

**Funktionsanalyse des Ets-Transkriptionsfaktors Elf3
im gastrointestinalen Trakt**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

Martina Protschka
geboren am 30.6.1965
in Wolfratshausen

Mainz, 2009

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 DER DARM	1
1.2 DIE ETS-FAMILIE	2
1.3 DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR ELF3	2
1.4 GENOMISCHE STRUKTUR UND PROTEINSTRUKTUR DES ELF3	3
1.5 EIN DOMINANT-NEGATIVER TRANSKRIPTIONSFAKTOR ELF3	4
1.6 KERATINEXPRESSION IM DARM	5
1.7 KERATIN 8/18 UND ELF3	6
1.8 CLAUDIN-7 UND ELF3	6
1.9 TGF-BETA REZEPTOR TYP II UND ELF3	7
1.10 ELF3 UND WECHSELWIRKUNG MIT ANDEREN PROTEINEN	8
1.11 KERATIN 20	10
1.12 DAS CRE/LOXP REKOMBINATIONS-SYSTEM	10
1.13 ZIELSETZUNG	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIALIEN	13
2.1.1 VERSUCHSTIERE	13
2.1.2 ZELLINIEN	13
2.1.3 ZELLKULTURMEDIEN	13
2.1.4 BAKTERIENSTÄMME	13
2.1.5 KLONIERUNGSVEKTOREN	14
2.1.6 EXPRESSIONSVEKTOREN	14
2.1.7 VERWENDETE PUFFER UND MEDIEN	15
2.1.8 OLIGONUKLEOTIDE	17
2.1.9 CHEMIKALIEN UND ENZYME	21
2.1.10 KITS UND ANTIKÖRPER	21
2.1.11 GERÄTE	22
2.1.12 SONSTIGE MATERIALIEN	23
2.1.13 COMPUTER UND SOFTWARE	24
2.2 METHODEN	25
2.2.1 PLASMID-DNA PRÄPARATION	25
2.2.2 DNA-RESTRIKTION UND KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	25
2.2.3 KONSTRUKTION DER EXPRESSIONSVEKTOREN	26
2.2.4 STABILE TRANSFEKTION HUMANER ZELLINIEN	27
2.2.5 FLUORESZENZMESSUNG	27
2.2.6 PRÄPARATION DER EXPRESSIONSVEKTOREN ZUR PRONUKLEUSINJEKTION	28

2.2.7	MIKROINJEKTION	28
2.2.8	ZUCHT UND SELEKTION TRANSGENER TIERE	28
2.2.9	AKTIVIERUNG DER CRE-REKOMBINASE	29
2.2.10	DNA-ISOLIERUNG AUS GEWEBE	29
2.2.11	POLYMERASEKETTENREAKTION ZUR BESTIMMUNG DES GENOTYPS	29
2.2.12	RNA ISOLIERUNG AUS GEWEBEN	29
2.2.13	REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASEKETTENREAKTION	30
2.2.14	<i>REAL TIME</i> -POLYMERASEKETTENREAKTION	30
2.2.15	WESTERN-BLOT ANALYSE	31
2.2.16	HÄMATOXILIN/EOSIN-FÄRBUNG	33
2.2.17	PERIODSÄURE-LEUKOFUCHSIN (PAS)-FÄRBUNG	33
2.2.18	ALCIANBLAU-FÄRBUNG NACH MOWRY	33
2.2.19	IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN	34
2.2.20	STATISCHE ANALYSEN	34
3.	ERGEBNISSE	35
3.1	EGFP-EXPRESSIONSVEKTOREN	35
3.1.1	STABILE TRANSFEKTION HUMANER ZELLINIEN	37
3.1.2	FLUORESZENZMESSUNG	38
3.1.3	GENERIERUNG UND ZUCHT EGFP TRANSGENER TIERE	39
3.1.4	DARMEPITHELSPZIFISCHE EXPRESSION DES TRANSGENS EGFP	39
3.2	DER EGFP ^{FLOX} /DNELF3-EXPRESSIONSVEKTOR UND TRANSGENE LINIEN	42
3.3	KONSTITUTIVES EXPRESSIONSSYSTEM	43
3.3.1	GENOMISCHE REKOMBINATION DURCH KONSTITUTIVE CRE-REKOMBINASEAKTIVITÄT	43
3.3.2	WURFGRÖÙE BEI VERPAARUNG VON TGEFLOXELF TIEREN MIT TGAKTINCRE MÄUSEN	45
3.3.3	NACHWEIS DER EXPRESSION VON EGFP UND DNELF3 AUF MRNA-EBENE	45
3.4	KONDITIONAL-INDUZIERBARES EXPRESSIONSSYSTEM	47
3.4.1	GENOMISCHE REKOMBINATION DURCH INDUZIERTER CRE-REKOMBINASEAKTIVITÄT	47
3.4.2	WURFGRÖÙE BEI VERPAARUNG VON TGEFLOXELF TIEREN MIT TGRSACREER-MÄUSEN	47
3.4.3	NACHWEIS DER EXPRESSION VON EGFP UND DNELF3 AUF MRNA-EBENE	49
3.4.4	GEWICHTSVERLUST UND MORTALITÄT NACH INDUZIERTER CRE-REKOMBINASE AKTIVITÄT	49
3.4.5	PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNG DER VILLUS-ARCHITEKTUR	52
3.4.6	BECHERZELLEN UND SCHLEIMPRODUKTION	54
3.4.7	NACHWEIS VON EGFP MITTELS QRT-PCR	54
3.4.8	NACHWEIS VON DNELF3 MITTELS QRT-PCR	56
3.4.9	NACHWEIS VON ENDOGENEM ELF3 MITTELS QRT-PCR	57
3.4.10	NACHWEIS VON ELF3 AUF PROTEINEBENE MITTELS IMMUN-HISTOLOGIE	58
3.4.11	VERMINDETE EXPRESSION DES PROTEINS CLAUDIN-7	59
3.4.12	EXPRESSION DES PROTEINS <i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA</i> REZEPTOR II	64
3.4.13	EXPRESSION DER PROTEINE KERATIN 8 UND KERATIN 18	65

4. DISKUSSION	67
4.1 REGULATORISCHE ELEMENTE DES K20-GENS UND DIE EXPRESSION VON EGFP IN.....	
ZELLKULTUR.....	67
4.2 REGULATORISCHE ELEMENTE DES K20-GENS UND DIE EXPRESSION VON	
TRANSGENEN IM MURINEN DARMEPITHEL	68
4.3 GENERIERUNG UND PHÄNOTYP TRANSGENER EGFP ^{FLOX} /DNELF3-MAUSLINIEN	69
4.4 KONSTITUTIVE EXPRESSION DES DOMINANT-NEGATIVEN TRANSKRIPTIONSFAKTORS ELF3.....	70
4.5 KONDITIONAL-INDUZIERBARE EXPRESSION VON DNELF3	71
4.6 PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNG DER VILLUS-ARCHITEKTUR.....	72
4.7 BECHERZELLEN UND SCHLEIMPRODUKTION	73
4.8 GEWICHTSVERLUST UND MORTALITÄT	75
4.9 EXPRESSION VON EGFP UND DNELF3	76
4.10 VORKOMMEN UND EXPRESSION VON CLAUDIN-7	77
4.11 EXPRESSION DES TGF-BETA REZEPTOR TYP II	79
4.12 EXPRESSION DER KERATINE K8 UND K18.....	81
4.13 ZUSAMMENFASSUNG.....	83
5. ABKÜRZUNGEN.....	84
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	86
7. LITERATUR	87
8. DANKSAGUNG	98

1. Einleitung

1.1 Der Darm

Der Darm ist der wichtigste Teil des gastrointestinalen Traktes und bewältigt die Nährstoff-, Wasser- und Elektrolytaufnahme. Er unterteilt sich in Dün- und Dickdarm. Der Dünndarm gliedert sich weiterhin in den Zwölffingerdarm (Duodenum), den Leerdarm (Jejunum) und den Krummdarm (Ileum). Die gesamte Dünndarmschleimhaut weist eine große Zahl von Darmzotten (*villi intestinales*) auf, die die Resorptionsoberfläche stark vergrößern.

Das einschichtige Darmepithel des Dünndarms bildet sich aus den resorptiven Enterozyten, den schleimsekretierenden Becherzellen, den enteroendokrinen Zellen und den Paneth Körnerzellen (Stappenbeck *et al.*, 1998). Die Enterozyten tragen auf der Lumenseite einen Bürstensaum aus fingerförmigen Membranfortsätzen, den Mikrovilli, die von Glykoproteinen umhüllt sind.

Da das Darmepithel starken chemischen und mechanischen Beanspruchungen durch Verdauungsprozesse und Peristaltik ausgesetzt ist, muss eine ständige Zellerneuerung erfolgen. Diese Zellerneuerung geht von den Krypten, der Basis der Villi aus. Die Krypten sind Einstülpungen des Epithels; hier sind pluripotente Stammzellen lokalisiert, die proliferative Progenitorzellen bilden (Potten and Loeffler, 1990).

Die Progenitorzellen wandern entlang der Krypten-Villus Achse nach oben. Bei Erreichen des Krypten-Villus Überganges stellen sie die Proliferation ein und beginnen zu differenzieren. Die differenzierenden Zellen wandern in Richtung Darmlumen und werden nach ca. 2-5 Tagen, bei Erreichen der Villusspitze, durch Verdrängung abgestoßen (Sancho *et al.*, 2004; Stappenbeck *et al.*, 1998). Die unter dem Epithel befindliche Bindegewebsschicht wird als Lamina propria bezeichnet. Hier finden sich, vor allem im Ileum, zahlreiche Lymphfollikel, die so genannten Peyer'schen Plaques.

Der Dickdarm gliedert sich in den Blinddarm (Caecum), den Grimmdarm (Colon) und den Mastdarm (Rektum). Im Dickdarm sind Krypten, aber keine Zotten vorhanden, es liegt eine grobe Faltung vor. Die Stammzellen befinden sich am Kryptenboden, proliferierende Progenitorzellen teilen sich in den unteren zwei Dritteln der Krypten, im oberen Drittel der Krypten beginnen die Zellen zu differenzieren (Sancho *et al.*, 2004).

Das mukosale Immunsystem setzt sich aus intraepithelialen Lymphozyten sowie den T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen der Peyer'schen Plaques und der Lamina propria zusammen (Murphy K. M., 2008; Neurath and Schurmann, 2000).

1.2 Die Ets-Familie

Ets (E *t* s *i* x)-Transkriptionsfaktoren bilden eine große Familie von Transkriptionsfaktoren und spielen funktionelle Rollen in vielen biologischen Prozessen. Benannt wurden die Ets-Transkriptionsfaktoren nach dem ersten Mitglied der Ets-Familie, dem viralen Onkogen v-Ets, das als Teil eines Fusionsproteins des transformierenden Retrovirus E26 Leukämie bei Vögeln verursacht. Auf die Beschreibung von v-Ets folgte die Charakterisierung des zellulären Proto-Onkogens c-Ets. Es zeigte sich, dass es sich bei c-Ets um einen Transkriptionsfaktor handelt.

Bis heute sind etwa 30 Mitglieder der Ets-Familie beschrieben, davon mehr als 20 in Säugetieren und 7 in *Drosophila* (Galang *et al.*, 2004; Laudet *et al.*, 1999; Oettgen *et al.*, 1999). Gemeinsam ist ihnen die konservierte Ets-Domäne, eine 85 Aminosäuren große DNA-Bindungsdomäne (Wasylyk *et al.*, 1993). Die Ets-Domäne hat eine *winged helix-turn-helix* Struktur, die spezifisch an Promotor-Sequenzen mit einem 5'-GGAA/T-3' -Kernmotiv bindet (Donaldson *et al.*, 1994; Donaldson *et al.*, 1996). Zur Ets-Familie gehören sowohl Transkriptions-Aktivatoren als auch -Repressoren. Daher spielen diese Faktoren eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen wie Gewebeentwicklung, Differenzierung, Proliferation und Transformation (Galang *et al.*, 2004; Oettgen *et al.*, 1999).

1.3 Der Transkriptionsfaktor Elf3

Der Transkriptionsfaktor Elf3 (*E74-like factor-3*) wurde 1997 als erster epithelspezifischer Transkriptionsfaktor der Ets-Familie beschrieben (Oettgen *et al.*, 1997). Mehrere Arbeitsgruppen arbeiteten an der Untersuchung des Transkriptionsfaktors und gaben ihm, Bezug nehmend auf Vorkommen und Struktur, verschiedene Namen wie ESE-1 (*epithelium-specific Ets*) (Oettgen *et al.*, 1997), jen (Andreoli *et al.*, 1997), ESX (*epithelial-restricted with serine box*) (Chang *et al.*, 1997), ERT (*Ets-related transcription factor*) (Choi *et al.*, 1998) und Elf3 (Oettgen *et al.*, 1999; Tymms *et al.*, 1997). Elf3 wird in vielen epithelialen Zelltypen exprimiert, unter anderem in Niere, Prostata, Dünndarm, Dickdarm, Eierstock, Pankreas, Leber und Plazenta. Besonders stark wird Elf3 im gastrointestinalen Trakt exprimiert, wobei Elf3 eine Rolle bei der terminalen Differenzierung der Epidermis spielt (Oettgen *et al.*, 1997; Oettgen *et al.*, 1999; Tymms *et al.*, 1997).

1.4 Genomische Struktur und Proteinstruktur des Elf3

Das humane Gen für Elf3 befindet sich auf dem Chromosom 1 und enthält 9 Exons, die eine Länge von ca. 5,8 kb auf der genomischen DNA überspannen. Das murine Elf3-Gen enthält ebenfalls 9 Exons, deren Größe weitgehend den humanen Exons entspricht. Auch die Intron/Exon-Übergänge sind überwiegend identisch zwischen humanem und murinem Gen. Lediglich das murine Intron 8 und Exon 9 sind deutlich kürzer als beim Menschen, dadurch ergibt sich eine genomische Ausdehnung des murinen Elf3-Gens von 4,8 kb (Oettgen *et al.*, 1997; Oettgen *et al.*, 1999; Tymms *et al.*, 1997).

Bei der Charakterisierung des humanen Elf3 wurden zwei alternative Spliceformen entdeckt, die sich durch ein zusätzliches Exon mit einer Basenlänge von 69 Nukleotiden unterscheiden. Die cDNA für die Splice-Variante a kodiert für ein 348 Aminosäuren großes Protein mit einer prognostizierten Molekülmasse von 39,3 kD. Die cDNA für die Splice-Variante b kodiert für ein 371 Aminosäuren großes Protein mit einer prognostizierten Molekülmasse von 41,4 kD (Oettgen *et al.*, 1997). Beim Vergleich von humanem und murinem Elf3 wurde eine Splice-Variante von murinem Elf3 entdeckt, die statt 371 Aminosäuren eine Größe von 391 Aminosäuren aufweist (Tymms *et al.*, 1997). Unabhängig davon wurde Elf3 als 371 Aminosäuren großes Protein mit einer Molekülmasse von 41 kD (Choi *et al.*, 1998) bzw. als 371 Aminosäuren großes Protein mit einer Molekülmasse von 42 kD beschrieben (Chang *et al.*, 1997).

Während das erste Exon nur die 5'-nicht translatierte Region und den Transkriptionsstart enthält, codiert Exon 3 für die so genannte *pointed domain*, die in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist. Exon 4 codiert für die Transaktivierungs-Domäne, sie bindet spezifisch an das TATA-Box bindende Protein (TBP) und interagiert mit Coaktivatoren. Exon 7 codiert für das *nuclear localisation signal* und die *AT hook domain*, eine putative DNA-Bindungs-Domäne, die in der kleinen Furche (*minor groove*) AT-reicher, doppelsträngiger DNA-Regionen bindet. Exon 8 und 9 codieren gemeinsam für die Ets-Domäne, die spezifisch an Promotor-Sequenzen mit einem 5'-GGAA/ T-3' Kernmotiv bindet (Abb. 1.1) (Chang *et al.*, 1999; Kopp *et al.*, 2007; Oettgen *et al.*, 1997).



Abb. 1.1 Die verschiedenen Domänen des Elf3 Proteins

Die *pointed domain* (PNT) ist für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich, die Transaktivierungs-Domäne (TAD) bindet spezifisch an das TATA-Box bindende Protein (TBP) und interagiert mit Coaktivatoren. C-terminal der Serin- und Asparaginsäure-reichen Domäne (SAR) befindet sich das *nuclear localisation signal* (NLS) und die *AT hook domain* (AT). Sie ermöglicht Bindungen an AT-reiche DNA-Regionen. Die Ets-Domäne bindet spezifisch an Promotor-Sequenzen mit einem 5'-GGAA/T-3'-Kernmotiv (Abbildung aus Kopp *et al.*, 2007).

Die Kernresonanzspektroskopie-Analyse der Ets-Domäne zeigt, dass sie drei α -Helices und vier β -Faltblätter in der Anordnung $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ enthält, die die räumliche Struktur *winged helix-turn-helix* ausbilden. Die dritte α -Helix ist verantwortlich für den Kontakt zur großen Furche (*major groove*) der DNA (Abb. 1.2) (Donaldson *et al.*, 1996; Kodandapani *et al.*, 1996).

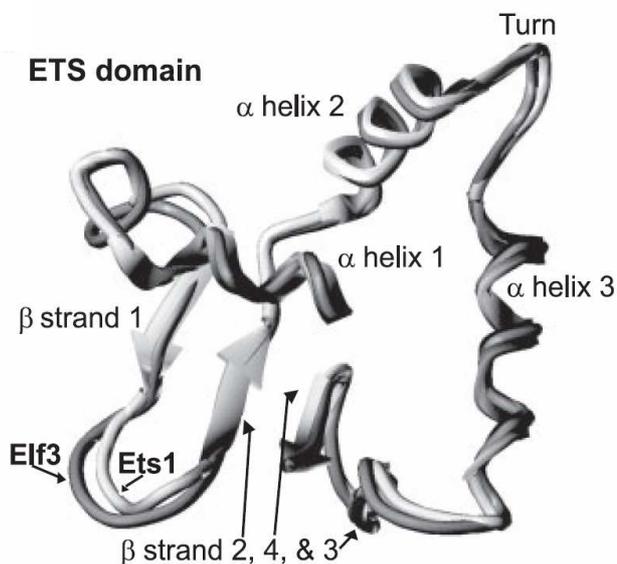


Abb. 1.2 Modell der Ets-Domäne

Das molekulare Modell der Ets-Domäne von Elf3 ist dunkelgrau dargestellt, die auf kristallographischen Daten basierende Struktur der Ets-Domäne von Ets1 ist weiß dargestellt. Das Modell zeigt drei α -Helices, vier β -Faltblätter und eine Wendung die zwischen Helix 2 und 3 liegt (Abbildung aus Kopp *et al.*, 2007).

1.5 Ein dominant-negativer Transkriptionsfaktor Elf3

Ein mutiertes Gen das in der Lage ist seinen zugehörigen Phänotyp in Gegenwart des Wildtyp-Genes zu manifestieren, gilt als dominant. Wird die Wildtyp-Genfunktion dabei inaktiviert, spricht man von einer dominant-negativen Mutante. Generell muss dabei die dominant-negative

Mutante eines Proteins intakte, funktionelle Domänen des Wildtyp-Proteins besitzen, ein Teil der Domänen muss jedoch fehlen oder so verändert sein, das sie nicht funktionell sind (Herskowitz, 1987).

Beim Transkriptionsfaktor Elf3 sind die Domänen, die von Exon 7-9 codiert werden, entscheidend für die Bindung an die Ziel-DNA. Domänen, die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind, werden von Exon 3 und 4 codiert (Chang *et al.*, 1999; Oettgen *et al.*, 1997). Fehlen diese Domänen, sollte der trunkierte Transkriptionsfaktor zwar in der Lage sein an die Ziel-DNA zu binden und diese für den Wildtyp-Transkriptionsfaktor zu blockieren, es sollte aber keine Bindung an das TBP bzw. Interaktionen mit Coaktivatoren stattfinden.

Die Untersuchung unterschiedlich stark verkürzter cDNA-Fragmente des murinen ELf3 in Expressionsvektoren und die Funktion der trunkierten Formen von Elf3 als dominant-negative Faktoren in der Zellkultur wurde bereits 2002 beschrieben (Kim *et al.*, 2002). Auch bei Ets2, einem anderen Mitglied der Ets-Familie, funktionierte eine trunkierte Mutante als dominant-negativer Faktor in der Zellkultur (Galang *et al.*, 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene, verkürzte cDNA des murinen Elf3-Gens enthält nur Exon 7 bis 9, die für DNA-Bindungsdomänen codieren. Das von der verkürzten cDNA kodierte, trunkierte Protein wird im Folgenden als dominant-negativer Transkriptionsfaktor Elf3 (dnElf3) bezeichnet.

1.6 Keratinexpression im Darm

Keratine sind wichtige Strukturproteine im Zytoskelett von Epithelzellen. Sie lassen sich aufgrund ihres Molekulargewichts und ihres isoelektrischen Punktes in die sauren Typ I- und die basischen Typ II-Keratine einteilen. Zu den Typ II-Keratinen gehören Keratin 1 bis Keratin 8, zu den Typ I- Keratinen Keratin 9 bis Keratin 20 (Hesse *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 1982).

Filamente werden aus sauren und basischen Keratinkomponenten im Verhältnis 1:1 gebildet. In den einfachen Epithelien des Darms werden vor allem die sauren Typ I-Keratine Keratin 18 (K18), Keratin 19 (K19), Keratin 20 (K20) und das basische Keratin 8 (K8) exprimiert. Die Aufgabe der Intermediärfilamente ist die Aufrechterhaltung der inneren Stabilität und Struktur der Zellen. Mit Ausnahme von K20 werden die genannten Keratine in allen Zellen des Darmepithels, den Enterozyten, den schleimsekretierenden Becherzellen und in den Zellen an der Kryptenbasis gleichmäßig stark exprimiert (Moll *et al.*, 2008; Moll *et al.*, 1990).

1.7 Keratin 8/18 und Elf3

Murines K8 (EndoA) ist ein basisches Typ II-Keratin und bildet mit murinem K18 (EndoB), einem Typ I-Keratin, Intermediärfilamente in zahlreichen einfachen Epithelialgeweben.

Das murine K8-Gen besitzt einen 3' gelegenen Enhancer mit mehreren Ets-Bindungsstellen. Im Versuch zeigte sich, dass der murine K8 Enhancer durch Ets-Proteine über Interaktion mit multiplen Ets-Bindungsstellen reguliert wird (Seth *et al.*, 1994).

Die mit der Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen zu extraembryonalem Entoderm assoziierte Induktion von K18 kann, neben verminderter negativer Regulation, auf eine Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie zurückgeführt werden. Dabei binden Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie an komplexe Enhancer-Elemente im ersten Intron des K18-Gens (Pankov *et al.*, 1994).

