

# **Generierung eines BAC-transgenen Mausstamms zur Analyse von Melanomen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Beate Schmid**

geboren am 23.10.1974  
in Augsburg

Mainz, Februar 2012

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Entstehung von Melanomen	2
1.2	Genetische Veränderungen humaner Melanome	4
1.2.1	Der p16INK4a-Zyklus-Rb-Signalweg und CDK4	5
1.2.2	Der MAP-Kinase Signalweg und BRAF	7
1.2.3	Der Transkriptionsfaktor MITF	9
1.3	Melanome und das Immunsystem	12
1.4	Melanozytenspezifische, induzierbare Expression und BAC-transgene Mausmodelle	14
1.4.1	Expression unter dem Tyrosinasepromoter	14
1.4.2	CreER <sup>T2</sup> und das Cre-loxP System	15
1.4.3	BAC-transgene Modelle	17
1.5	Autochthone Melanommodelle in der Maus	18
1.6	Zielsetzung der Arbeit	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.1.1	Gewinnung genomischer DNA aus Mausgewebe	22
2.1.2	RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe	22
2.1.3	Gewinnung von cDNA durch reverse Transkription	23
2.1.4	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	24
2.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.1.6	Site directed mutagenesis (SDM)	24
2.1.7	Overlapping extension PCR	25
2.1.8	DNA-Synthese und –Sequenzierung	25
2.1.9	Primer für PCR und DNA–Sequenzierung	26
2.1.10	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.1.11	Sepharose-Säulen-Chromatographie von DNA	28
2.1.12	Restriktionsverdau	29
2.1.13	Ligation von DNA-Segmenten	29
2.1.14	TOPO TA und directional TOPO Klonierung (Invitrogen)	29
2.1.15	Homologe Rekombination durch Red/ET-Klonierung	30
2.1.16	Transformation von E.coli	31
2.1.17	Kultur und Lagerung von Bakterien	31
2.1.18	Plasmid-Isolierung aus Bakterien	31
2.1.19	Southern Blot	32
2.1.20	Pronukleus-Injektion	33

<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>34</b>
2.2.1	Zellkultur (B16-F1 und C22)	34
2.2.2	Transfektion durch Elektroporation	34
<b>2.3</b>	<b>Proteinanalytische Methoden</b>	<b>35</b>
2.3.1	Luziferase Reporter Assay	35
2.3.2	Western Blot	35
	Herstellung von Zellysaten	35
	Messung der Proteinkonzentration	35
	Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE), Wetblot und Detektion	35
<b>2.4</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden</b>	<b>37</b>
2.4.1	Mäuse	37
2.4.2	Betäubung und Rasur	37
2.4.3	Tamoxifen-Injektionen	37
2.4.4	<i>In vivo</i> Biolumineszenz-Imaging	37
2.4.5	Entnahme von Gewebe aus Mäusen	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
	<b>Das Konstrukt Tyr iOnkogene</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Generierung der Sequenz „iOnkogene“</b> (5'Hom-loxP-CreER <sup>T2</sup> -Neo/Kana-STOP-loxP-Mitf-F2A-Braf <sup>V600E</sup> -E2A-Cdk4 <sup>R24C</sup> -T2A-Luziferase-3'Hom)	<b>41</b>
3.1.1	Gewinnung der Onkogene Braf <sup>V600E</sup> , Cdk4 <sup>R24C</sup> und Mitf	41
3.1.2	Generierung der Sequenz „Mitf-F2A-Braf <sup>V600E</sup> -E2A-Cdk4 <sup>R24C</sup> “	44
3.1.3	Generierung der Sequenz „loxP-CreER <sup>T2</sup> -Neo/Kana-STOP-loxP-T2A-Luziferase“	45
3.1.4	Fertigstellung der Sequenz „iOnkogene“	46
<b>3.2</b>	<b>Expressions- und Aktivitätsanalysen der im Konstrukt verwendeten Onkogene Braf<sup>V600E</sup> und Cdk4<sup>R24C</sup> und der firefly Luziferase</b>	<b>47</b>
3.2.1	Die Transfektion von C22 mit „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ führt zu einer erhöhten Expression von Cdk4 und Braf	47
3.2.2	„pcDNA3.1-Onko-Luzi“-transfizierte C22 zeigen Luziferase-Aktivität	47
3.2.3	Die Transfektion von C22 mit „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ führt zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs	48
<b>3.3</b>	<b>Generierung der transgenen Maus B6 tg Tyr iOnkogene</b>	<b>50</b>
3.3.1	Herstellung des BAC „Tyr iOnkogene“	50
3.3.2	Analyse der „Tyr iOnkogene“ BAC-Klone durch colony screening PCR	51
3.3.3	Analyse der „Tyr iOnkogene“ BAC-Klone durch Southern Blot	52
3.3.4	Analyse des BAC-Klons „Tyr iOnkogene“ #8 durch Restriktionsverdau und Sequenzierung	54
3.3.5	Linearisierung und Sepharose-Säulen-Chromatographie des BAC „Tyr iOnkogene“ für die Pronukleus-Injektion	56

3.3.6	Identifikation von 5 Founder Tieren mittels Typisierung-PCR	57
3.3.7	Drei Founder Tiere konnten mittels Southern Blot bestätigt werden	59
<b>3.4</b>	<b>Analyse des generierten Mausstamms B6 tg Tyr iOnkogene (TyriOn)</b>	<b>61</b>
3.4.1	Tamoxifen-induzierte Verstärkung der Luziferase-Aktivität war nur in Tieren der Linie D zu beobachten	61
3.4.2	Die Tamoxifen-induzierte Verstärkung der Luziferase-Aktivität ging in den Folgegenerationen der Linie D teilweise verloren	62
3.4.3	Das Genom von Tieren der Linie D enthält den vollständigen Sequenzteil „iOnkogene“	63
3.4.4	Die loxP-Stellen des transgenen Konstrukts sind funktionell	63
3.4.5	Weder Tamoxifen behandelte TyriOn-D noch TyriOn-D / Cre deleter Tiere entwickeln spontan Melanome	65
3.4.6	Melanome von TyriOn-D / MT/ret Tieren zeigen Luziferase-Aktivität	65
3.4.7	Melanome von TyriOn-D / MT/ret Tieren exprimieren CreER <sup>T2</sup> RNA	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	Funktionalität des BAC-Konstrukts in TyriOn Tieren der Linie D	68
4.2	Teilweiser Verlust der Tamoxifen-induzierbaren Verstärkung der Luziferase-Aktivität in TyriOn-D	70
4.3	Fehlende Entwicklung von Tumoren in TyriOn-D Tieren	72
4.3.1	Expression der eingebrachten Gene	72
4.3.2	Onkogene Eigenschaften der gewählten Onkogene	74
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>91</b>

# 1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen ein wesentliches Gesundheitsproblem in der westlichen Welt dar (Parkin et al., 2005); so sind fast 50 % der Todesfälle im mittleren Alter Krebs bedingt. Neben klassischen Therapien (Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie) gewinnen Immuntherapien immer mehr an Bedeutung. Die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern wird beispielsweise bereits praktiziert und T-Zell basierte Strategien sowie Krebsvakzinierungen zeigen vielversprechende Ergebnisse in diversen Studien (Finn, 2008).

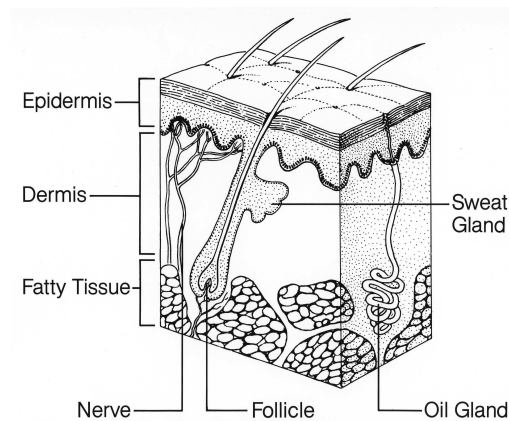
Neue Therapiestrategien müssen vor der Anwendung am Menschen an geeigneten Tiermodellen evaluiert werden. Seit langem verwendete Tumormodelle, bei denen aus Tumoren generierte Zelllinien in Mäuse transplantiert werden, sind zwar schnell und einfach *in vivo* anwendbar, jedoch ist die normale Tumorarchitektur nicht mehr vorhanden und die genetische Heterogenität verringert. So erweisen sich Zytostatika mit nachweisbarer Aktivität in transplantierten Tumoren oftmals in der klinischen Anwendung am Menschen als ineffektiv (Johnson et al., 2001). Um dieses Problem zu umgehen, können murine Melanommodelle mit autochthonen<sup>1</sup> Tumoren verwendet werden, die seit den 90er Jahren durch die Möglichkeiten der Gentechnologie generiert werden. Bestehende Modelle weisen jedoch zum Teil beachtliche Latenzzeiten bis zur Tumorentwicklung auf und sind oftmals nicht steuerbar (s. Tabelle 1.1).

Melanommodelle sind im Besonderen praktikabel, da diese Tumoren als Haut assoziierte Tumoren von außen gut erkennbar sind, so dass deren Wachstum einfach und nicht invasiv verfolgt werden kann. Außerdem werden humane Melanome bekanntermaßen immunologisch relativ gut erkannt (Boon et al., 2006). Melanom-Patienten zeigen gewöhnlich spontane Antworten zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) gegen ihren Tumor (Rosenberg et al., 1988; Germeau et al., 2005), welche allerdings durch immunsuppressive Prozesse des Tumors meist ineffektiv sind. Auch konnten in diversen Vakzinierungsstudien CTL Antworten generiert bzw. verstärkt werden (Lonchay et al., 2004; Thurner et al., 1999).

<sup>1</sup> Autochthon: altgriechisch autós „selbst“ und chthón „Erde“, etwa „an Ort und Stelle entstanden“

## 1.1 Die Entstehung von Melanomen

Melanome sind maligne Tumoren, die aus Pigment produzierenden Zellen, den Melanozyten, entstehen. Melanozyten befinden sich hauptsächlich in der Haut, in Haarfollikeln, im inneren Ohr, in der Hirnhaut und in bestimmten Bereichen des Auges. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Haut des Menschen und die der Maus nicht identisch sind und dass Mäuse nicht dazu neigen, Melanome zu entwickeln. In der humanen Haut befinden sich die meisten Melanozyten an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis und in Haarfollikeln (siehe Abbildung 1.1). In der murinen Haut sind sie hauptsächlich in Haarfollikeln (Hirobe, 1995), jedoch kaum an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis lokalisiert. (Walker and Hayward, 2002)



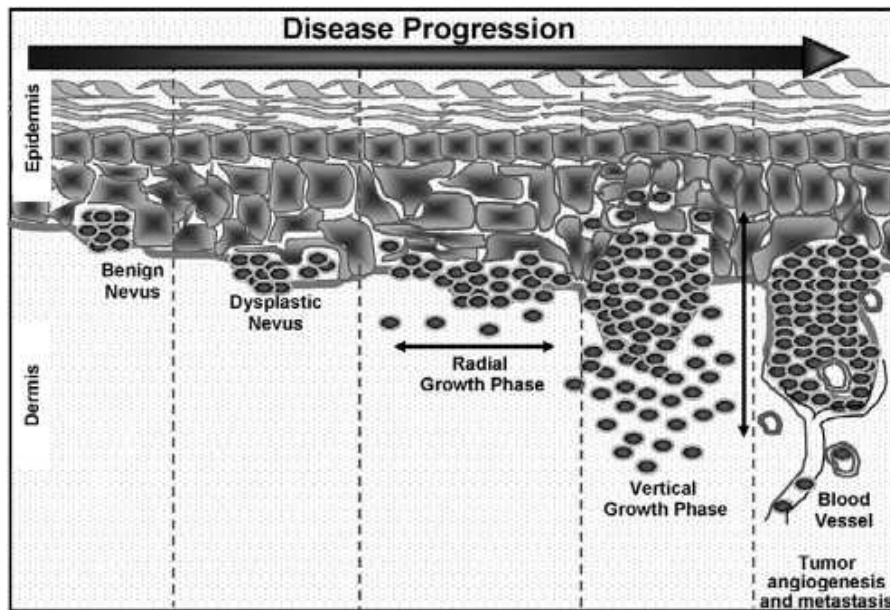
<http://visualsonline.cancer.gov>

**Abbildung 1.1: Anatomie der humanen Haut**

Melanozyten befinden sich in der humanen Haut vor allem an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis und in Haarfollikeln. In der murinen Haut dagegen sind sie kaum an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis zu finden, sondern hauptsächlich in Haarfollikeln.

Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, wird die Entwicklung von Melanozyten zum Melanom in fünf Stadien eingeteilt: 1. benignes (gutartiges) Muttermal (Nevus), ohne dysplastische Veränderungen, 2. dysplastischer (fehlgebildeter) Nevus, 3. RGP (radial growth phase) Melanom, 4. VGP (vertical growth phase) Melanom und 5. metastatisches Melanom.

Im Normalzustand befinden sich Melanozyten in bestimmtem Kontakt mit Keratinozyten an der Basalschicht der Epidermis. In einem Nevus dagegen treten Melanozyten gebündelt auf und haben den adäquaten Kontakt zu Keratinozyten verloren.



Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol.* 2007;34:555-565

### Abbildung 1.2: Entstehung eines Melanoms

Die Entwicklung von Melanozyten zum Melanom ist ein mehrstufiger Prozess, der durch genetische Veränderungen in Melanozyten hervorgerufen wird. Bis zum Stadium der „Radial Growth Phase“ haben die Melanozyten zwar stark proliferiert, befinden sich allerdings noch nahe der Basalschicht. Die Phase der „Vertical Growth Phase“ ist gekennzeichnet durch das Eindringen der Zellen in die Epidermis und in die Dermis. In der letzten Phase erlangt das Melanom schließlich metastatische Eigenschaften.

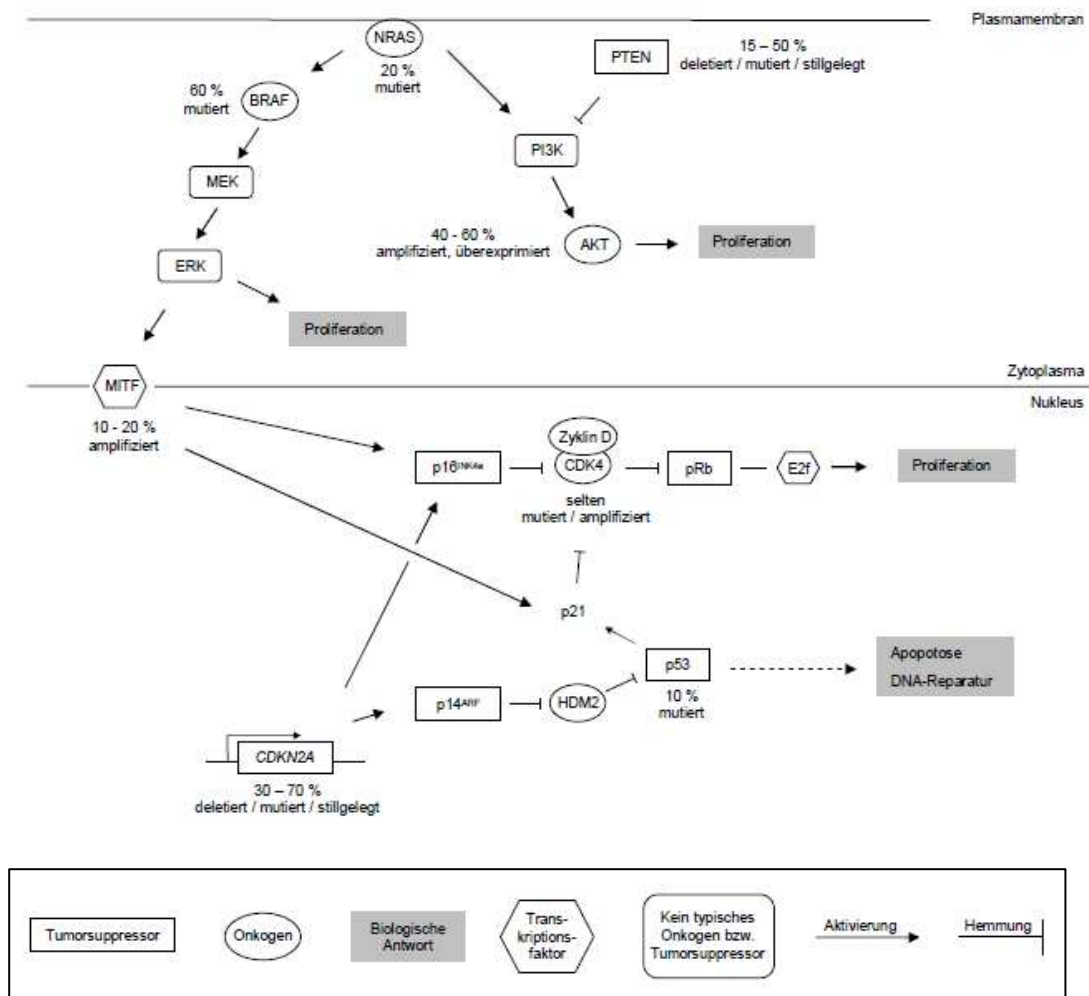
Die RGP ist gekennzeichnet durch laterale Proliferation der Melanozyten, die sich während dieser Phase noch nahe der Epidermis befinden. In der nächsten Phase, der VGP, durchbrechen die Zellen die Basalschicht und dringen sowohl in die oberen Schichten der Epidermis, als auch in die darunterliegende Dermis ein. In der letzten Phase erlangen die Zellen metastatische Eigenschaften, welche es ihnen ermöglichen, in den Blutkreislauf oder das lymphatische System einzudringen. Sie gelangen dadurch zu Geweben und Organen, die sie kolonisieren können.

(Larue and Beermann, 2007; Chin, 2003)



## 1.2 Genetische Veränderungen humaner Melanome

Die Entstehung von Melanomen ist mit zahlreichen Veränderungen zellulärer und molekularer Prozesse verbunden, die vor allem durch genetische Veränderungen in Melanozyten hervorgerufen werden. Humane Melanome sind vor allem gekennzeichnet durch die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *PTEN* und durch die Aktivierung der Proto-Onkogene *NRAS*, *BRAF*, *Akt* und *MITF* (Walker and Hayward, 2002; Takata and Saida, 2006).



**Abbildung 1.3: Betroffene Signalwege humaner Melanome**

Gezeigt ist ein vereinfachtes Schema der Signalwege, die typischerweise in humanen Melanomen betroffen sind. Dazu gehören der p16INK4a-ZyklusinD-Rb-Signalweg, der MAPK-Signalweg und der PI3K-Signalweg. Außerdem zu erwähnen sei der Transkriptionsfaktor MITF. Onkogene bzw. Tumorsuppressoren, welche typisch für Melanome sind, sind durch Prozentwerte gekennzeichnet. Dieser Wert besagt, wie viele der Melanome genetische Veränderungen in den jeweiligen Onkogenen bzw. Tumorsuppressor-Genen tragen.

### 1.2.1 Der p16<sup>INK4a</sup>-ZyklusinD–Rb-Signalweg und CDK4

ZyklusinD abhängige Kinasen (CDK) spielen eine wichtige Rolle im Teilungszyklus eukaryotischer Zellen. D-Typ Zyklone assoziieren mit den nah verwandten Kinasen CDK4 und CDK6, welche dadurch aktiviert werden und Retinoblastom Proteine (pRb) phosphorylieren. Die Phosphorylierung von pRb bewirkt die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2f, die Expression E2f-regulierter Gene und den Eintritt der Zelle in die S1 Phase (Walker and Hayward, 2002; Takata and Saida, 2006; Chin, 2003)

p16<sup>INK4a</sup> (genannt INK4a) und p14<sup>ARF</sup> (p19<sup>ARF</sup> in der Maus; beide genannt ARF) sind Proteine, die beide durch das Gen *CDKN2A* kodiert sind und durch unterschiedliche Leseraster entstehen (Quelle et al., 1995). Sowohl p16<sup>INK4a</sup>, als Inhibitor der CDK4-ZyklusinD-Komplex vermittelten Phosphorylierung (Serrano et al., 1993), als auch p14<sup>ARF</sup>, als negativer Regulator des p53-Signalwegs (Zhang et al., 1998), verursachen einen Arrest des Zellzyklus in Phase G1.

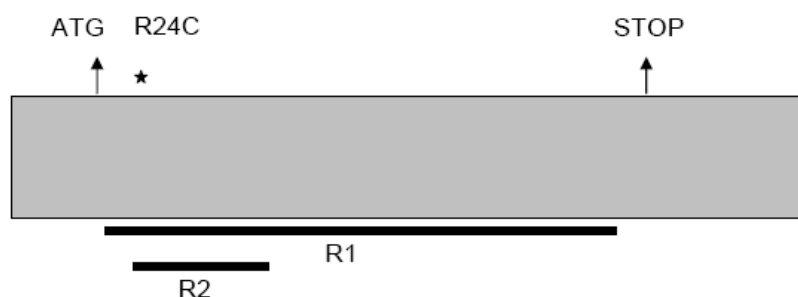
*CDKN2A* gilt, neben *p53*, in Tumoren generell als der am häufigsten inaktivierte Locus, wobei in Melanomen *p53* eine untergeordnete Rolle spielt (Bennett, 2008). *CDKN2A* wurde 1994 wegen seiner frequenten homozygoten Deletionen in Zelllinien, welche aus verschiedenen Tumoren generiert worden waren, identifiziert (Nobori et al., 1994; Kamb et al., 1994a). Noch im selben Jahr wurden genetische Veränderungen in *CDKN2A* auch in der Keimbahn von zahlreichen Familien mit vererbten Melanomen identifiziert (Hussussian et al., 1994); (Kamb et al., 1994b). In Fällen von spontan auftretenden Melanomen sind Veränderungen in diesem Locus zwar in primärem Tumorgewebe zu ca. 25 % festzustellen (Fujimoto et al., 1999), jedoch scheinen deren Auswirkungen eher mit invasiven Stadien des Tumorverlaufs zu korrelieren; so wird beispielsweise INK4a in Nevi vollständig, in primärem Tumorgewebe zu 91 % und in Metastasen zu 56 % exprimiert (Reed et al., 1995). Sowohl in vererbten, als auch in spontanen Melanomen wurden neben homozygoten Deletionen verschiedenste Mutationen (Soto et al., 2005; Rizos et al., 2001) wie auch Promotermethylierungen (Liu et al., 2008) festgestellt, die, abhängig vom Umfang bzw. Lage der Mutation, entweder ARF, INK4a oder beide Proteine betreffen können.

Bisher gewonnene Daten aus der humanen Melanom-Genetik und aus Tiermodellen zeigen deutlich, dass beide Proteine eine wichtige Rolle in der Suppression von Melanomen spielen (Sharpless and Chin, 2003).

Ein weiteres Gen, dessen Produkt Teil des p16INK4a-ZyklinD-Rb-Signalweges und welches in humanen Melanomen von genetischen Veränderungen betroffen ist, ist *CDK4*. Im Gegensatz zu *CDKN2A* ist *CDK4* in Melanomen zwar sehr viel seltener von genetischen Veränderungen betroffen, jedoch scheint es dieselben klinischen Auswirkungen zu haben. So wurden Melanome bei Betroffenen aus Familien mit Keimbahn-Mutationen in *CDKN2A* oder *CDK4* in einem ähnlichem Alter diagnostiziert; sie zeigten außerdem eine vergleichbare Anzahl an Tumoren, sowie Nevi (Goldstein et al., 2000).

Meist wurde *CDK4* in amplifizierter (Muthusamy et al., 2006), aber auch in mutierter Form gefunden, wobei ein Arginin an Position 24 zu einem Cystein (Wolfel et al., 1995) (Zuo et al., 1996) bzw. zu einem Histidin (Soufir et al., 1998) mutiert war. Diese Mutation unterbindet die Bindung von p16<sup>INK4a</sup> an CDK4 und verhindert somit eine Inhibition.

Das murine Ortholog für *CDK4* besteht aus 8 Exons (Ensembl Transcript ID: ENSMUST00000006911). Die katalytische Domäne umfasst die Aminosäuren 6 bis 295 (R1 in Abbildung 1.4) (Ensembl), für die Bindung von ZyklinD und p16<sup>INK4a</sup> sind hauptsächlich Aminosäuren in der aminoterminalen Region (R2 in Abbildung 1.4) verantwortlich (Coleman et al., 1997).



**Abbildung 1.4: Murines *Cdk4*<sup>R24C</sup>**

Eingezeichnet sind das Startcodon ATG (Beginn Exon 2), das Stoppcodon (Beginn Exon 8), die aktivierende Mutation R24C (in Exon 2) und die Regionen 1 und 2 (R1 und R2). Die katalytische Domäne befindet sich in R1, die Bindungsstellen für p16<sup>INK4a</sup> und ZyklinD vorwiegend in R2.

Neben den genannten Genen wurden auch vereinzelt Amplifikationen von *CCND1* (kodiert ZyklinD1) und Mutationen in *RB1* (kodiert pRb) identifiziert. Insgesamt ist damit der p16INK4a-ZyklinD-Rb-Signalweg in 90 % aller Melanome beeinträchtigt (Bennett, 2008).

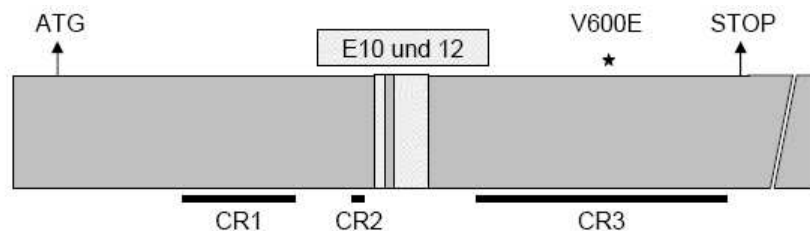
### 1.2.2 Der MAP-Kinase-Signalweg und BRAF

Der MAPK (Mitogen-activated protein kinase) -Signalweg ist unter anderem an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt. Es werden 3 verschiedene Signalwege unterschieden, denen eine Phosphorylierungskaskade durch Kinasen gemeinsam ist. In 30 % aller Tumorarten ist es der MAPK-Weg mit den Kinasen RAF, MEK und ERK, welcher hyperaktiviert ist (Garnett and Marais, 2004; Hoshino et al., 1999). RAF-Proteine umfassen die Isoformen A-, B- und C-RAF, wobei B-RAF (rapidly growing fibrosarcoma) in 7 % aller Tumorarten und in 66 % maligner Melanome mutiert vorliegt.

In einer Studie, bei welcher humane Melanome untersucht wurden, befanden sich sämtliche Mutationen in der Kinase-Domäne des Proteins. Davon wiederum bestanden 80 % in einem einzigen Nukleotidaustausch, der zu einer Mutation von Valin (V) zu Glutamat (E) an Position 600 führt (Davies et al., 2002) und zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins führt. Damit ist *BRAF* das Gen, welches in Melanomen am häufigsten mutiert vorliegt.

Interessanterweise wurden BRAF-Mutationen auch in 82 % analysierter melanozytischer Nevi (Muttermale) gefunden (Pollock et al., 2003), was darauf hindeutet, dass es sich dabei um ein frühes Ereignis bei der Entwicklung von Melanomen handeln könnte. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch mutiertes BRAF induziert jedoch eine wachstumshemmende Antwort in melanozytischen Nevi (Michaloglou et al., 2005) was ein Grund dafür sein mag, dass diese sich nicht zu Melanomen weiterentwickeln. Es wird angenommen, dass diese sogenannte „Onkogen-induzierte Seneszenz“ durch die Aktivierung von Tumorsuppressoren hervorgerufen wird (Hocker et al., 2008).

Das murine Ortholog für *BRAF* besteht aus 22 Exons (Ensembl Transcript ID: ENSMUST00000002487), wobei mindestens 10 verschiedene Isoformen des Proteins gefunden wurden, die in der adulten Maus gewebsspezifisch exprimiert sind. Diese unterscheiden sich durch das Vorhandensein der alternativ gesplitten Exons 10 und 12 (in der genannten Publikation sind sie bezeichnet als Exon 8b und 10), durch ihre Amino-Termini und wahrscheinlich durch die Präsenz anderer, nicht identifizierter Sequenzen (Barnier et al., 1995). Die beiden Exons regulieren unter anderem die Kinaseaktivität von Braf. Die Anwesenheit der Sequenz in Exon 12 hat einen aktivierenden, die in Exon 10 einen hemmenden Einfluss (Papin et al., 1998).



**Abbildung 1.5: Murines *Braf*<sup>V600E</sup>**

Eingezeichnet sind die alternativ gesplittenen Exons 10 und 12, die für Melanome typische aktivierende Mutation V600E (in Exon 18) und die mit den Proteinen Araf und Braf konservierten Regionen (CR) 1 bis 3. Die RAS bindende Domäne befindet sich in CR1, die Kinase Domäne in CR3.

