

„*Knock down* von Desmoglein 2 durch induzierbare
Cre-spezifische Rekombination in der Maus“

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Dorothe Hameyer
geboren am 07.04.1979 in Remagen

Mainz, 2006

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	V
	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Zelladhäsion	1
1.1.1	Die Bedeutung der Zelladhäsion	1
1.1.2	Ausbildung von Zellverbindungen durch Cadherine	2
1.1.3	Komponenten und Struktur von Desmosomen	4
1.2	Desmoglein 2	14
1.3	Kleine regulatorische RNAs	15
1.3.1	Mechanismus der RNA Interferenz	17
1.3.2	Anwendungsbereiche von RNAi	18
1.4	Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Verbrauchsmaterial	22
2.1.2	Chemikalien	23
2.1.3	Puffer und Lösungen	28
2.1.4	Kulturmedien	32
2.1.5	Enzyme	33
2.1.6	Radioaktive Nuklide	33
2.1.7	Oligonukleotide	34
2.1.8	Vektoren	35
2.1.9	Antikörper	36
2.1.10	Molekulargewichtsmarker	38
2.1.11	Kits	38
2.1.12	Bakterienstämme	38
2.1.13	Zelllinien	39
2.1.14	Tiere	39
2.1.15	Geräte	40
2.1.16	Software	43
2.2	Methoden	45
2.2.1	Präparation von Plasmid – DNA aus Bakterienkulturen	45
2.2.1.1	Präparation von DNA aus 2 ml Bakterienkulturen (Plasmid Minipräparation)	45
2.2.1.2	Präparation von DNA aus 400 ml Bakterienkulturen (Plasmid Maxipräparation)	45
2.2.2	DNA – Präzipitation	46
2.2.3	Präparation von genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien	46
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	47
2.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
2.2.6	Agarosegelelektrophorese	48
2.2.7	Präparative Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen (Gelextraktion)	49
2.2.8	Restriktionsverdau von DNA	49
2.2.8.1	Analytischer Restriktionsverdau	49
2.2.8.2	Präparativer Restriktionsverdau	50
2.2.9	Dephosphorylierung von Vektor – DNA	50
2.2.10	Auswahl der siRNA Zielsequenzen	50
2.2.11	<i>Annealing</i> von siRNA Oligonukleotiden	51

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.12	Ligation	51
2.2.13	Herstellung kompetenter Bakterien	52
2.2.13.1	Herstellung von elektrokompenten Bakterien (DH5 α)	52
2.2.13.2	Herstellung von Hitzeschock – kompetenten Bakterien (294 – Cre)	53
2.2.14	Transformation	53
2.2.14.1	Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation	53
2.2.14.2	Transformation von Bakterienzellen durch Hitzeschock	54
2.2.15	Radioaktive Markierung von DNA – Sonden	54
2.2.16	RNA – Extraktion aus Zellkultur – Zellen	55
2.2.17	Konzentrationsbestimmung von RNA	56
2.2.18	<i>Northern Blot</i>	56
2.2.19	Extraktion von Protein	57
2.2.19.1	Proteinextraktion aus Zellkultur – Zellen	57
2.2.19.2	Proteinextraktion aus murinem Gewebe	58
2.2.20	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	58
2.2.21	Acetonpräzipitation von Protein	59
2.2.22	<i>Western Blot</i>	59
2.2.22.1	Analytische SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE)	59
2.2.22.2	Durchführung des <i>Western Blots (Semi dry Blotting)</i>	61
2.2.23	Entfernung von Antikörpern und Sonden von Nitrozellulosemembranen	62
2.2.23.1	Entfernung von Sonden von Nitrozellulosemembranen bei <i>Northern Blots</i>	63
2.2.23.2	Entfernung von Antikörpern von Nitrozellulosemembranen bei <i>Western Blots</i>	63
2.2.24	Murine Gewebeschnitte	63
2.2.24.1	Anfertigung von murinen Gewebeschnitten	63
2.2.24.2	Acetonfixierung von murinen Gewebeschnitten	64
2.2.24.3	X – Gal – und <i>Fast – Red</i> – Färbung muriner Gewebeschnitte	64
2.2.24.4	Immunfluoreszenz von murinen Gewebeschnitten	64
2.2.25	Zellkultur	65
2.2.25.1	Kultivierung von HEK 293, 3T3 und EpH4 Zellen	65
2.2.25.2	Kryokonservierung von Zellen	65
2.2.25.3	Auftauen von Zellen	66
2.2.25.4	Transiente Transfektion von Plasmid – DNA in HEK 293 und NIH 3T3 – Zellen	66
2.2.25.5	Transiente Transfektion von EpH4 Zellen	67
2.2.26	Generierung transgener Mäuse durch Pronukleusinjektion	67
2.2.26.1	Superovulation	68
2.2.26.2	Gewinnung der befruchteten Eizellen	68
2.2.26.3	Vorbereitung der transgenen DNA für die Pronukleusinjektion	68
2.2.26.4	Mikroinjektion des transgenen Konstrukts in Oozyten	68
2.2.26.5	Scheinschwangere Leihmütter	69
2.2.26.6	Transfer der mikroinjizierten Oozyten	69
2.2.27	Behandlung von adulten Mäusen mit Tamoxifen	70
2.2.28	Aktivierung der CreER ^{T2} Rekombinase mit Tamoxifen im Embryo und anschließende β – Galaktosidase – Färbung	70
2.2.29	FACS (<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>) – Analyse von Mausorganen und Mausembryonen	71
2.2.30	Induktion von <i>Colitis ulcerosa</i> bei transgenen Mäusen	72
3	Ergebnisse	73
3.1	Charakterisierung der Rosa26CreER ^{T2} Maus	73
3.1.1	Genotypisierung von Rosa26CreER ^{T2} sowie Rosa26Reporter Mäusen	74

3.1.2	Behandlung doppelt transgener Rosa26CreER ^{T2} /R26R Mäuse mit Tamoxifen führt zu unterschiedlich starker Expression des Reportergens β -Galaktosidase in verschiedenen peripheren Organen	76
3.1.3	Analyse der Expression von Cre Rekombinase in verschiedenen Organen der Rosa26CreER ^{T2} Maus zeigt keine detektierbare Expression im Gehirn	80
3.1.4	FACS (<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>)-Analyse hämatopoietischer Organe von Rosa26CreER ^{T2} /RAGE Mäusen zeigt unterschiedlich starke Aktivierung der Cre Rekombinase in verschiedenen Blutzellpopulationen	81
3.1.5	Bereits im Embryo kann Cre Rekombinase durch Injektion von Tamoxifen ins Muttertier aktiviert werden	86
3.2	<i>Knock down</i> von Dsg 2 mit Hilfe des Expressionsvektors pTER _{EGFP}	88
3.2.1	Klonierung von verschiedenen siRNA Sequenzen gegen Dsg 2 in den Expressionsvektor pTER _{EGFP}	89
3.2.2	Herstellung der Dsg 2- und GAPDH-spezifischen Sonden	91
3.2.3	<i>Knock down</i> von Dsg 2 in den Desmosomen-bildenden Eph4 Zellen durch transiente Transfektion mit den shRNA Expressionsplasmiden	92
3.2.4	Verschiedene siRNA Zielsequenzen zeigen unterschiedliche <i>knock down</i> Effizienz in transienten co-Transfektionen	95
3.3	<i>Knock down</i> von Dsg 2 mit Hilfe des Expressionsvektors pSico	96
3.3.1	Klonierung der Dsg 2 shRNA Sequenz in den Expressionsvektor pSico	97
3.3.2	Deletion der Stop-Kassette durch Transfektion des pSico Dsg 2 shRNA Plasmids in Cre exprimierende Bakterien	99
3.3.3	<i>Knock down</i> von Dsg 2 im Zellkulturexperiment nach Deletion der Stop-Kassette	102
3.4	Klonierung der shRNA Expressionskassette in einen Vektor mit humanen MAR (<i>Matrix Attachment Region</i>)-Sequenzen zur Insulation des Transgens	103
3.5	Generierung der pSicopInsu Dsg 2 shRNA (Dsg 2 <i>knock down</i>) Mäuse	108
3.6	Genotypisierung und Fluoreszenztest von potenziellen Dsg 2 <i>knock down</i> Mäusen	109
3.7	<i>Knock down</i> von Dsg 2 nach Tamoxifen-Behandlung doppelt transgener pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER ^{T2} Mäuse	111
3.8	Induktion von <i>Colitis ulcerosa</i> in Tamoxifen-induzierten Dsg 2 <i>knock down</i> /VillinCreER ^{T2} Mäusen	115
4	Diskussion	119
4.1	Induzierbare Expression der Cre Rekombinase in den peripheren Geweben der Rosa26CreER ^{T2} Mauslinie	119
4.2	Verschiedene siRNA Sequenzen führen auf RNA- und Proteinebene zu unterschiedlich effizientem <i>knock down</i> von Dsg 2 unter Anwendung des Expressionsvektors pTER _{EGFP}	124
4.3	Durch Verwendung des Expressionsvektors pSico kann Dsg 2 Cre/lox-induzierbar herunterreguliert werden	126
4.4	Durch Mikroinjektion des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Konstrukts werden induzierbare Dsg 2 <i>knock down</i> Mäuse generiert	128
4.5	Behandlung mit Tamoxifen führt in doppelt transgenen pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER ^{T2} Mäusen zum <i>knock down</i> von Dsg 2	129

INHALTSVERZEICHNIS

4.6	Tamoxifen-behandelte pSicopInsu Dsg 2 shRNA/VillinCre Mäuse zeigen nach Induktion von <i>Colitis ulcerosa</i> Entzündungen und Tumore im Darm	132
5	Zusammenfassung	135
	Summary	137
6	Literaturverzeichnis	139
	Danksagung	148
	Lebenslauf	149

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung eines Desmosoms	5
Abb. 1.2	Differenzierungsabhängige Expression desmosomaler Cadherine in der Epidermis	8
Abb. 1.3	Mechanismus von siRNA und miRNA	18
Abb. 3.1	Genotypisierung von Rosa26CreER ^{T2} Mäusen	75
Abb. 3.2	Genotypisierung von Rosa26Reporter (R26R) Mäusen	76
Abb. 3.3	Verpaarungs- und Tamoxifenregime-Schema für den auf X-Gal-Färbung basierenden Funktionalitätstest der Rosa26CreER ^{T2} Maus	77
Abb. 3.4	X-Gal-Färbung von Kryostatschnitten der mit Tamoxifen behandelten Rosa26CreER ^{T2} /R26R Mäuse	78
Abb. 3.5	Expression von Cre Rekombinase in verschiedenen Geweben der Rosa26CreER ^{T2} Maus	81
Abb. 3.6	FACS-Plots verschiedener hämatopoietischer Organe der Rosa26CreER ^{T2} /RAGE Maus mit und ohne Tamoxifen-Induktion	82
Abb. 3.7	FACS-Plots der Blutzellpopulationen von Rosa26CreER ^{T2} /RAGE Mäusen nach Öl- oder Tamoxifenbehandlung	85
Abb. 3.8	Expressionslevels von EGFP (grünes Fluoreszenzprotein) in verschiedenen Blutzellpopulationen von Rosa26CreER ^{T2} /RAGE Mäusen	86
Abb. 3.9	X-Gal-Färbung von Rosa26CreER ^{T2} /R26R Embryonen	87
Abb. 3.10	FACS-Analyse 12 Tage alter Rosa26CreER ^{T2} /RAGE Embryonen	87
Abb. 3.11	ShRNA Expressionsplasmid pTER _{EGFP}	89
Abb. 3.12	PCR zur Suche nach positiven Klonen nach Ligation von shRNA Sequenzen in pTER _{EGFP}	90
Abb. 3.13	Restriktionsverdau des Dsg 2- und GAPDH-Expressionsvektors zur Herstellung von Sonden für den <i>Northern Blot</i>	91
Abb. 3.14	Relative Dsg 2 RNA-Intensität der EpH4 Zellen nach Transfektion mit den shRNA Expressionsplasmiden	93
Abb. 3.15	<i>Western Blot</i> der FACS-sortierten EpH4 Zellen	94
Abb. 3.16	<i>Western Blot</i> von Proteinextrakten der mit pTER _{EGFP} -shRNA Konstrukten transfizierten HEK 293-Zellen	95
Abb. 3.17	Kontrolle der transformierten Bakterien auf Intregation der shRNA in den pSico Expressionsvektor	98
Abb. 3.18	Cre-induzierte Rekombination zwischen den loxP <i>sites</i> im shRNA Expressionsvektor pSico führt zu Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette	101
Abb. 3.19	<i>Western Blot</i> zur Kontrolle der Funktionalität des pSico Dsg 2 shRNA Expressionsvektors	102
Abb. 3.20	Schematische Darstellung zur Klonierung des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Vektors	105
Abb. 3.21	Präparative Restriktionsverdaus der Vektoren pSico Dsg 2 shRNA und pInsu	106
Abb. 3.22	Analyse potenzieller pSicopInsu Dsg 2 shRNA Bakterienklone	107
Abb. 3.23	Präparativer Restriktionsverdau des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Plasmids für die Mikroinjektion	108
Abb. 3.24	Generierung und Genotypisierung der Dsg 2 <i>knock down</i> Mäuse	110
Abb. 3.25	<i>Western Blot</i> von pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER ^{T2} Mäusen nach Tamoxifenbehandlung	112
Abb. 3.26	Immunfluoreszenz von Leberschnitten der bitransgenen <i>knock down</i> Maus	114
Abb. 3.27	Endoskopische Untersuchung der Dsg 2 <i>knock down</i> /VillinCreER ^{T2} Mäuse nach Induktion von Colitis ulcerosa	118

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
as	<i>antisense</i>
bp	Basenpaar/e
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
fw	<i>forward</i>
g	Gramm
G	Guanin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
u. a.	und andere
μF	Mikrofaraday
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
N	beliebiges Nukleotid
nt	Nukleotid/e
OD	Optische Dichte
polyA	<i>poly adenylation signal</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	<i>sense</i>
sec	Sekunde
T	Thymin
Tam	Tamoxifen
tetO	Tetrazyklin Operatorsequenz
TetR	Tetrazyklin – abhängiger Repressor
U	Urazil
u	<i>units</i>
U/min	Umdrehungen/Minute
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion

1.1.1 Die Bedeutung der Zelladhäsion

Damit sich Strukturen und Organe ausbilden können, müssen dreidimensionale Zellverbände gebildet werden. Dazu ist die Zelladhäsion eine Grundvoraussetzung (Gumbiner, 1996). Während der Morphogenese entstehen unter Neubildung von Zellkontakten in Verbindung mit dem Zytoskelett mechanische Kräfte, die Veränderungen in Zellform und Bewegung modulieren. Durch diese molekularen Vorgänge werden Zellflächen in räumliche Strukturen umgewandelt. Zellen „kleben“ in einem solchen Zellverband nicht einfach aneinander, sondern sind in unterschiedlichen und komplexen Mustern organisiert. Verschiedene Adhäsionsmechanismen verhelfen den Zellen zum Zusammenhalt und bestimmen, gemeinsam mit den internen Zytoskelettstrukturen, die Gesamtarchitektur des Gewebes. Die funktionellen Einheiten der Zelladhäsion sind Multiproteinkomplexe, die im wesentlichen aus drei Klassen von Proteinen bestehen: Zelladhäsionsmoleküle (CAM, *cell adhesion molecules*), extrazelluläre Matrixproteine (ECM) und zytoplasmatische Plaqueproteine. Die meisten Zelladhäsionsmoleküle sind an den Regionen des Zellkontakts lokalisiert. Typischerweise handelt es sich um transmembrane Glykoproteine, deren extrazelluläre Domäne die Adhäsion mit benachbarten Zellen vermittelt. Die zytoplasmatische Domäne dieser Proteine ist in der Regel mit Elementen des Zytoskeletts verknüpft. Bei den fünf Klassen von CAMs unterscheidet man Mitglieder der Immunglobulin-, Integrin-, Mukin-, Cadherin- sowie Selektin-Superfamilien. Bei einer Vielzahl von Zellen wird die Zelladhäsion durch Verwendung verschiedener CAMs vermittelt (Lodish *et al*, 2000). Damit Zellen in einem Gewebe funktionieren können, sind spezialisierte Zellverbindungen unerlässlich. Als Hauptklassen der Zellverbindungen sind Verschlusskontakte, Kommunikationskontakte und Adhäsionskontakte zu unterscheiden, wobei *adherens junctions* und Desmosomen zu letzteren zu zählen sind (eine Übersicht dazu gibt Tabelle 1.1). Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen haben eine Strukturgebende Funktion. Durch Verknüpfung des Zytoskeletts benachbarter Zellen werden so assoziierte Zellen in einen Gewebeverband integriert. Die solche Zellverbindungen

vermittelnden Strukturen sind in die folgenden drei Klassen unterteilt: Zelladhäsionsmoleküle, die benachbarte Zellen verbinden, Adapterproteine, die CAMs mit Aktin- oder Keratinfilamenten verknüpfen, und die Filamente des Zytoskeletts selbst.

Verschlusskontakte (<i>occluding junctions</i>)	<i>tight junctions</i> <i>septate junctions</i>
Adhäsionskontakte (<i>anchoring junctions</i>)	Aktinfilamente: <i>adherens junctions</i> (Zell-Zell) <i>focal adhesion</i> (Zell-Matrix) Intermediärfilamente: <i>Desmosomen</i> (Zell-Zell) Hemidesmosomen (Zell-Matrix)
Kommunikationskontakte (<i>communicating junctions</i>)	<i>gap junctions</i>

Tabelle 1.1: Übersicht über die verschiedenen Zellverbindungen

1.1.2 Ausbildung von Zellverbindungen durch Cadherine

Die Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) der Cadherinsuperfamilie können *adherens junctions* und Desmosomen bilden. Sie stellen die bedeutendsten adhäsiven Zell-Zell Verbindungen epithelialer Zellen dar. Desmosomen und *adherens junctions* kommen zusammen in der gleichen Zelle vor und bewirken, dass Zellform und Gewebereinheit beibehalten werden (He *et al.*, 2003). Sowohl *adherens junctions* als auch Desmosomen sind mit dem Zytoskelett verbunden und bewirken die notwendige mechanische Kopplung zwischen den Zellen. Den beteiligten CAMs (klassische und desmosomale Cadherine) sind die fünf hintereinander angeordneten extrazellulären Domänen (EC 1-5) mit Kalziumbindemotiv, der Besitz einer Membrandurchspannenden sowie einer zytoplasmatischen Domäne gemeinsam (Ozawa, 1995). Dabei ist die Homologie von klassischen zu desmosomalen Cadherinen in der extrazellulären Domäne am größten.

Um die Zellverbindungen zu ermöglichen, sind die *adherens junctions* und Desmosomen aufbauenden Einzelproteine ähnlich angeordnet. Über eine zytoplasmatische Domäne binden die Cadherine an Armadilloproteine, die über Linkerproteine mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Im N-terminalen Bereich stellen die Glykoproteine Kalzium-abhängige Verbindungen zu Cadherinen benachbarter

Zellen her. Eine Übersicht zu Desmosomen- und *adherens junctions*-bildenden Proteine gibt Tabelle 1.2.

In *adherens junctions* verbindet das zu den klassischen Cadherinen gehörende E-Cadherin via α - und β -Catenin, Plakoglobin (δ -Catenin) sowie Vinculin und α -Aktinin, Aktinmikrofilamente benachbarter Zellen miteinander. Die klassischen Cadherine vermitteln homophile Adhäsion zwischen angrenzenden Zellen und bilden zusätzlich innerhalb einer Zelle laterale Dimere aus (Angst *et al*, 2001). *Adherens junctions* sind evolutionär älter als Desmosomen und werden sowohl während der Embryogenese als auch bei Entwicklung adulter Gewebestrukturen aufgebaut (Ohsugi *et al*, 1996; Keiffer-Combeau, 2001). Bei Kalzium-induzierter Zell-Zell-Kontaktbildung werden zuerst *adherens junctions* geformt. Während dieser ersten Zellkontaktbildungen interagieren desmosomale Proteine mit denen der *adherens junctions* (Hanakawa *et al*, 2000). Vermittelt durch diesen *cross-talk* werden dann in einem zweiten Schritt Desmosomen ausgebildet, welche die zuvor gebildeten Primäradhäsionen weiter stabilisieren (Garrod *et al*, 2002).

In der basalen Schicht der Epidermis funktionieren Zellkontaktverbindungen synergistisch. Ein doppel-*knock out* von P-Cadherin (klassisches Cadherin) und Desmoglein 3 (desmosomales Cadherin) im Mausmodell resultierte so in einem stärkeren, prononcierteren Phänotyp als die beiden einzel-*knock outs* (Lenox *et al*, 2000). Des weiteren gibt es Hinweise, dass die Ausbildung von Desmosomen indirekt durch *adherens junctions* reguliert wird: Ein gegen E-Cadherin gerichteter Antikörper blockierte nicht nur die Bildung von *adherens junctions*, sondern darüber hinaus auch die Desmosomenformation (Gumbiner *et al*, 1998).

Zellverbindung	Cadherine	Armadilloproteine	Linkerproteine
Desmosom	Desmosomale Cadherine: Desmogleine Desmocolline	Plakoglobin Plakophiline	Desmoplakine Envoplakin Periplakin
<i>adherens junction</i>	Klassische Cadherine: E-, N-, P-Cadherin	α -Catenin β -Catenin Plakoglobin	Vinculin α -Aktinin

Tabelle 1.2: Übersicht zu den an Desmosomen- und *adherens junction*-Bildung beteiligten Proteinen

1.1.3 Komponenten und Struktur von Desmosomen

Desmosomen sind hoch organisierte adhäsive interzelluläre Verbindungen. Sie vermitteln den direkten Zellkontakt und verleihen Geweben mechanische Integrität durch Bereitstellen von Anheftungspunkten für Intermediärfilamente. Historisch gesehen wurden Desmosomen zum ersten Mal aus der Nasenepidermis der Kuh isoliert (Skerrow und Matolsky, 1974). Heute ist klar, dass die Rolle der Desmosomen in der Ausbildung interzellulärer Verbindungen besteht, die adhäsive Festigkeit von Zellstrukturen vermitteln. Belegt wird dies durch verschiedene Krankheiten des Menschen und experimentelle Mausmodelle. Hierbei werden desmosomale Proteine durch Genmutationen, Autoimmunantikörper oder bakterielle Toxine in ihrer Funktion dereguliert. Häufigstes Resultat sind epitheliale Brüchigkeit und Blasenbildung, besonders bei mechanischem Stress, was zu diversen Haut- und Herzkrankheiten führt (Amagi *et al*, 2000; Armstrong *et al*, 2001; Den *et al*, 2005; Gallicano *et al*, 2001; Gerull *et al*, 2004; Grossmann *et al*, 2004; Jahoda *et al*, 2003; McGrath, 2005; Polakis, 1995; Ruiz *et al*, 1996; Stanley, 1995; Zlotogorski *et al*, 2006).

Eine schematische Übersicht zum Aufbau von Desmosomen ist in Abbildung 1.1 gegeben. Im elektronenmikroskopischen Bild ergibt sich ein symmetrischer, scheibenförmiger Aufbau bestehend aus zwei Hauptdomänen: Die extrazelluläre Core-Domäne oder Desmoglea ist 30 nm breit und durch die elektronendichte Mittellinie halbiert, welche eine Reißverschluss-ähnliche adhäsive Schnittstelle von desmosomalen Cadherinen benachbarter Zellen repräsentiert. Parallel zur Plasmamembran verlaufen zytoplasmatische Plaques (*outer* und *inner dense plaque*), die durch weniger kondensierte Bereiche abgegrenzt sind (North *et al*, 1999). Der Durchmesser eines Desmosoms beträgt 0,5 bis 1 µm.

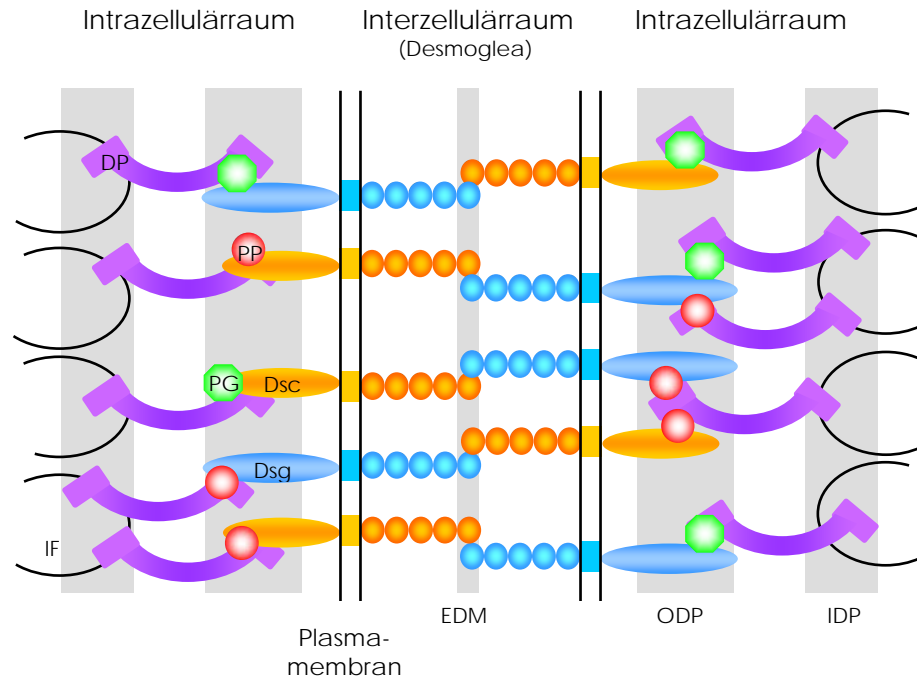


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Desmosoms

Angeedeutet durch die Plasmamembranen sind zwei benachbarte Zellen gezeigt. Die Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc) gehen im Interzellulärraum Kalzium-abhängige Verbindungen ein. Über ihren C-Terminus findet die Interaktion mit den Plakophilinen (PP), Plakoglobinen (PG) und Desmoplakinen (DP) statt. Desmoplakin verknüpft den Multiproteinkomplex mit den Intermediärfilamenten (IF).

EDM Elektronen-dichte Mittellinie, ODP *outer dense plaque*, IDP *inner dense plaque*

Die Adhäsionsmoleküle der Desmosomen sind die desmosomalen Cadherine. Im Unterschied zu den *adherens junctions* besitzen Desmosomen zwei Typen von adhäsiven Glykoproteinkomponenten, die Desmogleine und Desmocolline. Ursprünglich wurde der Begriff Desmoglein für alle desmosomalen Glykoproteine verwendet. Cowin und Kollegen führten den Terminus Desmocollin ein, um zwei Typen von Glykoproteinen zu unterscheiden, die in immunologischen Untersuchungen verschiedene Eigenschaften zu haben schienen (Cowin *et al*, 1984). Die Homologie zwischen ihnen ist nicht größer als zu den klassischen Cadherinen und liegt bei 51-55 % Identität in der Aminosäuresequenz (Huber, 2003). Gemeinsam ist den desmosomalen Cadherinen der Besitz von vier extrazellulären Cadherin-Repeats, bestehend aus je 110 Aminosäuren, sowie je einer extrazellulären Ankerdomäne, einer Membran-durchspannenden und einer zytoplasmatischen Domäne. In letzterer liegt der Hauptunterschied zwischen Desmogleinen und Desmocollinen. Nur die Desmogleine haben eine ausgedehnte intrazelluläre Domäne

mit Prolin-reicher Linkerregion gefolgt von einer *repeated unit* Domäne und der Glyzin-reichen Dsg-Terminaldomäne (Rezension in Huber, 2003).

Desmogleine und Desmocolline kommen in verschiedenen Subtypen vor, die gewebespezifisch und differenzierungsabhängig exprimiert werden (Koch *et al*, 1991). Bisher wurden für Mensch und Maus drei verschiedene Desmocolline (Dsc 1-3) beschrieben, die Produkte verschiedener Gene sind und jeweils in zwei alternativen Spleiß-Formen vorkommen. Man unterscheidet eine längere 'a' von einer kürzeren 'b' Form. Letzterer fehlt das intrazelluläre Cadherinsegment, über welches die Interaktion mit Plakoglobin, einem Armadilloprotein, stattfindet.

In der Maus sind sechs, beim Menschen vier Desmogleingene zu unterscheiden. Im Menschen bilden sie zusammen mit den Desmocollingenen ein Kluster auf Chromosom 18q12 (Hunt *et al*, 1999). In der Maus sind die desmosomalen Cadherine auf Chromosom 18 tandemartig angeordnet (Whitlock, 2003). Während die Expression der Isoformen 1 und 3 der Desmocolline (Dsc) und Desmogleine (Dsg) auf mehrschichtige und differenziertere Epithelien (beispielsweise Epidermis) beschränkt sind, kommen Dsg 2 und Dsc 2 in allen Desmosomen-bildenden Geweben, einfachen Epithelien und auch in nicht-Epithelgewebe vor (Schäfer *et al*, 1994; siehe dazu auch Tabelle 1.3). Bisher wurde die Expression von Dsg 2 und Dsc 2 für Epidermis, Zunge, Tonsillen, Lymphknoten, Luftröhre, Speicheldrüse, Magen, Darm, Niere, Blase, Leber, Milz und Myokard beschrieben (Schäfer *et al*, 1994). Dsg 4 besitzt eine hohe Homologie zu Dsg 3 und wird in den differenzierten Epithelschichten, vor allem in Speicheldrüse, Testis, Prostata und Haut, sowie von Tag 7 bis 17 während der Mausembryogenese exprimiert (Whitlock und Bower, 2003; Whitlock, 2003; Yin und Green, 2004). Die erst kürzlich beschriebenen Desmogleine 5 (Dsg 1 β) und 6 (Dsg 1 δ) der Maus sind beim Menschen bisher nicht gefunden worden. Sie besitzen hohe Homologie zu Dsg 1 und werden während verschiedener Zeitpunkte der Entwicklung gebildet (Pulkkinen *et al*, 2002; Kljuic und Christiano, 2003; Whitlock, 2003). Dsg 5 wird an Tag 17 der Embryogenese (E17) sowie in der adulten Epidermis exprimiert (Whitlock, 2003). Das Vorkommen von Dsg 6 ähnelt eher dem Expressionsmuster von Dsg 2, da es in Organen wie Epidermis, Uterus, Testis, Skelettmuskel und Gehirn zu finden ist. RT-PCR (reverse Transkriptase PCR) Ergebnisse zeigten Expression von Dsg 6 in der Leber (Kljuic und Christiano, 2003; Whitlock, 2003). In diesem Organ war zuvor nur die Expression von Dsg 2 beschrieben (Schäfer *et al*, 1994).

Dsg 1	Epidermis, Zunge, Tonsillen, Luftröhre
Dsg 2	Epidermis, Zunge, Tonsillen, Lymphknoten, Luftröhre, Speicheldrüse, Magen, Darm, Niere, Blase, Leber, Milz, Myokard
Dsg 3	Epidermis, Zunge, Tonsillen, Luftröhre
Dsg 4	Speicheldrüse, Testis, Prostata, Haut, und von Tag 7 bis 17 während der Mausembryogenese
Dsg 5	Epidermis und an Tag 17 der Mausembryogenese
Dsg 6	Epidermis, Uterus, Testis, Skelettmuskel, Leber, Gehirn

Tabelle 1.3: Expressionsmuster der Desmoglein-Isoformen

Dsg 1-4 werden sowohl beim Menschen als auch in der Maus exprimiert. Expression von Dsg 5 und 6 ist bisher nur für die Maus beschrieben.

In der Epidermis werden Dsg 2 und Dsc 2 ausschließlich in der Basalschicht exprimiert (siehe dazu auch Abb. 1.2). Die Expressionslevels von Dsg 3 und Dsc 3 sind in der basalen Schicht der Epidermis hoch und nehmen im Spinosum zum Granulosum hin stetig ab. Genau umgekehrt verhält es sich für Dsg 1 und Dsc 1, welche die stärkste Expression in der unterhalb des Corneums liegenden Schicht, dem Granulosum, haben und im Spinosum zur Basalmembran hin immer schwächer exprimiert werden. Dsg 4 wird in Granulosum und Spinosum etwa gleich exprimiert. Aufgrund dieser unterschiedlichen Verteilung der Isoformen in den verschiedenen Schichten der Epidermis liegt die Vermutung nahe, dass es während der Differenzierung zu einem *turn-over* der einzelnen Isoformen kommt. Ferner muss eine Interaktion zwischen verschiedenen Isoformen möglich sein, da auch zwischen Basalschicht und den suprabasalen Schichten Desmosomen ausgebildet werden (Legan *et al*, 1994). Ein weiterer Faktor, der zur Regulation der Expression desmosomaler Cadherine beitragen könnte, sind Hormone, welche im Tiermodell zur Umverteilung der Desmosomenexpression im Uterusepithel beitragen (Preston *et al*, 2004). Verschiedene Isoformen desmosomaler Cadherine können innerhalb eines Desmosoms vorkommen (North *et al*, 1996). Dabei werden leichte Veränderungen in der Cadherinstöchiometrie bei der Desmosomenbildung toleriert. Diese ist aber sensitiv in Bezug auf die Isoform-spezifischen Unterschiede in Dsc und Dsg. Transfektion von ausschließlich Dsg 2 exprimierenden Zellen mit Dsg 1 verhinderte die Neubildung von Desmosomen und führte zu Unterbrechung bereits bestehender Zellkontakte (Ishii *et al*, 2001).

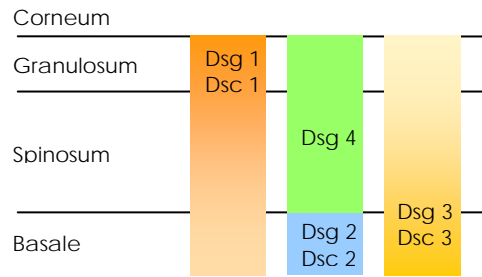


Abb. 1.2: Differenzierungsabhängige Expression desmosomaler Cadherine in der Epidermis

Schematische Darstellung der Epidermis, in deren Schichten die verschiedenen desmosomalen Cadherine zu unterschiedlichen Anteilen exprimiert werden. Die Farbintensität der Balken korreliert mit der Expressionsstärke. Angelehnt an Yin und Green, 2004.

Dsg Desmoglein, Dsc Desmocollin

Im N-terminalen, glykosylierten, interzellulären Bereich gehen die Desmogleine und Desmocolline Kalzium-abhängige, heterophile Bindungen miteinander ein (Chitav und Troyanovsky, 1997) und formen so die elektronendichte Mittellinie der Desmoglea (Schäfer *et al*, 1994; siehe auch Abb. 1.1). Homophile Bindungen wie bei den *adherens junctions* kommen kaum vor und sind, wenn sie ausgebildet werden, sehr schwach (Marcozzi *et al*, 1998; Syed *et al*, 2002). Über ihren im Zytoplasma liegenden C-terminalen Bereich sind die desmosomalen Cadherine mit den Armadilloproteinen Plakoglobin (PG) und Plakophilin (PP) im *outer dense plaque* verbunden. Dabei sind für die Interaktion von Desmogleinen mit Plakoglobin die letzten 41 Aminosäuren der C-terminalen Domäne des Cadherins notwendig (Troyanovsky *et al*, 1994).

Die zur Gruppe der Armadilloproteine gehörenden Moleküle PP und PG stellen wichtige funktionelle und strukturelle Komponenten des Desmosoms dar und sind im *outer dense plaque* lokalisiert. Plakoglobin ist ein 86 kDa großes Protein mit Homologie zu β -Catenin in *adherens junctions* und dem in *Drosophila melanogaster* vorkommenden Protein Armadillo, welches in einem Signalweg zur Etablierung der Segmentpolarität beteiligt ist und in Antwort auf die Expression des Proteins *wingless* hochreguliert wird (Riggelman *et al*, 1990). Das Vertebraten-Homolog zu *wingless*, Wnt-1, führt zu erhöhter Expression von Plakoglobin und β -Catenin und induziert Veränderungen in Zellform, Adhäsion und Proliferation (Cowin und Burket, 1996). Des Weiteren führt das Proteinprodukt eines Tumorsuppressorgens (APC, *adenomatous polyposis coli*) in humanem Darmkrebs zur Herunterregulation von PG und β -Catenin (Polakis, 1995). Mutationen in PG führen zu einer unter dem Namen *Naxos Disease* bekannt gewordenen Krankheit, die sich durch Verhornung der Haut,

ARVC (*arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*) und Veränderungen in der Haarstruktur (*woolly hair*) auszeichnet (Rezension in McGrath, 2005). Plakoglobin setzt sich aus einem N-terminalen Bereich, einer zentralen Domäne mit 12 Arm (Armadillo)-*repeats* sowie einem C-terminalen Bereich zusammen. Ein Arm-*repeat* besteht aus 42 Aminosäuren, die 3 α -Helices ausbilden, welche eine rechtsdrehende Superhelix formen. Zusammen bilden sie eine positiv geladene Grube, die eine Bindestelle für Liganden wie z.B. Cadherine darstellt (Huber *et al.*, 1997). Homozygote Plakoglobin Nullmutationsmäuse sterben an Tag 12 bis 16 der Embryogenese aufgrund von Herzfehlern (Ruiz *et al.*, 1996). Im Herz der *knock out* Embryonen werden keine Desmosomen gebildet, wodurch die Herzventrikel zerplatzen und Blut ins Perikard fließt (Ruiz *et al.*, 1996). Plakoglobin kommt als einziges an der Desmosomenbildung beteiligtes Protein auch in *adherens junctions* vor, wo es E-Cadherin mit Akinfilamenten verbindet (Rezension in Kitajima, 2002). Die Vermutung einer Interaktion zwischen den Proteinen dieser beiden Zellverbindungen liegt aufgrund dessen nahe. Wie bereits erwähnt, führt Blockade der *adherens junctions* dazu, dass auch die Desmosomenbildung verhindert wird. Bindung von Plakoglobin an E-Cadherin und die Ausbildung von *adherens junctions* könnte somit Grundvoraussetzung für die Ausformung von Desmosomen sein. Die Affinität von Plakoglobin für die Bindung an Cadherine ist am größten für Dsg, dann Dsc und am geringsten für die Assoziation mit E-Cadherin (Chitaev, 1996).

Man unterscheidet drei Spleißvarianten von Plakophilin (PP 1-3), wobei PP 1 ursprünglich als „Bande 6 Protein“ und zusätzliches desmosomales Plaqueprotein aus komplexen Epithelien in Anbindung an Keratin isoliert wurde (Mertens *et al.*, 1996). Gleich den desmosomalen Cadherinen, werden die Plakophiline differenzierungsabhängig exprimiert. Plakophilin 1 findet man in mehrschichtigen und komplexen Epithelien, PP 2 in den Desmosomen vieler Zelltypen und PP 3 in einfachen und komplexen Epithelien (North *et al.*, 1999). Die Plakophiline sind homolog zu p120^{ctn}, einem Tyrosinkinasesubstrat, welches mit E-Cadherin assoziiert und in Zelladhäsion sowie Signaltransduktion involviert ist (Rezension in Huber, 2003). Ebenso wie Plakoglobin kommen PP 1 und PP 2 auch im Nukleus vor. In Zellen ohne Desmosomen, wie zum Beispiel Lymphozyten, sind die Plakophiline ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Huber, 2003). Über ihre N-terminale Kopfdomäne findet die Interaktion mit Desmogleinen, Desmocollinen, Desmoplakinen und Plakoglobin statt. Diese Brückenfunktion spielt eine Rolle bei

der Organisation des desmosomalen Plaques. Die aus 10 *Arm-repeats* bestehende Armadillo-Domäne ist wahrscheinlich zur Regulierung der Interaktion mit Aktinfilamenten notwendig (Kitajima, 2002). Verlust von PP 1 führt zu einer autosomal rezessiven Störung in der Haut (*skin fragility ectodermal-dysplasia syndrome*), die sich durch Blasenbildung und Verkrustungen der Epidermis, besonders im Bereich des Mundes sowie an Handflächen und Fußsohlen auszeichnet (Rezension in McGrath, 2005). *Knock out* Mäuse von PP 2 zeigten an Tag 10,5 (E10,5) embryonale Letalität (Grossmann *et al*, 2004). Fehlerhafte Anordnung im Zytoskelett des Herzens führte in diesen Tieren zum Auslaufen des Blutes in die Peritonealhöhle. Da Epithelien aber normale Zellverbindungen zeigten, liegt der Schluss nahe, dass PP 2 eine essenzielle strukturelle Komponente des Herzens darstellt. In Korrelation dazu wurden bei 32 von 120 Patienten mit ARVC verschiedene Mutationen in PP 2 gefunden (Gerull *et al*, 2004). Verlust von PP 2 verhindert die Ausbildung von Zellkontakten im Herzen und kann bei starker mechanischer Beanspruchung zum plötzlichen Herztod führen, was vor allem bei Sportlern in der Vergangenheit nachgewiesen wurde (Rezension in McGrath, 2005).

Plakine sind Linkerproteine, welche Membranproteine und Keratinintermediärfilamente miteinander verbinden. In Desmosomen findet man hauptsächlich Desmoplakin (DP) 1 und 2, und zu geringeren Anteilen Envoplakin und Periplakin. Die 250 kDa und 220 kDa großen Isoformen von Desmoplakin entstehen durch alternatives *Splicing* und liegen im *outer* und *inner dense plaque* des Desmosoms (Abb. 1.1). In der N-terminalen Plakindomäne befinden sich Bindestellen für Plakoglobin und Plakophilin. Über den aus drei Plakin-*repeat* Domänen bestehenden globulären C-Terminus findet die Interaktion mit den Intermediärfilamenten statt und durch die zentrale coiled-coiled Domäne können parallele Dimere gebildet werden (Smith und Fuchs, 1998). Desmoplakine können über Armadillo-unabhängige Domänen im C-terminalen Bereich von Desmoglein auch direkt Interaktionen mit diesem eingehen (Garrod *et al*, 2002). Autosomal rezessive Mutationen in DP führen zum so genannten Carvajal Syndrom, welches sich ähnlich der *Naxos Disease* (Verhornung der Haut, ARVC, *woolly hair*) äußert (Rezension in McGrath, 2005).

In Tabelle 1.4 ist eine Übersicht zu den Mutationen in desmosomalen Proteinen und den daraus resultierenden Phänotypen gegeben.

Gen	Mutation/Transgen	Phänotyp
Desmoglein 1	α -Dsg 1 IgG	<i>Pemphigus foliaceus</i>
	Serinprotease (<i>S. aureus</i>)	epitheliale Blasenbildung
Desmoglein 2	<i>knock out</i> Maus	embryonal letal
	Mutationen	ARVC
Desmoglein 3	α -Dsg 3 IgG	<i>Pemphigus vulgaris</i>
	<i>knock out</i> Maus	Hautverkrustung, Haarverlust, orale Läsion
Desmoglein 4	Mutationen	LAH, Monilethrix
Plakoglobin	<i>frameshift</i> Mutation	<i>Naxos Disease</i>
	<i>knock out</i> Maus	embryonal letal (Herzfehler)
Plakophilin 1	Nullmutation	<i>skin fragility ectodermal-dysplasia syndrome</i>
Plakophilin 2	<i>knock out</i> Maus	embryonal letal (keine Zellkontakte im Herz)
	verschiedene Mutationen	ARVC
Desmoplakin	Mutation	Carjaval Syndrom

Tabelle 1.4: Desmosomale Proteine in Entwicklung und Krankheit

ARVC *arhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*, LAH *localized autosomal recessive hypotrichosis*

Desmosomen entstehen ab dem 32 Zell-Stadium im Trophoektoderm der Maus (Garrod *et al*, 1996). Durch Regulation der Transkription wird das Expressionsmuster desmosomaler Cadherine und deren Einbau in die Zellverbindungen spezifiziert. Dadurch werden die Funktionen der Proteine in Adhäsion und Morphogenese in verschiedenen Zellen und komplexen Geweben reguliert (Yin und Green, 2004). Aufbau und Degradation von Desmosomen wird posttranskriptionell durch Kalziumionen, Kinase/Phosphatase-Aktivität, proteolytische Prozessierung und *cross-talk* mit *adherens junctions* reguliert (Yin und Green, 2004). Bei Kalziumkonzentrationen unterhalb von 0,1 mM werden in nicht konfluenten Keratinozytenkulturzellen keine Desmosomen mehr ausgebildet. (Hennings *et al*, 1983). *In vivo* spielt dieser regulatorische Mechanismus wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle, da die physiologische Kalziumkonzentration oberhalb von 0,1 mM liegt. Eine Ausnahme stellen *Hailey-Hailey Disease* und *Darier's Disease* dar. Durch Mutationen in Kalzium-ATPasen kommt es hier zu desmosomaler Fehlfunktion und damit zum Verlust der Zelladhäsion (Hu *et al*, 2000). Durch Aktivierung und Inhibition von Proteinkinase C (PKC) verändern Desmosomen ihre Adhäsionseigenschaften. Konfluente Kulturzellen bilden Desmosomen Kalzium-unabhängig aus. Durch Verletzung einschichtiger Zellrasen transloziert PKC in die Zellperipherie, wo die Kinase durch Phosphorylierung desmosomaler Proteine bewirkt, dass die Bildung von Desmosomen wieder Kalzium-abhängig wird (Garrod *et al*, 1996; Gaudry *et al*, 2001; Wallis *et al*, 1999). Durch posttranslationale Ereignisse wird die Menge an nicht in den Desmosomen vorkommendem Plakoglobin

sowie Plakophilin 1 und 2 gesteuert, welche über Importin in den Nukleus gelangen (Cowin und Burket, 1996; Huber, 2003).

Die Bildung der Desmosomen besteht also aus drei miteinander verwobenen Prozessen: adhäsive Interaktion zwischen den Cadherinen, Cadherinklusterbildung und Verankerung der Cadherine ans Zytoskelett (Gloushankova *et al*, 2003). Zuerst werden die desmosomalen Cadherine an der Zelloberfläche exprimiert und bilden im Intrazellulärraum Verbindungen miteinander aus. Über Interaktion mit den zytoplasmatischen desmosomalen Proteinen findet dann die Verknüpfung mit den Intermediärfilamenten statt (Huber, 2003).

