppe I Hepatokarzinome.

6. Literaturverzeichnis

- Abremski K., Hoess R., Sternberg N. (1983); Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination; *Cell* 32: 1301-1311.
- Adams D.J., van-der-Weyden L. (2001); Are we creating problems? Negative effects of Cre Recombinase; *Genesis*. Mar; 29 (3): 115.
- Akagi K., Sandig V., Vooijs M., Van der Valk M., Giovannini M., Strauss M. and Berns A. (1997); Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice; *Nucleic Acids Research* 25 (9): 1766-1773.
- Akiyama T.E., Sakai S., Lambert G., Nicol C.J., Matsusue K., Pimprale S., Lee Y.H., Ricote M., Glass C.K., Brewer H.B. Jr., Gonzalez F.J. (2002); Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux; *Mol. Cell. Biol.* Apr; 22(8): 2607-2619.
- Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A., Fishbein E. (1974); Antibody to nuclear Ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors; *Nature* 271: 67-69.
- Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguelles A., Llorente L. (1979); Antibody penetration into living cells II: anti-ribonucleoprotein IgG penetrates into T lymphocytes causing their deletion and the abrogation of suppressor function; *J. Immunol.* 122: 1855-1862.
- Alferink J., Tafuri A., Vestweber D., Hallmann R., Hämmerling G.J. and Arnold B. (1998); Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking; *Science* 282: 1338-1341.
- Antopolsky, M.; Azhayeva, E.; Tengvall, U.; Auriola, S.; Jaaskelainen, I.; Ronkko, S.; Honkakoski, P.; Urtti, A.; Lonnberg, H.; Azhayev, A. (1999); Peptide-Oligonucleotide Phosphorothioate Conjugates with Membrane Translocation and Nuclear Localization Properties , *Bioconjugate Chem.*; 10(4): 598-606.
- Artandi S.E., Chang S., Lee S.-L., Alson S., Gottlieb G.J., Chin L., DePinho R.A. (2000); Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice; *Nature* (406): 641– 645.
- Attardi L.D., T. Jacks; The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models; *Cellular and Molecular Life Sciences* Volume 55, Issue 1: 48-63.
- Artuc, M., Nurnberg W., Czarnetzki B.M., Schadendorf D. (1995); Characterization of Gene Regulatory Elements for Selective Gene Expression in Human Melanoma Cells; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; Vol. 213, No. 2: 699-705.
- Avrameas A., Ternynck T., Nato F., Buttin G., Avrameas S. (1998); Polyreactive anti-DNA monoclonal antibodies and a derived peptide as vectors for the intracytoplasmic and intranuclear translocation of macromolecules; *PNAS USA* Vol 95; 5601-5606.
- Avrameas A., Gasmi L., Buttin G. (2001); DNA and Heparin Alter the Internalization Process of Anti-DNA Monoclonal Antibodies According to Patterns of Both the Charged Molecule and Antibody; *J. Autoimm.* 16: 383-391.
- Baker S.M., Bronner C.E., Zhang L., Plug A.W., Robatzek M., Warren G., Elliott E.A., Yu J., Ashley T., Arnheim N. (1995); Male Mice Defective In the DNA Mismatch Repair Gene PMS2 Exhibit Abnormal Chromosome Synapsis In Meiosis; *Cell* (82): 309-320.
- Baron U., Gossen M. and Bujard H. (1997); Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential; *Nucleic Acids Research* 25(14): 2723-2729.

- Batt D.B.; Luo Y.; Carmichael G.G. (1994); Polyadenylation and transcription termination in gene constructs containing multiple tandem polyadenylation signals; *Nucleic Acids Res.*; 22(14): 2811-2816.
- Becker J. C., Czerny C., and Brocker E.B. (1994); Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10; *Int Immunol* 6: 1605-1612.
- Becker-Hapak M., McAllister S., Dowdy F. (2001); TAT-mediated protein transduction into mammalian cells, *Methods*. Jul; 24(3): 247-56.
- Beermann F., Schmid E., Ganss R. and Ruppert S. (1992); Molecular characterization of the mouse tyrosinase gene: pigment cell-specific expression in transgenic mice; *Pigment Cell Res.*; Nov. 5 (5 Pt 2): 295-299.
- Bennoun M., Grimber G., Couton D., Seye A., Molina T., Briand P., Joulin V. (1998); The amino-terminal region of SV40 large T antigen is sufficient to induce hepatic tumours in mice; *Oncogene*.17(10): 1253-125
- Berkovich I., Efrat S. (2001); Inducible and reversible beta-cell autoimmunity and hyperplasia in transgenic mice expressing a conditional oncogene; *Diabetes*; 50 (10): 2260-7.
- Bennett R.P. and Dalby B. (2002); Protein delivery using VP22; *Nature Biotech.* Vol. 20: 20.
- Berns A. (2001) : Improved mouse models; *Nature* (410): 1043–1044.
- Berns A. (1999) :Turning on tumors to study cancer progression; *Nature Med.* Vol. 5 (9): 989–990.
- Berton T.R.; Matsumoto T., Page A., Conti C.J., Deng C.-X., Jorcano J.L. and Johnson D.G. (2003); Tumor formation in mice with conditional inactivation of Brca1 in epithelial tissues; *Oncogene* 22: 5415-5426.
- Betz U.A.K., Voßenrich C.A.J., Rajewsky K., Müller W. (1996); Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination; *Current Biology* (6): 1307-1316.
- Bex A., Vooijs M., Horenblas S., Berns A. (2002); Controlling Gene Expression In The Urothelium Using Transgenic Mice with Inducible Bladder Specific Cre-lox Recombination; *J. Urology*; 168 (9): 2641-2644.
- Bhatia-Gaur R., Donjacour A.A., Sciavolino P.J., Kim M., Desai N., Young P., Norton C.R., Gridley T., Cardiff R.D., Cunha G.R., Abate-Shen C., and Shen M.M. (1999); Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer; *Genes & Dev.* (13): 966-977.
- Black B.E., Holaska J.M., Rastinejad F., Paschal B.M. (2001); DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals; *Curr. Biol.* Nov 13; 11(22): 1749-1758.
- Bradl. M., Klein-Szanto A., Porter S. and Mintz B. (1991); Malignant melanoma in transgenic mice; *PNAS USA*; Vol. 88: 164-168.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P. and Metzger, D. (1997); Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse; *PNAS USA* 94 (26): 14559-14563.
- Buchholz F., Refaeli Y., Trumpp A., Bishop J.M. (2000); Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse; *EMBO-Rep.* Aug; 1(2): 133-139.
- Buchholz F., Angrand P.O., and Stewart A.F. (1996); A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs; *Nucleic Acids Res.* (24): 3118-3119.
- Capecchi M. R. (1989); Altering the genome by homologous recombination; *Science* 244 (4910): 1288-1292.