### 1.2.3 Der Transkriptionsfaktor MITF

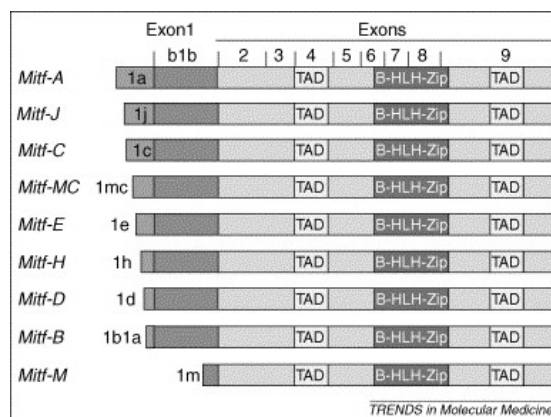
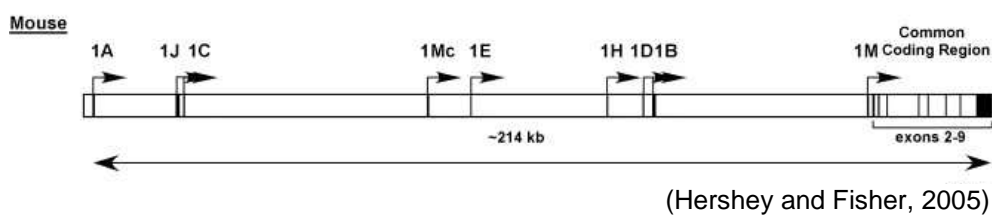
Der Transkriptionsfaktor MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) wird auch als „master regulator of melanocytes“ bezeichnet, da er eine Vielzahl von Genen reguliert, deren Produkte für die Entwicklung, die Funktion und das Überleben von Melanozyten essentiell sind (Levy et al., 2006). Beispielsweise spielt MITF bei der Regulation der Gene *Tyrosinase (TYR)*, *TYRP1* und *DCT*, welche an der Pigmentierung beteiligt sind, eine Rolle (Yasumoto et al., 1994; Steingrimsson et al., 2004). So führt eine Mutation von *MITF* beim Menschen zum sogenannten Waardenburg Syndrom IIa, bei dem unter anderem Pigmentierungsstörungen vorliegen (Hughes et al., 1994). In der Maus hat die Mutation von *Mitf* den Verlust der Pigmentzellen und dadurch unter anderem weiße Fellfarbe zur Folge (Hodgkinson et al., 1993). Die Auswirkungen von MITF auf die Zellproliferation sind sehr komplex. Einerseits kann es Wachstums-Inhibitoren, wie z.B. INK4a (Loercher et al., 2005) und p21 (Carreira et al., 2005) und andererseits Wachstums-Stimulatoren, wie z.B. CDK2 (Du et al., 2004) und Bcl-2 (McGill et al., 2002) transaktivieren.

Eine Untersuchung humaner Nevi und Melanome zeigte, dass 10 – 20 % der analysierten Melanome eine Amplifikation von *MITF* aufwiesen, was im Gegensatz dazu in Nevi nicht beobachtet werden konnte. Des Weiteren waren *MITF*-Amplifikationen etwas häufiger in metastatischen Tumoren zu finden und korrelierten mit einer geringeren Überlebensprognose (Garraway et al., 2005). Entsprechend war der MITF-Proteingehalt im Fall von Amplifikationen des Gens erhöht (Garraway et al., 2005; Yeang, 2010). Andere Studien zeigten, dass der MITF-Proteingehalt fortgeschrittener Melanome, die keine genetischen Veränderungen des *MITF*-Gens aufwiesen, reduziert war und mit einer schlechteren Prognose einherging (Salti et al., 2000; Selzer et al., 2002; Zhuang et al., 2007). Dieser scheinbare Widerspruch ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass andere genetische Veränderungen der Melanome die Auswirkungen von MITF beeinflussen (Levy et al., 2006; Garraway et al., 2005).

In einer Studie wurde beobachtet, dass alle analysierten humanen Tumor-Zelllinien mit *MITF*-Amplifikationen, außerdem die *BRAF*<sup>V600E</sup>-Mutation und die Inaktivierung des p16INK4a-Zyklus-Rb-Signalwegs aufwiesen (Garraway et al., 2005). Daraufhin wurden *in vitro* Analysen mit humanen, genetisch modifizierten, jedoch nicht transformierten Melanozyten (Inaktivierung der p53 und p16INK4a-Zyklus-Rb-Signalwege, Expression von Telomerase) durchgeführt. Die Transfektion der Zellen mit *BRAF*<sup>V600E</sup> hatte den Verlust von MITF-Protein zur Folge, führte aber nicht zur Transformation der Zellen. Erst die Kotransfektion mit *BRAF*<sup>V600E</sup> und *MITF* resultierte in transformierten Zellen (Garraway et al., 2005). In ähnlicher Weise berichten auch Wellbrock und Marais, dass *BRAF*<sup>V600E</sup> den Proteingehalt an MITF in immortalisierten murinen und primären humanen Melanozyten supprimierte. Jedoch inhibierte die Wiederherstellung der MITF-Expression die Proliferation *BRAF*<sup>V600E</sup>-transfizierter muriner Melanozyten und humaner Melanomzellen. Angaben über weitere genetische Veränderungen in den verwendeten Zellen wurden allerdings nicht gemacht (Wellbrock and Marais, 2005).

Die Frage, ob MITF in Melanozyten und Melanomen einen wachstumsfördernden oder wachstumshemmenden Effekt hat ist bisher noch nicht geklärt. Allerdings kann die Expression und Funktion von MITF von verschiedenen Transkriptionsfaktoren und von Mitgliedern der cAMP- und MAP-Kinase-Signalwege reguliert werden. Außerdem ist MITF an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt (Palmieri et al., 2009). Die Effekte von MITF auf das Wachstum von Melanomen sind daher vermutlich von der Kombination aller vorhandenen genetischen Veränderungen abhängig.

Das humane, wie das murine Ortholog für *MITF* kodiert für 9 verschiedene Isoformen des Proteins. Dabei ist jeweils das erste Exon variabel und die Exone 2 bis 9 konstant. Dieser konstante Teil kodiert für funktionell wichtige Motive, wie den für die DNA-Bindung wichtigen „basic helix-loop-helix leucine zipper“ (b-HLH-Zip) und die Transaktivierungsdomänen (TAD). Manche Isoformen werden nur in bestimmten Zelltypen exprimiert; wie z.B. die Isoform M (Ensembl Transcript ID: ENSMUST00000043628) in Melanozyten oder die Isoform MC in Mastzellen (Levy et al., 2006).



(Levy et al., 2006)

**Abbildung 1.6: Genomische Organisation von *Mitf***

Das Gen *Mitf* besitzt eine Multi-Promoter Organisation, wobei jedes Isoform-spezifische Exon einen eigenen Promoter besitzt und zuerst an Exon 1B1b (außer Isoform M) und anschließend an die gemeinsamen Exone 2-9 gesplittet wird. Die, den Isoformen gemeinsamen Exone 2-9 enthalten die Transaktivierungsdomäne (TAD) und den „basic helix-loop-helix leucine zipper“ (b-HLH-Zip).



### 1.3 Melanome und das Immunsystem

Das Immunsystem ist in der Lage, Tumorzellen zu detektieren und zu eliminieren. Dabei spielen neben natürlichen Killer (NK) -Zellen, dendritischen Zellen (DC), B-Zellen, CD4-T-Helferzellen,  $\gamma:\delta$ -T-Zellen etc. vor allem zytotoxische T-Zellen (CTL) eine entscheidende Rolle. Sie erkennen Tumorzellen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) und können diese, wie NK-Zellen, mittels zytotoxischer Granula abtöten. Der TCR bindet dabei spezifisch an einen Komplex aus Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) -Molekül und tumorassoziiertem Antigen (TAA), der jedoch teilweise auch auf der Oberfläche normaler Zellen vorhanden sein kann (Lucas and Coulie, 2008; Boon et al., 1997).

TAAe, die durch Mutation des entsprechenden Gens in Tumorzellen entstehen, können als strikt tumorspezifisch betrachtet werden. Einige Punktmutationen, die in Antigenen vorhanden sind, haben außerdem onkogene Eigenschaften. So wurden beispielsweise  $CDK4^{R24C}$  oder  $BRAF^{V600E}$  in humanen Melanomen gleichzeitig als Onkogene und die jeweils korrespondierenden antigenen Peptide als tumorspezifische Antigene (TSAe) identifiziert (Wolfel et al., 1995; Sharkey et al., 2004). Eine weitere Gruppe von TAAen, die ebenfalls als tumorspezifisch angesehen werden kann, sind die sogenannten „cancer-germline genes“. Dabei handelt es sich um Gene, die in vielen Tumoren und in männlichen Geschlechtszellen, nicht aber in anderen normalen adulten Geweben exprimiert werden. Da männliche Geschlechtszellen allerdings keine humanen MHC-Moleküle exprimieren, können die entsprechenden Epitope nicht präsentiert werden. Der Prototyp der „cancer-germline genes“ ist die Familie der „melanoma antigen-encoding“ (MAGE) Gene (Boon et al., 2006).

Es können jedoch auch T-Zell-Antworten auf TAAe detektiert werden, die auch auf „normalen“ Zellen präsentiert werden. Dazu zählen beispielsweise Antigene, die in Tumoren überexprimiert sind oder die durch normale Differenzierungsgene kodiert sind. Zu den melanomspezifischen Differenzierungsantigenen zählen z.B. Tyrosinase (Brichard et al., 1993) oder Melan-A/Mart-1 (2 Namen für das Antigen) (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994).

In vielen Tumorpatienten können spontane Tumor-Antigen-spezifische T- und B-Zell-Antworten detektiert werden, obwohl diese Patienten nicht immunisiert wurden (Jager et al., 1998; Germeau et al., 2005). Die Aktivierung von T-Zellen, die durch DCs erfolgt, ist neben dem TCR-Signal zusätzlich von kostimulatorischen Signalen abhängig, die durch TLR-Liganden von DCs vermittelt werden. Es ist unklar, wie spontane, tumorspezifische T-Zell-Antworten in Abwesenheit von TLR-Liganden zustande kommen (Gajewski, 2007).

Trotz spontaner T-Zell-Aktivierung scheint die effektive Abstoßung von Tumoren aber offensichtlich ein seltenes Ereignis zu sein. Durch hohe Mutationsraten entwickeln Tumorzellen häufig „escape“-Mechanismen, welche sie vor Angriffen des Immunsystems schützen (Boon et al., 2006; Gajewski, 2007). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass BRAF<sup>V600E</sup> in humanen Melanomzellen die Produktion immunsuppressiver Faktoren, wie z.B. IL-10 begünstigt, was wiederum zu Defekten in der Funktion von DCs führt (Sumimoto et al., 2006). Neben der Sekretion verschiedener Faktoren exprimieren viele Tumorzellen Oberflächenmoleküle, wie z.B.IDO, welche die Funktion von T-Zellen beeinträchtigen (Uyttenhove et al., 2003; Boon et al., 2006). Des Weiteren wurde in verschiedenen Tumortypen der Verlust bestimmter bzw. aller MHC-Moleküle festgestellt (Kageshita et al., 2005; Garcia-Lora et al., 2003). In Melanomen wurde außerdem beobachtet, dass Gene, welche für Differenzierungsantigene kodieren, abgeschaltet wurden (Boon et al., 2006). Dies bedeutet einen Selektionsvorteil für die Tumorzellvarianten, welche die Antigene nicht mehr präsentieren, die Ziele von Effektor-T-Zellen sind. Ein bedeutender, inhibierender Einfluss auf die T-Zell-Antwort gegen Tumore wird regulatorischen T-Zellen zugeschrieben, die in erhöhter Frequenz im Blut von Patienten mit verschiedensten Tumortypen zu finden sind (Zou, 2006; Viguier et al., 2004; Gray et al., 2003). Eine Erhöhung der Zellzahlen regulatorischer T-Zellen kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden, deren Ursachen in den Tumorzellen liegen (Zou, 2006). Dies sind nur einige Beispiele, der in Tumoren gefundenen „escape“-Mechanismen.

Die Therapieerfolge in der Behandlung von Tumoren sind stark vom Tumortyp abhängig. Melanome stellen hochgradig bösartige Tumoren dar, da sie bereits in frühen Entwicklungsstadien metastasieren. Gängige Therapieformen sind hierfür die chirurgische Entfernung des Primärtumors und abhängig vom Stadium der Erkrankung, Chemotherapie, Immuntherapie mit IFN- $\alpha$  und IL-2 und Kombinationen daraus (Garbe et al., 2011). Eine Heilung von metastasierten Melanomen ist durch diese Therapien jedoch nur sehr selten möglich. Die Immuntherapie gewinnt bei der Behandlung von Tumoren immer größere Bedeutung. So werden beispielsweise zahlreiche Vakzinierungsstudien mit tumorspezifischen Antigenen oder Antigen-beladenen DCs, Studien zu adoptiven Zelltherapien etc. durchgeführt. Vielversprechende Studien zu Immuntherapien gegen metastasierende Melanome beinhalten die Blockade inhibitorischer Immunrezeptoren wie CTLA-4 und adoptive T-Zelltherapie (Garbe et al., 2011). Weitere, Erfolg versprechende Studien zielen auf die Inhibition des onkogenen Kinase-Signalwegs (Garbe et al., 2011; Flaherty and Fisher, 2011).

#### **1.4 Melanozytenspezifische, induzierbare Expression und BAC-transgene Mausmodelle**

##### **1.4.1 Expression unter dem Tyrosinasepromoter**

Um die melanozytenspezifische Expression von Zielgenen in transgenen Mausmodellen zu erreichen, hat sich die Verwendung des Tyrosinasepromoters etabliert (siehe Tabelle 1.1). Tyrosinase ist ein Enzym, welches bei der Synthese von Melanin beteiligt ist und daher in allen melaninproduzierenden Zellen exprimiert wird. Zu diesen Zellen gehören die Melanozyten der Haut und die Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE). Die minimal notwendige Sequenz für die zellspezifische Aktivität des Tyrosinasepromoters umfasst 270 bp (Kluppel et al., 1991). Die Expression wird jedoch in Melanozyten durch das regulatorische Element „distal regulatory element“ (DRE), welches sich um -12 kb des Promoters befindet, deutlich verstärkt (Ganss et al., 1994; Montoliu et al., 1996). In verschiedenen transgenen Mausmodellen, in denen ein Zielgen unter Kontrolle des Tyrosinasepromoters exprimiert wird, wurde mittels RT-PCR RNA des Zielgens neben der Haut und den Augen auch im Gehirn detektiert (Goel et al., 2009; Yajima et al., 2006; Beermann et al., 1990; Montoliu et al., 1996). Es wird vermutet, dass Tyrosinase bei der

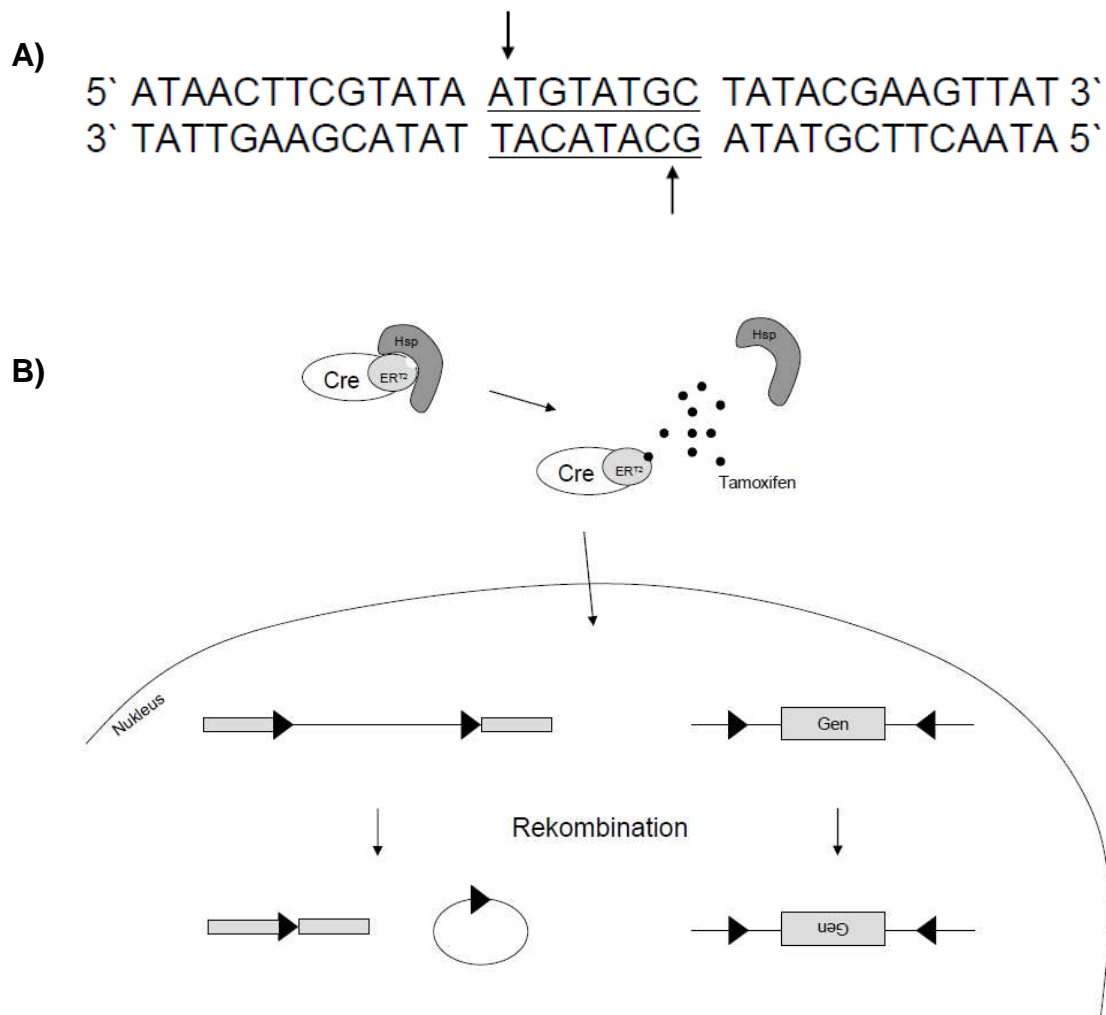
Neuromelanin Synthese in neuronalen Geweben eine Rolle spielen könnte (Tief et al., 1998). Entsprechend wurden in einem transgenen Mausmodell, bei welchem ein Onkogen unter Kontrolle des Tyrosinasepromoters exprimiert wurde, proliferierende Zellen in verschiedenen Geweben des Gehirns gefunden (Goel et al., 2009).

#### **1.4.2 CreER<sup>T2</sup> und das Cre-loxP System**

Um die Expression von Fremdgenen bzw. die Geninaktivierung räumlich und zeitlich flexibel zu gestalten, stehen verschiedene regulatorische Systeme eukaryotischer und prokaryotischer Organismen in variiert Form zur Verfügung, wie z.B. das Cre-loxP- oder das Tet-System. Die Möglichkeit der konditionalen Genexpression ist beispielsweise dann von Vorteil, wenn sich eine genetische Veränderung in der Embryonalentwicklung letal auswirkt. Da Proteine während der Embryonalentwicklung und im adulten Tier verschiedene Funktionen haben können, lässt sich die Funktion des Proteins im adulten Tier durch das spätere „Anschalten“ der genetischen Veränderung analysieren.

Das Cre-loxP-System ist ein Rekombinations-System des Bakteriophagen P1 (Sternberg and Hamilton, 1981) und erlaubt die gezielte Deletion bzw. Inversion von DNA-Sequenzen. Dieser Vorgang wird von der Rekombinase Cre (steht für causes recombination) gesteuert und findet zwischen bestimmten Erkennungssequenzen, den loxP (steht für locus of crossing over) -Stellen, statt.

LoxP-Elemente (siehe Abbildung 1.7 A) bestehen aus einer asymmetrisch gerichteten „Spacer“-Region von 8 bp und zwei flankierenden palindromen Wiederholungen von 13 bp (Hoess et al., 1982). Sind zwei loxP-Stellen in gleicher Richtung orientiert, wird die dazwischenliegende DNA-Sequenz deletiert, zeigen sie jedoch in verschiedene Richtungen findet eine Inversion der Sequenz statt (Abremski et al., 1983).



**Abbildung 1.7: CreER<sup>T2</sup> und das Cre-loxP System**

- A) Dargestellt ist die Sequenz eines loxP-Elements. Der unterstrichene Bereich stellt die „Spacer“-Region dar, welcher von zwei palindromen Wiederholungen flankiert ist. Die Stellen, an denen die Rekombinase schneidet (Hoess and Abremski, 1985) sind mit Pfeilen markiert.
- B) Dargestellt ist die Rekombination durch CreER<sup>T2</sup>. In Abwesenheit von Tamoxifen bzw. 4-Hydroxytamoxifen (OHT) liegt CreER<sup>T2</sup> inaktiv im Zytosol vor, da es von Hitzeschockproteinen (Hsp), wie Hsp90 gebunden ist. Die Anwesenheit von Tamoxifen bzw. OHT bewirkt die Freisetzung der ER<sup>T2</sup>-Domäne und damit die Translokation des Fusionsproteins CreER<sup>T2</sup> in den Nukleus. Dort rekombiniert es DNA-Sequenzen, welche durch loxP-Elemente (▶) flankiert sind. Abhängig von der Orientierung der loxP-Stellen wird die betroffenen DNA-Sequenz deletiert oder invertiert.

Durch Fusion der Rekombinase Cre mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors (ER) entstand die Tamoxifen-abhängige Rekombinase CreER<sup>T</sup>. Diese kann durch synthetisch hergestelltes Tamoxifen oder 4-Hydroxytamoxifen (OHT), jedoch nicht durch den natürlichen Liganden des Östrogenrezeptors, 17  $\beta$ -Estradiol, aktiviert werden (Feil et al., 1996). In Abwesenheit von Tamoxifen oder OHT ist CreER<sup>T</sup> an Hitzeschockproteine im Zytosol gebunden und damit inaktiv. Erst durch Verabreichen der genannten synthetischen Substanzen erfolgt eine Freisetzung der ER<sup>T</sup> Domäne und die Translokation der Rekombinase in den Nukleus (Metzger and Chambon, 2001) (siehe Abbildung 1.7 B).

Bei dem Versuch dieses System weiter zu verbessern, entstand die Mutante Cre-ER<sup>T2</sup>. Durch den Austausch von drei Aminosäuren des humanen Östrogenrezeptors entstand so eine Variante des Proteins, welche insensitive gegenüber Estradiol, jedoch besonders sensitiv gegenüber OHT ist (Feil et al., 1997).

### 1.4.3 BAC-transgene Modelle

Genetisch veränderte Mausmodelle können generell in transgene und endogene Modelle eingeteilt werden. Im Gegensatz zu transgenen Modellen wird in endogenen Modellen die genetische Veränderung in den entsprechenden Locus des Genoms eingebracht. Somit wird beispielsweise ein mutiertes Gen unter der Kontrolle seines natürlich vorkommenden Promoters und damit in physiologischer Weise exprimiert (Frese and Tuveson, 2007).

Die Generierung von transgenen Mäusen erfolgt durch Pronukleus-Injektion eines DNA-Konstrukts, wobei die Integrationsstelle der DNA in das Genom dem Zufall unterliegt. Konventionelle Transgene exprimieren ein Gen in nicht physiologischer Weise aufgrund ektopischer Promoter- und Regulator-Elemente. Oftmals repräsentieren verwendete Promoter-Fragmente lediglich die für eine Expression minimal notwendige Sequenz, beispielsweise weil ein regulatorisches Element erst später identifiziert wird (Powell et al., 1995; Chin et al., 1997; Ganss et al., 1994). Außerdem kann die Expression des eingebrachten Gens stark von regulatorischen Elementen beeinflusst werden, welche sich in der Nachbarschaft des Konstrukts befinden. Durch diesen sogenannten „position effect“ lässt sich das Expressionslevel eines konventionellen Transgens nicht vorhersehen (Ristevski, 2005).

Ein großer Fortschritt bei der Generierung von Transgenen wurde durch „bacterial artificial chromosomes“ (BACs) erzielt (Yang et al., 1997). BACs stellen künstliche Chromosomen dar, die auf dem Fertilitäts (F) -Faktor (auch F-Plasmid) von *E. coli* basieren und Genomfragmente von bis zu 300 kb enthalten (Shizuya et al., 1992; O'Connor et al., 1989). Durch sie ist es möglich, die vollständige Struktur von Zielgenen, einschließlich weit entfernt liegender *cis*-regulatorischer Elemente, in das Genom von Mäusen zu integrieren. BAC-Transgene sind deshalb in Bezug auf „position effects“ weniger anfällig und erreichen eher physiologische Expressionslevel als konventionelle Transgene (Heaney and Bronson, 2006; Sparwasser and Eberl, 2007).

Bei der Pronukleus-Injektion wird das, ins Genom zu integrierende, genetische Material direkt in den Pronukleus von Oozyten injiziert, welche im Anschluss pseudoschwangeren Tieren implantiert werden. Die daraus resultierenden Founder unterscheiden sich hinsichtlich des Integrationsorts und der Kopienzahl des Transgens voneinander. Aus diesem Grund werden zunächst durch Verpaarung mit Wildtyp-Tieren separate Linien erzeugt.

## 1.5 Autochthone Melanommodelle in der Maus

Seit Beginn der 90er Jahre wurden zahlreiche Versuche unternommen, durch genetische Manipulation, autochthone Tumormodelle in der Maus zu entwickeln bzw. neue Erkenntnisse über die Entstehung von Melanomen zu erlangen (Larue and Beermann, 2007; Walker and Hayward, 2002). Tabelle 1.1 zeigt eine Auswahl dieser genetisch veränderten Tiere.

Die ersten erfolgreichen Versuche, murine Tumormodelle zu generieren, gelangen zwei Gruppen im Jahr 1991. Der Mausstamm *Tyr-SV40Tag* trägt ein Transgen, das aus dem murinen Tyrosinasepromoter und dem „SV40 large T antigen“ besteht (Bradl et al., 1991). Das „SV40 large T antigen“ ist ein Protein des Affenvirus (simian virus), welches in der Lage ist, verschiedene Zelltypen zu Tumorzellen zu transformieren (Ali and DeCaprio, 2001). Noch im selben Jahr wurde der Mausstamm *Mt1-Ret* generiert. Hierzu wurde ein Konstrukt, bestehend aus dem ubiquitären Metallothionein-1 (Mt) -Promoter und dem Proto-Onkogen *Ret* verwendet. *Ret*, welches für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase kodiert und den MAP Kinase Weg aktivieren kann, wurde in verschiedenen Tumoren in genetisch

veränderter Form gefunden, ist jedoch nicht typisch für humane Melanome (Larue and Beermann, 2007). Die Nachkommen einiger Foundertiere entwickelten gutartige Tumoren aus Melanozyten der Haut (Iwamoto et al., 1991). Erst die 10-fache Rückkreuzung einer der Linien mit C57BL/6 resultierte in einem murinen Melanommodell (Kato et al., 1998).

Kombination genetischer Modifikationen (GM)		Anteil der Tiere mit spontanen kutanen Melanomen Latenzzeit	Referenz
Mausstamm mit GM I	Mausstamm mit GM II		
Tyr-SV40Tag	---	10 % 12 bis 18 Wochen	Bradl et al., 1991
Mt1-Ret	---	65 % 10 Monate	(Iwamoto et al., 1991) Kato et al., 1998
Tyr-H-RAS <sup>V12G</sup>	---	keine Melanome	Powell et al., 1995
		2 % 2 Monate	Chin et al., 1997
p16 <sup>Ink4a</sup> <sup>-/-</sup> p19 <sup>Arf</sup> <sup>-/-</sup>	---	keine Melanome	Serrano et al., 1996
Pten <sup>+/-</sup>	---	keine Melanome	Podsypanina et al., 1998
Cdk4 <sup>R24C</sup>	---	keine Melanome	Rane et al., 1999 Sotillo et al., 2001
Tyr-rtTA Tet-H-RAS <sup>V12G</sup>	---	n.a.	Chin et al., 1999
p16 <sup>Ink4a</sup> <sup>-/-</sup> p19 <sup>Arf</sup> <sup>-/-</sup>	Tyr-rtTA Tet-H-RAS <sup>V12G</sup>	25 % 60 Tage	Chin et al., 1999
Tyr-N-RAS <sup>Q61K</sup>	---	29 % 12 Monate	Ackermann et al., 2005
p16 <sup>Ink4a</sup> <sup>-/-</sup> p19 <sup>Arf</sup> <sup>-/-</sup>	Tyr-N-RAS <sup>Q61K</sup>	94 % 6 Monate	Ackermann et al., 2005
Cdk4 <sup>R24C</sup>	Tyr-H-RAS <sup>V12G</sup>	58 % 100 Tage (erstes Auftreten)	Hacker et al., 2006
Tyr-iH-Ras <sup>V12GP1A</sup>	---	n.a.	Huijbers et al., 2006
Tyr-iH-Ras <sup>V12GP1A</sup>	Ink4/Arf <sup>flox/flox</sup> (konditionale KO)	33 % 73 Tage	Huijbers et al., 2006
Tyr-BRAF <sup>V600E</sup>	---	10 % 295 Tage (Überleben)	Goel et al., 2009
Tyr-BRAF <sup>V600E</sup>	p16 <sup>Ink4a</sup> <sup>+/-</sup> p19 <sup>Arf</sup> <sup>+/-</sup>	38 % 185 Tage (Überleben)	Goel et al., 2009
Tyr-rtTA Tet-BRAF <sup>V600E</sup>	Ink4a/Arf <sup>-/-</sup>	minimal Melanom- anfällig	Jeong et al., 2008



Kombination genetischer Modifikationen (GM)		Anteil der Tiere mit spontanen kutanen Melanomen Latenzzeit	Referenz
Mausstamm mit GM I	Mausstamm mit GM II		
Braf <sup>+/LSL-V600E</sup> Tyr::CreERT2 <sup>+/-</sup>	---	50 - 60 % 12 Monate	Dhomen et al., 2009
Braf <sup>+/LSL-V600E</sup> Tyr::CreERT2 <sup>+/-</sup>	p16 <sup>INK4a</sup> <sup>-/-</sup>	80 % 7 Monate	Dhomen et al., 2009
Braf <sup>CA</sup> (cre activated) Tyr::CreERT2	---	keine Melanome	Dankort et al., 2009
Braf <sup>CA</sup> (cre activated) Tyr::CreERT2	Pten <sup>lox/lox</sup> (konditionale KO)	Läsionen verlangten das Abtöten der Tiere 25 - 50 Tage nach Tamoxifengabe	Dankort et al., 2009

**Tabelle 1.1: Auswirkung genetischer Veränderungen auf die Entwicklung spontaner Melanome im Mausmodell**

Die Kombination genetischer Modifikationen wurde meist durch Verkreuzen der entsprechenden genetisch veränderten Mausstämmen erzielt. In wenigen Fällen wurde dagegen bei der Generierung eines genetisch veränderten Stammes mit Oozyten des gewünschten anderen genetisch veränderten Stammes gearbeitet. Die grau unterlegten Mausstämmen tragen induzierbare Onkogene. n.a. = war in den entsprechenden Publikationen nicht angegeben.