Eine gleichzeitig verstärkte Expression von Elf3 und K8 bzw. K18 wurde auch in verschiedenen Tumoren beobachtet. Bei einer cDNA Microarray-Analyse von Synovialsarkomen wurde bei biphasischen Synovialsarkomen eine signifikant gesteigerte Expression von Elf3 sowie Keratin 5, Keratin 7, K8 und Keratin 14 festgestellt (Allander *et al.*, 2002). Eine relative Expressions-Analyse von Brusttumoren zeigte eine erhöhte Expression von Elf3, K8 und K18 (Galang *et al.*, 2004). Diese Resultate sind konsistent mit den Ergebnissen von Oettgen, wonach K8 und K18 Ets-Bindungsstellen in ihren Promotoren aufweisen und somit mögliche direkte bzw. indirekte Zielgene von Elf3 darstellen (Oettgen *et al.*, 1997).

1.8 Claudin-7 und Elf3

Claudine sind wichtige Bestandteile der in Epithelien vorkommenden Zellverbindungen, den so genannten *tight junctions* (Abb. 1.3). *Tight junctions* können eine semipermeable, parazelluläre Barriere bilden, die den selektiven Durchgang von Ionen und Molekülen ermöglicht oder hermetische Barrieren formen, wie z. B. im Colon. Darüber hinaus verhindern *tight junctions* die Diffusion von Membranproteinen und Membranlipiden von der apikalen zur basolateralen Domäne und halten so die Zellpolarität aufrecht (Cereijido *et al.*, 2007; Kominsky *et al.*, 2003).

Claudine sind 20-27 kD große Transmembranproteine, die die Zellmembran vier Mal durchspannen, wobei N-Terminus und C-Terminus jeweils im Cytoplasma liegen. Die extrazellulären Bereiche formen zwei Schleifen (Furuse and Tsukita, 2006). Es wurden bis heute 24 Mitglieder der Genfamilie in Menschen und Mäusen beschrieben, deren Expression von Gewebe und Zelltyp abhängig ist (Fujita *et al.*, 2006). Eine veränderte Expression von Claudin-7

wurde bei zahlreichen Krebserkrankungen gefunden (Hewitt *et al.*, 2006; Kominsky *et al.*, 2003). Bei Synovialsarkomen konnte eine übereinstimmende Proteinlokalisierung von Claudin-7 und Elf3 festgestellt werden. In der Promotorregion von Claudin-7 befindet sich eine Ets-Bindungsstelle und die Bindung von Elf3 an diese Ets-Bindungsstelle wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitations-Test gezeigt. Die mRNA-Expression von Claudin-7 konnte in Zellkultur-Experimenten durch Elf3 induziert werden (Kohno *et al.*, 2006).

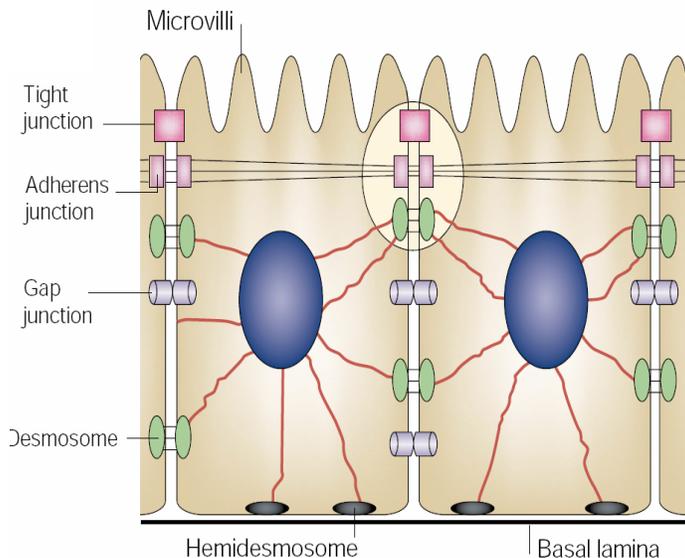


Abb. 1.3 Schematische Darstellung von Zellverbindungen in intestinalen Epithelzellen

Claudine sind wichtige Bestandteile der in Epithelien vorkommenden Zellverbindungen, den so genannten *tight junctions*. *Tight junctions* bilden eine Barriere zwischen der apikalen und der basolateralen Domäne der Zelle (Abbildung aus Tsukita *et al.*, 2001).

1.9 TGF-beta Rezeptor Typ II und Elf3

Transforming growth factor-beta (TGF-beta) ist ein pleiotropes Zytokin, das Wachstum und Differenzierung von Zellen, abhängig von deren Zelltyp und Aktivierungszustand, beeinflusst und eine kritische Rolle bei vielen Krankheiten spielt. TGF-beta zeigt komplexe Effekte auf Tumorwachstum und Metastasierung bei Krebserkrankungen und beeinflusst die Suppression des Immunsystems. TGF-beta vermittelt seine Wirkung über heterodimere TGF-beta Rezeptoren. Die TGF-beta Rezeptoren Typ I und Typ II (TGF-beta RII) sind transmembrane Serin/Threonin-Kinasen, die gemeinsam ein intrazelluläres Signal weiterleiten (Wan and Flavell, 2007; Wrzesinski *et al.*, 2007).

Elf3 kann die Expression des TGF-beta RII-Gens induzieren. Bei der Analyse des murinen TGF-beta RII-Promotors fanden sich zwei Ets-Bindedomänen, die eine Aktivierung durch Elf3 ermöglichen (Kopp *et al.*, 2004). Die Arbeitsgruppe um A. Ng generierte Mäuse mit einer Nullmutation von Elf3. Es wurde gezeigt, dass die Elf3 defizienten Epithelzellen des Dünndarms

eine gestörte Morphogenese und Differenzierung aufwiesen und im Duodenum deutlich reduzierte Mengen von TGF-beta RII exprimierten (Ng *et al.*, 2002). Durch Verpaarung mit Mäusen, die den TGF-beta RII spezifisch im Darmepithel überexprimieren, wurden doppeltransgene Tiere generiert, deren Dünndarm eine normale Morphologie zeigte. Schlussfolgernd wurde Elf3 als kritischer Regulator von TGF-beta RII im murinen Dünndarmepithel bezeichnet (Flentjar *et al.*, 2007).

Allerdings wurde experimentell nachgewiesen, dass Elf3 nicht das einzige Ets-Protein ist, welches die TGF-beta RII Expression reguliert. Im Rahmen der Untersuchung von Ets-Fusionsproteinen, die bei Ewing-Sarkomen auftreten, zeigte sich, dass zahlreiche Mitglieder der Ets-Familie die Expression des TGF-beta RII-Gens regulieren (Im *et al.*, 2000). Bei Versuchen mit F9 embryonalen Karzinomzellen wurde außerdem eine Abhängigkeit der Effekte vom Differenzierungsgrad der Zellen festgestellt. So stimulierte Elf3 den TGF-beta RII-Promotor in differenzierten F9 Zellen, jedoch nicht in undifferenzierten F9-Zellen (Kopp *et al.*, 2004).

1.10 Elf3 und Wechselwirkung mit anderen Proteinen

Bindungsstellen für Elf3 wurden in den Promotoren zahlreicher Gene gefunden. Bereits genannte Gene sind das *tight junction* Protein Claudin-7, der TGF-beta RII und K8/18. Bindungsstellen für Elf3 wurden in den Promotoren verschiedener SPRR (*small proline-rich protein*)-Proteine, die mit der terminalen Differenzierung von Keratinozyten verbunden sind, gefunden (Fischer *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2003).

Elf3 beeinflusst auch die Expression von Lysozym (LYZ), das eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr spielt (Lei *et al.*, 2007), die Expression des Chemokins *macrophage inflammatory protein-3 α* (MIP3 α /CCL20), welches vorwiegend extra-lymphoid, unter anderem im Dünndarm und Colon exprimiert wird (Kwon *et al.*, 2003) und die Expression des *human epidermal growth receptor 2* (Her2/neu/ErbB2), der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptoren gehört (Scott *et al.*, 2000).

Darüber hinaus aktiviert Elf3 die induzierbare Isoform der *nitric-oxide synthase* (NOS2) (Rudders *et al.*, 2001), beeinflusst die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), einem Enzym der Prostaglandinsynthese (Grall *et al.*, 2005), die Expression von Angiopoietin-1 (Ang-1) (Brown *et al.*, 2004) und die Expression des *autoimmune regulator* (AIRE), der die Expression von Selbst-Antigenen reguliert (Murumagi *et al.*, 2006) (Abb. 1.4).

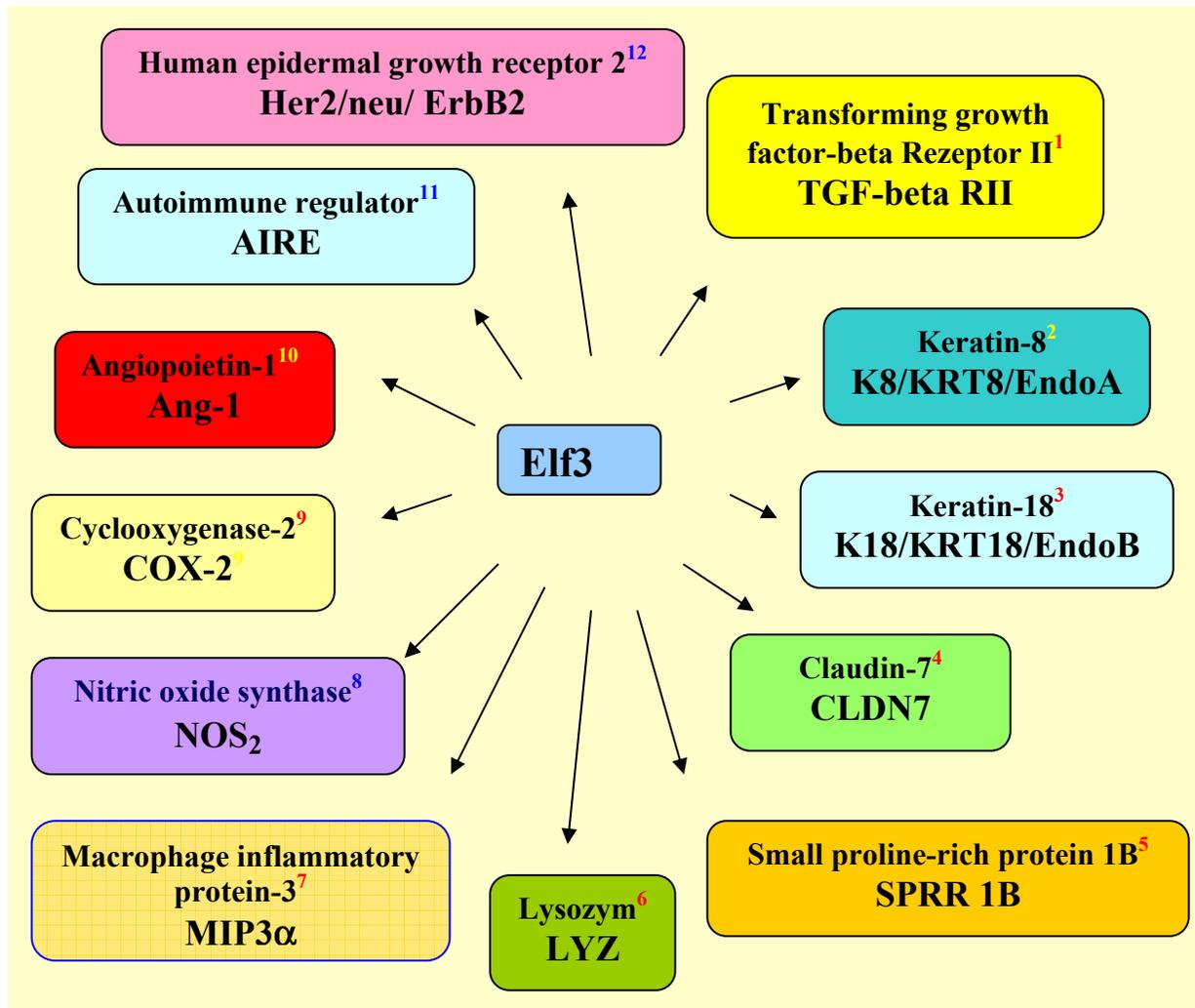


Abb. 1.4 Zielgene des Transkriptionsfaktors Elf3

1 Die Expression des Zytokin-Rezeptors *transforming growth factor-beta* Rezeptor II (TGF-beta RII) wird von Elf3 positiv reguliert ((Flentjar *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2002); **2** **3** K8 bildet mit K18 Intermediärfilamente im Darmepithel, beide Keratine besitzen Ets-Bindungsstellen in ihren Promotoren und sind mögliche direkte bzw. indirekte Zielgene von Elf3. Eine gleichzeitig verstärkte Expression von Elf3 und K8 bzw. K18 wurde in verschiedenen Tumoren beobachtet (Allander *et al.*, 2002; Galang *et al.*, 2004; Oettgen *et al.*, 1997); **4** Elf3 induziert die Expression des *tight junction* Proteins Claudin-7 (Kohnno *et al.*, 2006); **5** *Small proline-rich protein 1B* (SPRR1B) ist ein Differenzierungsmarker des Plattenepithels (Reddy *et al.*, 2003); **6** Das Enzyme Lysozym (LYZ) spielt eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr (Lei *et al.*, 2007); **7** Das Chemokin *macrophage inflammatory protein-3α* (MIP3α/CCL20) wird vorwiegend extra-lymphoid exprimiert, unter anderem im Dünndarm und Colon und wird durch proinflammatorische Stimuli hochreguliert (Kwon *et al.*, 2003); **8** Elf3 aktiviert die induzierbare Isoform der *nitric-oxide synthase* (NOS2) (Rudders *et al.*, 2001) **9** Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Enzym der Prostaglandinsynthese und spielt eine Rolle bei Entzündungsreaktionen (Grall *et al.*, 2005); **10** Angiopoietin-1 (Ang-1) spielt eine Rolle bei der Angiogenese (Brown *et al.*, 2004); **11** *Autoimmune regulator* (AIRE) reguliert die Expression von Selbst-Antigenen (Murumagi *et al.*, 2006); **12** *Human epidermal growth receptor 2* (Her2/neu/ ErbB2) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Scott *et al.*, 2000).

In vielen Fällen kooperieren Ets-Proteine mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*activating protein-1*), um ihre Zielgene zu transaktivieren (Wu *et al.*, 1994). Die Komplexität des regulatorischen Ets-Netzwerkes erhöht sich durch Heterodimerisierung (Kwiatkowski *et al.*, 1998) und/oder Phosphorylierung (Rabault and Ghysdael, 1994; Tootle and Rebay, 2005) sowie eine unterschiedliche zeitliche und räumliche Expression der Faktoren (Tymms and Kola, 1994). Die meisten Ets-Familienmitglieder können als monomerisches Protein an die DNA binden, ihre Aktivität bedarf jedoch der Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Sp1 (*specificity protein 1*), AP1 oder SRF (*serum response factor*) und wird durch signalabhängige Phosphorylierung reguliert, wie z. B. durch Signalwege, die das Proto-Onkogen Ras einschließen (Dittmer and Nordheim, 1998).

1.11 Keratin 20

K20 wird, wie K8, K18 und K19 im kompletten Intestinaltrakt exprimiert, jedoch ist es in anderen Organen wie z. B. der Leber und Niere nicht vorhanden. Starke Expression erfolgt in den Epithelien des Magens, des Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, und Colon. Außerhalb des Intestinaltraktes wird K20 nur noch in den Merkelzellen der Haut und im Urothel exprimiert. Mit immunhistologischen Untersuchungen von humanem, bzw. Ratten-Gewebe, konnte eine starke, einheitliche K20-Expression in den Epithelzellen der Darmzotten gezeigt werden, wohingegen die undifferenzierten Zellen der Krypten nur sehr schwache Expression zeigten bzw. K20 negativ waren. Beginnend mit der Differenzierung der Enterozyten bei Erreichen des Krypten-Villus Überganges bis zum Erreichen der Villusspitze ist die K20 Expression kontinuierlich stark vorhanden (Moll *et al.*, 2008; Moll *et al.*, 1990; Moll *et al.*, 1993).

1.12 Das Cre/loxP Rekombinations-System

Die Cre-Rekombinase (Cre: *causes recombination*; loxP: *locus of crossing over of P1 phage*) des Bakteriophagen P1 katalysiert die Rekombination zwischen zwei 34 Basenpaare langen loxP-Erkennungssequenzen. Die loxP-Erkennungssequenz enthält zwei 13 Basenpaare lange *inverted repeats*, die eine 8 Basenpaare lange, nichtpalindromische Kernregion flankieren, die der loxP-Erkennungssequenz eine Orientierung gibt. Wenn die loxP-Sequenzen in der gleichen Orientierung in das Genom integriert sind, kann durch die Cre-Rekombinase eine Deletion der loxP-flankierten (gefloxten) DNA Sequenzen erfolgen (Nagy, 2000). Auf diese Weise können gentechnisch in das Genom integrierte Reportergene oder Steuerelemente wieder entfernt

werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten TgAktinCre-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unabhängig vom Zelltyp und äußeren Einflüssen, es handelt sich also um eine konstitutive Expression (Munk, 2001).

Veränderungen des Genoms können die prä- und postnatale Entwicklung der betroffenen Organismen stören, Letalität oder stark reduzierte Lebenserwartung kann die Folge sein. Werden konventionelle Methoden zur Veränderung von Genen mit dem Cre/loxP-Rekombinationssystem kombiniert, ist eine gewebespezifische und/oder zeitlich steuerbare Modifikation des Genoms möglich (Rajewsky *et al.*, 1996).

Durch die Verwendung von Cre-Rekombinase transgenen Mäusen mit induzierbaren Systemen kann der Zeitpunkt der Rekombination beeinflusst werden. Wird die Cre-Rekombinase mit einer mutierten Östrogenrezeptor Liganden-Bindedomäne fusioniert, die das Östrogenanalogon Tamoxifen selektiv bindet, aktiviert erst die Gabe von Tamoxifen die Cre-Rekombinase. Das Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und Östrogenrezeptor Liganden-Bindedomäne, das sogenannte CreER, liegt an das *heat shock protein 90* gebunden als inaktiver Komplex im Zytoplasma vor. Erst nach Bindung des Liganden Tamoxifen dissoziiert der Komplex, CreER transloziert in den Kern und vermittelt die Rekombination von loxP-flankierten DNA-Abschnitten (Badea *et al.*, 2003; Feil *et al.*, 1996; Picard, 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten TgRosaCreER-Mäuse exprimieren das Fusionsprotein CreER. Erst nach der Gabe von Tamoxifen kommt es zur Rekombination und Expression des gewünschten Transgens, es findet also eine konditionale Expression statt (Badea *et al.*, 2003).

1.13 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Transkriptionsfaktor Elf3 im gastrointestinalen Trakt in Hinblick auf potentielle Zielgene und einen möglichen Einfluss auf die Morphologie des Darms zu untersuchen.

Elf3 hat für die Funktion des Darmepithels entscheidende Bedeutung. Von Elf3-Knockout-Mäusen sterben 30% der Tiere intrauterin. Von den lebend geborenen Tieren sterben mehr als die Hälfte in den ersten drei Lebenswochen. Diese Tiere zeigen pathologische Veränderungen des Epithels im Dünndarm, mit anormaler Morphogenese der Enterozyten und schleimsekretierenden Becherzellen (Ng *et al.*, 2002).

Elf3 ist ein Mitglied der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren und wird unter nicht-inflammatorischen Bedingungen spezifisch in epithelialen Zellen exprimiert (Oettgen *et al.*, 1997). Elf3 spielt eine Rolle bei der Aktivierung des TGF-beta RII (Kim *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002), ist jedoch auch ein potentieller Regulator anderer Zielgene wie Claudin-7 (Kohno *et al.*, 2006), K8 und K18 (Allander *et al.*, 2002; Oettgen *et al.*, 1997).

Zunächst sollten in Zellkultur mit humanen Colon-Karzinomzellen verschiedene Expressionsvektoren mit dem Reportergen EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*) auf ihre Expressioneffizienz getestet werden. Die Vektoren enthielten die potentiellen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 (*activating protein-2*) und Sp1 in kurzen Fragmenten in direkter Abfolge oder entsprechend ihrer Anordnung im *upstream* Bereich des K20-Gens.

Der EGFP-Expressionsvektor mit der stärksten Expression in der Zellkultur sollte zur Generierung transgener Mäuse genutzt werden. Die Funktionalität und Gewebespezifität der ausgewählten, potentiellen Enhancer- und Promotor-Fragmente konnte somit *in vivo* getestet werden.

In einem zweiten Mausmodell sollte unter Kontrolle der zuvor getesteten Enhancer- und Promotor-Fragmente eine verkürzte Variante von Elf3 als dominant-negativer Transkriptionsfaktor mittels Cre/loxP-System exprimiert werden. Zur Aktivierung der Elf3-Variante sollten die EGFP^{flox}/dnElf3 (TgEfloxElf)-Mäuse mit TgAktinCre-Mäusen (ubiquitäre, frühembryonale Expression der Cre-Rekombinase) und mit TgRosaCreER-Mäusen (Tamoxifen-induzierbare Expression) verpaart werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Der für die Herstellung transgener Mäuse verwendete Mausstamm (FVB/NHSD) entstammte der Zucht des Tierstalls der Zentralen Versuchstiereinrichtung des Hochhauses am Augustusplatz, Mainz. Die zur Aktivierung des dnElf3-Transgens verwendeten TgAktinCre Mäuse (FVB/N-TG(ACTB-cre)2MRT/J) besitzen einen FVB/NHSD Hintergrund und wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen (<http://jaxmice.jax.org/strain/003376.html>).

Die zur induzierbaren Aktivierung des dnElf3-Transgens verwendeten TgRosaCreER Mäuse (ROSA-cre/Esr1 (B6;129-Gt(Rosa)26Sor^{tm1(cre/Esr1)Nat}/J) haben einen C57BL/6;129/SvJ Hintergrund und wurden ebenfalls von Jackson Laboratory bezogen (<http://jaxmice.jax.org/strain/004847.html>).

2.1.2 Zelllinien

Für Transfektionsexperimente wurde die humane Zelllinie HT-29 (Humanes Colon Adenokarzinom, DSMZ Nr. ACC 299 (Fogh und Trempe, 1975)) von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) verwendet.

2.1.3 Zellkulturmedien

RPMI 1640, McCoy's 5A Media, steriles PBS und Antibiotika für die Zellkultur wurden von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), fötales Rinderserum von Vitromex (Selters), Accutase zum Ablösen von adhärenen Zellen bzw. AccuMax zum Lösen von Zell-Aggregaten von PAA Laboratories (Cölbe) bezogen.

2.1.4 Bakterienstämme

Um die in Plasmidvektoren klonierten DNA-Fragmente zu amplifizieren wurden die *Escherichia coli* Stämme top10, HB101 und JM105 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.1.5 Klonierungsvektoren

Für Klonierungen wurden das Derivat pBR322* des pBR322 (AatII/NdeI Fragment des pBR322 mit Polylinker aus pBluescript (Blessing *et al.*, 1993)) und pBluescript (Stratagene, CA, USA) genutzt.