Während der epidermalen Differenzierung migrieren Keratinozyten von der Basalschicht zum Corneum. Diese dynamische und organisierte Zellwanderung erfordert ständigen Auf- und Abbau der Desmosomen (Kitajima, 2002). Desmosomen sind daher keine statischen Strukturen, sondern eher dynamische Einheiten, die Zellbeweglichkeit innerhalb der Epidermis erlauben. In *time-spacing* Diagrammen wurde gezeigt, dass desmosomale Positionierung streng reguliert ist, auch während Veränderungen in der Zellform (Windoffer *et al*, 2002).

Wie bereits erwähnt, existieren mehrere natürlich vorkommende humane Genmutationen in desmosomale Komponenten, welche in vor allem das Herz und die Haut betreffenden Krankheiten resultieren. Auf die mit den desmosomalen Cadherinen verknüpften Krankheiten wird im folgenden näher eingegangen. Bei den Autoimmunkrankheiten vom *Pemphigus*-Typ resultiert die Blasenbildung der Haut aus dem Verlust der Zell-Zell-Kontakte (Stanley, 1995). Bei *Pemphigus foliaceus* findet der Verlust der Zellkontaktbildung im Granulosum, der oberen Schichten der Epidermis, statt und wird durch Autoantikörper gegen Dsg 1 herbeigeführt. Autoantikörper gegen Dsg 3 führen zum Zelladhäsionsverlust von tiefer in der Epidermis liegenden Schichten oberhalb der Basalmembran und resultieren im Krankheitsbild des *Pemphigus vulgaris* (PV). Die Antikörper binden in beiden Krankheiten an die extrazelluläre Domäne der Cadherine und können sowohl in der Haut als auch im Serum der Patienten nachgewiesen werden (Garrod *et al*, 2002; Stanley, 1995). Dsg 3 *knock out* Mäuse zeigten normales Aussehen zum Zeitpunkt der Geburt, hatten jedoch an Tag 8-10 deutlich geringeres Gewicht als nicht-transgene Geschwistertiere (Koch *et al*, 1997). Dies resultierte aus Inhibition der

Nahrungsaufnahme durch orale Läsionen, welche typisch für *Pemphigus vulgaris* sind. Des Weiteren zeigten Dsg 3 *knock out* Mäuse Verkrustung der Haut und Haarverlust. Dieser Phänotyp ähnelt dem der *balding (bal)* Mausmutante, welche eine Mutation im Dsg 3 Gen trägt (Koch *et al*, 1997). Shimizu und Kollegen zeigten mit Hilfe eines PV Mausmodells, dass anti-Dsg 3 Antikörper Dsg 3 direkt in den Desmosomen binden können, wodurch es zu Separierung der Desmosomen und zur Blasenbildung in der Epidermis kommt (Shimizu *et al*, 2004). Bei mit *Staphylococcus aureus* infizierten Patienten spaltet die bakterielle Serinprotease Dsg 1, was in Inaktivierung von Dsg 1 resultiert und sich in epithelialer Blasenbildung äußert (Amagi *et al*, 2000). Mutationen in Dsg 4 resultieren in Hautkrankheiten wie *localized autosomal recessive hypotrichosis (LAH)* und *Monilethrix*, einem angeborenen Defekt des Haares (Jahoda *et al*, 2003; Zlotogorski *et al*, 2006). Zudem wurden Autoantikörper gegen Dsg 4 in *Pemphigus vulgaris* detektiert (Kljuic *et al*, 2003). Fehlerhafte Regulation von Dsg 2 und mit diesem desmosomalen Cadherin in Zusammenhang zu bringende Krankheiten werden im Abschnitt über Dsg 2 (1.2) besprochen und erste funktionelle Daten zur Deregulierung von Dsg 2 in der adulten Maus werden im Ergebnisteil vorgestellt.

Interessanterweise stehen Funktion und Deregulierung von desmosomalen Proteinkomplexen nicht nur in ursächlichen Zusammenhang mit Herz-, Haut- und Autoimmunkrankheiten, sondern sind darüber hinaus mit Krebserkrankungen assoziiert. Bei wenig differenzierten Karzinomen und schuppigen Zellkarziomen (SCC, *squamous cell carcinoma*) wurde berichtet, dass die Expression der Desmosomen herunterreguliert wird (Davies *et al*, 1999; Garrod, 1995; Hardman *et al*, 2005). Dies deutet auf eine mögliche Funktion desmosomaler Proteine als Suppressor der Metastasierung hin, welches aufgrund der strukturellen Rolle der Desmosomen (Zelladhäsion und Gewebestabilität) denkbar wäre. Es gibt aber auch Tumore mit intakten Desmosomen (Garrod, 1995). Für eine Metastasierung dieser Tumore müsste ein Mechanismus postuliert werden, welcher temporär die adhäsive Affinität der metastasierenden Zellen moduliert. Transfektion von Dsg, Dsc und PG in nicht-adhärenenten Fibroblasten führte zu deren Adhäsion sowie Verhinderung von Invasion auf Kollagengel (Tselepis *et al*, 1998). Daraus ist zu schließen, dass desmosomale Adhäsion die Invasion, zumindest in Kulturzellen, stoppen kann.

Weiter deutet die differenzierungsabhängige und gewebespezifische Verteilung der verschiedenen Isoformen desmosomaler Cadherine darauf hin, dass desmosomale

Komponenten zusätzlich zu ihrer strukturegebenden Funktion ebenfalls eine wichtige Rolle für die Morphogenese und Differenzierung verschiedener Gewebe, besonders der Epidermis, haben könnten.

1.2 Desmoglein 2

Desmoglein 2 ist das größte und am weitesten verbreitete desmosomale Cadherin. Es wird in allen Desmosomen-tragenden Zellen, auch in einfachen Epithelien wie dem Darmepithel, gebildet (Schäfer *et al*, 1994). Damit ist es in einigen Organen (Lymphknoten, Magen, Darm, Niere, Blase, Myokard) das einzige exprimierte Desmoglein. Des weiteren unterscheidet es sich in seiner Aminosäuresequenz stärker von den anderen Desmogleinen als diese untereinander (Schäfer *et al*, 1994). In Zusammenhang mit Dsg 2 wurden bisher keine zu einer Hautkrankheit führenden Autoantikörper beschrieben, wie es für Dsg 1 (*Pemphigus foliaceus*) und Dsg 3 (*Pemphigus vulgaris*) der Fall ist. Fehlerhafte Expression von Dsg 2 steht in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen. Davies und Kollegen konnten in humanem Brustkrebsgewebe kein Dsg 2 detektieren, welches in normalem Brustgewebe vorhanden war (Davies *et al*, 1997). Eine Voraussetzung für die Bildung von Metastasen ist der Verlust der Zelladhäsion. Reduzierte oder fehlende Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie Dsg 2 scheinen dabei eine Rolle spielen zu können. In Magenkarzinomen, besonders denen des diffusen Typs, wurde eine reduzierte und/oder nicht mit der Membran assoziierte Expression von Dsg 2 gefunden (Biedermann *et al*, 2005). Bei Patienten mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung *Colitis ulcerosa* sind einige Gene der Zelldifferenzierung, unter anderem Dsg 2, dereguliert (Fukushima *et al*, 2003). In Zusammenhang mit einer nicht-entzündlichen Erkrankung des Herzens, der ARVC (*arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*), wurden Dsg 2 Genmutationen gefunden (Awad *et al*, 2006; Pilichou *et al*, 2006). In Kardiomyozyten, in denen Dsg 2 das einzige Desmoglein ist, führte Dsg 2 Funktionsstörung zum für ARVC typischen Ersatz der Kardiomyozyten durch Fettzellen sowie zur Umbildung der Desmosomen. Inaktivierung von Dsg 2 durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen führte im Mausmodell zu früher embryonaler Letalität (Eshkind *et al*, 2002). Alle homozygoten und auch einige heterozygote *knock out* Embryonen starben

während oder kurz nach der Implantation. Die Blastozysten bildeten zwar eine normale Trophoektodermis aus, in welcher normalerweise die ersten Desmosomen gebildet werden, doch kam es aufgrund des Fehlens von Dsg 2 zu gestörter Verteilung von Desmoplakin. Dieses wurde nicht mehr an den Zellgrenzen zur Ausbildung der Zellkontakte lokalisiert, sondern war diffus im Zytoplasma verteilt (Eshkind *et al*, 2002). Des Weiteren wird Dsg 2 für die Proliferation von embryonalen Stammzellen gebraucht (Eshkind *et al*, 2002). Dies deutet auf eine Funktion von Dsg 2 hin, die unabhängig der Desmosomenbildung ist. Diese Funktion muss darüber hinaus essenziell für die normale Entwicklung des Embryos sein. In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von Dsg 2 mittels induzierbarem *in vivo knock down* untersucht werden. Dazu wurde die Technologie der RNA Interferenz verwendet, die in den folgenden Kapiteln näher vorgestellt wird.

1.3 Kleine regulatorische RNAs

Die Bezeichnung „RNA Welt“ prägte die Beschreibung eines hypothetischen Zeitraumes in der Evolution vor vier Milliarden Jahren, als RNA das genetische Material und Katalysator entstehender Lebensformen war (Gilbert, 1986). Diese ursprüngliche RNA Welt ist längst vergangen, aber einige Prozesse in unseren Zellen reflektieren eine RNA Welt, die lebendig ist: RNA Interferenz (RNAi). Dieser in Eukaryoten evolutionär konservierte Mechanismus spielt eine essenzielle Rolle in der Vermittlung einer protektiven Antwort als Schutz gegen exogene RNAs, beispielsweise von Viren, sowie in der Stabilisierung des Genoms durch Repression des Springens mobiler genetischer Elemente und ist darüber hinaus an der Etablierung des *silencing* von Heterochromatinkomponenten beteiligt (Hall *et al*, 2002; Li *et al*, 2002; Pal-Badhra *et al*, 2004; Shi, 2002; Sijen und Plasterk, 2003; Szittyá *et al*, 2002; Volpe *et al*, 2002). Exposition mit fremden genetischen Material führt in den meisten Organismen zum „*Silencing*“ der fremden Nukleinsäuren. Im Zentrum dieses „Immunmechanismus“ steht dsRNA (doppelsträngige RNA). Diese induziert Sequenz-spezifisches post-transkriptionelles *Gensilencing*, einen Mechanismus, der als RNA Interferenz bezeichnet wird (Fire *et al*, 1998).

Funktionale Beschreibung des RNAi Mechanismus erfolgte nach Untersuchungen in *C. elegans*, die zeigten, dass dsRNA eine effektivere Interferenz der Ziel-mRNA lieferte als die jeweiligen Einzelstränge (Fire *et al*, 1998; Guo und Kemphus, 1995).

Die sequenzspezifischen Mediatoren von RNAi stellen 21 und 22 Nukleotid (nt) lange RNA Fragmente dar, welche als *small interfering RNA* (siRNA) bezeichnet werden und durch Prozessierung aus dsRNA Molekülen entstehen (Elbashir *et al*, 2001). *Silencing* Phänomene wie RNAi, post-transkriptionelles Gen-*Silencing* (PTGS) in Pflanzen, Co-Suppression und *Quelling* in Pilzen haben einen gemeinsamen Funktionsmechanismus, der wahrscheinlich in einem gemeinsamen Vorläufer entstanden ist (Elbashir *et al*, 2001; Mello und Conte, 2004).

Neben den siRNAs gibt es eine weitere Klasse kleiner regulatorischer RNAs, die microRNAs (miRNAs; Ambros, 2001; Lagos-Quintana *et al*, 2001). Zu den ursprünglich als stRNAs (*small temporal RNAs*) bezeichneten kleinen RNAs lin-4 und let-7, welche die zeitliche Entwicklung von *C. elegans* regulieren, wurden viele ähnliche, zum Teil hoch konservierte, Genprodukte in Invertebraten und Vertebraten gefunden, die nicht nur in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, sondern auch zelltypspezifisch exprimiert wurden. Daher wurde diese Klasse regulatorischer RNAs unter dem Namen miRNA zusammengefasst (Lagos-Quintana *et al*, 2001). Die miRNAs sind definiert als einzelsträngige, 22 nt lange RNAs, welche mittels RNase III Enzym Dicer aus einem 70 nt langen *hairpin*-Vorläufer (pre-miRNA) entstehen (Kim und Nam, 2006; siehe auch Abb. 1.2). Eine der so entstandenen miRNAs wird abgebaut (miR* oder *meir star*). Die andere (reife miRNA) assoziiert mit RISC (*RNA-induced silencing complex*) und bindet an eine komplementäre mRNA Sequenz (Tomari und Zamore, 2005). Dabei ist auch partielle Anbindung der miRNA möglich, so dass die miRNAs je nach Grad der Komplementarität zum Abbau einer spezifischen mRNA (miRNA Sequenz über die ganze Länge komplementär zur mRNA) oder Blockade der Translation durch *missmatch*-Basenpaarungen führen (Bonetta, 2004; Jackson und Linsley, 2004). Somit kann eine miRNA mehrere mRNAs zum Ziel haben und umgekehrt eine mRNA von verschiedenen miRNAs reguliert werden. Transkription der in inter-Gen Regionen oder in *antisense*-Orientierung eines Gens liegenden miRNAs findet mittels RNA Polymerase II statt (Lagos-Quintana *et al*, 2001; Lee *et al*, 2004). Das Primärtranskript (pri-miRNA) wird durch Drosha und DGCR8 (Di George Syndrom *Critical Region Gen 8*; Pasha in *Drosophila* und *C. elegans*) in eine pre-miRNA prozessiert (Tomari und Zamore,

2004), bevor es mittels Exportin 5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert wird (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003; siehe dazu auch Abb. 1.3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bisher zwei post-transkriptionell wirksame kleine regulatorische RNA-Spezies entdeckt wurden: Die siRNA und die miRNA.

1.3.1 Mechanismus der RNA Interferenz

Induziert wird die RNAi *Silencing* Kaskade durch dsRNA, die homolog der reprimierenden mRNA ist. Dicer, ein Enzym der RNase III Familie, erkennt und prozessiert die dsRNA unter ATP-Verbrauch in 21 nt lange siRNA Moleküle mit charakteristischem 3' Überhang von 2 Nukleotiden, einem 5' Phosphat- und einem 3' Hydroxy-Terminus (Bernstein *et al.*, 2001; Hutvagner und Zamore, 2002). Im nächsten Schritt bindet die siRNA an einen Multiproteinkomplex bestehend aus Helikase, Endonuklease, Exonuklease und „*homology searching element*“, um RISC (RNA-induced silencing complex) zu formen (Hammond *et al.*, 2000). Die Helikase führt mittels ATP zur Entwindung der doppelsträngigen siRNA in einzelsträngige Moleküle (Nykanen *et al.*, 2001), wobei RISC aktiviert wird. Einer der RNA-Stränge (*guide strand*) bleibt an den Multiproteinkomplex gebunden, der andere (*passanger strand*) wird degradiert. Der aktivierte RISC sucht nach zur siRNA homologen mRNA Sequenz und bindet an diese (Nykanen *et al.*, 2001). Durch die Aktivität von Exo- und Endonuklease wird die mRNA anschließend degradiert. Diese mRNA Degradation resultiert so in einer Blockade der Proteinsynthese und führt somit zu einer Herunterregulierung des entsprechenden Genprodukts. In Abbildung 1.3 ist der Mechanismus von siRNA und miRNA schematisch dargestellt.

In Pflanzen und bei Würmern, nicht aber bei *Drosophila* und Säugern, gibt es einen zusätzlichen Amplifikationsmechanismus, der als sekundäre oder *transitive* RNAi bezeichnet wird (Tomari und Zamore, 2005). Eine RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP) amplifiziert dabei dsRNA unter Verwendung der mRNA als Matrize und der im ersten Schritt entstandenen einzelsträngigen siRNA als Primer. Dicer spaltet diese dsRNA in siRNA Moleküle, welche zu Degradation der mRNA führen (Hutvagner und Zamore, 2002; Schiebel *et al.*, 1993; Waterhouse *et al.*, 1998).

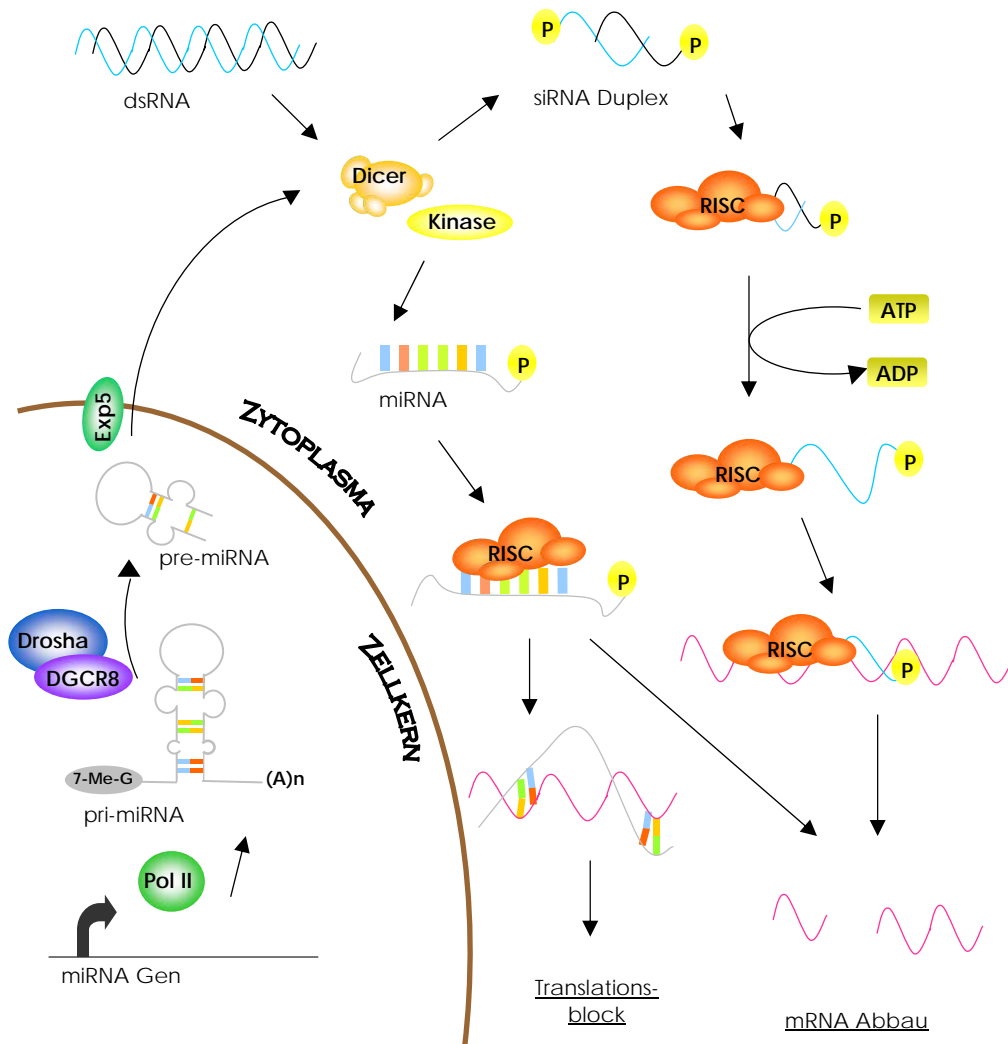


Abb. 1.2: Mechanismus von siRNA und miRNA

Schematische Darstellung der siRNA (*small interfering RNA*) und miRNA (*microRNA*) Maschinerie in einer Säugerzelle. Zu erkennen ist die unterschiedliche Entstehungsweise der kleinen regulatorischen RNAs. Beide werden mittels Dicer prozessiert und führen zusammen mit RISC (*RNA-induced silencing complex*) ihre Funktion, die sequenzspezifische Repression der Genexpression, über Translationsblock oder Abbau der mRNA, aus.

Pol II RNA Polymerase II, pri-miRNA *primary* miRNA, 7-Me-G 7-Methylguanosin *Cap*-Sequenz, DGCR8 Di George Syndrom *Critical Region Gen 8*, Exp5 Exportin 5, dsRNA doppelsträngige RNA, Dicer RNase III Enzym, P Phosphat, ATP Adenosintriphosphat, ADP Adenosindiphosphat

1.3.2 Anwendungsbereiche von RNAi

Bevor RNAi als experimentelles Werkzeug zur Herunterregulation von Genen in Säugerzellen verwendet werden konnte, waren einige Hürden zu bewältigen, da lange dsRNA in Säugerzellen einen antiviralen Mechanismus auslöst (Bonetta, 2004; Elbashir *et al*, 2002; Li *et al*, 2002; Manche *et al*, 1992; Szittyta *et al*, 2002). Diese angeborene Interferon-regulierte Antwort aktiviert unter anderem die Proteinkinase PKR und resultiert in unspezifischem Abbau von RNA Transkripten und generellem

shut down der Proteinsynthese in der Wirtszelle (Rezension in Shi, 2002). Die Existenz des antiviralen Mechanismus war zunächst inkompatibel mit der Nutzung von RNAi in Säugerzellen (Caplen *et al*, 2000). Pasquinelli und Kollegen fanden eine aus *Caenorhabditis elegans* bekannte kleine regulatorische RNA, die *let-7* RNA, in verschiedenen Tierspezies (Pasquinelli *et al*, 2000). Dadurch war der Beweis erbracht, dass kleine dsRNA Moleküle auch in Säugern den RNAi Signalweg vermitteln können.

Durch Transfektion, Elektroporation oder Mikroinjektion von siRNA Molekülen in Zellen oder Organismen kann lediglich transiente Repression der Genexpression erreicht werden (Caplen *et al*, 2001; Tuschl, 2002). Zudem ist chemische oder enzymatische und damit kostenintensive Synthese von siRNAs eine Voraussetzung dieser Technik. Kontinuierliche Expression von siRNA kann mit Hilfe von Plasmiden erreicht werden. RNA Polymerase III Promotoren wie U6 (murine *small nuclear* RNA) oder H1 (Histon 1) transkribieren kleine, nicht-kodierende Transkripte von bis zu 400 nt Länge. Transkriptionsinitiation erfolgt an definierten Nukleotiden und die Termination wird durch 4 oder 5 aufeinander folgende Thymidinnukleotide erreicht (Shi, 2002; Tuschl, 2002). So wird die Expression konstruierter siRNAs möglich, die denen der natürlicherweise vorkommenden kleinen RNA-Spezies ähneln. Es gibt zwei Methoden zur Transkription von siRNA in Plasmiden: entweder werden *sense* und *antisense* Strang von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert oder die Expression erfolgt als *hairpin*-Struktur (shRNA, *short hairpin* RNA), die intrazellulär in eine siRNA prozessiert wird. In der Literatur sind verschiedene, zum Teil virale Vektorsysteme zur Expression von siRNAs beschrieben, wobei einige durch Verwendung des Cre/loxP-Systems oder eines Tetrazyklin-induzierbaren Promoters schaltbare Expression der siRNA zu bestimmten Zeitpunkten oder in bestimmten Geweben ermöglichen (Bridge *et al*, 2003; Brummelkamp *et al*, 2002; Chang *et al*, 2004; Czauderna *et al*, 2003; Guo *et al*, 2003; Hasuwa *et al*, 2002; Hosono *et al*, 2004; Rubinson *et al*, 2003; Stegmeier *et al*, 2005; van de Wetering *et al*, 2003; Ventura *et al*, 2004).

Beachtet werden muss die Tatsache, dass RNAi keinen kompletten Funktionsverlust bewirkt wie ein *knock out*, sondern eher einen *knock down*, eine Herunterregulation des Zielgens, erreicht (Shi, 2002). Dies kann für Gendosis Effekt-Studien im Fall eines graduellen *knock downs* von Vorteil sein, oder bei mildem *knock down* die Untersuchung eines partiellen Genverlusts ermöglichen (Prawitt *et al*, 2004).

Die Spezifität des *Silencing* ist nicht absolut. So genannte *off-target* Effekte, beispielsweise durch Aktivierung von PKR, wurden auch für dsRNAs, shRNAs oder siRNAs mit weniger als 30 nt Länge beschrieben (Oates *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2001; zusammengefasst in Jackson und Linsley, 2004).

RNAi kann als genetische Methode nicht nur neue Einblicke in die Funktion von Genen geben, sondern auch praktischen Fortschritt in Behandlung von Krankheiten bringen. Therapeutische Potenziale von RNAi liegen in Spezifität und Aktivität, mit der die Genexpression inhibiert wird. Probleme stellen bisher Applikation und eventuelle Toxizität dar (Hannon und Rossi, 2004). Das wichtigste Argument, welches den Einsatz von siRNA oder miRNA in der Therapie vielleicht möglich machen wird, ist, dass kleine regulatorische RNAs nicht vom Immunsystem erkannt und abgewehrt werden. Diese Eigenschaft macht diese somit den Proteinen überlegen, welche in vielen Fällen vom Immunsystem erkannt werden und so für den therapeutischen Zweck im Menschen unbrauchbar sind.

Heute ist RNAi eine Standardmethode zur Repression der Expression spezifischer Gene (Czauderna *et al*, 2003; Hasuwa *et al*, 2002; Hong *et al*, 2006; Kissler *et al*, 2006; McCaffrey *et al*, 2002; Uprichard *et al*, 2005; Soutschek *et al*, 2004; Ryo *et al*, 2005; Sørensen *et al*, 2003; Urban-Klein *et al*, 2004; Yano *et al*, 2004). Diese Methode eignet sich auch für solche Tiersysteme, bei denen bisher keine embryonalen Stammzellen zur Generierung von *knock outs* zu Verfügung standen (Hasuwa *et al*, 2002). Die Herunterregulation des Zielgens kann durch Generierung transgener Tiere (Mikroinjektion des siRNA oder shRNA exprimierenden Plasmids oder Virus) oder Injektion der siRNA in adulte Tiere (beispielsweise intravenös oder in das Zielorgan) erreicht werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde RNAi zur Generierung eines Dsg 2 *knock down* Mausmodells genutzt.

Der in dieser Doktorarbeit gezeigte *in vivo knock down* von Dsg 2 und der beobachtete Phänotyp ist einer der ersten Demonstrationen einer konditionalen Inaktivierung einer essenziellen Genfunktion.

1.4 Zielsetzung

Ziel der Doktorarbeit war die Untersuchung der Funktion von Desmoglein 2 in Gewebekomöostase und Karzinogenese. Dies sollte durch Generierung eines über Cre/lox-induzierbaren siRNA Mausmodells erreicht werden, um die im *knock out* detektierte embryonale Letalität zu umgehen. Dazu war geplant, die im Rahmen dieser Dissertation generierte Dsg 2 *knock down* Maus mit verschiedenen Treibermäusen zu verpaaren, die exogene Kontrolle der Cre Rekombinase auf Proteinebene zulassen. Damit sollte es möglich werden, die embryonale Letalität zu vermeiden, und die Funktion von Dsg 2, besonders im Hinblick auf Krankheitsmodelle, zu analysieren.

Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der induzierbaren Cre *Deleter knock in* Maus Rosa26CreER^{T2} in Zusammenarbeit mit Prof. Anton Berns (*The Netherlands Cancer Institute, Division of Molecular Genetics and Center of Biomedical Genetics, Amsterdam, NL*).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Biomax MS Röntgenfilme	Sigma (Deisenhofen, D)
Braun-H ₂ O (<i>Aqua ad iniectabilia</i> Braun)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Corex II Röhrchen	DuPond (Bad Homburg, D)
Einmalküvetten	Braun (Melsungen, D)
Einmalpipetten	Greiner (Frickenhausen, D)
Elektroporationsküvetten 2mm	PeqLab (Erlangen, D)
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
Falkonfilter, steril (100 µm Nylon Zellsieb)	Greiner (Frickenhausen, D)
Falkonröhrchen, steril (15 ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
Glaswolle	Merck (Darmstadt, D)
Injektionsspritzen	Henke Sass Wolf (Tuttlingen, D)
Liquid Blocker Super Pap Pen (Fettstift)	Sigma (Deisenhofen, D)
Neubauer Zählkammer	Braun (Melsungen, D)

MATERIAL UND METHODEN

PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
Petrischalen, steril (Durchmesser 82 mm)	Greiner (Frickenhausen, D)
PP-Tube, steril (17,0/77 MM, 12 ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
Protran BA 85 Nitrozellulose 0,45 µm	Schleicher&Schuell (Dassel,D)
Schwamm für Northern Blot	Spontex, MAPA GmbH (Zeven, D)
Spin X Costar 8160 Column	Corning Inc. (Massachusetts, USA)
S&S Rotrand-Sterilfilter (0,22 µm)	Schleicher&Schuell (Dassel, D)
Sterile Spitzen	Henke Sass Wolf (Tuttlingen, D)
Super Frost Plus Objektträger (25 x 75 x 1 mm)	Menzel GmbH & Co KG (Braunschweig, D)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe, D)
Whatman 3MM Chromatografiepapier	Whatman International Ltd. (Maidstone, GB)
Zellkulturbedarf (6- und 96- Lochkulturplatten, 6 und 9 cm Kulturschalen, Einfrierröhrchen)	Greiner (Frickenhausen, D)

2.1.2 Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Agar	LB Broth, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)

MATERIAL UND METHODEN

Agarose	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen, D)
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm, D)
Avertine	Sigma Chemical Co (St. Louis, USA)
Azoxymethan (AOM)	Sigma Chemical Co (St. Louis, USA)
Benzylalkohol (99 %)	Sigma (Deisenhofen, D)
Benzylbenzoat (99 %)	Sigma (Deisenhofen, D)
β -Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen, D)
Borsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas (St. Leon – Rot, D)
Dextransodiumsulfat (DSS)	ICN Biochemicals Inc. (Aurora, USA)
Diethylphosphorylcyanid (DEPC)	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethylformamid	Sigma (Deisenhofen, D)
Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)

ECL Plus (Western Blot Detektionssystem)	Amersham (Freiburg, D)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromid Stammlösung (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Greiner (Frickenhausen, D)
Fluoromount-G	Biozol Diagnostika Vertrieb GmbH (Eching, D)
Formaldehyd	Sigma (Deisenhofen, D)
Glutaraldehyd	Sigma (Deisenhofen, D)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen, D)
Glycine	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Hepes (1 M)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Isopentan (2-Methylbutan, HPLC-Grad)	Sigma (Deisenhofen, D)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat	Merck (Darmstadt, D)

MATERIAL UND METHODEN

Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck (Darmstadt, D)
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
LB (Luria Bertani)-Medium (Pulver)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Magnesiumacetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Milchpulver	Sigma (Deisenhofen, D)
Natriumacetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogenphosphat	Riedel de Haen (Seelze, D)
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Nuclear <i>Fast Red</i> -Lösung	Sigma (Deisenhofen, D)
Opti-MEM	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Penicillin-Streptomycin (10^4 u/ml Penicillin, 10 g/ml Streptomycin)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
PIC (Proteasen-Inhibitoren-Cocktail)- Tabletten	Roche (Penzberg, D)
Ponceau	Sigma (Deisenhofen, D)

MATERIAL UND METHODEN

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen, D)
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamidmix)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
RNA Sample Loading Buffer	Sigma (Deisenhofen, D)
Salzsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Deisenhofen, D)
Sonnenblumenöl	Vita d'Or, Lidl Stiftung & Co KG (Neckarsulm, D)
Tamoxifen (99 %)	Sigma (Deisenhofen, D)
TEMED (N, N, N', N' - Tetraethylethylendiamin)	Sigma (Deisenhofen, D)
Tissue Tek	Sakura Finetek Europe (Zoeterwoude, NL)
Tris base	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
TRIzol	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, D)
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D- Galactopyranosid)	Sigma (Deisenhofen, D)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen, D)

2.1.3 Puffer und Lösungen

<i>Annealing</i> -Puffer (-20°C)	100 mM Natriumacetat 30 mM HEPES-KOH 2 mM Magnesiumacetat
Ammoniumpersulfat (APS, -20°C)	1 g Ammoniumpersulfatpulver in 10 ml <i>Aqua destillata</i>
Ampicillinlösung (100 µg/ml, -20°C)	10 g in 100 ml autoklaviertem <i>Aqua destillata</i> , steril filtriert
Church Buffer	7 % SDS 10 mM EDTA 250 mM NaPO ₄ Puffer 1 % BSA in DEPC-H ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC in <i>Aqua destillata</i> , über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, autoklaviert
EDTA (0,5 M)	146 g EDTA in 1 l <i>Aqua destillata</i> , pH 8 (eingestellt mit NaOH), autoklaviert
Erstantikörperverdünnungspuffer	5 % BSA 0,1 % Tween 20 in 1 x TBS
Fixierlösung für Mausembryos	4 % Formaldehyd 1 % Glutaraldehyd in PBS pH 7,4

MATERIAL UND METHODEN

Injektionspuffer	0,1 mM EDTA 10 mM Tris (pH 7,4)
Kalziumchlorid (0,1 M)	11,1 g Kalziumchlorid in 1 l <i>Aqua destillata</i> gelöst, autoklaviert
Kollagenaselösung (-20°C)	10 mg/ml in PBS
Laemmlipuffer (4°C)	10 % Glycerol 1 % SDS 4 % Tris pH 6,8 10 % β -Mercaptoethanol 0,001 % Bromphenolblau
Laufpuffer für Proteingele (5 x)	25 mM Tris 250 mM Glycine 0,1 % SDS pH 8 (eingestellt mit HCl), autoklaviert
Magnesiumacetat (1 M)	21,45 g Magnesiumacetat in 100 ml <i>Aqua destillata</i>
Magnesiumchlorid (2 M)	40,68 g in 100 ml <i>Aqua destillata</i>
MOPS (10 x)	83,8 g MOPS 13,6 g Natriumacetat 20 ml 0,5 M EDTA pH 8 in 1 l DEPC- H ₂ O pH 7,2 (eingestellt mit NaOH)
NaPO ₄ Puffer (1 M)	178 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in 1 l DEPC- H ₂ O pH 7,2 (eingestellt mit Phosphorsäure)

MATERIAL UND METHODEN

Natriumacetat (3 M)	246,1 g Natriumacetat in 1 l <i>Aqua destillata</i> , pH 4,8 (eingestellt mit HCl)
Natriumchlorid (5 M)	292,2 g in 1 l <i>Aqua destillata</i> , autoklaviert
<i>Northern</i> Waschlösung 1	2 x SSC 0,1 % SDS
<i>Northern</i> Waschlösung 2	0,2 x SSC 0,1 % SDS
Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,4)	8 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,44 g Natriumhydrogenphosphat 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat in 1 l <i>Aqua destillata</i> gelöst pH 7,4 (eingestellt mit HCl), autoklaviert
Probenpuffer (4°C)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol in <i>Aqua destillata</i>
Proteinase K Lösung (-20°C)	10 mg/ml in <i>Aqua destillata</i>
Schwanzlysepuffer	0,05 % Tris (pH 8) 0,1 % EDTA 0,02 % NaCl 1 % SDS
SDS-Lösung (10 %)	100 g SDS in 1 l <i>Aqua destillata</i> pH 7,2 (eingestellt mit HCl)

MATERIAL UND METHODEN

SDS-Lösung (20 %)	200 g SDS in 1 l <i>Aqua destillata</i> pH 7,2 (eingestellt mit HCl)
SSC (20 x)	175 g NaCl 88,2 g Tri Sodium Citrat in 1 l DEPC- H ₂ O pH 7 (eingestellt mit HCl), autoklaviert
<i>Stripping</i> Puffer für <i>Western Blot</i>	2,34 ml β -Mecaptoethanol 30 ml 20 % SDS 18,75 ml 1 M Tris pH 6,8 ad 300 ml <i>Aqua destillata</i>
Tamoxifen-Injektionslösung (10 mg/ml, -20°C)	1 g in 10 ml EtOH vorgelöst, mit 90 ml autoklaviertem Sonnenblumenöl über Nacht gemischt
TBE (Tris Borat EDTA) Puffer (10 x)	40 ml 0,5 M EDTA pH 8 108 g Tris base 55 g Borsäure ad 1 l <i>Aqua destillata</i> pH 8 (eingestellt mit HCl), autoklaviert
TBS/T	0,1 % Tween 20 in 1 x TBS
Transferlösung /Blotpuffer (<i>Western Blot</i>)	20 % Ethanol in 1 x Laufpuffer
Tris (1 M) pH 6,8	121,1 g Tris in 1 l <i>Aqua destillata</i> pH 6,8 (eingestellt mit HCl), autoklaviert
Tris (1,5 M) pH 8,8	181,65 g Tris in 1 l <i>Aqua destillata</i> pH 8,8 (eingestellt mit HCl), autoklaviert

MATERIAL UND METHODEN

Tris Buffered Saline (TBS, 10 x)	24,2 g Tris base 80 g Natriumchlorid in 1 l <i>Aqua destillata</i> pH 7,6 (eingestellt mit HCl), autoklaviert
Trypsin/EDTA	0,2 mM EDTA in PBS, autoklaviert 0,025 % Trypsin
X-Gal-Färbelösung (Kryostatschnitte)	5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat 2 mM Magnesiumchlorid 1 mg/ml X-Gal in PBS (pH 7,4)
X-Gal-Färbelösung (Mausembryos)	5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat 1 mM Magnesiumchlorid 1 mg/ml X-Gal in PBS (pH 7,4)
X-Gal-Stammlösung	25 mg X-Gal in 1 ml Dimethylformamid

2.1.4 Kulturmedien

LB (Luria Bertani) Medium	25 g in 1 l <i>Aqua destillata</i> , autoklaviert, nach Bedarf mit Ampicillin (Endkonzentration 0,1 µg/ml) versetzt
Zellkulturmedium	Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS, 1000 u/ml Penicillin- Streptomycin und 5,8 mg/ml L-Glutamin angereichert

Agarplatten	25 g LB Broth in 1 l <i>Aqua destillata</i> nach dem Autoklavieren mit Ampicillin (Endkonzentration 0,1 µg/ml) versetzt
-------------	---

2.1.5 Enzyme

Alkaline Phosphatase (1U/µl)	Roche (Penzberg, D)
Proteinase K	Merck (Darmstadt, D)
Klenow (5U/µl)	Stratagene (Heidelberg, D)
Kollagenase I	Sigma (Deisenhofen, D)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
T4 DNA Ligase (5 Weiss u/µl)	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Taq DNA Polymerase (5 u/µl)	Fermentas (St. Leon-Rot, D)

2.1.6 Radioaktive Nuklide

α - ³² P-dCTP	Amersham Bioscience (Braunschweig, D)
---------------------------------	---------------------------------------

2.1.7 Oligonukleotide

Labor nr.	Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
55	EGFP fw	5'-CTGAAGTTCATCTGCACCACC-3'	Genotypisierungsprimer RAGE-Mäuse
56	EGFP rev	5'-CGTTCCTTCTGCTTGTTCGGCC-3'	Genotypisierungsprimer RAGE-Mäuse
143	Ssexon4mD2	5'-GATCCCGGGAATTACAGAACCGCCTTTC AAGAGAAGGCGGTTCTGTAATTCCTTTTT GGAAT-3'	shRNA Oligo für mDsg2 (Exon 4) zur Ligation in pTER
144	Asexon4mD2	5'-AGCTATTCCAAAAAGGGAATTACAGA ACCGCCTTCTCTTGAAAGGCGGTTCTGTAA TTCCCGG-3'	shRNA Oligo für mDsg2 (Exon 4) zur Ligation in pTER
145	Ssexon9AmD2	5'-GATCCCGCAGCTTTCACAAAGTCCATTC AAGAGATGGACTTGTGGAAAGCTGCTTTTT GGAAT-3'	shRNA Oligo für mDsg2 (Exon 9) zur Ligation in pTER
146	Asexon9AmD2	5'-AGCTATTCCAAAAAGCAGCTTTCACAA GTCCATCTCTTGAATGGACTTGTGGAAAGC TGCGG-3'	shRNA Oligo für mDsg2 (Exon 9) zur Ligation in pTER
147	Ssexon9BmD2	5'-GATCCCGTGGTTGAAGGCATTCATTTTC AAAGAATGAATGCCTTCAACCACGTTTTTG GAAT-3'	shRNA Oligo für mDsg2 (Exon 9) zur Ligation in pTER
148	Asexon9BmD2	5'-AGCTATTCCAAAAACGTGGTTGAAGGCA TTCATTCTCTTGAATGAATGCCTTCAACC ACGGG-3'	shRNA Oligo für mDsg2 (Exon 9) zur Ligation in pTER
185	pTERH1c	5'-AATTCGAACGCTGACGTCATCAAC-3'	Primer für siRNA-Oligointegration in pTER
186	pTEREGFPnc	5'-CTATGGGAACATACGTCATTATTGAC-3'	Primer für siRNA-Oligointegration in pTER
201	Actin fw	5'-TCATCAGGTAGTCAGTGAGGTCGC-3'	Aktinprimer für Genotypisierungs-PCR
202	Actin r	5'-CACCACACCTTCTACAATGAGCTG-3'	Aktinprimer für Genotypisierungs-PCR
243	pSicofw1	5'-GAGCTGTACAAGTAGCGGCCGCAT-3'	Primer für siRNA-Oligointegration in pSico
244	pSicorev1	5'-ATGAGTCCGCCGTGGCAATAG-3'	Primer für siRNA-Oligointegration in pSico
247	pS9as	5'-TCGAGCTTTCACAAAGTACATTCAAGA GATGGACTTGTGGAAAGCTGCTTTTTTC-3'	shRNA Oligo für mDsg2 (Exon 9) zur Ligation in pSico
248	pS9aas	5'-TCGAGAAAAAGCAGCTTTCACAAAGTCC ATCTCTTGAATGGACTTGTGGAAAGCTGC A-3'	shRNA Oligo mDsg2 (Exon 9) zur Ligation in pSico
251	Rosa1	5'-ACCAGCCAGCTATCAACTC-3'	Genotypisierungsprimer Rosa26Cre-Mäuse
252	Rosa2	5'-TATACGCGTGCTAGCGAAGATCTCCAT CTTCCAGCAG-3'	Genotypisierungsprimer Rosa26Cre-Mäuse
253	Villi 01	5'-CAAGCCTGGCTCGACGGCC-3'	Genotypisierungsprimer Villin- Mäuse
254	Villi 02	5'-CGCGAACATCTTCAGGTTCT-3'	Genotypisierungsprimer Villin- Mäuse
275	Rosa Rep 1	5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'	Genotypisierungsprimer R26R-Mäuse
276	Rosa Rep 2	5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'	Genotypisierungsprimer R26R-Mäuse
277	Rosa Rep 3	5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'	Genotypisierungsprimer für R26R-Mäuse
291	pSkfw1	5'-GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAA-3'	Genotypisierungsprimer für Dsg2 knock down Mäuse

292	pSkrev1	5'-GTCAATGGGCGGGGGTCGTT-3'	Genotypisierungsprimer für Dsg2 <i>knock down</i> Mäuse
-----	---------	----------------------------	---

2.1.8 Vektoren

pBSK GAPDH	Plasmid zur Expression von GAPDH, freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Dr. Christian Spangenberg (Kinderklinik des Universitätsklinikums Mainz, D)
pCAGGmDsg2	mDsg2 Expressionsvektor, freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Dr. Z. Nie (School of Biological Sciences, Manchester, GB)
pINSU	Plasmid mit humanen MAR-Sequenzen zur Isolation eines Transgens, kloniert von Dr. Marko Maringer (Institut für Toxikologie, Mainz, D; Fleenor und Kaufman, 1993)
pSico	Vektor zur Expression von siRNA, freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Dr. Tyler Jacks (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA; Ventura <i>et al</i> , 2004)
pTER _{EGFP}	Vektor zur Expression von siRNA, freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Marc van de Wetering (Hubrecht Laboratory, Utrecht, NL; van de Wetering <i>et al</i> , 2003); Einklonierung von CM-Promoter und EGFP-Sequenz durch Louise Griffin (Institut für Toxikologie, Mainz, D)

2.1.9 Antikörper

α -CD3-PE	Phycoerythrin (PE)-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen CD3 ϵ -Kette (T-Zellen), Klon 145-2C11 (Lot # 50121), BD Biosciences (Pharmingen, D)
α -CD11b-PE	Phycoerythrin-gekoppelter Ratten-Antikörper gegen CD11b (Makrophagen), Klon M1/70, BD Biosciences (Pharmingen, D)
α -CD19-PE	Phycoerythrin-gekoppelter Ratte IgG2a gegen CD19 (B-Zellen), Klon 1D3, BD Biosciences (Pharmingen, D)
α -CD31-PE	Phycoerythrin-gekoppelter Ratte IgG2a gegen CD31 (Endothelzellen, Megakaryozyten, u.a.), Klon 390, Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
α -CD41	Monoklonaler Ratte IgG1 gegen CD41 (Platelets, Megakaryozyten), Klon MWReg30, BD Biosciences (Pharmingen, D)
α -CD117-APC	Allophycocyanin (APC)-gekoppelter Ratte IgG2b gegen CD117 (humane Stammzellen, u.a.), Klon 2B8, BD Biosciences (Pharmingen, D)
α -Cre	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Cre Rekombinase, PRB-106C, Covance (Berkeley, USA)
α -Dsg 1/2	Monoklonaler Maus Antikörper gegen Dsg 1 und 2, Klon DG 3.10 (Lot # 405270) Progen (Heidelberg, D; Schmelz et al, 1986)

MATERIAL UND METHODEN

α -Gr-1-PE	Phycoerythrin-gekoppelter Ratte IgG2b gegen Granulozyten, Klon RB6-8C5, BD Biosciences (Pharmingen, D)
α -HA tag	Polyklonaler Kaninchen- α -HA tag Antikörper, # 14-6756-81 (Lot # E014105) NaTuTec (Frankfurt, D)
α -mouse-Alexa	Alexa-Fluor gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper, MoBiTec GmbH (Göttingen, D)
α -mouse-HRP	Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus Antikörper, HRP (<i>horseradish peroxidase</i>)-gekoppelt, DaKoCytomation GmbH (Hamburg, D)
α -p38	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das <i>house keeping</i> Protein p38, SC-535 (Lot # J264), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
α -Pan NK-PE	Phycoerythrin-gekoppelter Ratte IgGM gegen natürliche Killerzellen, Klon DX5, Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
α -rabbit	<i>Donkey</i> α -rabbit IgG, HRP (<i>horseradish peroxidase</i>)-gekoppelt, SC- 2313 (Lot # H311), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
α -TER119-PE	Phycoerythrin-gekoppelter Maus-Antikörper gegen Erythrozyten, BD Biosciences (Pharmingen, D)