Wie Tabelle 1.1 deutlich zeigt, setzte sich bei der Generierung von Mausstämmen mit genetischen Veränderungen, die sich nur in Melanozyten auswirken sollten, sehr schnell die Verwendung des Tyrosinasepromotors durch. Da die generierten Stämme vorwiegend der Untersuchung von Melanomentstehung beim Menschen dienen, konzentrierte man sich außerdem bei der Auswahl der zu verändernden Gene auf Signalwege, die im Falle humaner Melanome gestört sind. Des Weiteren ist erkennbar, dass das Einbringen eines Onkogens bzw. das Ausschalten eines Tumorsuppressorgens meist nicht zu der Entstehung von Tumoren führt bzw. erhebliche Latenzzeiten mit sich bringt. Die Kombination solcher genetischer Veränderungen, z.B. durch Kreuzen der entsprechenden Tiere führt dagegen zu einem verstärkten Auftreten von Melanomen mit kürzeren Latenzzeiten und spricht eindeutig für einen Gen-Dosis-Effekt.

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein BAC-transgener Mausstamm mit induzierbarer Onkogen-Expression generiert und analysiert werden, um im Fall der Tumorentwicklung als autochthones Melanommodell Anwendung zu finden.

Im Einzelnen sollte dafür zunächst das Konstrukt generiert werden. Expressions- und Aktivitätsanalysen ausgewählter, im Konstrukt kodierter Proteine sollten deren Funktionalität sicherstellen. Nach Generierung des Mausstamms sollten die Vollständigkeit und die Funktionalität des BAC-Konstrukts in den Tieren analysiert werden. Außerdem sollte evaluiert werden, ob Tiere mit induzierter Expression der eingebrachten Onkogene Melanome entwickeln.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.1.1 Gewinnung genomischer DNA aus Mausgewebe**

Schwanzspitzen oder rasierte Hautproben der Mäuse wurden über Nacht bei 56°C in 200 µl Lysepuffer (300 mM NaCl, 25 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0,2 % SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K (Roche) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Wasser zugegeben und die Proteinase durch 10-minütiges Inkubieren bei 95°C inaktiviert. Bis zur Verwendung in der PCR wurde die, auf diese Weise aufbereitete genomische DNA bei -20°C gelagert.

#### **2.1.2 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe**

Die Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe wurde mit Hilfe von Trizol-Reagenz (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde sorgsam darauf geachtet, RNase-frei zu arbeiten.

Adhärente Zellen wurden in der Zellkulturplatte (6-well-Platte) mit kaltem 1xPBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen in dem well mit 1 ml Trizol-Reagenz (Invitrogen) lysiert und im Anschluss in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Gewebeproben wurden mit einem Polytron PT-2100 Homogenisierungsmixer (Kinematica AG) bei maximaler Geschwindigkeit in 1 ml Trizol zerkleinert und lysiert, Gewebereste abzentrifugiert und ebenfalls in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt.

Nach 5-minütiger Inkubation wurden 200 µl Chloroform (Roth) zugegeben und gevortext. Nach 2- bis 3-minütiger Inkubation wurde die Probe bei 11500 rpm 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol (Roth) gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Probe erneut bei 11500 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der RNA 1 ml 75%iger Ethanol (Roth) zugegeben und gevortext. Die Probe wurde durch erneute Zentrifugation bei 9200 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet bis es transparent war und in 10-100 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. (Inkubationsschritte erfolgten bei

Raumtemperatur, Zentrifugationsschritte wurden in einer auf 4°C gekühlten, Tischzentrifuge durchgeführt)

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.1.3 Gewinnung von cDNA durch reverse Transkription

Die reverse Transkription der B16-F1 RNA in cDNA zur Gewinnung der Onkogene wurde mit Hilfe des „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit“ von Roche gemäß deren Protokoll durchgeführt. Dazu wurden 3 µg RNA und Random Hexamer Primer verwendet. Die Inkubation für den cDNA-Synthese-Schritt wurde für 30 min bei 45°C durchgeführt. Die generierte cDNA wurde schließlich bei -20°C gelagert.

Gewebe-RNA wurde zunächst einem DNase-Verdau unterzogen (Deoxyribonuclease I-Kit, Invitrogen). Gemäß den Herstellerangaben wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl verwendet:

RNA	1 µg
DNase I Reaktionspuffer, 10x	1 µl
DNase I	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	auf 10 µl auffüllen

Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 1 µl EDTA (25 mM) gestoppt. Die Inaktivierung der DNase erfolgte im Heizblock bei 65°C für 10 min. Die gereinigte RNA wurde schließlich auf 25 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Für die Herstellung von cDNA durch reverse Transkription wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet (Reagenzien von Fermentas):

Reaktionspuffer, 5x	4 µl
d(NTPs), 10 mM	2 µl
Poly (N) <sub>6</sub> , 20 ng/µl	1 µl
Oligo d(T) <sub>n</sub> , 100 µg/ml	1 µl
Reverd Aid M-MuLV Reverse Transkriptase, 200U/µl	1 µl
RNA, 0,5 µg	11 µl

Als Kontrolle diente jeweils ein zusätzlicher Ansatz ohne Reverse Transkriptase.

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 42°C wurden die Proben 1:5 mit DNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.1.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen**

Zur Quantifizierung von DNA und RNA wurden die Photometer „Spectronic BioMate3“ (Fisher Scientific) und „NanoDrop™ 1000“ (Peqlab) verwendet.

#### **2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für Amplifikationen, deren Produkte für das BAC-Konstrukt oder für Expressionsvektoren verwendet wurden, wurde die proof-reading Polymerase „PfuUltra II Fusion HS“ (Stratagene) gemäß Herstellerangaben verwendet. Alle übrigen PCRs wurden mit der Taq-Polymerase „GoTaq“ (Promega) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für colony screening PCRs wurden anstelle eines DNA-templates intakte Bakterien verwendet. Dazu wurde ein Teil einer Bakterienkolonie mit Hilfe einer Pipettenspitze direkt von der LB-Agarplatte in den PCR-Mastermix übertragen. Alle Reaktionen wurden mit Hilfe eines Cycler Peqstar 96 Universal (Peqlab) durchgeführt.

#### **2.1.6 Site directed mutagenesis (SDM)**

Die SDM dient dem Einfügen einer Punktmutation in eine DNA-Sequenz durch Verwendung mutierter Primer. Dazu wurden Primer in einer Weise entworfen, dass sowohl „upstream“ als auch „downstream“ der Mutation 12-15 Basen eine korrekte Paarung erlaubten. Des Weiteren sollte der Schmelzpunkt  $T_m$  größer oder gleich 78°C sein.

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675 / N - \% \text{ mismatch}$$

Dabei sind % GC und % mismatch ganze Zahlen und N ist die Primerlänge in Basenpaaren. Es wurde darauf geachtet, dass der GC Gehalt über 40 % liegt und dass die Primer auf G oder C enden.

Mit den so entworfenen Primern wurde zunächst eine gewöhnliche PCR unter Verwendung der „Pfu Turbo Polymerase“ (Stratagene) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 2 Stunden bei

37°C mit dem Enzym DpnI inkubiert, welches methylierte DNA (hier: die nicht mutierte DNA) zerschneidet. Für die anschließend erfolgte Transformation von *E.coli* TOP10 wurde 1 µl des Ansatzes verwendet. Die Analyse der erzielten Kolonien wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung durchgeführt.

### 2.1.7 Overlapping extension PCR

Diese Fusions-PCR dient der Verbindung von zwei DNA-Fragmenten. Im ersten Schritt hybridisieren die beiden Fragmente an ihren komplementären Enden (25-30 Basenpaare), und werden am 3'-Ende von der Polymerase verlängert.

Dazu wurde folgender Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 42 µl verwendet:

Reaktionspuffer, 10x	4 µl
Fragment 1 (Gelextrakt)	12 µl
Fragment 2 (Gelextrakt)	12 µl
d(NTPs), 25 mM	1 µl
PfuTurbo® DNA Polymerase (Stratagene)	1 µl
H <sub>2</sub> O	12 µl

Verwendetes Programm:

95°C	5 min	} 10X
95°C	1 min	
72°C	30 sek	
4°C	∞	

Durch Zugeben des äußersten Sense und Antisense Primers und Durchführung eines entsprechenden PCR-Programms mit 20 Zyklen wurde das gewünschte Gesamt-DNA-Stück gewonnen.

### 2.1.8 DNA-Synthese und –Sequenzierung

Die Synthese von DNA-Sequenzen wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon / Eurofins Medigenomix in Auftrag gegeben.

DNA-Sequenzierungen wurden bei den Firmen Agowa und GATC in Auftrag gegeben.

## 2.1.9 Primer für PCR und DNA-Sequenzierung

### PCR-Primer

Primer-Name	Primer-Sequenz	T <sub>Annealing</sub>
BRAF S7	TTGACACAGGAACATATAGAGGCC	56°C
BRAF AS1	CACCGAGATTTCTCTGTGGCTAGACC	
BRAF S2	GGTCTAGCCACAGAGAAATCTCGG	56°C
BRAF AS2	CTACTTGAAGGCTGCAAATTCTCC	
CDK4 S1	CACCATGGCTGCCACTCGATATGA	56°C
CDK4 AS1	ACTGTGGGGATCACAGGCTTTGTACACC	
CDK4 S2	GTACAAAGCCTGTGATCCCCACA	59°C
CDK4 AS2	TCACTCTGCGTCGCTTTCCTCCT	
MITF S	CACCATGCTGGAAATGCTAGAA	57°C
MITF AS	CTAACACGCATGCTCCGTTT	
SDM in luc	CGACGATGACGCTGGTGAACCTCCC	55°C
SDM in luc RC-seq	GCTGCTACTGCGACCACTTGAAGGG	
SP luc	ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG	60°C
ASP luc	TCACCGGCGCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGC	
SP 5' Hom	TTAATTAACACTACTATGGGCTATGTACAA	52°C
ASP 5' Hom	TTAATTAATCATACAAAATCTGCACCAA	
SP 3' Hom	CGCCGGTGGGAATTTTGTCTGAGTTTGA	56°C
ASP 3' Hom	CGCCGGTGTGCTTCCCTTTCCTTTTA	
SP in BAC	CCACTGAGCCATTGCCCTT	60°C
ASP in BAC	GGCACATCCTCTCCCACTGA	
SP in targeting vector	ACGCAGGTGTGCGCAGGTC	60°C
ASP in BAC	GGCACATCCTCTCCCACTGA	
SP 5' Sonde	AAAAGAGAGAGAAAAAGAAGTGTAGGAG	51°C
ASP 5' Sonde	CCATCCTGCCCTGACTTTTA	
SP 3' Sonde	TCTTTGGCTATTGCTCTTGTGT	51°C
ASP 3' Sonde	CCTGGCGATTCTTTTTTCT	
SP Ende Mitf	ATCACCTTTACCAACAACCTCGG	60°C
ASP Beginn Braf	CTTGACCTTGTTCTGCCCTC	
SP Rek/o.Rek	ATGTGATAGTCACTCCAGGGGTTGC	57°C
ASP o.Rek	CAGCATTGCTGTCACTTGGTCGT	
SP Rek/o.Rek	ATGTGATAGTCACTCCAGGGGTTGC	57°C
ASP Rek	GCCCTGCTCTGCTCCTCAAACCTTA	
Cre for	GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG	60°C
Cre rev	GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG	

Primer-Name	Primer-Sequenz	T <sub>Annealing</sub>
SP ret	AAAATGCAGTCAGATATGGA	58°C
ASP ret	ACTCGGGGAGGCGTTC	
SP βm	CACCGGAGAATGGGAAGCCGAA	58°C
ASP βm	TCCACACAGATGGAGCGTCCAG	
SP HGPRT	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG	56°C
ASP HGPRT	GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT	

### Sequenzierungs-Primer

Primer-Name	Primer-Sequenz
2 R	TCAATGTATCTTATCATGTCTGCTCG
ASP Cre #216220	CTCCGGTATTGAAACTCCAGC
ASP CreERT2 #214923	TGGCTTTGGTCCGTCTCCT
ASP ERT2 #259404	CCAACAAGGCACTGACCATC
ASP luc #263708	TGGAACAACCTTACCGACCG
ASP Mitf #259405	CACTCACTCTCTGCCCTGCT
ASP2 WSS #259406	GGTGTAATAGCAAAGCAAGCA
Braf AMP AS3	GGAAGGTGAGGATTTGGGGC
Braf AMP Sense4	TGCTTTTCCAGGGTTTCCGTTG
Cre rev	GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG
SP Cdk4 #216221	CTGCTGGCCCGCTCATT
SP Cdk4 RT-PCR	CTAATGCGTCAGTTTCTAAGCGG
SP CreERT2 #214922	TCCTCATCCTCTCCCACATCA
SP luc #216222	GGTGGCTCCCGCTGAAT
SP Mitf #259407	GCATTGGCTAAAGAGAGGCA
SP WSS #214924	ACCTATGGAAGTATGAATGGG
SP2 Braf #216223	TGGACAGATTACAGTGGGACAGA
SP2 WSS #214925	TCATGTCTGGATCTGACATGGTAA
ASP ClaI #281757	GAGTTTTTGTGTTGCTGTTTCAATTT
SP ClaI #271081	CCAGACAGGTTTAGAGGAGAGTT
SP XhoI #271083	CGAGATTACAGGAAAGAGGCATT



### 2.1.10 Agarose-Gelelektrophorese

Abhängig von der erwarteten Größe der DNA-Bande, wurde ein 0,8 – 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde Agarose (Appllichem) durch Erhitzen in VE-Wasser gelöst, abgekühlt bis auf ca. 60°C und mit E thidiumbromid (Roth) in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Nach Zugabe des entsprechenden Volumens an 10x Ladepuffer (Fermentas) wurden die DNA-Proben in die Taschen des Gels pipettiert und entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes (GelDoc von BioRad) wurde die DNA schließlich sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurde ein Marker mit DNA-Fragmenten definierter Größe mitgeführt.

### 2.1.11 Sepharose-Säulen-Chromatographie von DNA

Für die Sepharose-Säulen-Chromatographie wurde eine Säule aus zweieinhalb 25-ml-Pipetten zusammengeklebt und am unteren Ende ein Baumwollstopfen eingebracht. An das spitz zulaufende Ende der Säule wurde außerdem ein Schlauch mit Klemme angebracht, wodurch die Flußrate reguliert werden konnte.

Für die Chromatographie wurde von Sepharose CL4B (Sigma-Aldrich) ein Säulenvolumen von ca. 60 ml verwendet. Zunächst wurde die Sepharose 2mal mit sterilem TBS (Tris buffered saline: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl, sterilfiltriert) gewaschen. Nach einer Vorlage von ca. 5 ml sterilem TBS in die unten verschlossene Säule, wurde die, in TBS resuspendierte Sepharose, langsam und luftblasenfrei entlang der Säulenwand in die Säule pipettiert. Die Säule wurde anschließend so lange mit TBS aufgefüllt, bis eine deutliche Grenze zwischen Sepharose und TBS sichtbar war. Der Fluß wurde gestoppt, als das TBS knapp über der Sepharose angelangt war. Anschließend wurde die Sepharose mit 3 Säulenvolumen Injektionspuffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 2,922 g NaCl in 500 ml UltraPure H<sub>2</sub>O, pH 7,5, sterilfiltriert) äquilibriert.

Der BAC-Verdau wurde mit 5 µl 10x Ladepuffer (Fermentas) versetzt und auf die Sepharose-Säule pipettiert. Nachdem die Flüssigkeit in das Säulenmaterial gelaufen war, wurde der Fluß gestoppt, 500 µl Injektionspuffer auf die Säule pipettiert und der Fluß fortgesetzt bis auch diese Flüssigkeit in die Säule gelaufen ist. Anschließend wurde die Säule vollständig mit Injektionspuffer gefüllt, die Flußrate auf 1-2 min pro

ml eingestellt und 500 µl Fraktionen gesammelt bis der Farbstoff im Ladepuffer das untere Ende der Säule erreicht hatte.

### **2.1.12 Restriktionsverdau**

Für Restriktionsverdau wurden Restriktionsenzyme der Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Fermentas (St. Leon-Rot) gemäß Herstellerangaben verwendet.

Der Verdau des BAC für die Pronukleus-Injektion erfolgte mit 55 µg „TyriOnkogene“-DNA und 200 Units FspAI (Fermentas). Die Reaktion wurde in 500 µl Gesamtvolumen über Nacht bei 37°C durchgeführt.

### **2.1.13 Ligation von DNA-Segmenten**

Zur Ligation von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten wurde T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Der 10x Ligase Puffer wurde aliquotiert, bei -20°C gelagert und nach Verwendung nicht wieder verwendet. Die Ligation wurde mit 3 fmol Vektor, 15 fmol Insert, 1x Ligase Puffer, 1 µl Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Reaktion erfolgte entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht. Mit diesem Reaktionsansatz wurden anschließend Bakterien transformiert.

### **2.1.14 TOPO TA und directional TOPO Klonierung (Invitrogen)**

Gemäß den Herstellerangaben wurden durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente in die entsprechenden Vektoren integriert: Der linearisierte Plasmid-Vektor „pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>“ trägt 3' T-Überhänge an den DNA-Fragmente mit 3' A-Überhängen ligieren können. Der linearisierte Plasmid-Vektor „pcDNA<sup>®</sup> 3.1 D/VS- His- TOPO<sup>®</sup>“ dagegen trägt einen 5' GTGG-Überhang und kann mit DNA-Fragmenten mit 5' CACC-Überhängen ligieren. Schließlich verbindet in beiden Varianten Topoisomerase I Plasmid und DNA-Fragment kovalent miteinander. Es wurde das Protokoll für chemisch kompetente *E.coli* verwendet.

### 2.1.15 Homologe Rekombination durch Red/ET-Klonierung

*E.coli* (DH10B), welche das bakterielle artifizielle Chromosom „pTARBAC RP24-439I17“ (BPRC Chori, Kalifornien, USA) tragen, wurden über Nacht in LB-Medium mit Chloramphenicol als Selektionsantibiotikum kultiviert.

Am folgenden Tag wurde aus der Vorkultur eine neue Kultur angesetzt und die Bakterien bei einer Wachstumsphase von OD (600) von 0,4 geerntet. Sie wurden zunächst mit dem Plasmid „pSC101-BAD-gbaA“ (Gene Bridges) transformiert, welches die Expression der Rekombinationsproteine Red $\alpha$ /Red $\beta$  unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren pBAD-Promotors erlaubt. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation mittels des „Gene Pulser®“ von Bio-Rad unter Verwendung deren Elektroprotokolls für *E.coli*, DH10B bei Verwendung von 2 mm Küvetten. (in Stichpunkten: Elektroporation bei einer Wachstumsphase von OD (600): 0,4, Wasch- und Elektroporationsmedium: 15% Glycerol, Geräteeinstellungen: 2,5 kV, 25  $\mu$ F, 100 Ohm). Da das Plasmid „pSC101-BAD-gbaA“ für das temperatursensitive Protein RepA kodiert, welches für die Replikation des Plasmids wichtig ist, wurden weitere Inkubationen bei 30°C durchgeführt. Zunächst wurden die Bakterien für eine Stunde ohne Selektion in SOC Medium (Invitrogen) kultiviert und anschließend auf Agarplatten selektiert (Tetrazyklin zur Selektion von „pSC101-BAD-gbaA“ und Chloramphenicol zur Selektion von „pTARBAC RP24-439I17“).

Daraus resultierende Klone wurden über Nacht in LB-Medium mit Tetrazyklin und Chloramphenicol vorkultiviert.

Entsprechend der ersten Elektroporation wurde aus der Vorkultur eine neue Kultur angesetzt (1,4 ml) und bei 29°C und 1000 rpm kultiviert bis die OD (600) einem Wert von 0,2 entsprach. Der Kultur wurden nun 20  $\mu$ l L-Arabinose (10 %ig) zugegeben, um den pBAD Promotor zu induzieren, die Rekombinationsproteine zu exprimieren. Mit einer Temperatur von 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 350 rpm wurden die Bakterien bis zu einer OD (600) von 0,4 kultiviert. Die zweite Elektroporation wurde unter gleichen Bedingungen wie die erste durchgeführt. Die für die Rekombination gewünschte DNA wurde in linearisierter Form und in einer Menge von 250 ng eingesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien in SOC-Medium ohne Antibiotikum in Anwesenheit von 20  $\mu$ l L-Arabinose (10 %ig) kultiviert (90 min, 37°C, 500 rpm) und anschließend auf Agarplatten selektiert

(Chloramphenicol zur Selektion von „pTARBAC RP24-439I17“ und Kanamycin zur Selektion auf das Konstrukt „iOnkogene“.

#### **2.1.16 Transformation von *E.coli***

Für Transformationen wurde der Bakterienstamm *E.coli* TOP10 (Invitrogen) verwendet. Die bei -80°C gelagerten 50 µl Bakterien-Aliquots wurden auf Eis aufgetaut. Die Transformation wurde gemäß des „TOPO TA -“ bzw. des „directional TOPO Klonierungs“ Protokolls durchgeführt. Dabei wurden von letztgenannten Reaktionen 2 µl, von einer Ligations-Reaktion 10 µl eingesetzt.

#### **2.1.17 Kultur und Lagerung von Bakterien**

Für die Flüssigkultur von Bakterien wurde LB-Medium (5g/l Hefeextrakt, 10g/l Trypton/Pepton, 5g/l NaCl in VE-Wasser, autoklaviert) und zur Selektion einzelner Bakterienklone wurden LB-Agarplatten (LB-Medium + 15g/l Agar, in VE-Wasser, autoklaviert und in Platten gegossen) verwendet.

Antibiotika für die Selektion wurden in folgenden Konzentrationen verwendet:

Ampicillin (Sigma):	100 µg/ml
Kanamycin (Sigma):	50 µg/ml
Tetrazyclin (Sigma):	5 µg/ml
Chloramphenicol (Roth):	15 µg/ml

Die kurzfristige Aufbewahrung von Bakterien erfolgte in LB-Medium bzw. auf Agarplatten bei 4°C. Zur längerfristigen Lagerung wurden 700 µl Bakteriensuspension mit 300 µl 50%igem Glycerin (Roth) vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.1.18 Plasmid-Isolierung aus Bakterien**

Abhängig von der gewünschten Menge an Plasmid-DNA wurden kleine Mengen an Plasmid mit dem „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ (Peachlab), größere Mengen mit dem „PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep bzw. Midiprep Kit“ (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die Isolierung von BAC-DNA erfolgte mit Hilfe des „PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit“ (Invitrogen) gemäß des Protokolls des Herstellers.

### 2.1.19 Southern Blot

Die Sonden wurden durch PCR aus dem BAC „pTARBAC RP24-439I17“ amplifiziert und durch TOPO TA Klonierung in den Plasmid-Vektor „pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>“ integriert. Für den Southern Blot wurden die Sonden mittels EcoRI Verdau, Fragmentauftrennung im Agarosegel und Gelextraktion aus dem Plasmid-Vektor gewonnen.

Von der BAC-DNA wurden jeweils 10 µg mit dem Restriktionsenzym BamHI für 6 Stunden verdaut und die so entstandenen Fragmente mit einem 0,7 %igen Agarosegel über Nacht bei 40mA aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel fotografisch dokumentiert und unter präparativem UV-Licht die DNA-Leiter durch kleine Löcher im Gel markiert.

Vor dem Transfer der DNA-Fragmente auf die Southern Blot Membran wurde das Gel zunächst 20 min in 0,25 M HCl Lösung geschwenkt und anschließend in 0,4 M NaOH neutralisiert.

Für den Transfer wurden nun auf folgende Weise blasenfrei übereinander geschichtet:

- 2 nebeneinander gelegte Stapel Papiertücher
- 3 mit Transferlösung (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) angefeuchtete Whatman-Papiere, die etwas größer sind als das Gel
- die mit Transferlösung angefeuchtete Membran
- das Gel
- 3 mit Transferlösung (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) angefeuchtete Whatman Papiere, die etwas größer sind als das Gel

Die Transferlösung wurde in eine Schale gefüllt und über eine Brücke aus Whatman Papier mit dem Stapel verbunden. Außerdem wurde der Stapel mit etwa 500g beschwert und der Transfer über Nacht durchgeführt.

Nach dem Transfer der DNA-Fragmente wurde zunächst die DNA-Leiter anhand der Markierungen auf dem Gel auf die Membran übertragen, bevor die Membran in einer Lösung aus 0,5 M Tris und 0,6 M NaCl neutralisiert wurde. Anschließend wurde die DNA durch Inkubation für 3 Stunden bei 85°C auf der Membran fixiert. Im Anschluss daran erfolgte die Prähybridisierung, wobei die Membran bei 65°C über Nacht in Hybridisierungslösung (1 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5, 10% Dextransulfat, 1% SDS, 250 µg/ml Lachssperma-DNA ultraschallbehandelt) rotiert wurde.

Die Sonde wurde mithilfe des Kits „Prime-It® II Random Primer Labeling Kit“ (Stratagene) gemäß den Angaben des Herstellers mit [ALPHA-<sup>32</sup>P] dCTP markiert. Zum Entfernen nicht inkorporierter Nukleotide wurden die Säulchen „NucTrap® Probe Purification Columns“ (Stratagene) gemäß Herstellerangaben verwendet. Von der Sonde wurden ca.  $2 \times 10^7$  CPM zu der Hybridisierungslösung gegeben und die Membran darin eine weitere Nacht bei 65°C rotiert.

Die Membran wurde nun je 10 min in Waschlösung I (2x SSC (Roti® Stock 20x SSC), 0,1% SDS) und in Waschlösung II (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen.

Anschließend wurde die Membran auf einen Film aufgelegt und zusammen mit einer Verstärkerfolie in eine Belichtungskassette (Kodak) gegeben. Dabei variierte die Expositionsdauer zwischen 30 und 60 min. Die Entwicklung des Films wurde mit Entwickler- und Fixierlösung von Kodak nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.1.20 Pronukleus-Injektion**

Die Injektion wurde von Frau Elena Wiese in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Dabei wurde das gewünschte BAC-Fragment in den Vorkern befruchteter C57BL/6 Oocyten injiziert und letztere in pseudoschwangere Tiere eingesetzt.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur (B16-F1 und C22)**

Die adhärenente, murine Melanom Zelllinie B16-F1 wurde in DMEM mit 5% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Natrium-Pyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Bei der adhärenenten Zelllinie C22 handelt es sich um eine immortalisierte Clara Zell-Zelllinie aus dem transgenen Mausstamm H2K<sup>b</sup>-tsA58. Dieser Mausstamm trägt ein Transgen, bei welchem das große Tumorantigen eines temperatursensitiven Stammes (tsA58) des Affenvirus 40 (simian virus 40 (SV40)) mit dem Promotor des Haupthistokompatibilitätskomplexes H2K<sup>b</sup> fusioniert ist. Durch Kultivierung bei 33°C in Gegenwart von Interferon-gamma werden die Zellen zur Proliferation angeregt (Demello et al., 2002).

Die Zelllinie wurde uns zur Verfügung gestellt von Jan Ryerse, Department of Pathology, St. Louis University Health Sciences Center and Pediatric Research Institute, USA.

Die Zelllinie wurde in glukosehaltigem DMEM (GibcoBRL) mit 3% FCS, 1% Glutamin (GibcoBRL), 64,4 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B (Sigma), 0,25 µg/ml Endothelin-1 (Bachem), 10 µg/ml Interferon-gamma (Cell Sciences), 10 µg/ml Insulin (Sigma), 5 µg/ml Transferrin (BD Biosciences), 7,5 µg/ml Endothelial Cell Growth Supplement (BD Biosciences), 25 ng/ml Epidermal Growth Factor (BD Biosciences), 360 ng/ml Hydrocortisone (BD Biosciences), 20 ng/ml T3 (Sigma) bei 10% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zur Generierung stabiler C22 Transfektanten wurden die Zellen zusätzlich mit 0,5 mg/ml G418 kultiviert.