2.1.6 Expressionsvektoren

Das Derivat pBR322* des pBR322 wurde als Vektorgerüst verwendet. Die Expressionsvektoren enthielten ein beta-Globin Intron des Kaninchens (GenBank Accession Nr. V00878; Position 570-1142), die cDNA für EGFP mit Kozak-Sequenz (GenBank Accession Nr. U55762; Position 661-1414) und das Polyadenylierungssignal (pA) des humanen Wachstumshormons (GenBank Accession Nr. J03071; Position 6699-7322). Das beta-Globin Intron des Kaninchens war 5' flankiert von 18 Basen des zweiten Exons (GenBank Accession Nr. V00878; Position 552-569) die als Primer-Bindestellen für die PCR verwendet wurden.

Der Vektor pEGFP-N1 wurde von Clontech (Palo Alto, CA, USA) bezogen. Das beta-Globin Intron des Kaninchens und das Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons wurden aus Vektoren, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Blessing zur Verfügung standen, entnommen.

Es wurden verschiedene putative Enhancer- und Promotor-Fragmente des humanen K20-Gens inkloniert: das Promotor-Fragment F1 des K20-Gens (GenBank Accession Nr. X73501; Position 4391-4886), sowie die putativen Enhancer-Fragmente F6 (GenBank Accession Nr. AC004231; Position 52622-52875), F5 (GenBank Accession Nr. AC004231; Position 58014-58289), F4 (GenBank Accession Nr. AC004231; Position 62144-62470), F3 (GenBank Accession Nr. X73501; Position 3642-4886) und F2 (GenBank Accession Nr. X73501; Position 3642-3894). Die putativen Enhancer-Fragmente stammten aus dem PAC Klon RP5-1110E20 (GenBank Accession Nr. AC004231), der freundlicherweise von Herrn Prof. Hankeln, Institut für Genetik der Universität Mainz, zur Verfügung gestellt wurde.

Die loxP-Sequenzen aus dem Bakteriophagen P1 wurden aus dem *targeting*-Vektor TV(=A) (Jahnen-Dechent *et al.*, 1997) gewonnen. RNA aus murinem Darm diente zur Herstellung einer verkürzten Elf3-cDNA.

2.1.7 Verwendete Puffer und Medien

DNA-Auftragspuffer	60% Glycerin (v/v) 100 mM EDTA 100 mM Tris-HCl; pH 7,5 0,1% Orange G (w/v)
DNA/RNA-Hybridisierungspuffer	500 mM NaP _i ; pH 7,2 7% SDS (w/v) 1% BSA (w/v) 1 mM EDTA
10x DNase Puffer	1 M Na-Acetat; pH 5,5 0,05 M MgCl ₂
3x Protein-Auftragspuffer	6% SDS (w/v) 15% β-Mercaptoethanol (v/v) 30% Glycerin (v/v) 188 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,005% Bromphenolblau (w/v)
10 x Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE	144 g/l Glycin 30 g Tris-Base 1% SDS
1%ige Eosin Y Lösung	1 g Eosin Y Dinatrium-Salz 100 ml 70% Ethanol 1 Tropfen Essigsäure
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Yeast 10 g/l NaCl auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren
LB-Agar	LB-Medium plus 15 g/l Agar

10 × MOPS-Puffer	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
10 x PBS	80 g/l NaCl 11,6 g/l Na ₂ HPO ₄ 2 g/l KCl 2 g/l KH ₂ PO ₄ auf pH 7,0 einstellen
PBST	PBS 0,05% Tween
Proteinase K-Puffer	200 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 10 mM EDTA 0,2% SDS (w/v)
Protein-Lysis-Puffer	150 mM NaCl 30 mM Tris-HCl, pH 7,5 5 mM EDTA 1 mM Na ₃ VO ₄ 1% Igepal CA 630 (v/v)
50 × TAE Elektrophorese-Puffer	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA auf pH 8,0 einstellen
10x TBS	80 g/l NaCl 30 g/l Tris-Base 2 g/l KCl auf pH 7,4 einstellen
TBST	TBS 0,05% Tween

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TNT-Puffer	0,1 M Tris-HCl pH 7,5 0,15 M NaCl 0,05% Tween 20 (v/v)
Transferpuffer Western-Blot	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037% SDS (w/v) 20% Methanol
Zitronensäurepuffer pH 6,0	450 ml 0.1 M Natriumcitrat (pH 8,6) 50 ml 0.1 M Zitronensäure (pH 1,9)

2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) für Klonierungen, zur Genotypisierung der Versuchstiere, zum Nachweis der genomischen Rekombination und für Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) bzw. quantitative *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)-Analysen wurden von biomers.net (Ulm), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Metabion (Martinsried) oder MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Oligonukleotide für die Klonierung der EGFP-Expressionsvektoren:

<u>F4/Sall</u>	5'-CAG TCG ACC CAA GTA GTT GGG AAT-3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 62144-62159
<u>F4rev/AvrII</u>	5'-GAC CTA GGG TCA CAC TGG ATT AG-3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 62470-62456
<u>F5/HindIII</u>	5'-CTA AGC TTT GTT CTC TCT CAT AAG-3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 58014-58029
<u>F5rev/Sall</u>	5'-CAG TCG ACG TAG CCT TCA CAT TCC-3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 58289-58274
<u>F6/NheI</u>	5'-CAG CTA GCG GTC TCG ATC TCT TG-3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 52622-52636

<u>F6rev/HindIII</u>	5'-CTA AGC TTT <u>TAC AGT GAG ATA GGT</u> -3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 52875-52860
<u>F2/F3/AvrII</u>	5'-GAC CTA GG <u>T CTA ATT AAC TAA GGA AG</u> -3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 77507-77524
<u>F2/F3/SbfI_AvrII</u>	5'-GAC CTA GG CCT GCA GGT <u>CTA ATT AAC TAA GGA AG</u> -3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 77507-77524
F2rev/BamHI	5'-CTG GAT CCC <u>ACA GCG AGA GTG G</u> -3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 77759-77746
<u>F3rev/NheI</u>	5'-GTT GAG CTA GCC <u>TTT TAT GAA GTC</u> -3' GenBank Accession Nr. X73501; Position 4812-4800
CK5	5'-GAG ATC TAG AAG CTT GTC GAC CTA GGA TCC GCG <u>GAA</u> <u>ACA GAG GTT CTG AAG AGC</u> -3' GenBank Accession Nr. X73501, Position 4391-4411
CK3	5'-GAG AGT CGA CAG ATC TCG <u>CGA TTC CAG GAG GGA GC</u> GenBank Accession Nr. X73501, Position 4886-4871

Oligonukleotide für die Klonierung des EGFP^{lox}/dnElf3-Expressionsvektors:

SpeKozATG	5'-GCT ACT AGT CGC CAC CAT GGA TG <u>ACTT TAC</u> TGA CTA T-3' GenBank Accession Nr. NM_007921; Position 786-803 Die markierten Basen weichen von der veröffentlichten Sequenz ab, siehe Ergebnisse Punkt 3.2
MMElfRSpe	5'-GCA CTA GTT <u>TAA TTC CGA CTC TCT CCA ACC TCT</u> -3' GenBank Accession Nr. NM_007921; Position 1214-1190
loxP_Hind_Sma	5'-AGCTT <u>A</u> ACTTCGTATAGCATA <u>C</u> ATTATACGAAGTTAT <u>C</u> CCC-3' GenBank Accession Nr. CR847878; Position 159-126
loxP_Sma_Hind	5'-GGG <u>A</u> TA <u>A</u> CTTCGTATAATGTATGCTATA <u>C</u> GAAGTTATA-3' GenBank Accession Nr. CR847878; Position 126-159

Oligonukleotide für die Genotypisierung der transgenen Foundertiere und Nachkommen:

FouIde 10	5'-GGT AGG GAT CAT GGT GGG TA-3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 52214-52233
-----------	--

Foulde 2	5'-CAA ACG AGC ACG TGA ATC C-3' GenBank Accession Nr. AC004231; Position 52761-52743
Foulde 3	5'-AGG GAA GCA AGT GAC TCA GG-3' GenBank Accession Nr. X73501; Position 3713-3732
Foulde 4	5'-CCA CAG GCA AGA AAC TCC TC-3' GenBank Accession Nr. X73501; Position 4800-4781
Cre for	5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3' GenBank Accession Nr. XO3453; Position 726-748
Cre rev	5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3' GenBank Accession Nr. XO3453; Position 997-977

Oligonukleotide für die interne Kontrolle:

TCRfor	5'-CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG-3' GenBank Accession Nr. AE008686; Position 375845-375864
TCRrev	5'-GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT-3' GenBank Accession Nr. AE008686; Position 376050-376031

Oligonukleotide zum Nachweis der Rekombination auf genomischer Ebene, für die RT-PCR und qRT-PCR:

beta-Globin Ex 2	5'-GAT CCT GAG AAC TTC AGG-3' GenBank Accession Nr. V00878; Position 552-569
CK20 RT-II	5'-AGC TAC AGG TGC TCC CTC CT-3' GenBank Accession Nr. X73501; Position 4861-4880
EGFPprev	5'-GCA TCG ACT TCA AGG AGG AC-3' GenBank Accession Nr. U55762; Position 1080-1061
EGFPprev3	5'-AAC AGC TCC TCG CCC TTG-3' GenBank Accession Nr. U55762; Position 704-687
Elf3rev	5'-CTC GGA TAA ACT CCC ACA GG-3' GenBank Accession Nr. NM_007921; Position 939-920

Elf3rev2	5'-CTC TTC TTG CCC TCC AGA CA-3' GenBank Accession Nr. NM_007921; Position 895-876
rbGl	5'-CTG GTC ATC ATC CTG CCT TT-3' GenBank Accession Nr. V00878; Position 1014-1033
HPRTfor	5'-AGC TAC TGT AAT GAT CAG TCA ACG-3' GenBank Accession Nr. NM_013556; Position 397-420
HPRTrev	5'-AGA GGT CCT TTT CAC CAG CA-' GenBank Accession Nr. NM_013556; Position 594-575
eElf3Ex6for	5'-GGT GGA AGT GAT GTG GAC CT-3' GenBank Accession Nr. NM_007921; Position 735-754
eElf3Ex8rev	5'-CTC GGA TAA ACT CCC ACA GG-3' GenBank Accession Nr. NM_007921; Position 939- 920
CLDN-7 for	5'-TGA TGA GCT GCA AAA TGT ACG-3' GenBank Accession Nr. NM_0168873; Position 608-628
CLDN-7rev	5'-GCC TTC TTC GCT TTG TCA TC-3' GenBank Accession Nr. NM_0168873; Position 773-754
TRII for	5'-CCA TTG TTC ACA GGG ACC TC-3' GenBank Accession Nr. NM_009371; Position 1448-1467
TRII rev	5'-CGA CTC CAC GTT TTC CAG AT-3' GenBank Accession Nr. NM_009371; Position 1650-1631
KRT8 for	5'-GCA CTC AGG AGA AGG AGC AG-3' GenBank Accession Nr. XR_004919; Position 312-331
KRT8-rev	5'-GGC GGA GGT TGT TGA TGT AG-3' GenBank Accession Nr. XR_004919; Position 494-475
KRT18 for	5'-GAC TGG GGC CAC TAC TTC AA-3' GenBank Accession Nr. BC08922; Position 377-396
KRT18 rev	5'-GCC TCG ATT TCT GTC TCC AG-3' GenBank Accession Nr. BC08922; Position 618-599

2.1.9 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AGS (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Biozym (Hess. Oldendorf), Boehringer Mannheim (Mannheim), Difco (Detroit, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.10 Kits und Antikörper

Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde mit dem 'NucleoSpin Plasmid Kit' von Machery-Nagel (Düren) und den Plasmid Midi- und Maxi-Präparations-Kits von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Aufreinigung der Injektions-DNA für die Pronukleusinjektion erfolgte mit dem 'Gene Clean Spin Kit' von Qbiogene (Heidelberg). DNA-Fragmente wurden mit dem DNA Ligations-Kit von TaKaRa Biomedicals (Japan) ligiert.

Die Herstellung von cDNA für die RT-PCR und die qRT-PCR erfolgte mit dem 'RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit' der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Rot). Die qRT-PCR wurde mit dem 'iQTMSYBR[®] Green Supermix' der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Die Signaldetektion bei Western-Blots erfolgte mit 'ECL plus Western Blotting Detection System' von Amersham Biosciences (Freiburg), oder 'Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate' von Pierce (Rockford, USA).

Für Western-Blot Analysen und immunhistologische Untersuchungen wurden die folgenden Antikörper verwendet:

Anti-Claudin-7 aus Ziege (Art.-Nr. sc-17670, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), Anti-EGFP aus Kaninchen (Art.-Nr. 8367, Clontech, Palo Alto, USA), Anti-ESE-1 aus Ziege (Art.-Nr. ab2934, Abcam, Cambridge, UK), Anti-K8/18 aus Meerschweinchen (Art.-Nr. BP 5007, Acris Antibodies, Hiddenhausen), Anti-K20 aus Kaninchen (Antikörperproduktion durch Davids Biotechnologie, Regensburg), Anti-Ki-67 aus Maus (Art.-Nr. 556003, BD Pharmingen, Heidelberg), Anti-PCNA aus Kaninchen (Art.-Nr. DB051, Delta Biolabs, USA), Anti-ZO-1 aus Kaninchen (Art.-Nr. sc-10804, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

Als Zweitantikörper für Western-Blot Analysen wurden HRPO (*horseradish peroxidase*)-gekoppelte Antikörper von Dianova, Hamburg verwendet: Anti-Kaninchen aus Ziege (Art.-Nr. 111-035-144), Anti-Ziege aus Esel (Art.-Nr. 705-035-147 und Anti-Meerschweinchen aus Esel (Art.-Nr. 06-035-148).

Als Zweitantikörper für immunhistologische Untersuchungen fanden Anti-Kaninchen aus Esel (Cy2 gekoppelt, Art.-Nr. 711-225-152), Anti-Kaninchen aus Esel (Cy3 gekoppelt, Art.-Nr. 711-165-152), Anti-Maus aus Esel (Cy2 gekoppelt, Art.-Nr. 715-225-150), Anti-Maus aus Ziege (Cy3 gekoppelt, Art.-Nr. 115-165-146), Anti-Meerschweinchen aus Esel (Cy3 gekoppelt, Art.-Nr. 706-165-148), Anti-Ziege aus Esel (Cy2 gekoppelt, Art.-Nr. 705-225-147) und Anti-Ziege aus Esel (Cy3 gekoppelt, Art.-Nr. 705-165-147) von Dianova, Hamburg Verwendung.

2.1.11 Geräte

Brutschrank Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank B 20	Heraeus, Hanau
Digitales Kamerasystem Cybertech	Hitachi, Japan
Durchlichtmikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
Elektrophorese Apparaturen	OWL Scientific über VWR, Darmstadt
Feinwaage BP61	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop AX70	Olympus, Hamburg
Freezer-86C ULT	Thermo Electron, Dreieich
Geldokumentations-Imager	Intas, Göttingen
Gradient Cyclyer PTC-200	Bio-Rad, München
Hybridisierungsöfen OV-1	Biometra, Göttingen
Inkubationsschüttler Certomat	Sartorius AG, Göttingen
Inverses Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Göttingen
Laborwaage BL 1500 S	Sartorius, Göttingen
Lumineszenz-Spektrometer LS 45	Perkin Elmer, Rodgau
Mikrowelle Micromat 135	AEG, Nürnberg-Muggenhof
Mini Trans Bot Transfer Cell	Bio-Rad, München
Paraffinausgießstation EG 1160	Leica, Bensheim
Paraffin-Strecktisch HI 1220	Leica, Bensheim
pH-Meter pH 537	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
Netzgerät, Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Rotationsmikrotom RM 2155	Leica, Bensheim
Rotator SB2	Stuart, über VWR, Bruchsal

Semi Dry Blotter Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Smart Cycler II	Cepheid, Sunnyvale, USA
Spektralfluorometer flx	SAFAS, Monaco
Spektralphotometer Helios γ	Spectronic Unicam, Leeds, UK
Spektralphotometer Nanodrop DN 1000	peQLab, Erlangen
Stereomikroskop SZ 40	Olympus, Hamburg
Sterilbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
Thermodrucker P67E	Mitsubishi, Japan
Thermocycler Techne Genius	Thermo-Dux, Wertheim
Trockenofen WTC	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Ultra Thurrax T 25	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Wasserbad HI 1210	Leica, Bensheim
Zentrifuge Microfuge 22R	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.12 Sonstige Materialien

Φ X174 DNA/BsuRI (1353-72 bps)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
λ DNA/Eco 91I (8453-702 bps)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pUC19 DNA/MspI (501-34 bps)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Eindeckmedium (Aqua Poly/Mount)	Polysciences, PA, USA
Roti®-Histokitt II	Roth, Karlsruhe
Einfriermedium	Leica, Bensheim
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore, USA
Hybond N-und N+-Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Kunststoffwaren	Eppendorf, Hamburg Nunc, Wiesbaden Greiner, Frickenhausen
Nick Columns Sephadex G50	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Freiburg Bio-Rad, München

PVDF Membran	Pall Gelman Laboratory, MI, USA
Röntgenfilm Kodak BioMax MR-1	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Transfektionsreagenz FuGENE 6	Roche, Mannheim

2.1.13 Computer und Software

Für die Verarbeitung der Daten, Sequenzbank- und Literaturrecherchen sowie die Bildverarbeitung wurde ein PC mit dem Betriebssystem Microsoft Windows XP verwendet. Die benutzten Programme waren hierbei: Adobe Acrobat 6.0, Adobe Photoshop 7.0 von Adobe, CorelDraw 11 von Corel, DNA Strider 1.2 von CEA, Microsoft Excel 2002, Microsoft Internet Explorer 7, Microsoft Power Point 2002 und Microsoft Word 2002.

Zur Bilddokumentation wurde die Software 'analySIS' der Soft Imaging System GmbH (Münster) auf einem PC mit dem Betriebssystem Microsoft Windows 2000 verwendet.

Zur Erstellung von Vektorkarten wurde auch das Programm Lasergene von DNASTAR, Inc. (Madison, USA) genutzt.

Verwendete Primer wurden mit Unterstützung des Programms 'Primer3' (Howard Hughes Medical Institute, USA) designt. Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des BLAST Programms 'nucleotide blast' überprüft. Sequenzen, Intron-/Exonübergänge, bzw. die Größe von Introns und Exons der untersuchten Gene wurde mit Hilfe des Programms 'Map viewer/Sequence viewer' des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) bestimmt.

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmid-DNA Präparation

Plasmid-DNA wurde aus *Escherichia coli*-Kulturen mittels Anionenaustausch-Chromatographie gewonnen. Für kleinere Mengen wurden 2 ml Bakterien-Übernachtskultur durch Zentrifugation pelletiert und mit dem 'NucleoSpin Plasmid Kit' von Macherey & Nagel (Düren) aufgearbeitet. Für größere Mengen Plasmid-DNA wurden 200-500 ml Bakterien-Übernachtskultur durch Zentrifugation pelletiert und mit den Plasmid Midi-, bzw. Maxi-Präparations-Kit von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Das 'Endofree Plasmid Maxi'-Kit von Qiagen wurde für Zelltransfektionsexperimente und die Präparation von DNA für die Pronukleusinjektion verwendet. Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach der im Labor etablierten Methode (Hanahan, 1983).

2.2.2 DNA-Restriktion und Klonierung von DNA-Fragmenten

Die DNA wurde mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease (2 Einheiten pro μ g DNA) im vom Hersteller angegebenen Restriktionspuffer für 1-2 h bei 37°C, wenn nicht anders angegeben; verdaut. Die restringierte DNA wurde vor der Elektrophorese mit 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte in 0,8 bis 2%igen, horizontalen Agarose-Gelen, mit 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE verwendet. Als Molekulargewichtsmarker wurden BstEII restringierte λ -DNA bzw. HaeII restringierte Φ X174 DNA verwendet. Die Dokumentation erfolgte auf einem UV-Transilluminator mittels digitaler Kamera und Thermodrucker.

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden Vektor und DNA-Fragment mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, so dass an Vektor- und Insert-DNA komplementäre Enden entstanden. Die DNA-Fragmente wurden über ein Agarose-Gel aufgetrennt und die entsprechenden Banden auf einem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten. Aus den Agarosestücken wurde die DNA mit dem 'NucleoSpin-Extract-Kit' nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Für die Ligation von Vektor- und DNA-Fragment wurde das DNA Ligations-Kit von TaKaRa Biomedicals (Japan) verwendet.

2.2.3 Konstruktion der Expressionsvektoren

Es wurden vier verschiedene EGFP-Expressionsvektoren generiert (siehe 3.1), pBR322* wurde als Vektorgerüst verwendet. In alle EGFP-Expressionsvektoren wurden das beta-Globin Intron des Kaninchens, die cDNA für EGFP mit Kozak-Sequenz und das Polyadenylierungssignal aus dem humanen Wachstumshormon einkloniert. Das beta-Globin Intron des Kaninchens ist 5' flankiert von 18 Basen des zweiten Exons (GenBank Accession Nr.V00878; Position 552-569) die als Primer-Bindestellen für die PCR verwendet wurden.

Bei der Identifizierung regulatorischer Elemente des Keratin 20-Gens wurden mit dem Programm 'Proscan' (Center for Information Technology, National Institutes of Health) Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1 identifiziert (Wilhelmi, 2002).

Die generierten EGFP-Expressionsvektoren enthalten die potentiellen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1 in kurzen Fragmenten in direkter Abfolge oder entsprechend ihrer genomischen Anordnung im *downstream* Bereich des humanen K20-Gens.

Die Fragmente F6, F5 und F4 wurden mittels PCR generiert, als Template diente der Klon RP5-1110E20, die 5' Enden der Oligonukleotide (siehe 2.1.8) wurden so gewählt, dass eine enzymatische Restriktion mit den gewünschten Enzymen möglich war. (Abb. 3.2).

Ein 10,3 kb großes SbfI Fragment mit putativen regulatorischen Elementen des humanen K20-Gens wurde aus dem PAC Klons RP5-1110E20 mit SbfI ausgeschnitten.

Ein 0,5 kb großes Promoter-Fragment des humanen K20-Gens (F1) wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden CK3 und CK5 generiert. Auch das 0,3 kb große F2 Fragment mit putativen regulatorischen Elementen des humanen K20-Gens wurde mit Hilfe der PCR erzeugt. Das 1,3 kb große F3 Fragment, das den K20 *upstream* Bereich von F1 bis F2 überspannt, wurde ebenfalls mittels PCR generiert. Die jeweils verwendeten Oligonukleotide enthielten Restriktionsschnittstellen für weitere Klonierungsschritte.

Aufbauend auf den EGFP-Expressionsvektor EV II wurde der EGFP^{lox}/dnElf3 Expressionsvektor EV VII kloniert. 5' und 3' der cDNA für EGFP wurden loxP-Sequenzen eingefügt. Eine loxP-Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen NheI und AscI aus dem Vektor TV(=A) ausgeschnitten und 5' der EGFP cDNA einkloniert. Die zweite loxP-Sequenz wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden loxP_Hind_Sma und loxP_Sma_Hind generiert. Die Primer enthielten Schnittstellen für spätere Klonierungsschritte.

Murine cDNA aus Darmgewebe diente als Template für die Herstellung einer verkürzten, mit SpeI- Schnittstellen versehenen Elf3-cDNA mittels PCR.