2.1.10 Molekulargewichtsmarker

DNA	Gene Ruler 100 bp DNA ladder Plus, Gene Ruler 1 kb DNA ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Protein	Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)	Fermentas (St. Leon-Rot, D)

2.1.11 Kits

Lipofectamine™ 2000	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, D)
Polyfect Transfection Reagent	Qiagen (Hilden, D)
Prime-it II Random Primer Labelling Kit	Stratagene (Heidelberg, D)
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden, D)

2.1.12 Bakterienstämme

DH5α	supE44 λlacU169 (Φ80lacλZM15) hsdR17recA1endA1 gyrA96 thi-1 relA1
------	--

294-Cre MM294, F⁻, λ⁻, supE44 endA1 thi-1
hsdR17 lacZ::cI857-cre
(Buchholz *et al*,1996)

2.1.13 Zelllinien

EpH4 Murine Epithelzelllinie, freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Hartmut Beug (Institut für molekulare Pathologie, Vienna, Österreich; Lopez-Barahona *et al*, 1995)

HEK 293 Menschliche embryonale Nierenzelllinie, freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Dr. Carsten Weiss (Institut für Toxikologie, Mainz)

NIH 3T3 Maus Fibroblasten, ATCC (Nummer CRL-1658)

2.1.14 Tiere

Die Mäuse stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld, D) oder der Firma Janvier (Le Genest-St-Ile, F) bezogen. Die Tierhaltung erfolgte in Filterkopfkäfigen und wurde entsprechend den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Zur Generierung der transgenen Linien wurden die folgenden Inzuchtstämme verwendet:

Zur Mikroinjektion: FVB

Scheinschwangere Ammenmütter: NMRI

Des weiteren wurden folgende Mauslinien verwendet:

Rosa26CreER ^{T2}	Freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Anton Berns (<i>The Netherlands Cancer Institute</i> , Amsterdam, NL)
R26R (Rosa26 Reporter)	(P. Soriano, 1999)
RAGE (<i>Receptor for advanced glycation end products</i>)	(Constien <i>et al</i> , 2001)
VillinCreER ^{T2}	Freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch Sylvie Robine (Institut Curie, Paris, F; El Marjou <i>et al</i> , 2004)

2.1.15 Geräte

Autoklav	KSG Sterilisatoren GmbH (Olching, D)
Bakterienbrutschrank	Heraeus (Hanau, D)
Bakterienschüttler	Certomat BS-T, B. Braun Biotech (Melsungen, D)
Binokular	Olympus S2X9 (Hamburg, D)
Coloview (Mausendoskop)	Karl Storz (Tuttlingen, D)
Computer	Power Macintosh G3 Siemens LapTop Amilo M 7400

MATERIAL UND METHODEN

Counter für Radioaktivität	Modell TRI-CARB 2100 TR Liquid Scintillation Analyser, Canberra Rochard GmbH (Dreieich, D)
Crosslinker	Modell Amplirad, <i>Genetic Research Instrumentation Ltd</i> (Essex, GB)
Elektrophoresekammern	Werkstatt der Institute Toxikologie/Pharmakologie (Mainz, D)
Elektroporator	Gene Pulser II, Bio Rad (München, D)
Eppendorf Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
FACS Calibur	Becton Dickinson BD (Heidelberg, D)
FACS Vantage	Becton Dickinson BD (Heidelberg, D)
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr Deutschland
Gefrierschrank (-70°C)	Snijders (Tilburg,NL)
Hybridisierungsöfen	Modell BFD-53, WTC Binder (Tuttlingen, D)
Kryostat	Modell 1720 Digital, Leica (Wetzlar, D)
Kühlschrank	Liebherr (Bieberach, D)
Laborschüttler	Unimax 2010, Heidolph (Kehlheim, D)
Mikromanipulationsanlage	Leica (Wetzlar, D)

Mikroskop	Modell Olympus CK2 und Olympus BX50 WI (Hamburg, D)
Netzgerät (<i>Power Supply</i>)	Consort E844, Labotec (Wiesbaden, D)
pH-Meter	Multical Typ 538, Wiss. Tech. Werkstätten (Weilheim, D)
Phosphorimager	Typ STORM 840, Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA)
Photometer	Spectrometer Spectronic Genesys 5, Spectronic Instruments Inc. (USA)
Pipetboy	Pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
<i>Semi dry</i> Elektrobloetter	<i>Perfect Blue</i> TM , Modell SEDEC M, PeqLab (Erlangen, D)
Sequenzierer	Kapillarsequenziergerät ABI Prism3730, Genterprise (Mainz, D)
Sicherheitswerkbank	Micoflow Advanced Bio Safety Cabinet, Nunc (Wiesbaden, D)
Sonikator	Branson Sonifier 250, Heinemann Laboratoriums-Ausrüstungen (Schwäbisch Gmünd, D)
Stickstofftank	Air Liquide Kryotechnik GmbH (Düsseldorf, D)

Thermoblock	Dri-Block DB-3A, Techne (Cambridge, GB)
Thermocycler	Typ Gradient, Eppendorf (Hamburg, D) Typ UNO 96, Biometra (Göttingen, D)
Tischzentrifuge	Eppendorf 5417 C und Eppendorf 5417 R, Eppendorf (Hamburg, D)
Ultrazentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B, DuPont (Bad Homburg, D)
UV-Transluminator	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Vortex	Heidolph (Kehlheim, D)
Wasserbad	Grant Science Services (München, D)
Zellkultur Inkubator	Nunc (Wiesbaden, D)
Zentrifuge	Laborzentrifuge 400 R, Heraeus (Hanau, D)

2.1.16 Software

alalySIS Software Package	Soft Image Systems (Münster, D)
Cellquest Pro	Becton Dickinson BD (Heidelberg, D)
DNA Strider 1.2	CEA (Gif-sur-Yvette, F)

Edit View 1.0.1	Perkin Elmer (USA)
Image Quant 5.2	Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA)
Lucia Version 4.51	Image Archive Plus, Olympus (Hamburg, D)
Mac-Plasmap 2.1	CGC Scientific Ltd. (St. Louis, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

2.2.1.1 Präparation von DNA aus 2 ml Bakterienkulturen (Plasmid Minipräparation)

Für DNA-Präparationen aus 2 ml Bakterienkulturen wurde das QIA Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden 2 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und diese über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler (225 U/min) gewachsen. Die Kulturen wurden am nächsten Tag in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 rpm und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in jeweils 250 µl vorgekühltem (4°C) Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurden die Kulturen invertiert und 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Dann wurden 350 µl Puffer N3 zugegeben, nochmals invertiert und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spin-Säule geladen und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchlaufs wurde die Säule zuerst mit 500 µl Puffer PB und anschließend mit 750 µl Puffer PE gewaschen, wozu die Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wie zuvor erfolgte. Nach Entfernen des Durchlaufs wurde erneut zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, und die Säulen anschließend in sterile Eppendorfgefäße gestellt. Um die DNA zu eluieren, wurden 50 µl Puffer EB in die Mitte der Säule pipettiert, für eine Minute stehen gelassen und danach für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

2.2.1.2 Präparation von DNA aus 400 ml Bakterienkulturen (Plasmid Maxipräparation)

Zur Präparation von DNA aus einer 400 ml-Bakterienkultur wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Es wurden dazu 400 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler (225U/min) gewachsen. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur bei 4500 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml

vorgekühltem (4°C) Puffer P1 resuspendiert, mit 20 ml Puffer P2 versetzt, invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bakterienzellen zu lysieren. Nach Zugabe von 20 ml vorgekühltem (4°C) Puffer P3 wurde das Lysat wieder invertiert und während einer Inkubation für 20 min auf Eis präzipitiert. Die Lösung wurde dann durch eine mit Glaswolle gefüllte Spritze gedrückt und auf die mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Quiagen-Tip-500-Säule aufgetragen, so dass die Plasmid-DNA enthaltende Durchlauf von Zelltrümmern und bakterieller DNA getrennt wurde. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml vorgewärmten (65°C) Puffer QF eluiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und invertieren präzipitiert und bei 10000 rpm und 4°C für 60 min abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl Braun-H₂O durch vortexen gelöst.

2.2.2 DNA-Präzipitation

Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 3 Volumen Ethanol (100 %) gefällt. Nach mindestens 30-minütiger Lagerung bei -20°C wurde die DNA pelletiert (14000 rpm, 15 min), dreimal mit Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in Braun-H₂O aufgenommen.

2.2.3 Präparation von genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien

Um die Genotypisierung der verschiedenen transgenen Mauslinien mittels PCR durchführen zu können, musste zunächst DNA aus den Schwanzproben von drei Wochen alten Mäusen isoliert werden. Dazu wurde jeweils eine etwa 0,5 cm lange Schwanzbiopsie entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 750 µl Schwanzlysepuffer überführt. Die Proben wurden anschließend mit je 26 µl Proteinase K Lösung (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C auf dem Laborschüttler inkubiert, um das Gewebe aufzuschließen. Am nächsten Tag wurden die verdauten Proben für 10 min gevortext, mit 250 µl NaCl (5 M) versetzt und nochmals für 10 min gemischt. Anschließend wurde bei 14000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch das unverdaute Material pelletiert wurde.

Vom die DNA enthaltenden Überstand wurden 750 µl abgenommen, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol für 5 min bei Raumtemperatur gemischt. In diesem Schritt wurde die DNA präzipitiert und anschließend bei 14000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das so erhaltene DNA-Pellet wurde zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und danach 1 min bei 14000 rpm pelletiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Ethanol/H₂O-Gemisch vollständig entfernt, das Pellet mit 50 µl Braun H₂O versetzt und für 30 min bei 55°C gelöst. Zur vollständigen Lösung wurde die DNA vor der Genotypisierung mittels PCR mindestens über Nacht bei 4°C gelagert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration von DNA erfolgte entweder nach dem von Sambrook et al. beschriebenen photometrischen Verfahren (Sambrook et al, 1989) oder über eine Verdünnungsreihe auf einem Agarosegel. Bei dem Verfahren nach Sambrook wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung mit Hilfe folgender Formel die DNA-Konzentration berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 0,05$$

Erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration über eine Verdünnungsreihe auf einem Agarosegel, wurde dies mittels UV-Transluminator dokumentiert und die Konzentration der letzten sichtbaren Bande als Equivalent von 10 ng DNA definiert. Die Konzentration der DNA wurde dann mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{DNA-Konzentration } [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{Verdünnung (letzte sichtbare Bande)} \times 10/\text{eingesetztes Volumen DNA}$$

2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide definierte DNA-Abschnitte gezielt amplifiziert werden. Die Oligonukleotide, oder Primer, dienen dabei der DNA-Polymerase als Starthilfe, um an die einzelsträngige DNA anzudocken und unter Verbrauch von

Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) den zur DNA komplementären Strang zu synthetisieren. Durch wiederholtes Durchlaufen des PCR-Zyklus, der aus Denaturierung der DNA, *Annealing* der Oligonukleotide an den Einzelstrang und Elongation (Synthese des komplementären Strangs) besteht, werden eine exponentiell anwachsende Anzahl Moleküle des definierten DNA-Abschnittes erhalten, welche im Anschluss auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden können. Dieses Verfahren kann beispielsweise dazu genutzt werden, um Transgene in Mäusen zu detektieren (Genotypisierung).

Die PCR wurde nach der Methode von Saiki et al. 1988 (Saiki *et al.*, 1988) in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Jede Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 1/10 Volumen 10 x PCR Puffer, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM von jedem dNTP, 10 pmol der jeweiligen Primer und 0,25 µl Taq Polymerase (5 u/µl).

Eine Standard PCR-Reaktion begann mit einem Denaturierungsschritt von 4 min bei 94°C. Darauf folgten 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 94°C, 30-60 sec *Annealing* bei 58-60°C und 1 min Elongation bei 72°C, woran sich ein finaler Elongationsschritt von 8 min anschloss. Alle PCR Reaktionen wurden in einem Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt.

Zur Analyse wurden 10 µl der PCR-Produkte auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen, mittels UV-Transluminator dokumentiert und ausgewertet.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Moleküle entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden (Fisher und Dingman, 1971). Sowohl zur Analyse als auch zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele verwendet. Die dabei verwendete Agarosekonzentration ergab sich aus der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht und mit 4 µl/100 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Anschließend wurde die flüssige Agarose in die Gelkammer gegossen, wobei durch einen Kamm die Probestaschen ausgespart blieben. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt, der Kamm herausgezogen und die Proben aufgetragen, welche zuvor mit 1/10 Volumen Probenpuffer gemischt worden waren. Die DNA-Fragmente wurden dann zusammen

mit dem neben den Proben aufgetragenen Größenmarker bei 40-80 Volt Spannung aufgetrennt, mittels UV-Transluminator dokumentiert und ausgewertet.

2.2.7 Präparative Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen (Gelextraktion)

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II DNA Gel Extraction Kit von Qiagen. Die entsprechenden DNA-wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt, gewogen und mit der entsprechenden Menge Puffer QX1 (30 µl je 10 mg Gel) versetzt. Nach einminütigem vortexen der QIAEX II Beats wurden 15 µl davon zum Gelstück gegeben und bei 55°C für 10 min inkubiert, wobei alle 2 min kurz durch vortexen gemischt wurde. Dies war notwendig, um die Agarose im Puffer aufzulösen und die DNA-Fragmente an die Beats binden zu lassen. Im Anschluss an die Inkubation wurde für 10 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zuerst mit 500 µl Puffer QX1 und dann zweimal mit 500 µl Puffer PE gewaschen, wozu jeweils für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer komplett entfernt, das Pellet getrocknet und in 15 µl Brau-H₂O gelöst, wozu je nach Fragmentgröße für 5 min bei Raumtemperatur oder für 5 min bei 50°C inkubiert wurde. Anschließend wurde bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert und der die DNA enthaltende Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß überführt.

2.2.8 Restriktionsverdau von DNA

2.2.8.1 Analytischer Restriktionsverdau

Für analytische Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA wurden die entsprechenden Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer gemäß Herstellervorschrift in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt.

2.2.8.2 Präparativer Restriktionsverdau

Bei präparativen Restriktionsverdaus wurden die verwendeten Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer gemäß Herstellervorschrift in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Bei der Verwendung von zwei Enzymen wurde der Ansatz nach dem ersten Verdau gefällt (2.2.2), in Restriktionspuffer aufgenommen und mit dem zweiten Enzym verdaut.

2.2.9 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Bei einer Ligation zwischen Vektor- und Insert-DNA, welche mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, kann es zur Religation des Vektors kommen. Um dies zu verhindern, entfernt man die terminalen 5'-Phosphatgruppen der Vektor DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase. Dadurch kann die Religation des Plasmids verringert werden.

Die Dephosphorylierungsreaktion wurde direkt nach dem Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurde der Restriktionsansatz im Anschluss an die gewünschte Inkubationsdauer mit 1 µl alkalischer Phosphatase (1u/µl) versetzt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (75°C für 15 Minuten) gestoppt.

2.2.10 Auswahl der siRNA Zielsequenzen

Die Auswahl der siRNA Zielsequenzen orientierte sich hauptsächlich an denen bis zu diesem Zeitpunkt durch Tuschl und Kollegen publizierten Richtlinien (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>). Zugrunde gelegt wurde die mRNA Sequenz, von der die jeweils ersten und letzten 100 Nukleotide zur Auswahl der siRNA Zielsequenz unbeachtet blieben. Es wurde nach Sequenzmotiven der Folge AA(N₁₉)TT gesucht, wobei N für jedes beliebige Nukleotid steht. Diese 23 nt lange Sequenzen sollten einen G/C-Gehalt von 40-60 % aufweisen und keine vier Thymidin- oder Adeninmoleküle in Folge beinhalten. Die so erhaltenen potentiellen siRNA Zielsequenzen wurden dann auf eine mögliche Sequenzhomologie mit

anderen nicht Ziel-mRNA Sequenzen überprüft (*BLAST*-Suche, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) und bei mehr als 12 übereinstimmenden Nukleotiden nicht für eine Verwendung in Betracht gezogen. Dabei spielten die zwei Adeninmoleküle am Anfang der Sequenz für das spätere synthetische einzelsträngige shRNA Oligonukleotid keine Rolle und blieben daher auch in der *BLAST*-Suche unberücksichtigt.

2.2.11 Annealing von shRNA Oligonukleotiden

Zur Ligation von shRNA Oligonukleotiden in den dafür vorgesehenen Expressionsvektor mussten zuerst die einzelsträngigen Oligonukleotide (*sense* und *antisense*) zu einem doppelsträngigen Molekül vereint werden. Dafür wurden je 1 µl *sense* und *antisense* Oligonukleotid (10 pmol/µl) mit 48 µl *Annealing*-Puffer gemischt, für 4 min bei 94°C und dann für 10 min bei 70°C inkubiert, wonach die Reaktion langsam auf 4°C gekühlt wurde. Die so über komplementäre Basenpaarung aneinander gebundenen Oligonukleotide konnten nach Fällung (2.2.2) für die Ligation mit dem jeweiligen shRNA Expressionsvektor verwendet werden.

2.2.12 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyltermini in DNA- oder RNA-Duplexen. Im Labor wurde für die Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmid-DNA die aus einem *Escherichia coli*-Stamm isolierte T4 DNA-Ligase verwendet. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA betrug dabei immer 1:3. Jede Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt, wobei jeweils 15 Weiss Einheiten des Enzyms eingesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 16°C oder 4 h bei Raumtemperatur.

2.2.13 Herstellung kompetenter Bakterien

Damit Bakterien Plasmid-DNA oder Ligationsansätze aufnehmen können, müssen die Bakterienzellen zuerst vorbereitet (kompetent gemacht) werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Transformation von Bakterienzellen. Im Labor wurden hierzu aufgrund der verwendeten Bakterienstämme (DH5 α und 294-Cre) zwei unterschiedliche Verfahren durchgeführt. Zum einen die Transformation durch Elektroporation und des weiteren die Transformation durch Hitzeschock. Die Bakterienzellen werden dazu in unterschiedlicher Art und Weise vorbereitet, weshalb im folgenden beide Methoden der Vorbereitung beschrieben werden.

2.2.13.1 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien (DH5 α)

Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterienzellen wurde eine Kultur einer *E. coli* DH5 α Einzelkolonie mit 1 μ l Glycerol in 10 ml LB-Medium angesetzt und diese über Nacht bei 37°C und 225 U/min im Bakterienschüttler gewachsen. Von der Übernachtskultur wurden 4 ml in 400 ml frisches LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben überführt und so lange bei 37°C gewachsen, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-1 erreicht war. Die Bakterienlösung wurde dann auf 50 ml-Falkonröhrchen verteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden ebenfalls bei 4°C oder auf Eis ausgeführt. Nach der Inkubation wurden die Bakterien bei 4500 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in je 25 ml gekühltem 1 mM Hepes-H₂O (pH 7) resuspendiert und immer zwei dieser Suspensionen vereint. Diese beiden Arbeitsschritte wurde genauso wiederholt. Danach wurde bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets in je 10 ml eiskaltem 10 % Glycerol 1 mM Hepes-H₂O (pH 7) resuspendiert und die Suspensionen zusammengeschüttet. Nach zehninütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem 10 % Glycerol 1 mM Hepes-H₂O (pH 7) aufgenommen und als 52 μ l-Aliquots in vorgekühlten (4°C) Eppendorfgefäßen in N₂ schockgefroren. Die so gewonnenen kompetenten Bakterienzellen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.13.2 Herstellung von Hitzeschock-kompetenten Bakterien (294-Cre)

Eine weitere Methode für das Einbringen von fremd-DNA in Bakterien ist der Hitzeschock. Zur Herstellung von 294-Cre Hitzeschock-kompetenten Bakterienzellen wurde eine 10 ml Übernachtskultur einer Bakterieneinzelkolonie angeimpft, von dieser am nächsten Tag 800 µl in 100 ml LB-Medium verdünnt und für weitere 3 Stunden bei 30°C und 225 U/min im Bakterienrührer gewachsen. Die Bakteriensuspension wurde in 50 ml Falconröhrchen verteilt und alle folgenden Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm und entfernen des Überstandes wurde das Pellet in jeweils 10 ml vorgekühltem (4°C) Kalziumchlorid (0,1 M) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation unter gleichen Bedingungen und entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml der gleichen Lösung aufgenommen und unter vortexen mit 70 µl DMSO versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden nochmals 70 µl DMSO zupipettiert, gevortext und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Aliquots in N₂ schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Bakterienzellen bei -80°C gelagert.

2.2.14 Transformation

Zum Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen wurden für die verwendeten Bakterienstämme zwei unterschiedliche Methoden, Transformation durch Elektroporation sowie Transformation durch Hitzeschock, gewählt, die im folgenden beschrieben werden.

2.2.14.1 Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation

Für die Transformation durch Elektroporation wurde ein Aliquot elektrokompetenter Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit 1 µl der entsprechenden Vektor-DNA oder eines Ligationsansatzes in eine Elektroporationsküvette (2 mm) gebracht. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 V in einem Gene Pulser II Elektroporator. Um die Expression des β-Lactamase-Resistenzgens zu

induzieren, wurden die transformierten Bakterien mit 200 µl LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C im Bakterieninkubator gewachsen. Dann wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert, wobei je nach zu erwartender Ligation- und Transformationseffizienz 50-100 µl der Suspension je Platte verwendet wurde. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Einzelkolonien konnten am nächsten Tag analysiert (PCR) oder zum Animpfen einer 2 ml- oder 400 ml-Übernachtskultur verwendet werden. Für weitere Verwendung wurden die Platten für mehrere Monate bei 4°C gelagert.

2.2.14.2 Transformation von Bakterienzellen durch Hitzeschock

Ein Aliquot der Hitzeschock-kompetenten Cre-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und 1 µl der zu transformierenden DNA zupipettiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock, wozu die Bakterien-DNA-Suspension für 2 min in den 42°C warmen Thermoblock überführt wurde. Darauf folgte eine weitere Inkubation der Bakterien für 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Bakterien für 20 min bei 30°C und 225 U/min im Bakterienrührer zur Induktion der Expression des β -Lactamase-Resistenzgens inkubiert. Von den gewachsenen und transformierten Cre – Bakterien wurden 200 µl, 100 µl und 10 µl auf Ampicillin – Agarplatten ausplattiert und bei 30°C im Bakterieninkubator belassen. Einzelkolonien konnten am nächsten Tag zum Animpfen von 2 ml- oder 400 ml-Kulturen verwendet werden. Die Platten wurden für diesen Zweck für mehrere Monate bei 4°C gelagert.

2.2.15 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zunächst wurde die durch Restriktionsverdau mit anschließender Gelextraktion gewonnene Sonden-DNA auf eine Konzentration von 20 ng/µl eingestellt. Für die radioaktive Markierung wurde das Prime-it II Random Primer Labeling Kit von Stratagene verwendet. DNA-Volumen von 0,5-1,5 µl wurden mit 10 µl *Random Oligonucleotid Primers* gemischt und mit *Aqua destillata* auf ein Endvolumen von

34 µl gebracht. Nach kurzer Zentrifugation bei 6000 rpm wurden die Proben für 5 min bei 100°C inkubiert und nach erneuter Zentrifugation mit 10 µl 5 x Buffer, 5 µl α-32-P-dCTP und 1 µl Klenow (5 U/µl) gemischt. Nach Inkubation bei 37°C für 30 min wurde die Sonden-DNA mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit von Qiagen gereinigt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer PN wurde die Lösung auf ein Säulchen gegeben und für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die an die Säule gebundene DNA zweimal mit Puffer PE gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Nach entfernen des letzten Waschpuffers wurde für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und im Anschluss die DNA durch Zugabe von 200 µl Puffer EB und erneute Zentrifugation eluiert. Von der eluierten Sonden-DNA wurden 2 µl für die Messung im Counter (*Liquid Scintillation Analyser*) verwendet, um die Inkorporationseffizienz zu überprüfen. Für *Northern Blots* wurden Sonden mit 10^6 bis 10^7 cpm verwendet.

2.2.16 RNA-Extraktion aus Zellkultur-Zellen

Für die Isolation von RNA aus Zellkultur-Zellen wurde das phenolhaltige TRIzol Reagenz von Invitrogen verwendet. Dazu wurden, um Kontamination mit RNasen zu vermeiden, alle Puffer mit DEPC-behandeltem H₂O angesetzt und alle Labormaterialien mit DEPC-H₂O (0,1 %) gereinigt. Die Zellen wurden mit Trypsin von der Kulturschale gelöst, mit PBS gewaschen und für 10 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das PBS entfernt und alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Extraktion wurde das Zellpellet in 1-2 ml TRIzol gelöst. Nach fünfminütiger Inkubation wurden 200-400 µl Chloroform zugegeben, das Tube für 15 sec geschüttelt und erneut für 2 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in Eppendorfgefäße überführt und für 15 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Phenol/Chloroform- und wässrige Phase voneinander zu trennen. Letztere wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert, das RNA-Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen und bei 7500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach trocknen des Pellets wurde dieses in 25 µl DEPC-H₂O bei 55°C für 10 min gelöst.

2.2.17 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA wurde nach dem von Sambrook *et al.* beschriebenen photometrischen Verfahren bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989). Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung wurde mittels folgender Formel die RNA-Konzentration bestimmt:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 0,04$$

2.2.18 Northern Blot

Mit Hilfe eines *Northern Blots* kann die Expression von RNA in verschiedenen Geweben oder Zellen quantifiziert werden (Alwine, 1979). Die aus Zellen oder Gewebe extrahierte RNA wird mittels eines Agarose-Formaldehydgels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Thomas, 1980). Durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde können die Expressionslevels in den einzelnen Proben detektiert werden.

Für das RNA – Gel wurden 4 g Agarose in 250 ml DEPC-H₂O durch aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf annähernd 55°C wurde diese mit 30 ml 10 x MOPS, 17,5 ml Formaldehyd und 6 µl EtBr (10 mg/ml) versetzt und das Gemisch in eine Geltrageschale gegossen, wobei die Probenaschen mit Hilfe eines Kamms ausgespart blieben. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 50 µg RNA im Verhältnis 1:2 mit RNA *sample loading buffer* gemischt, für 10 min bei 65°C inkubiert und dann bis zum Beladen des Gels auf Eis aufbewahrt. Nach Erhärten des Gels wurde der Probenkamm entfernt, die RNA-Proben aufgetragen und in 1 x MOPS bei 40-50 V für 8 Stunden aufgetrennt. Dann wurde das Gel für 15 min in DEPC-H₂O und zweimal für je 15 min in 10 x SSC bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler gewaschen. Der *Blot* wurde anschließend wie folgt aufgebaut:

Schwamm in 20 x SSC	– oben –
1 x Whatmanpapier in 20 x SSC	
RNA - Gel	
Nitrozellulosemembran in 20 x SSC	
1 x Whatmanpapier in 20 x SSC	
2 x Whatmanpapier	
½ Stapel Handtuchpapier	– unten –

Um ein Austrocknen des mit Transferlösung (20 x SSC) getränkten Schwammes zu verhindern und den Transfer der RNA auf die Membran zu gewährleisten, wurde der gesamte Blot mit Frischhaltefolie umwickelt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am folgenden Tag wurde die RNA auf der Membran im Crosslinker bei 40 W für 3 min fixiert. Für die Prähybridisierung wurde die Membran für 30 min bei 65°C mit 20 ml Church Buffer inkubiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde erfolgte im Anschluß über Nacht bei 65°C in 5-10 ml Church Buffer. Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal für 15 min bei 65°C mit Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) und zweimal unter den gleichen Bedingungen mit Waschlösung 2 (0,2 x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen, wonach die Nitrozellulose mit Frischhaltefolie verpackt wurde. Die Exposition auf den Phosphorimager erfolgte über Nacht.

2.2.19 Extraktion von Protein

2.2.19.1 Proteinextraktion aus Zellkultur-Zellen

Für die Gewinnung von Gesamtzelllysat wurde das Medium von den Zellen entfernt, diese zweimal mit PBS gewaschen und trypsiniert. Die von der Platte gelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen, gezählt und bei 1200 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet entsprechend der Zellzahl in vorgekühltem (4°C) Laemmlipuffer aufgenommen (100 µl Laemmlipuffer/10⁶ Zellen). Nach Sonifikation der Proben, die bei 5-10 Watt und auf Eis durchgeführt wurde, konnten die Extrakte für einen Western Blot verwendet werden oder wurden bei -20°C gelagert.

2.2.19.2 Proteinextraktion aus murinem Gewebe

Um Proteine aus murinen Geweben zu extrahieren, wurde die Maus euthanasiert, die betreffenden Organe entnommen und in N₂ schockgefroren. Anschließend wurden die Gewebe zusammen mit flüssigem Stickstoff in einen Mörser gegeben und darin zerkleinert. Das zerhackte Gewebe wurde zusammen mit dem Stickstoff in ein

Falkonröhrchen überführt, wo man diesen verdunsten ließ. Unmittelbar darauf wurden die Gewebeteile auf Eis gestellt, mit 1-2 ml Proteinlysepuffer versetzt und die Proben für 10 min gekocht. Anschließend wurden die Lysate auf Eis gekühlt und mehrmals bei 25-35 Watt sonifiziert, um das Gewebe weiter aufzuschließen. Nach überführen des Proteinlysats in ein steriles Eppendorf Gefäß wurde für 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert und auf diese Weise Zelltrümmer aus der Lösung entfernt. Der das Protein enthaltende Überstand wurde in ein frisches Eppendorf pipettiert und das Pellet verworfen. Dieser Zentrifugationsschritt wurde so lange wiederholt, bis der Überstand eine klare Lösung war.

2.2.20 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Proteinkonzentration einer Lösung zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist die photometrische Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dabei wird der Farbstoff Coomassie-Blau verwendet, der an die in der Suspension enthaltenen Proteine bindet, so dass sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt und somit eine indirekte photometrische Quantifizierung des Proteingehalts möglich ist.

Die Messungen wurden in Einmalküvetten durchgeführt, wozu jeweils 200 µl Bradford-Reagenz (Roti Quant), 790 µl *Aqua destillata* und 10 µl der zu messenden Proteinlösung gemischt wurden. Für die Quantifizierung von Protein aus Mausgewebe wurden 2-4 µl der Proteinlösung vorher 1:10 in *Aqua destillata* verdünnt, um ein Verklumpen mit dem Bradford-Reagenz zu verhindern. Nach Vortexen und 15 min Ruhezeit bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei OD₅₉₅. Zuvor wurde eine Eichgerade mit unterschiedlichen Mengen an BSA (0 µg, 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg, 100 µg und 200 µg pro ml) erstellt. Die Daten wurden mit der Software Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.21 Acetonpräzipitation von Protein

Um eine Proteinlösung zu reinigen oder zu konzentrieren, wurde die Methode der Acetonpräzipitation gewählt. Dazu wurden zu 1 Volumen Protein 4 Volumen

vorgekühltes (-20°C) Aceton gegeben und nach vortexen für mindestens 90 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde bei 14000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das getrocknete Pellet in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.22 Western Blot

Mit Hilfe von *Western Blots* können Proteine selbst in so komplexen Proteingemischen wie Gesamtproteinextrakt effizient nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Proteingemische werden dazu mittels analytischer, denaturierender SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) entsprechend der Molekülgröße der enthaltenen Proteine aufgetrennt und anschließend mit der *semi dry Blotting*-Methode (Khyse-Andersen, 1984) im elektrischen Feld vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die immobilisierten Proteine sind dann zugänglich für Antigen-Antikörper-Bindungen.

2.2.22.1 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch analytische SDS-PAGE werden die Proteine eines Proteingemischs größenabhängig im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei bewirkt das anionische Detergenz SDS zum einen, dass Quartär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst werden, wodurch diese eine gestreckte Konformation erhalten. Des Weiteren bindet SDS in konstantem Verhältnis an Proteine (1,4 g SDS/1 g Protein), wodurch eine einheitliche negative Ladung je Proteinmenge entsteht. Im Polyacrylamidgel wandern die negativ geladenen Proteine umgekehrt proportional ihrer molekularen Masse zur Anode. An der Trennlinie zwischen Sammelgel und Trenngel kommt es aufgrund des diskontinuierlichen Puffersystems nach Laemmli (Laemmli, 1970) zur Konzentrierung der Proteine, so dass diese anschließend hochauflösend getrennt werden. Zur Molekulargewichtsbestimmung wird parallel ein Proteinmarker aufgetragen.

Zunächst wurde für die Durchführung der SDS-PAGE zwischen die mit Ethanol (70 %) gereinigten Glasplatten das Trenngel gegossen (Zusammensetzung der Polyacrylamidgele siehe Tabelle 1). Dabei richtete sich der Anteil an Acrylamid für das Trenngel nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Das Trenngel wurde nach dem Einfüllen in die Gelplatten mit Isopropanol überschichtet, um eine klare Trennlinie zwischen Trenngel und Sammelgel zu erzeugen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Isopropylalkohol dekantiert und das Sammelgel gegossen, wobei durch Einstecken eines Kunststoffkamms die Taschen für das Beladen mit Protein geformt wurden. Nach Polymerisation wurde das Gel in der Gelkammer befestigt und diese mit Laufpuffer befüllt, wonach der Kamm entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer ausgespült wurden. Anschließend wurden die Proteinproben vorbereitet, wozu diese, sofern nicht bereits geschehen, mit Laemmli-puffer (2x oder 6x) versetzt und 5 min bei 95°C gekocht wurden. Anschließend wurden die Proben neben dem gefärbten Proteinmarker (5 µl/Gel) auf das Gel aufgetragen. Die Kammer wurde dann an das Netzgerät angeschlossen und die Proteine bei 40 V (Sammelgel) bis 80 V (Trenngel) getrennt, wobei die Laufzeit anhand der Markerbanden bestimmt wurde.

Trenngel	6 % (5 ml)	8 % (5ml)
H ₂ O	2,7 ml	2,3 ml
Acrylamidmix (30 %)	1 ml	1,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml
SDS (10 %)	50 µl	50 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	50 µl	50 µl
TEMED	4 µl	3 µl

Sammelgel	1 ml
H ₂ O	680 µl
Acrylamidmix (30 %)	170 µl
1 M Tris (pH 6,8)	130 µl
SDS (10 %)	10 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	10 µl
TEMED	1 µl

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

2.2.22.2 Durchführung des *Western Blots (semi dry Blotting)*

Der *Western Blot* wurde mit der *semi dry Blotting*-Methode durchgeführt (Khyse-Andersen, 1984). Die Proteine wurden dabei im elektrischen Feld vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der *semi dry Blot* wurde wie folgt auf die Platinum Titanium Anode geschichtet, wobei alle Elemente zuvor mit Transferlösung befeuchtet und die Nitrozellulosemembran zusätzlich zuvor für 2 min in *Aqua destillata* inkubiert wurden:

3 Filterpapiere (Whatman 3MM, 6 x 9 cm) - oben -
 Proteingel (ohne Sammelgel)
 Nitrozellulosemembran (6 x 9 cm)
 3 Filterpapiere (Whatman 3MM, 6 x 9 cm) - unten -

Luftblasen wurden mit Hilfe einer Pipette durch Rollen entfernt. Nach Aufsetzen der Kathode und Befestigen der Kontakte erfolgte der elektrophoretische Transfer, wozu die verwendete Stromstärke entsprechend der Fläche des Blots berechnet wurde:

$$\text{Stromstärke [mA]} = (\text{Breite} \times \text{Höhe}) \times \text{Anzahl der Blots} \times 1,5$$

Der Transfer wurde für zwei bis drei Stunden bei maximal 10 Volt durchgeführt. Danach wurde die Membran zum Visualisieren der transferierten Proteine mit Ponceaulösung gefärbt. Nach Entfärben der Membran mit *Aqua destillata* wurden auf dieser die freien Bindungsstellen eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % FCS-TBS/T auf dem Laborschüttler geblockt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden ebenfalls auf dem Laborschüttler durchgeführt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in entsprechender Verdünnung (1:50-1:1000) in Erstantikörperverdünnungslösung. Die weiteren Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/T für 15 min wurde mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für 30-45 min in entsprechender Verdünnung (1:2000-1:5000) in 2 % BSA-TBS/T inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS/T gewaschen und für eine Minute mit frischem ECL-Reagenz inkubiert. Darauf folgte unmittelbar die Exposition auf einem Autoradiographiefilm, wobei sich die Expositionszeit nach der zu erwartenden

Bandenintensität richtete. Die Filme wurden unmittelbar nach der Exposition entwickelt und ausgewertet.

2.2.23 Entfernung von Antikörpern und Sonden von Nitrozellulosemembranen

Nitrozellulosemembranen können sowohl Nukleinsäuren als auch Proteine binden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Membranen für die Durchführung von *Northern Blots* sowie *Western Blots* genutzt, um RNA- und Proteinexpression von Dsg 2 zu untersuchen. Um den Nachweis zu erbringen, dass für einen *Blot* homogene Probenmengen verwendet wurden (Ladekontrolle), mussten gebundene Sonden-DNA bzw. Antikörper von der Membran gewaschen und mit einer internen Kontrolle (Sonde oder Antikörper) inkubiert werden. Im folgenden werden die Verfahrensweisen für beide *Blotting*-Methoden beschrieben.

2.2.23.1 Entfernung von Sonden von Nitrozellulosemembranen bei *Northern Blots*

Um radioaktiv markierte DNA von Nitrozellulosemembranen zu entfernen, wurde SDS-Lösung (0,1 %) zum kochen gebracht, die Membran für 2 min in der kochenden Lösung inkubiert und beides auf 55°C abkühlen gelassen. Die Membran konnte dann für die Hybridisierung mit einer Sonde genutzt werden, die gegen eine konstitutiv exprimierte RNA gerichtet ist (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, GAPDH).

2.2.23.2 Entfernung von Antikörpern von Nitrozellulosemembranen bei *Western Blots*

Im Anschluss an einen *Western Blot* wurden die Nitrozellulosemembranen mit einem Antikörper inkubiert, der gegen ein konstitutiv exprimiertes, endogenes Protein, z.B. p38, gerichtet ist. Dazu mussten zunächst die bereits gebundenen Antikörper von den Membran entfernt werden. Diese wurden hierfür mit 50 ml *Stripping* Puffer für 30-60 Minuten bei 50°C inkubiert und anschließend dreimal mit 100 ml PBS für 15

Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Danach konnten die Membranen wie beschrieben geblockt und mit α -p38 Antikörper inkubiert werden.

2.2.24 Murine Gewebeschnitte

2.2.24.1 Anfertigung von murinen Gewebeschnitten

Die Mäuse wurden euthanasiert und die entnommenen Gewebe zuerst für 3-5 min in kaltem Isopentan (Behälter in flüssigem Stickstoff stehend) eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Für langfristige Lagerung wurden die Organe im -80°C Gefrierschrank tiefgefroren. Die Gewebe wurden bei -20°C an einem Kryostat der Firma Leica (Modell 1720 Digital) mit einer Dicke von $10\ \mu\text{m}$ geschnitten, auf Super Frost Plus-Objektträger transferiert und bei -20°C gelagert.

2.2.24.2 Acetonfixierung von murinen Gewebeschnitten

Die murinen Gewebeschnitte wurden zunächst mit einem Fettstift auf dem Objektträger umrandet, um ein späteres Auslaufen der Färbelösung zu verhindern. Anschließend wurden die Schnitte in kaltes Aceton (-20°C) überführt und 10 min bei 4°C fixiert. Dann wurden die Schnitte dreimal für 5 min in PBS (pH 7,4) bei Raumtemperatur gewaschen, worauf die Anfärbung des Gewebes folgte.

2.2.24.3 X-Gal- und *Fast Red*-Färbung muriner Gewebeschnitte

Von den fixierten und mit PBS gewaschenen Gewebeschnitten wurde die Waschlösung abgetropft und pro Objektträger etwa 1 ml der jeweils frisch angesetzten X-Gal-Färbelösung direkt auf das Gewebe pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nochmals dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zytoplasma mit *Fast Red* angefärbt, indem wenige Tropfen der Lösung für 3 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben wurde. Anschließend wurde die

Färbelösung durch Waschen mit PBS entfernt, die Schnitte mit Glycerol eingedeckelt, dokumentiert und ausgewertet.

2.2.24.4 Immunfluoreszenz von murinen Gewebeschnitten

Die Immunfluoreszenz wurde freundlicherweise von Frau Christine Grund (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, D) als indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei wird das Antigen von einem Antikörper erkannt, welcher wiederum in einem zweiten Färbeschritt von einem Spezies-spezifischen Zweitantikörper gebunden wird. Dieser ist gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch Licht bestimmter Wellenlänge wird der Farbstoff angeregt, wodurch das gesuchte Antigen detektiert werden kann.

Die Immunfärbung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazu wurden die fixierten Mausegewebeschnitte zunächst für 1 Stunde mit PBS/5 % FCS blockiert. Nach Entfernen der Blockierlösung wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (DG 3.10, 1:10 in PBS) inkubiert. Nach 30 min erfolgten drei Waschschrte mit PBS für jeweils 10 min. Der Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor) wurde 1:500 in PBS verdünnt und für 30 min inkubiert. Nachdem einmal mit PBS gewaschen und dieses vom Schnitt abgetropft war, erfolgte das Eindeckeln mit Fluoromount-G, wonach die gefärbten Schnitte dokumentiert werden konnten.

2.2.25 Zellkultur

Zur Verhinderung von Kontaminationen wurden alle Arbeitsschritte unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Zellinkubator bei 37°C und 5 % CO₂.

2.2.25.1 Kultivierung von HEK 293, 3T3 und EpH4 Zellen

Die Zellen wurden in 10 % FCS DMEM gehalten und im Zellinkubator kultiviert. Um die Zellen umzusetzen oder zu ernten, wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Überschichtung der Zellen mit Trypsin/EDTA, wobei für eine P 100 Kulturschale 1 ml der Lösung verwendet wurde, für kleinere Kulturschalen entsprechend weniger. Anschließend wurden die Zellen für mehrere Minuten im Zellinkubator belassen. Nach Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurden diese in Medium aufgenommen und im gewünschten Verhältnis neu ausplattiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in der Neubauerkammer gezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml Medium} = \text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.25.2 Kryokonservierung von Zellen

Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden diese in Medium aufgenommen, in ein 15 ml Falcon -Röhrchen überführt und die Zellzahl bestimmt. Dann wurde bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in entsprechender Menge Einfriermedium (FCS 10% DMSO, 1 ml je $7,5 \times 10^5$ Zellen) aufgenommen und 1 ml Suspension in je ein Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden dann mindestens über Nacht bei -80°C langsam in einer Styroporbox eingefroren, bevor sie zur langfristigen Lagerung in N_2 überführt wurden.

2.2.25.3 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagerten Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und der Inhalt des Kryoröhrchens in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml vorgewärmtem (37°C) Medium überführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 8 ml Medium resuspendiert und in eine P 100 Kulturschale überführt.

2.2.25.4 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in HEK 293- und NIH 3T3-Zellen

Die Transfektion von HEK 293- und NIH 3T3-Zellen erfolgte mit dem PolyFect Transfektionsreagenz von Qiagen. Am Tag vor der Transfektion wurden im Fall der HEK 293 Zellen 6×10^5 Zellen, im Fall der 3T3 Zellen 4×10^5 Zellen, in 3 ml Zellkulturmedium in jeweils eine Aussparung einer 6-Lochkulturplatte ausgesät, so dass die Zellen am folgenden Tag 80 % Konfluenz erreicht hatten. Von der in zirkulärer Form vorliegenden Plasmid-DNA wurden je Transfektionsansatz 2 µg in 100 µl DMEM verdünnt, welches weder FCS noch Antibiotika enthielt. Nach vortexen der Lösung wurden 20 µl PolyFect Reagenz zugegeben, durch pipettieren gemischt und die Lösung zur Bildung des Transfektionskomplexes für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Darauf folgte die Zugabe von 1 ml Medium zum Transfektionsgemisch, welches nach kurzem Mischen durch pipettieren direkt zu den Zellen gegeben und durch bewegen der Platte im Medium verteilt wurde. Die Zellen wurden dann für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Zellinkubator gewachsen.

2.2.25.5 Transiente Transfektion von EpH4 Zellen

Die Transfektion von EpH4 Zellen wurde mit Lipofectamine™ 2000 von Invitrogen durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden $4,5 \times 10^5$ Zellen in einer P 100 Kulturschale ausgesät, um zum Zeitpunkt der Transfektion 40-50 % Konfluenz zu erreichen. Je P 100 Kulturschale wurde ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 8 µg DNA und 500 µl Opti – MEM vorbereitet. In dem zweiten, separaten Röhrchen wurden 20 µl Lipofectamine Reagenz in 500 µl Opti-MEM verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden DNA- und Lipofectamine-Lösung miteinander gemischt und zur Komplexbildung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 5 ml frisches, Penicillin/Streptomycin-freies DMEM ersetzt. Dann wurde das Transfektionsgemisch im Medium auf den Zellen verteilt und diese bei 37°C und 5

% CO₂ inkubiert. Etwa 7 Stunden nach der Transfektion wurde jede Kulturschale mit weiteren 5 ml Medium versetzt.

2.2.26 Generierung transgener Mäuse durch Pronukleusinjektion

Die Mikroinjektion transgener DNA in den männlichen Vorkern befruchteter muriner Eizellen (d 0,5) und die damit verbundene Vorbereitung der Mäuse wurde im Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz freundlicherweise von Swetlana Ohngemach und Dr. Leonid Eshkind durchgeführt. Im Folgenden werden die zur Generierung transgener Mäuse erforderlichen Biotechniken vorgestellt.

2.2.26.1 Superovulation

Um eine möglichst große Anzahl befruchteter Eizellen gewinnen zu können, wurden die weiblichen Tiere durch Hormongabe in einen induzierten Sexualzyklus gebracht. Dazu wurden drei Tage vor der Verpaarung jeweils etwa 100 µl PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) und am Tag der Verpaarung HCG (Human Chorionic Gonadotropin) intraperitoneal injiziert.

2.2.26.2 Gewinnung der befruchteten Eizellen

Die superovulierten Mäuse wurden am Tag nach der Verpaarung getötet, die Uteri mit den befruchteten Eizellen entnommen und in eine Zellkulturplatte mit Medium überführt. Die Eizellen konnten dann aus den Uteri herausgespült und zur weiteren Manipulation vorbereitet werden.