### **2.2.2 Transfektion durch Elektroporation**

Zur Transfektion der Zelllinie C22 wurden 1,5 Mio Zellen pro Elektroporationsansatz verwendet. Die gewünschte DNA wurde in einer Gesamtmenge von 30 µg eingesetzt, wobei jeweils die gleiche Molmenge benutzt und mit Leervektor aufgefüllt wurde. Die Elektroporation wurde in DMEM (GibcoBRL) mit 0,4 cm Küvetten mittels des Gene pulser II (BioRad) mit 270 V und 500 µF durchgeführt.

## 2.3 Proteinanalytische Methoden

### 2.3.1 Luziferase Reporter Assay

Zur Überprüfung der Luziferase Aktivität wurde oben genannter Assay (Promega) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Aktivität wurde mit dem Luminometer TD-20/20 von Turner Biosystems gemessen. Es wurde allerdings keine Standardisierung durchgeführt bzw. berücksichtigt.

### 2.3.2 Western Blot

#### Herstellung von Zelllysaten

0,5 bis 3 Mio Zellen wurden in 250 µl modifiziertem RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,25% Na-Desoxycholat, 1% NP-40, 100 mM PMSF, Phosphatase-Inhibitoren: 50 mM Na-fluorid, 10 mM Na-pyrophosphat-Decahydrat, 10 mM β-Glycerophosphat-Pentahydrat, Na-orthovanadat, Protease-Inhibitoren: 100mM AEBSF, 5 mM Bestatin, 1,5 mM E-64, 2 mM Leupeptin H) 15 min auf Eis lysiert. Für die Proteinbestimmung wurde ein Aliquot von 20 µl bei -20°C aufbewahrt. Das restliche Lysat wurde mit 4xLDS Ladepuffer (4,3 M Glycerin, 0,56 M Tris Base, 0,42 M Tris-HCl, 0,3 M LDS, 1,6 mM EDTA, 0,88 mM Bromphenolblau, 0,5 mM Phenolrot, 0,2 M DTT) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe des „660 nm Protein Assay“ Kits (Pierce, Thermo Scientific) gemäß den Herstellerangaben ermittelt. Die photometrische Messung wurde bei 660 nm am „SpectraFlourPlus Reader“ (Tecan) durchgeführt. Durch Vergleichen der Werte mit einem mitgeführten BSA-Standard konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE), Wetblot und Detektion

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 12%iges Acrylamidgel verwendet und ca. 10 µg Gesamtprotein pro Tasche geladen. Anschließend wurden die Proteine mit einem Genie Blotter (Idea Scientific Company) auf eine Immobilon-P Membran (PVDF,



Porengröße: 0,45 µm, Millipore) transferiert. Die Membran wurde im Anschluß 30 bis 60 min in 5% Milchpulver (Roth) mit TBST (Tris buffered saline mit Tween 20: 1 mM Tris-Base, 9 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) geblockt. Nach 3maligem Waschen mit TBST à 5 min wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran 3mal à 5 min mit TBST gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem 3maligem Waschen wurde die Membran mit dem „SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate Kit“ (Pierce) entwickelt und mit dem „BioRad Molecular Imager ChemiDoc XRS System“ (BioRad) analysiert.

Verwendete Primär-Antikörper:

Cdk4 (DCS-156): 1:200 in TBST mit 5% Milchpulver  
B-Raf (L12G7): 1:1000 in TBST mit 5% Milchpulver  
β-Aktin (HRP Konjugat): 1:40000 in TBST mit 5% Milchpulver  
pErk1/2 (p44/42) MAP Kinase (Thr201/Tyr204): 1:1000 in TBST mit 1% BSA  
Erk1/2 (p44/42) MAP Kinase: 1:1000 in TBST mit 1% BSA

Verwendete Sekundär-Antikörper:

Goat Anti-mouse HRP (für Braf, Cdk4): 1:2500 in TBST mit 5% Milchpulver  
Goat Anti- rabbit HRP (für pErk und Erk): 1:1000 in TBST mit 5% Milchpulver

Der Cdk4-Antikörper wurde von Santa Cruz, alle übrigen Antikörper von Cell Signaling bezogen.

Um ein weiteres Protein auf der Membran nachzuweisen, wurde die Membran „gestrippt“. Dazu wurde sie für 30 min bei 56°C in Strip-Puffer (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0,1 M Mercaptoethanol) inkubiert, bevor erneut mit dem „Blocking“ begonnen wurde.

## **2.4 Tierexperimentelle Methoden**

### **2.4.1 Mäuse**

C57BL/6 Mäuse wurden von der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen.

Der transgene Mausstamm MT/ret exprimiert das Proto-Onkogen *Ret* unter Kontrolle des ubiquitären Metallothionein-1 (Mt) Promoter. Die Tiere wurden in eigener Zucht gemäß den offiziellen Richtlinien gehalten. Erste Zuchttiere wurden von Prof. Dr. Viktor Umansky (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Cre deleter Mäuse exprimieren eine konstitutiv aktive Rekombinase Cre ubiquitär. Die Tiere wurden in eigener Zucht gemäß den offiziellen Richtlinien gehalten. Erste Zuchttiere wurden von Prof. Dr. Ari Waisman (Institut für Molekulare Medizin, Mainz) zur Verfügung gestellt.

### **2.4.2 Betäubung und Rasur**

Die Mäuse wurden zunächst mit einer Ketamin/Rompun Mischung betäubt. Diese bestand aus 2 ml Ketamin- (Ratiopharm) und 800 µl Rompun-Lösung (Bayer), die vor Gebrauch 1:5 mit 1xPBS verdünnt wurde. Je nach Größe wurden den Tieren zwischen 200 und 250 µl i.p. verabreicht. Die Tiere wurden anschließend mit einem Langhaarschneider rasiert.

### **2.4.3 Tamoxifen-Injektionen**

Tamoxifen (MP Biomedicals) wurde in 96 %igem Ethanol (Roth) und Glycerol trioleate (Sigma) in einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst. Dazu wurden Tamoxifen und 100 µl Ethanol zunächst gevortext. Nach Zugabe von 900 µl Öl wurde die Mischung solange bei 56°C inkubiert, bis Tamoxifen vollständig gelöst war. Pro Injektion wurden 100 µl des gelösten Tamoxifens verwendet und den Mäusen i.p. verabreicht.

### **2.4.4 *In vivo* Biolumineszenz-Imaging**

Die Luziferase-Aktivität in Mäusen wurde durch *in vivo* Biolumineszenz-Imaging mittels des „IVIS Lumina Imaging Systems“ von Caliper Life Sciences gemessen.

Während der Messung befanden sich die Tiere in Isofluran-Kurzzeit-Inhalationsnarkose. Vor der Messung wurde den Tieren 3 mg Luziferin (Caliper) in 300 µl PBS i.p. verabreicht. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Luziferase-Aktivität mit einer Integrationszeit von 60 sek gemessen.

#### **2.4.5 Entnahme von Gewebe aus Mäusen**

Schwanzspitzen wurden mit Hilfe von Schere und Pinzette in einer Länge von 2–3 mm geschnitten und für Typisierungs-PCRs verwendet.

Zur Entnahme von Hautproben im Rückenbereich wurden die Tiere zunächst mit CO<sub>2</sub> getötet. Um die Haut von Haaren zu befreien, wurde die entsprechende Stelle mit einem Langhaarschneider und einem Rasierer enthaart. Die Hautproben wurden schließlich mit Schere und Pinzette entnommen.

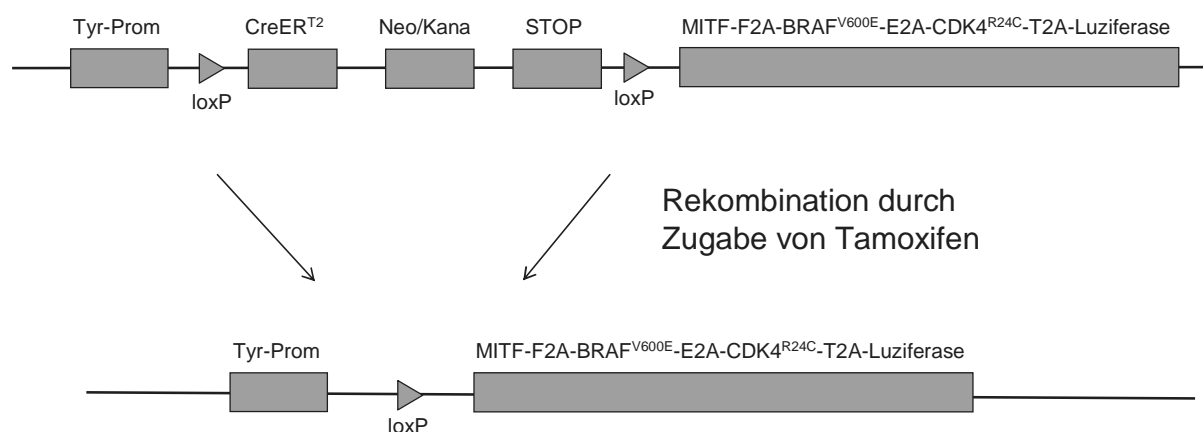
Zur Entnahme von Melanomen wurden die Tiere zunächst mit CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wurden sie auf dem Rücken liegend auf einem Präparationsbrett befestigt. Nach Ablösen und Spannen des Fells, wurden die etwa stecknadelgroßen Melanome mit Hilfe einer Pinzette entnommen.

### 3 Ergebnisse

#### Das Konstrukt Tyr iOnkogene

Zur Generierung des BAC-transgenen Mausstamms Tyr iOnkogene wurde das Cre/loxP-System gewählt. Wie in Abbildung 3.1 gezeigt flankieren zwei loxP-Stellen das Gen für die induzierbare Rekombinase CreER<sup>T2</sup>, eine Neomycin/Kanamycin-Kassette (Neo/Kana) und eine Westphal-Stop-Sequenz (WSS).

Für das Konstrukt wurden Proto-Onkogene gewählt, die in humanen Melanomen besonders häufig mutiert oder amplifiziert zu finden sind (Takata and Saida, 2006; Walker and Hayward, 2002) bzw., welche die entsprechenden Signalwege beeinflussen. Wie in Tabelle 1.1 zu sehen ist, geht die Melanomentwicklung in transgenen murinen Modellen mit nur einer genetischen Veränderung meist mit einer geringen Rate erkrankter Tiere und einer hohen Latenzzeit einher. Dies kann jedoch durch das Einbringen weiterer genetischer Veränderungen, welche die Melanomentwicklung begünstigen, verstärkt werden. Aus diesem Grund sollte das Konstrukt mehr als nur ein einziges Onkogen enthalten und außerdem verschiedene Signalwege beeinflussen. Die Entscheidung fiel auf die Onkogene *Braf*<sup>V600E</sup> und *Cdk4*<sup>R24C</sup>, deren Mutationen zu einer konstitutiven Aktivierung der Proteine führen und auf *Mitf*, das in Melanomen häufig amplifiziert zu finden ist.



**Abbildung 3.1: Schema des Konstrukts vor und nach Induktion durch Tamoxifen**

Die Zugabe von Tamoxifen bewirkt die Rekombination der DNA an den loxP-Stellen, wodurch die Expression der Onkogene *Mitf*, *Braf*<sup>V600E</sup> und *Cdk4*<sup>R24C</sup> unter Kontrolle des Tyrosinasepromoters möglich wird. Tyr-Prom=Tyrosinasepromoter, CreER<sup>T2</sup>= Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und mutierter Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors, Neo/Kana=Neomycin/Kanamycin-Kassette, STOP= Westphal-Stop-Sequenz, 2A-Sequenzen (F2A, E2A und T2A) ermöglichen die Ko-Expression mehrerer Gene

Um die Zellen, welche die Onkogene exprimieren, verfolgen zu können, wurde außerdem das Gen für Luziferase *luc* in das Konstrukt integriert. *Braf*<sup>V600E</sup>, *Cdk4*<sup>R24C</sup>, *Mitf* und *luc* wurden jeweils mit einem Linker (2A) verbunden, welcher enzymunabhängig die Spaltung von Proteinen vermittelt (Szymczak et al., 2004). Um zu gewährleisten, dass die Expression der Onkogene auf Melanozyten beschränkt ist, wurde das Konstrukt unter die Kontrolle des Tyrosinasepromoters gebracht, welcher nur in diesen Zellen aktiv ist. Dazu wurde ein BAC (bacterial artificial chromosome) verwendet, welcher den Promoter und das Gen für Tyrosinase enthält. Durch homologe Rekombination wurde das Konstrukt in den BAC eingebracht. Im nicht-induzierten Zustand wird die Rekombinase CreER<sup>T2</sup> im Zytoplasma durch Bindung an HSP90 vom Nukleus ferngehalten. Tamoxifen bewirkt die Freisetzung von HSP90, wodurch die Rekombinase in den Nukleus gelangt und dort ihre Ziel-DNA (loxP-Stellen) rekombinieren kann. Dadurch wird die Expression der Onkogene ermöglicht.

### 3.1 Generierung der Sequenz „iOnkogene“

(5'Hom-loxP-CreER<sup>T2</sup>-Neo/Kana-STOP-loxP-Mitf-F2A-Braf<sup>V600E</sup>-E2A-Cdk4<sup>R24C</sup>-T2A-Luziferase-3'Hom)

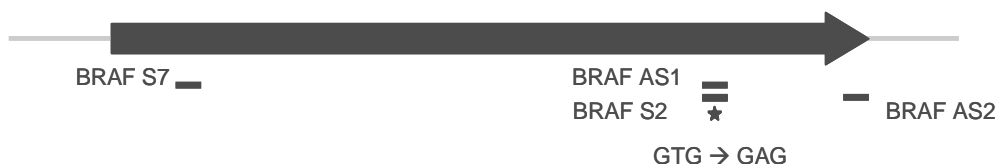
#### 3.1.1 Gewinnung der Onkogene *Braf*<sup>V600E</sup>, *Cdk4*<sup>R24C</sup> und *Mitf*

Zur Gewinnung der Onkogene wurde cDNA der murinen Melanomzelllinie B16-F1 (Fidler, 1973) hergestellt, daraus die oben genannten Gene amplifiziert und bereits beschriebene, für Melanome typische, aktivierende Mutationen *CDK4*<sup>R24C</sup> und *BRAF*<sup>V600E</sup>, (aufgrund der Isoform befindet sich die Mutation an Position 585) durch „site directed mutagenesis“ eingefügt. Da *MITF* in Melanomen nicht in genetisch veränderter Form, sondern amplifiziert gefunden wurde, wurde es unverändert in das Konstrukt eingebaut.

*Braf*<sup>V600E</sup>

Da *Braf* aus der genannten cDNA nicht vollständig gewonnen werden konnte, wurde es zunächst nur teilweise amplifiziert. Gemäß der Abbildung 3.2 wurden mit Hilfe der Primerpaare S7 (bindet in Exon 2) /AS1 und S2/AS2 zunächst zwei PCR-Produkte generiert, wobei durch die Primer AS1 und S2 die aktivierende Mutation V600E (GTG → GAG) eingefügt wurde.

Durch eine anschließende „overlapping extension PCR“ (OE-PCR) wurden beide Fragmente verbunden und durch „TOPO TA Cloning<sup>®</sup>“ in den Plasmidvektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> integriert.

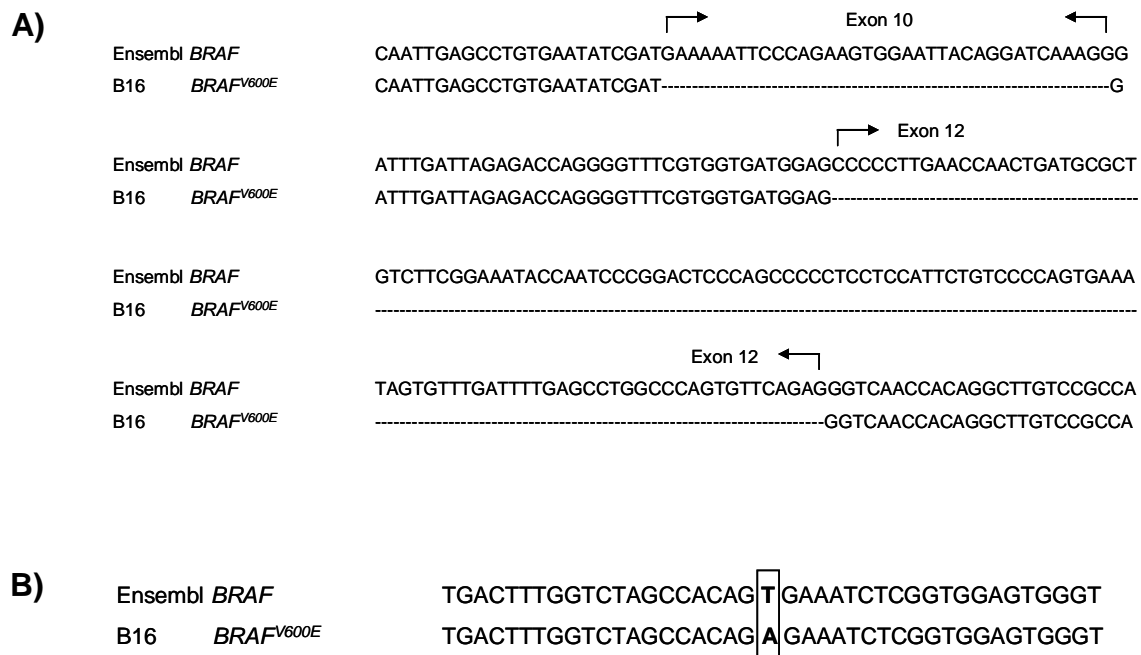


**Abbildung 3.2: Amplifikation des murinen *BRAF* und Einfügen der Mutation *V600E***

*BRAF* konnte zunächst nur teilweise amplifiziert werden. Mit den Primerpaaren S7/AS1 und S2/AS2 wurden zwei Produkte amplifiziert, in die durch die Primer AS1 und S2 die Mutation GTG → GAG eingefügt wurde. Durch overlapping extension PCR wurden beide Produkte zusammengefügt.

Einige der daraus resultierenden Klone wurden zunächst einer Voranalyse unterzogen. Dazu wurden diese expandiert, die Plasmide isoliert und mit Restriktionsenzymen verdaut, welche ein für das Plasmid spezifisches Schnittmuster ergeben. Daraus wiederum resultierende Kandidaten wurden schließlich einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Analyse der aus B16-F1 cDNA amplifizierten und modifizierten Sequenz zeigte einerseits, dass es sich um eine Isoform handelt, bei der die Exons 10 und 12 (siehe Einleitung 1.2.2) fehlten (siehe Abbildung 3.3 A) und andererseits, dass die Mutation V600E erfolgreich eingefügt wurde (siehe Abbildung 3.3 B). Die übrige Sequenz entsprach der erwarteten Sequenz (Ensembl Transcript ID: ENSMUST0000002487) (Ergebnis nicht gezeigt).

Die fehlende DNA-Sequenz von *Braf* wurde synthetisch hergestellt, worauf im Folgenden genauer eingegangen wird.



### Abbildung 3.3: Sequenzanalyse des mutierten *Braf*-Amplifikats

Der Vergleich des murinen *Braf*-Transkripts 1 aus Ensembl mit dem mutierten *Braf*-Amplifikat aus der cDNA der Zelllinie B16-F1 (teilweise abgebildet) zeigt, dass A) in B16-F1 *Braf* die Exons 10 und 12 fehlen und B) die Mutation V600E (GTG → GAG) erfolgreich war.

*Cdk4*<sup>R24C</sup>

Entsprechend der Vorgehensweise bei der Gewinnung von *Brat*<sup>V600E</sup> wurden auch bei der Generierung von *Cdk4*<sup>R24C</sup> zunächst 2 PCR Produkte mit eingebrachter Mutation hergestellt, welche anschließend durch OE-PCR verbunden wurden (siehe Abbildung 3.4)

**Abbildung 3.4: Amplifikation des murinen *CDK4* und Einfügen der Mutation R24C**

Mit den Primerpaaren S1/AS1 und S2/AS2 wurden zwei Produkte amplifiziert, in die durch die Primer AS1 und S2 die Mutation CGA → TGT eingefügt wurde. Durch overlapping extension PCR wurden beide Produkte zusammengefügt.

Durch Anfügen eines 5' CACC-Überhangs während der PCR konnte das Produkt mittels „directional TOPO<sup>®</sup> Cloning“ in den Plasmidvektor pcDNA<sup>®</sup> 3.1 D/VS- His- TOPO<sup>®</sup> integriert werden. Nach Durchführung der Voranalyse (siehe unter „*Brat*<sup>V600E</sup>“) zeigte die anschließende Sequenzanalyse die erfolgreiche Mutation CGA → TGT (siehe Abbildung 3.5). Die übrige Sequenz entsprach der erwarteten Sequenz (Ensembl Transcript ID: ENSMUST00000006911) (Ergebnis nicht gezeigt).

Ensembl <i>CDK4</i>	ATGGGACGGTGTACAAAGCC	<b>CGA</b>	GATCCCCACAGTGGCCACTT
B16 <i>CDK4</i> <sup>R24C</sup>	ATGGGACGGTGTACAAAGCC	<b>TGT</b>	GATCCCCACAGTGGCCACTT

**Abbildung 3.5: Sequenzanalyse des mutierten *Cdk4*-Amplifikats**

Der Vergleich des murinen *Cdk4*-Transkripts 1 aus Ensembl mit dem mutierten *Cdk4*-Amplifikat aus der cDNA der Zelllinie B16-F1 (teilweise abgebildet) zeigt, dass die Mutation R24C (CGA → TGT) erfolgreich war.

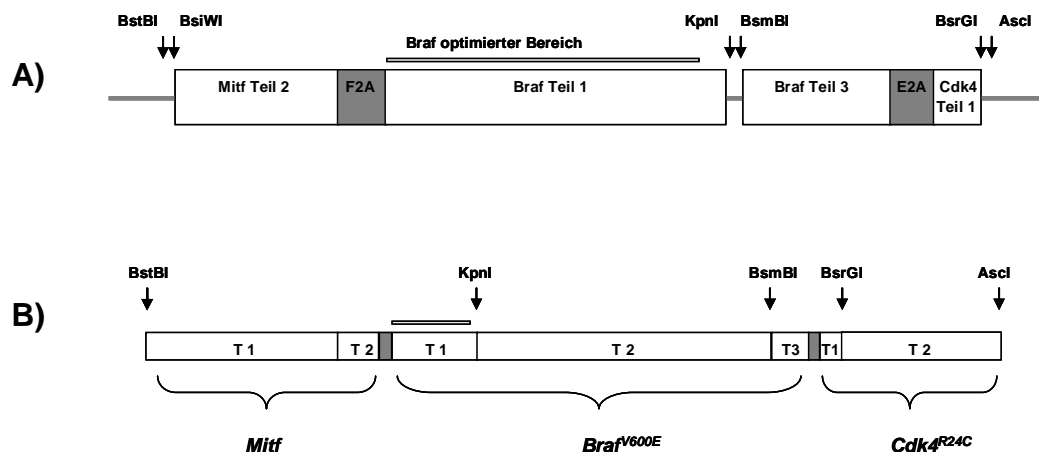
*Mitf*

Das Gen *Mitf* wurde mittels der Primer MITF S und MITF AS aus B16-F1 cDNA amplifiziert und wie *Cdk4*<sup>R24C</sup> in den Plasmidvektor pcDNA<sup>®</sup> 3.1 D/VS- His- TOPO<sup>®</sup> integriert. Die Analyse der Sequenz entsprach der erwarteten Sequenz (Ensembl Transcript ID: ENSMUST000000043628) (Ergebnis nicht gezeigt).



### 3.1.2 Generierung der Sequenz „*Mitf*-F2A-*Braf*<sup>V600E</sup>-E2A-*Cdk4*<sup>R24C</sup>“

Um die genannte Sequenz zu generieren, wurde ein Teil davon zunächst von Eurofins MWG Operon / Eurofins Medigenomix synthetisch hergestellt. Bei dieser Gelegenheit wurde außerdem der Bereich von *Braf* in Auftrag gegeben, den es uns nicht gelang zu amplifizieren. Aufgrund seiner GC-reichen Sequenz wurde dieser Abschnitt allerdings aminosäuresequenzerhaltend optimiert. Abbildung 3.6 A stellt ein Schema dieser in Auftrag gegebenen Sequenz, einschließlich der für die weiteren Klonierungsschritte benutzten Restriktionsschnittstellen, dar. Zur Vervollständigung der Sequenz wurden die bereits amplifizierten Onkogene verwendet. Dabei wurde in der Reihenfolge *Braf*, *Cdk4* und *Mitf* vorgegangen und durch Restriktionsverdau und Ligationen die gewünschte Sequenz generiert. Für die Vervollständigung von *Mitf* wurden die Restriktionsschnittstellen *BsiWI* und *Acc65I* (im *Mitf*-Amplifikat) benutzt, welche kompatible Enden erzeugen. In Abbildung 3.6 B ist ein Schema der daraus entstandenen Sequenz dargestellt.



**Abbildung 3.6: Generierung der Sequenz „*Mitf*-F2A-*Braf*<sup>V600E</sup>-E2A-*Cdk4*<sup>R24C</sup>“**

Die in Auftrag gegebene Sequenz (A) wurde unter Benutzung der eingezeichneten Restriktionsschnittstellen durch schrittweises Klonieren vervollständigt (B). Dazu wurden die bereits amplifizierten Onkogene verwendet. Der Teil von *Braf*, der nicht amplifiziert werden konnte, wurde wegen seiner GC-reichen Sequenz aminosäuresequenzerhaltend optimiert. Eingezeichnet sind außerdem die Linkersequenzen E2A und F2A, T = Teil.

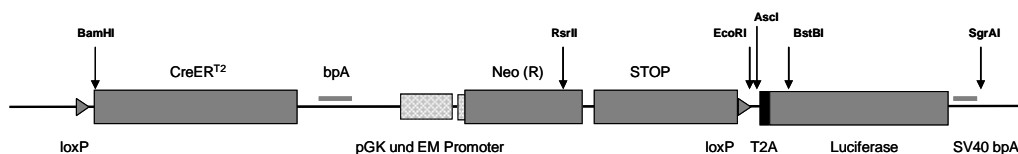
### 3.1.3 Generierung der Sequenz „loxP-CreER<sup>T2</sup>-Neo/Kana-STOP-loxP-T2A-Luziferase“

Zur Generierung der Sequenz „loxP - CreER<sup>T2</sup> - Neo/Kana - STOP – loxP“ wurden die Rekombinase CreER<sup>T2</sup> und die Neomycin/Kanamycin-Kassette (Neo/Kana) aus dem Plasmid „pNNCRE19\_ERT2\_(288-575)\_plain“ mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen BamHI und RsrII (siehe Abbildung 3.7) in das Plasmid „vorrübergehendes Konstrukt“ kloniert.

Das Gen für die firefly Luziferase (*luc*) wurde dem Plasmid „pGL3-Basic“ entnommen. Dabei wurde zunächst durch site-directed mutagenesis, mit Hilfe der Primer „SDM in luc“ und „SDM in luc RC-seq“ eine SgrAI-Schnittstelle in *luc* entfernt. Dem folgte die Amplifikation von *luc* unter Verwendung der Primer „SP luc“ und „ASP luc“, wobei am 3' Ende des SV40 bpA eine SgrAI-Schnittstelle (siehe Abbildung 3.7) eingefügt wurde.

Die Linkersequenz T2A, einschließlich der Sequenz *luc* bis zur Schnittstelle BstBI, wurden zur Synthese in Auftrag gegeben (Operon) und anschließend durch EcoRI- und BstBI-Doppelverdau (siehe Abbildung 3.7) in pGL3-Basic integriert.

Die nun entstandene Sequenz „T2A – luc SV40 bpA“ wurde anschließend durch einen AscI / SgrAI (siehe Abbildung 3.7) -Doppelverdau an das 3' Ende der zweiten loxP-Stelle kloniert, wodurch ein Plasmid mit der Sequenz „loxP - CreER<sup>T2</sup> - Neo/Kana - STOP - loxP - T2A - Luziferase“ entstand.

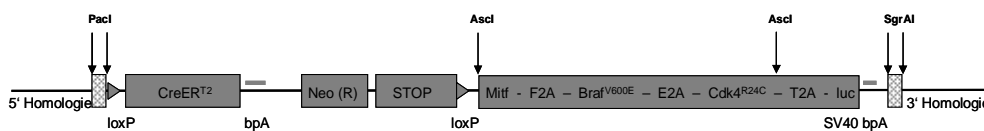


**Abbildung 3.7: Generierung der Sequenz „loxP-CreER<sup>T2</sup>-Neo/Kana-STOP-loxP-T2A-Luziferase“**

Die abgebildete Sequenz wurde schrittweise mit Hilfe der eingezeichneten Restriktionsenzyme aus dem Plasmid „vorrübergehendes Konstrukt“ generiert. Die Sequenz zwischen BamHI und RsrII stammt aus dem Plasmid „pNNCRE19\_ERT2\_(288-575)\_plain“, die Sequenz zwischen AscI und BstBI wurde synthetisch hergestellt und für die Sequenz zwischen BstBI und SgrAI wurde das Plasmid „pGL3-Basic“ als Grundlage verwendet.