2.2.4 Stabile Transfektion humaner Zelllinien

Um die Expressionsstärke der verschiedenen EGFP-Expressionsvektoren (EV I - IV) zu testen, wurden Zellen der Linie HT-29 (Humanes Colon Adenokarzinom, DSMZ Nr. ACC 299; (Fogh, 1975) stabil transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem Reagenz 'Fugene' der Firma Roche nach Angaben des Herstellers. Da die Konstrukte eine Ampicillin- aber keine Neomycin-Resistenz besitzen, wurde mit einem Neomycin-Resistenzplasmid kotransfiziert. Für die Transfektionen wurden äquimolare Mengen Vektor-DNA eingesetzt. Das molare Verhältnis EGFP-Expressionsvektor DNA zu Neomycin-Resistenzplasmid betrug 5:1, das Verhältnis Transfektionsreagenz zu DNA 3,5 µl/µg DNA. Jedes EGFP-Konstrukt wurde zweifach transfiziert. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^5 /ml in 94 mm Kulturschalen ausplattiert. Nach der Transfektion erfolgte eine 14-tägige Selektion mit Genetecin (G418), bis stabil transfiziert Klone auf den Kulturschalen sichtbar wurden. Fluoreszierende Klone wurden mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert und markiert. Einzelne EGFP-exprimierende Klone wurden gepickt und expandiert.

2.2.5 Fluoreszenzmessung

Die EGFP-Expressionsstärke transfizierter Zellen wurde mittels Spektralfluorometer gemessen. Die Zellen wurden mit 'Accutase' von den Zellkulturschalen abgelöst, bei 800 U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 'AccuMax' resuspendiert, um Zell-Aggregate zu lösen. Die Zellen wurden gezählt, erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Für die Messung wurden 2×10^7 Zellen in 400 µl (eine größere Zellmenge in entsprechendem Verhältnis) Protein-Lysispuffer aufgeschlossen, unlösliche Zellbestandteile bei 14000 U/min abzentrifugiert und der Überstand für die Messung im Fluorometer eingesetzt. Das Absorptionsmaximum von EGFP liegt nach Produktinformation der Firma Clontech bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 507 nm. Die Anregungswellenlänge des Spektralfluorometers wurde auf 488 nm eingestellt. Die Emissionsmessung von 500 bis 525 nm ergab, dass in HT-29-Zellen exprimiertes EGFP sein Emissionsmaximum bei 511,5 nm hat. Für die Berechnung der relativen Fluoreszenz wurden die Messwerte bei 511,5 nm gewählt.

2.2.6 Präparation der Expressionsvektoren zur Pronukleusinjektion

Der prokaryotische Teil des Expressionsvektoren wurde mit dem Restriktionsenzym AatII entfernt. Nach der Restriktion wurde die DNA auf einem 0,8%igen Agarose-Gel aufgetrennt und die Bande mit der Expressionskassette ausgeschnitten. Die Aufreinigung wurde mit dem 'Gene Clean Spin Kit' von Qbiogene (Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden endotoxinfreie Reaktionsgefäße sowie endotoxinfreie Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Für die Pronukleusinjektion wurde die DNA auf 1 ng/µl mit Injektionspuffer (5 mM Tris, pH 7,5; 0,15 mM EDTA in Embryonenwasser (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)) eingestellt. Die DNA-Lösung wurde 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert, um Partikel abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.7 Mikroinjektion

Die Pronukleusinjektion wurde von Herrn Dr. Reifenberg in der Zentralen Versuchstiereinrichtung des Hochhauses am Augustusplatz, Mainz durchgeführt. Es wurden befruchtete Eizellen von FVB/NHSD-Tieren verwendet.

2.2.8 Zucht und Selektion transgener Tiere

Die erhaltenen transgenen Foundertiere wurden mit FVB/NHSD-Tieren verpaart, um transgene Linien zu etablieren. Die Nachkommen wurden routinemäßig mittels PCR genotypisiert, DNA aus Ohrbiopsien diente als Matrix.

Für die Cre-Rekombination zur Aktivierung des dnElf3-Transgens wurden Tiere der jeweiligen TgEfloxElf Linie zunächst mit TgAktinCre-Mäusen verpaart. Die Cre-Rekombinase wird bei diesem Mausstamm unter Kontrolle des humanen beta-Aktin-Promotors ubiquitär und bereits während der Embryonalentwicklung exprimiert (Lewandoski *et al.*, 1997).

Für die induzierbare Aktivierung des dnElf3-Transgens wurden Tiere der jeweiligen TgEfloxElf - Linie mit TgRosaCreER-Mäusen gekreuzt, deren Cre-Rekombinase durch die Gabe von Tamoxifen induzierbar ist (Badea *et al.*, 2003).

2.2.9 Aktivierung der Cre-Rekombinase

Um die induzierbare Cre-Rekombinase zu aktivieren, wurde den Versuchstieren über einen Zeitraum von 5 Tagen im Abstand von 24 Stunden 40 µg Tamoxifen pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal (*i.p.*) injiziert. Tamoxifen wurde hierzu in Ethanol (1/10 Vol.)/Sonnenblumenöl (9/10 Vol.) gelöst.

2.2.10 DNA-Isolierung aus Gewebe

Für die Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung wurden Ohrbiopsien von Mäusen mit Proteinase K (Boehringer Mannheim) über Nacht bei 55°C verdaut. Die Proteinase K-Stocklösung (20 mg/ml) wurde mit Proteinase K-Puffer auf 0,25 mg/ml verdünnt, 20 µl dieser Lösung wurden für den Verdau einer Ohrbiopsie verwendet. Nach erfolgtem Verdau wurde mit H₂O_{dd} auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und durch kurzes Vortexen gemischt. Für die PCR-Analyse wurden 2 µl Proteinase K-Verdau pro Reaktion eingesetzt.

2.2.11 Polymerasekettenreaktion zur Bestimmung des Genotyps

Zur Genotypisierung der transgenen Tiere mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die unter Punkt 2.1.8 aufgeführten Primer verwendet. Alle Primer wurden mit Unterstützung des Programms 'Primer3' (Howard Hughes Medical Institute, USA) designt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Primerkonzentration 0,75 µM, Primerkonzentration (interne Kontrolle) 0,25 µM, Desoxyribonukleotide (dNTPs) 0,2 mM, Polymerase 1 Unit/Reaktionsansatz, 35 µl Reaktionsvolumen. Ein erster Denaturierungsschritt wurde bei 94°C für 3 min durchgeführt. Die Polymerisation erfolgte in 35 Zyklen, die Denaturierung bei 94°C für 20 s, das *annealing* erfolgte bei 58°C bis 60°C für 20 s, die Elongation wurde bei 72°C für 10 bis 30 s, abhängig von der Produktgröße, durchgeführt. Die finale Elongation erfolgte bei 72°C für 5 min.

2.2.12 RNA Isolierung aus Geweben

Zur Isolierung verwendete Lösungen wurden vor Gebrauch mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert. Alternativ wurden die Lösungen mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt. Porzellangefäße und Metallwerkzeuge wurden bei 180°C für 4 Stunden hitzesterilisiert. Die Präparation von Gesamt-Ribonukleinsäure

(RNA) aus verschiedenen Mausgeweben und Kulturzellen erfolgte mittels 'TriPure™ Isolation Reagent' (Boehringer Mannheim) bzw. 'Tri® Reagent' (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gemäß den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden 100 mg unter flüssigem Stickstoff pulverisiertes Gewebe bzw. 5×10^6 Zellen in 1 ml Reagenz suspendiert, mit 200 µl Chloroform versetzt, durchmischt und bei 12.000 g (4°C) für 15 min zentrifugiert.

Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Präzipitation der RNA zu ermöglichen. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 15.000 g (4°C) für 30 min pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei 65°C in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser gelöst.

2.2.13 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit dem RT-PCR-Kit 'RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit' der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers. Pro Reaktion wurden 2,5–5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zur Konzentrationsmessung wurde das Spektralphotometer Nanodrop DN 1000 von peQLab (Erlangen) verwendet. Für die RT-PCR wurden Vorwärtsprimer eingesetzt, die 5' des beta-Globin Introns lagen bzw. Rückwärtsprimer, die 3' des beta-Globin Introns lagen, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund einer Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Alle Primer wurden mit Unterstützung des Programms 'Primer3' (Howard Hughes Medical Institute, USA) designt.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Primerkonzentration 0,75 µM, dNTPs 0,2 mM, Polymerase 1 Unit/Reaktionsansatz, 35 µl Reaktionsvolumen. Ein erster Denaturierungsschritt wurde bei 94°C für 3 min durchgeführt. Die Polymerisation erfolgte in 35 Zyklen, Denaturierung bei 94°C für 20 s, das *annealing* erfolgte bei 58°C bis 62°C für 20 s, die Elongation wurde bei 72°C für 10 bis 20 s durchgeführt. Die finale Elongation erfolgte bei 72°C für 5 min. Als Template wurden 1–2 µl cDNA bzw. 1–2 µl einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

2.2.14 Real Time-Polymerasekettenreaktion

Um eine Aussage über die Expressionsstärke der untersuchten Gene zu treffen, wurde eine quantitative *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Die Präparation der cDNA erfolgte wie in Punkt 2.2.13 und 2.2.14 beschrieben. Zur Durchführung der qRT-PCR

wurde der 'iQTMSYBR[®] Green Supermix' der Firma Bio-Rad verwendet. Als Referenz-Gen wurde HPRT 1 (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1) verwendet, die relative Expression wurde berechnet als ΔC_t , die C_t -Werte der jeweiligen Reaktion wurden mit der Software des SmartCycler II von Cepheid (Sunnyvale, USA) bestimmt. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ Methode (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Gensequenzen, sowie Exon-Intron-Übergänge, wurden mit dem 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI) 'Map viewer/Sequence viewer' unter 'Mouse Genome Resources' bestimmt. Es wurden Vorwärtsprimer eingesetzt, die 5' eines Introns, bzw. Rückwärtsprimer, die 3' eines Introns lagen, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund einer Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Alle Primer wurden mit Unterstützung des Programms 'Primer3' (Howard Hughes Medical Institute, USA) designt. Primer (siehe Punkt 2.1.8) wurden in der Konzentration 250 nM verwendet. Die qRT-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: initialer Denaturierungsschritt bei 94°C 3 min. Die Polymerisation erfolgte in 35 Zyklen, Denaturierung bei 94°C für 20 s, das *annealing* erfolgte bei 59°C bis 64°C für 20 s, die Elongation wurde bei 72°C für 10 s durchgeführt. Als Template wurden 1µl einer 1:10 Verdünnung bzw. 1µl einer 1:100 Verdünnung cDNA pro Reaktionsansatz eingesetzt.

2.2.15 Western-Blot Analyse

Für die Proteinextraktion aus murinem Gewebe wurden die betreffenden Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebe wurden unter flüssigem Stickstoff in Porzellanmörsern mit Pistill zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit Protein-Lysispuffer versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford mit der 'Roti-Quant' Lösung von Roth (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels analytischer, denaturierender SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) auf einem 12,5%igen Trenngel. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 3 x Laemmli-puffer versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht. Für den Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran bzw. PVDF-Membran wurde ein 'semi dry' Elektrobloetter genutzt.

Freie Bindungsstellen der Membran wurden durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur oder Inkubation über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver bzw. 2% Magermilchpulver, 2% BSA und 0,5% Casein, oder 0,5% Casein in PBS geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, oder 2 h bei RT in Blocklösung. Nichtgebundene Antikörper wurden durch Waschungen mit PBS entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 1 h bei RT in Blocklösung. Nichtgebundene Antikörper wurden durch wiederholtes Waschen mit PBS entfernt. Die Signaldetektion erfolgte mit dem 'Chemilumineszenz-Substrat ECL plus Western Blotting Detection System' vom Amersham Biosciences (Freiburg), oder dem 'Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate' von Pierce (Rockford, USA) in der Dunkelkammer unter Verwendung von Kodak Bio Max Film, oder mittels eines Geldokumentations-Imager von Intas, Göttingen. Um die gleichmäßige Beladung der Gele zu kontrollieren wurden die Proteine auf der PVDF Membran mit 'India Ink' gefärbt (Sambrook, 1987; Sambrook et al., 1989).

Der Nachweis von EGFP erfolgte mit einem Anti-EGFP Antikörper aus Kaninchen (Art.-Nr. 8367, Clontech, Palo Alto, USA), als Sekundärantikörper wurde ein HRPO-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege (Art.-Nr. 111-035-144, Dianova, Hamburg) eingesetzt. K20 wurde mit einem Anti-K20 Antikörper aus Kaninchen (Davids Biotechnologie, Regensburg) nachgewiesen, als Zweitantikörper wurde ein HRPO-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege (Art.-Nr. 111-035-144, Dianova, Hamburg) verwendet. Der Nachweis von Claudin-7 erfolgte mit einem Anti-Claudin-7 Antikörper aus Ziege (Art.-Nr. sc-17670, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), als Zweitantikörper wurde ein HRPO-gekoppelter Anti-Ziege aus Esel (Art.-Nr. 705-035-147, Dianova, Hamburg) eingesetzt. K8/18 wurde mit einem Anti-K8/18 Antikörper aus Meerschweinchen (Acris Antibodies, Hiddenhausen), nachgewiesen, als Zweitantikörper wurde ein HRPO-gekoppelter Anti-Meerschweinchen Antikörper aus Esel (Art.-Nr. 06-035-148) verwendet. Der Nachweis von PCNA erfolgte mit einem Anti-PCNA Antikörper aus Kaninchen (Art.-Nr. DB051, Delta Biolabs, USA), als Zweitantikörper wurde ein HRPO-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege (Art.-Nr. 111-035-144, Dianova, Hamburg) eingesetzt.

2.2.16 Hämatoxilin/Eosin-Färbung

Gewebeproben wurden entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden mittels Mikrotom mit einer Gewebestärke von 4-5 µm geschnitten. Die Schnitte wurden in einem 42°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Diesem Vorgang folgte eine Trocknung der Schnitte auf einem beheizten Paraffin-Strecktisch. Vor der Hämatoxilin/Eosin-Färbung müssen die in Paraffin eingebetteten Schnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden die Schnitte 2 x 10 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol 2 x 2 min; 95% Ethanol 2 min, 80% Ethanol 2 min, 70% Ethanol 2 min) und deionisiertem H₂O rehydriert. Die Schnitte wurden 3 min in Hämatoxilin-Lösung, modifiziert nach Gill-III von Merck (Darmstadt) gefärbt und 3 min in Leitungswasser gebläut. Nach 3 Dehydrierungsschritten (2 min 30% Ethanol, 2 min 50% Ethanol, 2 min 70% Ethanol) erfolgte eine ca. dreiminütige Färbung mit 1%iger Eosin Y-Lösung. Nach weiteren Dehydrierungsschritten (2 x 2 min 100% Ethanol, 2x2 min Xylol) wurden die Schnitte mit 'Roti®-Histokitt II' von Roth (Karlsruhe) eingedeckt.

2.2.17 Periodsäure-Leukofuchsin (PAS)-Färbung

Gewebeschnitte wurden wie in Punkt 2.2.16 beschrieben angefertigt und entparaffiniert. Die Schnitte wurden 10 min in 1% Perjodsäure inkubiert, 10 min in Leitungswasser und 2 x 2 min in deionisiertem Wasser gespült. Nach 15 minütiger Inkubation mit Schiff'schem Reagenz wurde 5 min mit fließendem Leitungswasser und 2 min in deionisiertem Wasser gespült. Nach einer 4 minütigen Inkubation mit Hämatoxylin wurden die Schnitte 4 min mit fließendem Leitungswasser gebläut. Nach mehreren Dehydrierungsschritten (1 min 70% Isopropanol, 1 min 80% Isopropanol, 1 min 90% Isopropanol, 2 x 3 min 100% Isopropanol, 3 min Xylol) wurden die Gewebeschnitte mit 'Roti®-Histokitt II' eingebettet.

2.2.18 Alcianblau-Färbung nach Mowry

Gewebeschnitte wurden wie in Punkt 2.2.16 beschrieben angefertigt und entparaffiniert. Die Schnitte wurden 3 min in 3% Essigsäure, 30 min in 1%iger Alcianblau-Lösung und 1 min in 3% Essigsäure inkubiert. Nach einer 2minütigen Spülung mit Leitungswasser wurde 5 min mit Kernechtrolösung inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden 3 min mit deionisiertem Wasser

gespült, dehydriert (2 min 96% Isopropanol, 2x3 min 100% Isopropanol, 3 min Xylol) und mit 'Roti®-Histokitt II' eingebettet.

2.2.19 Immunhistologische Methoden

Gewebeschnitte wurden wie in Punkt 2.2.16 beschrieben angefertigt und entparaffiniert, es wurden Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger verwendet. Zur Demaskierung der Antigen-Epitope wurden die Schnitte in 10 mM Zitronensäurepuffer, pH 6,0, in einer Küvette in der Mikrowelle erhitzt bis der Siedepunkt erreicht war und ca. 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte wurden anschließend in TBS gewaschen.

Um unspezifische Protein-Bindungen zu verhindern wurden die Schnitte mit 10% Normalserum in TBS als Blockierungs-Reagenz inkubiert. Verwendet wurde Normalserum aus der gleichen Spezies wie der konjugierte Zweitantikörper. Die Blockierung erfolgte eine Stunde bei 37°C, oder RT in einer feuchten Kammer.

Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C, oder 2 h bei RT in einer feuchten Kammer mit dem Zweitantikörper inkubiert. Die Schnitte wurden 5 Minuten in TBS gewaschen und mit Hoechst 33342 (Invitrogen, Karlsruhe) gegengefärbt. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen in TBS wurden die Schnitte mit Aquamount (Polysciences, PA, USA) eingedeckt.

2.2.20 Statische Analysen

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm 'GraphPad Prism' durchgeführt. Die Darstellung der Daten der einzelnen untersuchten Gruppen erfolgte mittels 'Box-Whisker-Plot', mit Anzeige des Medians und des oberen und unteren Quartils. Die Whisker (Antennen) reichen bis zum größten bzw. kleinsten Wert der Daten.

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurde der Zweistichproben t-Test herangezogen. Es wurden der Mittelwert und dessen Standardabweichung errechnet. Ein $p \leq 0,05$ wurde als signifikant (*), ein $p \leq 0,01$ als hoch-signifikant (**) und ein $p \leq 0,001$ als höchst-signifikant (***) definiert.

3. Ergebnisse

3.1 EGFP-Expressionsvektoren

Enhancer- und Promotor-Fragmente des humanen Gens für K20 sollten eine spezifische Expression im Darmepithel der Maus gewährleisten. Aufbauend auf den Ergebnissen von A. Wilhelmi (Wilhelmi, 2002) wurden verschiedene putative Enhancer- und Promotor-Fragmente kombiniert und EGFP als Reporter gen verwendet.

Zunächst wurde ein EGFP-Vektor (A10) kloniert, welcher das Promotor-Fragment F1 des K20-Gens, ein beta-Globin Intron des Kaninchens, die cDNA für EGFP mit Kozak-Sequenz, und das Polyadenylierungssignal (pA) des humanen Wachstumshormons enthält. Als bakterielles Vektorgerüst wurde pBR322* verwendet.

Das beta-Globin Intron des Kaninchens ist 5' flankiert von 18 Basen des zweiten Exons, die als Primer-Bindestellen für die PCR verwendet wurden. Durch die Kombination verschiedener putativer Enhancer- und Promotor-Fragmente entstanden die EGFP-Expressionsvektoren EV I – EV IV.

Das Fragment F1 enthält proximale Promotorelemente des K20-Gens. Die Fragmente F2-F6 enthalten putative, distale Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Das Fragment F3 enthält sowohl proximale Promotorelemente als auch putative, distale Transkriptionsfaktor-Bindestellen.



Abb. 3.1 Putative Enhancer- und Promotor-Fragmente des humanen K20-Gens

Schematische Darstellung des *upstream* Bereiches des K20-Gens mit Angabe der Fragmente F1-F6. Das Fragment F1 enthält proximale Promotorelemente des K20-Gens. Die Fragmente F2-F6 enthalten putative, distale Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Das Fragment F3 enthält sowohl proximale Promotorelemente als auch putative, distale Transkriptionsfaktor-Bindestellen.

Der EGFP-Expressionsvektor EV I enthält die Fragmente F6, F5, F4, F2 und F1 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, ein beta-Globin Intron des Kaninchens, die cDNA für EGFP, das Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons und pBR322* als bakterielles Vektorgerüst. Der EGFP-Expressionsvektor EV III enthält statt der Fragmente F2 und F1 das Fragment F3 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens (Abb.3.2).

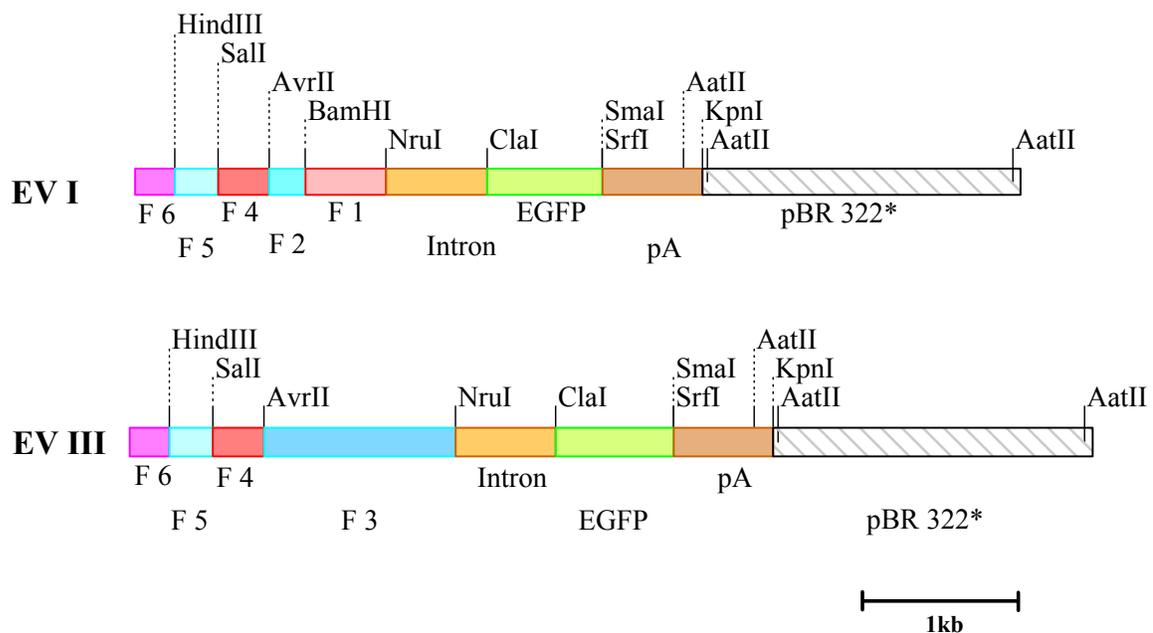


Abb. 3.2 Die EGFP-Expressionsvektoren EV I und EV III

Der EGFP-Expressionsvektor EV I enthält die Fragmente F6, F5, F4, F2 und F1 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, ein beta-Globin Intron aus Kaninchen, die cDNA für EGFP, das Polyadenylierungssignal aus dem humanen Wachstumshormon und pBR322* als bakterielles Vektorgerüst. Der EGFP-Expressionsvektor EV III enthält statt der Fragmente F2 und F1 das Fragment F3 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens.