2.2.26.3 Vorbereitung der transgenen DNA für die Pronukleusinjektion

Zunächst wurde die Plasmid-DNA durch präparativen Restriktionsverdau linearisiert (2.2.8.2) und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (2.2.7). Nach Fällung der DNA (2.2.2) und dreimaligem waschen mit Ethanol (70 %) wurde das DNA-Pellet in 160 µl Injektionspuffer aufgenommen, zur weiteren Reinigung auf eine Spin X-Säule gegeben und für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert.

Die Konzentration der DNA wurde über eine Verdünnungsreihe auf einem 1 % Agarosegel bestimmt (2.2.4) und für die Mikroinjektion auf 2,5 ng/µl eingestellt.

2.2.26.4 Mikroinjektion des transgenen Konstrukts in Oozyten

Die transgene DNA wurde mit Hilfe einer Mikromanipulationsanlage in den männlichen Vorkern der befruchteten Eizellen injiziert. Zu dieser Anlage gehörten zwei Mikromanipulatoren mit Halte- und Injektionskapillare, ein Stereomikroskop, sowie die die Oozyten enthaltende Objektkammer. Für die Injektion wurde die Injektionskapillare mit transgener DNA (2,5 ng/µl) befüllt und eine befruchtete Eizelle mit der Haltekapillare angesaugt. Dann wurde die Injektionskapillare in den männlichen Vorkern der Eizelle gestochen und das transgene Konstrukt injiziert. Die so veränderten Eizellen wurden anschließend in scheinchwangere Mäuse transferiert.

2.2.26.5 Scheinschwangere Leihmütter

Für den Transfer der manipulierten Oozyten wurden scheinträchtige Weibchen benötigt. Diese wurden durch Verpaarung mit vasktomierten Böcken erhalten. Männliche Tiere, denen beide *Vasa deferentia* durchtrennt worden waren, wurden nach Verheilung der Operationswunde mit den Weibchen verpaart. Die Weibchen wurden jeweils morgens auf einen Vaginalpfropf untersucht, der auf eine vollzogene Verpaarung hinweist.

2.2.26.6 Transfer der mikroinjizierten Oozyten

Mikroinjizierte Oozyten wurden ins Infundibulum scheinchwangerer Weibchen übertragen. Dazu wurde die scheinchwangere Maus betäubt, durch einen kurzen Schnitt die Bauchhöhle geöffnet und der Uterus vorsichtig herausgezogen. Die mikroinjizierten Oozyten konnten dann mit einer Transferkapillare in das Infundibulum gebracht und der Uterus anschließend in das Tier zurückgeschoben werden. Zuletzt wurde die Wunde verklammert. Nach einer Tragezeit von annähernd 20 Tagen wurden die Jungen geboren. Da die in die Oozyten eingebrachte transgene DNA das grüne Fluoreszenzprotein (EGFP) als Indikatorgen enthielt, konnte bereits durch einen Fluoreszenztest eine erfolgreiche Integration der transgenen DNA in das Mausgenom festgestellt werden. Dazu wurden Ohrproben der Jungen im Binokular unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzlampe untersucht. Des Weiteren wurde DNA aus Schwanzbiopsien der Tiere isoliert und mittels PCR die Integration des Transgens geprüft.

2.2.27 Behandlung von adulten Mäusen mit Tamoxifen

Zur Herstellung der Tamoxifen-Injektionslösung wurde 1 g Tamoxifenpulver in 10 ml Ethanol bei 37°C gelöst und anschließend über Nacht mit 90 ml autoklaviertem Sonnenblumenöl bei Raumtemperatur gemischt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Behandlung ausgewählte Tiere wurden in separaten Käfigen gehalten, um Kontaminationen zu vermeiden. Den Mäusen wurden täglich für 5 oder 10 aufeinander folgende Tage 100 µl der Injektionslösung (entspricht 1 mg Tamoxifen) intraperitoneal injiziert. Während den Injektionsintervallen wurde die Lösung bei 4°C aufbewahrt, wobei jedes Aliquot nach 6 Tagen bei 4°C verworfen wurde.

2.2.28 Aktivierung der CreER^{T2} Rekombinase mit Tamoxifen im Embryo und anschließende β -Galaktosidase-Färbung

Zwei Tage vor Präparation der Embryos wurde den Mausweibchen 1 mg Tamoxifen (10 mg/ml autoklaviertes Sonnenblumenöl) intraperitoneal injiziert. Die Präparation erfolgte an Tag 9,5 und 12,5 der Schwangerschaft. Die Dauer der Schwangerschaft wurde durch Untersuchung der Weibchen auf einen Vaginalpfropf am Morgen nach der Verpaarung genau bestimmt.

Zur Präparation der Embryonen wurde das Muttertier euthanasiert, mittels Bauchdeckenschnitt geöffnet, der Uterus entnommen und in PBS/5 % FCS überführt. In dieser Lösung wurden die Embryos vom umgebenden maternalen Gewebe frei präpariert und in frisches PBS/5 % FCS überführt.

Zur Fixierung wurden die Embryos für eine Stunde bei 4°C in der Fixierlösung inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS/5 % FCS für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Embryos über Nacht bei 37°C mit X-Gal-Färbelösung behandelt. Darauf folgte eine weitere Inkubation in der Fixierlösung über Nacht bei 4°C. Die Embryos wurden dann dreimal in PBS für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mittels Methanol-Reihe dehydriert (25 %, 50 %, 75 % Methanol in PBS, 100 % Methanol). Um die inneren Strukturen der Embryonen sichtbar zu machen, wurden diese in ein 2:1 Gemisch aus Benzylbenzoat und Benzylalkohol transferiert. Nach kurzer Inkubationszeit erfolgte die Dokumentation mittels Binokular.

2.2.29 FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*)-Analyse von Mausorganen und Mausembryonen

Um Mausorgane und Embryonen mit Hilfe des *Fluorescent Activated Cell Sortings* zu analysieren, müssen diese als Einzelzelllösungen vorliegen. Dazu wurden die Mäuse euthanasiert und die Embryos und Gewebe (Milz, Knochenmark, Thymus und Lymphknoten) entnommen.

Die Embryos wurden wie unter 2.2.22 beschrieben präpariert und anschließend halbiert. Der Kopfbereich des Embryos wurde in 750 μ l Schwanzlysepuffer mit 26 μ l Proteinase K (10 mg/ml) überführt und über Nacht bei 55°C auf einem Laboschüttler

inkubiert, um daraus DNA für die Genotypisierung mittels PCR zu extrahieren (2.2.3). Die zweite Embryohälfte wurde zum Verdauen mit einer Schere auf einem Objektträger zerkleinert, in ein 12 ml PP-Tube mit 3 ml PBS/5 % FCS überführt, mit 50 µl Kollagenase (10 mg/ml) versetzt und für 40 min in einem 37°C warmen Wasserbad geschüttelt. Nach der Inkubation wurde die Gewebelösung mit 5 ml PBS/5 % FCS verdünnt und über einen Falkonfilter in ein 50 ml Falconröhrchen gebracht. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 2-5 ml PBS/5 % FCS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Um Einzelzellsuspensionen von Milz und Thymus zu gewinnen, wurden die Organe in Zellkulturschalen mit PBS/5 % FCS gebracht und über einen Falkonfilter darin zerkleinert. Die Suspension wurde dann über den Filter in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Lymphknoten wurden zwischen zwei Objektträgern homogenisiert und ebenfalls über einen Falkonfilter in ein 50 ml Falconröhrchen gebracht. Zur Präparation des Knochenmarks wurde eine Spritze mit PBS/5 % FCS gefüllt, mit dieser mehrmals der Knochen ausgespült und die Zelllösung in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspensionen der lymphatischen Organe wurden wie oben beschrieben zentrifugiert und bis zur Antikörperfärbung auf Eis aufbewahrt.

Für jede Antikörperfärbung wurden 10^6 Zellen (in 100 µl PBS/5 % FCS) der jeweiligen Zelllösung in eine 96-Lochkulturplatte pipettiert und bei 1200 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die gegen die unterschiedlichen hämatopoietischen Zellen gerichteten Antikörper wurden in PBS/5 % FCS verdünnt (1:100-1:400). Die Zellpellets wurden in je 50 µl der Antikörperlösungen resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C für 10 min wurden die Zellen in 400 µl PBS/5 % FCS aufgenommen und bis zur Analyse auf Eis stehen gelassen oder, wenn nötig, mit einem Zweitantikörper behandelt.

Die Analyse erfolgte in einem FACS Calibur der Firma Becton Dickinson.

2.2.30 Induktion von *Colitis ulcerosa* bei transgenen Mäusen

Für einen Darm-spezifischen Untersuchungsansatz der Dsg 2 *knock down* Mäuse wurde bei den Tieren die chronische und entzündliche Darmerkrankung *Colitis*

ulcerosa induziert. Dazu wurden die Dsg 2 *knock down* Tiere zunächst verpaart mit VillinCreER^{T2} Mäusen, die Tamoxifen-induzierbar und gewebespezifisch im Darm Cre Rekombinase exprimieren (El Marjou *et al*, 2004). Die Translokation des über den Villin Promoter transkribierten CreER^{T2} Fusionsmoleküls, bestehend aus Cre Rekombinase und modifiziertem Östrogenrezeptor, in den Zellkern wurde bei bitransgenen Tieren durch Injektion von Tamoxifen (1 mg in 100 µl Sonnenblumenöl/Tag an 5 aufeinander folgenden Tagen) stimuliert. Durch die Translokation von CreER^{T2} in den Zellkern sollte die CMV/EGFP/Stop-Kassette des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Transgens entfernt und so die Dsg 2 shRNA exprimiert werden. Während der folgenden *Colitis*-Induktion wurden die Tiere weiter mit Tamoxifen behandelt, um in den sich ständig erneuernden Darmzellen die Expression der Dsg 2 shRNA zu gewährleisten. Für die Induktion von *Colitis ulcerosa* wurde den Mäusen eine einmalige Dosis Azoxymethan (AOM, 7,4 mg/kg) intraperitoneal injiziert und für die nachfolgenden 7 Tage das Trinkwasser mit 3 % Dextransodiumsulfat (DSS) versetzt. In den darauf folgenden Wochen bekamen die Mäuse normales Trinkwasser. Die endoskopischen Untersuchungen erfolgten 3 und 5 Wochen nach Gabe von AOM und wurden freundlicherweise von Alexej Nikolaev und Dr. Christof Becker (I Med Klinik, Arbeitsgruppe Prof. Neurath, Universitätsklinik Mainz) an einem speziellen Miniendoskop (Coloview) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Rosa26CreER^{T2} Maus

Um den Dsg 2 *knock down* Phänotyp in der Maus zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten induzieren zu können und besonders um mögliche phänotypische Effekte in der Adultmaus zu entdecken, war die Verfügbarkeit einer konditionalen allgemeinen Cre-*Deleter*maus notwendig.

In Zusammenarbeit mit Prof. Anton Berns (*The Netherlands Cancer Institute, Division of Molecular Genetics and Center of Biomedical Genetics, Amsterdam, NL*) und dessen Mitarbeitern wurde die Rosa26CreER^{T2} Maus generiert und analysiert. Dabei fanden die Vorarbeiten (Klonierung, ES-Zellkultur und Injektion der manipulierten ES-Zellen) im *Netherlands Cancer Institute* statt. Die Analyse der Maus wurde am Institut für Toxikologie, Universität Mainz, durchgeführt und wird im folgenden Ergebnisteil beschrieben.

Es wurden verschiedene Fusionsmoleküle bestehend aus Cre Rekombinase und modifizierten Ligandenbindedomänen des humanen Östrogenrezeptors hergestellt (CreER^{T1}, CreER^{T2}, CreER^{TΔ}) und in den Rosa26 Locus von ES-Zellen gebracht (*knock in*). Die verschiedenen ES-Zellklone zeigten im Vergleich mit nicht transfizierten ES-Zellen keinen Unterschied in Zellgröße und Morphologie. In Gegenwart des synthetischen Östrogenantagonisten Tamoxifen, nicht aber durch den natürlichen Liganden 17-β-Östradiol, wurde die Translokation der Cre/ER-Fusionsmoleküle in den Zellkern bewirkt. Zudem konnte für die WT-Cre, CreER^{T1} und CreER^{T2} exprimierenden ES-Zellen keine Veränderung im Zellwachstum festgestellt werden. Bei Zellen, welche die CreER^{TΔ} Mutante (ohne Ligandenbindedomäne D des Östrogenrezeptors) exprimierten, kam es zu einem deutlichem Rückgang der Proliferation kultivierter ES-Zellen. Da CreER^{T2} exprimierende Rosa26 *knock in* ES-Zellen weder einen antiproliferativen noch genotoxischen Effekt zeigten und zudem im Vergleich mit CreER^{T1} ES-Zellen sensitiver auf Tamoxifen reagieren (Feil *et al*, 1997; Indra *et al*, 1999), wurden sie zur Generierung der hier vorgestellten Rosa26CreER^{T2} *Deleter*mauslinie verwendet.

3.1.1 Genotypisierung von Rosa26CreER^{T2} sowie Rosa26Reporter Mäusen

Im Labor wurden alle Mäuse standardmäßig mit Hilfe von PCR (2.2.5) genotypisiert. Mit dieser Methode ist es, im Gegensatz zur Genotypisierung mittels *Southern Blot*, möglich, innerhalb kurzer Zeit Transgene in Mäusen zu detektieren. Als *template* für die PCR diente dabei die aus den Schwanzbiopsien isolierte DNA (2.2.3). Zur Detektion des jeweiligen Transgens wurden spezifische Primerpaare ausgewählt, die ausschließlich an das jeweilige Transgen anbinden und nur in diesem Fall ein entsprechendes PCR-Produkt liefern. Durch ein fehlendes PCR-Produkt wiederum wird angezeigt, dass dieses Transgen nicht vorhanden ist. Um zu überprüfen, ob ein Transgen tatsächlich nicht vorhanden ist oder andere Faktoren dazu führten, dass kein Amplifikationsprodukt entstand, wurde für jede PCR ein weiteres Primerpaar verwendet, welches an ein endogenes Gen anbindet. Dadurch entstand ein zusätzliches PCR-Produkt, welches als interne PCR-Kontrolle diente. Eine weitere Kontrolle für die PCR war die Verwendung von DNA bereits getesteter Mäuse. Diese wurden als Positiv- (Träger des Transgens) und Negativ- (nicht Träger des Transgens) Kontrollen in jeder PCR mitgeführt. Ebenso wie die Leerkontrolle, die alle PCR-Reagenzien mit Ausnahme von DNA enthielt, wodurch eventuelle Kontaminationen sichtbar gemacht werden konnten.

Zur Genotypisierung potentieller Rosa26CreER^{T2} Mäuse wurden Primer gewählt, die an Cre Rekombinase anbinden und ein 300 bp großes PCR-Produkt lieferten. Als interne Kontrolle wurden die Primerpaare für Aktin verwendet, wodurch eine 450 bp-Bande entstand. Die PCR-Reaktionen wurden wie unter 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die Produkte wurden im Anschluss auf einem 2 % Agarosegel (2.2.6) aufgetrennt und das Ergebnis mittels UV-Transluminator dokumentiert. Abbildung 3.1 zeigt ein Agarosegelbild mit den Genotypisierungsproben einiger potenzieller Rosa26CreER^{T2} Mäuse (Nummer 13204-13213). Zur Orientierung der Bandengröße wurde neben den Proben und Kontrollen (Positiv-, Negativ- und Leerkontrolle) ein Marker auf das Gel aufgetragen. Mit Ausnahme der DNA-Probe 13205 sind alle getesteten Mäuse positiv für das Transgen (300 bp-Bande). Da die Probe 13207 nur eine schwache Bande lieferte, wurde diese Probe in einem späteren PCR-Ansatz wiederholt und bestätigt.

Um die Aktivität der Cre-Rekombinase in den Rosa26CreER^{T2} Mäusen testen zu können, wurden diese zunächst mit einer Reportermaus verpaart. Rosa26Reporter

(R26R) Mäuse (Soriano, 1999) besitzen ein in den Rosa26 Locus integriertes Transgen, das es ermöglicht, die Expression von Cre-Rekombinase durch X-Gal-Färbung sichtbar zu machen. Der Promoter ist von dem Reporter gen β -Galaktosidase durch eine von *loxP sites* flankierte Stop-Kassette (Neomycinkassette) getrennt. Nur durch Cre-induzierte Rekombination zwischen den *loxP sites* kommt es zur Deletion der Stop-Kassette und damit zur Expression des Transgens. Auf diesen Funktionalitätstest wird unter 3.1.2 genauer eingegangen. Da für diesen Test doppelt transgene Mäuse benötigt werden, wurden die Tiere zunächst mit Hilfe von PCR genotypisiert. Für diese PCR wurden drei Primer je Reaktion verwendet.

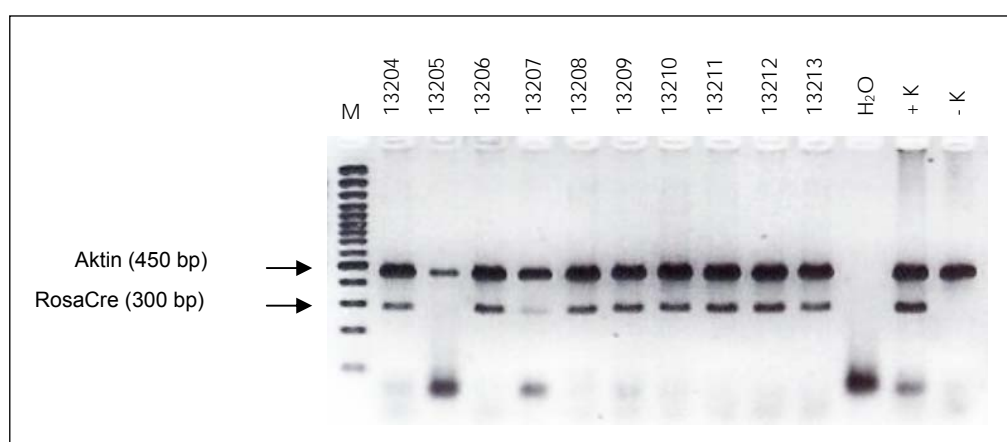


Abb. 3.1: Genotypisierung von Rosa26CreER^{T2} Mäusen

Agarosegel mit den Produkten einer Genotypisierungs-PCR. Die verwendete DNA stammt von Mausschwanzbiopsien potentieller Rosa26CreERT2 Mäuse. Zahlen geben die Nummern der Mäuse an. Als Leerkontrolle wurde ein PCR-Ansatz anstelle von DNA mit Wasser versetzt (H₂O). Als Positivkontrolle (+ K) diente DNA einer bereits für das Transgen positiv getesteten Maus. Als Negativkontrolle (- K) wurde DNA einer Maus verwendet, die nicht Träger des Transgens ist. Mäuse, die Träger des Rosa26CreER^{T2} Transgens sind, liefern neben dem Produkt der internen PCR-Kontrolle (Aktin, 450 bp) ein weiteres, 300 bp großes PCR-Produkt (RosaCre). M Marker (100 bp *ladder*)

Von diesen bindet ein Primer im Wildtyp-Rosa26 Locus, der zweite Primer bindet ausschließlich im genetisch veränderten Bereich und der dritte Primer bindet in beiden Fällen an den Rosa26 Locus auf der DNA. Für das Transgen entstand dabei eine Bande von 300 bp, für den Wildtyp eine von 600 bp. Dies bedeutet zum einen, dass in diesen Genotypisierungen keine weitere interne PCR-Kontrolle verwendet werden musste, da für nicht transgene Mäuse die Wildtyp-Bande erschien. Des Weiteren konnte mit diesem PCR-Ansatz festgestellt werden, ob die betreffende Maus homo- oder heterozygot für das Transgen ist. In Abbildung 3.2 ist das Ergebnis einer solchen Genotypisierungs-PCR in Form eines Agarosegelbildes für die Proben 11510 bis 11515 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Mäuse heterozygot für das

Transgen sind, da in allen Fällen neben der transgenen (Mut) auch die Wildtyp-Bande (WT) erscheint.

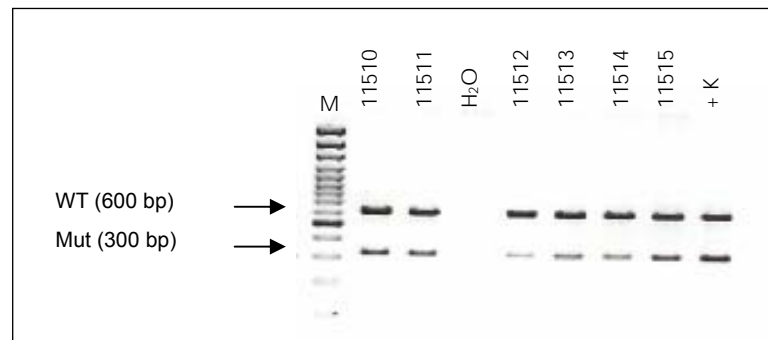


Abb. 3.2: Genotypisierung von Rosa26Reporter (R26R) Mäusen

Agarosegels mit PCR-Produkten von R26R Mäusen. Neben dem Marker (M, 100 bp *ladder*) sind die Produkte der verschiedenen Mäuse (11510-15) sowie die Positiv- (+ K) und Leerkontrolle (H₂O) der PCR aufgetragen. Die verwendeten Primer binden an den Rosa26 Locus auf der DNA und liefern für den Wildtyp-Lokus (WT) ein 600 bp- und für den transgenen Locus (Mut) ein 300 bp-Produkt.

3.1.2 Behandlung doppelt transgener Rosa26CreER^{T2}/R26R Mäuse mit Tamoxifen führt zu unterschiedlich starker Expression des Reportergens β -Galaktosidase in verschiedenen peripheren Organen

Um die Aktivität der Cre-Rekombinase in verschiedenen Geweben der Rosa26CreER^{T2} Maus untersuchen zu können, wurde diese mit entsprechenden Reporterstämmen verpaart. Für den im folgenden beschriebenen Funktionalitätstest wurden zur Verpaarung R26R Mäuse gewählt, welche als Reportergen β -Galaktosidase exprimieren. Da zwischen Reportergen und Promoter eine von *loxP sites* flankierte Neomycin/Stop-Kassette liegt, kommt es zunächst nicht zur Expression des Reportergens. Erst nach Cre-vermittelter Rekombination zwischen den *loxP sites* wird die Stop-Kassette aus der DNA entfernt und β -Galaktosidase kann exprimiert werden.

Das Gen für Cre-Rekombinase in Rosa26CreER^{T2} Mäusen ist an eine modifizierte Ligandenbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors (tripel-Mutation: Glycin400Valin/Methionin543Alanin/Leucin544Alanin; Indra *et al*, 1999) gekoppelt. Aufgrund dieser Fusion gelangt die Cre-Rekombinase erst dann in den Zellkern, wenn der synthetische Ligand Tamoxifen (Tam) an den Rezeptor gebunden hat. Durch die Anbindung des Liganden kann das Molekül in den Zellkern

translozieren und dort seine Funktion, die Rekombination zwischen zwei *loxP sites*, ausführen. Aus der Literatur sind bereits ähnliche Fusionsmoleküle bekannt (Danielian *et al*, 1998; Feil *et al*, 1996 und 1997; Indra *et al*, 1999; Littlewood *et al*, 1995; Vasioukhin *et al*, 1999). Bei der Zubereitung der Tamoxifen-Injektionslösung konnte daher auf bereits publizierte Ansätze zurückgegriffen werden (Danielian *et al*, 1998; Indra *et al*, 1999). Um die Effizienz des hier verwendeten CreER^{T2} Systems zu testen und Cre-Aktivität in möglichst vielen Zellen zu erreichen, wurde doppelt transgenen Rosa26CreER^{T2}/R26R Tieren für 5 oder 10 aufeinander folgende Tage je 1 mg Tamoxifen (100 µl, in autoklaviertem Sonnenblumenöl) oder als Kontrolle das gleiche Volumen autoklaviertes Sonnenblumenöl intraperitoneal injiziert und diese 5 oder 15 Tage nach der letzten Injektion analysiert (Abb. 3.3). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde darauf geachtet, die Tiere während der Behandlungszeit in getrennten Käfigen zu halten, da in der Literatur Kreuzkontaminationen durch co-Habitation von aktivierten Tieren und Kontrolltieren beschrieben wurde (Brake *et al*, 2004). Für die Analyse wurden die Mäuse euthanasiert, die Organe in Isopentan eingefroren und Kryostat-Gewebeschnitte angefertigt, die im Anschluss fixiert und mit X-Gal gefärbt wurden (2.2.24). In den Zellen, in welchen Cre Rekombination stattgefunden hat und die daher β-Galaktosidase exprimieren, ist eine Blaufärbung aufgrund der Umsetzung des Substrats X-Gal zu erwarten.

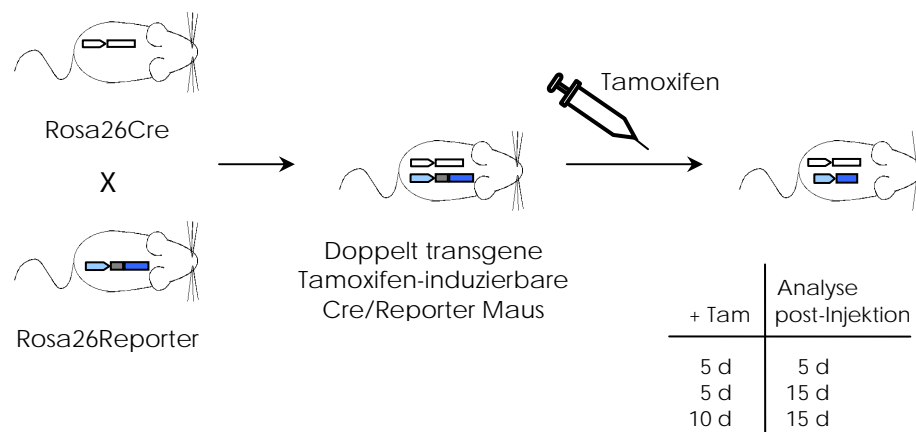


Abb. 3.3: Verpaarungs- und Tamoxifenregime-Schema für den auf X-Gal-Färbung basierenden Funktionalitätstest der Rosa26CreER^{T2} Maus

Rosa26CreER^{T2} Mäuse wurden für einen Funktionalitätstest mit R26R Mäusen verpaart (links). Doppelt transgenen Tieren (Mitte) wurde für 5 oder 10 Tage (d) 1 mg Tamoxifen (pro Tier und Tag) intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden 5 oder 15 Tage nach der letzten Injektion analysiert.

ERGEBNISSE

Tamoxifen (1 mg/d)	-	5 d	5 d	10 d
Analyse post-Injektion	5 d	5 d	15 d	15 d
Haut				
Zunge				
Luftröhre				
Herz				
Leber				
Niere				
Blase				
Magen				
Dünndarm				
Dickdarm				
Muskel				
Gehirn				

Abb. 3.4: X-Gal-Färbung von Kryostatschnitten der mit Tamoxifen behandelten Rosa26CreER^{T2}/R26R Mäuse

Doppelt transgenen Tieren wurde an 5 oder 10 aufeinander folgenden Tagen je 1 mg Tamoxifen (in 100 µl autoklaviertem Sonnenblumenöl) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle wurde das gleiche Volumen autoklaviertes Sonnenblumenöl gespritzt (linke Spalte). Dargestellt sind mit X-Gal gefärbte Kryostatschnitte verschiedener Organe für die unterschiedlichen Behandlungsprotokolle.

In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis der unterschiedlichen Tamoxifenbehandlungen dargestellt. Bei den Kontrollmäusen, die nur mit autoklaviertem Sonnenblumenöl behandelt wurden, sind keine blau gefärbten Zellen auf den Kryostatschnitten zu sehen (Abb. 3.4 links). Bereits eine 5 Tage andauernde Behandlung mit Tamoxifen mit anschließender Wartezeit von 5 Tagen führte in der Mehrzahl der Organe zu β -Galaktosidase-Expression (Abb. 3.4 zweite Spalte). Die Anzahl an β -Galaktosidase exprimierenden Zellen variierte dabei stark zwischen den einzelnen Geweben. Niere, Blase, Magen und Muskel zeigten nur wenige blau gefärbte Zellen. In Zunge, Luftröhre und Herz konnten deutlich mehr blaue Zellen detektiert werden. Die Färbung führte in Haut, Leber, Dünn- und Dickdarm zu über 30 % β -Galaktosidase exprimierender Zellen. Wurde die Analyse 15 Tage nach der letzten über 5 Tage laufenden Tamoxifeninjektion durchgeführt, kam es in Luftröhre, Herz, Niere, Blase und Magen zu einem deutlichem Anstieg an blauen Zellen (Abb. 3.4, dritte Spalte von links). Im Muskel war die Expression des Reportergens auch nach 15 Tagen sehr gering. In den nach 5 Tagen stark blau gefärbten Organen (Haut, Leber, Dünn- und Dickdarm) konnte keine wesentliche Steigerung der β -Galaktosidaseexpression erreicht werden. Die Gesamtdauer der Tamoxifenbehandlung (5 oder 10 Tage) hatte ebenfalls nur wenig Einfluss auf den Anteil blauer Zellen auf dem Gewebeschnitt (vergleiche Spalte drei und vier in Abb. 3.4). Mit Ausnahme von Leber und Blase, wo es zu einer leichten Steigerung an blauen Zellen kam, veränderten sich die Expressionslevels des Reportergens im Vergleich mit der fünftägigen Behandlung nicht. Auffällig ist das Fehlen von blauen Zellen in allen Gehirnschnitten. Auch nach mehrmaliger Wiederholung der Färbung mit geeigneten Positivkontrollen konnten keine blauen Zellen auf diesen Schnitten detektiert werden. Zusammenfassend fällt im Vergleich der verschiedenen Organe miteinander auf, dass in einigen Geweben mehr blaue Zellen zu finden sind als in anderen. Des Weiteren ist festzustellen, dass unterschiedliche Behandlungsweisen zu unterschiedlich ausgeprägter Blaufärbung führten.

Um zu überprüfen, ob das Fehlen von blauen Zellen im Gehirn auf ein niedriges Expressionslevel der Cre Rekombinase zurückzuführen ist, wurden die Organe deshalb mittels *Western Blot* analysiert.

3.1.3 Analyse der Expression von Cre Rekombinase in verschiedenen Organen der Rosa26CreER^{T2} Maus zeigt keine detektierbare Expression im Gehirn

Aufgrund der fehlenden blauen Zellen auf den Kryostatschnitten vom Gehirn der Rosa26CreER^{T2} Maus wurden *Western Blots* verschiedener Gewebe durchgeführt, um so Cre Proteinexpression nachzuweisen. Dazu wurden die Organe transgener Tiere in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und die Proteinextraktion wie unter 2.2.19.2 beschrieben durchgeführt. Durch photometrische Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung (2.2.20) wurde das zu verwendende Proteinvolumen ermittelt und je Probe 100 µg Protein auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.2.22.1). Der *Western Blot* wurde dann unter Verwendung eines α-Cre Antikörpers (1:1000 in Erstantikörperverdünnungslösung) wie dargestellt durchgeführt (2.2.22.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 zusammengefasst. Im Fall der Rosa26CreER^{T2} Maus sind für Haut, Zunge, Leber, Herz, Blase, Muskel, Magen, Dünn- und Dickdarm deutliche Banden für das modifizierte Cre Protein, das eine Größe von 74 kDa hat, erkennbar. In den Spuren der Negativkontrolle (Proteinextrakte einer Wildtyp Maus, in der Abbildung die jeweils linke Spur) sind keine Banden auf der mit Cre-Antikörper behandelten Membran zu sehen. Im Gehirn konnte keine Cre Expression detektiert werden, was die Ergebnisse aus den Gefrierschnitten dieses Organs wiederum bestätigte. Zur Ladekontrolle wurde der gebundene Cre-Antikörper im Anschluss an die Dokumentation der Cre Expression vom der Membran gewaschen und mit p38-Antikörper (1:200 in Erstantikörperverdünnungslösung) re-inkubiert (2.2.23). Das Ergebnis ist jeweils unter dem Cre Blot dargestellt und zeigt in jedem Gewebe eine vergleichbare Konzentration von Kontroll- und Testprotein. Aufgrund dieses *Western Blot* Ergebnisses ist festzustellen, dass das unter 3.1.2 beobachtete Fehlen von X-Gal positiven Zellen im Gehirn durch fehlende Expression oder sehr geringe (nicht im *Western Blot* detektierbare) Mengen an Cre Expression erklärt werden kann.

ERGEBNISSE

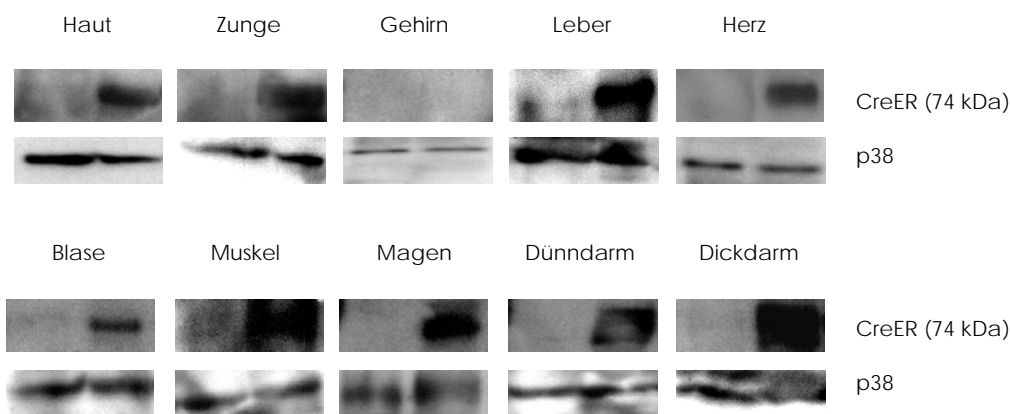


Abb. 3.5: Expression von Cre Rekombinase in verschiedenen Geweben der Rosa26CreER^{T2} Maus

Gezeigt sind die Ergebnisse von *Western Blots*, wobei für jedes Organ Proteinextrakt einer Wildtyp Maus (links) neben dem der Rosa26CreER^{T2} Maus (rechts) aufgetragen wurde. Der jeweils obere *Blot* zeigt die Expressionslevels der Cre Rekombinase, darunter ist der gleiche *Blot* mit p38-Antikörperbehandlung zu sehen.

3.1.4 FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*)-Analyse hämatopoietischer Organe von Rosa26CreER^{T2}/RAGE Mäusen zeigt unterschiedlich starke Aktivierung der Cre Rekombinase in verschiedenen Blutzellpopulationen

Zur weiteren Charakterisierung der Rosa26CreER^{T2} Maus sollten hämatopoietische Organe auf Cre-Aktivität analysiert werden. Dazu wurden die Tiere mit einer weiteren Reportermaus, der RAGE Maus (Constien *et al.*, 2001), verpaart. Diese exprimiert das grüne Fluoreszenzprotein (EGFP) nach Cre-vermittelter Exzision einer Neomycin/Stop-Kassette. Mit Hilfe des FACS kann EGFP Expression leicht in Einzelzellsuspensionen detektiert werden. Des weiteren ist die FACS-Analyse sehr sensitiv, so dass wenige grüne Zellen in einem Zellgemisch detektiert werden können.

Um die Translokation der Cre Rekombinase in den Zellkern zu induzieren, wurde doppelt transgenen Rosa26CreER^{T2}/RAGE Mäuse an 5 aufeinander folgenden Tagen je 1 mg Tamoxifen (in 100 µl autoklaviertem Sonnenblumenöl) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle wurden doppelt transgene Tiere mit je 100 µl autoklaviertem Sonnenblumenöl behandelt. Fünfzehn Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere euthanasiert, die hämatopoietischen Organe (Milz, Knochenmark, Lymphknoten und Thymus) entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt, welche mit den gegen die verschiedenen Blutzellpopulationen gerichteten

ERGEBNISSE

Antikörpern inkubiert wurden (2.2.28). Die Messung der Proben erfolgte in einem FACS Calibur. Ausgewertet wurden die erhaltenen Ergebnisse mit der Software Cellquest Pro.

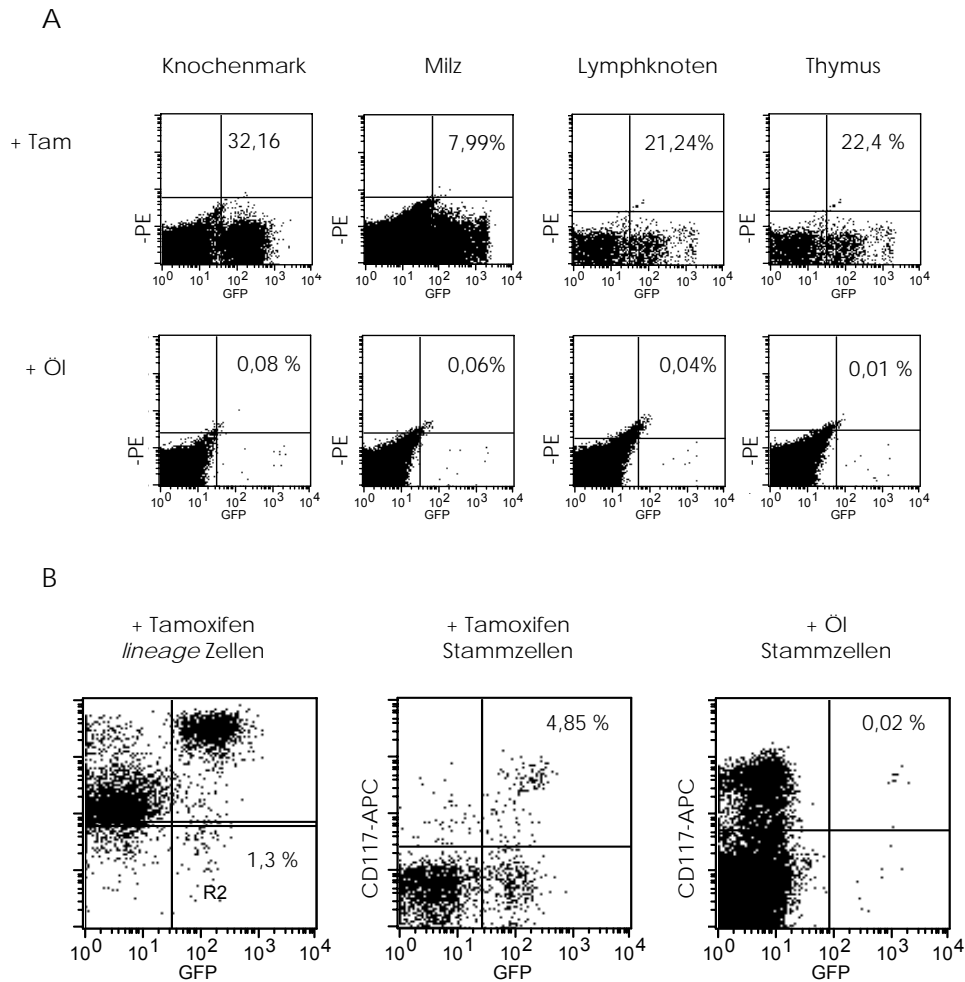


Abb. 3.6: FACS-Plots verschiedener hämatopoietischer Organe der Rosa26CreER^{T2}/RAGE Maus mit und ohne Tamoxifen-Induktion.

(A) *Dotplots* von ungefärbten Zellen aus Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Thymus. Grünes Fluoreszenzprotein (EGFP) ist jeweils gegen Zellgranularität aufgetragen. Die obere Reihe zeigt *Plots* einer mit Tamoxifen-induzierten Maus, darunter sind die entsprechenden *Plots* einer mit Öl behandelten Maus zu sehen. Die Prozentwerte (oben rechts im jeweiligen *Plot*) geben den Anteil an grünen Zellen in der jeweiligen Probe wieder.

(B) Die *Plots* zeigen Einstellungen für die Definition von Stammzellen aus dem Knochenmark. Im linken *Plot* wurden Knochenmarkszellen mit den PE-gekoppelten Antikörpern gegen die verschiedenen Blutzellen (so genannte *lineage* Zellen) gefärbt (lin-PE). Der Anteil an PE-negativen, im unteren rechten Quadranten (R2) liegenden Zellen (1,3 %) wurden in einem weiteren *Dotplot* gegen CD117-APC aufgetragen. Der mittlere *Plot* stellt die Färbung einer Tamoxifen-induzierten Maus dar, der rechte die einer mit Öl behandelten Maus. Die Prozentwerte im mittleren und rechten *Plot* geben den Anteil an grünen Stammzellen an.

Die *Dotplots* der verschiedenen ungefärbten hämatopoietischen Organe sind in Abbildung 3.6A dargestellt. Untereinander sind nach gleicher Behandlungsweise die *Plots* für eine mit Tamoxifen (induziert) und eine mit Öl behandelte Maus (Kontrolle) zu sehen. Die Prozentwerte geben den Anteil an allen in der Population vorhandenen grünen Zellen an. Im Knochenmark der Tamoxifen-induzierten Maus wurden 32,16 % grüne Zellen gemessen, in der Milz 7,99 %, im Lymphknoten 21,24 % und im Thymus 22,4 %. Für die mit Öl injizierte Maus wurden im Knochenmark 0,08 %, in der Milz 0,06 %, im Lymphknoten 0,04 % und im Thymus 0,01 % EGFP-positive Zellen detektiert.

In Abbildung 3.6B ist für eine Tamoxifen-induzierte Maus demonstriert, wie die Population der Stammzellen im Knochenmark definiert wurde. Zunächst wurden die Zellen mit allen gegen die verschiedenen reifen Blutlinien (so genannte *lineage* Zellen) gerichteten PE-gekoppelten Antikörpern gefärbt und in einem *Dotplot* PE (Ordinate) gegen EGFP (Abszisse) aufgetragen (linker *Plot* in Abb. 3.6B). Zusätzlich waren die Zellen mit α -CD117-APC gefärbt, der als potenzieller Stammzellmarker beschrieben ist (Crosby *et al*, 2001; Dirnhofer *et al*, 2006). Die PE-negativen, und damit nicht *lineage* Zellen (R2; 1,3 %) wurden dann in einem weiteren FACS-*Plot* APC gegen GFP gemessen (mittlerer *Dotplot*). Die APC-positiven, PE-negativen Zellen wurden als Stammzellen definiert. Bei der verwendeten mit Tamoxifen injizierten Maus waren 4,85 % der Stammzellen positiv für EGFP, in der Öl-Kontrollmaus wurden 0,02 % grüne Stammzellen gemessen.

Abbildung 3.7 zeigt die *Dotplots* der verschiedenen Blutzellsubpopulationen unter Angabe des prozentualen Anteils grüner Zellen in der jeweiligen Population. Zusammenfassend sind in Abbildung 3.8 die im Durchschnitt erhaltenen prozentualen Anteile EGFP-positiver Zellen für die einzelnen Blutzellpopulationen der Tamoxifen- und Öl-induzierten Rosa26CreER^{T2}/RAGE Mäuse in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Hier ist die unterschiedliche Skalierung der Diagramme zu beachten, die im Fall der Tamoxifen-induzierten Tiere von 0 bis 40 % und bei den Kontrolltieren von 0 bis 0,2 % reicht. Nach Tamoxifen-Behandlung exprimieren durchschnittlich 32,16 % der Knochenmarkszellen EGFP. Ohne Induktion wurden im Knochenmark 0,08 % grüne Zellen gemessen (Abb. 3.6). Die einzelnen Populationen hämatopoietischer Zellen variieren stark in den Expressionslevels. In der T-Zell Population wurden nach Tamoxifen-Injektion 5,88 % EGFP exprimierende Zellen detektiert (ohne Tamoxifen 0,15 %). Makrophagen

zeigten mit Tamoxifen einen Anteil grüner Zellen von 35,9 % (ohne Tamoxifen 0,02 %), B-Zellen von 1,95 % (0,09 %), Mastzellen von 0,16 % (0,01 %), Endothelzellen von 5,07 % (0,03 %), Platelets/Megakaryozyten von 1,62 % (0,01 %), Granulozyten von 34,5% (0,02 %), Erythrozyten von 1,15 % (0,06 %) und Stammzellen bildeten 4,85 % (0,02 %) EGFP exprimierende Zellen.

Die Färbungen wurden dreimal an unterschiedlichen Versuchstagen mit unterschiedlichen Mäusen durchgeführt und zeigten reproduzierbare Werte.

Anhand der so erhaltenen Ergebnisse ist festzuhalten, dass es in den verschiedenen Blutzellpopulationen zu unterschiedlich starker Cre Rekombinase-vermittelter Induktion des EGFP-Reportergens kam. Darüber hinaus kam es in den untersuchten Zellen zu einer Aktivierung des Reportergens in Abwesenheit von Tamoxifen, was in der Literatur bereits für ein anderes Cre/ER-Fusionsmolekül beschrieben ist (Schwenk *et al*, 1998). Dieses Ergebnis ist wichtig, da es zeigt, dass das Cre/ER-System eine gewisse „unerwünschte“ Hintergrundaktivität hat, welche es deshalb für manche Versuche (z.B. für Krebsmodelle) disqualifiziert.