### 3.1.4 Fertigstellung der Sequenz „iOnkogene“

Im Folgenden wurde die im Vorfeld erzeugte Sequenz „Mitf – F2A – Braf<sup>V600E</sup> – E2A – Cdk4<sup>R24C</sup>“ mittels einer *Ascl*-Klonierung zwischen die zweite loxP-Stelle und die T2A-Sequenz kloniert (siehe Abbildung 3.8). Für die spätere homologe Rekombination in das BAC wurden nun die Homologieregionen generiert und an das 5' bzw. 3' Ende kloniert. Dazu wurden aus DNA des BAC „pTARBAC RP24-439117“ mittels der Primerpaare „SP 5' Hom“ / „AS 5' Hom“ und „SP 3' Hom“ / „AS 3' Hom“ beide Homologieregionen amplifiziert und dem jeweiligen Ende mittels *PacI*-Klonierung (5' Hom, 226 bp) bzw. *SgrAI*-Klonierung (3' Hom, 308 bp) angefügt (siehe Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Generierung der Sequenz „iOnkogene“ (5'Hom-loxP-CreER<sup>T2</sup>-Neo/Kana-STOP-loxP-Mitf-F2A-Braf<sup>V600E</sup>-E2A-Cdk4<sup>R24C</sup>-T2A-Luziferase-3'Hom)**

Die Integration der Onkogene aus dem Plasmid „Mitf-F2A-Braf<sup>V600E</sup>-E2A-Cdk4<sup>R24C</sup>“ in die vorbereitete Sequenz „loxP-CreER<sup>T2</sup>-Neo/Kana-STOP-loxP-T2A-Luziferase“ erfolgte durch eine *Ascl*-Klonierung. Des Weiteren wurden die Homologieregionen für die spätere Red/ET-Klonierung durch Amplifikation aus dem BAC „pTARBAC RP24-439117“ gewonnen. Dabei wurden mit Hilfe der Primer für die 5' Homologie *PacI*-Schnittstellen und für die 3' Homologie *SgrAI*-Schnittstellen eingebracht, welche der Klonierung der Homologieregionen dienen.

### **3.2 Expressions- und Aktivitätsanalysen der im Konstrukt verwendeten Onkogene Braf<sup>V600E</sup> und Cdk4<sup>R24C</sup> und der firefly Luziferase**

Vor der endgültigen Fertigstellung des BAC-Transgens und der Generierung der transgenen Tiere sollten verschiedene Kontrollversuche durchgeführt werden. Es sollte der Nachweis der Expression und Funktionalität der einzubringenden Onkogene und der Luziferase erbracht werden.

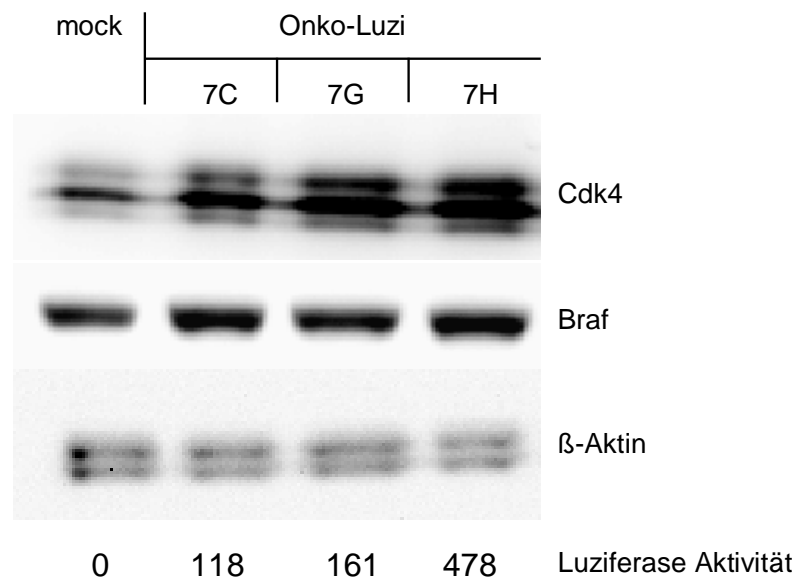
Dazu wurde die Sequenz „Mitf–F2A–Braf<sup>V600E</sup>–E2A–Cdk4<sup>R24C</sup>-T2A–Luziferase“ (genannt: „Onko-Luzi“) in den Expressionsvektor „pcDNA<sup>®</sup> 3.1 D/VS- His- TOPO<sup>®</sup>“ (Invitrogen) kloniert, bei welchem die Zielgene unter dem CMV-Promoter exprimiert werden. Mit dem so entstandenen Plasmid „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ wurde anschließend die Zelllinie C22 transfiziert. Im Folgenden wurden entweder transient- oder stabil-transfizierte C22 verwendet.

#### **3.2.1 Die Transfektion von C22 mit „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ führt zu einer erhöhten Expression von Cdk4 und Braf**

Die Expressionsanalyse mittels Western Blot wurde aus methodischen Gründen nur für die beiden Onkogene Braf<sup>V600E</sup> und Cdk4<sup>R24C</sup> durchgeführt. Die verwendeten Antikörper gegen Braf und Cdk4 erkennen sowohl das mutierte, als auch das nicht-mutierte Protein. Wie in Abbildung 3.9 zu sehen, exprimieren bereits „mock“-transfizierte C22 Zellen sowohl Cdk4, als auch Braf. Dennoch ist in den getesteten „Onko-Luzi“-Transfektanten eine deutlich verstärkte Expression von Cdk4 sowie eine leichte Verstärkung der Expression von Braf zu erkennen.

#### **3.2.2 „pcDNA3.1-Onko-Luzi“-transfizierte C22 zeigen Luziferase-Aktivität**

Die Funktionalität der Luziferase wurde mit dem „Luciferase Reporter Assay“ (Promega) überprüft. Wie erwartet weisen „mock“-transfizierte C22 keine Luziferase-Aktivität auf. Im Gegensatz dazu zeigen alle getesteten Onkogen-transfizierten C22 eine Aktivität der Luziferase. Außerdem ist eine Korrelation zwischen der Stärke der Luziferase-Aktivität und der Verstärkung der Expression von Cdk4 und Braf zu erkennen (siehe Abbildung 3.9).

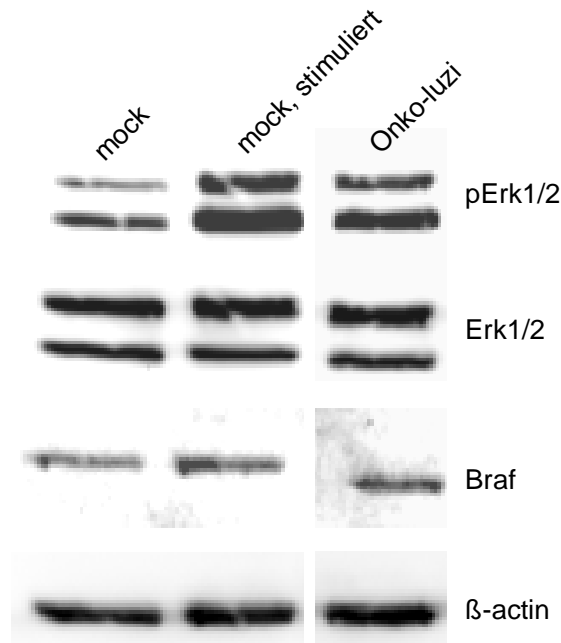


**Abbildung 3.9: Gesteigerte Expression der Onkogene Cdk4 und Braf und Luziferase-Aktivität in „Onko-Luzi“ transfizierten C22**

C22 Zellen wurden entweder mit dem „leeren“ Expressionsvektor (mock) oder mit dem Expressionsvektor „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ („Mitf-F2A-Braf<sup>V600E</sup>-E2A-Cdk4<sup>R24C</sup>-T2A-Luziferase“) durch Elektroporation transfiziert. Nach Selektion und Klonierung der Transfektanten wurde die Expression von Braf (86 kDa) und Cdk4 (34 kDa) durch Western Blots überprüft. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Die Aktivität der Luziferase wurde durch den Luziferase Reporter Assay überprüft. Für Western Blots wurden Zellysate aus jeweils 1 Mio Zellen, für Luziferase Assays wurden je 1 Mio Zellen verwendet.

### 3.2.3 Die Transfektion von C22 mit „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ führt zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs

In einem weiteren Schritt sollte analysiert werden, ob die Expression des konstitutiv aktiven Braf<sup>V600E</sup> die Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk begünstigt. Dazu wurden C22 Zellen wiederum mit „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ oder mit dem Leervektor transfiziert und nach einer 2-tägigen Kultur mittels Western Blot untersucht. Wie Abbildung 3.10 zeigt, führt die Transfektion von C22 mit dem Onko-Luzi Konstrukt zu einer ähnlich verstärkten Erk-Phosphorylierung wie die Stimulation der Zellen mit der Positivkontrolle (IL-22). Eine erhöhte Expression von Braf war hier nicht zu erkennen.



**Abbildung 3.10: Verstärkte Phosphorylierung von Erk in „Onko-Luzi“ transfizierten C22**

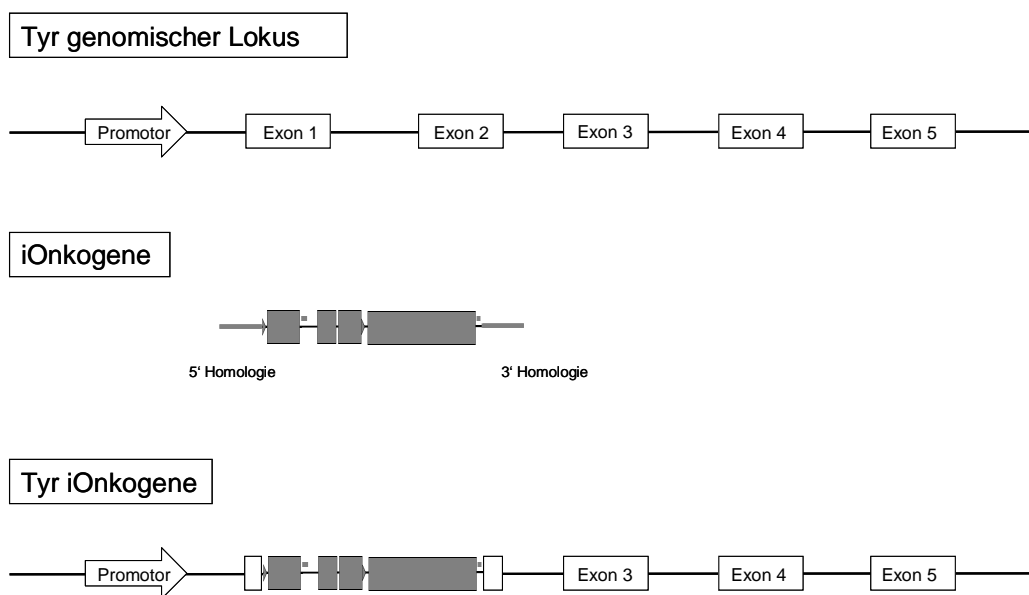
C22 Zellen wurden entweder mit dem „leeren“ Expressionsvektor (mock) oder mit dem Expressionsvektor „pcDNA3.1-Onko-Luzi“ („Mitf-F2A-Braf<sup>V600E</sup>-E2A-Cdk4<sup>R24C</sup>-T2A-Luziferase“) durch Elektroporation transfiziert. Die Herstellung der Lysate erfolgte nach 2-tägiger Kultur. Als Positivkontrolle wurden mock-transfizierte C22 Zellen direkt vor der Lyse für 5 min mit 100 ng/ml IL-22 inkubiert. Von jedem Lysat wurden 8 µg Protein auf ein SDS-Gel geladen bevor die Proteine pErk1/2 (42/44 kDa), Erk1/2(42/44 kDa) und Braf (86 kDa) mittels Western Blot detektiert wurden. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.

Es konnte also gezeigt werden, dass der Teil des späteren BAC-Konstrukts, der die Onkogene und die Luziferase kodiert, hinsichtlich der Expression (Braf<sup>V600E</sup> und Cdk4<sup>R24C</sup>) und der Proteinaktivität (Braf<sup>V600E</sup> und Luziferase) in eukaryontischen Zellen funktionell ist. Die richtigen Größen der Onkogene Braf<sup>V600E</sup> und Cdk4<sup>R24C</sup> im Western Blot und die Aktivitäten der Proteine Braf<sup>V600E</sup> und Luziferase sprechen außerdem für die Funktionalität der 2A-Sequenzen. Da die restliche Sequenz „loxP - CreER<sup>T2</sup> - Neo/Kana - STOP - loxP“ aus „iOnkogene“ bereits in anderen Tiermodellen zum Einsatz kam, wurde von deren Funktionalität ausgegangen. Somit konnte die Generierung des BAC-Konstrukts und schließlich der BAC-transgenen Maus „B6 tg Tyr iOnkogene“ fortgesetzt werden.

### 3.3 Generierung der transgenen Maus B6 tg Tyr iOnkogene

#### 3.3.1 Herstellung des BAC „Tyr iOnkogene“

Nach Sequenzbestätigung des bisher erzeugten Konstrukts durch Sequenzierung, wurde es durch homologe Rekombination (Red/ET-Klonierung) in das bakterielle artifizielle Chromosom (BAC) „pTARBAC RP24-439I17“, welches das murine Gen für Tyrosinase enthält, eingebracht. Hierbei wurden die Homologieregionen in der Art gewählt, dass das Konstrukt einen Teil des Exons 1, Intron 1 und einen Teil des Exons 2 ersetzt. Die Expression sämtlicher, auf dem Konstrukt kodierten Proteine, wurde somit unter die Kontrolle des Tyrosinasepromoters gestellt, der ausschließlich in Melanozyten aktiv ist.

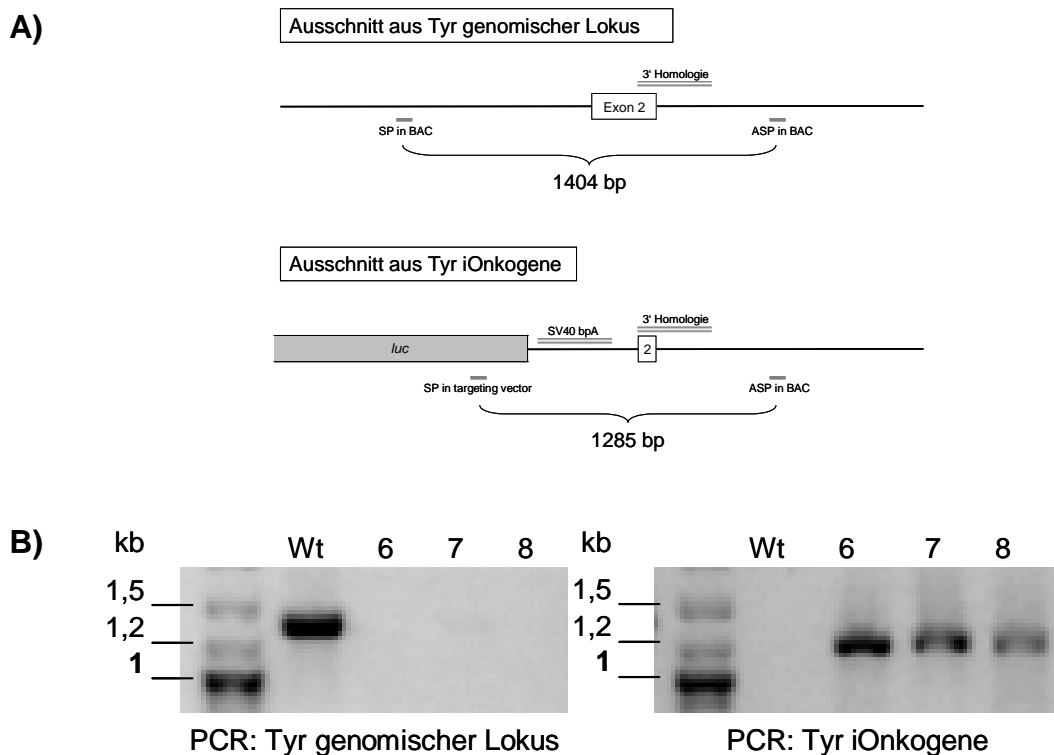


**Abbildung 3.11: Homologe Rekombination (Red/ET-Klonierung) des Konstrukts „iOnkogene“ in „pTARBAC RP24-439I17“**

Mit Hilfe zweier Homologieregionen, welche sich an beiden Enden des Konstrukts „iOnkogene“ befinden, wurde es mittels homologer Rekombination so in das BAC „pTARBAC RP24-439I17“ integriert, dass Teile der Exons 1 und 2 des murinen Gens *Tyr* ersetzt wurden. Somit gelangen sämtliche Gene des Konstrukts „iOnkogene“ unter die expressionelle Kontrolle des Tyrosinasepromoters. (zur genaueren Beschriftung von „iOnkogene“ siehe Abbildung 3.8)

### 3.3.2 Analyse der „Tyr iOnkogene“ BAC-Klone durch colony screening PCR

Einige der durch Red/ET-Klonierung gewonnenen BAC-Klone wurden zunächst mittels zweier PCRs analysiert. Wie in Abbildung 3.12 A dargestellt, ergibt die PCR mit den Primern „SP in BAC“ und „ASP in BAC“ ein Produkt der Länge 1404 bp, welches nur auf dem Wildtyp-BAC „pTARBAC RP24-439I17“ amplifiziert werden kann, da die Bindungsstelle des sense-Primers im rekombinierten BAC nicht mehr vorhanden ist. Entsprechend ergibt die PCR mit den Primern „SP in targeting vector“ und „ASP in BAC“ nur ein Produkt (1285 bp) auf dem rekombinierten BAC „Tyr iOnkogene“, da der sense-Primer im rekombinierten Teil des BAC bindet. Abbildung 3.12 B zeigt, dass das Wildtyp-BAC, wie erwartet, in beiden PCRs ausschließlich zu der 1404 bp Bande führt. Bei den analysierten Klonen 6, 7 und 8 handelt es sich voraussichtlich um den rekombinierten BAC „Tyr iOnkogene“.



**Abbildung 3.12: PCR Analyse der durch Homologe Rekombination (Red/ET-Klonierung) gewonnenen BAC-Klone**

A) PCR Strategie: Zur Analyse der gewonnenen Klone wurden zwei PCRs durchgeführt, wobei eine der beiden PCRs spezifisch für das Wildtyp-BAC „pTARBAC RP24-439I17“ ist und ein Produkt der Länge 1404 bp ergibt. Die andere PCR ist spezifisch für das rekombinierte BAC „Tyr iOnkogene“ und amplifiziert ein Produkt von 1285 bp. B) Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und photographisch dokumentiert. Die durch Red/ET-Klonierung gewonnenen Klone 6, 7 und 8 zeigten ausschließlich die 1285 bp Bande der PCR, welche spezifisch für das BAC „Tyr iOnkogene“ ist.

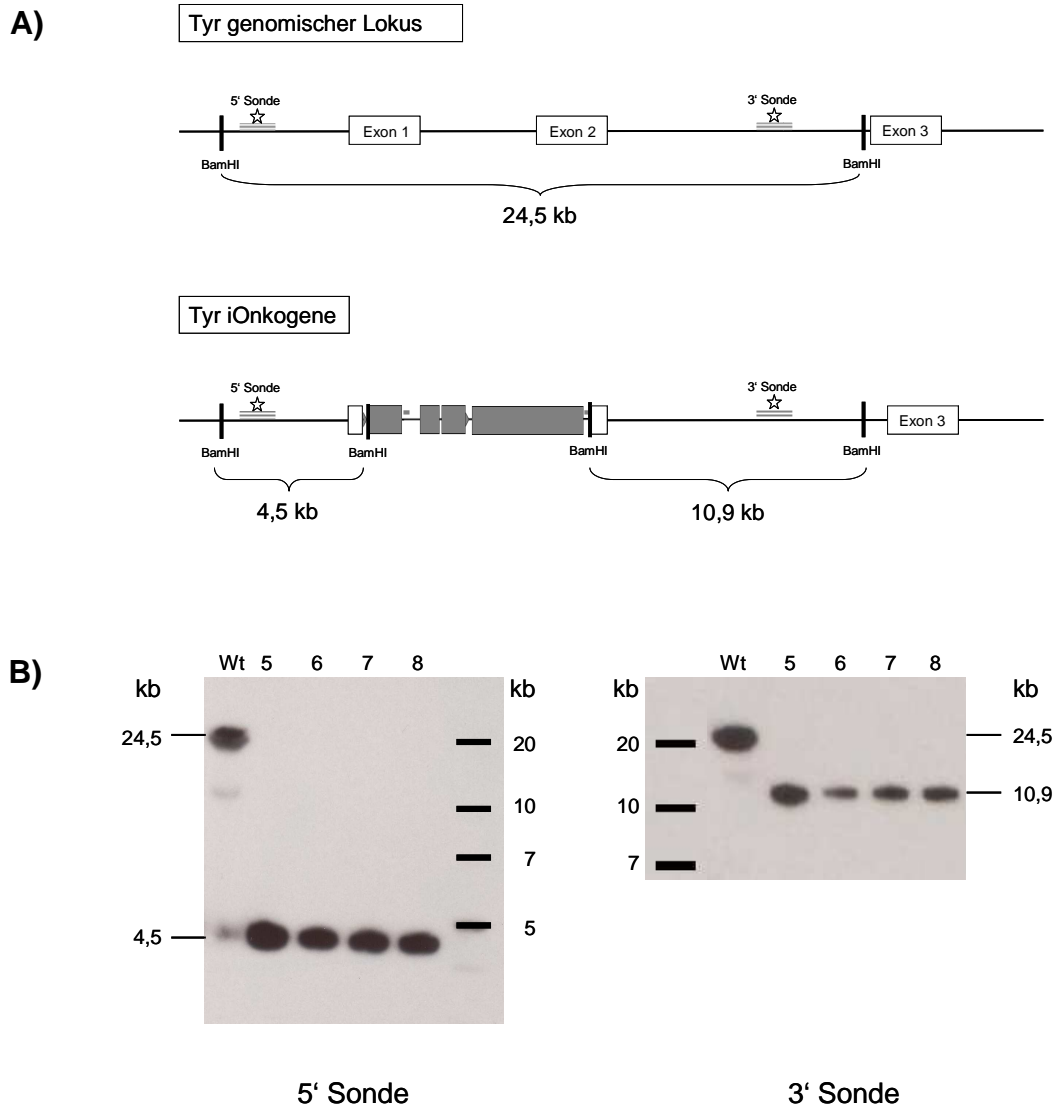


### 3.3.3 Analyse der „Tyr iOnkogene“ BAC-Klone durch Southern Blot

Die durch colony screening PCR identifizierten „Tyr iOnkogene“ BAC-Klone sollten zusätzlich durch Southern Blot bestätigt werden. Zunächst wurden die dafür notwendigen Sonden durch PCR aus dem Wildtyp-BAC generiert. Wie in Abbildung 3.13 A dargestellt, bindet die 5' Sonde „upstream“ von Exon 1 und die 3' Sonde zwischen Exon 2 und Exon 3.

Für den Southern Blot wurden sowohl das Wildtyp-BAC als auch die Klone 5 bis 8 des BAC „Tyr iOnkogene“ mit dem Enzym BamHI verdaut und die so entstandenen DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Wie in Abbildung 3.13 A zu sehen, entsteht im Falle des Wildtyp-BAC unter anderem eine 24,5 kb Bande, an welche beide Sonden binden können. Im rekombinierten BAC „Tyr iOnkogene“ dagegen sind weitere BamHI Schnittstellen enthalten, was dazu führt, dass die 5' Sonde an ein 4,5 kb Fragment und die 3' Sonde an ein 10,9 kb Fragment binden kann.

Wie erwartet, zeigt der Southern Blot (siehe Abbildung 3.13 B) des Wildtyp-BAC mit beiden Sonden das 24,5 kb Fragment. Die 5' Sonde erzeugt bei den BAC-Klonen 5 bis 8 ein Signal knapp unterhalb der 5 kb Markerbande, die 3' Sonde ein Signal knapp überhalb der 10 kb Markerbande. Dies legt nahe, dass es sich bei den Klonen 5 bis 8 um erfolgreich rekombinierte BACs „Tyr iOnkogene“ handelt.



**Abbildung 3.13: Southern Blot Analyse der durch Homologe Rekombination (Red/ET-Klonierung) gewonnenen BAC-Klone**

A) Schematische Darstellung eines Ausschnittes sowohl des Wildtyp BAC, als auch des BAC „Tyr iOnkogene“ mit eingezeichneten BamHI Schnittstellen und Bindungsstellen der Sonden für den Southern Blot. Die 5' Sonde bindet im Wildtyp BAC dasselbe 24,5 kb Fragment, wie die 3' Sonde. Im BAC „Tyr iOnkogene“ dagegen, bindet die 5' Sonde ein 4,5 kb Fragment und die 3' Sonde ein 10,9 kb Fragment. B) Das Wildtyp BAC und das BAC „Tyr iOnkogene“ wurden mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und in einem 0,7 %igen Agarosegel nach der Größe der DNA Fragmente aufgetrennt. Das Wildtyp BAC zeigte im Southern Blot mit beiden Sonden die erwartete 24,5 kb Bande. Die analysierten Klone 5 bis 8 zeigten mit beiden Sonden, die für das BAC „Tyr iOnkogene“ erwarteten Banden (5' Sonde: 4,5 kb Bande, 3' Sonde: 10,9 kb Bande).

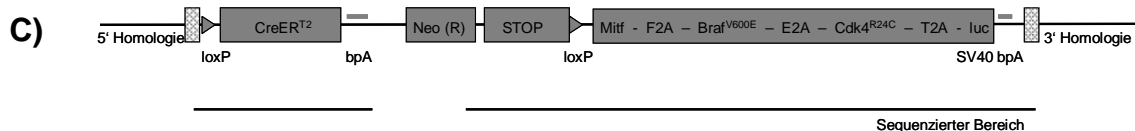
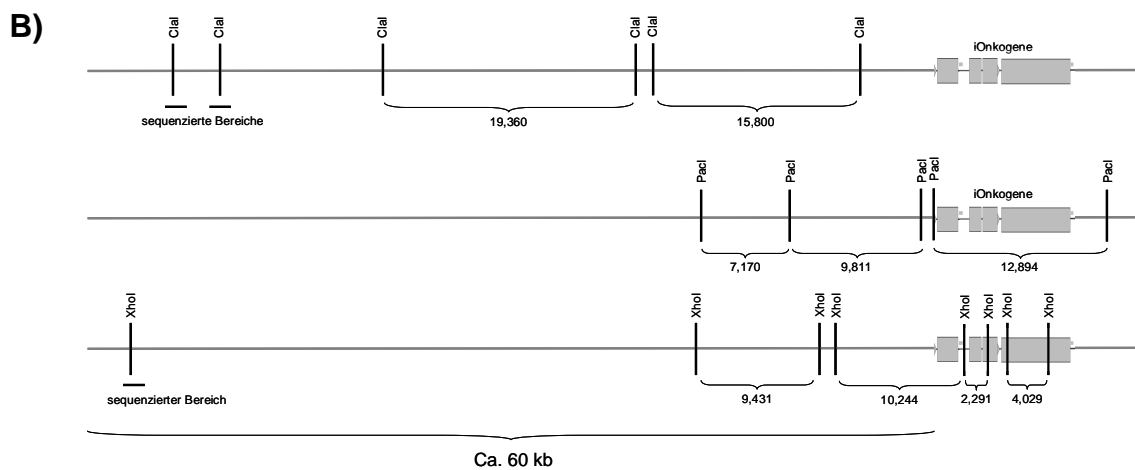
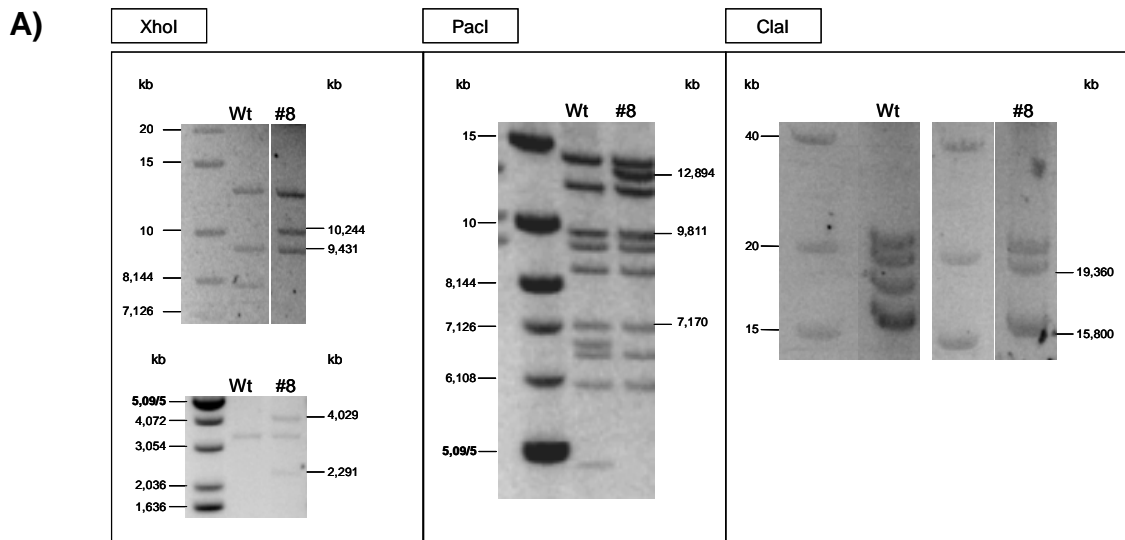
### 3.3.4 Analyse des BAC-Klons „Tyr iOnkogene“ #8 durch Restriktionsverdau und Sequenzierung

Um weitere Hinweise zu bekommen, ob die gewonnenen Klone tatsächlich das gewünschte BAC „Tyr iOnkogene“ enthielten, wurde die BAC-DNA des Klons #8 exemplarisch weiterer Analysen unterzogen. Durch Restriktionsverdau sollte vor allem die Region, welche sich „upstream“ von „iOnkogene“ befindet, charakterisiert werden, da diese den Tyrosinasepromoter enthält. Ein zellspezifisches, verstärkendes, regulatorisches Element wurde in einem Bereich ca. 12 kb „upstream“ des Tyrosinasegens identifiziert (Ganss et al., 1994). Großteile der Sequenz „iOnkogene“ sollten durch Sequenzierung bestätigt werden.