Der EGFP-Expressionsvektor EV II setzt sich zusammen aus einem SbfI Fragment des PAC Klons RP5-1110E20 mit putativen Enhancer-Elementen, den Fragmenten F2 und F1 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, dem beta-Globin Intron 2 aus Kaninchen, der cDNA für EGFP und der Polyadenylierungssequenz des humanen Wachstumshormons. Als bakterielles Vektorgerüst wurde pBR322* verwendet. Der EGFP-Expressionsvektor EV IV enthält statt der Fragmente F2 und F1 das Fragment F3 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens (Abb.3.3).

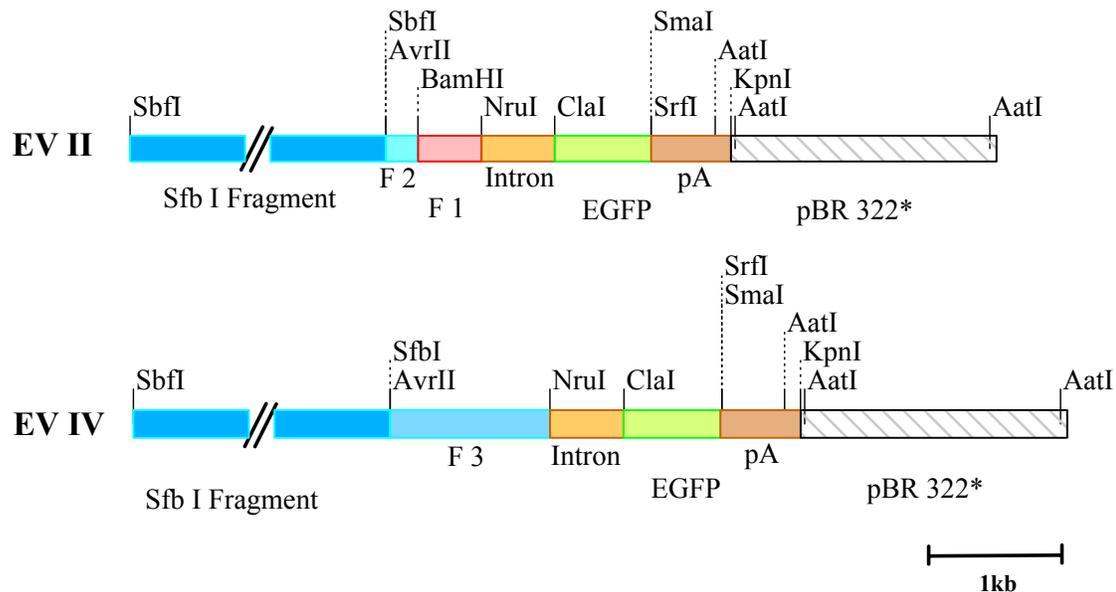


Abb. 3.3 Die EGFP-Expressionsvektoren EV II und EV IV

Der EGFP-Expressionsvektor EV II enthält ein SbfI Fragment des PAC Klon RP5-1110E20 mit putativen Enhancer-Elementen, die Fragmente F2 und F1 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, das beta-Globin Intron 2 aus Kaninchen, die cDNA für EGFP und das Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons. Als bakterielles Vektorgerüst wurde pBR322* verwendet. Der EGFP-Expressionsvektor EV IV enthält statt der Fragmente F2 und F1 das Fragment F3 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens.

3.1.1 Stabile Transfektion humaner Zelllinien

Die Expressionsstärke der verschiedenen EGFP-Expressionsvektoren wurde mittels Transfektion der K20-positiven, humanen Zelllinie HT-29 (Humanes Colon Adenokarzinom, DSMZ Nr. ACC 299 (Fogh, 1975)) getestet. Zellen der Linie wurden mit verschiedenen EGFP-Expressionsvektoren stabil transfiziert. Für die Transfektionen wurden die EGFP-Expressionsvektoren EV I, EV II, EV III, E IV und als Kontrolle, der Vektor A10 verwendet. Nach einer 14 tägigen Selektion mit Genetecin (G418) wurden stabil transfizierte Klone auf den Kulturschalen sichtbar. Diese fluoreszierenden Klone wurden mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert und markiert. Einzelne exprimierende Klone wurden gepickt und expandiert (Abb. 3.4).

3.1.2 Fluoreszenzmessung

Die EGFP-Expressionsstärke transfizierter Zellen wurde mittels Spektralfluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm gemessen. Für die Berechnung der relativen Fluoreszenz wurden die Emissionswerte bei 511,5 nm bestimmt.

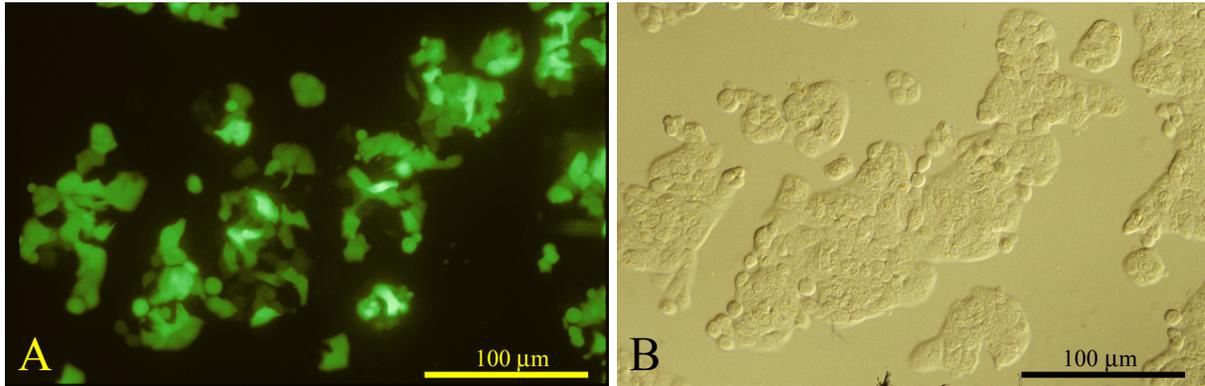


Abb. 3.4 EGFP-Expression in transfizierten HT-29-Zellen

HT-29-Zellen, die mit dem EGFP-Expressionsvektor II transfiziert wurden, im Fluoreszenzmikroskop, mit blauem Licht (490 nm) angeregt und fotografiert (A). Die gleichen Zellen mit *Differential Interference Contrast* abgebildet (B).

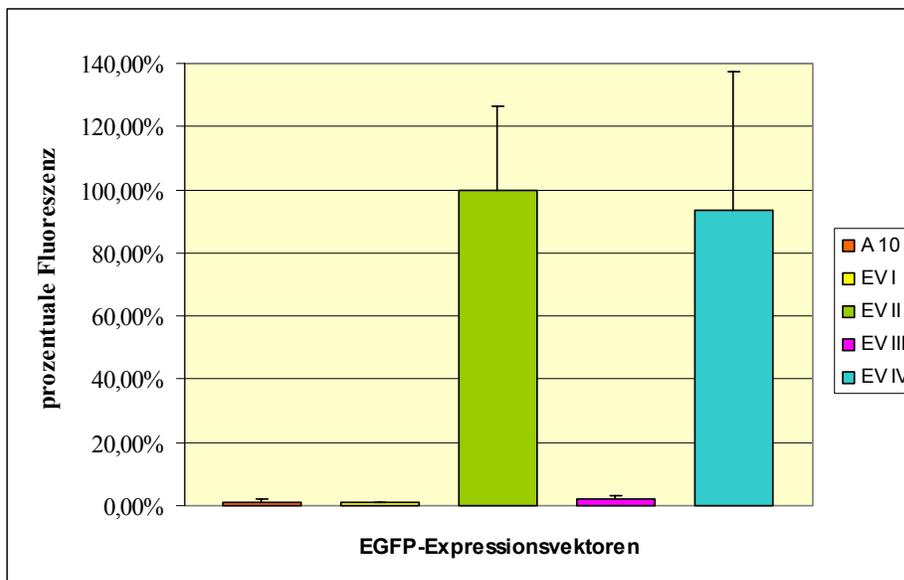


Abb. 3.5 Relative EGFP Expression der Konstrukte in HT-29-Zellen

HT-29-Zellen wurden mit vier verschiedenen EGFP-Expressionsvektoren (EV I, EV II, EV III, EV IV) transfiziert, die putative Enhancer- und Promotor-Fragmente des humanes Gens für K20 enthalten. Der Vektor A 10 enthält keine Enhancer-Fragmente. Stabile Einzelklone wurden separat expandiert und deren EGFP-Emission im Spektralfluorometer gemessen. Die Konstrukte A10, EV I und EV III zeigten nur sehr schwache Fluoreszenz. Mit dem Konstrukt EV II wurde die maximale durchschnittliche EGFP-Expression erreicht.

Für jedes Konstrukt wurde die Fluoreszenz in mindestens zwei bis 6 Einzelklonen gemessen. In Klonen, die mit A10, EV I oder EV III transfiziert wurden, zeigte sich nur eine sehr schwache EGFP-Expression. Die maximale durchschnittliche Expression wurde mit EV II erreicht, dieser Maximalwert wurde als 100% Fluoreszenz definiert. Eine starke Expression zeigten auch Klone, die mit EV IV transfiziert wurden, hier lag die durchschnittliche Expression bei 93,5% des Maximalwertes. Die durchschnittliche relative Fluoreszenz der Klone A10, EV I und EV IV lag unter 2,5% des Maximalwertes (Abb. 3.5).

3.1.3 Generierung und Zucht EGFP transgener Tiere

Die Mikroinjektion des Konstrukts EV II wurde von Dr. Reifenberg in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsklinik Mainz durchgeführt. Es wurden sieben Foundertiere (A-G) mit dem Konstrukt EV II generiert, durch Verpaarung mit FVB/NHSD-Tieren konnten sechs transgene Linien etabliert werden. Die Linien A, E und F wurden exemplarisch untersucht. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels PCR, es wurden die Primerpaare Foulde 10 und Foulde 2 (Fragmentlänge 548 bp) bzw. Foulde 3 und Foulde 4 (Fragmentlänge 601 bp) verwendet.

3.1.4 Darmepithelspezifische Expression des Transgens EGFP

Durch die Verwendung von putativen Enhancer- und Promoter-Elementen des humanen K20-Gens in den generierten Expressionsvektoren konnte eine spezifische Expression des Reportergens EGFP in Darmepithelzellen erreichen werden. Der transgene Nachwuchs der untersuchten Linien hatte einen deutlichen Phänotyp (Abb. 3.6; Abb. 3.7).

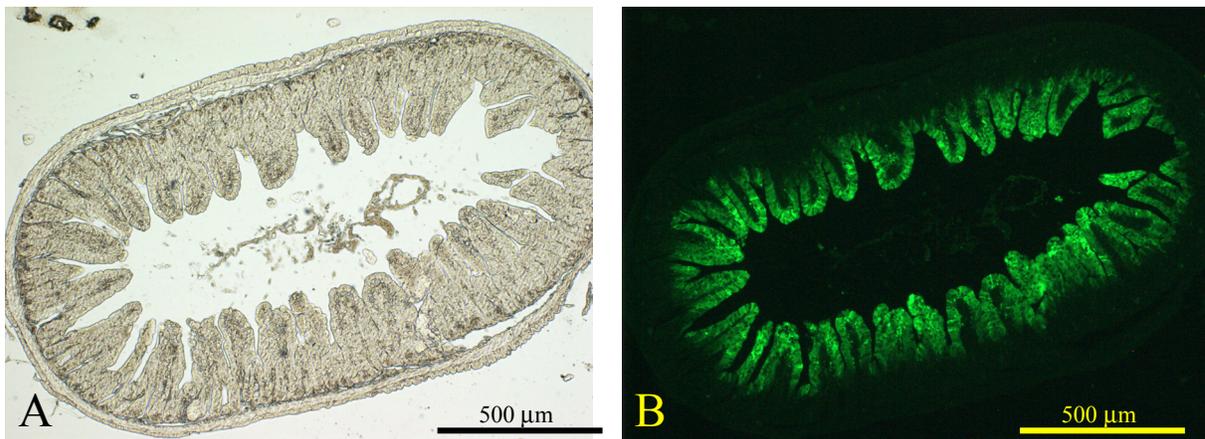


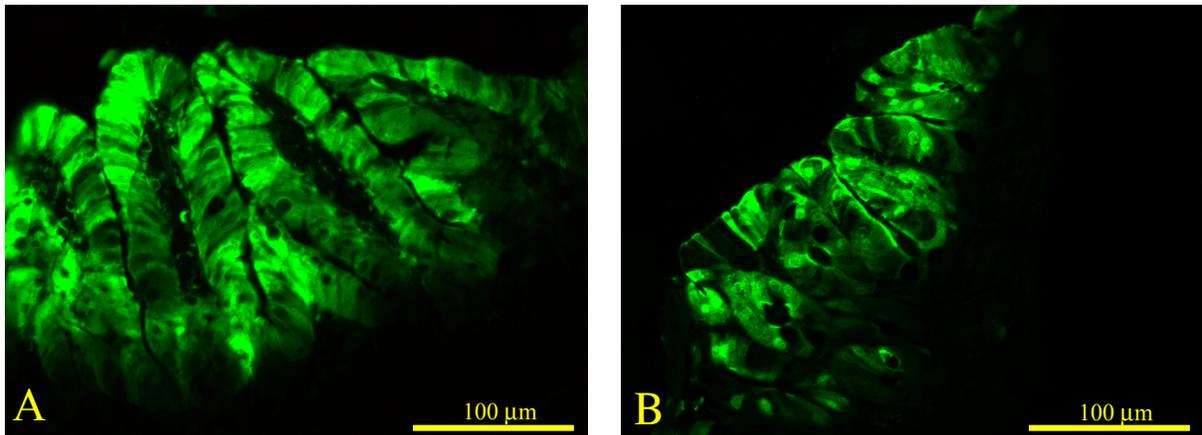
Abb. 3.6 EGFP-Expression in Enterozyten des Mäusedünndarms (Ileum)

Histologischer Schnitt des Mäusedünndarms (Ileum) der Linie EV II E im Hellfeldmikroskop. Die Oberfläche des Dünndarms wird durch zahlreiche Darmzotten (*Villi intestinales*) vergrößert (A).

Histologischer Schnitt des Mäusedünndarms (Ileum) der Linie EV II E im Fluoreszenzmikroskop, mit blauem Licht (490 nm) angeregt und fotografiert. Die epithelzellspezifische Expression von EGFP ist deutlich zu erkennen (B).

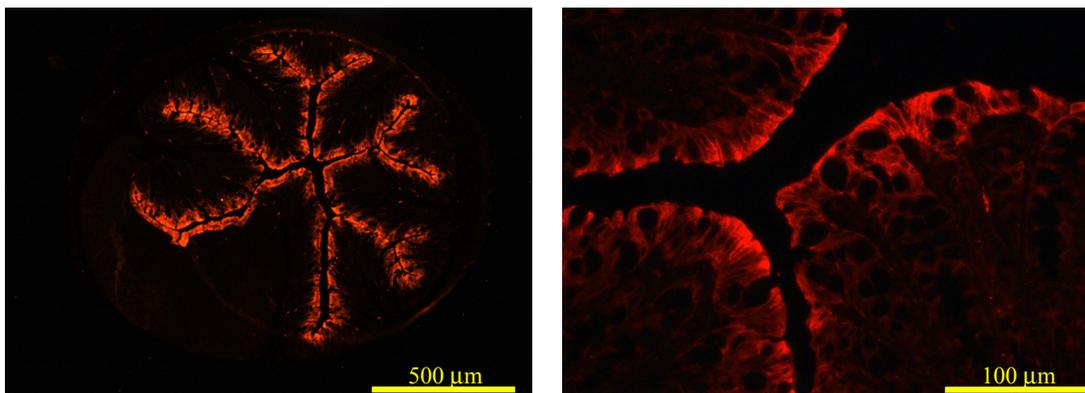
Histologische Untersuchungen der Gewebeschnitte im Fluoreszenzmikroskop zeigten eine deutliche Expression des Reportergens EGFP in den Darmepithelzellen. Bei den Linien EV II A, E und F konnte in allen untersuchten Teilen des Darms (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon) eine Expression von EGFP festgestellt werden, dabei beschränkte sich die Expression auf das Darmepithel, die Zellen an der Kryptenbasis waren EGFP-negativ. In den Organen Leber, Lunge, Niere, Milz, Herz, Thymus und Blase zeigte sich keine EGFP-Expression.

Die epithelzellspezifische Expression des K20 wurde mittels Immunhistologie gezeigt, K20 wurde mit einem Anti-K20 Antikörper aus Kaninchen (Davids Biotechnologie, Regensburg) detektiert (Abb.3.8).

**Abb. 3.7 EGFP-Expression in den Enterozyten des Mäusedarms**

Histologischer Schnitt des Mäusedünndarms (Ileum) der Linie EV II E (A) und des Mäusedickdarms (Colon) der Linie EV II E (B) im Fluoreszenzmikroskop, mit blauem Licht (490 nm) angeregt und fotografiert. Die Expression von EGFP beschränkt sich auf die Enterozyten.

Die EGFP-Expression wurde mittels Western-Blot bestätigt. Von verschiedenen Geweben wurden 30µg Protein mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einem Kaninchen-anti-EGFP Antikörper (Clontech; pAB 8367) detektiert. Eine EGFP Expression zeigte sich in den Organen Magen, Dünndarm, (Duodenum, Ileum) und Dickdarm (Caecum, Colon). In den Organen Herz, Lunge, Leber, sowie im Urogenitaltrakt konnte keine EGFP-Expression festgestellt werden (Abb. 3.9).

**Abb. 3.8 K20-Expression in Epithelzellen des murinen Colon**

Die immunhistologische Detektion von K20 im Mäusedickdarm (Colon) erfolgte mit α -K20 Antikörpern (rote Fluoreszenz) im Fluoreszenzmikroskop. Darstellung in 40- und 200-facher Vergrößerung.

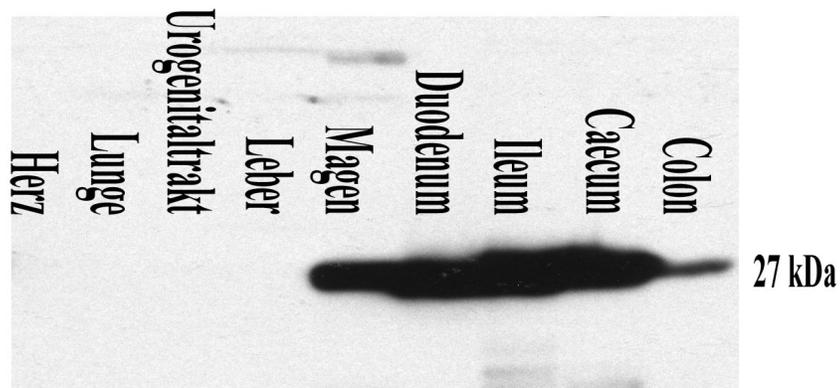


Abb. 3.9 EGFP Western-Blot verschiedener muriner Gewebe der Linie EV II A

Je Organ wurden 30µg Protein über eine SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mittels Anti-EGFP Antikörper (Clontech, pAB 8367) detektiert. Eine EGFP Expression zeigt sich in den Organen Magen, Dünndarm (Duodenum, Ileum) und Dickdarm (Caecum, Colon). In den Organen Herz, Lunge, Leber, sowie im Urogenitaltrakt konnte keine EGFP-Expression festgestellt werden.

3.2 Der EGFP^{fllox}/dnElf3-Expressionsvektor und transgene Linien

Um eine darmepithelspezifische Expression einer trunkierten Form des Transkriptionsfaktors Elf3 zu ermöglichen, wurde aufbauend auf dem EGFP-Expressionsvektor EV II der EGFP^{fllox}/dnElf3-Expressionsvektor EV VII kloniert. 5' und 3' der cDNA für EGFP wurden loxP-Sequenzen eingefügt. Die loxP-Sequenzen aus dem Bakteriophagen P1 wurden aus dem *targeting*-Vektor TV(=A) (Jahnen-Dechent et al., 1997) mittels Restriktionsenzymen gewonnen bzw. durch PCR mit TV(=A) als Template amplifiziert, wobei die Primer Schnittstellen für die weiteren Klonierungsschnitte enthielten (siehe 2.1.8).

Murine cDNA aus Darmgewebe diente als Template für die Herstellung einer trunkierten, mit SpeI-Schnittstellen versehenen Elf3-cDNA (Exon 7-9) mittels PCR. Da zunächst kein PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, wurde der gesamte Bereich Exon 7-Exon 8 sequenziert, dabei zeigte sich, dass in den ersten 10 Basen des Exons 7 zwei Basen nicht mit der publizierten Sequenz identisch waren (Tymms *et al.*, 1997). Nach Austausch der Basen im Primer konnte mittels PCR eine trunkierte, mit Restriktionsschnittstellen versehene Elf3-cDNA (Exon 7-9) amplifiziert werden, die 3' des geflochten EGFPs inkloniert wurde.

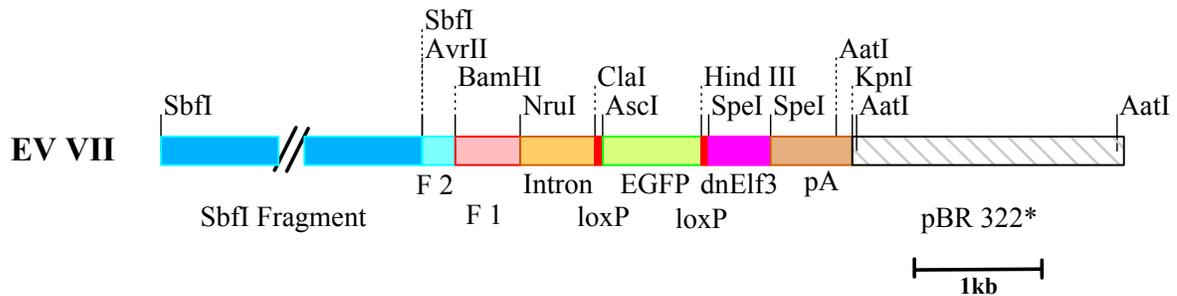


Abb. 3.10 Der EGFP^{lox}/dnElf3 -Expressionsvektor

Der EGFP^{lox}/dnElf3-Expressionsvektor enthält das SbfI I-Fragment aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, die Fragmente F1 und F2 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, das beta-Globin Intron des Kaninchens, die cDNA für EGFP; die loxP-Erkennungssequenzen des Bakteriophagen P1, eine trunkierte Elf3-cDNA (Exon 7-9), das Polyadenylierungssignal aus dem humanen Wachstumshormon und pBR322* als bakterielles Vektorgerüst.