ERGEBNISSE

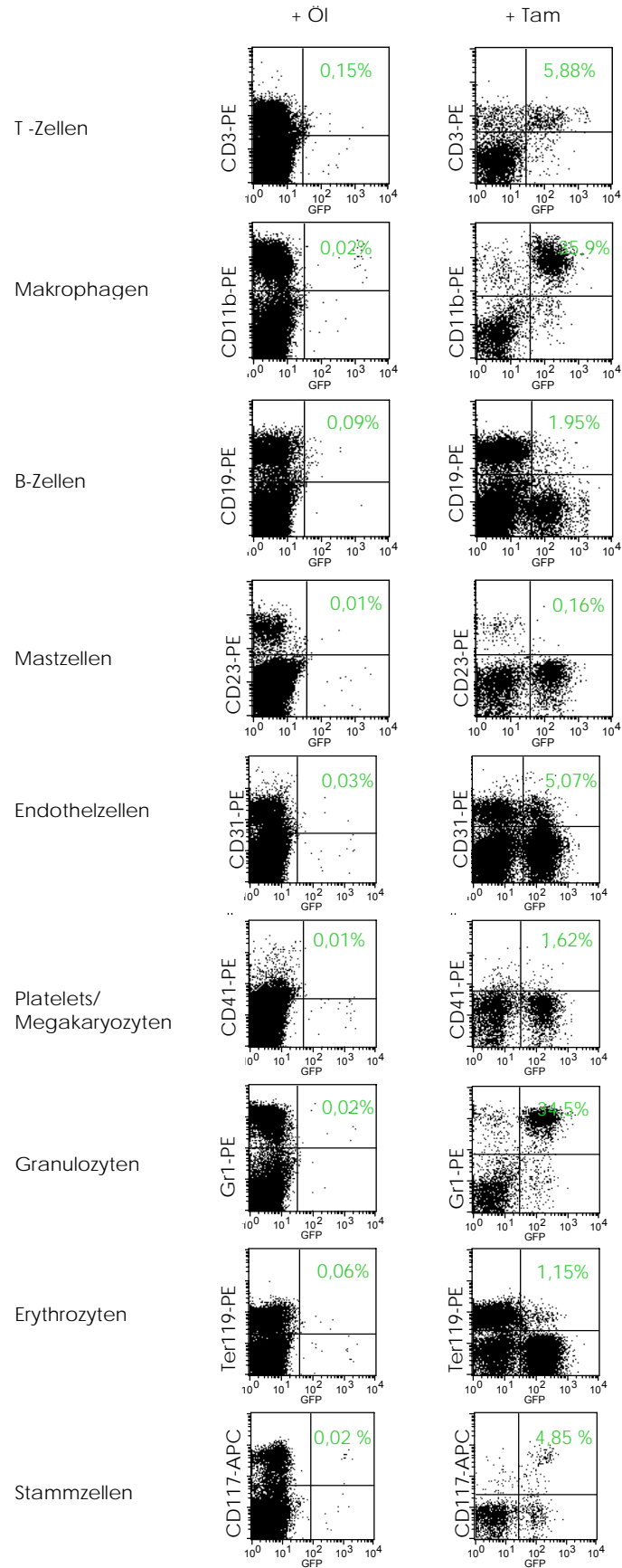


Abb. 3.7: FACS-Plots der Blutzellpopulationen von Rosa26CreER^{T2}/RAGE Mäusen nach Öl- oder Tamoxifenbehandlung. Untereinander sind die Plots für die Blutzellen dargestellt. Links die einer mit Öl behandelten (+ Öl), rechts die der Tamoxifen-induzierten Maus (+ Tam). Prozentwerte (jeweils im oberen rechten Quadrant) geben den Anteil grüner Zellen in der Population an.

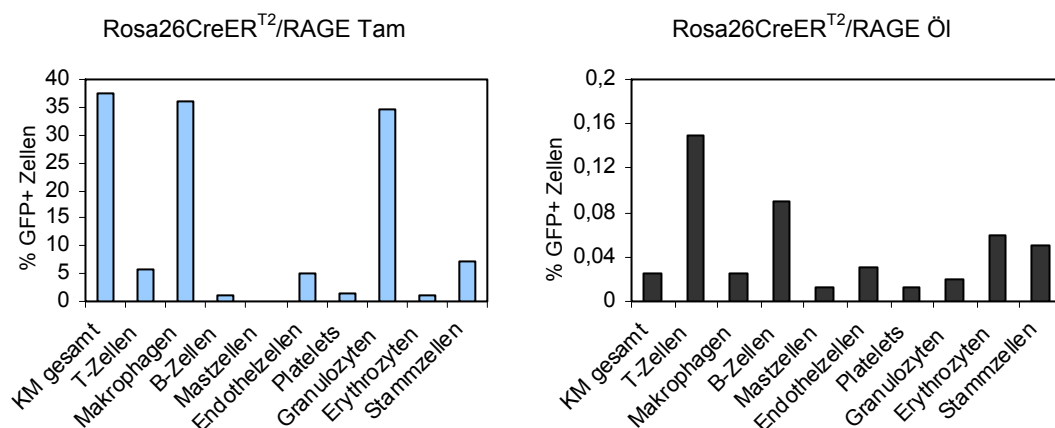


Abb. 3.8: Expressionslevels von GFP (grünes Fluoreszenzprotein) in verschiedenen Blutzellpopulationen von Rosa26CreER^{T2}/RAGE Mäusen

Dargestellt des durchschnittlichen prozentualen Anteils grüner Zellen an der jeweils gemessenen Zellpopulation in Form eines Balkendiagramms. Das linke Diagramm zeigt die Werte nach Tamoxifen-Behandlung (Tam). Im rechten Graph sind die Werte der Kontrollmäuse (Öl) zu sehen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Diagramme.

3.1.5 Bereits im Embryo kann Cre Rekombinase durch Injektion von Tamoxifen ins Muttertier aktiviert werden

Neben der induzierbaren Expression oder Deletion von Genen im adulten Tier ist die Analyse früh exprimierter Gene von besonderem Interesse. Es galt daher zu untersuchen, ob die Cre Rekombinase bereits im Embryo eingeschaltet werden kann und RosaCreER^{T2} Mäuse sich somit auch für die Analyse von Genen eignen, die auch oder ausschließlich in der frühen Ontogenese eine Rolle spielen. Um dies zu testen, wurden RosaCreER^{T2} Mäuse mit den bereits in 3.1.2 und 3.1.4 beschriebenen Reporterlinien verpaart. Die Weibchen wurden am Tag nach der Verpaarung auf einen Vaginalpropf untersucht, so dass die Dauer der Schwangerschaft genau bestimmt werden konnte. An Tag E7,5 und E10,5 der Tragezeit wurde den Muttertieren 1 mg Tamoxifen (in 100 µl autoklaviertem Sonnenblumenöl) intraperitoneal injiziert (Hayashi und McMahon, 2002) und zwei Tage darauf die Embryonen (E9,5 und E12,5) präpariert (2.2.27). Die potenziell doppelt transgenen RosaCreER^{T2}/R26R Embryonen wurden wie beschrieben fixiert und mit X-Gal gefärbt (2.2.27). Nachkommen aus RosaCreER^{T2}/RAGE Verpaarungen wurden mit Hilfe von FACS analysiert (2.2.28) und per PCR genotypisiert. Um für den beobachteten Hintergrund an EGFP-positiven Zellen in Abwesenheit von Tamoxifen

einen Vergleichswert in den Embryonen zu bekommen, wurde einigen Tieren nach diesen Verpaarungen zur Kontrolle anstelle von Tamoxifen 100 µl autoklaviertes Sonnenblumenöl injiziert.

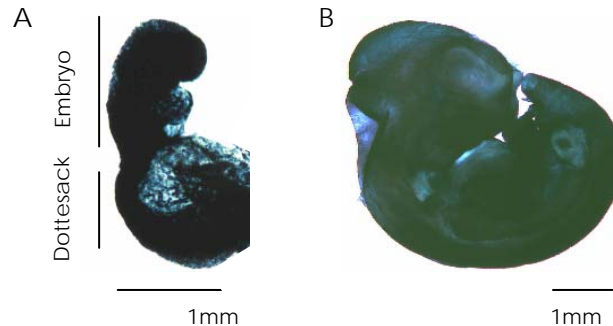


Abb. 3.9: X-Gal-Färbung von Rosa26CreER^{T2}/R26R Embryonen

(A) Der E9,5 Tage alte Embryo wurde zum Teil vom Dottersack, der im unteren Bereich der Abbildung zu erkennen ist, frei präpariert.

(B) An Tag E12,5 hat der Embryo stark an Größe zugenommen. Zum Vergleich sind Linien, die 1 mm der Normalgröße entsprechen, angegeben.

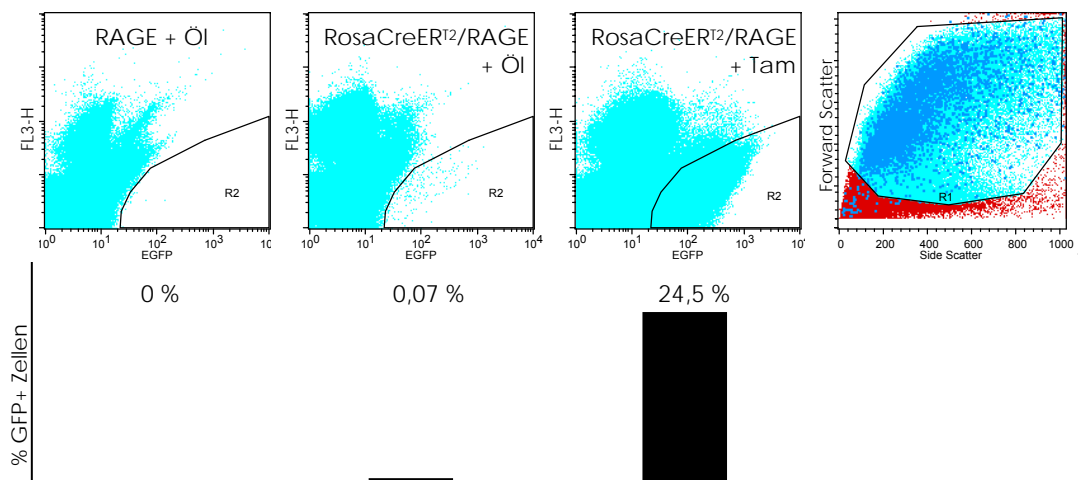


Abb. 3.10: FACS-Analyse 12 Tage alter Rosa26CreER^{T2}/RAGE Embryonen

Im oberen Bereich der Abbildung sind drei FACS-Dotplots von Zellen gezeigt, die aus E12,5 Embryonen präpariert wurden, welche 2 Tage zuvor mit Tamoxifen oder Öl behandelt worden waren. Es ist jeweils EGFP (Abszisse) gegen Zellgranularität (Ordinate) aufgetragen. Die im Bereich von R2 liegenden Zellen wurden als EGFP-positiv betrachtet. Unter den Dotplots ist in einem Balkendiagramm der zugehörige durchschnittliche Anteil an grünen Zellen dargestellt. Der im rechten Teil der Abbildung zu sehende Plot zeigt die Zellen im Forward/Side Scatter. Nur Zellen, welche im Bereich R1 liegen (in blau dargestellt), wurden in den EGFP/Zellgranularität Dotplot übertragen.

Die Abbildungen 3.9 und 3.10 zeigen die Ergebnisse dieser Embryo-Analyse. Rosa26CreER^{T2}/R26R Embryonen zeigen nach X-Gal-Färbung eine starke Blaufärbung im gesamten Körper. Aufgrund von Behandlung mit Benzylalkohol/Benzylbenzoat im Anschluss an die Färbung können zum Teil auch innere Strukturen erkannt werden. Der E12,5 Embryo wurde komplett vom

Dottersack frei präpariert. Aufgrund der geringen Größe und um den Embryo in seiner Struktur nicht zu schädigen, wurde bei 9,5 Tage alten Embryonen der Dottersack nur zum Teil entfernt.

Die FACS-Analyse der Einzelzellsuspensionen aus Rosa26CreER^{T2}/RAGE Embryonen ergab im Durchschnitt 24,5 % EGFP-positive Zellen für Tamoxifen-induzierte und 0,07 % grüne Zellen für Öl behandelte Embryonen. In Abbildung 3.10 ist zusätzlich ein *Dotplot* eines RAGE-Embryos als Kontrolle aufgeführt (links), um so eine Hintergrundaktivität der RAGE Maus ausschließen zu können. Unterhalb der FACS-Plots sind in einem Balkendiagramm die durchschnittlichen Anteile grüner Zellen der Öl- und Tamoxifen-behandelten Embryonen dargestellt. Der rechte FACS-Plot zeigt beispielhaft die Zellen im *Forward/Side Scatter*, in dem nur die in R1 liegenden Zellen (in blau dargestellt) zur Analyse ausgewählt wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein hoher prozentualer Anteil der embryonalen Zellen schon nach einmaliger Injektion von Tamoxifen zur Expression der Reportergene EGFP und β -Galaktosidase induziert wird. Ferner wurde durch FACS-Analyse der E12,5 Rosa26CreER^{T2}/RAGE Embryonen eine geringe Aktivierung des Reportergens auch in Absenz von Tamoxifen beobachtet.

3.2 Knock down von Dsg 2 mit Hilfe des Expressionsvektors pTER_{EGFP}

Durch Verwendung des Expressionsvektors pTER_{EGFP} (Tet-inducible RNAi) kann eine spezifische Inhibition der Genexpression erreicht werden. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Marc van de Wetering (*Hubrecht Laboratory, Centre for Biomedical Genetics, Utrecht, NL*) zu Verfügung gestellt (van de Wetering *et al*, 2003) und bedient sich des Tet-Systems zur konditionalen Regulierung der Expression von shRNA (Gossen und Bujard, 1992). Der Vektor besitzt zur Expression der shRNA (*small hairpin RNA*) einen Doxycyclin (Dox)-abhängigen RNA Polymerase III H1 Promoter. Dieser beinhaltet eine Bindestelle (TetO, Tet Operatorsequenz) für den Tet-Repressor (TetR), welcher die Expression der shRNA blockiert. In Gegenwart von Dox verändert das Repressormolekül seine dreidimensionale Struktur, wonach ein Anbinden an TetO nicht mehr möglich ist und es zur Expression der shRNA kommt. Um dieses über Dox induzierbare System zu nutzen, ist neben dem shRNA Expressionsvektor ein TetR Molekül notwendig. Da in

der hier vorliegenden Arbeit der Vektor pTER_{EGFP} ausschließlich dazu genutzt wurde, verschiedene siRNA Zielsequenzen in Zellkulturexperimenten auf deren Funktionalität zu testen, wurde auf die Verwendung des Repressormoleküls und damit auf die Induzierbarkeit des Systems verzichtet.

3.2.1 Klonierung von verschiedenen siRNA Sequenzen gegen Dsg 2 in den Expressionsvektor pTER_{EGFP}

Um den optimalen *knock down* von Dsg 2 erreichen zu können, wurden drei verschiedene siRNA Zielsequenzen anhand der mRNA Sequenz ausgewählt (2.2.10). Die zur Insertion in den Expressionsvektor synthetisch hergestellten shRNA (*short hairpin* RNA) Oligonukleotide beinhalten neben der siRNA Sequenz (19 bp) eine 9 bp lange Sequenz für den so genannten *hairpin* oder *loop* im shRNA Molekül (Abb. 3.11). Die Sequenz dieses *hairpins*, die für die Insertion in den Vektor notwendigen Nukleotide sowie die aus Verwendung des H1 Promoters resultierende Terminatorsequenz waren bereits vorgegeben (van de Wetering *et al*, 2003).

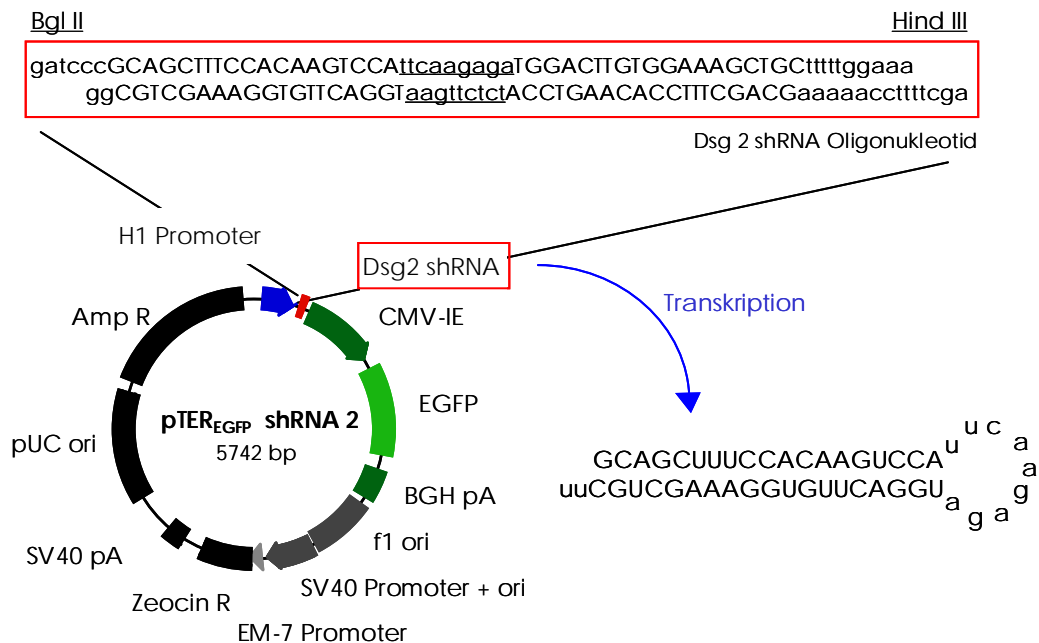


Abb. 3.11: ShRNA Expressionsplasmid pTER_{EGFP}

Im linken Teil der Abbildung ist der shRNA Expressionsplasmid schematisch dargestellt. In der Sequenz des Dsg 2 shRNA Oligonukleotids (oben) stehen Großbuchstaben für die siRNA Sequenz, kleine Buchstaben für die vorgegebenen Sequenzbereiche und unterstrichene Schriftzeichen für die Sequenz des *hairpins*. Rechts ist die shRNA als *stem-loop*-Struktur nach der Transkription abgebildet. AmpR Ampicillinresistenzgen, H1 Promoter Histon 1 Promoter, CMV-IE Cytomegalusvirus Promoter *Immediate Early*, BGH *bovine growth hormone*, f1 ori F1 Einzelstrang-DNA Origin, SV40 Simian Virus 40, EM-7 Promoter synthetischer prokaryotischer Promoter, Zeocin R Zeocinresistenzgen, pUC ori *plasmid replication origin*, ori *origin of replication*, pA Polyadenylierungssignal

ERGEBNISSE

Durch *Annealing* der shRNA Oligonukleotide (2.2.11) wurden doppelsträngige Moleküle erhalten, die dann mit dem Bgl II/Hind III-verdauten Plasmid ligiert wurden (2.2.9.2 und 2.2.12). Vom Ligationsansatz wurde 1 µl zur Transformation elektrokompenter Bakterienzellen verwendet (2.2.14.1). Ein Teil jeder gewachsenen Bakterienkolonie wurde am nächsten Tag in 5 µl *Aqua destillata* gelöst und 1 µl davon als *template* für die PCR zur Überprüfung auf positive Klone verwendet (2.2.5). Dabei wurden die PCR Primer so gewählt, dass für den leeren Vektor ein PCR-Produkt von 489 bp und im Fall der Integration des Inserts eines von 549 bp entsteht. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mittels UV-Transluminator dokumentiert.

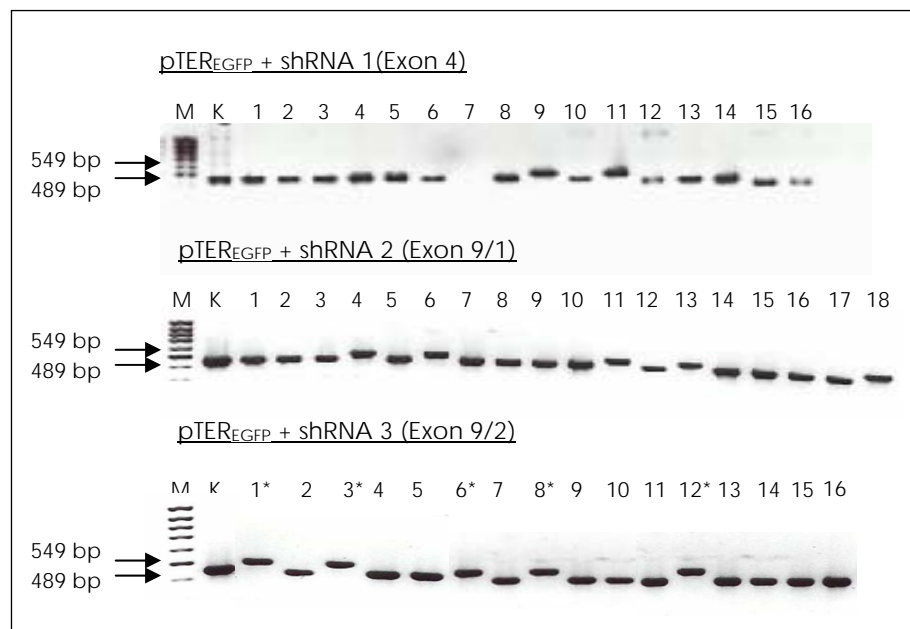


Abb. 3.12: PCR zur Suche nach positiven Klonen nach Ligation von shRNA Sequenzen in pTER_{EGFP}

Untereinander sind Gelbilder für PCR-Produkte von Bakterienkolonien dargestellt, welche nach Ligation der drei shRNA Sequenzen mit dem Expressionsvektor und anschließender Elektroporation erhalten wurden. Positive Klone, welche das shRNA Oligonukleotid enthalten, sind mit * gekennzeichnet.

M Marker (1 kb *ladder*), K Negativkontrolle

Die Bilder der Agarosegele sind in Abbildung 3.12 dargestellt und zeigen die Ergebnisse der Klon-Screening-PCR. Als Kontrolle wurde jeweils eine PCR-Reaktion mit DNA des leeren Vektors durchgeführt, welche ein PCR-Produkt von 489 bp liefert (K). Hat ein shRNA Insert in den Expressionsvektor integriert, entsteht ein 549 bp langes Fragment. Für die drei shRNAs, die eine Sequenz in Exon 4 und 9

der Dsg 2 mRNA als Zielsequenz beinhalten, standen nach der Ligation zwei, fünf und fünf positive Klone zu Verfügung, was anhand des 60 bp-*shifts* zu erkennen ist. Für die weiteren Versuche wurde jeweils ein positiver Klon zum Animpfen einer 400 ml Bakterienkultur verwendet und aus dieser DNA präpariert (2.2.1.2).

3.2.2 Herstellung der Dsg 2- und GAPDH-spezifischen Sonden

Da die Effektivität der shRNA Expressionsvektoren auf RNA-Ebene mit Hilfe von *Northern Blots* getestet werden sollte, mussten zunächst geeignete Sonden hergestellt werden. Dazu wurden die Expressionsvektoren für Dsg 2 und GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase) mit Not I/Bgl II bzw. Xho I über Nacht verdaut und die DNA-Fragmente auf einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel geschnitten und die DNA mittels Gelextraktion daraus gewonnen (2.2.7). Das Ergebnis der Restriktionsverdau ist in Abbildung 3.13 zu sehen. Aufgrund der gewählten Enzyme entstanden für den Dsg 2 Expressionsvektor drei DNA-Fragmente, wobei die 2500 bp Bande aus dem Gel extrahiert und später als Sonde für den *Northern Blot* verwendet wurde. Aus dem Restriktionsverdau des GAPDH Vektors mit Xho I resultierten zwei DNA-Fragmente, von denen das 1100 bp große Fragment extrahiert wurde. Nach Konzentrationsbestimmung der Sonden-DNA (2.2.4) wurde diese bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

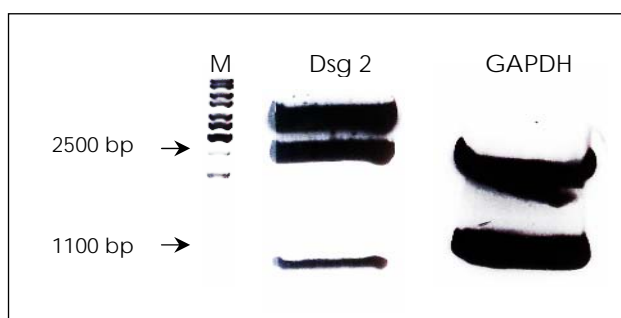


Abb. 3.13: Restriktionsverdau des Dsg 2- und GAPDH- Expressionsvektors zur Herstellung von Sonden für den *Northern Blot*

Die Plasmide wurden mit Not I/Bgl II (Dsg 2) bzw. Xho I (GAPDH) verdaut und die Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt.

M Marker (1 kb *ladder*)

3.2.3 *Knock down* von Dsg 2 in den Desmosomen-bildenden EpH4 Zellen durch transiente Transfektion mit den shRNA Expressionsplasmiden

Die *knock down* Effizienz der verschiedenen pTER_{EGFP}-shRNA Konstrukte sollte zunächst auf RNA-Ebene getestet werden. Dazu wurden Dsg 2-exprimierende, Desmosomen-bildende murine Epithelzellen (Eph4; Lopez-Barahona *et al*, 1995; Leder *et al*, 2002) mit den drei anti-Dsg 2 pTER_{EGFP} Plasmiden transient transfiziert. Da der shRNA Expressionsvektor als Reporter gen EGFP trägt, werden transfizierte Zellen neben der shRNA auch EGFP exprimieren. Durch Anregung von Licht der geeigneten Wellenlänge, in diesem Fall Licht einer Wellenlänge von 550 nm, leuchten die Zellen, welche den Vektor aufgenommen haben, grün. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die Zellen mit Hilfe eines FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*) Gerätes (Modell FACS Vantage) präparativ zu sortieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion trypsinisiert, gewaschen und in PBS aufgenommen. Die EGFP-exprimierenden Zellen wurden dann mittels FACS Vantage in ein gekühltes FACS-Röhrchen sortiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 10 min bei 4°C), in TRIzol aufgenommen und über Nacht bei -70°C gelagert. Die RNA-Präparation erfolgte dann weiter wie beschrieben (2.2.16). Je 50 µg der RNA wurde auf einem RNA-Gel bei maximal 50 Volt für etwa 8 Stunden aufgetrennt. Der *Northern Blot* wurde anschließend wie beschrieben aufgebaut und durchgeführt (2.2.18). Verschiedene DNA-Konzentrationen der Dsg 2 Sonde (10, 20 und 30 ng) wurden mittels α -³²P-dCTP radioaktiv markiert (2.2.15) und die Probe mit der höchsten spezifischen Aktivität für die Hybridisierung über Nacht bei 65°C verwendet. Nachdem die Membran mit verschiedenen Puffern gewaschen war, erfolgte die Inkubation auf dem Phosphorimager (Typ STORM 840). Um auf gleiche RNA-Mengen in den verschiedenen Proben zu testen, wurde die gebundene Sonde von der Membran gewaschen und mit einer weiteren Sonde inkubiert, welche gegen das endogene Gen GAPDH gerichtet ist. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Image Quant. Das dargestellte Ergebnis (Abb. 3.14) gibt die relative Dsg 2-Intensität an. Die relative Dsg 2 mRNA Expression wurde dazu mit Hilfe der GAPDH Expression normalisiert. Die *knock down*-Effizienz wurde auf die in pTER_{EGFP}leer transfizierten Zellen gemessene RNA-Expression bezogen. Im

Vergleich zu diesen Zellen betrug die Dsg 2 Expression bei pTER_{EGFP}shRNA1 76 %, bei pTER_{EGFP}shRNA2 59,9 % und bei pTER_{EGFP}shRNA3 66 %.

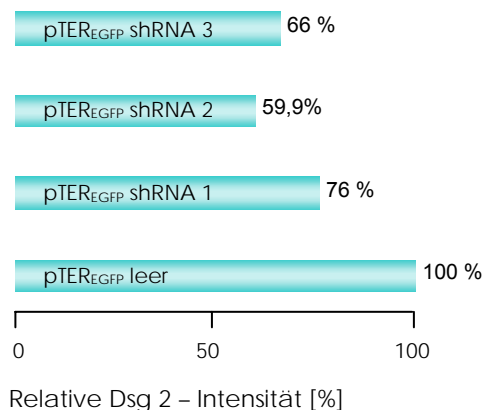


Abb. 3.14: Relative Dsg 2 RNA-Intensität der Eph4 Zellen nach Transfektion mit den shRNA Expressionsplasmiden

RNA der EGFP-exprimierenden Eph4 Zellen wurde mittels *Northern Blot* auf Dsg 2 mRNA Expressionslevels untersucht. Die Normalisierung erfolgte über die RNA-Intensität von GAPDH.

Die reduzierten Dsg 2 RNA-Mengen in den EGFP-positiven Zellen zeigen, dass die shRNA exprimiert wurde und zur Degradierung der endogenen Dsg 2 mRNA führte. Um zu prüfen, ob dies zum Rückgang von Dsg 2 Protein führt, wurde die Wirksamkeit der shRNA Expressionsvektoren zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Dazu wurde genauso verfahren wie bereits erwähnt. Eph4 Zellen wurden zunächst mit einem der shRNA Vektoren transfiziert und die EGFP-positiven von den EGFP-negativen Zellen mittels FACS Vantage getrennt. Die Zellen wurden in Laemmlipuffer aufgenommen (100 μ l/10⁶ Zellen) und jeweils 20 μ l des Proteinextrakts auf einem 6 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der *Western Blot* wurde wie beschrieben unter Verwendung des Dsg 1/2-Antikörpers (DG 3.10, 1:50 in Erstantikörperverdünnungslösung) durchgeführt (2.2.22).

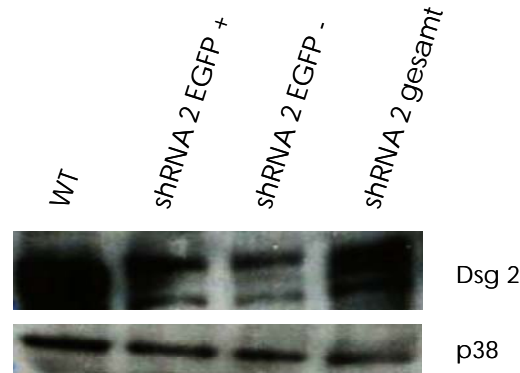


Abb. 3.15: Western Blot der FACS-sortierten Eph4 Zellen

Die Intensität der Dsg 2 Proteinexpression ist in EGFP-positiven und EGFP-negativen Zellen nicht zu unterscheiden. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen (WT) sowie die nicht FACS-sortierte Zellpopulation (shRNA 2 gesamt) aufgetragen. Der obere Kasten gibt die Expressionslevels für Dsg 2, der untere für p38 wieder.

Da kein Unterschied in der Intensität an Dsg 2 Protein in EGFP-exprimierenden und EGFP-negativen Zellen festzustellen war (Abb. 3.15), wurde die *Western Blot* Membran mit einem Antikörper inkubiert, der gegen ein konstitutiv exprimiertes endogenes Protein gerichtet ist (p38 Kinase). So konnte kontrolliert werden, ob gleiche Proteinmengen geladen wurden. Die Intensität der Banden für p38 ist in allen Proben gleich. Dieses Ergebnis beweist einerseits eine etwa identische Proteinkonzentration für alle vier geladenen Proben. Des Weiteren bedeutet es, dass die Dsg 2 Proteinmenge durch die Expression der shRNA nicht verändert wurde. Eine Ursache dafür könnte eine lange Halbwertszeit (Stabilität) des endogenen Dsg 2 Proteins sein. Da die Eph4 Zellen nur transient transfiziert und bereits nach 48 Stunden analysiert wurden, ist es denkbar, dass bei einer langen Halbwertszeit des Dsg 2 Proteins keine Unterschiede in der Dsg 2 Proteinmenge zu detektieren sind. Eine Möglichkeit, um dennoch die *knock down* Effizienz der drei shRNAs auf Proteinebene testen zu können, bestand in transientser co-Transfektion von Dsg 2 Expressionsvektor und shRNA Vektor in Zellen, welche *per se* kein Dsg 2 exprimieren. Diese Methode ist schnell und einfach durchzuführen und hat den Vorteil, das shRNA und Ziel-mRNA zur gleichen Zeit in die Zelle kommen.

3.2.4 Verschiedene siRNA Zielsequenzen zeigen unterschiedliche knock down Effizienz in transienten co-Transfektionen

Um die *knock down* Effizienz der drei verschiedenen siRNAs zu testen, wurden HEK 293-Zellen transient mit den pTER_{EGFP}-shRNA Konstrukten transfiziert, Proteinextrakt aus den Zellen gewonnen und die Expressionslevels von Dsg 2 mittels *Western Blot* kontrolliert. Dabei wurden für die co-Transfektion identische Mengen an Dsg 2-Expressionsvektor (1 µg DNA je 6 x 10⁵ Zellen) und abnehmende Konzentrationen an siRNA Vektor (1, 0,75 und 0,5 µg DNA je 6 x 10⁵ Zellen) verwendet. Die Zellen wurden wie beschrieben behandelt (2.2.25.4) und 48 Stunden nach der Transfektion Proteinextrakte daraus erzeugt, wobei jeweils 10⁶ Zellen in 100 µl Laemmli-puffer aufgenommen wurden (2.2.19.1). Um gleiche Proteinmengen zu laden, wurden jeweils 20 µl des so gewonnenen Proteingemischs auf analytischen 6 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Da in dem verwendeten Dsg 2 Expressionsvektor an die Dsg 2 Sequenz ein HA (Hämagglutinin) tag gekoppelt ist, wurde der *Western Blot* unter Verwendung des α-HA tag Antikörpers (1:1000 in Erstantikörperverdünnungslösung) durchgeführt (2.2.22).

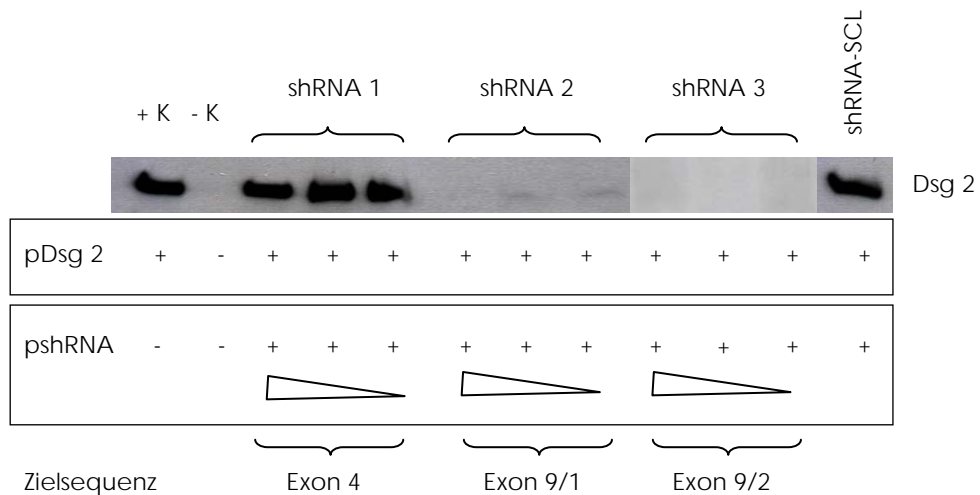


Abb. 3.16: Western Blot von Proteinextrakten der mit pTER_{EGFP}-shRNA Konstrukten transfizierten HEK 293-Zellen

Bei identischen Mengen Dsg 2 Expressionsvektor wurde mit abnehmende Mengen der jeweiligen shRNA Vektoren transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer unspezifischen shRNA (shRNA-SCL) transfiziert.

+K Positivkontrolle, - K Negativkontrolle

Das Ergebnis der *Western Blots* ist in Abbildung 3.16 zusammengefasst. Als Positivkontrolle für den Antikörper wurden HEK 293-Zellen nur mit Dsg 2 Expressionsvektor transfiziert, was in einer deutlichen Bande auf dem *Western Blot* von 120 kDa Größe resultierte. Negativkontrolle stellen untransfizierte Zellen dar, die auf dem *Blot* keine Bande in der entsprechenden Größe zeigen. Nebeneinander sind die drei shRNA Expressionsplasmide, die zusätzlich zum Dsg 2 Expressionsplasmid in absteigender Konzentration transfiziert wurden, aufgetragen. ShRNA 1, deren Zielsequenz in Exon 4 der Dsg 2 mRNA liegt, zeigte in dieser Analyse keinen signifikanten *knock down* des Dsg 2 Proteins. Im Fall von shRNA 2 ist bei der Transfektion mit 0,5 µg shRNA Plasmid eine minimale Bande für Dsg 2 Protein sichtbar. Die ebenso wie shRNA 2 eine Sequenz in Exon 9 als Ziel aufweisende shRNA 3 zeigt auch bei der geringsten verwendeten shRNA-Konzentration (0,5 µg DNA) noch keine Dsg 2 Proteinbande. Als Kontrolle für die Spezifität der shRNAs wurden Zellen mit Dsg 2 Expressionsvektor und einem unspezifischen shRNA Expressionsvektor transfiziert, dessen shRNA gegen SCL (*stem cell leucemia*) mRNA gerichtet ist. Hier konnte eine Bande für Dsg 2 Protein detektiert werden. Die verschiedenen gegen Dsg 2 gerichteten shRNAs zeigten in wiederholten Ansätzen ähnliche Ergebnisse. Was die Effizienz des Dsg 2 *knock downs* betrifft, kam es reproduzierbar zu den gleichen Unterschieden zwischen den drei shRNA Expressionsplasmiden.

3.3 *Knock down* von Dsg 2 mit Hilfe des Expressionsvektors pSico

Ziel der Doktorarbeit war es, eine induzierbare Dsg 2 siRNA Maus zu generieren, um die Funktion von Dsg 2 genauer zu untersuchen. In den Zellkultur-Vorversuchen wurde der shRNA Expressionsvektor pTER_{EGFP} verwendet, um die siRNA Sequenz zu finden, welche Dsg 2 am besten herunterreguliert. Um die Expression der shRNA in diesem Vektor schaltbar zu machen, ist, wie bereits beschrieben, das Repressormolekül TetR notwendig, welches die Transkription der shRNA verhindert (van de Wetering *et al*, 2003). Erst durch Bindung von TetR an Doxycyclin (Dox), wodurch der Repressor seine Konformation verändert und nicht mehr als Homodimer an die TetO Bindestelle im Promoterbereich anbinden kann, kommt es zur Expression der shRNA. Konditionale Induzierbarkeit des Dsg 2

Funktionsverlustes war notwendig, da Dsg 2 bereits in der frühen Entwicklung des Mausembryos eine essenzielle Rolle spielt und ein kompletter Funktionsverlust von Dsg 2 zu embryonaler Letalität führt (Eshkind *et al*, 2002). Um den mit Tetrazyklin induzierbaren pTER_{EGFP} shRNA Expressionsvektor in der Maus verwenden zu können, sind geeignete Repressormäuse nötig, welche nach Abschluss der Vorversuche nicht zu Verfügung standen. Daher wurde die zuvor in pTER_{EGFP} auf *knock down* von Dsg 2 getestete siRNA Sequenz 2 (Zielsequenz in Exon 9/1) in einen anderen, zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten shRNA Expressionsvektor inkloniert. Dieser Vektor (pSico, *plasmid for stable RNAi, conditional*) ermöglicht eine Cre/lox-regulierte Expression der shRNA (Ventura *et al*, 2004). Dazu waren modifizierte *loxP sites* im Bereich des Polymerase III U6 Promoters und vor der shRNA Sequenz in einen lentiviralen Vektor (lentilox 3.7; Rubinson *et al*, 2003) eingebracht worden, die eine Stop-Kassette, bestehend aus CMV-Promoter und für EGFP kodierender Sequenz, flankieren. Aufgrund dieser Stop-Kassette kommt es zunächst nicht zur Expression der shRNA. Den Vektor tragende Zellen können durch EGFP-Fluoreszenz detektiert werden. Wird in der EGFP-positiven Zelle zusätzlich Cre Rekombinase exprimiert, kommt es zur Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette durch Rekombination zwischen den *loxP sites*, wodurch der U6 Promoter in physische Nähe der shRNA kodierenden Kassette gebracht, und damit die Expression der shRNA initiiert wird. Für dieses System ist kein zusätzliches Repressormolekül notwendig, da die Expression der shRNA erst nach Cre Rekombination erfolgt. Benötigt wird in diesem System hingegen eine schaltbare Cre *Deleter* Maus, um die shRNA Expression zum gewünschten Zeitpunkt induzieren zu können. Da verschiedene induzierbare Cre *Deleter* Mäuse aus der Literatur bekannt waren (Casanova *et al*, 2002; Hayashi und MacMahon, 2002; Kellendonk *et al*, 1999; Kuhn *et al*, 1995; El Marjou *et al*, 2004; Metzger und Chambon, 2001; Utomo *et al*, 1999), wurde der lentivirale Vektor pSico für die weiteren Versuche und zur Generierung der Dsg 2 *knock down* Maus gewählt.

3.3.1 Klonierung der Dsg 2 shRNA Sequenz in den Expressionsvektor pSico

Aufgrund der Vorversuche, in denen die verschiedenen Dsg 2 siRNA Sequenzen auf deren *knock down* Effizienz getestet wurden und der Vorgaben für die Klonierung in

den neuen shRNA Expressionsvektor, wurde die Sequenz der siRNA 2 für den späteren *knock down* in der Maus ausgewählt. Mit dieser Sequenz konnte ein deutlicher *knock down* auf Proteinebene in Zellkulturexperimenten erreicht werden. Zudem beginnt diese siRNA Sequenz mit dem Nukleotid Guanin, was idealerweise für die Expression einer siRNA oder shRNA mittels U6 Promoter der Fall sein sollte, um die Wildtyp-Sequenz des Promoters zu erhalten (+1 Guanin) und so die durch bestimmte Nucleotidfolgen am Anfang der Sequenz erzeugte Interferonantwort zu verhindern (Pebernard und Iggo, 2004; Tuschl, 2002; Yu *et al*, 2002). Gleichermäßen wie die Klonierung bei dem zuvor verwendeten Vektor wurden auch hier synthetische shRNA Oligonukleotide, deren Sequenz sich aus siRNA, *loop* und Klonierungsstellen zusammensetzen, nach dem *Annealing* (2.2.11) als doppelsträngige Moleküle mit dem Xho I/Hpa I-verdauten Vektor pSico ligiert (2.2.8.2 und 2.2.12) und in elektrokompente Bakterien gebracht (2.2.14.1). Am Tag darauf wurden die gewachsenen Kolonien in 5 µl *Aqua destillata* resuspendiert und 1 µl davon für eine PCR verwendet, um die Integration der shRNA Sequenz zu bestätigen. Die PCR wurde wie beschrieben durchgeführt (2.2.5) und die PCR-Produkte neben einem Größenmarker auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Abbildung 3.17A zeigt das Ergebnis der PCR, wobei für den leeren Vektor, welcher zur Kontrolle in der PCR mitgeführt wurde, eine Bande in von 492 bp und für Vektor mit integrierter shRNA ein 546 bp-Produkt erwartet wurde.

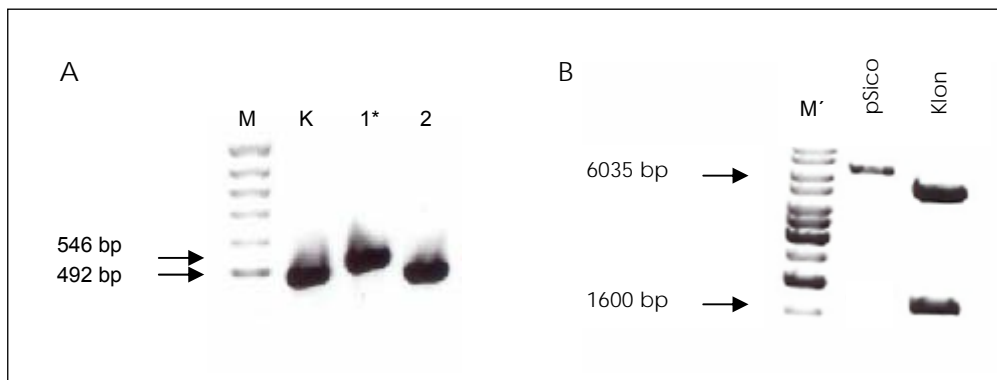


Abb. 3.17: Kontrolle der transformierten Bakterien auf Intregation der shRNA in den pSico Expressionsvektor

(A) PCR-Produkte zweier Bakterienkolonien und des leeren pSico Vektors (K). Der positive Klon ist durch * gekennzeichnet.

(B) Gezeigt werden Restriktionsverdaus des leeren pSico Vektors und des positiven Klons mit Xcm I/Xba I.

M Marker (100 bp ladder), M' Marker (1 kb ladder)

Von den nach Transformation gewachsenen Bakterienkolonien konnte Klon 1 mit Hilfe von PCR als positiv für die Integration der shRNA bestätigt werden. Um sicher zu gehen, dass die shRNA in den Vektor integriert hatte, wurde diese Kolonie zum Animpfen einer 2 ml Übernachtskultur verwendet und DNA daraus präpariert (2.2.1.1). Im Anschluss daran wurden zwei Restriktionsverdau mit der DNA von Klon 1 und zur Kontrolle mit der des leeren Vektors durchgeführt. Die DNA wurde dazu wie beschrieben mit Xcm I und Xba I für 3 Stunden bei 37 °C verdaut (2.2.8.1) und die entstandenen Fragmente später auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Xcm I schneidet nur im shRNA Insert. Da zusätzlich Xba I nur eine Schnittstelle im pSico Vektor hat, wird für den leeren Vektor im Restriktionsverdau mit Xcm I/Xba I eine Linearisierung, und damit eine 7600 bp Bande erwartet. Im Fall der Integration der shRNA entstehen aufgrund der zwei Schnittstellen (Xba I und Xcm I) ein 6035 bp und 1600 bp Fragment, welche deutlich auf dem Gelbild zu erkennen sind. Aufgrund der mit Hilfe des Restriktionsverdau detektierten Integration des shRNA Oligonukleotids wurde Klon 1 zum Animpfen einer 400 ml Bakterienkultur verwendet und die daraus präparierte DNA in den weiteren Versuchen genutzt. Um die Nukleotidsequenz des pSico Dsg 2 *knock down* Vektors zu verifizieren, wurde eine Analyse der Sequenz durchgeführt (Genterprise, Mainz). Diese Analyse bestätigte die erwartete Nukleotidsequenz.