Zur Analyse der Tyrosinasepromoterregion wurde die BAC-DNA des Klons #8 und des Wildtyp Klons mit den Enzymen XhoI, PaeI oder ClaI in Einzelreaktionen geschnitten und die so entstandenen DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt (siehe Abbildung 3.14 A). Fragmente, welche sich in der zu analysierenden Region befinden, sind in Abbildung 3.14 A gekennzeichnet und außerdem in einer schematischen Darstellung eines Ausschnitts des BAC „Tyr iOnkogene“ der entsprechenden Position zugeordnet (siehe Abbildung 3.14 B). Aufgrund von Unstimmigkeiten bei der Analyse der geschnittenen BAC-DNA im Bereich 50 bis 60 kb „upstream“ von iOnkogene, wurden dort drei Bereiche sequenziert, in denen sich ClaI- bzw. eine XhoI-Schnittstelle befinden (siehe Abbildung 3.14 B). Diese Sequenzierungen bestätigten die erwartete Sequenz. Auf diese Weise konnte also ein Bereich von ca. 60 kb „upstream“ von „iOnkogene“ charakterisiert werden.

Auf Unterschiede im Bandenmuster zwischen der verdauten DNA des Wildtyp-BAC und des BAC „Tyr iOnkogene“ wurde in den Abbildungen 3.14 A und B nur vereinzelt eingegangen, da der Bereich „iOnkogene“ durch Sequenzierung analysiert wurde. Ein Verdau der BAC-DNA mit XhoI zeigt beispielsweise die Banden 10244 bp, 4029 bp und 2291 bp nur im Falle des BAC „Tyr iOnkogene“; bei einem Verdau mit PaeI ist es die Bande 12894 bp, welche nur bei der Probe „Tyr iOnkogene“ auftaucht (siehe Abbildungen 3.14 A und B).

In Abbildung 3.14 C sind die Bereiche gekennzeichnet, welche innerhalb der Sequenz „iOnkogene“ durch Sequenzierung (GATC Biotech AG) bestätigt wurden.

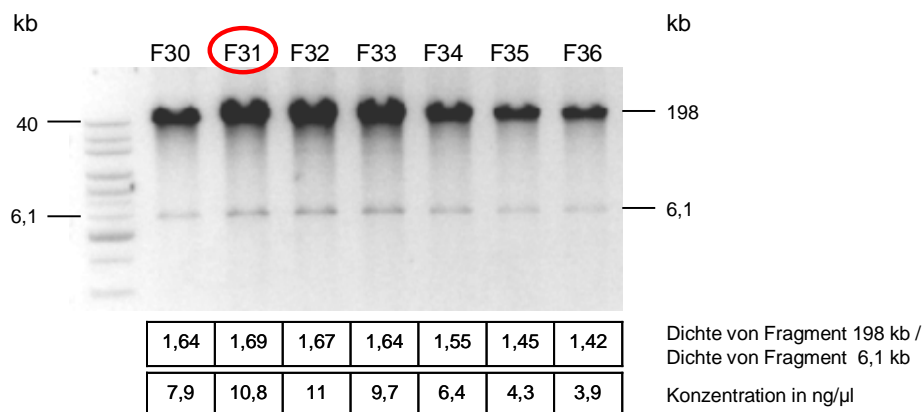


**Abbildung 3.14: Analyse des BAC „Tyr iOnkogene“, Klon #8 durch Restriktionsverdau und Sequenzierung**

A) Wildtyp- und „Tyr iOnkogene“ BAC-DNA wurden in Einzelreaktionen mit den Enzymen XhoI, PaeI und ClaI verdaut. Die so erzeugten DNA-Fragmente wurden in einem 0,7 %igen Agarosegel nach der Größe aufgetrennt. B) Ausschnitt („iOnkogene“ und ein ca. 60 kb Bereich „upstream“ davon) aus der schematischen Darstellung des BAC „Tyr iOnkogene“. Dargestellt wird die jeweilige Position der durch Restriktionsverdau erzeugten Fragmente, welche in A) durch ihre Größe gekennzeichnet sind. C) Darstellung der Bereiche im BAC „Tyr iOnkogene“ welche durch Sequenzierung bestätigt wurden.

### 3.3.5 Linearisierung und Sepharose-Säulen-Chromatographie des BAC „Tyr iOnkogene“ für die Pronukleus-Injektion

Um in die genomische DNA der murinen Oocyte zu integrieren, muß das BAC in linearer Form vorliegen. Um zu verhindern, dass das BAC „Tyr iOnkogene“ an einer Stelle bricht, welche die gewünschte Sequenz zerstören würde, wurde es mit dem Enzym FspAI verdaut. Da dieses Enzym zweimal darin schneidet, konnte außerdem ein Teil des prokaryotischen Vektors entfernt werden. Bei dem Verdau entstanden ein 6,1 kb - und ein 198 kb -Fragment, wobei letzteres die Sequenz „iOnkogene“ sowie den Tyrosinasepromoter enthält. Anschließend wurde die verdaute BAC-DNA durch Sepharose-Säulen-Chromatographie von Proteinen, chromosomaler DNA etc. gereinigt. Die DNA-Konzentration der gesammelten Fraktionen wurde photometrisch bestimmt und die Qualität der DNA im Agarosegel analysiert.



#### Abbildung 3.15: Analyse der durch Sepharose-Säulen-Chromatographie gewonnenen Fraktionen des BAC „Tyr iOnkogene“

BAC-DNA „Tyr iOnkogene“ wurde mit dem Restriktionsenzym FspAI verdaut und durch Sepharose-Säulen-Chromatographie gereinigt. Die DNA-Konzentration der gewonnenen Fraktionen (F) wurde photometrisch bestimmt. Anschließend wurden die Fraktionen mit DNA-Gehalt in einem 0,6 %igen Agarosegel analysiert. Die Dichte der Banden (in Intensität/mm<sup>2</sup>) wurde mittels „Quantity One 4.4.0“ ermittelt. Fraktion (F) 31 wurde für die Pronukleus-Injektion ausgewählt.

Die Laufgeschwindigkeit großer DNA-Fragmente (ab ca. 50 kb) ist bei der herkömmlichen Gelelektrophorese nicht mehr abhängig von der Größe der Fragmente. Aus diesem Grund erscheint die 198 kb Bande auf Höhe der 40 kb Markerbande (siehe Abbildung 3.15).

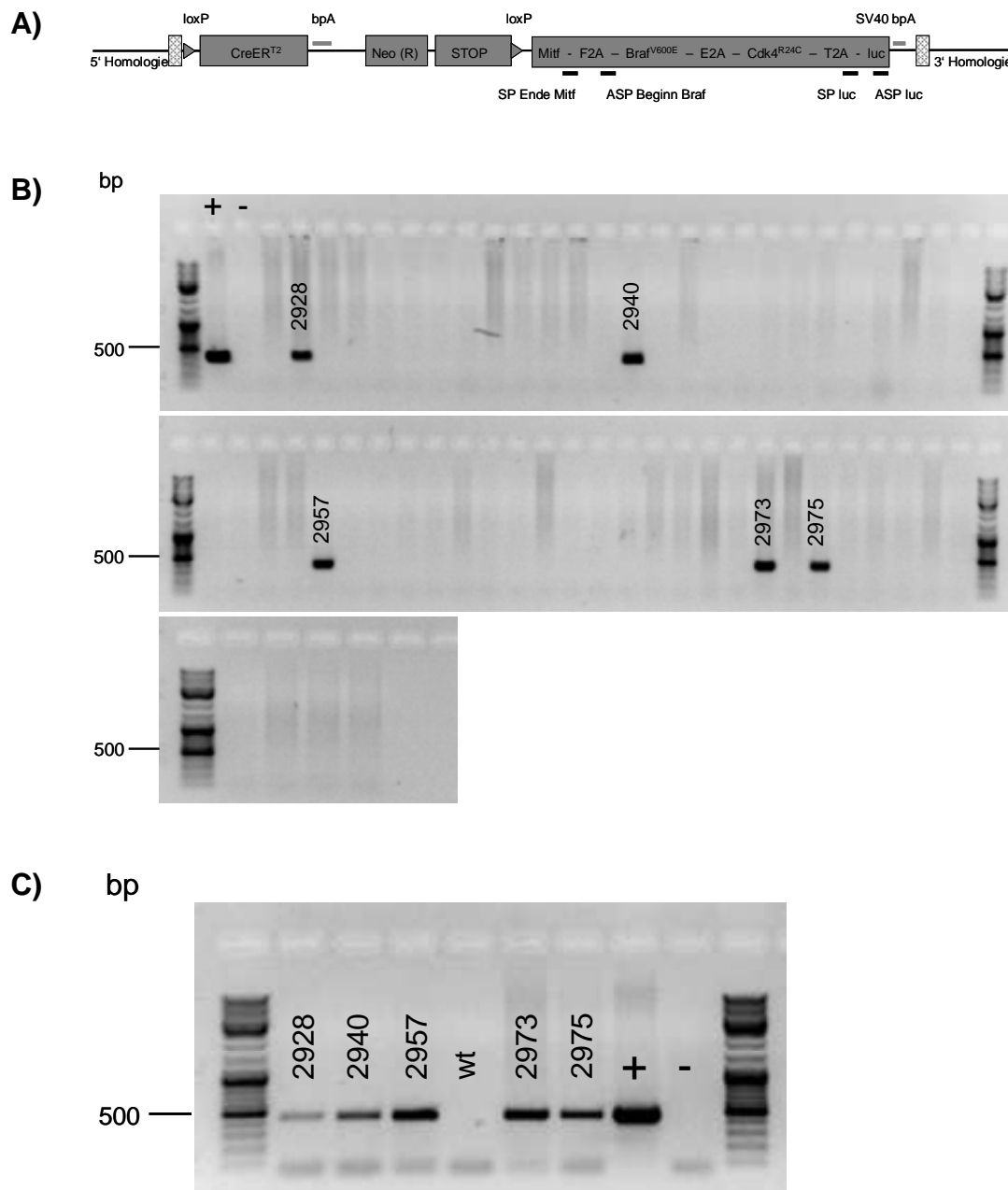
Da durch die Sepharose-Säulen-Chromatographie eine Trennung der BAC-Fragmente nicht möglich war, wurde für die Pronukleus-Injektion eine Fraktion mit einem relativ hohen Anteil der gewünschten 198 kb Bande ausgewählt. Hierbei fiel die Wahl auf Fraktion (F) 31 (siehe Abbildung 3.15), welche für die Injektion auf 2 ng/µl verdünnt wurde. Schließlich wurde die DNA in den Vorkern befruchteter C57BL/6 Oozyten injiziert und pseudoschwangeren Weibchen eingesetzt.

### **3.3.6 Identifikation von 5 Founder-Tieren mittels Typisierungs-PCR**

Die Identifikation von Founder-Tieren, bei welchen die injizierte BAC-DNA im Genom integriert war, erfolgte mittels PCR. Dazu wurde DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien verwendet.

Die erste PCR wurde mit den Primern „SP Ende Mitt“ und „ASP Beginn Braf“ durchgeführt (siehe Abbildung 3.16 A), welche nur in Anwesenheit der eingebrachten DNA, nicht aber mit Wildtyp-DNA ein Amplifikat ermöglichen. Wie Abbildung 3.16 B zeigt, führten 5 der 58 DNA-Proben zu einem PCR Produkt. Diese 5 Proben entstammten den Tieren # 2928, # 2940, # 2957, # 2973 und # 2975.

Zur Bestätigung der 5 positiv getesteten DNA-Proben wurden aus der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) neue Schwanzspitzen der positiv getesteten Tiere angefordert, daraus DNA isoliert und eine weitere PCR mit den Primern „SP luc“ und „ASP luc“ durchgeführt (siehe Abbildungen 3.16 A und C).



### Abbildung 3.16: Identifikation von 5 Founder-Tieren

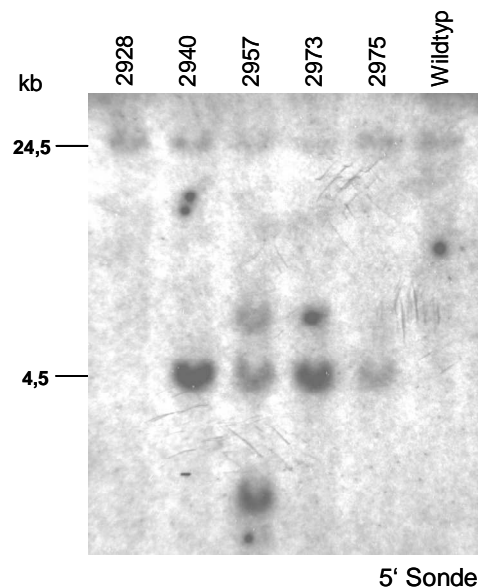
A) Gezeigt ist ein Ausschnitt des eingebrachten Konstrukts und die Bindungsstellen, der für die Typisierungs-PCR verwendeten Primer. Die Primer „SP Ende Mitf“ und „ASP Beginn Braf“ ergeben ein Produkt von 388 bp, die Primer „SP luc“ und „ASP luc“ ein Produkt von 457 bp. B) DNA-Proben der 58 Nachkommen der BAC-Injektion wurden durch PCR mit den Primern „SP Ende Mitf“ und „ASP Beginn Braf“ analysiert. C) Neu hergestellte DNA-Proben der in B) positiv getesteten Tiere und eines Kontrolltiers wurden mittels PCR mit den Primern „SP luc“ und „ASP luc“ analysiert. B) und C) Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und photographisch dokumentiert. Wt: Wildtyp, +: BAC DNA „Tyr iOnkogene“, -: DNA aus der Schwanzspitze einer C57Bl/6 Maus.

### 3.3.7 Drei Founder-Tiere konnten mittels Southern Blot bestätigt werden

Die Southern Blot Analyse wurde ebenfalls mit DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien durchgeführt. Nach BamHI-Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese sollten die gewünschten DNA-Fragmente mit Hilfe der bereits zur Identifikation der BAC-Klone „Tyr iOnkogene“ verwendeten Sonden 5' und 3' (siehe Abbildung 3.13) detektiert werden.

Wie in Abbildung 3.17 zu erkennen, konnte in allen DNA-Proben mittels der 5' Sonde das 24,4 kb Fragment detektiert werden, welches beim BamHI-Verdau des ursprünglichen Tyrosinaselokus entsteht. Das 4,5 kb Fragment, welches durch die Insertion des Konstrukts entsteht, fehlte bei Founder #2928. Im Falle von Founder #2957 waren zwei zusätzliche Fragmente zu erkennen.

Bei Verwendung der 3' Sonde war lediglich das Fragment des als Positivkontrolle verwendeten BAC „Tyr iOnkogene“ detektierbar (Daten nicht gezeigt). Vermutlich sind die Bedingungen für die Hybridisierung der 3' Sonde bei Verwendung genomischer DNA zu stringent.



**Abbildung 3.17: Southern Blot-Analyse der 5, mittels PCR identifizierten, Founder-Tiere**

Genomische DNA der Founder-Tiere wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und in einem 0,7 %igen Agarosegel nach der Größe der DNA-Fragmente aufgetrennt. Beim Verdau des ursprünglichen Tyrosinaselokus entsteht ein 24,5 kb Fragment, beim Verdau des veränderten Locus Tyr iOnkogene ein 4,5 kb Fragment, welche mit der 5' Sonde detektiert werden können. Wie erwartet, ist in allen Proben das 24.5 kb Fragment detektierbar. Das 4,5 kb Fragment fehlt bei Founder #2928 und Founder #2957 weist 2 zusätzliche Fragmente auf.



Trotz der Unstimmigkeiten bei der Southern Blot Analyse von Founder #2928 und #2957 wurden aus allen 5 Founder-Tieren durch Kreuzung mit C57BL/6 Tieren Linien erzeugt:

Founder # 2928 → Linie A

Founder # 2940 → Linie D

Founder # 2957 → Linie B

Founder # 2973 → Linie E

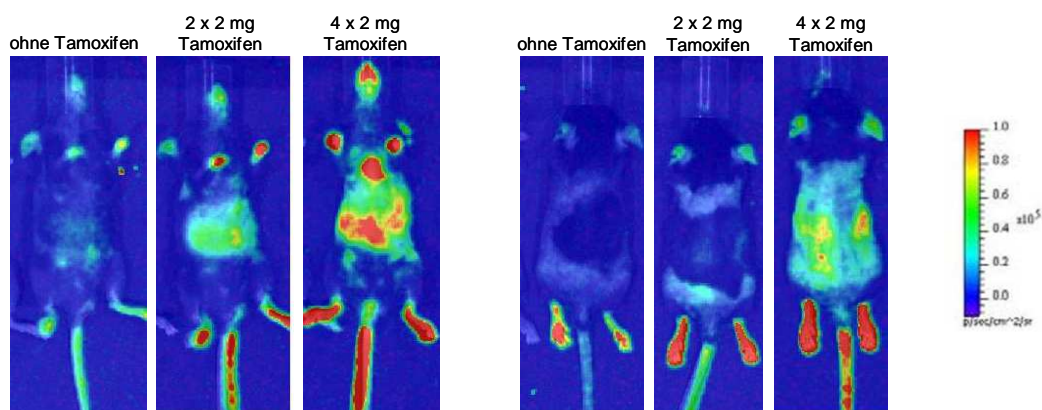
Founder # 2975 → Linie C

Der generierte Stamm erhielt die Bezeichnung B6 tg Tyr iOnkogene, Linien A bis E (TyriOn-A bis -E).

### 3.4 Analyse des generierten Mausstamms B6 tg Tyr iOnkogene (TyriOn)

#### 3.4.1 Tamoxifen-induzierte Verstärkung der Luziferase-Aktivität war nur in Tieren der Linie D zu beobachten

Zunächst wurden die Nachkommen der 1. Generation aller Linien dahingehend untersucht, ob sie durch Tamoxifen induzierbare Luziferase-Aktivität aufwiesen. Luziferase diente hierbei als Reporter für die Expression der eingebrachten Onkogene. Dazu wurde ihnen intraperitoneal Tamoxifen verabreicht und die Luziferase-Aktivität *in vivo* mit Hilfe eines Biolumineszenz-Messgerätes analysiert. Einen Einfluss von Tamoxifen auf die Luziferase-Aktivität konnte nur bei Linie D beobachtet werden. Hier war eine geringradige Hintergrundaktivität der Luziferase in Abwesenheit von Tamoxifen zu erkennen, was die Vermutung nahe legte, dass das Konstrukt auch minimal ohne Induktion aktiv ist. Jedoch wurde die Luziferase-Aktivität durch Zugabe von Tamoxifen deutlich verstärkt (siehe Abbildung 3.18).



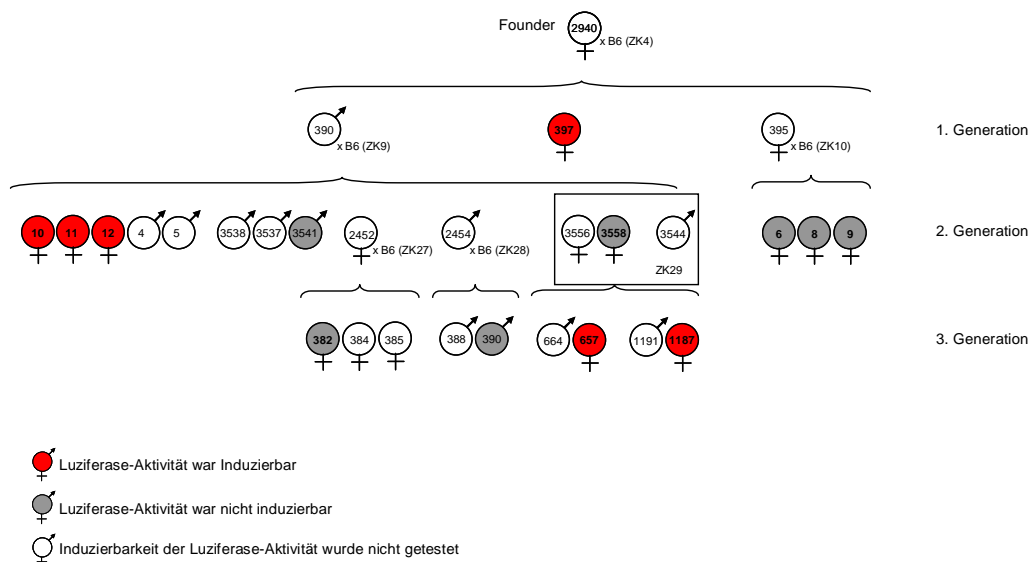
**Abbildung 3.18: Tamoxifen-induzierte Verstärkung der Luziferase-Aktivität in TyriOn-D #397 aus der 1. Generation**

Tamoxifen wurde systemisch durch intraperitoneale (i.p.) Injektionen im Abstand von 2 Tagen verabreicht. Die Luziferase-Aktivität wurde 2 Tage nach der letzten Tamoxifeninjektion durch *in vivo* Biolumineszenz gemessen. Dafür wurden die Tiere am Vortag rasiert. Für die Messung wurde den Tieren 3 mg Luziferin i.p. injiziert und nach einer Inkubationszeit von 10 Min wurde die Luziferase-Aktivität mit einer Aufnahmezeit von 60 Sek gemessen.

Die übrigen Linien A, B, C und E boten letztendlich sowohl ohne als auch mit Tamoxifen-Behandlung keine Luziferase-Aktivität oder deren Luziferase-Aktivität war durch Tamoxifen nicht verstärkbar.

### 3.4.2 Die Tamoxifen-induzierte Verstärkung der Luziferase-Aktivität ging in den Folgegenerationen der Linie D teilweise verloren

In den folgenden Generationen der Linie D zeigte sich, dass die Induzierbarkeit offenbar teilweise verloren ging, da es nur noch in einigen Tieren möglich war, die Luziferase-Aktivität durch Tamoxifen zu verstärken (siehe Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19: Stammbaum von TyriOn-D**

Gezeigt sind Nachkommen des Founders #2940 (Linie D), welche bezüglich der Induzierbarkeit der Luziferase-Aktivität überprüft wurden. Hier gezeigte Tiere, die nicht getestet wurden, dienten entweder als Negativkontrollen im Induktionsexperiment oder wurden für weitere Zuchten verwendet. Das Zuchttier #3558 wurde in der Zucht eingesetzt, da es erst nach Entpaarung getestet wurde.

Vermutlich integrierten funktionelle und nicht funktionelle Varianten des Konstrukts an mehreren Stellen im Genom und verteilten sich in den folgenden Generationen auf die Nachkommen. Aufgrund dieser Vermutung und des hohen Anteils nicht-induzierbarer Tiere wurden in der weiteren Zucht auch solche Tiere verwendet, denen bereits Tamoxifen verabreicht wurde und die induzierbare Luziferase-Aktivität gezeigt hatten. Aufgrund der Melanozyten-spezifischen Expression der induzierbaren Rekombinase CreER<sup>T2</sup>, kann davon ausgegangen werden, dass sich die DNA ihrer Keimzellen in nicht-rekombiniertem Zustand befindet.

### **3.4.3 Das Genom von Tieren der Linie D enthält den vollständigen Sequenzteil „iOnkogene“**

Aufgrund der instabilen Befunde innerhalb der Linie D wurde im Rahmen der Funktionsanalyse des Konstrukts zunächst seine Vollständigkeit mit Hilfe verschiedener PCR-Analysen überprüft. Zusätzlich zur bereits genannten Typisierungs-PCR (siehe Abbildung 3.16 B), wurden zwei weitere PCRs durchgeführt. Dabei konnte sowohl ein PCR-Produkt von 420 bp, welches die erste loxP-Stelle am 5' Ende enthält, als auch ein weiteres Produkt von 457 bp, welches einen Teil des Gens für die Luziferase am 3' Ende enthält, detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies war jedoch nicht nur in Tieren der Fall, deren Luziferase-Aktivität durch Tamoxifen induzierbar war, sondern auch in nicht-induzierbaren Tieren der Linie D. Folglich legen diese Ergebnisse zwar nahe, dass die transgene Sequenz „iOnkogene“ vollständig ins Genom der TyriOn-Mäuse integriert ist, erklären den teilweisen Verlust der Induzierbarkeit jedoch nicht.

### **3.4.4 Die loxP-Stellen des transgenen Konstrukts sind funktionell**

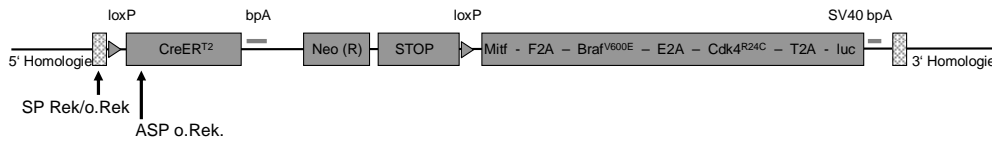
Im weiteren Verlauf der Funktionsanalyse des Konstrukts sollte durch PCR-Analysen überprüft werden, ob das Konstrukt in der Haut von Tamoxifen-behandelten TyriOn-D Tieren in rekombinierter Form vorliegt bzw. nachweisbar ist. Die Bindungsstellen der dafür verwendeten Primer sind in Abbildung 3.20 A dargestellt.

Da dies nicht der Fall war (siehe Abbildung 3.20 B) und die Möglichkeit bestand, dass die Tamoxifen-induzierte Cre-Aktivität zu schwach bzw. der Anteil Cre-exprimierender Zellen in der Haut zu gering war, wurden als Positivkontrolle für die maximal mögliche Rekombination TyriOn-D Mäuse mit sog. Cre deleter (Cre del) Tieren verkreuzt, die eine konstitutiv aktive Rekombinase Cre ubiquitär exprimieren.

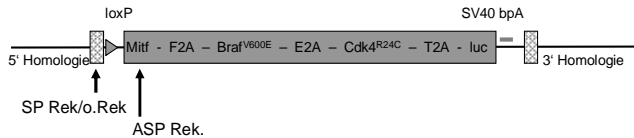
Wie in Abbildung 3.20 B dargestellt, enthielten DNA-Proben von TyriOn-D / Cre del Tieren das Konstrukt in rekombinierter Form, was auf die Funktionalität der loxP-Stellen schließen lässt.

A)

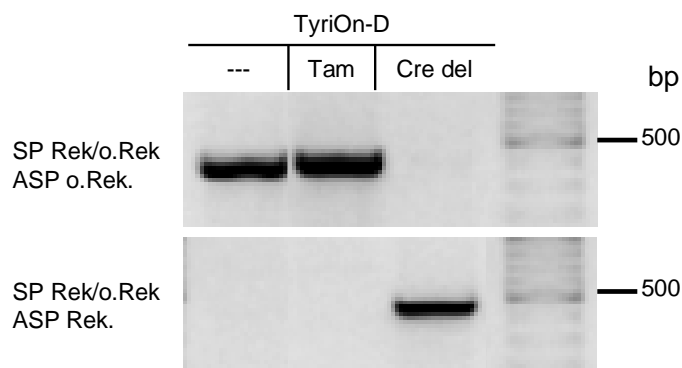
nicht rekombiniertes Konstrukt:



rekombiniertes Konstrukt:



B)



**Abbildung 3.20: Rekombiniertes TyriOn-Konstrukt in TyriOn-D / Cre del Tieren**

In der PCR wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien von unbehandelten, Tamoxifen (Tam; 3 x 2 mg) -behandelten TyriOn-D und von TyriOn-D / Cre del Tieren verwendet. Das nicht-rekombinierte Konstrukt wurde mit den Primern SP Rek/o.Rek und ASP o.Rek, das rekombinierte Konstrukt mit den Primern SP Rek/o.Rek und ASP Rek. detektiert. Das Produkt, welches mit den Primern SP Rek/o.Rek und ASP Rek. mit dem nicht-rekombinierten Konstrukt denkbar wäre, wird vermutlich aufgrund dessen Länge nicht amplifiziert.

### **3.4.5 Weder Tamoxifen behandelte TyriOn-D noch TyriOn-D / Cre deleter Tiere entwickeln spontan Melanome**

TyriOn-D Tiere, denen Tamoxifen verabreicht wurde, wurden bislang für einen Zeitraum von 15 Monaten beobachtet. In dieser Zeit entwickelten die Tiere noch keine spontanen Melanome. Als Kontrolle für eine maximale Expression der eingebrachten Onkogene wurden zusätzlich TyriOn-D / Cre deleter Tiere bezüglich der spontanen Melanomentwicklung beobachtet. Jedoch war auch bei diesen Tieren in einem bisherigen Zeitraum von 12 Monaten keine Melanomentwicklung zu erkennen.