Der EGFP^{lox}/dnElf3-Expressionsvektor EV VII enthält somit das SbfI I-Fragment aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, die Fragmente F1 und F2 aus dem 5' *upstream* Bereich des K20-Gens, das beta-Globin Intron des Kaninchens, die gefloخته cDNA für EGFP mit Kozak-Sequenz, eine trunkierte Elf3-cDNA (Exon 7-9) (GenBank Accession Nr. NM_007921; Position 786-1214), das Polyadenylierungssignal aus dem humanen Wachstumshormon und pBR322* als bakterielles Vektorgerüst.

Die Mikroinjektion des Konstrukts EV VII wurde von Dr. Reifenberg in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsklinik Mainz durchgeführt. Es wurden fünf Foundertiere mit dem Konstrukt EV VII generiert, durch Verpaarung mit FVB/NHSD-Tieren konnten vier transgene Linien (im Folgenden als TgEfloxElf3A-E bezeichnet) etabliert werden. Die Linien TgEfloxElf3A und TgEfloxElf3C wurden exemplarisch untersucht. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels PCR, es wurden die Primer beta-Globin Ex2 bzw. rbG1 als Vorwärtsprimer und EGFPprev bzw. Elf3rev als Rückwärtsprimer verwendet.

3.3 Konstitutives Expressionssystem

3.3.1 Genomische Rekombination durch konstitutive Cre-Rekombinaseaktivität

Zur Aktivierung des dnElf3-Transgens wurden TgEfloxElf-Mäuse mit TgAktinCre-Mäusen, die Cre-Rekombinase konstitutiv unter einem beta-Aktin-Promotor exprimieren, gekreuzt. Bei doppeltransgenen TgEfloxElf x TgAktinCre-Mäusen wurde durch Cre-Rekombinase-Aktivität

das gefloخته EGFP aus dem Genom entfernt und es erfolgte eine Expression des trunkierten Transkriptionsfaktors Elf3. Die Rekombination auf genomischer Ebene konnte mittels PCR gezeigt werden. Mit den Primern beta-Globin Ex2 und EGFPprev, bzw. Elf3rev2 wurde mit genomischer DNA von einfach transgenen bzw. doppeltransgenen Tieren als Template PCR-Produkte in der Länge von 1184 bp bzw. 850 bp generiert (Abb. 3.12).

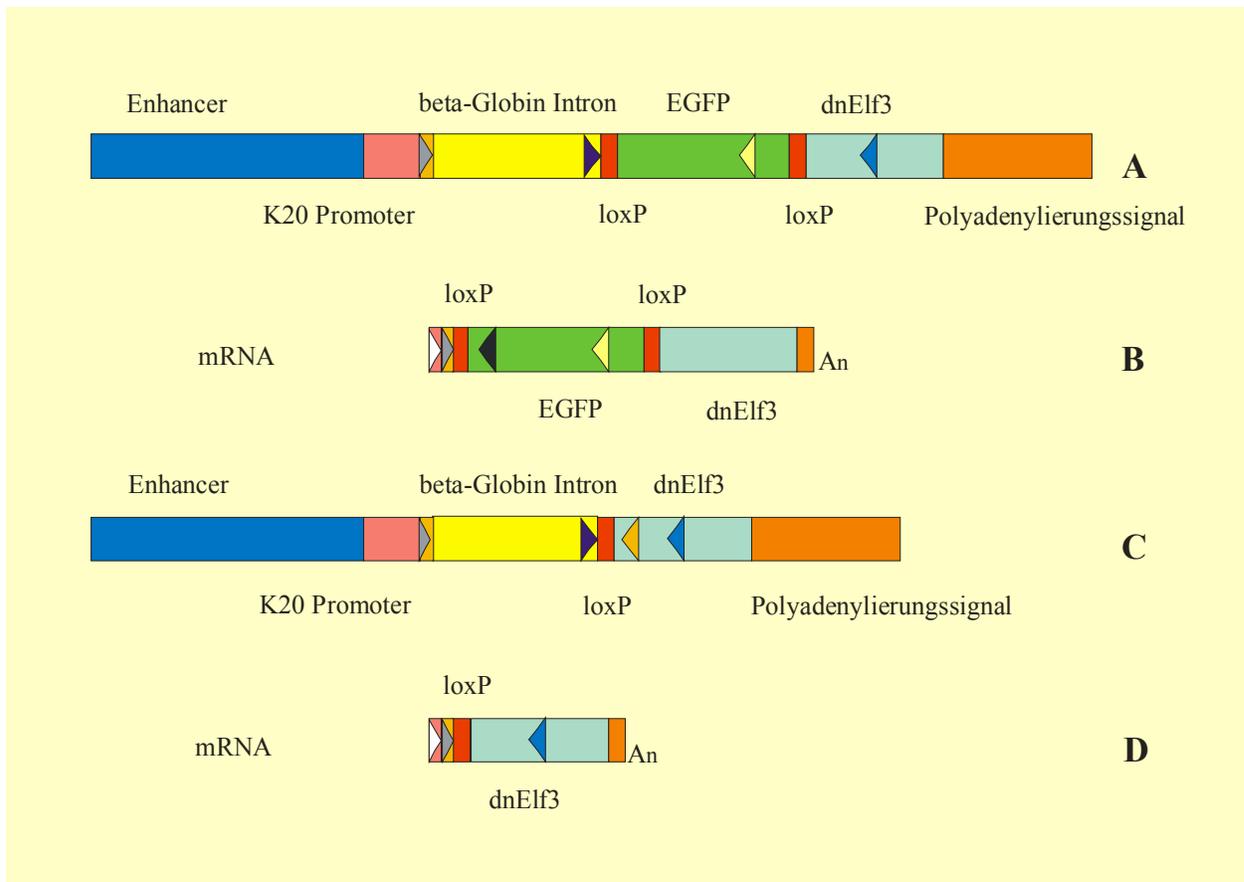


Abb. 3.11 Genomische Rekombination und Intron-Entfernung durch Spleißen

Genomische, nicht rekombinierte DNA (A) wurde mit den Primern beta-Globin Ex2 (graue Pfeilspitze) bzw. rbG1 (dunkelblaue Pfeilspitze) als Vorwärtsprimer und EGFPprev (gelbe Pfeilspitze) bzw. Elf3rev (blaue Pfeilspitze) als Rückwärtsprimer analysiert. Die der mRNA aus einfach transgenen Tieren (B) entsprechende c-DNA wurde mit den Vorwärtsprimer beta-Globin Ex2 oder CK20 RT-II (weiße Pfeilspitze) und den Rückwärtsprimer EGFPprev oder EGFPprev3 (schwarze Pfeilspitze) nachgewiesen. Genomische, rekombinierte DNA (C) wurde mit den Oligonukleotiden beta-Globin Ex2 bzw. rbG1 als Vorwärtsprimer und Elf3rev oder Elf3rev2 (orange Pfeilspitze) analysiert. Die der mRNA aus doppeltransgenen Tieren mit erfolgter genomischer Rekombination (D) entsprechende c-DNA, wurde mit den Oligonukleotiden CK20 RT-II und Elf3rev nachgewiesen. Der Primer CK20 RT-II bindet im 5' nicht-translatierten Bereich des K20. Das Oligonukleotid beta-Globin Ex2 entspricht den 18 Basen des zweiten Exons, die das beta-Globin Intron 5' flankieren (hellorange Segment). An \approx Poly(A)-Schwanz.

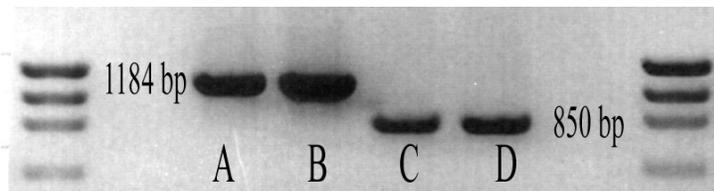


Abb. 3.12 Nachweis der DNA-Rekombination auf genomischer Ebene mittels PCR I

Werden TgEfloxElf-Mäuse mit TgAktinCre-Mäusen verpaart, findet in doppeltransgenen Tieren eine Rekombination auf genomischer Ebene statt. Mittels PCR wurden mit genomischer DNA von einfach transgenen (A, B) bzw. doppeltransgenen Tieren (C, D) als Template, PCR-Produkte in der erwarteten Länge von 1184 bp bzw. 850 bp generiert. Als Vorwärtsprimer wurde beta-Globin Ex2, als Rückwärtsprimer EGFPprev (A, B) bzw. Elf3rev2 (C, D) eingesetzt (siehe 2.1.8). Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174/BsuRI verwendet.

3.3.2 Wurfgröße bei Verpaarung von TgEfloxElf Tieren mit TgAktinCre Mäusen

Wurden homozygote TgEfloxElfA-Tiere mit homozygoten TgAktinCre-Mäusen verpaart, war eine reduzierte Zahl von Jungtieren pro Wurf auffällig. Bei 8 Würfen ergab sich ein Mittelwert von 3,75 Jungtieren pro Wurf. Bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit Wildtyptieren ergab sich ein Mittelwert von 8,63 Jungtieren pro Wurf. Dieser Unterschied ist höchst-signifikant ($P < 0,0001$) (Abb. 3.16). Bei der Verpaarung von heterozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit homozygoten TgAktinCre-Mäusen bzw. mit heterozygoten TgAktinCre-Mäusen entsprach die Anzahl der geborenen doppeltransgenen Tiere nicht der theoretisch erwarteten Anzahl doppeltransgener Nachkommen. Bei 5 Würfen wurden 44 Tiere geboren, davon waren 2 Tiere doppeltransgen, 14 doppeltransgene Tieren wurden erwartet. Bei Verpaarungen von heterozygoten TgEfloxElfC-Tieren mit homozygoten bzw. mit heterozygoten TgAktinCre-Mäusen wurden 30 Tiere geboren, kein Tier war doppeltransgen.

Die Anzahl von Jungtieren pro Wurf bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElf-Tieren mit homozygoten TgAktinCre-Mäusen war signifikant reduziert. Die Anzahl der geborenen, doppeltransgenen Tiere bei der Verpaarung von heterozygoten Tieren wich deutlich von der theoretisch erwarteten Anzahl ab. Aufgrund dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die frühe Expression von dnElf3 pränatal letale Effekte hat.

3.3.3 Nachweis der Expression von EGFP und dnElf3 auf mRNA-Ebene

Um eine Aussage über die Expression von EGFP und dnElf3 auf mRNA-Ebene in einfach transgenen Tieren (TgEfloxElf) und doppeltransgenen Tieren (TgEfloxElf x TgAktinCre) machen zu können, wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Der

Nachweis der EGFP-Expression auf mRNA-Ebene bei einfach transgenen Tieren erfolgte mit den Primern beta-Globin Ex2 und EGFPrev. Damit entstanden PCR-Produkte in der Länge von 610 bp mit cDNA als Template (Abb. 3.13). Der Nachweis der dnElf3 Expression auf mRNA-Ebene bei doppeltransgenen Tieren erfolgte mit den Oligonukleotiden CK20 RT-II und Elf3rev. Damit entstanden PCR-Produkte in der Länge von 350 bp (Abb. 3.14). Einfach transgene Tiere (TgEflorElf) der Linie A zeigten, wie erwartet, eine deutliche Expression von EGFP. Bei den doppeltransgenen Tieren (TgEflorElfA x TgAktinCre) konnte eine deutliche Expression von dnElf3 auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Einfach transgene Tiere der Linien B, C und E zeigten eine schwache EGFP-Expression, bei doppeltransgenen Tieren der Linien B, C und E war die dnElf3 Expression schwach bzw. nicht nachweisbar.

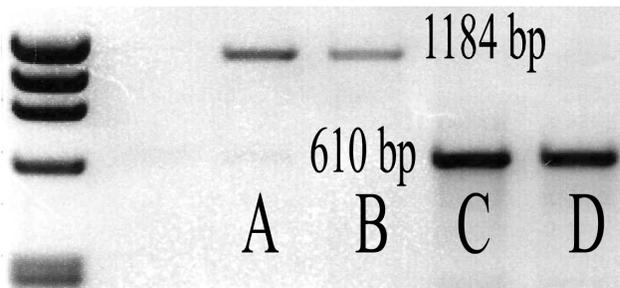


Abb. 3.13 Nachweis der EGFP Expression auf mRNA-Ebene

Der Nachweis der EGFP-Expression auf mRNA-Ebene bei einfach transgenen Tieren erfolgte mit den Primern beta-Globin Ex2 und EGFPrev. Damit entstanden PCR-Produkte in der Länge von 1184 bp mit genomischer DNA als Template (A, B) und PCR-Produkte in der Länge von 610 bp mit cDNA als Template (C, D). Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174/ BsuRI verwendet.

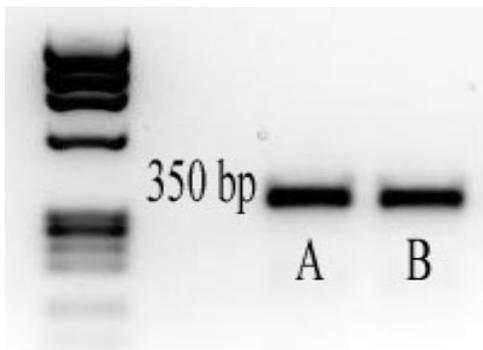


Abb. 3.14 Nachweis der dnElf3 Expression auf mRNA-Ebene I

Bei doppeltransgenen Tieren wird nach erfolgter genomischer Rekombination transgenes dnElf3 exprimiert. Der Nachweis der dnElf3 Expression erfolgte mit den Oligonukleotiden CK20 RT-II und Elf3rev. Damit entstanden PCR-Produkte in der Länge von 350 bp (A, B). Als Marker wurde der DNA Molekulargewichtsstandard ϕ X174/ BsuRI verwendet.

Es konnte also gezeigt werden, dass eine Transkription des Reportergens EGFP unter Kontrolle der K20 regulatorischen Elemente in allen transgenen Linien, allerdings auf unterschiedlich hohem Niveau, erfolgt. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass nach erfolgter genomischer Rekombination die trunkierte dnElf3 c-DNA transkribiert wird, jedoch nicht in allen transgenen Linien.

3.4 Konditional-induzierbares Expressionssystem

3.4.1 Genomische Rekombination durch induzierte Cre-Rekombinaseaktivität

Da aufgrund der reduzierten Wurfgröße bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxEIf-Tieren mit homozygoten TgAktinCre-Mäusen von pränatalen Effekten des Transgens dnElf3 auszugehen war, wurden TgEfloxEIfA- und TgEfloxEIfC-Tiere mit TgRosaCreER-Mäusen gekreuzt. Doppeltransgene Tiere wurden zur Aktivierung des dnElf3-Transgens mit Tamoxifen induziert.

Die Rekombination auf genomischer Ebene konnte mittels PCR gezeigt werden. Mit den Primern rbG1 und Elf3rev2 wurde mit genomischer DNA von einfach transgenen bzw. doppeltransgenen Tieren als Template, PCR-Produkte in der Länge von 1239 bp bzw. 432 bp generiert (Abb. 3.15).

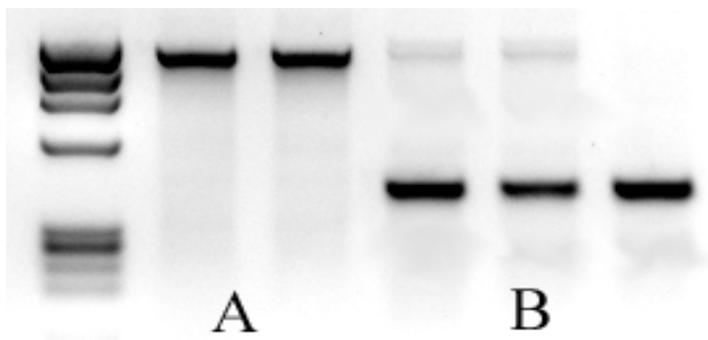


Abb. 3.15 Nachweis der DNA-Rekombination auf genomischer Ebene mittels PCR II

Werden doppeltransgene TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäuse mit Tamoxifen induziert, findet eine Rekombination auf genomischer Ebene statt. Mittels PCR wurden mit genomischer DNA von einfach transgenen (A) und induzierten, doppeltransgenen Tieren (B) als Template, PCR-Produkte in der erwarteten Länge von 1239 bp bzw. 432 bp generiert. Als Vorwärtsprimer wurde rbG1, als Rückwärtsprimer Elf3rev eingesetzt (siehe 2.1.8). Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174/BsuRI verwendet.

3.4.2 Wurfgröße bei Verpaarung von TgEfloxEIf Tieren mit TgRosaCreER-Mäusen

Bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxEIf-Tieren der Linie A mit homozygoten TgRosaCreER-Mäusen wurde keine reduzierte Wurfgröße beobachtet. Es ergab sich ein Mittelwert von 7,00 Jungtieren pro Wurf, im Vergleich dazu betrug die mittlere Wurfstärke bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxEIfA-Tieren mit homozygoten TgAktinCre-Mäusen 3,75 Jungtiere pro Wurf, dieser Unterschied ist signifikant ($p=0,019$). Der Mittelwert von 7,00

Jungtieren unterscheidet sich jedoch nicht signifikant vom Mittelwert von 8,63 Jungtieren pro Wurf, der sich bei der Verpaarung mit Wildtyptieren ergab (Abb. 3.16).

Bei der Verpaarung von heterozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit homozygoten TgRosaCreER-Mäusen bzw. bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit heterozygoten TgRosaCreER-Mäusen und bei der Verpaarung von heterozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit heterozygoten TgRosaCreER-Mäusen wurde keine reduzierte Wurfgröße beobachtet. Die Zahl der geborenen doppeltransgenen Tiere entsprach den theoretisch erwarteten Werten.

Bei der Verpaarung von heterozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit homozygoten TgRosaCreER-Mäusen wurden in vier Würfen 30 Tiere geboren, davon waren 14 Tiere (47%) doppeltransgen. Bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit heterozygoten TgRosaCreER-Mäusen wurden in sechs Würfen 55 Tiere geboren, davon waren 24 Tiere (44%) doppeltransgen. Bei der Verpaarung von heterozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit heterozygoten TgRosaCreER-Mäusen wurden in sechs Würfen 53 Tiere geboren, davon waren 14 Tiere (26%) doppeltransgen. Bei der Verpaarung von heterozygoten TgEfloxElf-Tieren der Linie C mit heterozygoten TgRosaCreER-Mäusen wurden weniger doppeltransgene Tiere geboren als theoretisch erwartet. Bei 12 Würfen wurden 105 Tiere geboren, davon waren 14 statt der erwarteten 26,25 Tiere doppeltransgen. Alle folgenden Untersuchungen wurden an der Linie A durchgeführt, da keine Letalität in nicht-induzierten Tieren auftrat. Lediglich für histologische Untersuchungen wurden vier doppeltransgene TgEfloxElfC x TgRosaCreER-Tiere induziert und Gewebe entnommen.

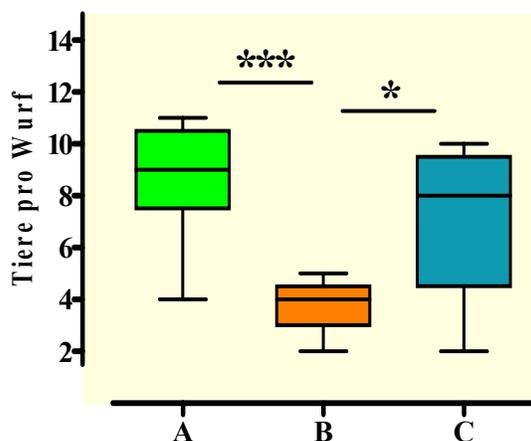


Abb. 3.16: Wurfgröße bei Verpaarung von EGFP^{flox}/dnElf3 Tieren

Bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit Wildtyptieren (A) ergab sich ein Mittelwert von 8,63 Jungtieren pro Wurf. Bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit TgAktinCre-Mäusen (B) errechnete sich bei 8 Würfen ein Mittelwert von 3,75 Jungtieren pro Wurf. Dieser Unterschied ist höchst-signifikant. Bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit homozygoten TgRosaCreER-Mäusen (C) ergab sich bei 8 Würfen ein Mittelwert von 7 Jungtieren pro Wurf. Dieser Unterschied (B vs. C) ist signifikant.

3.4.3 Nachweis der Expression von EGFP und dnElf3 auf mRNA-Ebene

Um eine Aussage über die Expression von dnElf3 auf mRNA-Ebene in doppeltransgenen, induzierten Tieren (TgEfloxE1f x TgRosaCreER) machen zu können, wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt.

Der Nachweis der EGFP-Expression auf mRNA-Ebene bei einfach transgenen Tieren erfolgte mit den Oligonukleotiden CK20 RT-II und EGFPrev3, damit entstanden PCR-Produkte in der Länge von 264 bp. Es konnte also die EGFP-Expression auf mRNA-Ebene bei einfach transgenen Tieren nachgewiesen werden. Der Nachweis der dnElf3 Expression auf mRNA-Ebene erfolgte mit den Oligonukleotiden CK20 RT-II und Elf3rev. Die damit entstanden PCR-Produkte hatten eine Länge von 350 bp (Abb. 3.17). Damit wurde gezeigt, dass nach erfolgter genomischer Rekombination die trunkierte dnElf3 c-DNA unter Kontrolle der K20 regulatorischen Elemente transkribiert wird.

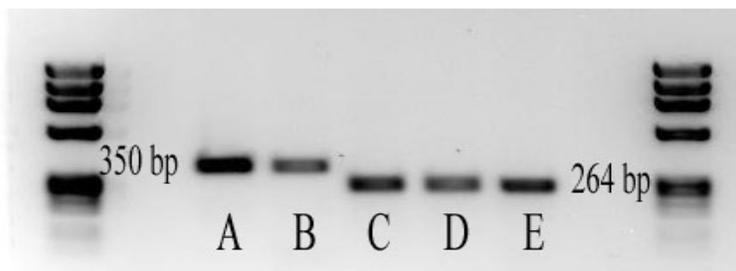


Abb. 3.17 Nachweis der EGFP- und dnElf3-Expression auf mRNA-Ebene

Bei doppeltransgenen, induzierten Tieren wird nach erfolgter genomischer Rekombination transgenes dnElf3 exprimiert. Der Nachweis der dnElf3 Expression auf mRNA-Ebene erfolgte mit den Oligonukleotiden CK20 RT-II und Elf3rev. Damit entstanden PCR-Produkte in der Länge von 350 bp (A, B). Der Nachweis der EGFP-Expression auf mRNA-Ebene bei einfach transgenen Tieren (C, D, E) erfolgte mit den Oligonukleotiden CK20 RT-II und EGFPrev3, damit entstanden PCR-Produkte in der Länge von 264 bp. Als Marker wurde der DNA-Molekulargewichtsstandard ϕ X174/BsuRI verwendet.

3.4.4 Gewichtsverlust und Mortalität nach induzierter Cre-Rekombinase Aktivität

Doppeltransgenen (TgEfloxE1f x TgRosaCreER) Tieren wurde an 5 aufeinander folgenden Tagen 40 μ g Tamoxifen/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Als Kontrollgruppe wurden doppeltransgene, unbehandelte bzw. mit Lösungsmittel (Ethanol/Sonnenblumenöl) behandelte Tiere untersucht.