- Casanova E., Fehsenfeld S., Lemberger T., Shimshek D., Sprengel R., Mantamadiotis T. (2002); ER-based Double iCre Fusion Protein Allows Partial Recombination in Forebrain; *Genesis* 34: 208-214.
- Cavallaro U. (2000); Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis and Tumor Progression; *Journal of Neuro-Oncology* 50(1): 63-70.
- Chiba H., Chambon P., Metzger D. (2000); F9 embryonal carcinoma cells engineered for tamoxifen-dependent Cre-mediated site-directed mutagenesis and doxycycline-inducible gene expression; *Exp. Cell. Res.*; 260(2): 334-9.
- Chin L., Tam A., Pomerantz J., Wong M., Holash J., Bardeesy N., Shen Q., O'Hagan R., Pantginis J., Zhou H., Horner J.W., Cordon-Cardo C., Yancopoulos G.D., DePinho R. A. (1999); Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance; *Nature* 400: 468–472.
- Chin L., Pomerantz J., Polsky D., Jacobson M., Cohen C., Cordon-Cardo C., Horner J.W., II, and DePinho R.A.(1997); Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo; *Genes Dev.* (11): 2822-2834.
- Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee S.-L., Gottlieb G.J., Greider C.W., and DePinho R.A. (1999); p53 Deficiency Rescues the Adverse Effects of Telomere Loss and Cooperates with Telomere Dysfunction to Accelerate Carcinogenesis; *Cell* (97): 527-538.
- Chin L. et al. (2000); *Genes Dev.* (11) : 2822-2834.
- Clarke A.R. (2000); Manipulating the germline: its impact on the study of carcinogenesis; *Carcinogenesis* 21: 435-441.
- Condreay J.P., Witherspoon S.M., Clay W.C., Kost T.A. (1999); Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector; *PNAS USA*; Jan 5; 96(1): 127-132.
- Console S., Marty C., Garcia-Echeverria C., Schwendener R., Ballmer-Hofer K. (2003); Antennapedia and HIV Transactivator of Transcription (TAT) "Protein Transduction Domains" Promote Endocytosis of High Molecular Weight Cargo upon Binding to Cell Surface Glucosaminoglycans; *J Biol. Chem.* Vol. 237; Number 37: 35109-35114.
- Cronin C.A., Gluba W., Scrable H. (2001); The lac operator-repressor system is functional in the mouse; *Genes. Dev.* Jun 15; 15(12): 1506-1517.
- Costantini F. and Lacy E. (1981); Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line; *Nature* 294 (5836): 92-94.
- Constien R., Forde A., Liliensiek B., Gröne H.-J., Nawroth P., Hämmerling G., Arnold B. (2001); Characterization of a Novel Reporter Mouse to Monitor Cre Recombination as Demonstrated by a Tie2 Cre Mouse Line; *Genesis* 30: 36 – 44.
- Danielian P.S., Muccino D., Rowitch D.H., Michael S.K. and McMahon A.P. (1998); Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase; *Current Biology* 8 (24): 1323-1326.
- de-Alboran I.M., O'Hagan R.C., Gartner F., Malynn B., Davidson L., Rickert R., Rajewsky K., DePinho R.A., Alt F.W. (2001); Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation; *Immunity.* Jan; 14(1): 45-55.
- Derossi D., Chassaing G., Prochiantz A.; Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery; *Trends in Cell Biology* 8: 84-87.
- Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G., and Prochiantz A. (1996); Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent; *J. Biol. Chem.* 271: 18188-18193.

- Delmas V., Martinozzi V., Bourgeois Y., Holzenberger M. and Larue L. (2003); Cre-mediated Recombination in the Skin Melanocyte Lineage; *Genesis* 36: 73-80.
- Dietrich P., Dragatsis I., Xuan S., Zeitlin S., Efstratiadis A. (2000); Conditional mutagenesis in mice with heat shock promoter-driven cre transgenes; *Mamm-Genome*. Mar; 11(3): 196-205.
- Donehower L.A. (1996); The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies; *Sem. Cancer Biol.*; 7: 269-278.
- Edelmann W., Yang K., Umar A., Heyer J., Lau K., Fan K., Liedtke W., Cohen P.E., Kane M.F., Lipford J.R., Yu N., Crouse G.F., Pollard J.W., Kunkel T., Lipkin M., Kolodner R., and Kucherlapati R. (1997); Mutation in the Mis-match Repair Gene Msh6 Causes Cancer Susceptibility; *Cell* (91): 467-477.
- Elliott G. & O'Hare P. (1997); *Cell* 88: 223-233.
- Ewald D., Li M., Efrat S., Auer G., Wall R.J., Furth P.A. Hennighausen L. (1996); Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen; *Science* 273: 1384-1386.
- Fawell S. et al. (1994); Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells; *PNAS USA* Vol. 91: 664-668.
- Feil R., Brocard J., Mascrez B., LeMeur M., Metzger D., Chambon P. (1996); Ligand-activated site-specific recombination in mice; *PNAS USA* Oct 1; 93(20): 10887-10890.
- Feil R., Wagner J., Metzger D., Chambon P. (1997); Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Aug 28; 237(3): 752-757.
- Felsher D.W., Bishop J.M. (1999); Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic Lineages, *Mol-Cell.*; Aug; 4(2): 199-207.
- Fiering S., Kim C.G., Epner E.M., and Groudine M. (1993); An "In-Out" Strategy Using GeneTargeting and FLP Recombinase for the Functional Dissection of Complex DNA Regulatory Elements: Analysis of the β -Globin Locus Control Region; *PNAS USA* (90): 8469-8473.
- Fischer P.M., Krausz E. Lane D.P. (2001); Cellular Delivery of Impermeable Effector Molecules in the Form of Conjugates with Peptides Capable of Mediating Membrane Translocation; *Bioconjugate Chem.* Vol. 12; No. 6: 825-841.
- Fisher G.H., Orsulic S., Holland E., Hively W.P., Li Y., Lewis B.C., Williams B.O., Varmus H.E. (1999); Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models : *Oncogene*; 20 September; Vol. 18, No. 38: 5253-5260.
- Fodde R., Edelmann W., Yang K., van Leeuwen C., Carlson C., Renault B., Breukel C., Alt E., Lipkin M, Khan P.M., and Kucherlapati R.; A Targeted Chain-Termination Mutation in the Mouse Apc Gene Results in Multiple Intestinal Tumors *PNAS* (91): 8969-8973.
- Frankel A.D. and Pabo C.O. (1988); Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus; *Cell*, Vol. 55, December: 1189-1193.
- Forde A., Constien R., Gröne H.J., Hämmerling G., Arnold B. (2002); Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements; *Genesis* Aug;33(4):191-197.
- Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Suguira Y. (2001); Arginine-rich Peptides; *J. Biol. Chem.* Vol 276; Vol. 8: 5836-5840.

- Futaki S., Ohashi W., Suzuki T., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Harashima H., Sugaira Y. (2001); Stearylated Arginine-rich Peptides: A New Class of Transfection Systems; *Bioconjugate Chem.* 12: 1005-1111.
- Furth P.A., St Onge L., Böger H., Gruss P., Gossen M., Kistner A., Bujard H. and Hennighausen L. (1994); Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter; *PNAS USA* 91 (20): 9302-9306.
- Gannon M., Herrera P.L., Wright C.V. (2000); Mosaic Cre-mediated recombination in pancreas using the pdx-1 enhancer/promoter, *Genesis*. Feb; 26 (2): 143-144.
- Ganss R., Montoliu L., Monaghan A.P., and Schutz G. (1994); A cell-specific enhancer far upstream of the mouse tyrosinase gene confers high level and copy number-related expression in transgenic mice; *EMBO J.* 13: 3083-3093.
- Ganss R., Schmidt A., Schütz G. and Beermann F. (1994); Analysis of the mouse tyrosinase promoter in vitro and in vivo; *Pigment Cell Res.*; Oct. 7 (5): 275-278.
- Ganss R. and Hanahan D. (1998); Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lamphocytes; *Cancer Research*; Oct. 15; 58 (20): 4673-4683.
- Ganten D. and Ruckpaul K. (1998); Tumorerkrankungen – Handbuch der Molekularen Medizin; Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Garcia E.L., Mills A.A. (2002); Getting around lethality with inducible Cre-mediated Exzision; *Semin. Cell. Dev. Biol.* Apr;13 (2):151-158.
- Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar J.J., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M. and Stern, P.L. (1997); Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours; *Immunol Today* 18: 89-95.
- Gatz C. and Quail P.H. (1988); Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter; *PNAS USA* 85 (5): 1394-7.
- Girardi M., Oppenheim D.E., Steele C.R., Lewis J.M., Glusac E., Filler R., Hobby P., Sutton B., Tigelaar R.E., and Hayday A.C. (2001); Regulation of Cutaneous Malignancy by T Cells; *Science* (294): 605-609.
- Gjoerup O., Zaveri D., Roberts T.M. (2001); Induction of p53-Independent Apoptosis by Simian Virus 40 Small t Antigen, *J. Virol.* Oct; 75(19): 9142-9155.
- Gossen M. and Bujard H. (1992); Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters; *PNAS* 89 (12): 5547-55451.
- Gossen M. and Bujard H. (1995); Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type; *Biotechniques* 19 (2): 213-216.
- Guo C., Yang W., Lobe C.G. (2002); A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action; *Genesis* Jan; 32 (1): 8-18.
- Green M. & Loewenstein P.M. (1988); Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat transactivator protein; *Cell* 55: 1179-1188.
- Hadjantonakis A.K., Purity M., Nagy A. (1999); Cre recombinase mediated alterations of the mouse genome using embryonic stem cells; *Methods Mol. Biol.*; 97: 101-22.
- Haffar O.K., Popov S., Dubrovsky L., Agostini I., Tang H., Pushkarsky T., Nadler S.G., Bukrinsky M. (2000); Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex; *J. Mol. Biol.*; Jun 2; 299 (2): 359-68.