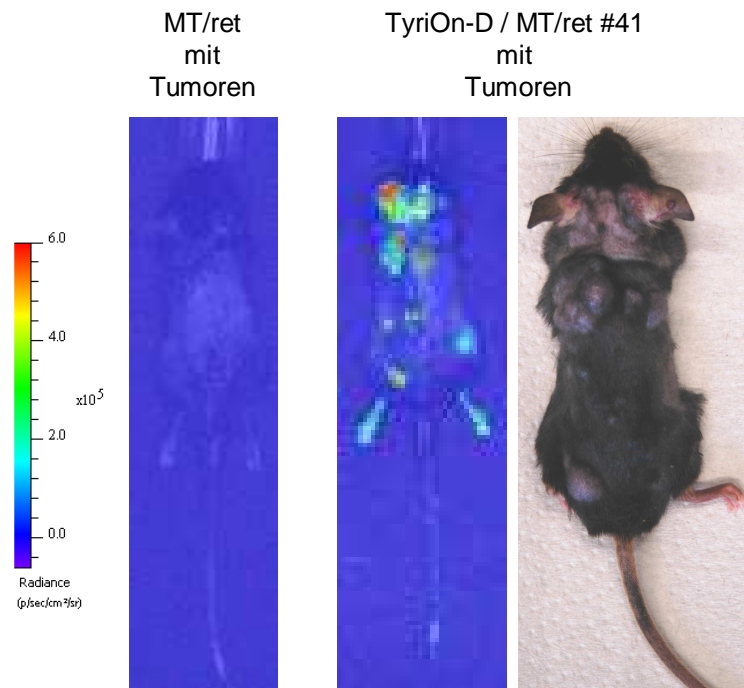
### **3.4.6 Melanome von TyriOn-D / MT/ret Tieren zeigen Luziferase-Aktivität**

Selbst wenn genetische Veränderungen nicht bzw. kaum in der Lage sind, die spontane Entstehung von Tumoren zu bewirken, können sie dennoch deren Entwicklung begünstigen. Eine Kombination solcher genetischer Veränderungen würde dann zur Entwicklung bzw. zu einer stärkeren Tumorbildung bezüglich Latenzzeit und Häufigkeit führen (siehe Einleitung 1.5).

Entsprechend diesen Überlegungen wurden TyriOn-D Tiere mit MT/ret Mäusen gekreuzt. Entgegen den Literaturangaben (Kato et al., 1998) entwickeln die Tiere in bis zu 25 % der Fälle bereits im Alter von ca. 3 Wochen spontan Melanome. Die übrigen, zunächst gesunden Tiere, zeigen in 5-10 % der Fälle im Laufe von mehreren Monaten spontane Melanombildung (Information von Viktor Umansky).

Bisher stehen jedoch noch nicht genügend Tiere und ausreichend Zeit zur Verfügung, um über die kooperativen Effekte der genetischen Veränderungen der beiden Mausstämme bezüglich der Melanomentwicklung eine Aussage machen zu können.

Allerdings konnten erste TyriOn-D / MT/ret Tiere, die Melanome entwickelten analysiert werden. Wie in Abbildung 3.21 dargestellt, zeigen vor allem die Tumore dieser Tiere Luziferase-Aktivität.

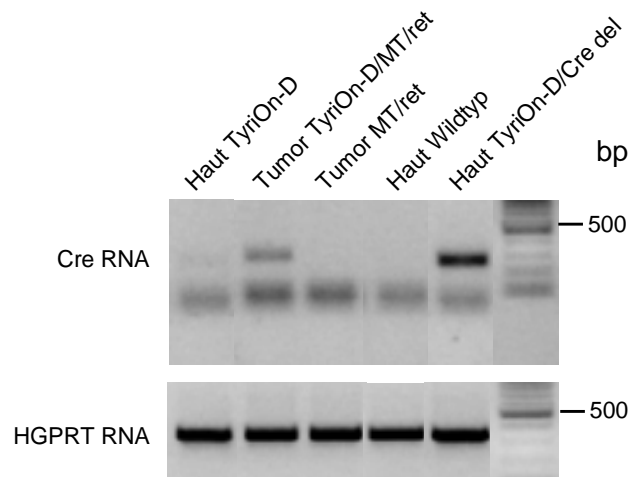


**Abbildung 3.21: Luziferase-Aktivität in Tumoren von TyriOn-D / MT/ret Mäusen**

Die Luziferase-Aktivität von tumortragenden MT/ret oder TyriOn-D / MT/ret Mäusen wurde durch *in vivo* Biolumineszenz gemessen. Dafür wurde den Tieren 3 mg Luziferin i.p. injiziert und nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Luziferase-Aktivität mit einer Aufnahmezeit von 60 sek gemessen. Das im Foto abgebildete Tier zeigt das typische Bild früh auftretender Tumoren von MT/ret und TyriOn-D / MT/ret Mäusen.

### 3.4.7 Melanome von TyriOn-D / MT/ret Tieren exprimieren CreER<sup>T2</sup> RNA

Im Rahmen der Funktionsanalyse des Konstrukts wurde zunächst versucht, die Expression von CreER<sup>T2</sup> RNA in der Haut von TyriOn-D Tieren mittels RT-PCR zu detektieren. Dies war jedoch nicht bzw. nur sehr schwach möglich. In isolierten Tumoren aus TyriOn-D / MT/ret Mäusen dagegen konnte die Expression der induzierbaren Rekombinase eindeutig gezeigt werden (siehe Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22: CreER<sup>T2</sup> RNA in Tumoren von TyriOn-D / MT/ret Mäusen**

Rasierte Haut oder Tumorgewebe wurde in Trizol aufgenommen, mit Hilfe eines Polytron homogenisiert und die RNA isoliert. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden wurde die RNA vor der reversen Transkription (RT) einer DNase-Behandlung unterzogen. Die so generierte cDNA wurde in der dargestellten Cre (CreER<sup>T2</sup>) und HGPRT RT-PCR verwendet.

Die Analyse von Linie D des generierten Mausstammes TyriOn zeigte, dass das transgene Konstrukt zwar dem Prinzip nach funktionell zu sein scheint, jedoch für sich alleine genommen (bisher) keine Tumoren auslöst. Durch die Verkreuzung mit dem Stamm MT/ret konnte jedoch ein neuer Mausstamm generiert werden, der Luziferase-positive (d. h. durch *in vivo* Imaging detektierbare) Tumoren entwickelt. Einerseits erleichtern diese Melanome die weitere Analyse hinsichtlich der Funktionalität des Konstrukts, andererseits bieten diese Tiere ein Modell zur Untersuchung der Vakzinierungseffizienz mittels der in unserem Labor etablierten transkutanen Immunisierungstechnik (TCI). Als Modell-Tumorantigen kann hierbei Luziferase dienen, von welchem das immundominante Peptid bekannt ist (Limberis et al., 2009).



## 4 Diskussion

### 4.1 Funktionalität des BAC-Konstrukts in TyriOn Tieren der Linie D

Die *in vivo* Biolumineszenz-Messung von Linie D des BAC-transgenen Mausstammes TyriOn zeigte in der 1. Generation in Abwesenheit von Tamoxifen einen gewissen Grad an basaler Luziferase-Aktivität (siehe Abbildung 3.18). Bekanntermaßen zeigen einige Mausmodelle, bei denen die Expression der firefly Luziferase von loxP-Rekombination abhängig ist bzw. sein sollte, bereits im nicht-rekombinierten Zustand Luziferase-Aktivität aufgrund „durchlässiger“ („leaky“) Expression (Buschow et al., 2010; Liao et al., 2007; Sandhu et al., 2011). Ursachen hierfür können sowohl in den loxP-flankierten, isolierenden Sequenzen (Buschow et al., 2010), als auch in der induzierbaren Rekombinase liegen (Sandhu et al., 2011). Beispielsweise beeinflusst das Expressionslevel von CreER<sup>T2</sup> die Aktivität der Rekombinase in Abwesenheit von Tamoxifen (Sandhu et al., 2011; Imayoshi et al., 2006). Im TyriOn Modell wäre theoretisch eine Kombination aus beidem, undichter isolierender Sequenz und Aktivität der induzierbaren Rekombinase in Abwesenheit von Tamoxifen, möglich. Die Ursachen der Hintergrund-Luziferase-Aktivität wurden jedoch nicht untersucht. Trotz der Tamoxifen-unabhängigen basalen Luziferase-Aktivität konnte das Signal durch die Gabe von Tamoxifen deutlich gesteigert werden (siehe Abbildung 3.18), was prinzipiell für die Funktionalität des BAC-Konstrukts in den transgenen TyriOn Tieren der Linie D spricht.

Um die Funktionalität des BAC-Konstrukts im Detail zu analysieren, sollte zunächst die Integrität der Sequenz „iOnkogene“ innerhalb des BAC-Transgens mittels PCR analysiert werden. In der genomischen DNA aller untersuchten Tiere konnten die in 3.4.3 genannten 3 Sequenzbereiche mittels PCR nachgewiesen werden, was die Vollständigkeit der Sequenz „iOnkogene“ nahelegt.

In einem weiteren Schritt sollte die Expression der Tamoxifen-induzierbaren Rekombinase CreER<sup>T2</sup> in der Haut untersucht werden. Ein Nachweis von CreER<sup>T2</sup> RNA in der Haut war allerdings nur in einigen TyriOn Tieren möglich. Außerdem zeigten diese Proben nur ein sehr schwaches Signal (siehe Abbildung 3.22). Trotz der relativ geringen Anzahl von Melanozyten in der Haut sollte dort die Detektion von RNA, die unter der Kontrolle des Tyrosinasepromoters exprimiert wird, prinzipiell

möglich sein. So konnte beispielsweise in einem transgenen Mausstamm, bei der die induzierbare Rekombinase CreER<sup>T2</sup> in Abhängigkeit eines Tyrosinasepromoters, bestehend aus Promoter und dem regulatorischen Element DRE, in der Haut nachgewiesen werden. Allerdings scheint auch bei diesem Modell der Gehalt an CreER<sup>T2</sup> RNA in der Haut sehr gering zu sein (Yajima et al., 2006). Ein anderes murines transgenes Modell beinhaltet den Tyrosinasepromoter in ähnlicher Form wie unser BAC-Transgen. Es wurde dabei ein künstliches Chromosom von Hefen verwendet, das als YAC (yeast artificial chromosome) bezeichnet wird und hier den gesamten Tyrosinase-Lokus enthält. In der Haut dieser Tiere konnte Tyrosinase RNA des YAC-transgenen Allels deutlich nachgewiesen werden (Montoliu et al., 1996). Dieses Transgen enthält allerdings das natürlich vorkommende Gen einschließlich aller Introns. Bekanntermaßen können Introns regulatorische Sequenzen enthalten, welche die Transkription verstärken (Ristevski, 2005; McKnight et al., 1995; Liska et al., 1994).

Um nun die Expression von CreER<sup>T2</sup> im TyriOn Modell weiter zu analysieren, wurden Tumoren aus TyriOn-D / MT/ret Tieren bezüglich CreER<sup>T2</sup> RNA untersucht. Da in diesen Proben nun eindeutig CreER<sup>T2</sup> RNA nachweisbar war (siehe Abbildung 3.22), kann davon ausgegangen werden, dass CreER<sup>T2</sup> in der Haut von TyriOn Tieren exprimiert wird.

Die Behandlung von TyriOn Tieren mit Tamoxifen sollte die Aktivierung von CreER<sup>T2</sup> und damit die Rekombination des BAC-Konstrukts an den loxP-Stellen zur Folge haben. Um das Konstrukt in rekombinierter Form nachzuweisen, wurde DNA aus Hautproben Tamoxifen-behandelter TyriOn Tiere analysiert. Das BAC-Konstrukt konnte dort jedoch lediglich in der ursprünglichen, nicht-rekombinierten Form nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.20 B). Um festzustellen, ob das Konstrukt prinzipiell rekombinierbar war, wurden TyriOn-D Tiere mit Cre deleter Tieren verkreuzt. In TyriOn-D / Cre del Tieren lag das BAC-Transgen nun ausschließlich in rekombinierter Form vor (siehe Abbildung 3.20 B), was für die Funktionalität der loxP-Stellen spricht. Gründe für den fehlenden Nachweis rekombinierter DNA in der Haut Tamoxifen-behandelter TyriOn-D Tiere könnten in der relativ geringen Melanozytenzahl in der Haut oder aber in einer Fehlfunktion von CreER<sup>T2</sup> liegen. Da die Luziferase-Aktivität jedoch in einigen Tieren durch Tamoxifen verstärkbar war

(siehe Abbildungen 3.18 und 3.19), ist eine prinzipielle Fehlfunktion von CreER<sup>T2</sup> vermutlich auszuschließen.

Zusammenfassend konnte bislang also gezeigt werden, dass die Sequenz „Onkogene“ vollständig im Genom von TyriOn-D Tieren vorhanden ist, dass die induzierbare Rekombinase CreER<sup>T2</sup> exprimiert wird und dass die loxP-Stellen des BAC-Konstrukts funktionell sind. Des Weiteren war es möglich die Luziferase-Aktivität in Tieren der Linie D durch die Behandlung mit Tamoxifen zu verstärken. Die bis dahin erzielten Ergebnisse sprechen für die Funktionalität des BAC-Konstrukts. In einem letzten Schritt muss nun jedoch die Expression der Onkogene in Tamoxifen-behandelten Tieren überprüft werden.

#### **4.2 Teilweiser Verlust der Tamoxifen-induzierbaren Verstärkung der Luziferase-Aktivität in TyriOn-D**

Wie bereits erwähnt, konnte in TyriOn-D Tieren der ersten Generation die Hintergrund-Aktivität der Luziferase durch Tamoxifen-Injektionen gesteigert werden (siehe Abbildung 3.18). In den Folgegenerationen ging diese Induzierbarkeit jedoch teilweise verloren (siehe Abbildung 3.19). Dabei spielte weder Alter noch Geschlecht der Tiere eine Rolle und konnten als mögliche Ursachen ausgeschlossen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Möglicherweise integrierten funktionelle und nicht-funktionelle Varianten des Transgens an unterschiedlichen Stellen im Genom von Founder D, welche sich in den folgenden Generationen auf die Nachkommen verteilt hatten.

Die Methode der pronukleären Injektion, die zur Generierung transgener Tiere verwendet wird, führt meist zur Integration des Transgens an nur einer Stelle im Genom. Es existieren allerdings auch Transgene mit mehr als nur einer Integrationsstelle (Ristevski, 2005; Heaney and Bronson, 2006). Chandler *et al.* berichten beispielsweise, dass 12 % der von ihnen analysierten BAC-transgenen Linien (3/26) mehr als nur eine Integrationsstelle des Transgens aufwiesen (Chandler *et al.*, 2007). Dabei sind die Kopien des Transgens jedoch nicht zwangsläufig identisch. Deletionen oder „Rearrangements“ des Transgens vor bzw. während der Integration ins Genom der Maus können zu verschiedenen Transgen-Varianten führen (Kaufman *et al.*, 1999; Deal *et al.*, 2006). Des Weiteren können Positionseffekte die Funktionalität des Transgens beeinflussen. Aufgrund der Größe von

BACs sind diese im Fall von BAC-Transgenen zwar eher untypisch, können aber nicht völlig ausgeschlossen werden (Kaufman et al., 1999).

Die Anzahl der Integrationsstellen des BAC-Transgens wurde in TyriOn Tieren nicht analysiert. Um jedoch Hinweise darauf zu bekommen, ob die mangelnde Verstärkung der Luziferase-Aktivität nach Tamoxifen-Gabe auf eine nicht-funktionelle Transgen-Variante zurückzuführen ist, wurden die Tiere hinsichtlich der Integrität der Sequenz „iOnkogene“ verglichen. Wie bereits in 4.1 beschrieben wurde dazu genomische DNA verwendet und mittels PCR auf das Vorhandensein der in 3.4.3 genannten 3 Bereiche der Sequenz „iOnkogene“ untersucht. In allen getesteten Tieren konnten die 3 Bereiche amplifiziert werden. Es spielte dabei keine Rolle, ob es sich um Proben von Tieren handelte, deren Luziferase-Aktivität durch Tamoxifen verstärkbar war oder um solche, bei denen dies nicht möglich war (Abschnitt 3.4.3, Ergebnisse nicht gezeigt). Vermutlich ist also der teilweise Verlust der Induzierbarkeit nicht auf fehlende Integrität der Sequenz „iOnkogene“ in diesen Tieren zurückzuführen.

Der restliche Teil des BAC-Transgens, insbesondere der Promotorregion, wurde jedoch nicht bezüglich seiner Integrität untersucht. Es wäre denkbar, dass in Tieren der Linie D mit fehlender Induzierbarkeit Deletionen oder „Rearrangements“ (Deal et al., 2006; Kaufman et al., 1999) in der Promoterregion stattgefunden haben, welche die Funktionalität negativ beeinflussen. Deal *et al* berichten beispielsweise von Deletionen in der Promotorregion ihres Transgens in 3 der 4 von ihnen generierten BAC-transgenen Linien (Deal et al., 2006).

Veränderungen in der Promotorregion können die Expression des betreffenden Gens beeinflussen. Im Falle des TyriOn BAC-Konstrukts könnte sich dies auf die Expression und damit auf die Funktionalität der induzierbaren Rekombinase CreER<sup>T2</sup> auswirken. Um festzustellen, ob die Ursache für die fehlende Induzierbarkeit in einigen Tieren der Linie D in der Expression und Funktionalität von CreER<sup>T2</sup> liegt, sollten Hautproben induzierbarer und nicht-induzierbarer Tiere hinsichtlich CreER<sup>T2</sup> RNA und rekombinierter genomischer DNA verglichen werden. Aufgrund der in 4.1 bereits geschilderten Nachweisschwierigkeiten von CreER<sup>T2</sup> RNA in Hautproben konnte hierzu allerdings kein Ergebnis erzielt werden. In ähnlicher Weise verhielt es sich mit dem Nachweis des rekombinierten Transgens. Dies konnte weder in

Hautproben induzierbarer noch in Proben nicht-induzierbarer Tiere detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). In einem weiteren Schritt könnte nun versucht werden, die Analyse der CreER<sup>T2</sup> Expression und loxP-Rekombination mit isolierten Melanozyten zu wiederholen.

Zusammenfassend konnte also lediglich geklärt werden, dass die fehlende Induzierbarkeit betroffener Tiere nicht an mangelnder Integrität der Sequenz „iOnkogene“ liegt. Entsprechend der Vermutung, dass funktionelle und nicht-funktionelle Varianten des Tansgens an unterschiedlichen Stellen im Genom von Founder D integriert, wurde die Strategie verfolgt, durch weiteres Kreuzen induzierbarer TyriOn mit C57BL/6 Tieren, eine stabile Linie bezüglich Tamoxifen-induzierbarer Verstärkung der Luziferase-Aktivität zu erzeugen. So werden die folgenden Generationen Hinweise darauf geben, ob die angestellte Vermutung zutreffen könnte.

### **4.3 Fehlende Entwicklung von Tumoren in TyriOn-D Tieren**

Die Behandlung von TyriOn-D Tieren mit Tamoxifen führte nicht zur Entwicklung spontaner Tumoren in einem Zeitraum von 15 Monaten. Ebenso wenig konnten in TyriOn-D / Cre del Tieren, welche die eingebrachten Onkogene maximal exprimieren sollten, Tumoren detektiert werden.

#### **4.3.1 Expression der eingebrachten Gene**

Die Entstehung von Tumoren in Tamoxifen-behandelten TyriOn-D bzw. in TyriOn-D / Cre del Tieren ist nur dann möglich, wenn die eingebrachten Onkogene tatsächlich exprimiert werden. Der entsprechende Nachweis ist zwar noch zu erbringen, es wurde jedoch angenommen, dass aufgrund der Lage der Onkogene im Konstrukt Tamoxifen-behandelte Tiere mit verstärkter Luziferase-Aktivität die eingebrachten Onkogene exprimieren.

Die Entstehung von Tumoren kann davon abhängen, wie stark ein Onkogen exprimiert wird. Dies wurde beispielsweise im Fall des transgenen Mausstamms Tyr-BRAF<sup>V600E</sup> beobachtet, der die aktive Form des humanen BRAF melanozytenspezifisch exprimiert (Goel et al., 2009). Im Rahmen der Charakterisierung des Mausstamms wurden zwei Linien bezüglich der Onkogen-

Expression in der Haut und der Entstehung von Tumoren analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Linie mit der höheren Onkogen-Expression auf RNA Ebene wesentlich häufiger Melanome entwickelte (etwa 10 % der Tiere) als die Linie mit der geringeren Onkogen-Expression (etwa 1 % der Tiere).

Der Versuch, in der Haut Tamoxifen-behandelter TyriOn-D Tiere RNA der eingebrachten Onkogene nachzuweisen, scheiterte. RNA der induzierbaren Rekombinase CreER<sup>T2</sup>, deren Expression demselben Promoter unterliegt, wurde in der Haut einzelner TyriOn-D Tiere in schwachem Maße detektiert (siehe Abbildung 3.22). In Tumoren aus TyriOn-D / MT/ret Mäusen dagegen konnte CreER<sup>T2</sup> RNA deutlich nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.22), was für die Funktionalität des verwendeten Tyrosinasepromoters spricht. Eine Analyse von Onkogen-RNA in Tumoren Tamoxifen-behandelter TyriOn-D / MT/ret Mäuse wurde bislang nicht unternommen. Dennoch deuten die bisher erzielten Ergebnisse auf eine eher schwache Expression unter dem im TyriOn-BAC-Konstrukt verwendeten Tyrosinasepromoter hin. Dies wiederum könnte ein Grund dafür sein, weshalb Tamoxifen-behandelte TyriOn-D Tiere bislang keine Melanome entwickelten.

Eine starke Variation des Expressionslevels der eingebrachten Gene ist in verschiedenen TyriOn Linien nicht zu erwarten. Typischerweise integrieren Transgene als „head-to-tail“ Konkatomere<sup>2</sup> ins Genom der Maus, wobei die Anzahl der Kopien klassischer Transgene erfahrungsgemäß höher ist als die Kopienzahl von BAC-Transgenen (Heaney and Bronson, 2006; Sparwasser and Eberl, 2007). Im Falle des TyriOn-Transgens ist außerdem zu beachten, dass nach erfolgter Rekombination aller vorhandenen loxP-Stellen nur noch eine Kopie des Transgens vorhanden sein sollte und damit die Expressionsstärke der Onkogene begrenzt wäre (Huijbers et al., 2006; Tiedt et al., 2008).

<sup>2</sup>Wiederholungen von DNA-Sequenzen mit gleichgerichteter Orientierung

### 4.3.2 Onkogene Eigenschaften der gewählten Onkogene

Das onkogene Potential der Onkogene  $Braf^{V600E}$  und  $Cdk4^{R24C}$  wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen demonstriert (siehe Tabelle 1.1). Neben des bereits genannten Mausstammes Tyr-BRAF<sup>V600E</sup> (Goel et al., 2009) wurden parallel von zwei Gruppen zwei sehr ähnliche Mausstämme mit konditionaler, melanozyten-spezifischer Expression von  $Braf^{V600E}$  generiert. Dazu wurde jeweils ein Stamm erzeugt, der mutiertes  $Braf$  nach loxP-Rekombination in physiologischer Weise exprimiert, da das Gen der Kontrolle des endogenen Promoters unterliegt (Dankort et al., 2007; Mercer et al., 2005). Diese Tiere wurden anschließend mit einem Stamm gekreuzt, der die induzierbare Rekombinase CreER<sup>T2</sup> unter Kontrolle des Tyrosinasepromoters exprimiert (Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009). Obwohl die genetische Veränderung beider Stämme sehr ähnlich ist, entwickelte nach Tamoxifen-Gabe nur einer der beiden Stämme Melanome. Diese wurden in 50 – 60 % der Tiere nach einer Latenzzeit von einem Jahr beobachtet (Dhomen et al., 2009). Im anderen Fall konnte jedoch gezeigt werden, dass  $Braf^{V600E}$  die Entstehung von Melanomen begünstigt. Die Kreuzung des Stammes mit *Pten*-defizienten Tieren, welche ebenfalls nicht zu Melanomen neigen, führte in weniger als 50 Tagen zur Entstehung von Melanomen (Dankort et al., 2009). Eine weitere Gruppe verwendete zur Generierung einer Maus mit induzierbarer Expression von  $Braf^{V600E}$  das Tetrazyklin-regulierbare System und den Tyrosinasepromoter. Dieser Mausstamm, genannt iBRAF\*, ist außerdem *Ink4a*- und *Arf*-defizient. Es wird lediglich berichtet, dass der Stamm minimal für Melanome anfällig ist. Vielmehr entwickelten männliche Tiere Prostatakarzinome (Jeong et al., 2008).

Die onkogene Eigenschaft von  $Cdk4^{R24C}$  wurde in einem Mausstamm demonstriert, welcher anstelle von *Cdk4* die mutierte Variante des Proteins ubiquitär exprimiert (Rane et al., 1999). Die Tiere bekamen zwar spontan keine Melanome, waren aber im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gegenüber karzinogenen Behandlungen anfälliger (Sotillo et al., 2001). Außerdem entwickelten  $Cdk4^{R24C} / Tyr-H-Ras^{V12G}$  Tiere Melanome, was in Stämmen mit nur einer der beiden genetischen Veränderungen nicht bzw. nur sehr geringfügig der Fall war (Powell et al., 1995; Chin et al., 1997; Hacker et al., 2006).

Diese verschiedenen Mausmodelle zeigen die onkogene Eigenschaft von  $Braf^{V600E}$  und  $Cdk4^{R24C}$  deutlich auf. Das onkogene Potential von  $Mitf$  wurde bisher nicht mittels genetisch veränderter Mausmodelle nachgewiesen. Der Grund für die fehlende Melanomentwicklung in Tamoxifen-behandelten TyriOn Mäusen könnte neben einer zu geringen Expression der Onkogene, auch die Kombination der gewählten Onkogene sein. Dabei ist in erster Linie der Transkriptionsfaktor  $Mitf$  zu nennen. Trotz *MITF*-Amplifikationen in 10 - 20 % humaner Melanome ist eine Veränderung seines Expressionslevels auf das Wachstum von Melanozyten nicht abschließend geklärt, wie in der Einleitung unter Punkt 1.2.3 erwähnt. *In vitro* Experimente mit humanen, genetisch modifizierten Melanozyten haben allerdings gezeigt, dass *MITF* in Kombination mit inaktiviertem p16INK4a-ZyklusD-Rb-Signalweg und mutiertem *BRAF* durchaus transformierende Fähigkeiten besitzen kann (Garraway et al., 2005).

Ein Vergleich der genannten, genetisch manipulierten Mausstämme mit TyriOn Tieren bezüglich der Melanomentwicklung scheint jedoch aufgrund der Unterschiede in der Zusammensetzung der Konstrukte schwierig. Dies wird besonders durch die beiden  $Braf^{V600E}$ -Mausstämme von Dankort et al., 2009 und Dhomen et al., 2009 deutlich, die sehr ähnliche Konstrukte tragen, sich in ihrer Tumoranfälligkeit aber enorm unterscheiden. Offensichtlich können Unterschiede in scheinbar unwichtigen Sequenzen im Konstrukt das Resultat durchaus beeinflussen.

Die genetischen Modifikationen vieler Mausstämme aus Tabelle 1.1 induzieren alleine keine Melanome. Eine Kombination dieser genetischen Veränderungen, beispielsweise durch Verkreuzen entsprechender Mausstämme, bewirkt dagegen in vielen Fällen die Entstehung von Melanomen. Onkogene, die zwar alleine keine Tumoren auslösen, können also deren Entwicklung begünstigen. Entsprechend dieser Überlegung sollte untersucht werden, ob dies auch für die eingebrachten Onkogene der TyriOn Tiere gilt.

Zunächst wurden Wildtyp-, TyriOn-D-, Tamoxifen behandelte TyriOn-D- und TyriOn-D / Cre del Tiere einem DMBA/TPA-Karzinogenesetest unterzogen. In Wildtyp-Tieren bewirkt dies die Entwicklung von Nevi und Papillomen. In Tieren mit genetischen Veränderungen, welche die Entstehung von Melanomen begünstigen, bilden sich jedoch Melanome (Sotillo et al., 2001). Die Tiere aller Gruppen entwickelten jedoch



lediglich Papillome und Nevi (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die Gruppe der Tamoxifen-behandelten TyriOn-D Tiere jedoch keine Verstärkung der Luziferase-Aktivität zeigte ist zu berücksichtigen, dass die eingebrachten Onkogene vermutlich nicht exprimiert wurden.

In weiteren Experimenten soll untersucht werden, ob das Kreuzen von TyriOn Tieren mit Mausstämmen, welche zur Entwicklung von Melanomen neigen, zu einer Verstärkung der Tumorbildung bezüglich Latenzzeit und Häufigkeit führt. Hierzu stehen die beiden Stämme MT/ret (Iwamoto et al., 1991; Kato et al., 1998) und Tyr-N-Ras<sup>Q61K</sup> (Ackermann et al., 2005) zur Verfügung. Da diese Versuche noch nicht abgeschlossen sind, konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die eingebrachten Onkogene der TyriOn Tiere die Entwicklung von Melanomen in den Tieren begünstigen.

## 5 Zusammenfassung

Da Tumorerkrankungen ein enormes Gesundheitsproblem in der westlichen Welt darstellen, wird eine Vielzahl neuer Behandlungsstrategien entwickelt. Neuartige Tumor-Therapeutika werden jedoch üblicherweise zunächst an Tiermodellen evaluiert, bevor sie am Menschen angewandt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein BAC-transgenes Mausmodell generiert, welches als autochthones Melanommodell zur Anwendung kommen sollte.