3.3.2 Deletion der Stop-Kassette durch Transfektion des pSico Dsg 2 shRNA Plasmids in Cre exprimierende Bakterien

Um die Funktionalität des pSico-shRNA Konstrukts testen zu können, muss eine den Expressionsvektor tragende Zelle zusätzlich Cre Rekombinase exprimieren, damit es zur Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette und damit zur Expression der shRNA kommt. Eine Möglichkeit, das System zu testen, besteht in Verwendung einer Cre exprimierenden Zelllinie (Ouvrard-Pascaud *et al*, 2003; Sauer und Henderson, 1988). Eine weitere Möglichkeit ist die Transfektion des Plasmids in Cre exprimierende Bakterien, welche im Labor zu Verfügung standen (294-Cre, Buchholz *et al*, 1996). Dieser Ansatz wurde genutzt, um die CMV/EGFP/Stop-Kassette aus dem pSico shRNA Expressionsvektor zu entfernen. Dazu wurden 294-Cre Bakterien mittels Hitzeschock transformiert (2.2.14.2), ausplattiert, bei 30°C über Nacht inkubiert und

die gewachsenen Kolonien zum Animpfen von 2 ml Bakterienkulturen verwendet (2.2.1.1). Die daraus präparierte DNA wurde mit Pst I/Kpn I für 3 Stunden bei 37°C verdaut (2.2.8.1) und die DNA Fragmente auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die aus CMV Promoter und EGFP bestehende Stop-Kassette hat eine Größe von 1598 bp. Aufgrund der für den analytischen Verdau gewählten Enzyme waren für den Vektor mit Stop-Kassette Banden in der Größe von 5006 bp und 2600 bp und für den Vektor nach Cre Rekombination 5006 bp- und 1002 bp-Fragmente zu erwarten. In Abbildung 3.18 ist zum einen der shRNA Expressionsvektor pSico Dsg 2 shRNA vor und nach Cre Expression dargestellt. Ferner wird das Agarosegelbild mit dem Ergebnis des Restriktionsverdaus gezeigt. In allen getesteten Bakterienkolonien (Banden der Klone 2 und 4 sind sehr schwach) kam es zur Expression von Cre Rekombinase und damit zur Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette. Von einem der Klone wurde aus einer 400 ml Bakterienkultur DNA präpariert (2.2.1.2), die in den weiteren Versuchen verwendet wurde.

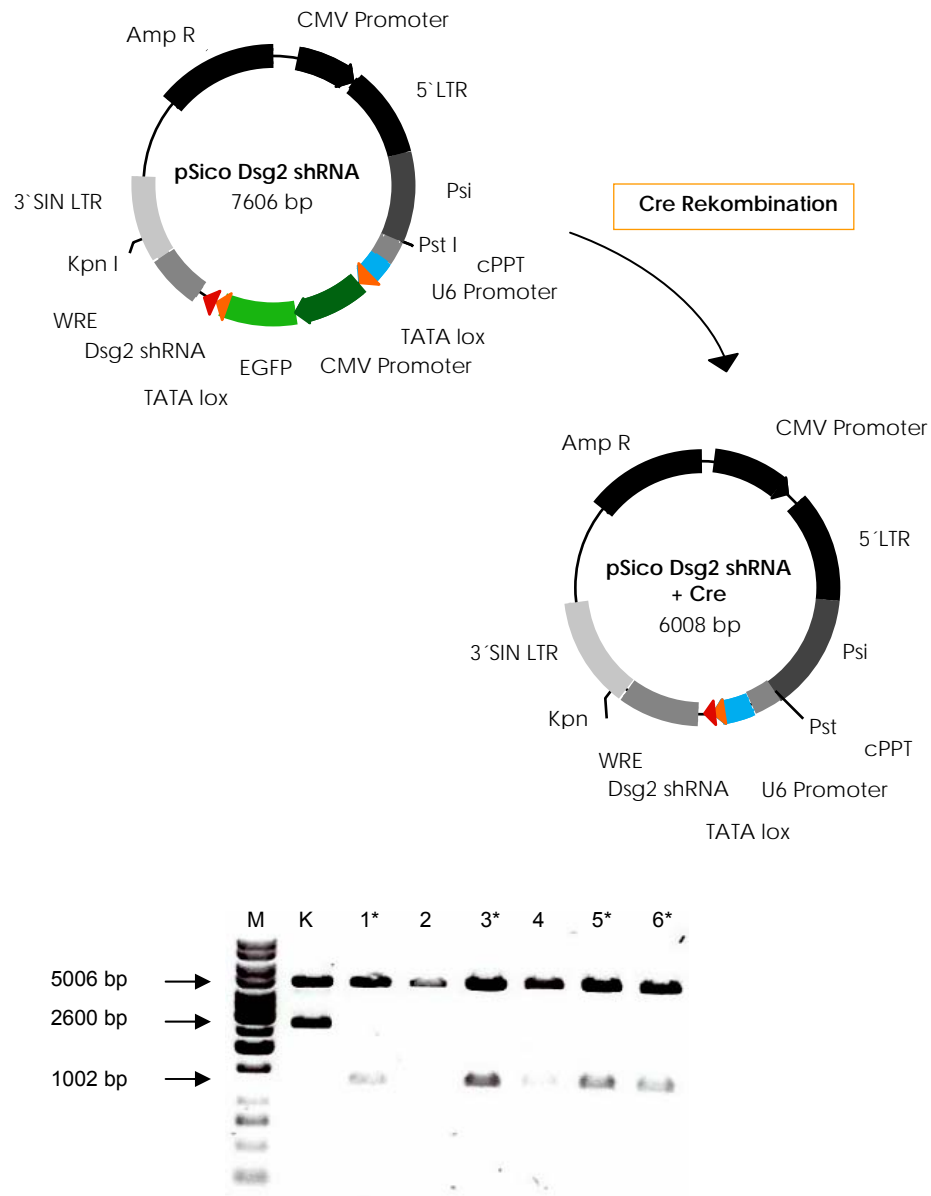


Abb. 3.18: Cre-induzierte Rekombination zwischen den loxP sites im shRNA Expressionsvektor pSico führt zu Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette

Schematisch dargestellt ist der Vektor pSico Dsg 2 shRNA vor (links) und nach (rechts) Cre Rekombination zwischen den loxP sites, was zur Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette führt. Das Agarosegelbild zeigt das Ergebnis des Restriktionsverdaus mit Kpn I/Pst I nach Transfektion von pSico Dsg 2 shRNA in Cre exprimierende Bakterien. Als Kontrolle (K) wurde DNA des Vektors vor dieser Transfektion verdaut. Rekombinierte Klone sind mit * markiert.

M Marker (1 kb ladder), Amp R Ampicillinresistenzgen, CMV Cytomegalovirus, LTR Long Terminal Repeat, Psi für virale RNA Verpackung, cPPT central Polypurine Tract, WER Woodchuck hepatitis virus Response Element, SIN self-inactivating

3.3.3 *Knock down* von Dsg 2 im Zellkulturexperiment nach Deletion der Stop-Kassette

Bevor der pSico Dsg 2 shRNA Expressionsvektor Anwendung im Mausmodell finden konnte, musste zunächst die Funktionalität dieses Vektors in der Zellkultur getestet werden. Dazu wurden NIH 3T3 Zellen mit dem Dsg 2 Expressionsvektor sowie dem shRNA Expressionsplasmid vor und nach Cre Rekombination transient co-transfiziert (2.2.25.4). Je 4×10^5 Zellen wurden mit $1 \mu\text{g}$ Dsg 2 Expressionsvektor und $1 \mu\text{g}$ shRNA Vektor transfiziert und 48 Stunden später Protein aus den Zellen extrahiert (2.2.19.1). Um die Expressionslevels von Dsg 2 zu untersuchen, wurden jeweils $20 \mu\text{l}$ der Proteinextrakte auf 6 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und ein *Western Blot* wie beschrieben unter Verwendung des Dsg 1/2-Antikörpers DG 3.10 (1:50 in Erstantikörperverdünnungslösung) durchgeführt (2.2.22). Als weitere Kontrolle für die geladenen Proteinmengen wurde der gebundene Dsg 2 Antikörper nach erfolgter Exposition von der *Western Blot* Membran entfernt und wie dargestellt mit einem Antikörper inkubiert, der gegen ein konstitutiv exprimiertes, endogenes Protein gerichtet ist (2.2.23). Durch Vergleich der Expressionslevels dieses Proteins (p38 Kinase) kann die Menge an geladenem Protein in den verschiedenen Taschen verglichen werden.

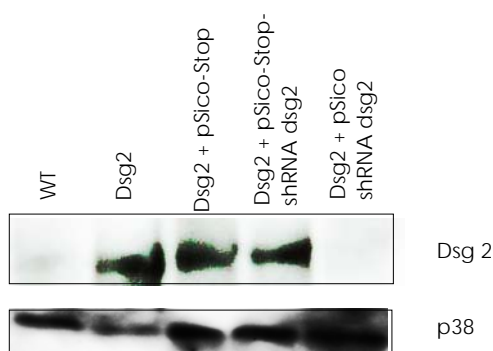


Abb. 3.19: *Western Blot* zur Kontrolle der Funktionalität des pSico Dsg 2 shRNA Expressionsvektors

NIH 3T3 Zellen wurden mit dem Dsg 2 Expressionsvektor (Dsg 2), dem leeren pSico Plasmid (pSico-Stop), dem pSico Dsg 2 shRNA Vektor vor (pSico-Stop-Dsg 2 shRNA) und nach (pSico Dsg 2 shRNA) Cre Rekombination transfiziert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen (WT) verwendet. Das obere Fenster zeigt die Expression von Dsg 2, darunter ist die Expression des Kontrollproteins p38 dargestellt.

Durch Vergleich der für das Kontrollprotein p38 erhaltenen Banden kann von annähernd gleichen Proteinmengen in den verschiedenen Proben ausgegangen werden (Abb. 3.19). Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers wurde Proteinextrakt untransfizierter NIH 3T3 Zellen aufgetragen (WT). Im *Western Blot* wurde für diese Probe kein Dsg 2 Signal detektiert. Die Positivkontrolle (Protein von mit Dsg 2 Expressionsvektor transfizierten Zellen) lieferte eine deutliche Bande in der erwarteten Größe von 120 kDa. Proteinextrakte der mit dem leeren pSico (pSico-Stop) sowie dem shRNA und Stop-Kassette beinhaltenden Vektor (pSico-Stop-Dsg 2 shRNA) transfizierten Zellen ergaben ebenfalls Banden für Dsg 2 Protein. Zellen, die mit dem Vektor nach Cre Rekombination (pSico Dsg 2 shRNA) transfiziert wurden, zeigten keine Bande in entsprechender Größe. Dieses Ergebnis zeigt, dass der generierte pSico Dsg 2 *knock down* Vektor nach Entfernen der CMV/EGFP/Stop-Kassette die Expression von Dsg 2 Protein im verwendeten Zellkulturansatz vollständig unterdrücken konnte.

3.4 Klonierung der shRNA Expressionskassette in einen Vektor mit humanen MAR (*Matrix Attachment Region*)-Sequenzen zur Insulation des Transgens

Bei der Herstellung transgener Mäuse erfolgt die Integration eines Transgens in die murine DNA stochastisch. Dies hat zur Folge, dass die Transkription des Transgens verändert sein kann und die das Transgen umgebenden Elemente Einfluss auf dessen Expression nehmen (variegationaler Effekt). Jedes Gen ist innerhalb des Chromatins von DNA Sequenzen umgeben, die das Potenzial haben, auf dessen Expression Einfluss zu nehmen. Beispielsweise kann die Expression eines Transgens durch regulatorische Elemente wie *Enhancer* oder *Silencer* sowie durch Integration nahe eines transkriptionell aktiven Gens oder in kondensierte Chromosomenstrukturen determiniert werden. Um dies zu umgehen, kann ein Transgen in einen ausgewählten Locus auf der DNA zielgerichtet eingebracht oder von Insulatorelementen umgeben werden (Bronson *et al*, 1996; Bell *et al*, 2001). Insulatoren fungieren als eine Art Barriere gegen umgebende DNA Domänen. Sie können zum einen als „*positional enhancer blocker*“ wirken, indem sie als neutrale Barriere zwischen Promoter und *Enhancer* liegend, dessen Einfluss auf den Promoter unterbinden. Des Weiteren können Insulatoren gegen PEV (Positions-Variegations-Effekt) schützen, so dass die

Expression des Transgens nicht von der umgebenden Chromatinstruktur oder Transkriptionselementen beeinflusst wird. Die Sequenz von Insulatoren ist uneinheitlich und meist werden künstliche Konstrukte verwendet, um die oben genannten Eigenschaften zu vermitteln. Mit Hilfe von humanen *Matrix Attachment Region* (MAR)-Sequenzen, die ursprünglich aus dem humanen Globingenlokus stammen, kann ein Transgen von umgebenden DNA Elementen isoliert und somit deren Einfluss auf die Expression des Transgens verhindert werden (Fleenor *et al*, 1993; Fukumura *et al*, 1998). Da ein Vektor mit MAR Sequenzen im Labor zu Verfügung stand, wurde die Möglichkeit genutzt, die Expression von Dsg 2 shRNA, unabhängig von umgebenden Sequenzelementen, zu verbessern. Dazu wurden die für die Expression der Dsg 2 shRNA wichtigen Sequenzelemente mit Hilfe eines präparativen Restriktionsverdau aus dem shRNA Expressionsvektor entfernt und mit dem die humanen MAR-Sequenzen tragenden Vektor pInsu ligiert (Abb. 3.20). Für diese Klonierung wurden beide Vektoren mit Hind III über Nacht bei 37°C inkubiert und die entstandenen DNA Fragmente auf einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt (2.2.8.2 und 2.2.6). Im Fall des pInsu Plasmids erfolgte nach dem Restriktionsverdau eine Dephosphorylierung, um einer Religation des Vektors vorzubeugen (2.2.9).

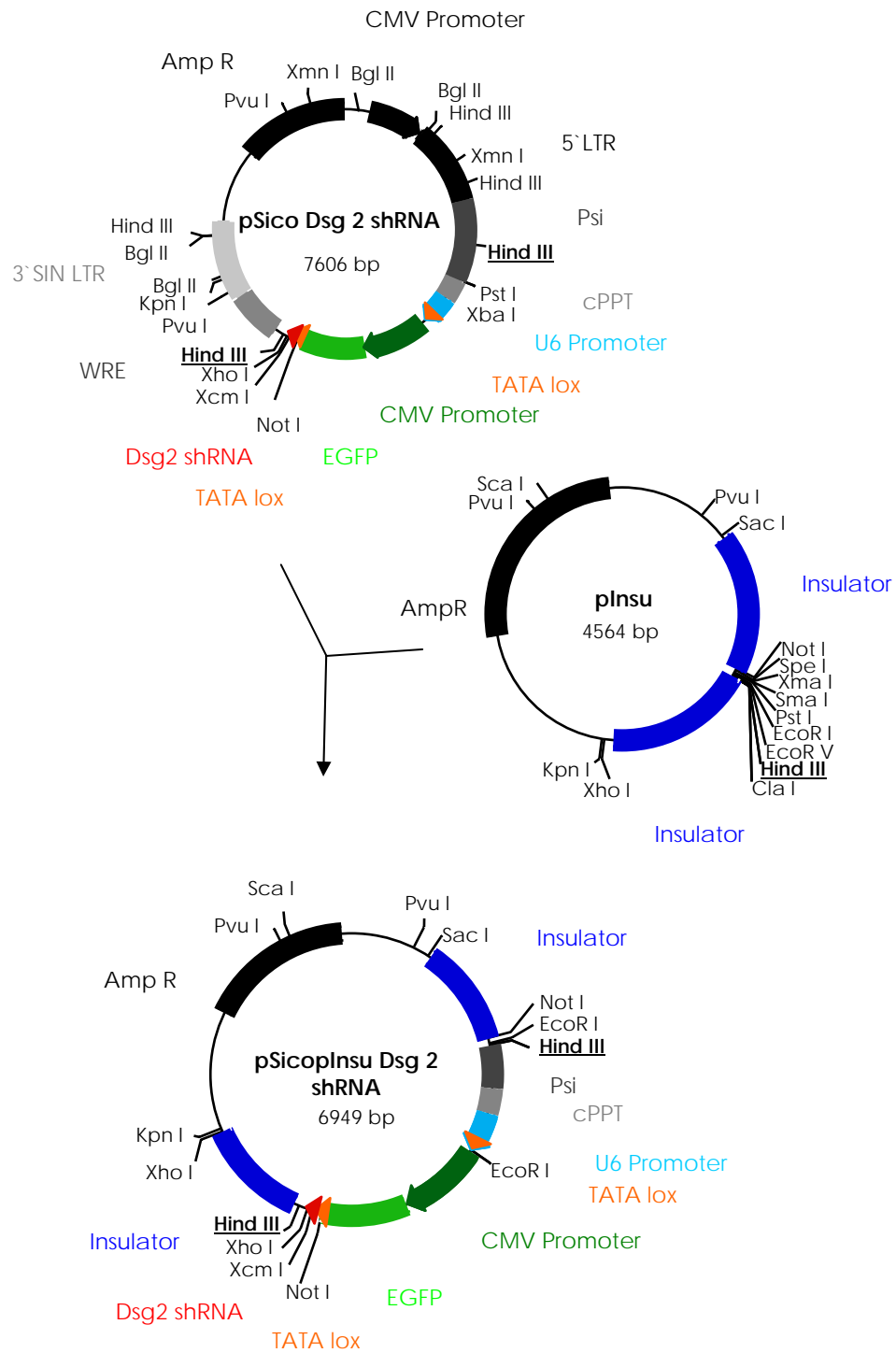


Abb. 3.20: Schematische Darstellung zur Klonierung des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Vektors

Die Abbildung zeigt schematisch die Klonierung des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Vektors aus pSico Dsg 2 shRNA und pInsu (die Hind III Klonierungssequenz ist unterstrichen).

Amp R Ampicillinresistenzgen, CMV Cytomegalusvirus, LTR *Long Terminal Repeat*, Psi für virale RNA Verpackung, cPPT *central Polypurine Tract*, WRE *Woodchuck hepatitis virus Response Element*, SIN *sefl- inactivating*, Insulator humane MAR (*Matrix Attachment Region*) Sequenz

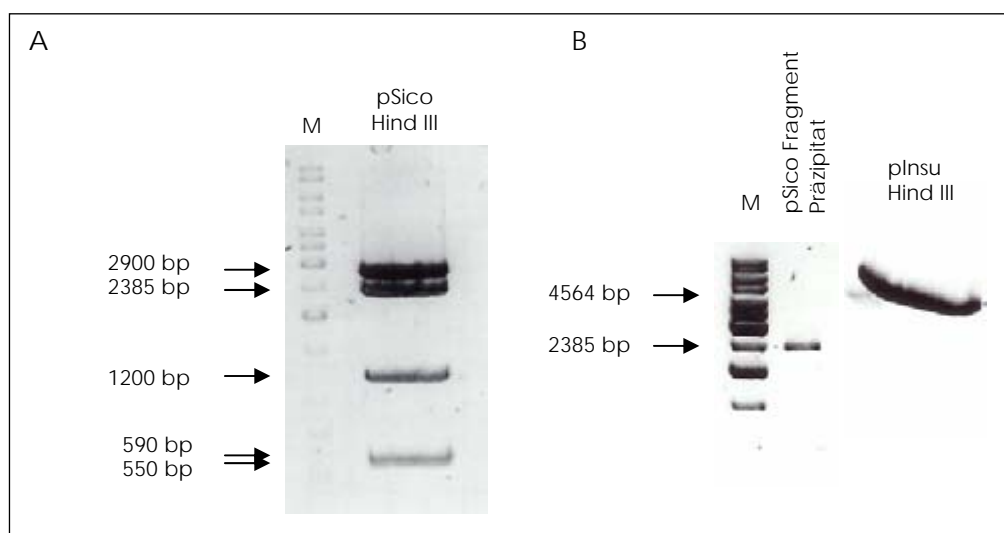


Abb. 3.21: Präparative Restriktionsverdau der Vektoren pSico Dsg 2 shRNA und pInsu
 (A) Präparativer Verdau von pSico Dsg2 shRNA mit Hind III. Es entstehen 5 Fragmente, von denen das 2385 bp Fragment die shRNA Expressionkassette beinhaltet.
 (B) Abgebildet ist das aus dem Gel extrahierte und präzipitierte DNA Fragment des pSico Dsg 2 shRNA Vektors sowie der mit Hind III linearisierte pInsu Vektor.
 M Marker (1 kb *ladder*)

Das Restriktionenzym hat lediglich eine Schnittstelle im pInsu Vektor, wodurch dieser linearisiert und auf dem Agarosegel als 4564 bp großes DNA Fragment sichtbar wird (Abb. 3.21). Für den pSico Dsg 2 shRNA Vektor entstehen nach Verdau mit Hind III 5 DNA Fragmente (2900 bp, 2385 bp, 1200 bp, 590 bp und 550 bp).

Die shRNA Expressionskassette enthaltende Bande ist 2385 bp groß und wurde, ebenso wie die DNA des linearisierten pInsu Vektors, wie beschrieben aus dem Gel extrahiert (2.2.7). Die Fragmente wurden präzipitiert (2.2.2), anschließend über Nacht bei 16°C ligiert (2.2.12) und 1 µl des Ligationsansatzes für die Transformation elektrokompenter Bakterienzellen verwendet (2.2.14.1). Mit denen auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden 2 ml Bakterienkulturen angeimpft und die DNA wie dargestellt präpariert (2.2.1.1). Für einen analytischen Verdau mit Xho I wurden 5 µl der so gewonnenen DNA verwendet. Für die Integration der shRNA Expressionskassette in richtiger Orientierung wurden Banden der Größe 6000 bp und 949 bp erwartet, bei falscher Orientierung sollten 3700 bp und 3249 bp große Fragmente zu sehen sein. Wie in Abbildung 3.22A zu erkennen ist, konnten für die Klone 6 und 11 die nach erfolgreicher Integration des Inserts in pInsu erwarteten DNA Fragmente von 6000 bp und 949 bp erhalten werden. Als Kontrolle wurde unverdaute und mit Xho I geschnittene DNA des leeren pInsu auf dem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Klon 11 wurde in weiteren Restriktionsverdau (Abb. 3.22

B) genauer untersucht. Die DNA wurde mit Eco RI/Xcm I (Spur 2), Sac I/Hind III (Spur 3), Xho I/Pvu I (Spur 4), Hind III/Kpn I (Spur 5) und Sca I (Spur 6) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und die Fragmente anschließend auf einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Es wurden dabei Banden für DNA Fragmente von 4680 bp/1424 bp/896 bp (Spur2), 3718 bp/2425 bp/857 bp (Spur 3), 3361 bp/1673 bp/1015 bp/951 bp (Spur 4), 3690 bp/2425 bp/885 bp (Spur 5) Größe erwartet, sowie eine Linearisierung des Vektors (6949 bp, Spur 6). Als Kontrolle wurde nicht verdaute DNA des Vektors (Spur 1) aufgetrennt. Aufgrund der geringen Intensität ist die 896 bpBande in Spur 2 nicht zu erkennen. Durch addieren der sichtbaren DNA Fragmente aus diesem Verdau erhält man also nicht den Wert der gesamten Größe des Vektors (6949 bp). Die weiteren Restriktionsverdaus (Spur 3 bis 6) zeigen Banden, die der erwarteten DNA Fragmentgröße entsprachen.

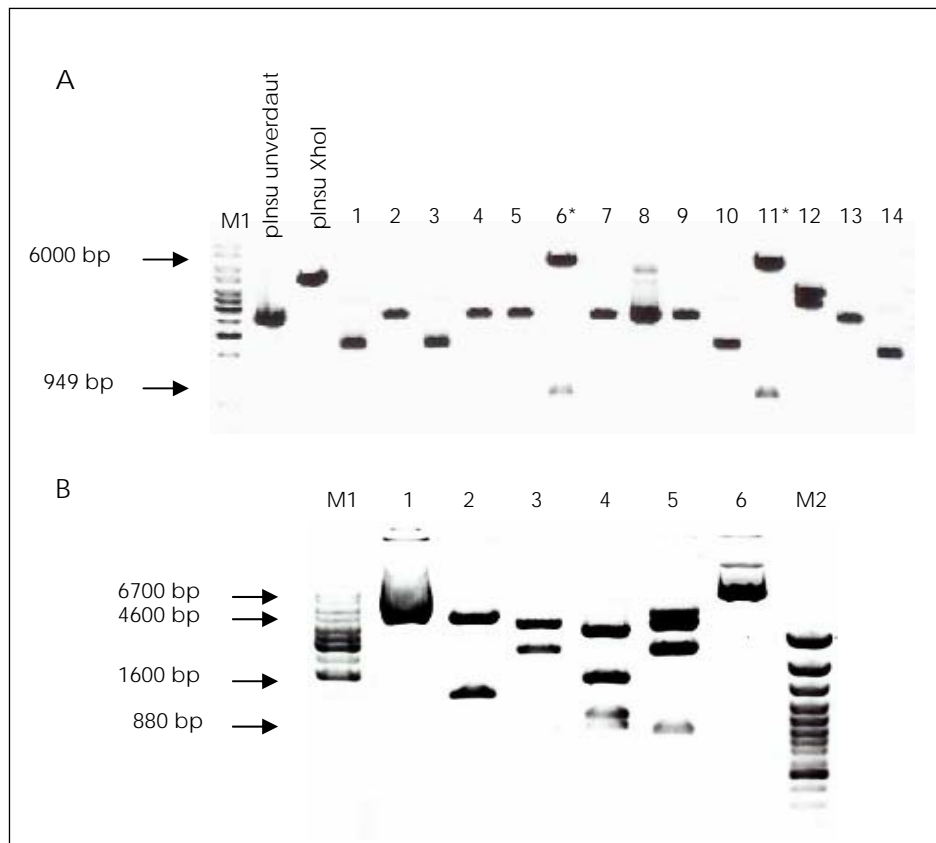


Abb. 3.22: Analyse potenzieller pSicopInsu Dsg 2 shRNA Bakterienklone

(A) Analytischer Restriktionsverdau von 14 potenziellen pSicopInsu Dsg 2 shRNA Klonen mit Xho I. Die mit * markierten Klone 6 und 11 zeigen die nach erfolgreicher Integration der shRNA Expressionskassette in pInsu erwarteten Banden (6000 bp und 949 bp).

(B) Klon 11 wurde durch weitere Restriktionsverdaus genauer analysiert. Gezeigt sind (1) unverdaute, sowie mit (2) Eco RI/Xcm I, (3) Sac I/Hind III, (4) Xho I/Pvu I, (5) Hind III/Kpn I und (6) Sca I verdaute DNA des Klons.

M1 Marker (1 kb ladder), M2 Marker (100 bp ladder)

3.5 Generierung der pSicopInsu Dsg 2 shRNA (Dsg 2 knock down) Mäuse

Um transgene Mäuse zu generieren, sind verschiedenartige Vorbereitungen und Techniken notwendig, welche unter 2.2.26 im Detail beschrieben werden. Damit die transgene DNA ins Mausgenom integriert, muss sie in linearer Form vorliegen. Dazu wurde die Plasmid DNA (pSicopInsu Dsg 2 shRNA) mittels präparativen Restriktionsverdau linearisiert, wozu 5 µg DNA über Nacht mit Sca I inkubiert wurden. Nach Auftrennung auf einem 0,7 % Agarosegel und anschließender Gelextraktion (2.2.7) wurde die nun lineare DNA präzipitiert und in Injektionspuffer (0,1 mM EDTA, 10mM Tris, pH 7,4) aufgenommen. Dann erfolgte die Reinigung der DNA über eine Spin X-Säule, wonach die Konzentration über eine Verdünnungsreihe auf einem Agarosegel bestimmt (2.2.26.3) und für die Mikroinjektion auf 2,5 ng/µl eingestellt wurde. In Abbildung 3.23 ist das Agarosegelbild des präparativen Restriktionsverdaus zu sehen. Neben der mit Sca I linearisierten DNA wurde zur Kontrolle DNA des unverdauten Plasmids aufgetrennt.

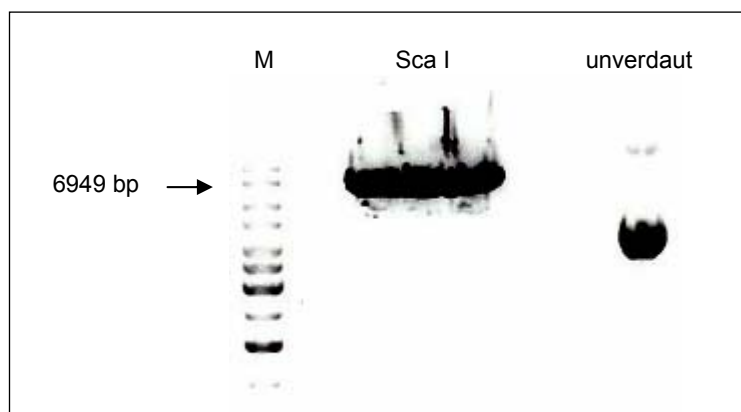


Abb. 3.23: Präparativer Restriktionsverdau des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Plasmids für die Mikroinjektion

Zu sehen ist die mit Sca I linierisierte DNA des 6949 bp großen Vektors; daneben zur Kontrolle unverdaute Plasmid-DNA.

M Marker (1 kb ladder)

Die gereinigte DNA (2,5 ng/µl) wurde wie beschrieben in den männlichen Vorkern befruchteter muriner Eizellen (d 0,5) mikroinjiziert (2.2.26.4) und die so manipulierten Oozyten in scheinchwangere Mäuse transferiert (2.2.26.6). Die Jungen wurden nach einer Tragezeit von etwa 20 Tagen geboren.

3.6 Genotypisierung und Fluoreszenztest von potentiellen Dsg 2 *knock down* Mäusen

Um festzustellen, welche der von den Leihmüttern geborenen Mäuse Träger des Transgens waren, wurden Schwanzbiopsien der zwei bis drei Wochen alten Mäuse entnommen und aus diesen für die Genotypisierung mittels PCR wie beschrieben DNA präpariert (2.2.3). Die PCR wurde unter Verwendung der pSico Primer (5'-GAGCTGTACAAGTAGCGGCCGCAT-3' und 5'-ATGAGTTCCGCCGTGGCAATAG-3') durchgeführt (2.2.5), welche für das Transgen ein 620 bp Produkt liefern. Als interne Kontrolle wurden in jeder PCR Reaktion zusätzlich Primer verwendet, die das endogene Gen Aktin amplifizierten. Als Negativkontrolle wurde DNA einer Wildtyp Maus und zur Positivkontrolle DNA des injizierten pSicopInsu Dsg 2 shRNA Vektors mitgeführt. Abbildung 3.24 zeigt exemplarisch ein Agarosegelbild einer solchen Genotypisierungs-PCR.

Die durch Mikroinjektion in murine Oozyten eingebrachte DNA enthielt neben der shRNA Sequenz das grüne Fluoreszenzprotein EGFP als Indikatorgen. In der Fluoreszenzanalyse bestand daher neben der Genotypisierung mittels PCR eine weitere Möglichkeit, auf Integration des Transgens zu prüfen. Dazu wurden Biopsien der Mausohren unter der Fluoreszenzlampe auf EGFP-Expression untersucht.

In Abbildung 3.24B ist das Agarosegelbild eines PCR Ergebnisses zur Genotypisierung potenzieller Dsg 2 *knock down* Tiere zu sehen. Für drei der untersuchten Mäuse erscheint neben der Bande für die internen PCR Kontrolle (Aktin, 450 bp) das 620 bp große Produkt des Transgens. Negativkontrolle in der PCR Reaktion war DNA einer Wildtyp Maus, wobei nur die Aktin-Bande entstehen sollte. Als Positivkontrolle wurde DNA des injizierten Vektors verwendet, wobei hier nur das Transgen amplifiziert werden kann. Für eine der in der PCR positiv für das Transgen getesteten Mäuse ist in Abbildung 3.24C die Fluoreszenzanalyse einer Ohrbiopsie beispielhaft dargestellt. Links sieht man zur Kontrolle die Ohrprobe einer nicht das Transgen tragenden Maus. Im oberen Teil der Abbildung ist die Biopsie im Durchlicht des Binokulars gezeigt, darunter bei Licht einer Wellenlänge von 550 nm. Bei der Dsg 2 *knock down* Maus ist im Vergleich mit der Wildtyp Maus deutlich die Expression von EGFP zu erkennen. Abbildung 3.24A zeigt, wie DNA in den männlichen Vorkern einer befruchteten Oozyte injiziert wird. Daneben sind nochmals schematisch die zur shRNA Expression notwendigen mikroinjizierten

ERGEBNISSE

DNA Elemente, bestehend aus den beiden das Transgen umgebende Insulatorsequenzen, der von *loxP sites* flankierten CMV/EGFP/Stop-Kassette, sowie U6 Promoter und shRNA, dargestellt.

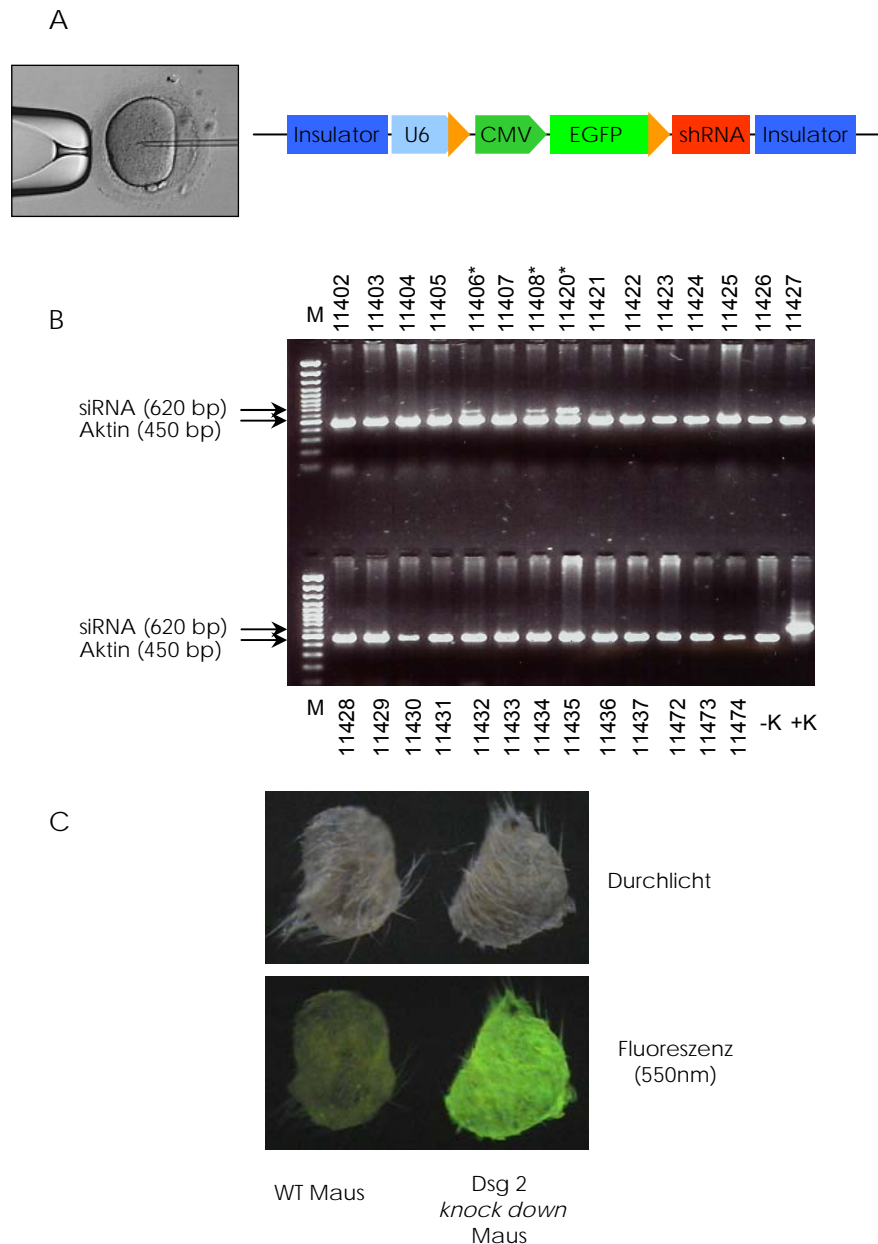


Abb. 3.24: Generierung und Genotypisierung der Dsg 2 knock down Mäuse

(A) Schematische Darstellung der für die shRNA Expression essentiellen DNA Elemente des mikroinjizierten Konstrukts. Links davon sieht man, wie DNA in den männlichen Vorkern einer befruchteten murinen Eizelle injiziert wird.

(B) Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR potenzieller Dsg 2 knock down Mäuse. Transgene Tiere sind mit * gekennzeichnet.

(C) Fluoreszenzanalyse einer Wildtyp (WT) und einer Dsg 2 knock down Maus. Im oberen Bereich sind die Ohrbiopsien im Durchlicht des Binokulars gezeigt, darunter mit Licht von 550 nm Wellenlänge.

- K Negativkontrolle, +K Positivkontrolle, M Marker (100 bp ladder) Insulator MAR Sequenzen, U6 U6 Promoter, CMV Cytomegalusvirus Promoter, EGFP enhanced green fluorescent protein Gen, shRNA Dsg 2 shRNA Oligonukleotid

Insgesamt wurden nach der Mikroinjektion 69 *Founder*-Tiere erhalten, von denen drei mittels PCR und Fluoreszenzanalyse positiv für das Transgen getestet wurden. Eine Maus starb bereits nach wenigen Wochen, so dass für die Analyse zwei Linien zu Verfügung standen.

3.7 *Knock down* von Dsg 2 nach Tamoxifen-Behandlung doppelt transgener pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER^{T2} Mäuse

Wie bereits zu Beginn erwähnt, exprimieren die das pSicopInsu Dsg 2 shRNA-Konstrukt tragenden Mäuse noch nicht die Dsg 2 shRNA. Erst wenn die CMV/EGFP/Stop-Kassette mittels Cre Rekombination zwischen den *loxP sites* deletiert wird, kommt der U6 Promoter in physische Nähe der shRNA Sequenz, wodurch diese transkribiert werden kann. Zur Expression der shRNA ist somit Cre Rekombinase notwendig. Durch Verpaarung der Dsg 2 *knock down* Tiere mit den unter 3.1 beschriebenen Rosa26CreER^{T2} Mäusen wurden bitransgene Tiere erhalten, die zum einen das Dsg 2 *knock down*-Konstrukt und des weiteren die über Tamoxifen induzierbare Cre Rekombinase (CreER^{T2}) trugen. Diesen bitransgenen Mäusen wurde über einen längeren Zeitraum wiederholt für jeweils 5 Tage 1 mg Tamoxifen (gelöst in 100 µl autoklaviertem Sonnenblumenöl) pro Tag intraperitoneal injiziert. Dabei lag der Zeitraum zwischen den Behandlungen zwischen 16 und 23 Tagen. Durch diese Mehrfachbehandlung sollte in möglichst vielen Zellen CreER^{T2} aktiviert werden, in den Zellkern translozieren und dort die Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette durch Rekombination zwischen den *loxP sites* vermitteln. Nur in den Cre exprimierenden Zellen kann auch die shRNA exprimiert und damit Dsg 2 herunterreguliert werden.

Um zu testen, in wie weit die Proteinexpression von Dsg 2 nach der Tamoxifenbehandlung reduziert werden konnte, wurden zwei unterschiedliche Detektionsmethoden gewählt. Zum einen wurden *Western Blots* durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse 15 Tage nach der letzten Tamoxifeninjektion euthanasiert und aus den entnommenen Geweben Proteinextrakte hergestellt (2.2.19.2). Von diesen wurde je 100 µg Gesamtprotein auf 6 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und der *Western Blot* wie beschrieben unter Verwendung des Dsg 1/2-Antikörpers (DG 3.10, 1:50 in Erstantikörperverdünnungslösung) durchgeführt (2.2.22). Zur Kontrolle auf

homogene Proteinmengen wurde der Antikörper DG 3.10 von der Membran entfernt und diese im Anschluss mit p38 Antikörper inkubiert (2.2.22).

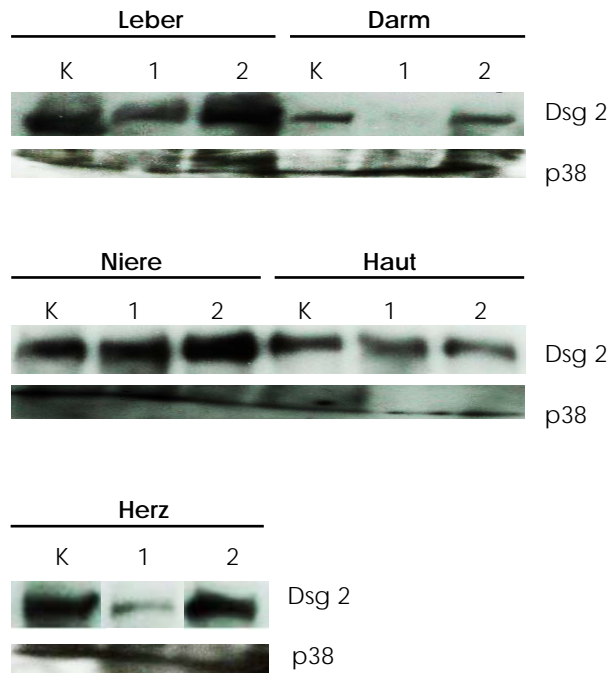


Abb. 3.25: Western Blot von pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER^{T2} Mäusen nach Tamoxifenbehandlung

Western Blot von Proteinextrakten verschiedener Gewebe Tamoxifen-behandelter, doppelt transgener Dsg 2 knock down/Rosa26CreER^{T2} Mäuse. Als Kontrolle (K) wurden die Proteinproben einer bitransgenen mit Öl behandelten Maus verwendet. Die Membranen wurden mit Dsg 1/2- sowie p38-Antikörper behandelt.

1 pSicopInsu Dsg 2 shRNA Mauslinie 1, 2 pSicopInsu Dsg 2 shRNA Mauslinie 2

Das Ergebnis eines *Western Blots* für Proteinextrakte aus Leber, Darm, Niere, Haut und Herz der beiden Dsg 2 knock down Linien ist in Abbildung 3.25 gezeigt. Um eine Referenz für die Dsg 2 Expression ohne induzierten knock down zu haben, wurden Mäuse mit gleichem genetischen Hintergrund (doppelt transgene Geschwistertiere) mit autoklaviertem Sonnenblumenöl anstelle von Tamoxifen behandelt (K). Die Dsg 2 Proteindetektion ist in dem jeweils oberen Ausschnitt dargestellt. In der Leber kommt es nur zu geringen Veränderungen der Proteinlevels in den beiden Linien. Die Proteinextrakte des Darms zeigen, dass es in Linie 1 zu drastischer Reduktion der Dsg 2 Proteinkonzentration gekommen war. Linie 2 zeigte kaum Abweichungen im Vergleich mit der Öl-behandelten Maus. In der Niere konnten in beiden transgenen Linien keine Veränderungen in den Expressionslevels nach Tamoxifenbehandlung detektiert werden. In den Extrakten der Haut kommt es zu geringer Verminderung des Proteins in beiden Linien. Beim Vergleich der

Proteinlevels im Herz kann man eine deutliche Reduktion in der Dsg 2 Expression in Extrakten der Linie 1 sehen. Die geladenen Proteinmengen wurden mittels p38 Antikörper kontrolliert. Gleichartige Stärke der Banden deutet auf etwa identische Proteinmengen hin. Die Proteinmengen in den verschiedenen Organen lassen die Folgerung zu, dass Dsg 2 *knock down* Mäuse der Linie 1 eine bessere Reduktion in Dsg 2 Protein bewirken als die Tiere der Linie 2. Die *knock down* Effizienz in Dsg 2 Protein korreliert zudem mit der in 3.1 beschriebenen Ergebnissen zur Funktionalität der Rosa26CreER^{T2} Maus. In den Funktionalitätstests wurde gezeigt, dass die Expression von Cre Rekombinase in verschiedenen Organen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. In der Niere konnten nur wenige Cre exprimierende Zellen detektiert werden (Abb. 3.4). Da die Cre Expression notwendig ist, um die Transkription der siRNA zu ermöglichen, liegt nahe, dass es in diesem Organ aufgrund fehlender Dsg 2 siRNA kaum zu einer drastischen Reduktion des Dsg 2 Proteins kommen kann. In Haut und Herz konnten deutlich mehr Cre exprimierende Zellen gefunden werden. Für Mäuse der Dsg 2 *knock down* Linie 1 kann im Proteinextrakt aus Herzgewebe eine klare Reduktion in Dsg 2 Protein erreicht werden. Im Fall der Linie 2 ist die Proteinreduktion in diesem Organ nicht signifikant. In der Haut sind nur schwer Unterschiede in den Dsg 2 Proteinmengen von Kontrolltieren zu Linie 1 und 2 festzustellen. Dies könnte auch eine Ursache in der Spezifität des Antikörpers haben, da dieser auch Dsg 1 detektiert, welches in den oberen, differenzierteren Schichten der Epidermis (Granulosum und Spinosum) exprimiert wird (siehe Abb. 1.3). In Leber und Darm konnten im β -Galaktosidase Funktionalitätstest der Rosa26CreER^{T2} Mäuse über 30 % Cre-positive Zellen detektiert werden. In Proteinextrakten aus der Leber von pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER^{T2} Mäusen kam es in Linie 1 zu einer sichtbaren, in Linie 2 weniger starken Reduktion des Dsg 2 Proteins. Im Darmgewebe der Linie 1 wurde Dsg 2 Protein drastisch reduziert. In diesem Fall führte die Expression der shRNA fast zur vollständigen Unterdrückung des Dsg 2 Proteins. In Linie 2 konnte keine solch dramatische Proteinreduktion festgestellt werden.

Die zweite Methode, um eventuell veränderte Proteinlevels nachzuweisen, bestand in der Durchführung von Immunfärbungen. Diese wurden am DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) freundlicherweise von Christine Grund durchgeführt. Die Mäuse wurden dazu euthanasiert und die Gewebe wie beschrieben eingefroren (2.2.24.1). Von der Leber wurden Kryostatschnitte angefertigt, die mit

dem gegen Dsg 1 und 2 gerichteten Antikörper (DG 3.10) inkubiert wurden (2.2.24.4).