- Hahne M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., and Tschopp J. (1996); Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape [see comments]; *Science* 274: 1363-1366.
- Haigh J.J., Gerber H.P., Ferrara N., Wagner E.F. (2000); Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state; *Development*; 127: 1445-1453.
- Hakansson S., Jacobs A., Caffrey M. (2001); Heparin binding by the HIV-1 tat protein transduction domain; *Protein-Sci. Oct*; 10 (10): 2138-2139.
- Hann B. and Balmain A. (2001); Building 'validated' mouse models of human cancer; *Curr. Opin. Cell Biol.* (13): 778-784.
- Hanahan D. (1985); Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulian/simian virus 40 oncogenes; *Nature*; 315: 115-122.
- Hayashi S., McMahon A.P. (2002); Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse; *Dev Biol.* Apr 15; 244 (2): 305-318.
- Ho A., Schwarze S.R., Mermelstein S.J., Waksman G., Dowdy S.F. (2001); Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo, *Cancer-Res.* Jan 15; 61(2): 474-477.
- Ho A. and Dowdy S.F. (2002); Regulation of G₁ cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes; *Curr. Opinion in Genetics & Development*; 12: 47-52.
- Hoff T., Schnorr K.M., Mundy J. (2001); A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants; *Plant-Mol-Biol.* Jan; 45 (1): 41-49.
- Holzenberger M., Zaoui R., Leneuve P., Hamard G., Le-Bouc Y. (2000) ; Ubiquitous postnatal LoxP recombination using a doxycycline auto-inducible Cre transgene (DAI-Cre); *Genesis.* Feb; 26 (2): 157-159.
- Hollstein M. Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C.C. (1994); p53 mutations in human cancers; *Science*; 253: 49-53.
- Huettner C.S., Zhang P., Van Etten R.A., and Tenen D.G. (2000) ; Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1; *Nat. Genet.* 24: 57-60.
- Imai T., Chambon P., Metzger D. (2000); Inducible site-specific somatic mutagenesis in mouse Hepatozytes; *Feb*; 26 (2): 147-148.
- Indra K., Warot X., Brocard J., Bornert J.M., Xiao J.H., Chambon P., Metzger D. (1999); Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases, *Nucleic-Acids-Res.* Nov 15; 27(22): 4324-7.
- Jacks T., Remington L., Williams B.O., Schmitt E.M., Halachmi S., Bronson R.T., Weinberg R.A. (1994);Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice; *Current Biolog* (4): 1-7.
- Jackson E.L., Willis N., Mercer K., Bronson R.T., Crowley D., Montoya R., Jacks T.,and Tuveson D.A. (2001); Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras ; *Genes & Dev.* (15): 3243-3248.
- Jo D., Nashabi A., Doxsee C., Lin Q., Unutmaz D., Chen J., Ruley H.E. (2001); Epigenetic regulation of gene structure and function with a cell-permeable Cre-recombinase; *Nat-Biotechnol.* Oct; 19 (10): 929-33.

- Jo D., Lin Q., Nashabi A., Mays D.J., Unutmaz D., Pietsenpol J.A., Ruley H.E. (2003); Cell Cycle-Dependant Transduction of Cell-Permeant Cre Recombinase Proteins; *J. Cell. Biochem.* 89: 674-687.
- Johnson L., Mercer K., Greenbaum D., Bronson R.T., Crowley Y.D., Tuveson D.A. & Jacks T. (2001): Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice; *Nature* (410): 1111-1116.
- Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., and Prochiantz A. (1991); Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis; *PNAS USA* 88: 1864-1868.
- Jonkers J. & Berns A. (2002); Conditional Mouse Models Of Sporadic Cancer; *Nature Reviews Cancer*; Vol. 2; April 2002: 251-264.
- Kaczmarczyk S.J., Green J.E. (2001); A single vector containing modified cre recombinase and LOX recombination sequences for inducible tissue-specific amplification of gene expression; *Nucleic-Acids-Res.* Jun 15; 29 (12): 56-66.
- Kamijo T., Zindy F., Roussel M.F., Quelle D.F., Downing J.R., Ashmun R.A., Grosveld G., and Sherr C.J. (1997); Tumor Suppression at the Mouse INK4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product p19^{ARF}; *Cell* (91): 649-659.
- Kato M., Takahashi M., Akhand A.A., Liu W., Dai Y., Shimizu S., Iwamoto T., Suzuki H., Nakashima I. (1998); Transgenic mouse model for skin malignant melanoma, *Oncogene*. Oct 8; 17 (14): 1885-1888.
- Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H. and Tsunoda Y. (1998); Eight calves cloned from somatic cells of a single adult [see comments]; *Science* 282 (5396): 2095-2098.
- Kellendonk C., Tronche F., Casanova E., Anlag K., Opherk C., Schutz G. (1999); Inducible site-specific recombination in the brain; *J. Mol. Biol.* Jan 8; 285 (1): 175-182.
- Kellendonk C., Tronche F., Monaghan A.P., Angrand P.O., Stewart F., and Schutz G. (1996); Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486; *Nucleic Acids Res.* 24: 1404-1411.
- Kilk K., Magzoub M., Pooga M., Eriksson L.E.G., Langel Ü., Gräslund A. (2001); Cellular Internalization of a Cargo Complex with a Novel Peptide Derived from the Third Helix of the Islet-1 Homeodomain. Comparison with the Penetratin Peptide; *Bioconjugate Chem.* 12: 911-916.
- Kelsall S.R., Le-Fur N., Mintz B. (1997); Qualitative and quantitative catalog of tyrosinase alternative transcripts in normal murine skin melanocytes as a basis for detecting melanoma-specific changes, *Biochem-Biophys-Res-Commun.* Jul 9; 236 (1): 173-177.
- Kilby N.J., Snaith M.R. and Murray J.A. (1993); Site-specific recombinases: tools for genome engineering; *Trends In Genetics* 9; (12): 413-421.
- Kistner A., Gossen M., Zimmermann F., Jerecic J., Ullmer C., Lübbert H. and Bujard H. (1996); Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice; *PNAS USA* 93 (20): 10933-10938.
- Klüppel M., Beermann F., Ruppert S., Schmid E., Hummler E. and Schütz G. (1991); The Mouse Tyrosinase Promoter is Sufficient for Expression in Melanocytes and in the Pigmented Epithelium of the Retina; *PNAS USA* 88: 3777-3781.
- Knippers R. (1997); *Molekulare Genetik*; 7. Auflage; Thieme Verlag; ISBN 3-13-477007-5.