Die Gewichtsbestimmung nach Induktion ergab einen deutlichen Verlust von Körpergewicht bei den doppeltransgenen, induzierten, männlichen Tieren. Die unbehandelten bzw. mit Lösungsmittel behandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 24,53 g (Standardfehler 0,45; N=10), 12 Tage nach Versuchsbeginn betrug das mittlere Körpergewicht 27,91 g (Standardfehler 0,53; N=10). Die mit Tamoxifen behandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 24,38 g (Standardfehler 0,38; N=10), 12 Tage nach Versuchsbeginn betrug das mittlere Körpergewicht 22,54 g (Standardfehler 0,76, N=10). Der Gewichtsunterschied ($5,37 \pm 0,93$ g) zwischen doppeltransgenen, induzierten Tieren und Tieren der Kontrollgruppe war 12 Tage nach Versuchsbeginn höchst-signifikant ($p < 0,0001$). Die Tiere erholten sich jedoch wieder: 4 Wochen nach Versuchsbeginn hatten die unbehandelten bzw. mit Lösungsmittel behandelten Tiere ein mittleres Körpergewicht von 29,37 g (Standardfehler 0,86), die mit Tamoxifen behandelten Tiere hatten ein mittleres Körpergewicht von 28,36 g (Standardfehler 0,31).

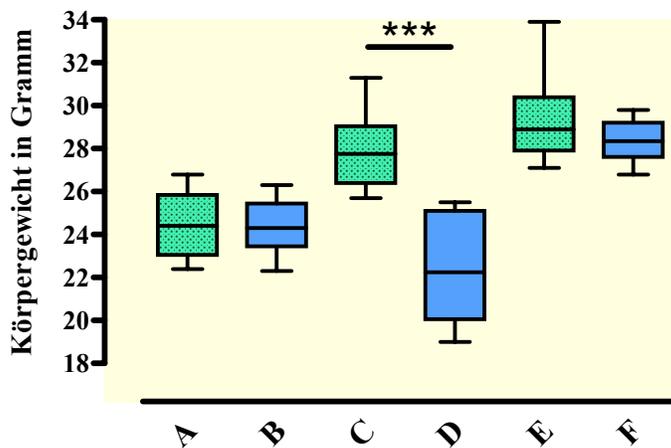


Abb. 3.18 Körpergewicht männlicher Tiere nach induzierter Cre-Rekombinase Aktivität

Doppeltransgenen (TgEflxElf x TgRosaCreER) Tieren wurde Tamoxifen injiziert (B, D, F), die Kontrollgruppe erhielt kein Tamoxifen (A, C, E). Nach Induktion ergab sich einen deutlichen Verlust von Körpergewicht bei doppeltransgenen, induzierten, männlichen Tieren. Die unbehandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 24,53 g (A), 12 Tage nach Versuchsbeginn betrug das mittlere Körpergewicht 27,91 g (C). Die mit Tamoxifen behandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 24,38 g (B), 12 Tage nach Versuchsbeginn betrug das mittlere Körpergewicht 22,54 g (D). Der Gewichtsunterschied C vs. D war höchst-signifikant ($p < 0,0001$). 4 Wochen nach Versuchsbeginn hatten sich die mit Tamoxifen behandelten Tiere jedoch erholt, die Gewichtsbestimmung ergab ein mittleres Körpergewicht von 28,36 g (F), die unbehandelten Tiere hatten ein mittleres Körpergewicht von 29,37 g (E).

Auch bei den doppeltransgenen, induzierten, weiblichen Tieren ergab die Gewichtsbestimmung nach Induktion einen deutlichen Verlust von Körpergewicht, die meisten Tiere starben jedoch bzw. wurde aufgrund des schlechten Zustandes getötet. Die unbehandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 19,37 g (Standardfehler 0,46; N=6), durchschnittlich 8 Tage nach Versuchsbeginn betrug das mittlere Körpergewicht 19,37 g (Standardfehler 0,54). Die mit Tamoxifen behandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 19,52 g (Standardfehler 0,19; N=13), durchschnittlich 8 Tage nach Versuchsbeginn betrug das mittlere Körpergewicht 17,07 g (Standardfehler 0,30; N=13), bei einzelnen Tieren konnte jedoch ein Gewichtsverlust von bis zu 25% des Gesamtgewicht gemessen werden. Der Gewichtsunterschied ($2,30 \pm 0,58$ g) zwischen doppeltransgen, induzierten Tieren und Tieren der Kontrollgruppe war 8 Tage nach Versuchsbeginn höchst-signifikant ($p=0,001$).

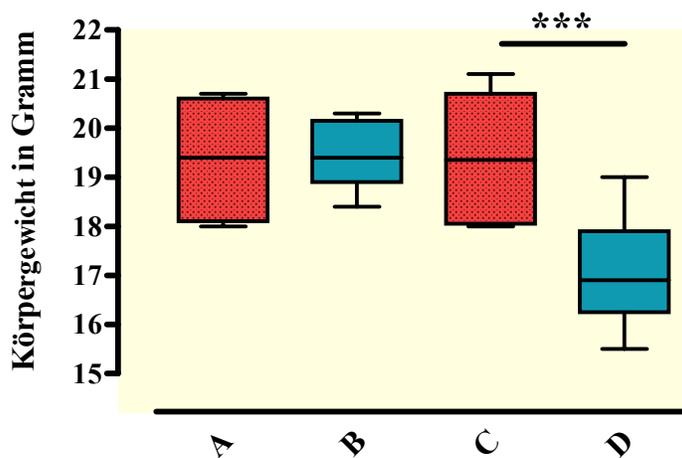


Abb. 3.19 Körpergewicht weiblicher Tiere nach induzierter Cre-Rekombinase Aktivität

Doppeltransgenen (TgEfloxE1f x TgRosaCreER) Tieren wurde Tamoxifen injiziert (B, D), die Kontrollgruppe erhielt kein Tamoxifen (A, C). Nach Induktion der Cre-Rekombinase Aktivität konnte ein deutlicher Verlust von Körpergewicht bei den induzierten Tieren gemessen werden. Die unbehandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 19,37 g (A), durchschnittlich 8 Tage nach Versuchsbeginn war das mittlere Körpergewicht unverändert (C). Die behandelten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Körpergewicht von 19,52 g (B), durchschnittlich 8 Tage nach Versuchsbeginn betrug das mittlere Körpergewicht 17,07 g (D). Der Gewichtsunterschied C vs. D war höchst-signifikant ($p=0,001$).

3.4.5 Pathologische Veränderung der Villus-Architektur

Um mögliche Veränderung der Darmepidermis zu untersuchen, wurden histologische Schnitte von Dün- und Dickdarm von doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1fA x TgRosaCreER- und TgEfloxE1fC x TgRosaCreER-Mäusen in der Phase des Gewichtsverlustes angefertigt und mittels Hämatoxilin/Eosin gefärbt. Als Kontrolle wurde Gewebe von einfachtransgenen, induzierten TgEfloxE1f-Mäusen untersucht.

Dabei zeigt sich eine deutliche Veränderung der Villus-Architektur bei doppeltransgenen, induzierten Tieren beider Linien. Zellkontakte zwischen Enterozyten bzw. zwischen Enterozyten und Becherzellen sind nur unzureichend ausgeprägt, es bilden sich abgerundete Einstülpungen durch einzelne Zellen. Das einschichtige Zylinderepithel, das die Darmzotten umschließt, bildet keine eindeutig abgegrenzte Zellschicht wie bei gesunden Tieren, sondern erscheint ungeordnet. Zahlreiche Enterozyten zeigen nicht den normalen zylindrischen Phänotyp, sondern sind beliebig geformt, die Zellkerne der betroffenen Enterozyten sind ungewöhnlich rund geformt (Abb. 3.20).

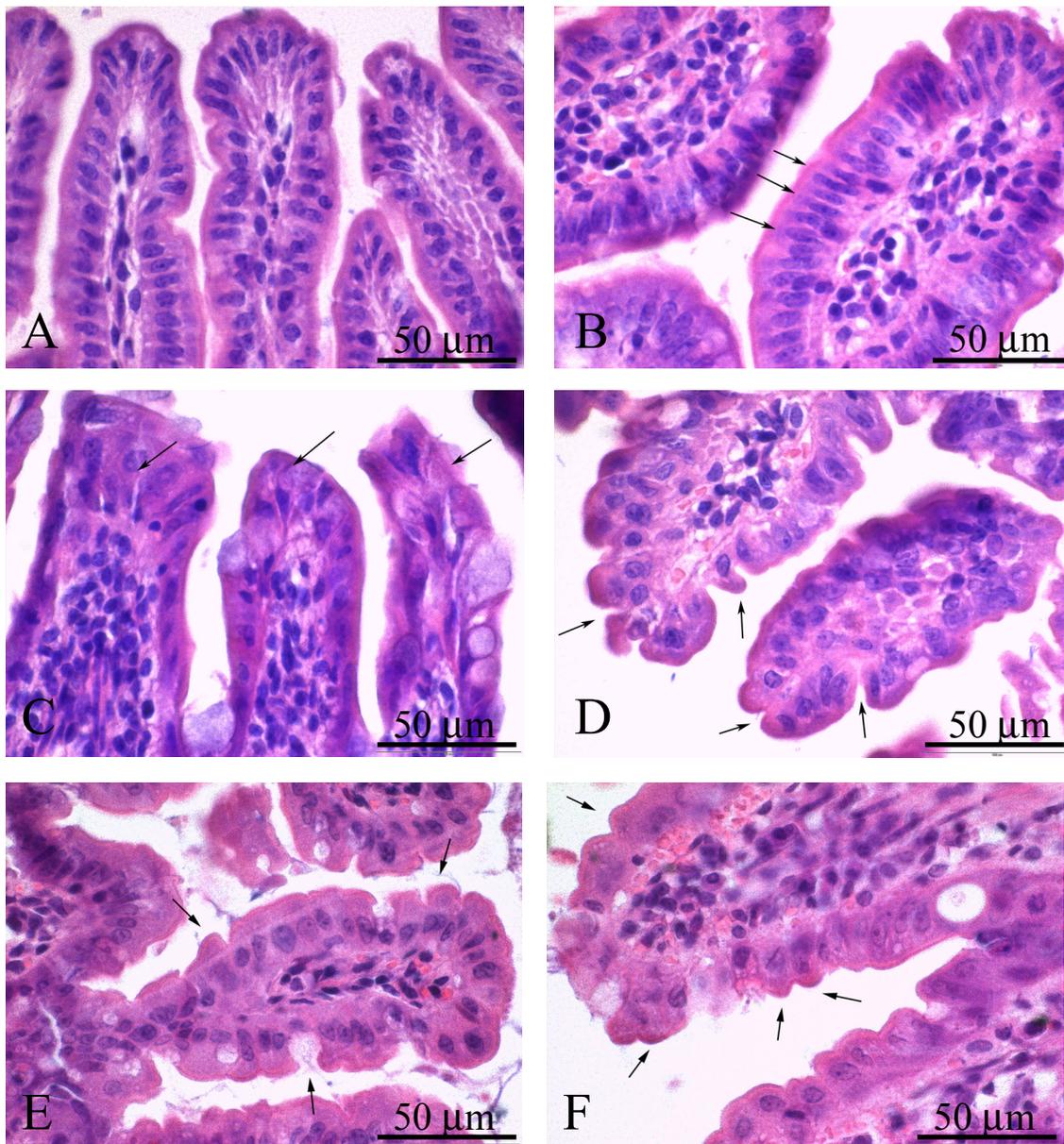


Abb. 3.20 Pathologische Veränderung der Villus-Architektur

Histologische Schnitte des Dünndarms von doppeltransgenen, induzierten TgEflxElfA x TgRosaCreER-Mäusen (C, D), doppeltransgenen, induzierten TgEflxElfC x TgRosaCreER-Mäusen (E, F) und von Tieren der Kontrollgruppe (A, B) wurden mittels Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Dabei zeigte sich eine deutliche Veränderung der Villus-Architektur bei doppeltransgenen, induzierten Tieren. Zellkontakte sind nur unzureichend ausgeprägt, es bilden sich abgerundete Einstülpungen durch einzelne Zellen. Bei doppeltransgenen, induzierten Tieren bildet das einschichtige Zylinderepithel keine eindeutig abgegrenzte Zellschicht wie bei gesunden Tieren, sondern erscheint ungeordnet. Zahlreiche Enterozyten sind nicht zylindrisch, sondern beliebig geformt, die Zellkerne vieler Enterozyten sind ungewöhnlich rund geformt.

3.4.6 Becherzellen und Schleimproduktion

Um eine mögliche Veränderung der Anzahl der Becherzellen und der Schleimproduktion zu untersuchen, wurden histologische Schnitte von Dünndarm und Dickdarm von doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Mäusen in der Phase des Gewichtsverlustes angefertigt und mittels Periodsäure-Leukofuchsin (PAS)-Färbung und Alcianblau/Kernechtrot-Färbung gefärbt.

Als Kontrolle wurde Gewebe von doppeltransgenen, nicht-induzierten TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Mäusen, von einfachtransgenen, induzierten TgEfloxE1f-Mäusen und von doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen, die wieder Normalgewicht erreicht hatten, untersucht.

Die Hauptbestandteile des Schleims sind Glykoproteine, so genannte Muzine. Sie werden in neutrale und saure Muzine eingeteilt, wobei die Polysaccharide der sauren Muzine mit Sulfatgruppen oder Sialinsäuregruppen verbunden sein können (Deplancke and Gaskins, 2001). Mittels PAS-Färbung können neutrale Muzine angefärbt werden (violette Färbung), mit Alcianblau können saure Mukosubstanzen (Glykosaminoglykane) dargestellt werden (hellblaue Färbung).

Im Dünndarm (Ileum) von doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen in der Phase des Gewichtsverlustes zeigte sich bei zahlreichen Darmzotten eine erhöhte Anzahl von Becherzellen mit deutlich vergrößerter muköser Granula. Auch bei Darmzotten ohne erkennbar erhöhte Anzahl von Becherzellen war die muköse Granula deutlich vergrößert.

Im Colon konnte kein Unterschied zwischen doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen und Geweben der Kontrollgruppe in Bezug auf Anzahl der Becherzellen und Größe der Granula festgestellt werden (Abb. 3.21).

3.4.7 Nachweis von EGFP mittels qRT-PCR

Die Expression des Markergens EGFP wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1 (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1). Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode. Im Ileum einfach transgener TgEfloxE1f-Mäuse konnte eine Expression von EGFP auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäuse (in und nach der akuten Phase des Gewichtsverlustes) konnte nur eine minimale Expression von EGFP

nachgewiesen werden, die einer Reduktion der Expression auf ca. ein Tausendstel des Expressionsniveaus einfach transgener TgEfloxE1fA-Mäuse entspricht (relative Expression 1,028 (N=4) vers. 0,001 (N=6) (Daten nicht gezeigt).

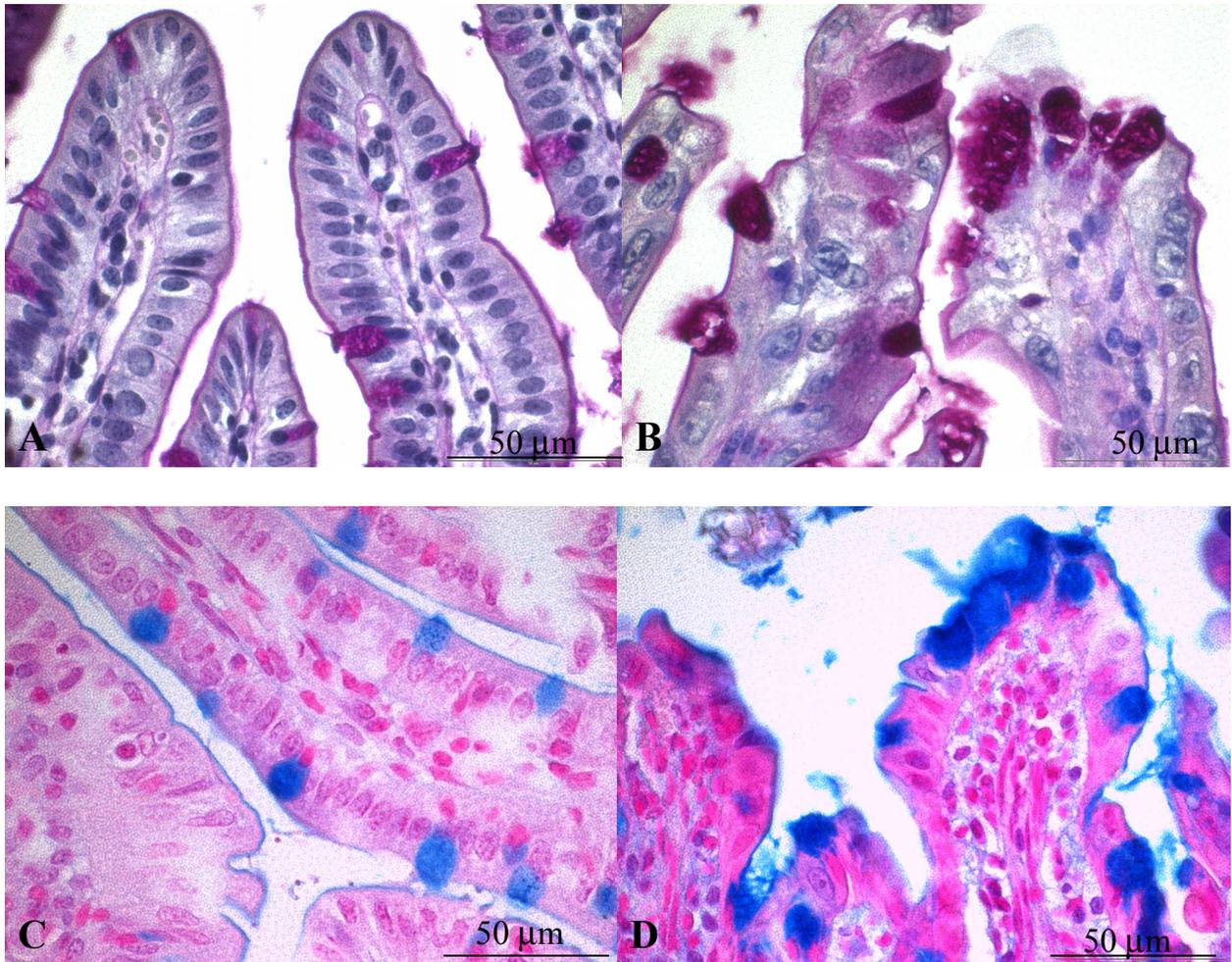


Abb. 3.21 Becherzellen und Schleimproduktion

Histologische Schnitte des Dünndarms von doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Mäusen in der akuten Phase des Gewichtsverlustes (B, D), von einem einfach transgenen TgEfloxE1fA-Tier (C) sowie von einer doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Maus 8 Wochen nach Induktion (A) wurden mittels PAS Färbung (A, B) und Alcianblau/Kernechtrot-Färbung (C, D) gefärbt. Dabei zeigte sich bei einzelnen Darmzotten von doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Mäusen in der akuten Phase des Gewichtsverlustes eine erhöhte Anzahl von Becherzellen mit deutlich vergrößerter muköser Granula.

3.4.8 Nachweis von dnElf3 mittels qRT-PCR

Die Expression von dnElf3 wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Expression von dnElf3 wurde im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes, im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse, die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt hatten, und im Ileum einfach transgener TgEfloxElf-Mäuse bestimmt. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode.

Im Ileum der einzeltransgenen TgEfloxElf-Mäuse konnte keine Expression von dnElf3 nachgewiesen werden. Im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes konnte eine starke Expression mittels qRT-PCR gemessen werden. Bei männlichen, doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen, die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt hatten und wieder ein Körpergewicht entsprechend der einzeltransgenen Vergleichsgruppe erreicht hatten, konnte ebenfalls eine Expression von dnElf3 nachgewiesen werden, jedoch auf einem niedrigerem Niveau. Bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen in der akuten Phase des Gewichtsverlustes betrug die relative Expression von dnElf3 im Ileum 1,08 (N=7), bei männlichen, doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen, die wieder ein Körpergewicht entsprechend der einzeltransgenen Vergleichsgruppe erreicht hatten, betrug die relative Expression von dnElf3 im Ileum 0,64 (N=6), dieser Unterschied war nicht signifikant.

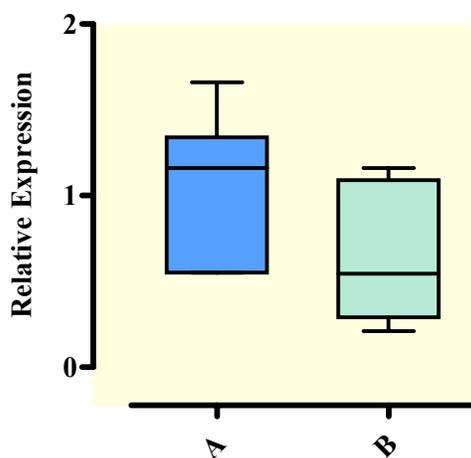


Abb. 3.22 Relative Expression von dnElf3

Die relative Expression von dnElf3 wurde im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes (A) sowie nach der akuten Phase des Gewichtsverlustes (B) bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode. Es zeigte sich eine nichtsignifikante Reduktion der dnElf3 Expression, die relative Expression betrug 1,08 (N=7) (A) gegen 0,64 (N=6) (B).

3.4.9 Nachweis von endogenem Elf3 mittels qRT-PCR

Die Expression von endogenem Elf3 wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Expression von endogenem Elf3 wurde im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes, im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse, die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt hatten, und im Ileum einfach transgener TgEfloxElf-Mäuse bestimmt. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode.

Endogenes Elf3 konnte im Ileum der einzeltransgenen TgEfloxElf-Mäuse, im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes und bei männlichen, doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen, die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt hatten und wieder ein Körpergewicht entsprechend der einzeltransgenen Vergleichsgruppe erreicht hatten, nachgewiesen werden.

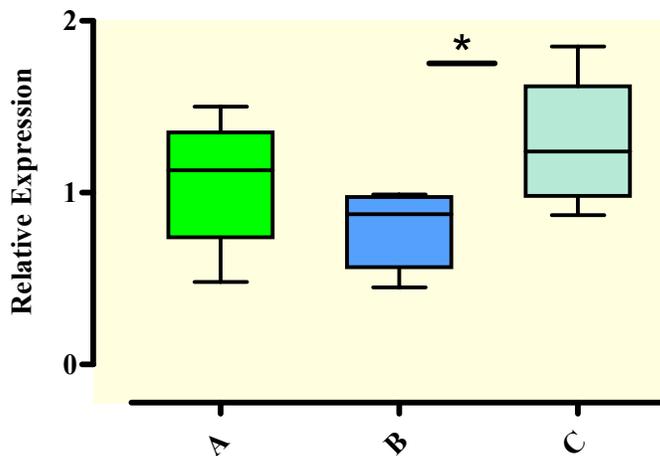


Abb.3.23: Relative Expression von endogenem Elf3

Die relative Expression von endogenem Elf3 wurde im Ileum einfachtransgener TgEfloxElf-Mäuse (A), im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes (B) sowie nach der der akuten Phase des Gewichtsverlustes (C) bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von endogenem Elf3 bei Tieren, die wieder ein Körpergewicht entsprechend Kontrollgruppe erreicht hatten, die relative Expression betrug 0,81 (N=6) (B) gegen 1,30 (N=4) (C).