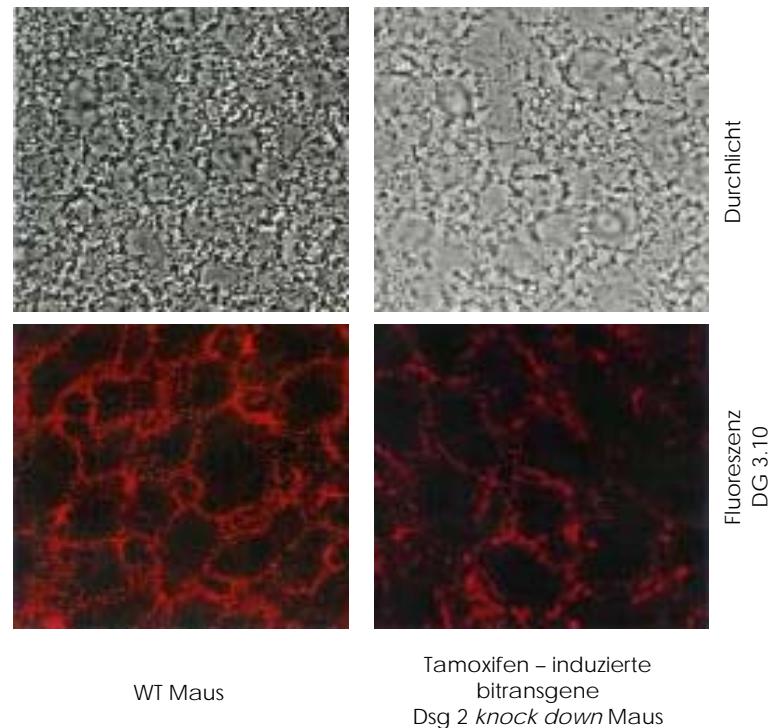


Abb. 3.26: Immunfluoreszenz von Leberschnitten der bitransgenen *knock down* Maus

Abgebildet sind mit Dsg 1/2-Antikörper (DG 3.10) gefärbte Kryostatschnitte der Leber. Links sieht man die Schnitte der Kontrollmaus (WT, Wildtyp), daneben die der mit Tamoxifen behandelten Dsg 2 *knock down* Maus. Über den Fluoreszenzaufnahmen ist das dazugehörige Durchlichtbild zu sehen.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen mit den zugehörigen Durchlichtbildern sind in Abbildung 3.26 gezeigt. Um einen Vergleichswert für die Expressionslevels von Dsg 2 in der Leber zu haben, wurden Kryostatschnitte einer Wildtypmaus mitgeführt. Diese sind im linken Teil der Abbildung zu sehen. Beim Vergleich der beiden Proben ist eine weniger intensive Rotfärbung in der *knock down* Maus an den Zellgrenzen, welche die Desmosomen als punktuelle Strukturen erkennen lassen, zu erfassen.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz von Leberschnitten konnte das Ergebnis der *Western Blots* bestätigt werden. In diesen beiden unabhängigen Methoden wurde eine klare Reduktion des Dsg 2 Proteins nachgewiesen.

3.8 Induktion von *Colitis ulcerosa* in Tamoxifen-induzierten Dsg 2 knock down/VillinCreER^{T2} Mäusen

Aufgrund der erfolgreichen Reduktion von Dsg 2 Protein sollte eine erste funktionale Untersuchung der Dsg 2 knock down Mäuse erfolgen.

Colitis ulcerosa ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die meist im unteren Abschnitt des Dickdarms beginnt und sich von dort aus über den gesamten Dickdarm ausbreitet (Price und Morson, 1975). Im Verlauf der Krankheit kann es zu Ausbildung von Darmtumoren kommen (Price und Morson, 1975). Die Ursachen für die Erkrankung sind weitgehend ungeklärt. Als Auslöser werden unter anderem Störungen der Immunabwehr, Bakterien und Umwelteinflüsse vermutet (Karlinger *et al*, 2000). Darmepithelzellen müssen ständig an unterschiedliche Situationen in der Mukosa-Umgebung adaptieren und sind somit aktiv involviert in die Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen. Als Konsequenz der proliferativen, metabolischen, immunologischen, entzündlichen oder genetischen Veränderungen kann es zur Modulation der epithelialen Genexpression kommen (Fukushima *et al*, 2003). Untersuchungen mit *Colitis ulcerosa* Patienten ergab im Vergleich mit der Kontrollgruppe im *differential display* eine Deregulation von an der Zelldifferenzierung beteiligter Moleküle, unter anderem Dsg 2 (Fukushima *et al*, 2003).

Für die funktionale Untersuchung der Dsg 2 knock down Mäuse in Zusammenhang mit *Colitis ulcerosa* wurden die Mäuse der Linie 1 zunächst mit VillinCreER^{T2} Mäusen verpaart (El Marjou *et al*, 2004). Diese exprimieren mittels Villin Promoter gewebespezifisch im Darm (und auch in der Niere) ein Fusionsmolekül aus Cre Rekombinase und modifizierter Ligandenbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors (CreER^{T2}), welches über den synthetischen Östrogenantagonisten Tamoxifen, nicht aber durch den natürlichen Liganden 17- β -Östradiol, exogen aktivierbar ist. Um Cre Aktivität im Darm zu induzieren, wurde bitransgenen Mäusen an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 1 mg Tamoxifen injiziert (in 100 μ l autoklaviertem Sonnenblumenöl). Nach Anbindung des Liganden Tamoxifen an das CreER^{T2}-Fusionsmolekül transloziert dieses in den Zellkern und führt durch Exzision der CMV/EGFP/Stop-Kassette zur Expression der shRNA in den Darmzellen. Während der anschließenden Induktion einer experimentellen *Colitis* wurde die Tamoxifeninjektion beibehalten, um die sich schnell erneuernden

Darmzellen zur Expression der shRNA zu stimulieren. Die Induktion von *Colitis ulcerosa* erfolgte wie beschrieben (2.2.30). Endoskopische Untersuchungen wurden 3 und 5 Wochen nach Beginn der Induktion und freundlicherweise von Alexej Nikolaev und Dr. Christof Becker (I Med Klinik, Arbeitsgruppe Prof. Neurath, Universität Mainz) an einem speziellen Miniendoskop (Coloview) durchgeführt. Als Kontrolle wurden Tiere des gleichen genetischen Hintergrundes untersucht, die mit Ausnahme der Tamoxifeninjektion gleich behandelt worden waren. Die endoskopische Analyse erfolgte unter Berücksichtigung von Tumorbildung und Entzündungsstatus nach vorgegebenen Kriterien (Becker *et al*, 2005). Der so genannte *tumour score* ergab sich aus Anzahl und Größe der Tumore, wobei die Größe Werte von 1 (gerade detektierbar), 2 (nimmt 1/8 des Darmdurchmessers ein), 3 (nimmt 1/4 des Darmdurchmessers ein), 4 (nimmt bis zur Hälfte des Darmdurchmessers ein), bis 5 (der Tumor nimmt mehr als die Hälfte des Darmdurchmessers ein) erreichen konnte. Der Entzündungsstatus oder *colitis score* ergab sich aus Wertung verschiedener Parameter: Dicke der Darmmukosa, vaskuläre Veränderungen, Vorhandensein von Fibrin, Granularität der Mukosaoberfläche und Konsistenz des Stuhls (beurteilt mit Werten zwischen 0 und 3). Durch Addition ergab sich für den *colitis score* ein Gesamtwert, mit Hilfe dessen Aussagen über den Grad der Entzündung des Darmepithels gemacht werden konnten.

Tumor score (nach 3 Wochen):

Maus	15359 - Tam	15357 - Tam	15360 - Tam	15284 + Tam	15287 + Tam	15285 + Tam	15358 + Tam	15283 + Tam
Tumor (Anzahl x Größe)	0	0	0	1 x 2	5 x 2	6 x 2 2 x 1	1 x 2 1 x 1	3 x 2 2 x 1
Summe	0	0	0	2	10	14	3	8

Tabelle 3.1: Bewertung der Tumore im Darmepithel der Dsg 2 knock down/VillinCreER^{T2} Mäuse nach Colitis-Induktion
-Tam ohne Tamoxifen, + Tam mit Tamoxifen

Colitis score (nach 3 Wochen):

Maus	15359 - Tam	15357 - Tam	15360 - Tam	15284 + Tam	15287 + Tam	15285 + Tam	15358 + Tam	15283 + Tam
Mukosadiecke	0-1	1	0-1	1-2	2-3	2	1-2	2
Granularität	1	1	0	2-3	3	3	1-2	2-3
Fibrin	1	1	1	1-2	2-3	3	1-2	2
Vaskularität	1	1	0-1	2	2	2-3	1-2	2
Stuhl	0	0	0	1	3	2	0	1
Summe	3,5	4	2	8,5	13	12,5	6	9,5

Tabelle 3.2: Bewertung der Entzündung der Darmmukosa in Dsg 2 knock down/VillinCre ER^{T2} Mäusen nach Colitis-Induktion

- Tam ohne Tamoxifen, + Tam mit Tamoxifen

Die beiden Tabellen (Tabelle 3.1 und 3.2) geben die für *tumour score* und *colitis score* erhaltenen Untersuchungswerte für drei Kontrollmäuse (ohne Tamoxifen, - Tam) sowie fünf Tamoxifen-induzierte (und damit die Dsg 2 shRNA exprimierende) Mäuse (+ Tam) an. In den untersuchten Kontrollmäusen konnten bei der ersten Endoskopie (drei Wochen nach AOM-Injektion) keine Tumore festgestellt werden. Aufgrund der Induktion von *Colitis ulcerosa* mit Azoxymethan (AOM) und Dextransodiumsulfat (DSS, siehe dazu auch 2.2.30) kam es in den Kontrollmäusen zur Entzündung der Darmmukosa, welche sich zum Zeitpunkt der ersten Endoskopie bereits im verheilenden Stadium befand. Die Entzündungswerte der Kontrollmäuse lagen zu diesem Zeitpunkt zwischen zwei und vier. Bei den mit Tamoxifen behandelten Mäusen konnten bereits drei Wochen nach *Colitis*-Induktion Tumore der Größe 1 und 2 detektiert werden. Aufgrund der Anzahl der Tumore im Darmepithel ergaben sich Werte von 2 bis 8 beim *tumour score*. Aussehen und der Stand der Entzündung der Darmmukosa in den Dsg 2 shRNA exprimierenden Mäusen zeigte schon 3 Wochen nach der Induktion drastische Unterschiede zu der Kontrollgruppe. In Abbildung 3.27 sind Aufnahmen während der Endoskopie 3 und 5 Wochen nach AOM-Injektion dargestellt. Man konnte deutliche Unterschiede in der Morphologie des Darmepithels erkennen. In den mit Tamoxifen behandelten Tieren war eine Verdickung der Mukosa festzustellen. Nicht mit Tamoxifen induzierte Tiere zeigten ein dünnwandiges, mit vielen Blutgefäßen durchzogenes Darmgewebe. In der zweiten endoskopischen Untersuchung zeigte sich, dass es aufgrund der Behandlung mit AOM, einem Tumor-inducer, auch in den Kontrollmäusen zur Ausbildung von Tumoren gekommen war. Diese unterschieden sich jedoch in Anzahl und Größe deutlich von den in Dsg 2 shRNA exprimierenden Mäusen detektierten Tumoren. In den Kontrolltieren waren fünf Wochen nach AOM-Injektion nur wenige Tumore der

Größe 1 und 2 zu finden, während die Ausprägung der Tumore in den Dsg 2 shRNA Mäusen mit der Zeit fort schritt, was beim Vergleich der Aufnahme nach 3 und 5 Wochen auffällt. In der zweiten Untersuchung der Tamoxifen-induzierten Tiere stiegen Frequenz und Größe der Tumore (Tumorgröße 3 und 4) im Vergleich mit dem ersten Untersuchungsergebnis. Das Wachstum der Tumore in den induzierten Tieren gestaltete sich eher flächig als polypartig. Aufgrund dieser dramatischen Unterschiede in den die Dsg 2 siRNA bildenden Mäuse ist ein Zusammenhang von Dsg 2 Expression und entzündlicher Darmerkrankung mit assoziierter Induktion von Tumoren zu postulieren.

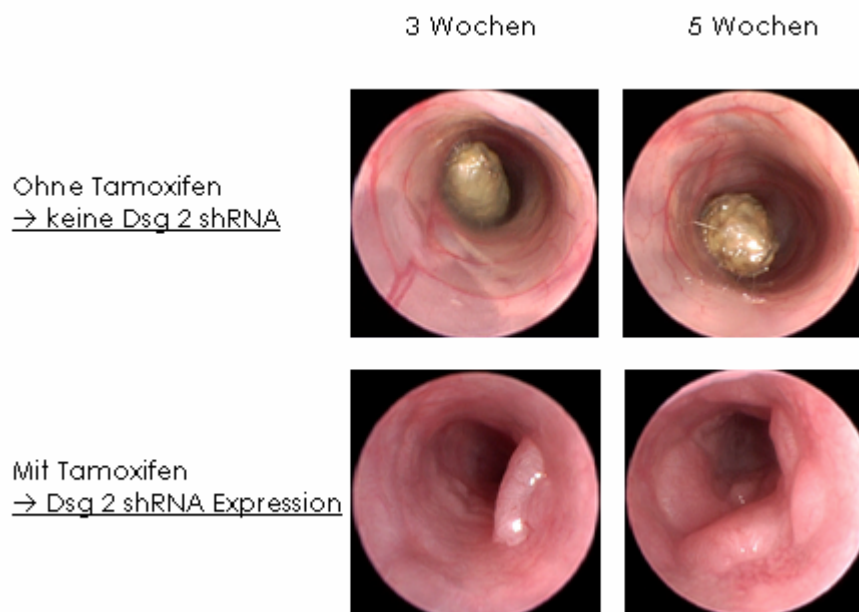


Abb. 3.27: Endoskopische Untersuchung der Dsg 2 *knock down*/VillinCreER^{T2} Mäuse nach Induktion von *Colitis ulcerosa*

Bei bitransgenen Dsg 2 *knock down*/VillinCreER^{T2} Mäusen wurde durch Gabe von Azoxymethan (AOM) und Dextransodiumsulfat *Colitis ulcerosa* induziert. Die endoskopische Untersuchung erfolgte 3 (links) und 5 (rechts) Wochen nach Injektion von AOM. Die jeweils oberen Aufnahmen zeigen den Darm der nicht mit Tamoxifen behandelten Kontrollmäuse. Darunter sind Bilder des Darms der Dsg 2 shRNA exprimierenden Mäuse zu sehen.

4 Diskussion

4.1 Induzierbare Expression der Cre Rekombinase in den peripheren Geweben der Rosa26CreER^{T2} Mauslinie

Rekombination ist ein die DNA betreffender Prozess, der durch spezialisierte Enzyme (Rekombinasen) katalysiert wird. Durch Spaltung und Neuverknüpfung von DNA wird genetische Diversität und Reparatur von Mutationen ermöglicht. Viele zu Laborzwecken verwendete Rekombinasen stammen aus Bakteriophagen und binden an konservierte DNA Erkennungssequenzen. Ein häufig verwendetes Cre (*cyclisation rekombination*) Rekombinationssystem leitet sich vom Bakteriophagen P1 ab. Dabei katalysiert Cre die Rekombination zwischen zwei loxP (*locus of X-over of P1*) Erkennungssequenzen, welche je aus einem zentralen Basenoktamer, flankiert von zwei palindromischen Sequenzen von 13 bp Länge, bestehen (Hamilton und Abremski, 1984). Je nach Orientierung des zentralen Elements kommt es zu Exzision/Integration oder Inversion von zwischen den loxP *sites* liegenden Sequenzen. Da dieses System sowohl in eukaryotischen Zellen als auch im Tiermodell funktioniert (Sauer und Henderson, 1988; Lakso *et al*, 1992), wird es in der medizinischen Grundlagenforschung zahlreich eingesetzt (Chang *et al*, 2004; Kemp *et al*, 2004; Ouvrard-Pascaud *et al*, 2002; Schwenk *et al*, 1998; Silver und Livingston, 2001). Für die Funktionalität des Systems sind normalerweise zwei transgene Mäuse notwendig. Eine trägt das mit loxP Elementen flankierte Transgen (so genannter „Reporter“), die andere exprimiert Cre Rekombinase. Durch Verpaarung der Tiere kommt es in den Nachkommen zur Rekombination zwischen den loxP Erkennungssequenzen. Werden für die Expression der Rekombinase Zeit- oder Gewebe-spezifische Promotoren verwendet, so findet die Rekombination während eines bestimmten Zeitpunkts der Entwicklung oder nur in bestimmten Organen statt (Indra *et al*, 1999; Lakso *et al*, 1992; Utomo *et al*, 1999). Dieser Vorteil des Systems ist gleichzeitig auch ein Nachteil, da für die jeweilige Anwendung die entsprechenden Cre exprimierenden Mauslinien zu Verfügung stehen müssen. Durch Fusion der Cre Rekombinase mit modifizierten Hormonrezeptoren kann das System zusätzlich schaltbar gemacht werden (Brake *et al*, 2004; Brocard *et al*, 1998; Feil *et al*, 1996; Kellendonk *et al*, 1999; Metzger und Chambon, 2001; Vasiokhin, 1999). Dies ist vor allem dann sinnvoll und auch

notwendig, wenn das Gen, welches durch *knock out* oder *knock down* untersucht werden soll, embryonal letal ist.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit analysierte Rosa26CreER^{T2} Maus wurde generiert, um die Cre Rekombinase temporär kontrolliert und ubiquitär zu exprimieren. Dazu wurde ein modifizierter Östrogenrezeptor (ER^{T2}) mit Cre Rekombinase des Bakteriophagen P1 fusioniert und in den Rosa26 Locus der Maus eingebracht (*knock in*). Für den Rosa26 Locus ist ubiquitäre und moderate Expression von Transgenen beschrieben (Soriano, 1999). Das ER^{T2} Molekül bewirkt, dass die mit ihm fusionierte Cre Rekombinase erst nach Induktion, das heißt durch Bindung des synthetischen Liganden Tamoxifen, in den Zellkern transloziert und die Rekombination zwischen den loxP *sites* katalysiert (Feil et al, 1997; Indra et al, 1999). Dadurch wird die Aktivität der Cre Rekombinase zeitlich regulierbar.

Durch Verpaarung der Rosa26CreER^{T2} Tiere mit so genannten „Reportermäusen“ (R26R und RAGE) wurde die Expression der Cre Rekombinase nach Induktion mit Tamoxifen in verschiedenen Organen und Zelltypen untersucht. Bitransgenen Rosa26CreER^{T2}/R26R Mäusen wurde für 5 oder 10 Tage je 1 mg Tamoxifen intraperitoneal injiziert (siehe dazu 2.2.27) und diese 5 oder 15 Tage nach der letzten Injektion analysiert, wozu Kryostatschnitte der Organe angefertigt und diese mit X-Gal gefärbt wurden. In den Zellen, in welchen Cre Rekombination stattgefunden hatte, kam es zu einer Blaufärbung. Dabei war eine starke Variation im Anteil der β -Galaktosidase exprimierenden, blauen Zellen in verschiedenen Organen zu beobachten (Abb. 3.4). In Niere, Blase, Magen und Muskel konnten nur wenige, in Zunge, Luftröhre und Herz deutlich mehr blaue Zellen detektiert werden. Am effizientesten war die Rekombination in Haut, Leber, Dünn- und Dickdarm. Dort exprimierten über 30 % der Zellen β -Galaktosidase. Wurde die Analyse 15 Tage nach der fünftägigen Tamoxifenbehandlung durchgeführt, kam es in einigen Organen zum Anstieg des Anteils blauer Zellen (Luftröhre, Herz, Niere, Blase und Magen). Eine länger andauernde Behandlung mit dem Liganden führte zu keinem signifikanten Anstieg der β -Galaktosidase exprimierenden Zellpopulation. Das Fehlen von blauen Zellen im Gehirn deutete auf fehlende Rekombination in diesem Organ hin. Verursacht werden könnte dies durch zu geringe Konzentrationen von Tamoxifen oder ungenügende Expression des CreER^{T2} Fusionsmoleküls. Um zu prüfen, ob die Rekombinase im Gehirn exprimiert wird, wurden *Western Blots* durchgeführt. Hier konnte das 74 kDa große Fusionsprotein in allen untersuchten

Organen mit Ausnahme des Gehirns detektiert werden. Das Fehlen von X-Gal positiven Zellen im Gehirn ist damit auf fehlende oder ungenügende Expression von CreER^{T2} zurückzuführen. Für eine ähnliche *knock in* Maus wurde Expression in dem betreffenden Organ beschrieben (Seibler *et al.*, 2003). Unzureichende Mengen Tamoxifen im Gehirn kann als Verursacher der fehlenden Rekombination ausgeschlossen werden, da beschrieben wurde, dass Tamoxifen im Gehirn zu Aktivierung von Cre und damit zu Rekombination führen kann (Casanova *et al.*, 2002). Die hier erhaltenen Daten zeigen, dass mit der Rosa26CreER^{T2} Mauslinie Rekombination in allen peripheren Organen erreicht werden kann. Die Expression im Gehirn fehlt aber oder ist zu gering, um sie mit den verwendeten Methoden zu detektieren.

Weitere Analyse der Rosa26CreER^{T2} Maus durch Verpaarung mit RAGE Mäusen zeigte unterschiedlich starke Aktivierung der Cre Rekombinase in verschiedenen Blutzellpopulationen. Zudem wurde mit Hilfe des FACS eine sehr geringe Hintergrundaktivität der Cre Rekombinase in Abwesenheit des Liganden detektiert (0,01-0,15 % in Blutzellen). Eine Kontamination der Kontrolltiere mit Tamoxifen konnte ausgeschlossen werden, da die Tiere während der Behandlungszeit in getrennten Käfigen gehalten wurden. Da in einer FACS-Analyse wesentlich mehr Zellen untersucht werden und diese Methode vergleichsweise sehr sensitiv ist, können hier auch sehr kleine, das Reporter-gen exprimierende Zellpopulationen detektiert werden, was bei einem Gewebeschnitt nicht der Fall ist. Zellen mit Basalaktivität der Rekombinase werden bei einem Schnitt nur per Zufall detektiert, was die Tatsache erklärt, dass bei Analyse der Organe mittels X-Gal Färbung keine blauen Zellen in den Kontrolltieren zu sehen waren. Die unterschiedliche Aktivierung der Cre Rekombinase in den verschiedenen hämatopoietischen Linien, und dem daraus resultierenden Anteil an Reporter-gen-exprimierenden Zellen, ist wahrscheinlich mit dem ungleichen Umsatz der einzelnen Zellen zu erklären (*turn over*). Auch spielt der Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion in Zusammenhang mit dem jeweiligen Differenzierungsstatus der Zelle eine Rolle. Eine noch nicht ganz gereifte, sich häufig teilende Blutzelle gibt den rekombinierten Lokus an alle aus ihr hervorgehenden Zellen weiter, während eine differenzierte, sich nicht mehr teilende Effektorzelle dies nicht tut. Zudem ist Rekombination ein stochastisches Ereignis. Es findet nicht in allen Zellen zum selben Zeitpunkt statt, was auch die durch X-Gal Färbung erhaltenen Daten belegten (Abb. 3.4).

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Rosa26CreER^{T2} Mauslinie für Untersuchungen von Genen eignet, die in der frühen Ontogenese eine Rolle spielen. Durch Verpaarung mit den Reporterlinien und Injektion von Tamoxifen an Tag E7,5 und E10,5 der Tragezeit konnten zwei Tage später die potenziell bitransgenen Tiere auf Cre Rekombination untersucht werden. Dazu wurden die an E9,5 und E12 präparierten Embryonen in einem Versuchsansatz fixiert und mit X-Gal gefärbt. In doppelt transgenen Tieren war eine starke Blaufärbung im gesamten Embryo zu sehen (Abb. 3.9). Dies zeigt, dass durch Injektion von 1 mg Tamoxifen in das Muttertier die Aktivität des ER^{T2} Fusionsmoleküls induziert und die Rekombination im Nukleus katalysiert wird. Damit ist die Anwendung dieses Systems bereits in frühen Entwicklungsstadien möglich. Die starke und über den gesamten Embryo verteilte β -Galaktosidase-Aktivität bereits 2 Tage nach der Injektion des Liganden, ermöglicht eine Induktion in allen Geweben des Embryos und eine kurz darauf folgende Analyse eines Phänotyps. Untersuchung der Cre Rekombination im Embryo mittels RAGE Reportermausen führte in der FACS-Analyse zu 24,5 % der Reporterzellen exprimierenden Zellen. Dieser Unterschied zu der kompletten Blaufärbung und damit auf Rekombination in jeder Zelle hindeutenden Ergebnis mit der R26R Maus könnte in der Reportermaus bzw. in den verschiedenen Reportertransgenen (β -Galaktosidase und EGFP) begründet sein, deren Expression wiederum von dem jeweiligen genetischen Locus, in dem sie liegen (ROSA26 Locus und RAGE Locus), abhängt. Auch ohne Induktion mit Tamoxifen wurden mittels FACS 0,07 % EGFP-exprimierende Zellen in E12 Rosa26CreER^{T2}/RAGE Embryonen gemessen. Einzeltransgene RAGE Embryonen lieferten jedoch keine grünen Zellen (Abb. 3.10). Zum einen bestätigt dies vorangegangene Versuche der Arbeitsgruppe in Zusammenhang mit der RAGE Mauslinie, die auch dort keine Hintergrundaktivität zeigte. Des Weiteren korrelieren diese Ergebnisse mit der bereits in den Blutzellen detektierten geringen Aktivität des Fusionsmoleküls in Abwesenheit des Liganden. Die hier gezeigte unerwünschte Hintergrundaktivität ohne Induktion hat für alle Versuchsreihen, welche eine stringente Kontrolle der Rekombinationsaktivität erfordern, eine Verschiebung der Nulllinie zur Folge und kann dadurch möglicherweise die Interpretation von geringen Effekten erschweren. Die Rosa26CreER^{T2} Maus zeigte induzierbare Rekombination in allen untersuchten peripheren Geweben. Dadurch können auch Gene untersucht werden, die ansonsten zu embryonaler Letalität führen. Rekombination konnte bereits in Embryonalstadien

induziert werden, wodurch die Analyse von Genen möglich wird, die zu frühen Entwicklungsvorgängen beitragen. Die geringen Mengen an aktiver Cre Rekombinase ohne Tamoxifen von bis zu 0,15 % grenzen die Anwendbarkeit im Hinblick beispielsweise auf Krebs-Mausmodelle ein, da in Krebsstudien das Ziel ist, Ätiologie und Verlauf der Krankheit zu simulieren, und daher die Einführung beispielsweise einer Mutation, zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgen muss, um die sich entwickelnde Pathologie dokumentieren zu können. Die sporadische Rekombination ohne Induktion könnte durch hohe Expressionslevels des Fusionsmoleküls CreER^{T2} erklärt werden. Bereits publizierte Mausmodelle für Tamoxifen-induzierbare Cre Rekombination zeigten ähnliche Hintergrundaktivitäten (Hayashi und McMahon, 2002; Vooijs *et al*, 2001). Durch Kombination eines gewebespezifischen Promoters und induzierbarer Cre Rekombinase können zwar Rekombinationsereignisse ohne Induktion vermindert oder beseitigt werden, die Rekombination ist aber auf die Organe beschränkt, in denen der gewählte Promoter aktiv ist (Casanova *et al*, 2002; Kemp *et al*, 2004). Eine weitere Limitation des Rosa26CreER^{T2} Systems liegt in der Effizienz der Rekombination. Partielle Exzision eines Transgens erschwert die Analyse von Phänotypen, da nicht alle Zellen eines Gewebes oder eines Zelltyps erfolgreich rekombiniert haben. So entstehen Mosaik-Gewebe mit unterschiedlichem Anteil an Wildtyp-Zellen, deren Interpretation sich schwierig gestaltet. In anderen Tiermodellen, in denen Cre/ER-Fusionsmoleküle zur induzierbaren Rekombination zwischen loxP-sites führen sollten, wurden vergleichbare Probleme in der Effizienz der Rekombination beobachtet (Casanova *et al*, 2002; Guo *et al*, 2002; Hayashi und McMahon, 2002; Kemp *et al*, 2004; Schwenk *et al*, 1998). Im Vergleich mit nativer Cre Rekombinase zeigte ein CreER^T-Fusionsmolekül reduzierte Rekombinationseffizienz (Kemp *et al*, 2004). Bisher ist kein Mausmodell publiziert, in dem induzierbare ubiquitäre Cre Rekombination ohne Hintergrundaktivität möglich ist, und in dem es nicht zu mosaikartiger Aktivität der Cre Rekombinase kommt. Die hier beschriebene mosaikartige Rekombination in peripheren Geweben mit der Rosa26CreER^{T2} Maus kann hilfreich für die Analyse von partiellen Phänotypen sein, welche bei kompletter Deletion letal wären.

4.2 Verschiedene siRNA Sequenzen führen auf RNA- und Proteinebene zu unterschiedlich effizientem *knock down* von Dsg 2 unter Anwendung des Expressionsvektors pTER_{EGFP}

Der von van de Wetering und Kollegen generierte Expressionsvektor pTER_{EGFP} ermöglicht über Doxyzyklin induzierbare Expression einer shRNA (van de Wetering *et al.*, 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der pTER_{EGFP} Vektor dazu verwendet, drei unterschiedliche gegen Desmoglein 2 gerichtete shRNAs auf ihre *knock down* Effizienz zu testen. Dabei wurde auf die Schaltbarkeit des Systems verzichtet, und das dafür notwendige Repressormolekül in den Zellkulturexperimenten nicht eingesetzt. Die Auswahl der siRNA Sequenzen richtete sich nach den bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Kriterien. Die synthetischen shRNA Oligonukleotide bestehend aus Sequenzen für siRNA, *loop* und Klonierungsstelle, wurden zunächst in den Expressionsvektor eingebracht. Um zu testen, wie effizient der *knock down* auf RNA Ebene ist, wurden murine Dsg 2 exprimierende EpH4 Zellen transient mit den drei hergestellten shRNA Vektoren transfiziert. Da das Plasmid zusätzlich zur shRNA EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) exprimiert, konnten 48 Stunden nach der Transfektion grüne, mit dem Vektor transfizierte und damit die shRNA exprimierende Zellen mittels FACS sortiert, und so von den nicht-transfizierten Zellen getrennt werden. Aus den so gewonnenen Zellpopulationen wurde RNA extrahiert und *Northern Blots* durchgeführt, welche mit einer Dsg 2 und einer GAPDH Sonde inkubiert wurden. Das Ergebnis aus diesen Versuchen zeigte, dass es durch Expression der drei shRNAs zu einer Reduktion der Dsg 2 mRNA um 24 % bei shRNA1, 40,1 % bei shRNA2 und 34 % bei shRNA3 kam. Diese deutliche Verminderung der Ziel-mRNA konnte bereits 48 Stunden nach transients Transfektion erreicht werden. Ob verminderte mRNA Menge auch nach 48 Stunden zu reduzierten Proteinlevels führte, wurde in einem zweiten Versuch getestet. Dazu wurden aus den FACS-sortierten EpH4 Zellen Proteinextrakte hergestellt und diese in *Western Blots* analysiert. Mit dem gewählten Versuchsansatz konnten keine Unterschiede in den Dsg 2 Proteinmengen zwischen grünen und nicht EGFP-exprimierenden Zellen detektiert werden. Auch hier wurde eine transiente Transfektion durchgeführt und die Zellen 48 Stunden später für die FACS-Analyse geerntet. Daher liegt der Verdacht nahe, dass die Ursache in der Stabilität des Dsg 2 Proteins zu suchen ist. Bereits

vorhandenes Dsg 2 Protein wurde wahrscheinlich in einer Versuchszeit von 48 Stunden nicht abgebaut, so dass reduzierte mRNA Mengen, welche verminderte Proteinmengen nach sich ziehen sollten, keinen unmittelbaren Einfluss auf den Protein „*steady state*“ hatte. Daher wurde versucht, die Zellen stabil mit den shRNA Vektoren zu transfizieren, um durch ständige Expression der shRNA einen möglichen Einfluss auf die Proteinmengen messen zu können. Die murinen Epithelzellen EpH4 benötigten zur Transfektion besondere Bedingungen (maximal 40 % Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion) und es konnte nur durch Verwendung von Lipofectamine2000 eine erfolgreiche Transfektion von bis zu 40 % erreicht werden. Leider war es nicht möglich, innerhalb der veranschlagten Zeit stabile Klone zu generieren. Zum einen war ein Sortieren der EGFP-positiven Klone kurz nach der Transfektion oder Picken von Einzelklonen nicht möglich, da die Zellen ohne Verbindungen zu anderen Zellen starben, was bereits durch zu dünne Aussäen hervorgerufen wurde. Zudem verloren die Zellen nach wenigen Tagen im Selektionsmedium die Fluoreszenz, so dass eine Expression der shRNA nicht mehr nachvollzogen, und grüne Einzelklone auch nicht in untransfizierte Zellrasen eingebracht werden konnten, und so ein Sterben der Zellen verhindert werden könnte. Um trotzdem den Einfluss der shRNA Expression auf die Proteinmenge messen zu können, wurden Zellen, welche normalerweise kein Dsg 2 bilden, mit gleichen Mengen Dsg 2 Expressionsvektor und unterschiedlichen Mengen der drei shRNA Plasmide co-transfiziert und die daraus gewonnenen Proteinextrakte im *Western Blot* analysiert. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes war es möglich, Reduktionen in der Dsg 2 Proteinmenge aufgrund der shRNA Expression zu detektieren. Des Weiteren wurde deutlich, dass die verschiedenen, ausgewählten siRNA Sequenzen zu unterschiedlich starkem *knock down* von Dsg 2 Protein führten. ShRNA1 mit Zielsequenz in Exon 4 der Dsg 2 mRNA führte kaum zum *knock down* von Dsg 2. Mit Unterschied zu shRNA1 führte Expression von shRNA2 und 3 zu drastischer Reduktion der Dsg 2 Proteinmenge. Mit abnehmender Konzentration des shRNA Vektors nahm im Fall der shRNA2 die Dsg 2 Proteinmenge wieder minimal zu. Bei shRNA3 konnte auch bei einer Konzentration von 0,5 µg transfiziertem shRNA Expressionsplasmid kein Dsg 2 Protein detektiert werden. Beide den shRNAs zugrunde liegenden siRNA Zielsequenzen liegen in Exon 9 der Dsg 2 mRNA. Für die Funktionalität einer shRNA spielen Stabilität und dreidimensionale Struktur von

shRNA und mRNA eine Rolle (Qiu *et al*, 2005; Schwarz *et al*, 2003; Tomari und Zamore, 2005).

Die hier in der Zellkultur erhaltenen Ergebnisse zeigen den *knock down* von Dsg 2 auf Proteinebene. Dies wurde durch transiente co-Transfektion eines Dsg 2 Expressionsvektors und den drei shRNA Plasmiden erreicht. Durch gleichzeitiges Einbringen von mRNA und shRNA in eine Zelle konnte die auf RNA-Ebene detektierte Herunterregulation von Dsg 2 mRNA in den konstitutiv Dsg 2 exprimierenden EpH4 Zellen auch auf Proteinebene bei transienten co-Transfektionen nachgewiesen werden. Verwendung eines shRNA Vektors, welcher nicht gegen Dsg 2 sondern gegen SCL (*stem cell leukemia*) gerichtet war, führte in der co-Transfektion nicht zu verminderten Dsg 2 Proteinmengen. Die Stärke der Bande auf dem *Western Blot* war nicht von der durch Transfektion mit Dsg 2 Plasmid allein transfizierten Zellen zu unterscheiden (Abb. 3.16). Dadurch wurde gezeigt, dass die reduzierte Dsg 2 Proteinmenge durch sequenzspezifischen Abbau der Dsg 2 mRNA hervorgerufen wurde.

4.3 Durch Verwendung des Expressionsvektors pSico kann Dsg 2 Cre/lox-induzierbar herunterreguliert werden

Ziel der Doktorarbeit war es, die Funktion von Dsg 2 mit Hilfe eines induzierbaren siRNA Mausmodells zu untersuchen. Um ein schaltbares System zu generieren, welches später in der Maus Anwendung finden konnte, wurde die siRNA2 Sequenz in einen Cre/lox-induzierbaren shRNA Expressionsvektor inkloniert (pSico; Ventura *et al*, 2004). Mit Hilfe dieses Vektors ist die Expression der shRNA zeitlich exogen regulierbar. Der pSico Expressionsvektor besitzt modifizierte *loxP sites*, die im Bereich des Polymerase III U6 Promoters und vor der shRNA Sequenz liegen, und eine Stop-Kassette, bestehend aus CMV Promoter und EGFP Sequenz, flankieren. So wird zunächst zwar EGFP exprimiert, was die Detektion der den Vektor tragenden Zellen ermöglicht, aber die Produktion der siRNA ist aufgrund der zwischen U6 Promoter und shRNA liegenden CMV/EGFP/Stop-Kassette blockiert. Erst durch Aktivierung/Expression von Cre Rekombinase wird die Rekombination zwischen den *loxP sites* katalysiert, wodurch die Stop-Kassette entfernt und die shRNA exprimiert werden kann. Dieses System eignet sich gut für die Anwendung

in der Maus, da bereits mehrere transgene Mauslinien existieren, welche Cre exogen induzierbar exprimieren (Casanova *et al*, 2002; Hayashi und MacMahon, 2002; Kellendonk *et al*, 1999; El Marjou *et al*, 2004; Metzger und Chambon, 2001). Für den *knock down* mittels pSico wurde die siRNA2 mit der Zielsequenz in Exon9/1 gewählt. Zum einen lieferte sie in den transienten Zellkulturversuchen einen reproduzierbaren und effizienten *knock down* sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene. Im pSico Vektor wird die shRNA mittels U6 Promoter exprimiert. Für die Expression einer funktionellen shRNA, die in der Zelle zur siRNA prozessiert wird, sollte die Wildtyp-Struktur des Promoters erhalten bleiben (Pebernard und Iggo, 2004; Tuschl, 2002; Yu *et al*, 2002). Das +1 Nukleotid ist in diesem Fall Guanin. Da die Sequenz der siRNA2 mit Guanin beginnt, schafft dies ideale Voraussetzungen für eine funktionelle siRNA und damit für den *in vivo knock down* von Dsg 2. Nach Integration des Dsg 2 shRNA Oligonukleotids in den Expressionsvektor pSico (siehe dazu 2.2.11 und 2.2.12) wurde dieser in der Zellkultur getestet, bevor es zur Generierung transgener *knock down* Mäuse kam. Der Vektor wurde zur Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette in Cre exprimierende Bakterien transfiziert (294-Cre; Buchholz *et al*, 1996) und die daraus gewonnene DNA in transienten Transfektionsexperimenten genutzt. Durch co-Transfektion der verschiedenen pSico Plasmide zusammen mit dem Dsg 2 Expressionsvektor konnte auch hier die *knock down* Effizienz auf Proteinebene mittels *Western Blot* getestet werden. Diese Versuche zeigten eine drastische Reduktion des Dsg 2 Proteins nach Deletion der CMV/EGFP/Stop-Kassette (Abb. 3.19). Der pSico Vektor ohne Dsg 2 shRNA und der pSico Vektor mit CMV/EGFP/Stop-Kassette hingegen führen in keinem Fall zu verminderten Dsg 2 Proteinmengen. Diese Versuchsergebnisse zeigten, dass die Sequenz der shRNA 2 auch in dem Cre/lox-induzierbaren Vektorsystem zu sequenzspezifischem Abbau der Dsg 2 mRNA und damit zu verminderten, in den Western Blot Experimenten nicht mehr detektierbaren Mengen von Dsg 2 Protein führen.

4.4 Durch Mikroinjektion des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Konstrukts werden induzierbare Dsg 2 *knock down* Mäuse generiert

Da die Integration eines Transgens bei der Generierung transgener Mäuse stochastisch erfolgt, wird die Expression des Transgens nicht nur durch den jeweiligen Promoter bestimmt, sondern auch von umgebenden DNA-Elementen wie Enhancern oder Silencern beeinflusst. Um die Expression der Dsg 2 shRNA weitgehend unabhängig gegenüber solchen Sequenzen zu machen, wurde der für die Expression der Dsg 2 shRNA notwendige Bereich des pSico Vektors in ein Plasmid mit humanen MAR (*matrix attachment region*)-Sequenzen subkloniert. Diese ursprünglich aus dem humanen Globingenloкус stammenden Sequenzen gehören zur Gruppe der Insulatoren. Sie grenzen das Transgen gegen die umgebende Chromatinstruktur weitgehend ab und ermöglichen damit eine vom Integrationsort unabhängige Funktionsweise (Fleenor *et al.*, 1993; Fukumura *et al.*, 1998). Nach erfolgreicher Klonierung der shRNA Expressionskassette in den Vektor mit Insulatorsequenzen wurde die DNA des Plasmids linearisiert und für die Mikroinjektion vorbereitet. Die gereinigte DNA wurde in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen mikroinjiziert und diese anschließend in scheinchwangere Mäuse transferiert. Die nach etwa 20 Tagen Tragezeit geborenen Nachkommen wurden mittels PCR genotypisiert und Ohrbiopsien der Mäuse für die Fluoreszenzanalyse genommen, um die Expression des Reportergens EGFP, welches in der CMV/EGFP/Stop-Kassette liegt, zu überprüfen. In drei der 69 *Founder*-Tiere wurde die Integration des pSicopInsu Dsg 2 shRNA Plasmids per PCR nachgewiesen und grüne Fluoreszenz in den Ohrbiopsien detektiert. Da ein Tier nach wenigen Wochen starb, blieben zwei *Founder*-Tiere und damit zwei Mauslinien für die Analyse. Mikroinjektion des Dsg 2 *knock down* Plasmids führte damit zu erfolgreicher Integration in das Mausgenom. Aufgrund der im *Foundertier* detektierten grünen Fluoreszenz kann gefolgert werden, dass zum einen die Expression des Transgens nicht durch die umgebende Chromatinstruktur reprimiert wurde und deshalb wahrscheinlich auch die shRNA nach erfolgter Cre Rekombination exprimiert werden kann. Ohne Cre Rekombination kam es nicht zur Expression der shRNA, da die positiv für das Transgen getesteten Tiere kein verändertes Aussehen im Vergleich mit Geschwistertieren zeigten und die F1

Generationen eine normale Mendel'sche Verteilungsfrequenz für das Transgen zeigte.

4.5 Behandlung mit Tamoxifen führt in doppelt transgenen pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER^{T2} Mäusen zum *knock down* von Dsg 2

Um die shRNA zu exprimieren, ist die durch Cre Rekombinase katalysierte Rekombination zwischen den loxP Elementen nötig. Da das Abschalten von Dsg 2 embryonal letal ist (Eshkind *et al*, 2002), wollten wir die Aktivität der Cre Rekombinase zudem zeitlich regulieren. Zur induzierbaren Expression der shRNA wurden die Dsg 2 *knock down* Mäuse mit den Tamoxifen induzierbaren Rosa26CreER^{T2} Tieren verpaart. Diese exprimieren in peripheren Organen ein Fusionmolekül (bestehend aus modifizierter Ligandenbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors und Cre Rekombinase), welches nach Bindung von Tamoxifen in den Zellkern transloziert und dort zur Rekombination zwischen loxP *sites* führt. Dadurch wird die CMV/EGFP/Stop-Kassette des Transgens entfernt, die shRNA codierende Sequenz kommt in physische Nähe des U6 Promoters, und wird transkribiert. Dazu wurden bitransgene pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER^{T2} Mäuse wiederholt für fünf aufeinander folgende Tage mit Tamoxifen behandelt (siehe dazu 2.2.27), um in möglichst vielen Zellen Cre Rekombinase zu aktivieren und damit die Produktion der shRNA zu induzieren. Nach vier bis fünf Behandlungszyklen wurden die Gewebe entnommen und Proteinextrakte daraus hergestellt, welche im *Western Blot* auf Dsg 2 Expression untersucht wurden. Zur Kontrolle auf adäquate Proteinmengen in den aufgetragenen Proben wurden die Membranen zusätzlich mit einem Antikörper behandelt, welcher gegen ein endogenes Gen gerichtet ist (p38 Kinase). Als Vergleichswert für die Dsg 2 Proteinmengen ohne induzierten *knock down* wurde für jedes Organ Proteinextrakt von Öl-behandelten, doppelt transgenen Mäusen parallel mitgeführt. Beide Linien zeigten nach Tamoxifen-Behandlung in den untersuchten Geweben (Leber, Darm, Niere, Haut und Herz) verschieden starke *knock down* Effizienz (Abb. 3.25), was mit den aus Untersuchung der Rosa26CreER^{T2} Maus gewonnenen Daten korrelierte, welche starke Zelltyp-spezifische Unterschiede der Reportergeninduktion zeigten (Abb. 3.4, Abb. 3.7 und Abb. 3.8). Nur durch Translokation des Fusionsmoleküls in

den Zellkern und die durch Cre katalysierte Rekombination zwischen den loxP *sites* kann die shRNA exprimiert und eine Reduktion der Dsg 2 Proteinmenge erreicht werden.

Die *knock down* Tiere der Linie 1 zeigten erkennbare Verminderung der Dsg 2 Proteinmenge in der Leber. Linie 2 zeigte in diesem Organ kaum Unterschiede in der Dsg 2 Expression, verglichen mit dem Proteinextrakt der Kontrolltiere. In der Niere ist für beide Linien keine Reduktion in der Dsg 2 Proteinmenge festzustellen. Sowohl in der Niere als auch der Leber wurde bei der Charakterisierung der Rosa26CreER^{T2} Maus mosaikartige Aktivität der Cre Rekombinase in etwa 10-15 % der Zellen detektiert. Damit ist in 85-90 % der Zellen dieser Gewebe Cre nicht aktiv, so dass es dort nicht zu ausreichender Expression der shRNA kommt und sich die Mengen an Dsg 2 mRNA und Protein damit nicht signifikant veränderten. In der Haut kommt es bei beiden Dsg 2 *knock down* Linien zu geringer Verminderung der Dsg 2 Proteinmenge. Aufgrund der im Vergleich mit anderen Geweben relativ starken β -Galaktosidasefärbung der Haut in Rosa26CreER^{T2}/R26R Tieren konnte auf hohe Aktivität der Cre Rekombinase in diesem Gewebe geschlossen werden. In der Haut werden neben Dsg 2 auch alle anderen Desmogleine zu unterschiedlichen Anteilen in den verschiedenen Schichten der Epidermis exprimiert (siehe dazu Abb. 1.2). Daher war die Haut als Zielorgan für einen möglichen Phänotyp durch Dsg 2 *knock down* eher zweitrangig. Es kann vermutet werden, dass bei geringen Abweichungen in den Proteinmengen die Funktion von Dsg 2 in der Haut von einem anderen Desmoglein, beispielsweise Dsg 3, welches in den unteren Schichten der Epidermis exprimiert wird, übernommen oder zumindest ausgeglichen wird. Anders gestaltet sich es bei Organen, in denen Dsg 2 das einzige exprimierte Desmoglein ist, z.B. Darm und Herz. Für Linie 1 ist im *Western Blot* eine drastische Reduktion, für Linie 2 eine geringere Verminderung, in den Dsg 2 Proteinmengen aus Extrakten von Darm und Herz zu sehen (Abb. 3.25). In diesen Organen konnte gleichfalls bei der Charakterisierung der Rosa26CreER^{T2} Maus in Verbindung mit X-Gal-Färbung eine starke Cre Aktivität festgestellt werden (siehe Abb. 3.4). Es liegt deshalb nahe, dass in Herz und Darm die Exzision der CMV/EGFP/Stop-Kassette und damit die Expression der Dsg 2 shRNA signifikant war. Diese wiederum reduzierte dort die Dsg 2 Proteinmengen. Die hier dargestellten *Western Blot* Ergebnisse zeigten deutlich, dass es durch Expression der Dsg 2 shRNA zu verminderten Dsg 2 Proteinmengen in Herz, Darm und auch in der Leber kommt. Die mit Öl anstelle von

Tamoxifen behandelten Kontrolltiere zeigen dagegen normale Expression des Proteins (Abb. 3.25). In den beiden generierten *knock down* Linien kam es zu unterschiedlich starker Herunterregulation von Dsg 2. Dies könnte mit dem Integrationsort des Transgens auf der DNA zusammenhängen, der trotz den Insulatorelementen, die das Transgen umgeben, Einfluss auf die Expressionsstärke ausüben könnte.