- Kovalchuk A.L., Qi C.-F., Torrey T.A., Taddesse-Heath L., Feigenbaum L., Park S.S., Gerbitz A., Klobeck G., Hoertnagel K., Polack A., Bornkamm G.W., Janz S. and Morse H.C. III (2000); Burkitt Lymphoma in the Mouse; *J. Exp. Med.* (192): 1183-1190.
- Lakso M., Sauer B., Mosinger Jr B., Lee E.J., Manning R.W., Yu S., Mulder K.L., and Westphal H. (1992); Targeted Oncogene Activation by Site-Specific Recombination in Transgenic Mice; *PNAS USA* 89: 6232-6236.
- Lavon I., Goldberg I., Amit S., Landsman L., Jung S., Tsuberi B.Z., Barshack I., Kopolovic J., Galun E., Bujard H., Ben-Neriah Y. (2000); High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for Hepatozyte NF-kappaB activation, *Nat. Med.* May; 6 (5): 573-577.
- Lea N.C., Buggins A.G.S., Orr S.J., Mufti G.J., Thomas S.B. (2003); High efficiency protein transduction of quiescent and proliferating primary hematopoietic cells; *J. Biochem. Biophys. Methods* 55: 251-258.
- Lee E., Chang C., Hu N., Wang Y., Lai C., Herrup K., Lee W. and Bradley A. (1992); Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis; *Nature* ; 359: 328-330.
- Li M., Indra A.K., Warot X., Brocard J., Messaddeq N., Kato S., Metzger D., Chambon P. (2000); Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis; *Nature*; 407 (6804): 633-636.
- Li M., Chiba H., Warot X., Messaddeq N., Gerard C., Chambon P., Metzger D. (2001); RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal Alterations; *Development Mar*; 128 (5): 675-688.
- Lin Y.-Z., Yao S.Y., Veach A.-R., Torgerson T.R. and Hawiger J. (1995); Inhibition of Nuclear Translocation of Transcription Factor NF-B by a Synthetic Peptide Containing a Cell Membrane-permeable Motif and Nuclear Localization Sequence; *J. Biol. Chem.* 270: 14255-14258.
- Lin Y.-Z., Yao S.Y., and Hawiger J. (1996); Role of the Nuclear Localization Sequence in Fibroblast Growth Factor-1-stimulated Mitogenic Pathways; *J. Biol. Chem.* 271: 5305-5308.
- Lindberg M. and Gräslund A.; The position of the cell penetrating peptide penetratin in SDS micelles determined by NMR; *Volume 497, Issue 1; FEBS Letters*: 39-44.
- Lindgren M., Hällbrink M., Prochiantz A. and Langel Ü.; Cell-penetrating peptides; *Trends in Pharmacological Sciences*; *Volume 21; Issue 3*: 99-103.
- Littlewood T.D., Hancock D.C., Danielian P.S., Parker M.G. and Evan G.I. (1995); A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins; *Nucleic Acids Research* 23(10): 1686-1690.
- Liu J.L., Grinberg A., Westphal H., Sauer B., Accili D., Karas M., LeRoith D. (1998); Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependant manner: Manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice; *Mol. Endocrinol.* 12: 1452-1462.
- Liu P., Jenkins N.A., Copeland N.G. (2003); A Highly Efficient Recombineering-Based Method for Generating Conditional Knockout Mutations; *Genome Research*; 13: 476-484.
- Loonstra A., Vooijs M., Beverloo H.B., Al Allak B., van Drunen E., Kanaar R., Berns A., Jonkers J. (2001); Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells; *PNAS USA* 98: 9209-9214.
- Ludtke J.J., Zhang G., Sebestyen M.G., Wolff J.A. (1999); A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA; *J. Cell. Sci.* 112: 2033-2241.

- Ludwig T., Fisher P., Murty V., Efstratiadis A. (2001); Development of mammary adenocarcinomas by tissue-specific knockout of Brca2 in mice; *Oncogene*; Vol. 20; No. 3: 3937-3948.
- Lundberg M., Wikström S., Johansson M. (2003); Cell Surface Adherence and Endocytosis of Protein Transduction Domains; *Molecular Therapy* Vol. 8; Number 1: 143-150.
- Luo G., Santoro I.M., McDaniel L.D., Nishijima I., Mills M., Youssoufian H., Vogel H., Schultz R.A. & Bradley A. (2000); Cancer predisposition caused by elevated mitotic recombination in Bloom mice; *Nature Gen.* 26: 424 – 429.
- Macleod K. (1999); pRb and E2f-1 in mouse development and tumorigenesis; *Curr. Opinon in Genetics and Development*; 9: 31-39.
- Macleod K.F., Jacks T. (1999); Insights into cancer from transgenic mouse models; *Journal of Pathology* 187:43-60.
- Malkin D. (1993); p53 and the Li-Fraumeni syndrome; *Cancer Genet. Cytogenet.*; 66: 83-92.
- Mansour S.L. (1990); Gene Targeting in murine embryonic stem cells : introduction of specific alterations into the mammalian genome; *Genet. Anal. Tech. Appl.*; 7 (8): 219-227.
- Marinovic A.C., Mitch W.E., Price S.R. (2000); Tools for evaluating ubiquitin (UbC) gene expression: characterization of the rat UbC promoter and use of an unique 3' mRNA sequence; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Aug 2; 274(2): 537-541.
- Maroulakou I.G., Anver M., Garrett L., and Green J.E. (1994); Prostate and Mammary Adenocarcinoma in Transgenic Mice Carrying a Rat C3(1) Simian Virus 40 Large Tumor Antigen Fusion Gene; *PNAS USA* 91:11236-11240.
- Matsuda M., Salazar F., Petersson M., Masucci G., Hansson J., Pisa P., Zhang Q.J., Masucci M.G., and Kiessling R. (1994); Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression; *J Exp Med* 180: 237-2376.
- McClatchey A.I., Saotome I., Mercer K., Crowley D., Gusella J.F., Bronson R.T. and Jacks T. (1998); Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors; *Genes & Dev.* 12: 1121-1133.
- Metzger D., Chambon P. (2001); Site- and time-specific gene targeting in the mouse; *Methods*. May; 24(1): 71-80.
- Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P. (1995); Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase; *PNAS USA* Jul 18; 92(15): 6991-6995.
- Meuwissen R., Linn S.C., van der Valk M., Mooi W.J., Berns A. (2001); Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene; *Oncogene* 20: 6551-6558.
- Michael S.K., Brennan J. and Robertson E.J. (1999); Efficient gene-specific expression of cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci; *Mechanisms Of Development* 85(1-2): 35-47.
- Minamino T., Gaussin V., DeMayo F.J., Schneider M.D. (2001); Inducible gene targeting in postnatal myocardium by cardiac-specific expression of a hormone-activated Cre fusion protein; *Circ-Res.* Mar 30; 88(6): 587-592.
- Mintz B., Bradl M. (1991); Mosaic Expression of a Tyrosinase Fusion Gene in Albino Mice Yields a Heritable Striped Coat Color Pattern in Transgenic Homozygotes; *PNAS USA* 88: 9643-9647.