Zunächst wurde dafür ein DNA-Konstrukt erzeugt. Dieses enthält die Melanom-Onkogene *Braf*<sup>V600E</sup>, *Cdk4*<sup>R24C</sup> und *Mitf* deren Expression durch die Tamoxifen-induzierbare Rekombinase CreER<sup>T2</sup> kontrollierbar sein sollte. Die Verwendung des Tyrosinasepromoters sollte die melanozytenspezifische Expression der eingebrachten Gene gewährleisten. Ein weiterer Bestandteil des Konstrukts ist ein Luziferase-Gen, welches die Lokalisierung Onkogen-exprimierender Zellen durch *in vivo*-Biolumineszenz-Imaging erlaubt, da die Onkogen- und Luziferase-Expression durch 2A-Sequenzen gekoppelt sind.

Vor der Generierung der transgenen Tiere sollten *in vitro* Analysen die Funktionalität des Konstruktteils, bestehend aus den Onkogenen und der Luziferase, klären. Zu diesem Zweck wurde die Zelllinie C22 mit einem Expressionsvektor transfiziert, welcher den genannten Konstruktteil enthielt. Es konnte ein Anstieg der *Braf*- und *Cdk4*-Expression auf Protein Ebene, das Vorhandensein von Luziferase-Aktivität und die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs nachgewiesen werden. Die Funktionalität des untersuchten Konstruktteils war damit nahegelegt und die Generierung der transgenen Tiere wurde fortgesetzt.

Die Pronukeus-Injektion resultierte schließlich in 3 Founder-Tieren, die mittels PCR und Southern Blot identifiziert wurden und die Bezeichnung „B6 tg Tyr iOnkogene“ (TyriOn) erhielten. Durch Verkreuzen der Founder-Tiere mit C57BL/6 Mäusen wurden im weiteren Verlauf 3 Linien erzeugt. Bei *in vivo* Biolumineszenz-Messungen zeigten Tiere der Linie D einen gewissen Grad an Hintergrund-Luziferase-Aktivität, die jedoch durch Tamoxifen-Injektionen verstärkt werden konnte. In den Folgegenerationen ging diese Tamoxifen-induzierte Verstärkung der Luziferase-Aktivität teilweise verloren. Es wurde die Vermutung angestellt, dass funktionelle und nicht-funktionelle Varianten des Transgens an unterschiedlichen Stellen im Genom von Founder D integriert hatten, und sich in den folgenden Generationen auf die

Nachkommen verteilen. Die mangelnde Induzierbarkeit betroffener Tiere konnte nicht auf fehlende Integrität der Sequenz „iOnkogene“ in diesen Tieren oder auf nicht-funktionelle loxP-Stellen im Konstrukt zurückgeführt werden.

Tamoxifen-Injektionen führten in TyriOn-D Tieren im Laufe von 15 Monaten nicht zur Entwicklung von Tumoren. Ebenso wenig konnten in TyriOn-D / Cre del Tieren, welche die eingebrachten Onkogene maximal exprimieren sollten, Tumoren detektiert werden. Um zu analysieren, ob die eingebrachten Onkogene die Bildung von Tumoren begünstigen, wurden TyriOn-D Tiere mit dem Melanom-anfälligen Stamm MT/ret verkreuzt. Hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit noch kein Ergebnis erzielt werden. Allerdings konnte in Melanomen von TyriOn-D / MT/ret Tieren Luziferase-Aktivität bei *in vivo* Biolumineszenz-Messungen und CreER<sup>T2</sup> RNA durch RT-PCR detektiert werden.

TyriOn-D / MT/ret Tiere werden im weiteren Verlauf dieses Projektes nicht nur der Analyse der Melanomentwicklung dienen. Deren Tumore ermöglichen außerdem weitere Untersuchungen bezüglich der Funktionalität des Konstrukts, die teilweise in TyriOn Tieren keine Resultate ergaben.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AKT	= Proteinkinase B (PKB)
ARF	alternate reading frame
AS	antisense
ASP	antisense primer
BAC	bacterial artificial chromosome
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; Protein, das bei der Apoptose eine Rolle spielt
b-HLH-Zip	basic helix-loop-helix leucine zipper
bp	Basenpaare
BRAF	rapidly growing fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma, B-Isoform
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CDK	ZyklinD abhängige Kinase
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CMV	Zytomegalie-Virus
Cre	causes recombination
Cre del	Mausstamm Cre deleter
CreER <sup>T2</sup>	causes recombination estrogen receptor T2
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA	cytotoxic T lymphocyte antigen
DC	dendritic cell
DCT	dopachrome tautomerase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DRE	distal regulatory element
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular-signal regulated kinase
et al.	und andere (et alii)
F-Faktor	Fertilitäts-Faktor
G1-Phase	phase gap 1
HDM2	human double minute 2

---

HRP	horseradish peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
i	induzierbar
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	interferon
IL	interleukin
INK4a	inhibitors of CDK4
i.p.	intraperitoneal
Kana	Kanamycin
kb	kilobase
loxP	locus of crossing over
MAGE	melanoma antigen-encoding
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mart-1	melanoma antigen recognized by T cells
MEK	mitogen-activated ERK-regulating kinase
Melan-A	melanocyte antigen
MHC	major histocompatibility complex
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
<i>Mt1-Ret</i>	metallothionein 1 promoter - Ret
Neo	Neomycin
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NRAS	neuroblastoma rat sarcoma
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
OE-PCR	overlapping extension PCR
OHT	4-Hydroxytamoxifen
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p21	ein CDK-Inhibitor
p53	Protein 53, ein Tumorsuppressor
PBS	phosphate buffered saline

RAS	rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
Ret	rearranged during transfection
RGP	radial growth phase
RNA	ribonucleic acid
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	revolutions per minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
S	sense
SDM	site directed mutagenesis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	sense primer
S-Phase	Synthese-Phase
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAM	Tamoxifen
TBS	tris buffered saline
TCI	transkutane Immunisierung
TCR	T cell receptor
Tet	tetracycline-controlled transcriptional activation
TLR	toll-like receptor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TSA	tumorspezifisches Antigen
TyriOn	Mausstamm B6 tg Tyr induzierbare Onkogene
TYRP1	tyrosinase-related protein 1
<i>Tyr-SV40Tag</i>	tyrosinase promoter – simian virus 40 T antigen
VGP	vertical growth phase
WSS	Westphal-Stop-Sequenz
YAC	yeast artificial chromosome
ZVTE	zentrale Versuchstiereinrichtung

## 7 Literaturverzeichnis

- Abremski, K., Hoess, R., and Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32, 1301-1311.
- Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 65, 4005-4011.
- Ali, S.H. and DeCaprio, J.A. (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin. Cancer Biol.* 11, 15-23.
- Barnier, J.V., Papin, C., Eychene, A., Lecoq, O., and Calothy, G. (1995). The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 270, 23381-23389.
- Beermann, F., Ruppert, S., Hummler, E., Bosch, F.X., Muller, G., Ruther, U., and Schutz, G. (1990). Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice. *EMBO J.* 9, 2819-2826.
- Bennett, D.C. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 27-38.
- Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and van der, B.P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 175-208.
- Boon, T., Coulie, P.G., and Van den, E.B. (1997). Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today* 18, 267-268.
- Bradl, M., Klein-Szanto, A., Porter, S., and Mintz, B. (1991). Malignant melanoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 164-168.
- Brichard, V., Van, P.A., Wolfel, T., Wolfel, C., De, P.E., Lethe, B., Coulie, P., and Boon, T. (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178, 489-495.
- Buschow, C., Charo, J., Anders, K., Loddenkemper, C., Jukica, A., Alsamah, W., Perez, C., Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2010). In vivo imaging of an inducible oncogenic tumor antigen visualizes tumor progression and predicts CTL tolerance. *J. Immunol.* 184, 2930-2938.
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.D., Denat, L., Larue, L., and Goding, C.R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433, 764-769.
- Chandler, K.J., Chandler, R.L., Broeckelmann, E.M., Hou, Y., Southard-Smith, E.M., and Mortlock, D.P. (2007). Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression. *Mamm. Genome* 18, 693-708.
- Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat. Rev. Cancer* 3, 559-570.
- Chin, L., Pomerantz, J., Polsky, D., Jacobson, M., Cohen, C., Cordon-Cardo, C., Horner, J.W., and DePinho, R.A. (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* 11, 2822-2834.
- Coleman, K.G., Wautlet, B.S., Morrissey, D., Mulheron, J., Sedman, S.A., Brinkley, P., Price, S., and Webster, K.R. (1997). Identification of CDK4 sequences involved in cyclin D1 and p16 binding. *J. Biol. Chem.* 272, 18869-18874.

- Coulie,P.G., Brichard,V., Van,P.A., Wolfel,T., Schneider,J., Traversari,C., Mattei,S., De,P.E., Lurquin,C., Szikora,J.P., Renauld,J.C., and Boon,T. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* *180*, 35-42.
- Dankort,D., Curley,D.P., Cartlidge,R.A., Nelson,B., Karnezis,A.N., Damsky,W.E., Jr., You,M.J., DePinho,R.A., McMahon,M., and Bosenberg,M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat. Genet.* *41*, 544-552.
- Dankort,D., Filenova,E., Collado,M., Serrano,M., Jones,K., and McMahon,M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* *21*, 379-384.
- Davies,H., Bignell,G.R., Cox,C., Stephens,P., Edkins,S., Clegg,S., Teague,J., Woffendin,H., Garnett,M.J., Bottomley,W., Davis,N., Dicks,E., Ewing,R., Floyd,Y., Gray,K., Hall,S., Hawes,R., Hughes,J., Kosmidou,V., Menzies,A., Mould,C., Parker,A., Stevens,C., Watt,S., Hooper,S., Wilson,R., Jayatilake,H., Gusterson,B.A., Cooper,C., Shipley,J., Hargrave,D., Pritchard-Jones,K., Maitland,N., Chenevix-Trench,G., Riggins,G.J., Bigner,D.D., Palmieri,G., Cossu,A., Flanagan,A., Nicholson,A., Ho,J.W., Leung,S.Y., Yuen,S.T., Weber,B.L., Seigler,H.F., Darrow,T.L., Paterson,H., Marais,R., Marshall,C.J., Wooster,R., Stratton,M.R., and Futreal,P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949-954.
- Deal,K.K., Cantrell,V.A., Chandler,R.L., Saunders,T.L., Mortlock,D.P., and Southard-Smith,E.M. (2006). Distant regulatory elements in a Sox10-beta GEO BAC transgene are required for expression of Sox10 in the enteric nervous system and other neural crest-derived tissues. *Dev. Dyn.* *235*, 1413-1432.
- Demello,D.E., Mahmoud,S., Ryerse,J., and Hoffmann,J.W. (2002). Generation and characterization of a conditionally immortalized lung clara cell line from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* *38*, 154-164.
- Dhomen,N., Reis-Filho,J.S., Da Rocha,D.S., Hayward,R., Savage,K., Delmas,V., Larue,L., Pritchard,C., and Marais,R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* *15*, 294-303.
- Du,J., Widlund,H.R., Horstmann,M.A., Ramaswamy,S., Ross,K., Huber,W.E., Nishimura,E.K., Golub,T.R., and Fisher,D.E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* *6*, 565-576.
- Feil,R., Brocard,J., Mascrez,B., LeMeur,M., Metzger,D., and Chambon,P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 10887-10890.
- Feil,R., Wagner,J., Metzger,D., and Chambon,P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *237*, 752-757.
- Fidler,I.J. (1973). Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat. New Biol.* *242*, 148-149.
- Finn,O.J. (2008). Molecular origins of cancer - Cancer immunology. *New England Journal of Medicine* *358*, 2704-2715.
- Flaherty,K.T. and Fisher,D.E. (2011). New strategies in metastatic melanoma: oncogene-defined taxonomy leads to therapeutic advances. *Clin. Cancer Res.* *17*, 4922-4928.
- Frese,K.K. and Tuveson,D.A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 645-658.
- Fujimoto,A., Morita,R., Hatta,N., Takehara,K., and Takata,M. (1999). p16INK4a inactivation is not frequent in uncultured sporadic primary cutaneous melanoma. *Oncogene* *18*, 2527-2532.
- Gajewski,T.F. (2007). Failure at the effector phase: immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* *13*, 5256-5261.



- 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.
- Garbe,C., Eigentler,T.K., Keilholz,U., Hauschild,A., and Kirkwood,J.M. (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist.* 16, 5-24.
- Garcia-Lora,A., Algarra,I., and Garrido,F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J. Cell Physiol* 195, 346-355.
- Garnett,M.J. and Marais,R. (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6, 313-319.
- Garraway,L.A., Widlund,H.R., Rubin,M.A., Getz,G., Berger,A.J., Ramaswamy,S., Beroukhi,R., Milner,D.A., Granter,S.R., Du,J., Lee,C., Wagner,S.N., Li,C., Golub,T.R., Rimm,D.L., Meyerson,M.L., Fisher,D.E., and Sellers,W.R. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-122.
- Germeau,C., Ma,W., Schiavetti,F., Lurquin,C., Henry,E., Vigneron,N., Brasseur,F., Lethe,B., De Plaen,E., Velu,T., Boon,T., and Coulie,P.G. (2005). High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J. Exp. Med.* 201, 241-248.
- Goel,V.K., Ibrahim,N., Jiang,G., Singhal,M., Fee,S., Flotte,T., Westmoreland,S., Haluska,F.S., Hinds,P.W., and Haluska,F.G. (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 28, 2289-2298.
- Goldstein,A.M., Struewing,J.P., Chidambaram,A., Fraser,M.C., and Tucker,M.A. (2000). Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1006-1010.
- Gray,C.P., Arosio,P., and Hersey,P. (2003). Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+ CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma. *Clin. Cancer Res.* 9, 2551-2559.
- Hacker,E., Muller,H.K., Irwin,N., Gabrielli,B., Lincoln,D., Pavey,S., Powell,M.B., Malumbres,M., Barbacid,M., Hayward,N., and Walker,G. (2006). Spontaneous and UV radiation-induced multiple metastatic melanomas in Cdk4R24C/R24C/TPras mice. *Cancer Res.* 66, 2946-2952.
- Heaney,J.D. and Bronson,S.K. (2006). Artificial chromosome-based transgenes in the study of genome function. *Mamm. Genome* 17, 791-807.
- Hershey,C.L. and Fisher,D.E. (2005). Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. *Gene* 347, 73-82.
- Hirobe,T. (1995). Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histol. Histopathol.* 10, 223-237.
- Hocker,T.L., Singh,M.K., and Tsao,H. (2008). Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J. Invest Dermatol.* 128, 2575-2595.
- Hodgkinson,C.A., Moore,K.J., Nakayama,A., Steingrimsson,E., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Arnheiter,H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- Hoess,R.H. and Abremski,K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* 181, 351-362.
- Hoess,R.H., Ziese,M., and Sternberg,N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 3398-3402.

- Hoshino,R., Chatani,Y., Yamori,T., Tsuruo,T., Oka,H., Yoshida,O., Shimada,Y., Ari-i S, Wada,H., Fujimoto,J., and Kohno,M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18, 813-822.
- Hughes,A.E., Newton,V.E., Liu,X.Z., and Read,A.P. (1994). A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1. *Nat. Genet.* 7, 509-512.
- Huijbers,I.J., Krimpenfort,P., Chomez,P., van der Valk,M.A., Song,J.Y., Inderberg-Suso,E.M., Schmitt-Verhulst,A.M., Berns,A., and Van den Eynde,B.J. (2006). An inducible mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen. *Cancer Res.* 66, 3278-3286.
- Hussussian,C.J., Struewing,J.P., Goldstein,A.M., Higgins,P.A., Ally,D.S., Sheahan,M.D., Clark,W.H., Jr., Tucker,M.A., and Dracopoli,N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* 8, 15-21.
- Imayoshi,I., Ohtsuka,T., Metzger,D., Chambon,P., and Kageyama,R. (2006). Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis.* 44, 233-238.
- Iwamoto,T., Takahashi,M., Ito,M., Hamatani,K., Ohbayashi,M., Wajjwalku,W., Isobe,K., and Nakashima,I. (1991). Aberrant melanogenesis and melanocytic tumour development in transgenic mice that carry a metallothionein/ret fusion gene. *EMBO J.* 10, 3167-3175.
- Jager,E., Chen,Y.T., Drijfhout,J.W., Karbach,J., Ringhoffer,M., Jager,D., Arand,M., Wada,H., Noguchi,Y., Stockert,E., Old,L.J., and Knuth,A. (1998). Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* 187, 265-270.
- Jeong,J.H., Wang,Z., Guimaraes,A.S., Ouyang,X., Figueiredo,J.L., Ding,Z., Jiang,S., Guney,I., Kang,G.H., Shin,E., Hahn,W.C., Loda,M.F., bate-Shen,C., Weissleder,R., and Chin,L. (2008). BRAF activation initiates but does not maintain invasive prostate adenocarcinoma. *PLoS. One.* 3, e3949.
- Johnson,J.I., Decker,S., Zaharevitz,D., Rubinstein,L.V., Venditti,J.M., Schepartz,S., Kalyandrug,S., Christian,M., Arbusk,S., Hollingshead,M., and Sausville,E.A. (2001). Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br. J. Cancer* 84, 1424-1431.
- Kageshita,T., Ishihara,T., Campoli,M., and Ferrone,S. (2005). Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens* 65, 419-428.
- Kamb,A., Gruis,N.A., Weaver-Feldhaus,J., Liu,Q., Harshman,K., Tavitigian,S.V., Stockert,E., Day,R.S., III, Johnson,B.E., and Skolnick,M.H. (1994a). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.
- Kamb,A., Shattuck-Eidens,D., Eeles,R., Liu,Q., Gruis,N.A., Ding,W., Hussey,C., Tran,T., Miki,Y., Weaver-Feldhaus,J., and . (1994b). Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat. Genet.* 8, 23-26.
- Kato,M., Takahashi,M., Akhand,A.A., Liu,W., Dai,Y., Shimizu,S., Iwamoto,T., Suzuki,H., and Nakashima,I. (1998). Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17, 1885-1888.
- Kaufman,R.M., Pham,C.T., and Ley,T.J. (1999). Transgenic analysis of a 100-kb human beta-globin cluster-containing DNA fragment propagated as a bacterial artificial chromosome. *Blood* 94, 3178-3184.
- Kawakami,Y., Eliyahu,S., Sakaguchi,K., Robbins,P.F., Rivoltini,L., Yannelli,J.R., Appella,E., and Rosenberg,S.A. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180, 347-352.

- Kluppel,M., Beermann,F., Ruppert,S., Schmid,E., Hummler,E., and Schutz,G. (1991). The mouse tyrosinase promoter is sufficient for expression in melanocytes and in the pigmented epithelium of the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 3777-3781.
- Larue,L. and Beermann,F. (2007). Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res.* *20*, 485-497.
- Levy,C., Khaled,M., and Fisher,D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* *12*, 406-414.
- Liao,C.P., Zhong,C., Saribekyan,G., Bading,J., Park,R., Conti,P.S., Moats,R., Berns,A., Shi,W., Zhou,Z., Nikitin,A.Y., and Roy-Burman,P. (2007). Mouse models of prostate adenocarcinoma with the capacity to monitor spontaneous carcinogenesis by bioluminescence or fluorescence. *Cancer Res.* *67*, 7525-7533.
- Limberis,M.P., Bell,C.L., and Wilson,J.M. (2009). Identification of the murine firefly luciferase-specific CD8 T-cell epitopes. *Gene Ther.* *16*, 441-447.
- Liska,D.J., Reed,M.J., Sage,E.H., and Bornstein,P. (1994). Cell-specific expression of alpha 1(I) collagen-hGH minigenes in transgenic mice. *J. Cell Biol.* *125*, 695-704.
- Liu,S., Ren,S., Howell,P., Fodstad,O., and Riker,A.I. (2008). Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment Cell Melanoma Res.* *21*, 545-558.
- Loercher,A.E., Tank,E.M., Delston,R.B., and Harbour,J.W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J. Cell Biol.* *168*, 35-40.
- Lonchay,C., van der,B.P., Connerotte,T., Hanagiri,T., Coulie,P., Colau,D., Lucas,S., Van Pel,A., Thielemans,K., van Baren,N., and Boon,T. (2004). Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101 Suppl 2*, 14631-14638.
- Lucas,S. and Coulie,P.G. (2008). About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Semin. Immunol.* *20*, 301-307.
- McGill,G.G., Horstmann,M., Widlund,H.R., Du,J., Motyckova,G., Nishimura,E.K., Lin,Y.L., Ramaswamy,S., Avery,W., Ding,H.F., Jordan,S.A., Jackson,I.J., Korsmeyer,S.J., Golub,T.R., and Fisher,D.E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* *109*, 707-718.
- McKnight,R.A., Wall,R.J., and Hennighausen,L. (1995). Expression of genomic and cDNA transgenes after co-integration in transgenic mice. *Transgenic Res.* *4*, 39-43.
- Mercer,K., Giblett,S., Green,S., Lloyd,D., DaRocha,D.S., Plumb,M., Marais,R., and Pritchard,C. (2005). Expression of endogenous oncogenic V600E-raf induces proliferation and developmental defects in mice and transformation of primary fibroblasts. *Cancer Res.* *65*, 11493-11500.
- Metzger,D. and Chambon,P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* *24*, 71-80.
- Michaloglou,C., Vredeveld,L.C., Soengas,M.S., Denoyelle,C., Kuilman,T., van der Horst,C.M., Majoor,D.M., Shay,J.W., Mooi,W.J., and Peeper,D.S. (2005). BRAF<sup>V600E</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* *436*, 720-724.
- Montoliu,L., Umland,T., and Schutz,G. (1996). A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene. *EMBO J.* *15*, 6026-6034.
- Muthusamy,V., Hobbs,C., Nogueira,C., Cordon-Cardo,C., McKee,P.H., Chin,L., and Bosenberg,M.W. (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes. Cancer* *45*, 447-454.

- Nobori,T., Miura,K., Wu,D.J., Lois,A., Takabayashi,K., and Carson,D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753-756.
- O'Connor,M., Peifer,M., and Bender,W. (1989). Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* 244, 1307-1312.
- Palmieri,G., Capone,M., Ascierto,M.L., Gentilcore,G., Stroncek,D.F., Casula,M., Sini,M.C., Palla,M., Mozzillo,N., and Ascierto,P.A. (2009). Main roads to melanoma. *J. Transl. Med.* 7, 86.
- Papin,C., Denouel-Galy,A., Laugier,D., Calothy,G., and Eychene,A. (1998). Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. *J. Biol. Chem.* 273, 24939-24947.
- Parkin,D.M., Bray,F., Ferlay,J., and Pisani,P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 55, 74-108.
- Pollock,P.M., Harper,U.L., Hansen,K.S., Yudt,L.M., Stark,M., Robbins,C.M., Moses,T.Y., Hostetter,G., Wagner,U., Kakareka,J., Salem,G., Pohida,T., Heenan,P., Duray,P., Kallioniemi,O., Hayward,N.K., Trent,J.M., and Meltzer,P.S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* 33, 19-20.
- Powell,M.B., Hyman,P., Bell,O.D., Balmain,A., Brown,K., Alberts,D., and Bowden,G.T. (1995). Hyperpigmentation and melanocytic hyperplasia in transgenic mice expressing the human T24 Ha-ras gene regulated by a mouse tyrosinase promoter. *Mol. Carcinog.* 12, 82-90.
- Quelle,D.E., Zindy,F., Ashmun,R.A., and Sherr,C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
- Rane,S.G., Dubus,P., Mettus,R.V., Galbreath,E.J., Boden,G., Reddy,E.P., and Barbacid,M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22, 44-52.
- Reed,J.A., Loganzo,F., Jr., Shea,C.R., Walker,G.J., Flores,J.F., Glendening,J.M., Bogdany,J.K., Shiel,M.J., Haluska,F.G., Fountain,J.W., and . (1995). Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 55, 2713-2718.
- Ristevski,S. (2005). Making better transgenic models: conditional, temporal, and spatial approaches. *Mol. Biotechnol.* 29, 153-163.
- Rizos,H., Puig,S., Badenas,C., Malveyh,J., Darmanian,A.P., Jimenez,L., Mila,M., and Kefford,R.F. (2001). A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene* 20, 5543-5547.
- Rosenberg,S.A., Packard,B.S., Aebersold,P.M., Solomon,D., Topalian,S.L., Toy,S.T., Simon,P., Lotze,M.T., Yang,J.C., Seipp,C.A., and . (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 319, 1676-1680.
- Salti,G.I., Manougian,T., Farolan,M., Shilkaitis,A., Majumdar,D., and Das Gupta,T.K. (2000). Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res.* 60, 5012-5016.
- Sandhu,U., Cebula,M., Behme,S., Riemer,P., Wodarczyk,C., Metzger,D., Reimann,J., Schirmbeck,R., Hauser,H., and Wirth,D. (2011). Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications based on RMCE compatible ES cells. *Nucleic Acids Res.* 39, e1.
- Selzer,E., Wacheck,V., Lucas,T., Heere-Ress,E., Wu,M., Weilbaecher,K.N., Schlegel,W., Valent,P., Wrba,F., Pehamberger,H., Fisher,D., and Jansen,B. (2002). The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res.* 62, 2098-2103.

- Serrano,M., Hannon,G.J., and Beach,D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.
- Sharkey,M.S., Lizee,G., Gonzales,M.I., Patel,S., and Topalian,S.L. (2004). CD4(+) T-cell recognition of mutated B-RAF in melanoma patients harboring the V599E mutation. *Cancer Res.* 64, 1595-1599.
- Sharpless,E. and Chin,L. (2003). The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 22, 3092-3098.
- Shizuya,H., Birren,B., Kim,U.J., Mancino,V., Slepak,T., Tachiiri,Y., and Simon,M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 8794-8797.
- Sotillo,R., Garcia,J.F., Ortega,S., Martin,J., Dubus,P., Barbacid,M., and Malumbres,M. (2001). Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 13312-13317.
- Soto,J.L., Cabrera,C.M., Serrano,S., and Lopez-Nevot,M.A. (2005). Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC. Cancer* 5, 36.
- Soufir,N., Avril,M.F., Chompret,A., Demenais,F., Bombled,J., Spatz,A., Stoppa-Lyonnet,D., Benard,J., and Bressac-de Paillerets,B. (1998). Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum. Mol. Genet.* 7, 209-216.
- Sparwasser,T. and Eberl,G. (2007). BAC to immunology--bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis for targeting of immune cells. *Immunology* 121, 308-313.
- Steingrimsson,E., Copeland,N.G., and Jenkins,N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* 38, 365-411.
- Sternberg,N. and Hamilton,D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467-486.
- Sumimoto,H., Imabayashi,F., Iwata,T., and Kawakami,Y. (2006). The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J. Exp. Med.* 203, 1651-1656.
- Szymczak,A.L., Workman,C.J., Wang,Y., Vignali,K.M., Dilioglou,S., Vanin,E.F., and Vignali,D.A. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.* 22, 589-594.
- Takata,M. and Saida,T. (2006). Genetic alterations in melanocytic tumors. *J. Dermatol. Sci.* 43, 1-10.
- Turner,B., Haendle,I., Roder,C., Dieckmann,D., Keikavoussi,P., Jonuleit,H., Bender,A., Maczek,C., Schreiner,D., von den,D.P., Brocker,E.B., Steinman,R.M., Enk,A., Kampgen,E., and Schuler,G. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 190, 1669-1678.
- Tiedt,R., Hao-Shen,H., Sobas,M.A., Looser,R., Dirnhofer,S., Schwaller,J., and Skoda,R.C. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111, 3931-3940.
- Tief,K., Schmidt,A., and Beermann,F. (1998). New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 53, 307-310.
- Uytenhove,C., Pilotte,L., Theate,I., Stroobant,V., Colau,D., Parmentier,N., Boon,T., and Van den Eynde,B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9, 1269-1274.
- Viguiier,M., Lemaitre,F., Verola,O., Cho,M.S., Gorochov,G., Dubertret,L., Bachelez,H., Kourilsky,P., and Ferradini,L. (2004). Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in

- human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J. Immunol.* **173**, 1444-1453.
- Walker,G.J. and Hayward,N.K. (2002). Pathways to melanoma development: lessons from the mouse. *J. Invest Dermatol.* **119**, 783-792.
- Wellbrock,C. and Marais,R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J. Cell Biol.* **170**, 703-708.
- Wolfel,T., Hauer,M., Schneider,J., Serrano,M., Wolfel,C., Klehmann-Hieb,E., De Plaen,E., Hankeln,T., Meyer zum Buschenfelde,K.H., and Beach,D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**, 1281-1284.
- Yajima,I., Belloir,E., Bourgeois,Y., Kumasaka,M., Delmas,V., and Larue,L. (2006). Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. *Genesis.* **44**, 34-43.
- Yang,X.W., Model,P., and Heintz,N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* **15**, 859-865.
- Yasumoto,K., Yokoyama,K., Shibata,K., Tomita,Y., and Shibahara,S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol. Cell Biol.* **14**, 8058-8070.
- Yeang,C.H. (2010). An integrated analysis of molecular aberrations in NCI-60 cell lines. *BMC Bioinformatics.* **11**, 495.
- Zhang,Y., Xiong,Y., and Yarbrough,W.G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**, 725-734.
- Zhuang,L., Lee,C.S., Scolyer,R.A., McCarthy,S.W., Zhang,X.D., Thompson,J.F., and Hersey,P. (2007). Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod. Pathol.* **20**, 416-426.
- Zou,W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 295-307.
- Zuo,L., Weger,J., Yang,Q., Goldstein,A.M., Tucker,M.A., Walker,G.J., Hayward,N., and Dracopoli,N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat. Genet.* **12**, 97-99.

## Danksagung

# Lebenslauf