Um weiteren Einblick in die durch Dsg 2 *knock down* ausgelösten Veränderungen auf zellulärer Ebene zu bekommen, wurden Immunfärbungen der Leber von Tamoxifen-behandelten pSicopInsu Dsg 2 shRNA/Rosa26CreER^{T2} Mäusen durchgeführt. Die Kryostatschnitte wurden mit einem gegen Dsg 1 und 2 gerichteten Antikörper behandelt und zeigen die Desmosomen als punktartige Strukturen an den Zellgrenzen benachbarter Zellen. Im Vergleich mit einer Wildtyp Maus wurden in der Dsg 2 *knock down* Maus (Linie 1) weniger Desmosomen gebildet (Abb. 3.26). Dies bestätigt die Ergebnisse der *Western Blots* und zeigt zudem, dass verminderte Dsg 2 Proteinmengen, hervorgerufen durch die Expression einer sequenzspezifischen siRNA, in reduzierter Anzahl an Desmosomen resultieren. Der Begriff der Reduktion in Zusammenhang mit der Aktivität der siRNA wurde bewusst gewählt, da RNA Interferenz eher zu einer Herunterregulation als einem „Ausschalten“ des Zielproteins führt (Shi, 2002). Bei der Bewertung des Phänotyps muss diese Tatsache beachtet werden. Durch geringere Ausbildung von Desmosomen sollte sich der Kontakt zwischen den Zellen lockern und zu Verminderung der Gewebestabilität führen. Bei Verwendung der Rosa26CreER^{T2} Maus als Cre *Deleter* Mauslinie kann nicht in allen Zellen eines Gewebes die shRNA exprimiert werden, da die Aktivität der Cre Rekombinase mosaikartig ist und so in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark wirkt. In vielen Zellen wird somit Dsg 2 mRNA nicht abgebaut, so dass weiterhin ausreichend Desmosomen gebildet werden, welche die benachbarten Zellen eines Gewebes verknüpfen und durch Verankerung mit den Intermediärfilamenten Gewebestabilität vermitteln. Mit diesem Versuchsansatz konnte trotz der gewählten *Deleter*linie und der damit verbundenen Limitationen gezeigt werden, dass Expression der Dsg 2 shRNA zu Reduktion von Dsg 2 Protein und verminderter Desmosomenanzahl führt. Ein offensichtlicher Phänotyp war allerdings mit diesem Ansatz bisher nicht zu detektieren. Daher wurden Dsg 2 *knock down* Mäuse für eine weitere Analyse mit den VillinCreER^{T2} Mäusen verpaart,

welche induzierbar spezifisch im Darm Cre Rekombinase exprimieren, und so eine gezielte Analyse eines denkbaren Phänotyps ermöglichen.

4.6 Tamoxifen-behandelte pSicopInsu Dsg 2 shRNA/VillinCreER^{T2} Mäuse zeigen nach Induktion von *Colitis ulcerosa* Entzündungen und Tumore im Darm

Da gezeigt werden konnte, dass die Dsg 2 Proteinmengen in Dsg 2 *knock down* Mäusen reduziert und weniger Desmosomen zwischen den Zellen gebildet werden, wurde eine erste funktionale Untersuchung der pSicopInsu Dsg 2 shRNA Mäuse durch Induktion der chronischen und entzündlichen Darmerkrankung *Colitis ulcerosa* durchgeführt. Fukushima und Kollegen fanden eine Deregulation von Dsg 2 in Patienten mit *Colitis ulcerosa* (Fukushima *et al*, 2003), was Hinweis auf eine mögliche Rolle von Dsg 2 bei dieser Erkrankung gab. Um eine gezielte Reduktion von Dsg 2 spezifisch nur in dem die Krankheit betreffenden Organ (Darm) zu erzielen, und damit Sekundäreffekte, hervorgerufen durch *knock down* von Dsg 2 in nicht-Darmzellen, zu vermeiden, wurden die Dsg 2 *knock down* Mäuse zunächst mit VillinCreER^{T2} Mäusen verpaart, die im Darm Tamoxifen induzierbar Cre Rekombinase exprimieren (El Marjou *et al*, 2004). Die bitransgenen Mäuse wurden für fünf aufeinander folgende Tage mit Tamoxifen behandelt (siehe 2.2.27), um Cre zu aktivieren und so die Expression der Dsg 2 shRNA zu stimulieren. *Colitis ulcerosa* wurde anschließend durch einmalige Injektion von Azoxymethan (AOM, 7,4 mg/kg) gefolgt von einer Woche mit 3 % Dextransodiumsulfat (DSS) im Trinkwasser, induziert. Zwei und vier Wochen später erfolgten die endoskopischen Untersuchungen. Als Kontrolle waren doppelt transgene Mäuse mit Öl anstelle von Tamoxifen behandelt und im Parallelversuch für die *Colitis*-Induktion verwendet worden. Bereits drei Wochen nach AOM-Injektion war ein deutlicher Unterschied in der Morphologie der Darmmukosa im Vergleich der Tamoxifen induzierten Mäuse zur Kontrollgruppe zu erkennen. Die Tamoxifen-behandelten und damit die Dsg 2 shRNA exprimierenden Mäuse bildeten flächig wachsende Tumore in einer entzündeten Epithelumgebung. Die Darmmukosa war verdickt und das Wachstum der Tumore schritt mit der Zeit fort, was die spätere endoskopische Untersuchung (5 Wochen nach AOM-Injektion) zeigt. Bei den Kontrolltieren wurden erst in der

zweiten endoskopischen Untersuchung Tumore geringer Größe detektiert, die zudem seltener auftraten als die Tumore der Dsg 2 shRNA exprimierenden Mäuse. Die induzierte Entzündung befand sich bei den Kontrolltieren 3 Wochen nach AOM-Injektion in einer abheilenden Phase. Die Darmmukosa dieser Tiere war dünnwandig und mit vielen Blutgefäßen durchzogen (Abb. 3.27). Tumorbildung und Entzündungsstatus des Darmgewebes wurden nach vorgegebenen Kriterien bewertet (Becker *et al*, 2005) und für die erste endoskopische Untersuchung dokumentiert. Der *tumour score*, welcher Anzahl und Größe der detektierten Tumore wiedergibt, lag in den Kontrolltieren bei null, da zu diesem Zeitpunkt keine Tumore gewachsen waren. Im Gegensatz dazu entstanden bei Dsg 2 shRNA produzierenden Tieren Tumore der Größe 1 (gerade detektierbar) und 2 (nimmt 1/8 des Darmvolumens ein) in unterschiedlicher Anzahl. Der Entzündungsstatus, welcher als *colitis score* bezeichnet wird, ergab sich durch Bewertung von Dicke der Darmmukosa, vaskulären Veränderungen, Vorhandensein von Fibrin, Granularität der Mukosaoberfläche und Konsistenz des Stuhls. Der daraus resultierende Gesamtwert des *colitis score* war Maß für den Stand der Entzündung des Darmepithels. Die bereits verheilende Entzündung des Darmgewebes der Kontrollmäuse ergab Werte zwischen 2 und 4 während die der Tamoxifen-induzierten zwischen 6 und 13 lag. Diese Werte, zusammen mit den endoskopischen Bildern, zeigten eindeutig, dass es in Dsg 2 *knock down* Mäusen bereits nach einmaliger Induktion von *Colitis ulcerosa* zu starken Entzündungsreaktionen im Darm und Ausbildung von Tumoren kommt. Die flächige Ausbreitung der Tumore könnte durch verminderte Zelladhäsion und Gewebestabilität ausgelöst werden, die durch verringerte Desmosomenbildung resultierend aus dem *knock down* von Dsg 2 entsteht, und Hyperproliferation nach sich ziehen könnte. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass Transfektion von desmosomalen Komponenten (Dsg, Dsc und PG) in nicht-adhärenente Fibroblasten diese an Invasion auf dem Kollagengel hinderte (Tselepis *et al*, 1998). Des Weiteren wurde verminderte Desmosomenbildung bei schuppigen Zellkarzinomen (Davies *et al*, 1999; Garrod, 1995; Hardman *et al*, 2005), Deregulation der Expression von Dsg 2 in Zusammenhang mit Magenkarzinomen (Biedermann *et al*, 2005), und fehlende Dsg 2 Expression in Mammakarzinomen beobachtet (Davies *et al*, 1997). Diese Ergebnisse deuten alle auf eine Metastasen-Suppressor-Funktion desmosomaler Komponenten hin. Fehlende Desmosomenbildung, und damit Verlust der Zelladhäsion sowie der Zell-Zell-Kontakte, könnten daher in direktem

Zusammenhang mit Metastasierung und Ausbildung von Tumoren (Hyperproliferation) stehen.

Die Entzündung des Darmgewebes wird wahrscheinlich durch eindringende Bakterien verstärkt, welche die Epithelbarriere durch verminderte Zelladhäsion durchdringen können. In weiteren Experimenten sollten nun die Ursachen von Tumorbildung und Entzündung im Detail betrachtet und Folgen des Dsg 2 *knock downs* genau analysiert werden.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigt nicht nur erstmals den ursächlichen Zusammenhang zwischen Dsg 2 Expression und *Colitis ulcerosa/Colitis ulcerosa*-induzierter Tumorbildung, sondern ist das erste experimentelle Modell, welches die *Colitis ulcerosa*-assoziierte Tumorinduktion im Menschen, und was hier besonders interessant ist, den flachzellig wachsenden Tumortyp, in einem konditionalen Tiermodell rekapituliert.

Es ist zu erwarten, dass das im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Tiermodell in Zukunft viele wichtige Erkenntnisse über die Pathologie von Darmtumoren liefern wird und so unser Verständnis der *Colitis*-induzierten Tumorentstehung wesentlich verbessert wird.

5 Zusammenfassung

Desmosomen sind hoch organisierte adhäsive interzelluläre Verbindungen, die benachbarte Zellen durch Verankerung mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts miteinander verknüpfen und so Zellen und Geweben Stabilität verleihen. Die Adhäsionsmoleküle der Desmosomen sind die desmosomalen Cadherine. Diese transmembranen Glykoproteine gehen im Interzellulärraum Verbindungen mit den desmosomalen Cadherinen der Nachbarzelle ein und sind im zytoplasmatischen Bereich Anheftungspunkte für weitere an der Desmosomenbildung beteiligte Proteine.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von Desmoglein 2 (Dsg 2), einem in allen Epithelien exprimierten desmosomalen Cadherin. Da der konstitutive *knock out* von Dsg 2 embryonal letal ist, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine transgene Maus generiert, in der die Reduktion von Dsg 2 temporär regulierbar war (konditionaler *knock down*). Dazu wurde der Mechanismus der RNA Interferenz genutzt, wodurch Sequenz-spezifische, post-transkriptionelle Regulation von Genen möglich ist. Unter Verwendung eines über Cre/lox-induzierbaren Vektors wurden transgene Mäuse generiert, welche nach Induktion Dsg 2 shRNA exprimieren, die in der Zelle in siRNA umgewandelt wird und zum Abbau der Dsg 2 mRNA führt. Durch Verpaarung der generierten Dsg 2 *knock down* Maus mit der über Tamoxifen induzierbaren Cre *Deleter knock in* Mauslinie Rosa26CreER^{T2} konnte deutliche Reduktion der Dsg 2 Proteinmenge in Leber, Darm und Herz erreicht werden. In Immunfärbungen der Leber wurde zudem eine reduzierte Desmosomenbildung durch Expression der Dsg 2 shRNA detektiert. Die für diese Versuche generierte und getestete Rosa26CreER^{T2} Mauslinie ermöglichte jedoch nicht in allen Zellen eines Gewebes die komplette Aktivierung der Cre Rekombinase und damit die Expression der shRNA. Dadurch entstanden mosaikartige Wildtyp/*knock down*-Gewebe, in denen noch ausreichend Desmosomen gebildet wurden, um die Gewebestabilität und -struktur zu erhalten.

Für eine funktionale Untersuchung von Dsg 2 in Zusammenhang mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung *Colitis ulcerosa* wurden die Dsg 2 *knock down* Mäuse mit Darm-spezifischen, induzierbaren Cre *Deleter* Mäusen (VillinCreER^{T2}) verpaart. Nach Aktivierung der Cre Rekombinase mittels Tamoxifen wurde in bitransgenen Tieren über Gabe von Azoxymethan (AOM) und Dextransodiumsulfat

(DSS) *Colitis ulcerosa* induziert. Diese entzündliche Erkrankung des Darms ist mit der Induktion von Darmtumoren assoziiert. Bereits nach einmaliger Induktion mit AOM/DSS wurde in der ersten endoskopischen Untersuchung eine starke Entzündung des Darmgewebes und die Ausbildung von flächig wachsenden Tumoren in den Dsg 2 *knock down* Tieren hervorgerufen. In den Kontrolltieren wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt Tumore geringerer Größe und Frequenz beobachtet. Es ist anzunehmen, dass durch *knock down* von Dsg 2, und die damit verbundene verminderte Desmosomenbildung und Zelladhäsion, Infiltration von Bakterien durch die epitheliale Barriere des Darms möglich war, und so die Entzündungsreaktion in der Darmmukosa verstärkte. In Zusammenhang mit Verlust der epithelialen Festigkeit durch verringerte Zellkontakte kam es zur Hyperproliferation der Darmmukosa, die sich in Ausbildung von flächigen Tumoren äußerte. In weiteren Experimenten müssen nun die Tumore und das entzündete Gewebe der *Colitis*-induzierten Mäuse mittels Immunfluoreszenz untersucht werden, um Veränderungen in der Desmosomenformation *in situ* detektieren zu können. Des Weiteren sind Verpaarungen der Dsg 2 *knock down* Maus mit anderen Cre Rekombinase exprimierenden Mauslinien möglich, um den Einfluss von Dsg 2 auch in anderen Geweben, beispielsweise im Herzen, zu untersuchen.

Die hier vorgelegte Arbeit zeigt also erstmalig den ursächlichen Zusammenhang zwischen Dsg 2 und dem Auftreten von *Colitis*-assoziierten Tumoren in einem konditionalen RNAi-vermittelten *knock down* Tiermodell. Die Etablierung dieser Maus ist somit das erste konditionale Mausmodell, welches die bei vielen Krebspatienten gefundenen flachzellig wachsenden Tumore *in vivo* rekapituliert.

Vorausschauend kann man sagen, dass mit Hilfe des im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten Tiermodells wichtige Erkenntnisse über die Pathologie von Darmtumoren erbracht werden können, die unser Verständnis der *Colitis*-induzierten Tumorentstehung verbessern.

Summary

Desmosomes are highly organised inter-cellular adhesion junctions that connect neighbouring cells with each other and also provide additional mechanical reinforcement to the cell by anchoring the intermediate filaments of the cytoskeleton to the plasma membrane. The adhesion function of desmosomes is accomplished by the desmosomal cadherin molecules, transmembrane glycoproteins that interact through their extra-cellular domain with desmosomal cadherins of adjacent cells and through their inter-cellular domain with other desmosomal proteins.

As the desmosomal cadherin desmoglein 2 (Dsg 2), which is expressed in all epithelial cells, is embryonically lethal in knock out mice, the aim of this project was to generate transgenic knock down mice where the knock down of Dsg 2 is inducible (conditional knock down). To this end, the elegant method of RNA interference (RNAi) was used. RNAi allows for sequence specific and post-transcriptional down-regulation of protein expression. Employing a Cre/lox-inducible vector system, the transcribed shRNA specific for Dsg 2 will be processed to siRNA by the mouse cells and this will lead to the degradation of Dsg 2 mRNA and finally to a decrease in Dsg 2 protein level. We therefore generated a transgenic Dsg 2 siRNA mouse. The transcription of Dsg 2 specific shRNA was switched on by crossing the transgenic Dsg 2 shRNA mice with the Tamoxifen inducible Cre deleter knock in mouse-line Rosa26CreER^{T2}. The double-transgenic offspring showed significant decrease in the Dsg 2 protein levels in the liver, colon and heart. Although it was not possible to generate mice that expressed the Dsg 2 shRNA in all the cells of the organ by crossing with the Rosa26CreER^{T2} mice, mosaic wild-type/knock down tissue was observed, the liver of the offspring mice did show reduced desmosome formation as determined by immuno-fluorescence.

To determine the consequences of specifically knocking down Dsg 2 in connection with the inflammatory bowel disease *Colitis ulcerosa*, the transgenic Dsg 2 shRNA mouse was crossed with a colon-specific inducible Cre deleter mouse (VillinCreER^{T2}). Following activation of Cre recombinase by Tamoxifen-injection, *Colitis ulcerosa*, which is associated with colon tumour formation, was induced in double-transgenic mice via azoxymethane (AOM)/dextran sulphate sodium (DSS). A single induction with AOM/DSS in the double-transgenic mice led to a strong inflammatory response in the intestine as well as the formation of intestinal tumours

in Dsg 2 shRNA expressing mice. In control mice, tumour formation following AOM/DSS induction was observed in the second round of colonoscopy, with less big and less frequent tumours. The inflammation observed in the shRNA expressing mice can be explained by the decrease in the desmosomal adhesion function, bacteria can infiltrate the intestine tissue via the epithelial barrier and this will lead to inflammation. The increased tumour incidence can be explained via the decrease in cell contact inhibition, which might lead to hyper-proliferation of the colon mucosa, thereby, leading to plane tumours.

In future studies, the tumour and inflammatory tissue of the double-transgenic mice specific for colon Dsg 2 knock down can be examined by immuno-histochemistry, which should lead to a further understanding of how changes in desmosome formation *in situ* contributes to these conditions. Furthermore, crossing the transgenic Dsg 2 siRNA mouse with Cre recombination mice specific for other organ tissue knock down can teach us about the function of desmosomes in these tissues, for example in the heart.

This thesis shows, for the first time, the connection between Dsg 2 and the occurrence of *Colitis*-associated tumours. In order to show this, a novel mouse model was established, which is the first conditional mouse model where the tumour formation seen in many cancer patients is mirrored in an *in vivo* animal system. It is envisioned that this *in vivo* model will be used in future for answering questions relating to colon tumour pathology and to improve our knowledge of *Colitis*-induced tumour formation.

6 Literaturverzeichnis

- Alwine, J. C., Kemp, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G. R. & Wahl, G. M. (1979). Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol* 68, 220-42.
- Amagai, M., Matsuyoshi, N., Wang, Z. H., Andl, C. & Stanley, J. R. (2000). Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med* 6, 1275-7.
- Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107, 823-6.
- Angst, B. D., Marcozzi, C. & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily. *J Cell Sci* 114, 625-6.
- Armstrong, H., Hennies, C., Küster, W., Hughes, A. E., Arnemann, J., Leigh, I. M., McGrath, J. A., Kelsell, D. P. & Buxton, R. S. (2001). Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Eur J Human Genetics* 9, 197-203.
- Awad, M. M., Dalal, D., Cho, E., Amat-Alarcon, N., James, C., Tichnell, C., Tucker, A., Russell, S. D., Bluemke, D. A., Dietz, H. C., Calkins, H. & Judge, D. P. (2006). DSG2 Mutations Contribute to Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 79, 136-42.
- Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Kiesslich, R., Lehr, H. A., Galle, P. R. & Neurath, M. F. (2005). In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut* 54, 950-4.
- Bell, A. C., West, A. G. & Felsenfeld, G. (2001). Insulators and Boundaries: Versatile Regulatory Elements in the Eukaryotic Genome. *Science* 291, 447-50.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. (2001). Role of a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-66.
- Biedermann, K., Vogelsang, H., Becker, I., Plaschke, S., Siewert, J. R., Hofler, H. & Keller, G. (2005). Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. *J Pathol* 207, 199-206.
- Bonetta, L. (2004). RNAi: Silencing never sounded better. *Nature Methods* 1, 79-86.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72, 248-54.
- Brake, R. L., Simmons, P. J. & Begley, C. G. (2004). Cross-contamination with tamoxifen induces transgene expression in non-exposed inducible transgenic mice. *Genet Mol Res* 3, 456-62.
- Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L. & Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-4.
- Brocard, J., Feil, R., Chambon, P. & Metzger, D. (1998). A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res* 26, 4086-90.
- Bronson, S. K., Plaehn, E. G., Kluckman, K. D., Hagaman, J. R., Maeda, N. & Smithies, O. (1996). Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9067-72.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. (2002a). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-7.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. (2002b). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-3.
- Buchholz, F., Angrand, P. O. & Stewart, A. F. (1996). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* 24, 3118-9.
- Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A. & Morgan, R. A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 252, 95-105.
- Casanova, E., Fehsenfeld, S., Lemberger, T., Shimshek, D. R., Sprengel, R. & Mantamadiotis, T. (2002). ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain. *Genesis* 34, 208-14.
- Chang, H.-S., Lin, C.-H., Chen, Y.-C. & Yu, W. C. Y. (2004). Using siRNA Technique to Generate Transgenic Animals with Spatiotemporal and Conditional Gene Knockdown. *Am J Pathol* 165, 1535-41.
- Cheng, X., Den, Z. & Koch, P. J. (2005). Desmosomal Cell Adhesion in mammalian development. *Eur J Cell Biol* 84, 215-23.

- Chitaev, N. A., Leube, R. E., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Franke, W. W. & Troyanovsky, S. M. (1996). The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. *J Cell Biol* 133, 359-69.
- Chitaev, N. A. & Troyanovsky, S. M. (1997). Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 138, 193-201.
- Constien, R., Forde, A., Liliensiek, B., Grone, H. J., Nawroth, P., Hammerling, G. & Arnold, B. (2001). Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* 30, 36-44.
- Cowin, P. (1994). Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10759-61.
- Cowin, P. & Burke, B. (1996). Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol* 8, 56-65.
- Cowin, P., Mattey, D. & Garrod, D. (1984). Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'. *J Cell Sci* 70, 41-60.
- Czauderna, F., Santel, A., Hinz, M., Fechtner, M., Durieux, B., Fisch, G., Leenders, F., Arnold, W., Giese, K., Klippel, A. & Kaufmann, J. (2003). Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res* 31, e127.
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K. & McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* 8, 1323-6.
- Davies, E. L., Cochrane, R. A., Hiscox, S., Jiang, W. G., Sweetland, H. M. & Mansel, R. E. (1997). The role of desmoglein 2 and E-cadherin in the invasion and motility of human breast cancer cells. *Int J Oncol* 11, 415-19.
- Davies, E. L., Gee, J. M. W., Cochrane, R. A., Jiang, W. G., Sharma, A. K., Nicholson, R. I. & Mansel, R. E. (1999). The Immunohistochemical Expression of Desmoplakin and its Role In Vivo in the Progression and Metastasis of Breast Cancer. *Eur J Cancer* 35, 902-7.
- Den, Z., Cheng, X., Merched-Sauvage, M. & Koch, P. J. (2006). Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo. *J Cell Sci* 119, 482-89.
- el Marjou, F., Janssen, K. P., Chang, B. H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D. & Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39, 186-93.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-88.
- Eshkind, L., Tian, Q., Schmidt, A., Franke, W. W., Windoffer, R. & Leube, R. E. (2002). Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol* 81, 592-8.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D. & Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-90.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 752-7.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.
- Fisher, M. P. & Dingman, C. W. (1971). Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* 10, 1895-9.
- Fleenor, D. E. & Kaufman, R. E. (1993). Characterization of the DNase I hypersensitive site 3' of the human beta globin gene domain. *Blood* 81, 2781-90.
- Frank, J., Cserhalmi-Friedman, P. B., Ahmad, W., Panteleyev, A. A., Aita, V. M. & Christiano, A. M. (2001). Characterisation of the desmosomal cadherin gene family: Genomic organisation of two desmoglein genes on human chromosome 18q12. *Exp Dermatol* 10, 90-4.

- Fukushima, K., Yonezawa, H. & Fiocchi, C. (2003). Inflammatory Bowel Disease-Associated Gene Expression in Intestinal Epithelial Cells by Differential cDNA Screening and mRNA Display. *Inflamm Bowel Diseases* 9, 290-301.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E. C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K., Seed, B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94, 715-25.
- Gallicano, G. I. (2001). Composition, regulation, and function of the cytoskeleton in mammalian eggs and embryos. *Front Biosci* 6, D1089-108.
- Gallicano, G. I., Bauer, C. & Fuchs, E. (2001). Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature. *Development* 128, 929-41.
- Garrod, D., Chidgey, M. & North, A. (1996). Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr Opin Cell Biol* 8, 670-8.
- Garrod, D. R. (1995). Desmosomes and cancer. *Cancer Surv* 24, 97-111.
- Garrod, D. R. (1996). Epithelial development and differentiation: the role of desmosomes. The Watson Smith Lecture 1996. *J R Coll Physicians Lond* 30, 366-73.
- Garrod, D. R., Merritt, A. J. & Nie, Z. (2002a). Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation (Review). *Mol Membr Biol* 19, 81-94.
- Garrod, D. R., Merritt, A. J. & Nie, Z. (2002b). Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14, 537-45.
- Gaudry, C. A., Palka, H. L., Dusek, R. L., Huen, A. C., Khandekar, M. J., Hudson, L. G. & Green, K. J. (2001). Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 276, 24871-80.
- Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., Paul, M., Basson, C. T., McDermott, D. A., Lerman, B. B., Markowitz, S. M., Ellinor, P. T., MacRae, C. A., Peters, S., Grossmann, K. S., Drenckhahn, J., Michely, B., Sasse-Klaassen, S., Birchmeier, W., Dietz, R., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E. & Thierfelder, L. (2004). Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 36, 1162-4.
- Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618.
- Gloushankova, N. A., Wakatsuki, T., Troyanovsky, R. B., Elson, E. & Troyanovsky, S. M. (2003). Continual assembly of desmosomes within stable intercellular contacts of epithelial A-431 cells. *Cell Tissue Res* 314, 399-410.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-51.
- Grossmann, K. S., Grund, C., Huelsken, J., Behrend, M., Erdmann, B., Franke, W. W. & Birchmeier, W. (2004). Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol* 167, 149-60.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-57.
- Gumbiner, B. M. (1998). Propagation and localization of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8, 430-5.
- Guo, C., Yang, W. & Lobe, C.G. (2002). A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. *Genesis* 32, 8-18.
- Guo, H.-S., Fei, J.-F., Xie, Q. & Chua, N.-H. (2003). A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *The Plant Journal* 34, 383-92.
- Guo, S. & Kempfus, J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-20.
- Hall, I. M., Noma, K. & Grewal, S. I. (2002). RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 193-8.
- Hamilton, D. L. & Abremski, K. (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178, 481-6.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene-silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-6.
- Hanakawa, Y., Amagai, M., Shirakata, Y., Sayama, K. & Hashimoto, K. (2000). Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. *J Cell Sci* 113 (Pt 10), 1803-11.
- Hannon, G. J. & Rossi, J. J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-8.
- Hardman, M. J., Liu, K., Avilion, A. A., Merritt, A., Brennan, K., Garrod, D. R. & Byrne, C. (2005). Desmosomal cadherin misexpression alters beta-catenin stability and epidermal differentiation. *Mol Cell Biol* 25, 969-78.

- Hasuwa, H., Kaseda, K., Einarsdottir, T. & Okabe, M. (2002). Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 532, 227-30.
- Hayashi, S. & McMahon, A. P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244, 305-18.
- He, W., Cowin, P. & Stokes, D. L. (2003). Untangling Desmosomal Knots with Electron Tomography. *Science* 302, 109-13.
- Hennings, H. & Holbrook, K. A. (1983). Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res* 143, 127-42.
- Hong, C. S., Goins, W. F., Goss, J. R., Burton, E. A. & Glorioso, J. C. (2006). Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide in vivo. *Gene Therapy*, 1-12.
- Hosono, T., Mizuguchi, H., Katayama, K., Xu, Z. L., Sakurai, F., Ishii-Watabe, A., Kawabata, K., Yamaguchi, T., Nakagawa, S., Mayumi, T. & Hayakawa, T. (2004). Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum Gene Ther* 15, 813-9.
- Hu, Z., Bonifas, J. M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T. & Epstein, E. H., Jr. (2000). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* 24, 61-5.
- Huber, A. H., Nelson, W. J. & Weis, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90, 871-82.
- Huber, O. (2003). Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 60, 1872-90.
- Hunt, D. M., Sahota, V. K., Taylor, K., Simrak, D., Hornigold, N., Arnemann, J., Wolfe, J. & Buxton, R. S. (1999). Clustered cadherin genes: a sequence-ready contig for the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18. *Genomics* 62, 445-55.
- Hutvagner, G. & Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12, 225-32. (1999).
- Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J. M., Xiao, J. H., Chambon, P. & Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27, 4324-7.
- Ishii, K., Norvell, S. M., Bannon, L. J., Amargo, E. V., Pascor, L. T. & Green, K. J. (2001). Assembly of desmosomal cadherins into desmosomes is isoform dependent. *J Invest Dermatol* 117, 26-35.
- Jackson, A. L. & Linsley, P. S. (2004). Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet* 20, 521-4.
- Jahoda, A. E., Olson, M. K. & Kovacs, E. J. (2003). Murine model of peritoneal adhesion formation. *Methods Mol Med* 78, 141-8.
- Jahoda, C. A. (2003). Cell movement in the hair follicle dermis - more than a two-way street? *J Invest Dermatol* 121, ix-xi.
- Karlinger, K., Gyorke, T., Mako, E., Mester, A., Tarjan, Z. (2000). The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 35, 154-67.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherk, C. & Schutz, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol* 285, 175-82.
- Kemp, R., Ireland, H., Clayton, E., Houghton, C., Howard, L. & Winton, D. J. (2004). Elimination of background recombination: somatic induction of Cre by combined transcriptional regulation and hormone binding affinity. *Nuc Acids Res* 32, e92.
- Khyse-Andersen. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-9.
- Kieffer-Combeau, S., Meyer, J. M. & Lesot, H. (2001). Cell-Matrix interactions and cell-cell junctions during epithelial histomorphogenesis in the developing mouse incisor. *Int J Dev Biol* 45, 733-42.
- Kim, V. N. & Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *TRENDS in Genetics* 22, 165-73.
- Kissler, S., Stern, P., Takahashi, K., Hunter, K., Peterson, L. B. & Wicker, L. S. (2006). In vivo RNA interference demonstrates a role for Nramp1 in modifying susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Genet* 38, 479-83.
- Kitajima, Y. (2002). Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clin Exp Derma* 27, 684-90.

- Kljuic, A., Bazzi, H., Sundberg, J. P., Martinez-Mir, A., O'Shaughnessy, R., Mahoney, M. G., Levy, M., Montagutelli, X., Ahmad, W., Aita, V. M., Gordon, D., Uitto, J., Whiting, D., Ott, J., Fischer, S., Gilliam, T. C., Jahoda, C. A., Morris, R. J., Panteleyev, A. A., Nguyen, V. T. & Christiano, A. M. (2003a). Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 113, 249-60.
- Kljuic, A. & Christiano, A. M. (2003). A novel mouse desmosomal cadherin family member, desmoglein 1 gamma. *Exp Dermatol* 12, 20-9.
- Kljuic, A., Gilead, L., Martinez-Mir, A., Frank, J., Christiano, A. M. & Zlotogorski, A. (2003b). A nonsense mutation in the desmoglein 1 gene underlies striate keratoderma. *Exp Dermatol* 12, 523-7.
- Koch, P. J., Goldschmidt, M. D., Walsh, M. J., Zimbelmann, R. & Franke, W. W. (1991). Complete amino acid sequence of the epidermal desmoglein precursor polypeptide and identification of a second type of desmoglein gene. *Eur J Cell Biol* 55, 200-8.
- Koch, P. J., Mahoney, M. G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G. F., Whitaker-Menezes, D. & Stanley, J. R. (1997). Targeted Disruption of the Pemphigus Vulgaris Antigen (Desmoglein 3) Gene in Mice Causes Loss of Keratinocyte Cell Adhesion with a Phenotype Similar to Pemphigus Vulgaris. *J Cell Biol* 137, 1091-102.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M. & Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853-8.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. & Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6.
- Leder, B. Z., Leblanc, K. M., Longcope, C., Lee, H., Catlin, D. H. & Finkelstein, J. S. (2002). Effects of oral androstenedione administration on serum testosterone and estradiol levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5449-54.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H. & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051-60.
- Legan, P. K., Yue, K. K., Chidgey, M. A., Holton, J. L., Wilkinson, R. W. & Garrod, D. R. (1994). The bovine desmocollin family: a new gene and expression patterns reflecting epithelial cell proliferation and differentiation. *J Cell Biol* 126, 507-18.
- Lenox, J. M., Koch, P. J., Mahoney, M. G., Liebermann, M., Stanley, J. R. & Racide, G. L. (2000). Postnatal lethality of P-cadherin/desmoglein 3 double knock out mice: demonstration of a cooperative effect of these cell adhesion molecules in tissue homeostasis of stratified squamous epithelia. *J Invest Dermatol* 114, 948-52.
- Li, H., Li, W. X. & Ding, S. W. (2002). Induction and Suppression of RNA Silencing by an Animal Virus. *Science* 296, 1319-21.
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G. & Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 1686-90.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. E. (2000). Integrating Cells into Tissues. In *Molecular Cell Biology* 4th edit. (Freeman, W. H., ed.). Freeman, W. H. and Co, N Y.
- Lopez-Barahona, M., Fialka, I., Gonzalez-Sancho, J. M., Asuncion, M., Gonzales, M., Iglesias, T., Bernal, J., Beug, H. & Munoz, A. (1995). Thyroid Hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal polarized mammary epithelial cells. *Embo J* 14, 1145-55.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303, 95-8.
- Mahoney, M. G., Simpson, A., Aho, S., Uitto, J. & Pulkkinen, L. (2002). Interspecies conservation and differential expression of mouse desmoglein gene family. *Exp Dermatol* 11, 115-25.
- Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C. & Mathews, M. B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12, 5238-48.
- Marcozzi, C., Burdett, I. D., Buxton, R. S. & Magee, A. I. (1998). Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J Cell Sci* 111 (Pt 4), 495-509.
- McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. & Kay, M. A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-9.

- McGrath, J. A. (2005). Inherited Disorders of Desmosomes. *Aust J Dermatol* 46, 221-9.
- Mello, C. C. & Conte Jr, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338-42.
- Metzger, D. & Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24, 71-80.
- North, A. J., Bardsley, W. G., Hyam, J., Bornslaeger, E. A., Cordingley, H. C., Trinnaman, B., Hatzfeld, M., Green, K. J., Magee, A. I. & Garrod, D. R. (1999). Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci* 112 (Pt 23), 4325-36.
- North, A. J., Chidgey, M. A., Clarke, J. P., Bardsley, W. G. & Garrod, D. R. (1996). Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded distributions in bovine nasal epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7701-5.
- Nykanen, A., Haley, B. & Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-21.
- Oates, A. C., Bruce, A. E. & Ho, R. K. (2000). Too much interference: injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 224, 20-8.
- Ohsugi, M., Hwang, S. Y., Butz, S., Knowles, B. B., Solter, D. & Kemler, R. (1996). Expression and cell membrane localization of catenins during mouse preimplantation development. *Dev Dyn* 206, 391-402.
- Ota, T., Amagai, M., Watanabe, M. & Nishikawa, T. (2003). No involvement of IgG autoantibodies against extracellular domains of desmoglein 2 in paraneoplastic pemphigus or inflammatory bowel disease. *J Dermatol Sci* 32, 137-41.
- Ouvrard-Pascaud, A., Puttini, S., Sainte-Marie, Y., Athman, R., Fontaine, V., Cluzeaud, F., Farman, N., Rafestin-Oblin, M. E., Blot-Chaubaud, M. & Jaisser, F. (2004). Conditional gene expression in renal collecting duct epithelial cells: use of the inducible Cre-lox system. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F180-7.
- Ozawa, M., Terada, H. & Pedraza, C. (1995). The fourth armadillo repeat of plakoglobin (gamma-catenin) is required for its high affinity binding to the cytoplasmic domains of E-Cadherin and desmosomal cadherin Dsg2, and the tumor suppressor APC protein. *J Biochem* 118, 1077-82.
- Pal-Badhra, M., Leibovitch, B. A., Gandhi, S. G., Rao, M., Badhra, U., Birchler, J. A. & Elgin, S. C. R. (2004). Heterochromatin Silencing and HP1 Localisation in Drosophila Are Dependent on the RNAi Machinery. *Science* 303, 669-72.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-9.
- Pebernard, S. & Iggo, R. D. (2004). Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation* 72, 103-11.
- Pilichou, K., Nava, A., Basso, C., Beffagna, G., Bauce, B., Lorenzon, A., Frigo, G., Vettori, A., Valente, M., Towbin, J., Thiene, G., Danieli, G. A. & Rampazzo, A. (2006). Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 113, 1171-9.
- Polakis, P. (1995). Mutations in the APC gene and their implications for protein structure and function. *Curr Opin Genet Dev* 5, 66-71.
- Prawitt, D., Brixel, L., Spangenberg, C., Eshkind, L., Heck, R., Oesch, F., Zabel, B. & Bockamp, E. (2004). RNAi knock-down mice: an emerging technology for post-genomic functional genetics. *Cytogenet Genome Res* 105, 412-21.
- Preston, A. M., Lindsay, L. A. & Murphy, C. R. (2004). Progesterone treatment and the progress of early pregnancy reduce desmoglein 1&2 staining along the lateral plasma membrane in rat uterine epithelial cells. *Acta Histochemica* 106, 345-51.
- Price, A. B. & Morson, B. C. (1975). Inflammatory bowel disease: the surgical pathology of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Pathol* 6, 7-29.
- Pulkkinen, L., Choi, Y. W., Kljuic, A., Uitto, J. & Mahoney, M. G. (2003). Novel member of the mouse desmoglein gene family: Dsg1-beta. *Exp Dermatol* 12, 11-9.
- Pulkkinen, L., Ringpfeil, F. & Uitto, J. (2002). Progress in heritable skin diseases: molecular bases and clinical implications. *J Am Acad Dermatol* 47, 91-104.
- Qiu, S., Adema, C. M. & Lane, T. (2005). A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res* 33, 1834-47.
- Riggelman, R., Schedl, P., Wieschaus, E. (1990) Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is post-transcriptionally regulated by wingless. *Cell* 63, 549-60.

- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., Scott, M. L. & Van Parijs, L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33, 401-6.
- Ruiz, P., Brinkmann, V., Ledermann, B., Behrend, M., Grund, C., Vogel, F., Birchmeier, C., Gunthert, U., Franke, W. W. & Birchmeier, W. (1996). Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol* 135, 215-55.
- Ryo, A., Uemura, H., Ishiguro, H., Saitoh, T., Yamaguchi, A., Perrem, K., Kubota, Y., Lu, K. P. & Aoki, I. (2005). Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11, 7523-31.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY.
- Sauer, B. & Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-70.
- Schäfer, S., Koch, P. J. & Franke, W. W. (1994). Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalogue of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. *Exp Cell Res* 211, 391-9.
- Schäfer, S., Stumpp, S. & Franke, W. W. (1996). Immunological identification and characterisation of the desmosomal cadherin Dsg2 in coupled and uncoupled epithelial cell and in human tissues. *Differentiation* 60, 99-108.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. & Sanger, H. L. (1993a). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. Purification and physical properties. *J Biol Chem* 268, 11851-7.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. & Sanger, H. L. (1993b). RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J Biol Chem* 268, 11858-67.
- Schmelz, M., Duden, R., Cowin, P. & Franke, W. W. (1986). A constitutive transmembrane glycoprotein of Mr 165,000 (desmoglein) in epidermal and non-epidermal desmosomes. II. Immunolocalization and microinjection studies. *Eur J Cell Biol* 42, 184-99.
- Schwarz, S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P. D. (2003). Evidence that siRNAs Function as Guides, not Primers, in the Drosophila and Human RNAi Pathways. *Mol Cell* 10, 537-48.
- Schwenk, F., Kuhn, R., Angrand, P. O., Rajewsky, K. & Stewart, A. F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 26, 1427-32.
- Seibler, J., Zevnik, B., Kuter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heimann, C., Faust, N., Kauselmann, G., Schoor, M., Jaenisch, R., Rajewsky, K., Kuhn, R. & Schwenk, F. (2003). Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res* 31, e12.
- Shi, Y. (2002). Mammalian RNAi for the masses. *TRENDS in Genetics* 19, 9-12.
- Shimizu, A., Ishiko, A., Ota, T., Tsunoda, K., Amagai, M. & Nishikawa, T. (2004). IgG Binds to Desmoglein 3 in Desmosomes and Causes a Desmosomal Split Without Keratin Retraction in Pemphigus Mouse Model. *J Invest Dermatol* 122, 1145-53.
- Sijen, T. & Plasterk, R. H. (2003). Transposon silencing in the Caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi. *Nature* 426, 310-4.
- Skerrow, C. J. & Matoltsy, A. G. (1974). Isolation of epidermal desmosomes. *J Cell Biol* 63, 515-23.
- Smith, E. A. & Fuchs, E. (1998). Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* 141, 1229-41.
- Sorensen, D. R., Leirdal, M. & Sioud, M. (2003). Gene Silencing by Systemic Delivery of Synthetic siRNAs in Adult Mice. *J Mol Biol* 327, 761-6.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-1.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. & Vornlocher, H. P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-8.
- Stanley, J. R. (1995). Autoantibodies against Adhesion Molecules and Structures in Blistering Skin Diseases. *J Exp Med* 181, 1-4.
- Stegmeier, F., Hu, G., Rickles, R. J., Hannon, G. J. & Elledge, S. J. (2005). A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13212-7.

- Syed, S.-e.-H., Trinnaman, B., Martin, S., Major, S., Hutchinson, J. & Magee, A. I. (2002). Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J* 362, 317-27.
- Szittyá, G., Molnár, A., Silhavy, D., Hornyik, C. & Burgyan, J. (2002). Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14, 359-72.
- Thomas, P. S. (1980). Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5201-5.
- Tomari, Y. & Zamore, P. D. (2004). MicoRNA Biogenesis: Drosha Can't Cut It without a Partner. *Curr Biol* 15, R61-4.
- Tomari, Y. & Zamore, P. D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19, 517-29.
- Troyanovsky, S. M., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Krutovskikh, V. A., Leube, R. E. & Franke, W. W. (1994a). Identification of the plakoglobin-binding domain in desmoglein and its role in plaque assembly and intermediate filament anchorage. *J Cell Biol* 127, 151-60.
- Troyanovsky, S. M., Troyanovsky, R. B., Eshkind, L. G., Leube, R. E. & Franke, W. W. (1994b). Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10790-4.
- Tselepis, C., Chidgey, M., North, A. & Garrod, D. (1998). Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8064-9.
- Tuschl, T. (2002). Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20, 446-8.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. & Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13, 3191-7.
- Uprichard, S. L. (2005). The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett* 579, 5996-6007.
- Uprichard, S. L., Boyd, B., Althage, A. & Chisari, F. V. (2005). Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 773-8.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbid, S., Czubayko, F. & Aigner, A. (2004). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Therapy*, 1-6.
- Utomo, A. R., Nikitin, A. Y. & Lee, W. H. (1999). Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 17, 1091-6.
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M. T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F. C., Brummelkamp, T. R., Agami, R. & Clevers, H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 4, 609-15.
- Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B. & Fuchs, E. (1999). The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8551-6.
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C. P., McManus, M., Sharp, P. A., Van Parijs, L., Jaenisch, R. & Jacks, T. (2004). Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10380-5.
- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. & Martienssen, R. A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-7.
- Vooijs, M., Jonkers, J. & Burns, A. (2001). A highly specific ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that loxP recombination is position dependent. *EMBO Rep* 2: 292-7.
- Wallis, S., Lloyd, S., Wise, I., Ireland, G., Fleming, T. P. & Garrod, D. (2000). The alpha Isoform of Protein Kinase C Is Involved in Signaling the Response of Desmosomes to Wounding in Cultured Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* 11, 1077-92.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W. & Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13959-64.
- Whittock, N. V. (2003). Genomic Sequence Analysis of the Mouse Desmoglein Cluster Reveals Evidence for Six Distinct Genes: Characterisation of Mouse DSG4, DSG5, and DSG6. *J Invest Dermatol* 120, 970-80.
- Whittock, N. V., Bower, C. (2003). Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *J Invest Dermatol* 120, 523-30.
- Windoffer, R., Borchert-Stuhltrager, M. & Leube, R. E. (2002). Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci* 115, 1717-32.

- Yano, J., Hirabayashi, K., Nakagawa, S., Yamaguchi, T., Nowaga, M., Kashimori, I., Naito, H., Nitagawa, H., Ishiyama, K., Ohgi, T. & Irimura, T. (2004). Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7721-6.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-16.
- Yin, T. & Green, K. J. (2004). Regulation of desmosome assembly and adhesion. *Semin Cell Dev Biol* 15, 665-77.
- Yu, J.-Y., DeRuiter, S. L. & Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 6047-52.
- Zhao, Z., Cao, Y., Li, M. & Meng, A. (2001). Double-Stranded RNA Injection Produces Nonspecific Defects in Zebrafish. *Dev Biol* 229, 215-23.
- Zlotogorski, A., Marek, D., Horev, L., Abu, A., Ben-Amitai, D., Gerad, L., Ingber, A., Frydman, M., Reznik-Wolf, H., Vardy, D. A. & Pras, E. (2006). An autosomal recessive form of monilethrix is caused by mutations in DSG4: clinical overlap with localized autosomal recessive hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 126, 1292-6.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst zu haben, und dass außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln keine weiteren zur Anwendung kamen.

Dorothe Hameyer