- Mintz B., Klein-Szanto A.J.P. (1992); Malignancy of Eye Melanomas Originating in the Retinal Pigment Epithelium of Transgenic Mice after Genetic Ablation of Choroidal Melanocytes; PNAS USA 89: 11421-11425.
- Mintz B., Silvers W.K. (1993); Transgenic Mouse Model of Malignant Skin Melanoma; PNAS USA 90: 8817-8821.
- Miwa T., Koyama T., Shirai M. (2000); Muscle specific expression of Cre recombinase under two actin promoters in transgenic mice; Genesis. Feb; 26(2): 136-138.
- Moroianu J. (1999); Nuclear import and export pathways; J. Cell. Biochem.: 76-83.
- Moulin K., Truel N., Andre M., Arnauld E., Nibbelink M., Cousin B., Dani C., Penicaud L., Casteilla L. (2001); Emergence during development of the white-adipocyte cell phenotype is independent of the brown-adipocyte cell phenotype; Biochem. J. Jun 1; 356: 659-664.
- Möller P., Momburg F., Koretz K., Moldenhauer G., Herfarth C., Otto H.F., Hämmerling G.J. and Schlag P. (1991); Influence of major histocompatibility complex class I and II antigens on survival in colorectal carcinoma; Cancer Research 51: 729-736.
- Nagahara H., Vocero-Akbani A.M., Snyder E.L., Ho A., Latham D.G., Lissy N.A., Becker-Hapak M., Ezhevsky S.A., Dowdy S.F. (1998); Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell Migration; Nat. Med. Dec; 4 (12): 1449-1452.
- Nagano T., Itoh N., Ebisutani C., Takatani T., Miyoshi T., Nakanishi T., Tanaka K. (2000); The transport mechanism of metallothionein is different from that of classical NLS-bearing protein; J-Cell-Physiol. Dec; 185(3): 440-446.
- Nagy A. (2000); Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring, Genesis. Feb; 26(2): 99-109.
- Niwa-Kawakita M., Abramowski V., Kalamarides M., Thomas G., Giovannini M. (2000); Targeted expression of Cre recombinase to myelinating cells of the central nervous system in transgenic mice; Genesis. Feb; 26(2): 127-129.
- Ochsenbein A.F., Sierro S., Odermatt B., Pericin M., Karrer U., Hermanns J., Hemmi S., Hengartner H. & Zinkernagel R.M. (2001); Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction; Nature (411): 1058-1064.
- O'Connell J., O'Sullivan G.C., Collins J.K. and Shanahan F. (1996); The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand; J Exp Med 184: 1075-1082.
- Ogra Y., Suzuki K.T. (2000); Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge; Genesis; Mar; 46(2): 357-365.
- Orban P.C., Chui D., and Marth J.D. (1992); Tissue- and Site-Specific DNA Recombination in Transgenic Mice; PNAS USA 89: 6861-6865.
- Orlow S.J., Hearing V.-J., Sakai C., Urabe K., Zhou B.K., Silvers W.K., Mintz B. (1995); Changes in expression of putative antigens encoded by pigment genes in mouse melanomas at different stages of malignant progression, PNAS USA; Oct 24; 92 (22): 10152-10156.
- Passinen S., Valkila J., Manninen T., Syvala H., Ylikomi T. (2001); The C-terminal half of Hsp90 is responsible for its cytoplasmic localization; Eur. J. Biochem. Oct; 268 (20): 5337-5342.
- Peitz M., Pfannkuche K., Rajewsky K., and Edenhofer F. (2002); Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: A tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes; PNAS (im Internet).

- Pelengaris S., Littlewood T., Khan M., Elia G., and Evan G. (1999); Reversible activation of c-Myc in skin: Induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion; *Mol. Cell* 3, 565–577.
- Postic C., Magnuson M.A. (2000); DNA Excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age; *Genesis*. Feb; 26(2): 149-150.
- Pooga M., Soomets U., Hällbrink M., Valkna A., Saar K., Rezae K., Kahl U., Hao J.-X., Xu X.-J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hökfelt T., Bartfai T, and Langel Ü. (1998); Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo; September; Vol. 16, Issue 9; *Nature Biotechnology*: 857.
- Prochiantz A.; Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides; Volume 6, Issue 5; *Current Opinion in Neurobiology*: 629-634.
- Prolla T.A., Baker S.M., Harris A.C., Tsao J.-L., Yao X., Bronner C.E., Zheng B., Gordon M., Reneker J., Arnheim N., Shibata D., Bradley A. & Liskay R.M. (1998); Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair; *Nature Gen.* (18): 276-279.
- Radtke T., Schmalz D., Coutavas E., Soliman T.M., Peters R. (2001); Kinetics of protein import into isolated *Xenopus* oocyte nuclei; *PNAS USA* Feb 27; 98(5): 2407-2412.
- Rajewsky K., Gu H., Kühn R., Betz U. A., Müller W., Roes J. and Schwenk F. (1996); Conditional gene targeting; *Journal Of Clinical Investigation* 98(3): 600-603.
- Ranges G.E., Figari I.S., Espevik T. and Palladino M.A., Jr. (1987); Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha; *J Exp Med* 166: 991-998.
- Ray M.K., Fagan S.P., Moldovan S., DeMayo F.J., Brunnicardi F.C. (1999); Beta cell-specific ablation of target gene using Cre-loxP system in transgenic mice; *J. Surg. Res.* Jun 15; 84 (2): 199-203.
- Reitmair A.H., Redston M., Cai J.C., Chuang T.C., Bjerknes M., Cheng H., Hay K., Gallinger S., Bapat B., and Mak T.W. (1996); Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice; *Cancer Res.* (56): 3842-3849.
- Resor L., Bowen T. J., and Wynshaw-Boris A. (2001) : Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis; *Hum Mol Genet* 10: 669-675.
- Rivoltini L., Barracchini K.C., Viggiano V., Kawakami Y., Smith A., Mixon A., Restifo N.P., Topalian S.L., Simonis T.B., Rosenberg S.A., and et al. (1995); Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes; *Cancer Res* 55: 3149-3157.
- Roberts R.W. and Szostak J.W. (1997); RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins; *PNAS USA*; 94: 12297-12302.
- Rothbard J.B., Garlington S., Lin Q., Kirschberg T., Kreider E., McGrane P.L., Wender P., Khavari P.A. (2000); Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation; *Nature Med.* Vol. 6; Number 11: 1253-1257.
- Ryschich E., Schmidt J., Hämmerling G.J., Klar E. and Ganss R. (2002); Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis; *Int. Journal of Cancer*; Feb. 20; 97 (6): 719-725.
- Sacher T. (2000); Doktorarbeit; Die Rolle von Entzündungsreaktionen bei Immunreaktionen gegen gesundes und malignes Gewebe: Etablierung eines autochthonen Tumormodells.

- Schmidt E.E., Taylor D.S., Justin R., Loonstra A., Vooijs M., Beverloo H.B., Al Allak B., van Drunen E., Kanaar R., Berns Prigge J.R., Barnett S., and Capecchi M.R. (2000); Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids; *PNAS USA* (97): 13702-13707.
- Schnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A. and Campbell K. H. (1997); Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [see comments]; *Science* 278 (5346): 2130-2133.
- Schorpp M., Jager R., Schellander K., Schenkel J., Wagner E.F., Weiher H., Angel P. (1996); The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice; *Nucleic Acids Res.* May 1; 24(9): 1787-1788.
- Schutze-Redelmaier M.-P., Gournier H., Garcia-Pons F., Moussa M., Joliot A.H., Volovitch M., Prochiantz A., Lemmonier F.A. (1996); Introduction of Exogenous Antigens into the MHC Class I Processing and Presentation Pathway by Drosophila Antennapedia Homeodomain Primed Cytotoxic T Cells in vivo; *J. Immunol.* 157: 650-655.
- Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S.F. (1999); In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse; *Science.* Sep 3; 285 (5433): 1569-1572.
- Schwarze S.R., Hruska K.A. and Dowdy S.F.; Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?; *Trends in Pharmacological Sciences*; Volume 10, Issue 7: 290-295.
- Schwenk, F., Kuhn R., Angrand P.O., Rajewsky K. and Stewart A. F. (1998); Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice; *Nucleic Acids Research* 26(6): 1427-1432.
- Serrano M., Lee H.-W., Chin L., Cordon-Cardo C., Beach D., and DePinho R.A. (1996); Role of the INK4a Locus in Tumor Suppression and Cell Mortality; *Cell* (85); 27-37.
- Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J. & Schreiber R.D. (2001); IFN and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity; *Nature* (410): 1107-1111.
- Shibagaki N., Udey M.C. (2003); Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing Tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma; *Eur. J. Immunol.* 33: 850-860.
- Shimshek D.R., Kim J., Hubner M.R., Spergel D.J., Buchholz F., Casanova E., Stewart A.F., Seeburg P.H., Sprengel R. (2002); Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse; *Genesis* 32: 19-26.
- Sohal D.S., Nghiem M., Crackower M.A., Witt S.A., Kimball T.R., Tymitz K.M., Penninger J.M., Molkentin J.D. (2001); Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein; *Circ.Res.* Jul 6; 89 (1): 20-25.
- Soriano, P. (1999); Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [letter]; *Nature Genetics* 21(1): 70-71.
- Strambio de Castillia C., Blobel G., Rout M.P. (1999); Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior; *J. Cell. Biol.* Mar 8; 144 (5): 839-855.
- Su H., Wang X. & Bradley A. (2000); Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice; *Nature Gen.* (24): 92-95.
- Suzuki A., Itami S., Ohishi M., Hamada K., Inoue T., Komazawa N., Senoo H., Sasaki T., Takeda J., Manabe M., Wah Mak T. and Nakano T. (2003); Keratinocyte-specific Pten Deficiency Results in Epidermal Hyperplasia, Accelerated Hair Follicle Morphogenesis and Tumor Formation; *Cancer Research* 63; February: 674-681.

- Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Suguiira Y. (2002); Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-rich Peptides; *J. Biol. Chem.* Vol. 277; No. 4: 2437-2443.
- Tarutani M., Itami S., Okabe M., Ikawa M., Tezuka T., Yoshikawa K., Kinoshita T., Takeda J. (1997); Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development; *PNAS USA* Jul 8; 94 (14): 7400-7405.
- Tannour-Louet M., Porteu A., Vaulont S., Kahn A., Vasseur-Cognet M. (2002); A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver; *Hepatology*; May; 35 (5):1072-1081.
- Terry R.W., Kwee L., Baldwin H.S. and Labow, M.A. (1997); Cre-mediated generation of a VCAM-1 null allele in transgenic mice; *Transgenic Research* 6 (5): 349-356.
- Thomas K. R. and Capecchi M. R. (1987); Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells; *Cell* 51 (3): 503-512.
- Torre-Amione G., Beauchamp R.D., Koeppen H., Park B.H., Schreiber H., Moses H.L. and Rowley D.A. (1990); A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance; *PNAS USA* (87): 1486-1490.
- Tuting T., Steitz J., Bruck J., Gambotto A., Steinbrink K., DeLeo A.B., Robbins P., Knop J., Enk A.H. (1999); Dendritic cell-based genetic immunization in mice with a recombinant adenovirus encoding murine TRP2 induces effective anti-melanoma immunity; *J. Gene. Med.*; 1(6): 400-406.
- van Deursen J., Fornerod M., van Rees B., and Grosveld G. (1995); Cre-Mediated Site-Specific Translocation between Nonhomologous Mouse Chromosomes; *PNAS USA* (92): 7376-7380.
- Vasioukhin V., Degenstein L., Wise B., Fuchs E. (1999); The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin; *PNAS USA* Jul 20; 96 (15): 8551-8556.
- Vegeto, E., Allan, G.F., Schrader, W.T., Tsai, M.J., McDonnell, D.P. and O'Malley, B.W. (1992); The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor; *Cell* 69 (4): 703-713.
- Vives E., Brodin P., Lebleu B. (1997); A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus; *J. Biol. Chem.* Jun 20; 272 (25): 16010-16017.
- Vivès E. and Lebleu B.; Selective Coupling of a Highly Basic Peptide to an Oligonucleotide; *Tetrahedron Letters*; Volume 38, Issue 7: 1183-1186.
- Vocero-Akbani A., Lissy N.A., Dowdy S.F. (2000); Transduction of full-length Tat fusion proteins directly into mammalian cells: analysis of T cell receptor activation-induced cell death; *Methods Enzymol.*: 322508-322521.
- Vooijs M., Jonkers J., Berns A. (2001); A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependant; *EMBO reports* Vol.2; No. 41: 292-297.
- Wadia J.S., Dowdy S.F. (2002); Protein transduction technology; *Curr. Op. Biotech.* 13: 52-56.
- Wallich R., Bulbuc N., Hämmerling G.J., Katzav S., Segal S. and Feldmann M. (1985); Abrogation of metastatic properties of tumour cells by de novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection; *Nature* 1985; May; 315 (6017): 301-305.
- Weinberg R. (1995); The retinoblastoma protein and cell cycle control; *Cell*; 81: 323-330.

- Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J. and Campbell K. H. (1997); Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [see comments] [published erratum appears in Nature 1997 Mar 13; 386(6621): 200]; Nature 385 (6619): 810-813.
- Wolff T., Unterstab G., Heins G., Richt J.A., Kann M. (2002); Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import; J. Biol. Chem. Apr 5; 277 (14): 12151-12157.
- Wender P.A., Mitchell D.J., Pattabiraman K., Pelkey E.T., Steinman L., Rothbard J.B. (2000); The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters, PNAS USA Nov 21; 97(24): 13003-13008.
- Werdien D., Peiler G., Ryffel G.U. (2001); FLP and Cre recombinase function in Xenopus Embryos; Nucleic Acids Res. Jun 1; 29(11): E53-3.
- Wunderlich F.T., Wildner H., Rajewsky K., Edenhofer F. (2001); New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility; Nucleic Acids Res. May 15; 29(10): E47.
- Wurtz O., Pophillat M., Schmitt-Verhulst A.M., Guerder S. (2002); A novel reporter strain to follow Cre-mediated recombination in T and NK cells; Genesis Apr; 32 (4): 287-292.
- Xie W., Wu X., Chow L.T., Chin E., Paterson A.J. and Kudlow J.E. (1998); Targeted expression of activated erbB-2 to the epidermis of transgenic mice elicits striking developmental abnormalities in the epidermis and hair follicles; Cell Growth Differ. 9: 313-325.
- Yamasaki L. Jacks T., Bronsorn R., Goillot E., Harlow E. and Dyson N.J. (1996); Tumor induction and Tissue atrophy in mice lacking E2F-1; Cell; 85: 537-548.
- Yanase K., Smith R.M., Pucetti A, Jarett L., Madaio M.P. (1997); Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin; J. Clin. Invest. 100: 23-31.
- Yang Y., Ma J., Song Z., Wu M. (2002); HIV-1TAT-mediated protein transduction and subcellular localization using novel expression vectors; FEBS letters 532: 36-44.
- Ziegler A., Blatter X.L., Seelig A., Seelig J. (2003); Protein Transduction Domains of HIV-1 and SIV TAT Interact with Charged Lipid Vesicles. Binding Mechanism and Thermodynamic Analysis; Biochemistry 42: 9185-9194.
- Zhang F., White R.L. and Neufeld K.L.; Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein; PNASUSA 97: 12577-12582.
- Zhang Y., Riesterer C., Ayrall A.M., Sablitzky F., Littlewood T.D., and Reth M. (1996); Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells; Nucleic Acids Res. 24: 543-548.
- Zhen H.N., Zhang X., Bu X.Y., Zhang Z.W., Huang W.J., Zhang P., Liang J.W., Wang X.L. (1999); Expression of the simian virus 40 large tumor antigen (Tag) and formation of Tag-p53 and Tag-pRb complexes in human brain tumors; Cancer. Nov 15; 86(10): 2124-2132.
- Zheng B., Sage M., Cai W.-W., Thompson W.M., Tavsanli B.C., Cheah Y.-C. & Bradley A. (1999); Engineering a mouse balancer chromosome; Nature Gen. (22): 375-378.
- Zou Y.-R., Müller W., Gu H., Rajewsky K. (1994); Cre-loxP-mediated gene replacement : a mouse strain producing humanized antibodies; Current Biology (4): 1099-1103.
- Zuo J., Niu Q.W., Moller S.G., Chua N.H. (2001); Chemical-regulated, site-specific DNA Exzision in transgenic plants; Nat. Biotechnol. Feb; 19(2): 157-161.

7. Anhang

7.1. Zusammenstellung aktueller Tumormodellsysteme

Onkogen	Spezifität	Tumor	Referenz
Msh2	Haut	Lymphome, Hautkarzinome	Reitmayr (1996)
p19-Arf	Haut	Lymphome, Sarcome	Kamijo (1997)
Tyr-RasInk4a	Haut	Melanome	Chin (1997)
Myc	Haut	Prämaligene Läsionen	Felsher (1998)
Erb2	Haut	Epidermale Hyperplasien	Xie (1999)
Ras	Haut	Papillome, Karzinome	Brown (1998)
H-Ras/Ink4a/p19Arf	Haut	Melanome	Chin (1999)
Myc-ER	Haut	Papillome	Pelengaris (1999)
Ptch ^{-/-}	Haut	Basalzellkarzinome	Aszterbaum (1999)
K14-HPV16MMP-9 ^{-/-}	Haut	Karzinome	Coussens (2000)
Ras	Haut	Epidermale Tumoren	Chin (2000)
p16 ^{Ink4a^{-/-}}	Haut	Lymphome, Melanome	Sharpless (2001)
Metallotionine- HGF/SF	Haut	Melanome	Noonan (2001)
Brca ^{flox/flox} Cre	Haut	Hyperproliferation	Berton (2003)
Pten ^{flox/flox} Cre	Haut	Epidermale Hyperplasien	Suzuki (2003)
TRAMP	Prostata	Adenokarzinome	Greenburg (1995)
SV40 TAg	Prostata	Adenokarzinome	Greenburg (1999)
Nkx3.1 ^{-/-}	Prostata	Dysplasien	Bhatia-Gaur (1999)
Pten ^{+/-} p27KIP ^{+/-}	Prostata	Karzinome	DiCristofano (2001)
Apc ^{min+/-}	Gastrointestinal	Gastrointestinale Tumoren	Su (1992)
Apc ^{1638N+/-}	Gastrointestinal	Adenokarzinome	Fodde (1994)
Apc ^{616+/-} Smad4 ^{+/-}	Gastrointestinal	Adenome, Adenokarzinome	Takaku (1998)
PI(3)K ^{γ^{-/-}}	Gastrointestinal	Adenokarzinome	Sasaki (2000)
Terc ^{-/-} Apc ^{min+/-}	Gastrointestinal	Adenome, Microadenome	Rudolph (2001)
Nf1 ^{+/-} p53 ^{+/-}	Zentrales Nervensystem / Peripheres Nervensystem	Periphere Nervenmembran Tumoren	Vogel (1999)
K-ras + Akt	Zentrales Nervensystem / Peripheres Nervensystem	Glioblastome	Holland (2000)
Nf1 ^{+/-} p53 ^{+/-}	Zentrales Nervensystem / Peripheres Nervensystem	Glioblastome	Reilly (2000)

Anhang

Onkogen	Spezifität	Tumor	Referenz
hCG-PML-RAR α	Hematopoetische Gewebe	Leukämie	He (1997)
c-myc	Hematopoetische Gewebe	Lymphome, Myeloide Tumoren	Felsher (1999)
myc	Hematopoetische Gewebe	Burkitt Lymphom	Kovalchuk (2000)
hCG-PML-RAR α , μ 4	Hematopoetische Gewebe	Leukämie	Kogan (2000)
Bcr-Abl	B-lymphoides Kompartiment	B-ALL	Huettner (2000)
SV40 TAg	Auge	Melanome	Bradl (1991)
SV40 TAg	Auge	Retinoblastom	Lakso (1992)
K-ras	Lunge	Adenokarzinome	Johnson (2001)
Ink4a	Leber, Milz, Weichteile	Lymphome, Sarcome	Serrano (1996)
SV40 TAg	Gehirn	Choroid plexus Karzinom	Chen (1991)
SV40 TAg	Speicheldrüse	Hyperplastische Gänge	Ewald (1996)
SV40 TAg	Leber	Hepatokarzinome	Sacher (2000)
Brca2	Milchdrüsenepithel	Adenokarzinome	Ludwig (2001)
SV40 TAg	Pankreas	Insulinome	Hanahan (1985)
SV40 TAg	Pankreas	Insulinome	Ganß (1998)
E1-TGF- α p53 ^{+/-}	Pankreas	Ductale Karzinome	Wagner (2001)
SV40 TAgMMP-9 ^{-/-}	Pankreas	β -cell Karzinome	Bergers (2000)
SV40 TAg	Pankreas	Hyperplasie	Berkovich (2001)
Pten ^{+/-}	Verschiedene Gewebe	Sarkome	DiCristofano (1998)
Terc ^{-/-} p53 ^{-/-}	Verschiedene Gewebe	Karzinome, Sarkome	Artandi (2000)
Blm ^{-/-}	Verschiedene Gewebe	Bloom Syndrom	Luo (2000)
Mlh1	Verschiedene Gewebe	Lymphome, Karzinome	Prolla (1998)
Rb ^{-/-}	Verschiedene Gewebe	Li-Fraumeni Syndrom	Jacks (1992)
p53 ^{-/-}	Verschiedene Gewebe	Lymphome, Sarkome	Jacks (1994)
Nf-1 ^{-/-}	Verschiedene Gewebe	Myeloide Leukämie	Jacks (1994)
Nf-2 ^{-/-}	Verschiedene Gewebe	Sarkome	McClatchey (1998)

7.2. Übersicht über verschiedene PTD-Sequenzen

Name	Herkunft	Sequenz
Amphiphilic model peptide (Amp)	künstliche Sequenz	KLALKLALKALKAAKLA
Antennapedia (Antp)	Drosophila melanogaster	RQIKIWFQNRRMKWKK
Argininoktamer (Arg8x)	künstliche Sequenz	RRRRRRRR
Viral protein 22 (VP22)	Herpes simplex virus	DAATATRGRSDDSRPTEPRDPDRSDSRPRRPVE
Improved tat (itat)	modifizierte tat-Sequenz	YARAAARQARA
Kaposi Fibroblast Growth Factor (KFGF)	Kaposi Sarkom	AAVALLPAVLLA
Penetratin	modifizierte Antp-Sequenz	RQIKIWFQNRRMKWKK
Nuclear localisation sequence (NLS)	Simian Virus 40	PKKKRKV
Transactivator of transcription (tat)	Human immunodeficiency virus 1	YGRKKRRQRRR
Transportan	künstliche Sequenz	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
gp41 Fusion sequence	Glykoprotein 41	GALFLGWLGAAGSTMGE
Caiman crocodylus Ig(v) light chain	Caiman crocodylus	MGLGLHLLVLAALQGA
MPS	Human integrin β_3 signal sequence	VTVLALGALAGVGVG

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Arg8x	Arginin-Oktamer
AST	Albumin-floxstop-TAg
bp	Basenpaare
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cam	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
Cre	Cre-Rekombinase
Cre-del. (= engl. „Cre-deleter“)	Cre-rekombinierende Mauslinie
d (= engl. „day“)	Tag
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccos´ s Modified Eagle Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid
dsDNA	Doppelsträngige DNA
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylenamintetraesssäure
ERT ²	Östrogenrezeptor mit zweifach mutierter Bindedomäne
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FACS (= engl. „fluorescence activated cell sorter“)	Durchflusszytometer
FCS (= engl. „fetal calf serum“)	Fetales Kälberserum
FDG	Fluorescein-di-β-D-Galaktopyranosid
g	Gramm
Glc	Glucose
h (= engl. „hour“)	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
His ₅	Pentahistidinmotiv
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen (= 1.000bp)
KFGF	Kaposi Fibroblast Growth Factor
KerIVCreERT ²	KeratinIV-CreERT ²
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Bakterienkulturmedium)
LiCl	Lithiumchlorid
M	Mol

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
MHC (= engl. „major histocompatibility complex“)	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mM	Millimolar (10^{-3} Mol)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
OD	Optische Dichte
PI	Propidiumiodid
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
POD	Peroxidase
PTD (= engl. „Protein Transduction Domain“)	Proteintranslokationsdomäne
Rage	engl. „receptor for advanced glycated end products“
RA/EG	Rage-EGFP
Rpm (= engl. „rounds per minute“)	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec (= engl. „second“)	Sekunde
ssDNA	Einzelsträngige DNA
TAg	Simian Virus 40 large T-Antigen
tat (HIV1-tat)	HIV1-Transaktivator of transcription
TE	Tris-EDTA
TfT	Tyrosinase-floxstop-TAg
TyrCreERT ²	Tyrosinase-CreERT ²
U (= engl. „unit/s“)	Einheiten
U/l (= engl. „units per Liter“)	Einheiten pro ein Liter
UfT	UbiquitinC-floxstop-Tag
ÜN	Über Nacht
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
α	anti
μ g	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
μ M	Mikromolar (10^{-6} Mol)
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1	Übersicht über die molekulare Interaktion von E2F, pRB und TAg	5
Abb. 2	Funktion des p53 Proteins	6
Abb. 3	Funktionsweise des tet on/off Systems	8
Abb. 4	Darstellung der Cre-vermittelten Rekombinationsereignisse	9
Abb. 5	Gewebsspezifische Rekombination	11
Abb. 6	Darstellung der 4-Hydroxytamoxifen-vermittelten Induktion	12
Abb. 7	Darstellung des möglichen Translokationsvorganges	15
Abb. 8	Tyrosinase Enhancer- Promotor-Konstrukt	50
Abb. 9	Tyrosinase-CreERT ² -Transgenkassette	51
Abb. 10	Ubiquitin-floxstop-TAg –Transgenkassette	52
Abb. 11	Tyrosinase-floxstop-TAg –Transgenkassette	53
Abb. 12	KeratinIV-floxstop-TAg –Transgenkassette	54
Abb. 13	Nachweis von in vitro-Rekombination	55
Abb. 14	Schematische Übersicht über Cre-vermittelte Rekombination	56
Abb. 15	Vergleich von Kryoschnitten / KerIVCreERT2xRosa26	57
Abb. 16	Vergleich von Kryoschnitten / Tyr CreERT2xRosa26	58
Abb. 17	Immunhistologische Detektion von Cre-Rekombinase in vivo	59
Abb. 18	Lokalisation der Tumoren in UfT-Maus #29583	60
Abb. 19	Darstellung des Osteosarcoms von UftxCre-del.-Maus #29625	61
Abb. 20	Darstellung der histopathologischen Gewebeschnitte / UfT	62
Abb. 21	Direkter Vergleich von Gewebeschnitten der Tumoren	63
Abb. 22	Darstellung der Lokalisation des Tumors in UfT-Maus #29583	63
Abb. 23	Immunfärbung von Gewebeschnitten	64
Abb. 24	Darstellung des Augentumors TfTxCre-del.-Maus #23227	65
Abb. 25	Vergleich der Histopathologie des tumorentwickelnden Auges	66
Abb. 26	Übersicht über die verwendeten Peptidsequenzen	72
Abb. 27	Übersicht über den Aufbau der rekombinanten Fusionsproteine	73
Abb. 28	Ergebnis eines Western Blot	74
Abb. 29	Darstellung eines repräsentativen Kontroll-Western Blot	75
Abb. 30	Schematische Übersicht über PTD-NLS-Cre vermittelte Rekombination	77
Abb. 31	X-Gal Färbung von CV1-5B Reporterzellen	78
Abb. 32.1	Inkubation von CV1-5B Reporterzellen / Konzentration	79
Abb. 32.2	Inkubation von CV1-5B Reporterzellen / Konzentration	80
Abb. 33.1	Immunhistochemischer Nachweis von Cre-Fusionsproteinen	80
Abb. 33.2	Immunhistochemischer Nachweis von Cre-Fusionsproteinen	81
Abb. 34	Immunhistochemische Detektion von PTD-NLS-Cre in HeLa-Zellen	81
Abb. 35	Experimenteller Ablauf zur quantitativen Erfassung der Rekombination	82
Abb. 36	Vergleich der Durchflusszytometrie-Ergebnisse von rekombinierten CV1-5B Zellen	83
Abb. 37	Übersicht über weitere Durchflusszytometrie-Ergebnisse	84
Abb. 38	Graphische Darstellung der prozentualen Rekombination	84
Abb. 39	Vergleich der Durchflusszytometrie-Ergebnisse von tat-NLS-Cre und itat-NLS-Cre	86
Abb. 40	Übersicht über weitere Durchflusszytometrie-Ergebnisse	87

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 41	Graphische Darstellung der prozentualen Rekombination	88
Abb. 42	Experimenteller Ablauf zur quantitativen Erfassung der Rekombinationsereignisse ex vivo	89
Abb. 43	Durchflusszytometrie-Ergebnis von ex vivo-rekombinierten Milzzellen	91
Abb. 44	Vergleich der ex vivo-Rekombinationseffizienzen von RA/EG0%-Milzzellen	92
Abb. 45	Organe einer Rosa26-Maus nach ip. Injektion von itat-NLS-Cre und X-Gal Färbung	94
Abb. 46	Vergleich von Gewebedünnschnitten nach X-Gal Färbung	95
Abb. 47	Rekombination in Rosa26-PBL, Milzzellen und Leber nach intravenöser Hydroschock Injektion	96
Abb. 48.1	Vergleich der Rekombinationseffizienzen in vivo nach intravenöser (iv) oder intraperitonealer (ip) Injektion	98
Abb. 48.2	Vergleich der Rekombinationseffizienzen in vivo nach intravenöser (iv) oder intraperitonealer (ip) Injektion	99
Abb. 49	Schematische Darstellung der Hepatokarzinom-Induktion	100
Abb. 50	Graphische Darstellung der Alt-Level in AST-Tieren / Gruppe	101
Abb. 51	Graphische Darstellung der ALT-Level in AST-Tieren / Gruppe II	102
Abb. 52	In vivo-Tumorentstehung in Lebern von AST-Tieren	104
Abb. 53	Darstellung der histopathologischen Gewebeschnitte / AST	105

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tabelle 1	Zusammenstellung der transgen-positiven Tiere	55
Tabelle 2	Ergebnisse der in vivo-Onkogenexpression	67
Tabelle 3	Übersicht über die Nachkommen aus Cre-deleter Verpaarungen	68
Tabelle 4	Übersicht über TyrosinaseCreERT ² xRosa26 Nachkommen	68
Tabelle 5.1	Übersicht über UfTxCre-del. Nachkommen	69
Tabelle 5.2	Übersicht über TfTxCre-del. Nachkommen	70
Tabelle 6	Darstellung der Proteinausbeuten	76
Tabelle 7	Tabelle der quantitativen Rekombinationseffizienzen / Konzentrationsabhängigkeit	85
Tabelle 8.1	Tabelle der quantitativen Rekombinationseffizienzen / Kinetik	88
Tabelle 8.2	Tabelle der quantitativen Rekombinationseffizienzen / Kinetik	89
Tabelle 9	Zusammenstellung der untersuchten Organe	95