Bei einfachtransgenen TgEfloxElf-Mäusen betrug die relative Expression von endogenem Elf3 im Ileum 1,07 (N=6). Bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen in der akuten Phase des Gewichtsverlustes betrug die relative Expression von endogenem Elf3 im Ileum 0,81 (N=6), bei männlichen, doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen, die wieder ein Körpergewicht entsprechend Kontrollgruppe erreicht hatten, betrug die relative Expression von endogenem Elf3 im Ileum 1,30 (N=4), dieser Unterschied war signifikant ($p=0,037$).

3.4.10 Nachweis von Elf3 auf Proteinebene mittels Immun-Histologie

Die Expression von Elf3 wurde auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Untersucht wurde die Expression von Elf3 im Colon- und Ileum doppeltransgenen TgEfloxElf x TgAktinCre-Mäuse, im Colon- und Ileum doppeltransgener, nicht-induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse, im Colon- und Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse während und nach der akuten Phase des Gewichtsverlustes, sowie im Colon- und Ileum einfach transgener TgEfloxElf-Mäuse.

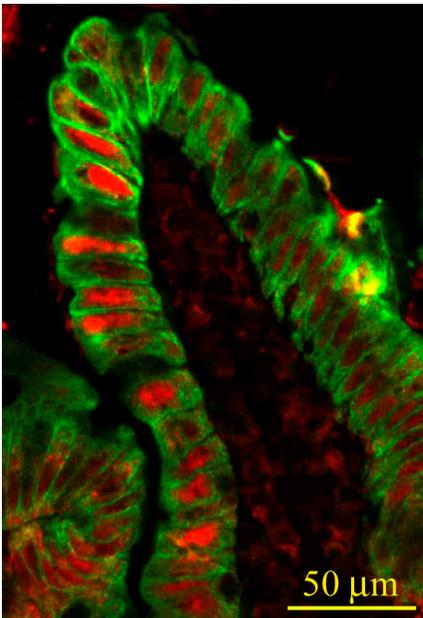


Abb. 3.24 Elf3- und Keratin 20- Expression im murinen Darm

Die immunhistologische Detektion von Elf3 im Dünndarm einer doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER Maus erfolgte mit α -Elf3 Antikörpern (rote Fluoreszenz) im Fluoreszenzmikroskop. Die immunhistologische Detektion von K20 erfolgte mit α -K20 Antikörpern (grüne Fluoreszenz) im Fluoreszenzmikroskop.

Im Darmgewebe von einfach transgenen TgEfloxEIf-Mäusen und doppeltransgenen TgEfloxEIf x TgAktinCre-Mäusen konnte kein EIf3 im Zellkern der Enterozyten nachgewiesen werden.

Im Colon- und Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäuse konnte EIf3 bei Tieren in der akuten Phase des Gewichtsverlustes, und bei Tieren die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt hatten, im Zellkern von Enterozyten nachgewiesen werden. Allerdings war auch bei einzelnen doppeltransgenen, nicht-induzierten TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäusen ein Nachweis von EIf3 im Zellkern von Enterozyten möglich.

3.4.11 Verminderte Expression des Proteins Claudin-7

Die Expression von Claudin-7 wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Expression von Claudin-7 wurde im Colon und Ileum einfach transgener TgEfloxEIfA-Mäuse, im Colon und Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIfA x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes sowie im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIfA x TgRosaCreER-Mäuse, die sich erholt hatten, bestimmt.

Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Claudin-7 Expression auf mRNA-Ebene im Colon und Ileum bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEIfA x TgRosaCreER-Mäusen in der akuten Phase des Gewichtsverlustes.

Bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäusen betrug die relative Expression im Colon 0,61 (N=6), der Wert der Kontrollgruppe war 1,06 (N=6). Im Ileum betrug die relative Expression von Claudin-7 bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäusen 0,53 (N=10), der Wert der Kontrollgruppe war 1,03 (N=7). Die Reduktion der Expression war im Colon signifikant ($p=0,0426$), im Ileum höchst-signifikant ($p=0,0008$). Dabei war die Claudin-7 Expression im Dünndarm höher als im Dickdarm. Vergleicht man die Expression in den verschiedenen Geweben bei einfach transgenen Tieren, so betrug die relative Expression im Ileum 1,68 (N=7) verglichen mit 1,06 im Colon (N=6).

Bei männlichen, doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEIfA x TgRosaCreER-Mäusen, die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt hatten und wieder ein Körpergewicht entsprechend der Vergleichsgruppe erreicht hatten, zeigte sich, dass die Claudin-7 Expression wieder angestiegen war und kein signifikanter Unterschied zur einfach transgenen Vergleichsgruppe bestand (relative Expression im Ileum 1,29 (N=6) zu 1,03 (N=7)) (Abb. 3.25).

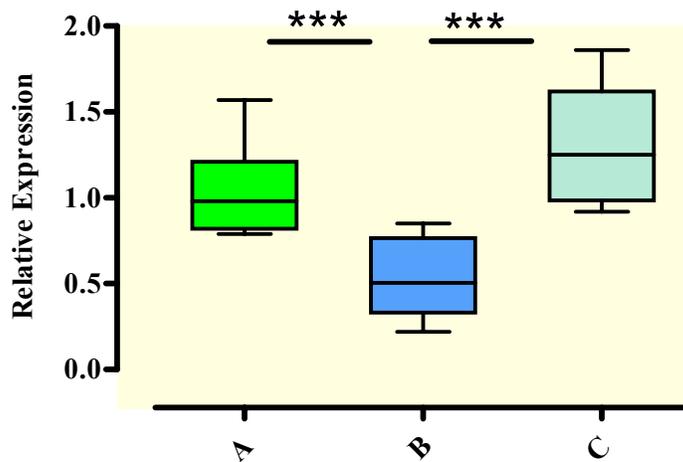


Abb. 3.25 Relative Expression von Claudin-7

Die relative Expression von Claudin-7 wurde im Ileum einfach transgener TgEfloxE1fA-Mäuse (A), im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes (B) sowie im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Mäuse, die wieder ein Körpergewicht entsprechend der einzeltransgenen Vergleichsgruppe erreicht hatten (C) bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode. Es zeigte sich eine höchst-signifikante Reduktion der Claudin-7 Expression bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1fA x TgRosaCreER-Mäusen in der akuten Phase des Gewichtsverlustes ($p=0,0008$). Bei dieser Gruppe betrug die relative Expression 0,53 (N=10), der Wert der Kontrollgruppe war 1,03 (N=7). Die relative Expression bei den Tieren, die sich wieder erholt hatten, betrug 1,29 (N=6). Der Unterschied B vs. C ist höchst-signifikant ($p<0,0001$).

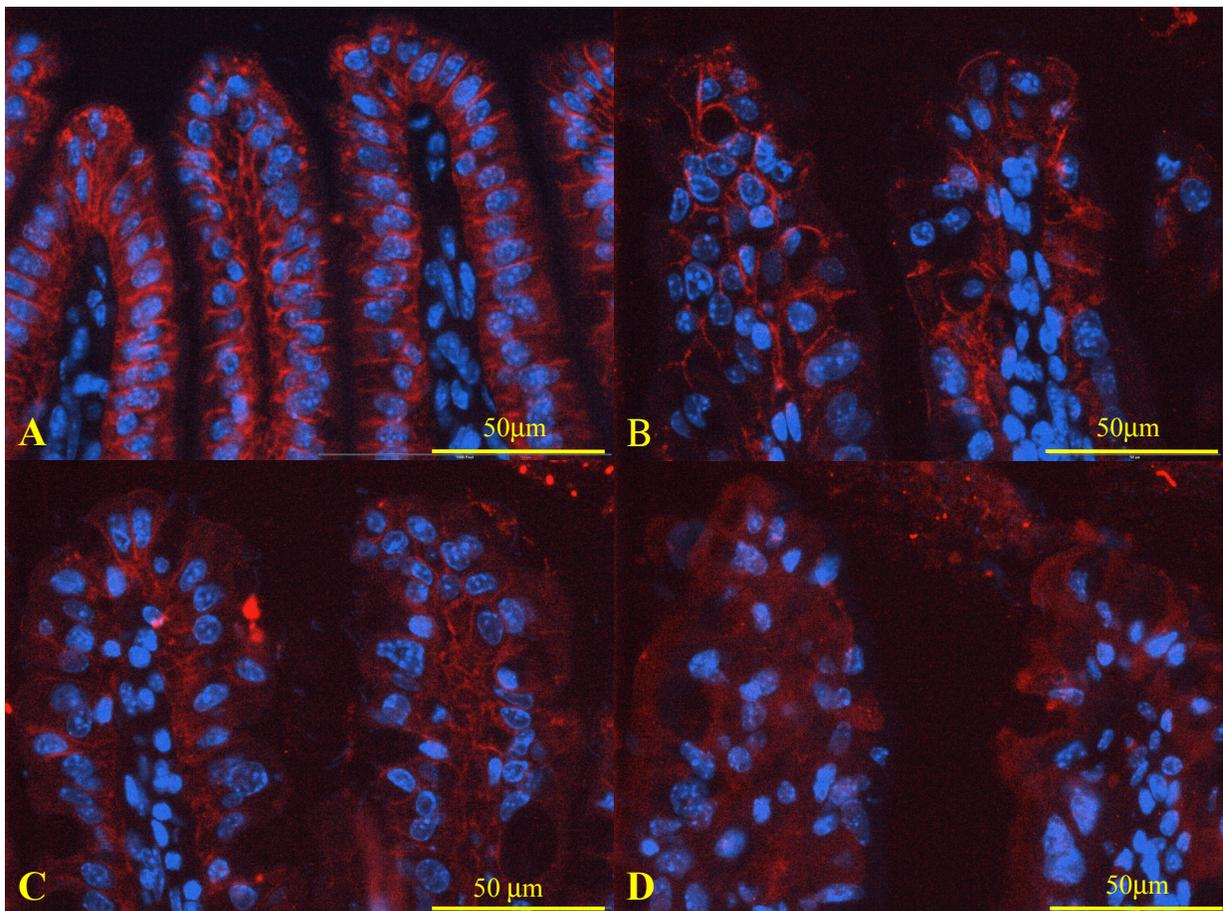


Abb. 3.26 Immunhistologischer Nachweis von Claudin-7 im murinen Ileum

Die Expression von Claudin-7 wurde im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäuse (B, C, D) sowie einfach transgener TgEfloxE1f-Mäuse (A) immunhistologisch untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Claudin-7 Expression der Enterozyten bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen. Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt.

Die Expression von Claudin-7 wurde auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Untersucht wurde die Expression von Claudin-7 in Colon- und Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäuse sowie in Colon- und Ileum einfachtransgener Mäuse. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Claudin-7 Expression der Enterozyten bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen im Ileum, wobei Claudin-7 sowohl im apikalen als auch im basolateralen Bereich der Zellmembran exprimiert wird.

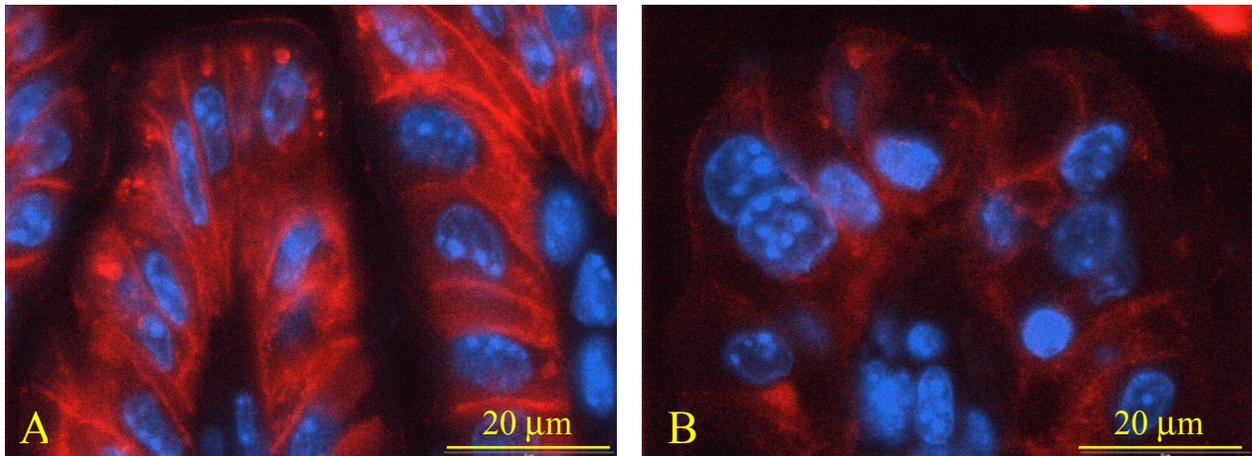


Abb. 3.27 Immunhistologischer Nachweis von Claudin-7 im murinen Ileum II

Die Expression von Claudin-7 wurde im Ileum einfach transgener TgEfloxE1f-Mäuse (A) sowie bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen (B) immunhistologisch untersucht. Es konnte eine deutliche Reduktion der Claudin-7 Expression der Enterozyten bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen beobachtet werden. Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt. Die Zellkerne der betroffenen Enterozyten sind ungewöhnlich rund geformt und zum Teil stark vergrößert.

Um Artefakte aufgrund der Präparation der Gewebe bzw. Schnittdicke auszuschließen, wurden zusätzliche Aufnahmen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt. Die Expression von Claudin-7 im basolateralen Membranbereich der Enterozyten wurde mit dieser Methode bestätigt, ebenso wie eine reduzierte Expression von Claudin-7 in doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen.

Ein weiterer Nachweis der negativ regulierten Expression von Claudin-7 erfolgte mittels Western-Blot Analyse. Gesamtproteine aus Dünndarmgewebe einfach transgener TgEfloxE1f und doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäuse wurde auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem anti-Claudin-7 Antikörper hybridisiert. In doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f-Mäusen zeigte sich eine deutlich verminderte Expression von Claudin-7.

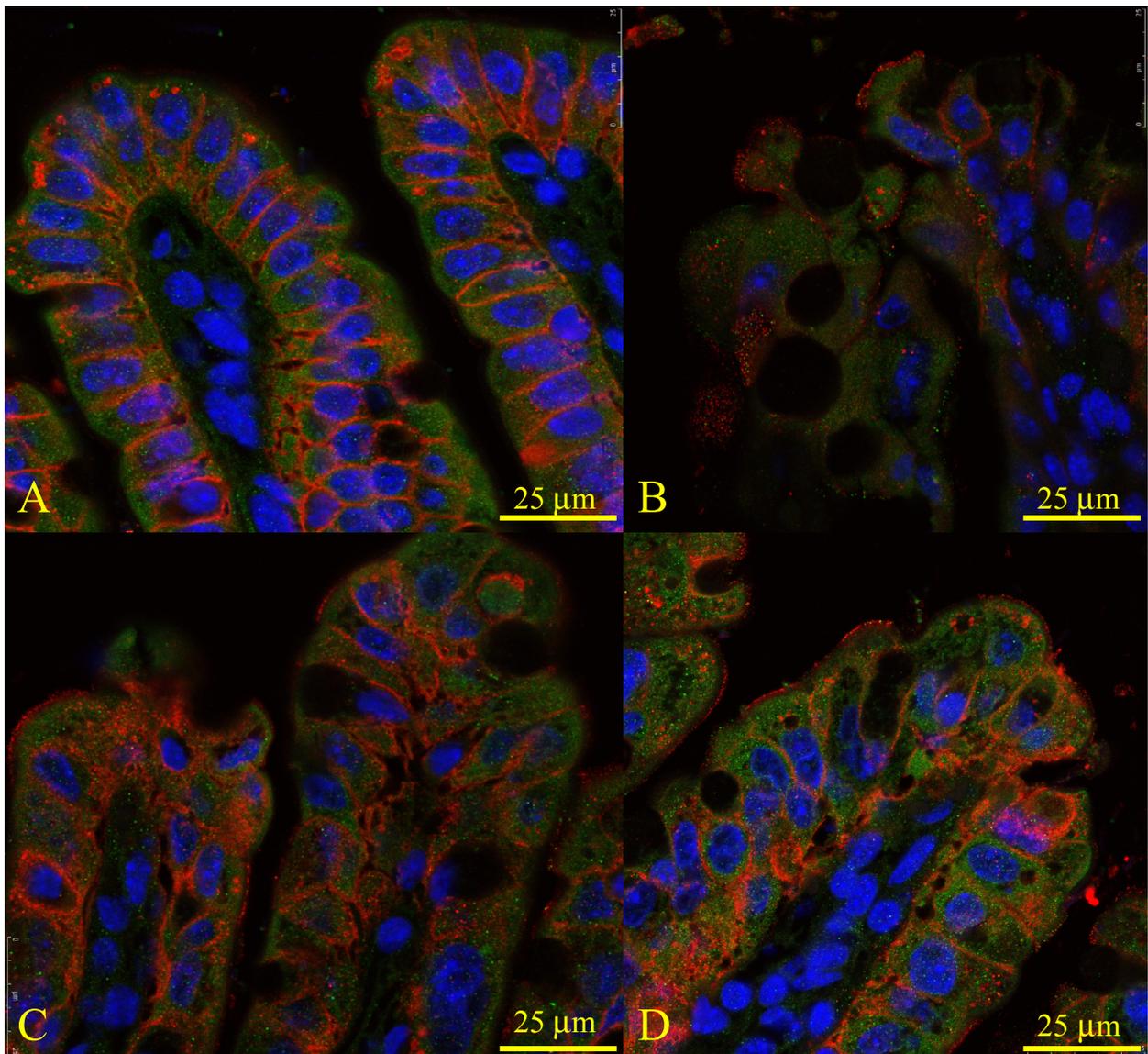


Abb. 3.28 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zum Nachweis von Claudin-7 im Ileum

Die Expression von Claudin-7 wurde im Ileum einfach transgener TgEfloxE1f-Mäuse (A) und doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäuse (B, C, D) immunhistologisch untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Claudin-7 Expression in den Epithelzellen bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen. Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt.

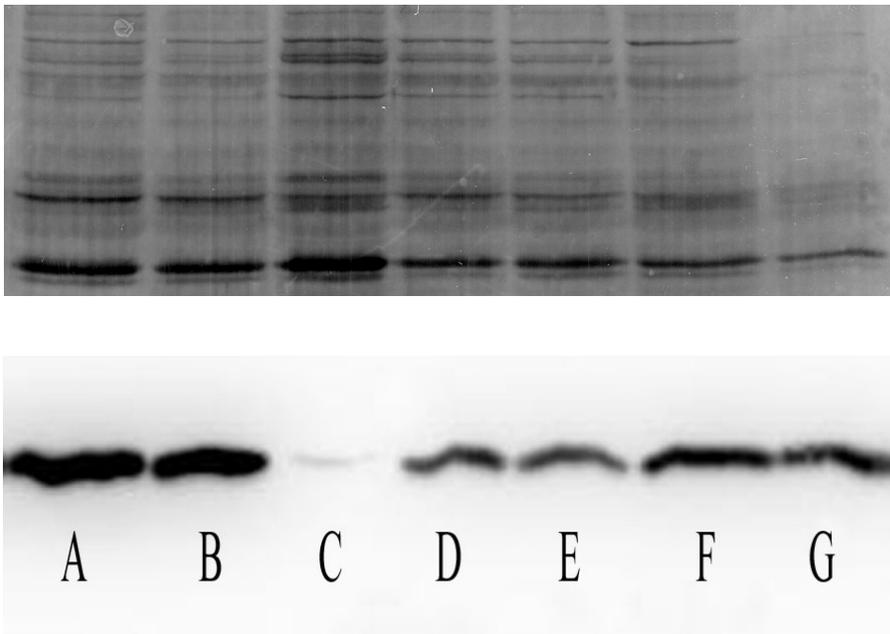


Abb. 3.29 Western-Blot zum Nachweis von Claudin-7 im murinen Ileum

Aus Dünndarmgewebe (Ileum) einfach transgener TgEfloxEIf (A, B) und doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIf-Mäuse (C-G) wurde Gesamtprotein isoliert. Von jeder Probe wurden 20µg Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Claudin-7 wurde mittels Ziege-anti-Claudin-7 Antikörper detektiert. In den doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEIf-Mäusen zeigte sich eine deutlich verminderte Expression von Claudin-7, dabei war die Expression im Ileum stark betroffener Tiere (C) geringer als im Ileum mittelschwer betroffener Tiere (D, E) bzw. schwach betroffener Tiere. Als Ladekontrolle wurde der Blot mit Tinte gefärbt.

3.4.12 Expression des Proteins *transforming growth factor-beta* Rezeptor II

Die Expression von *transforming growth factor-beta* Rezeptor II (TGF-beta RII) wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Es erfolgte eine Bestimmung der relativen Expression von TGF-beta RII im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäuse, in bzw. nach der akuten Phase des Gewichtsverlustes, sowie bei einfach transgenen TgEfloxEIf-Mäusen. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode.

Es konnte keine signifikante Veränderung der TGF-beta RII Expression festgestellt werden, jedoch wurde in der Gruppe der Tiere, die sich in der akuten Phase des Gewichtsverlustes befanden, eine hohe Varianz der Werte auffällig, was auf eine stark erhöhte TGF-beta RII Expression bei einzelnen Tieren zurückzuführen ist.

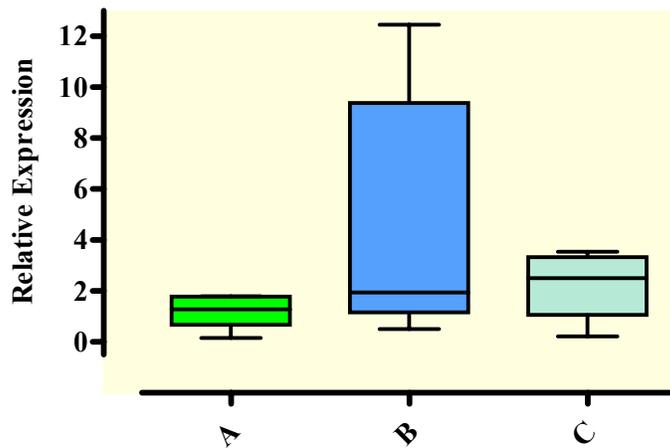


Abb. 3.30 Relative Expression des TGF-beta RII im murinen Ileum

Die relative Expression von TGF-beta RII wurde im Ileum einfach transgener TgEfloxEIf-Mäuse (A), (N=6), doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes (B), (N=7), sowie im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäuse, die wieder ein Körpergewicht entsprechend der einzeltransgenen Vergleichsgruppe erreicht hatten (C), (N=5) bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ Methode. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der TGF-beta RII Expression bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäusen, jedoch konnte in der Gruppe der Tiere in der akuten Phase des Gewichtsverlustes eine hohe Varianz der Werte festgestellt werden.

Die TGF-beta RII Expression wurde auch mittels Western-Blot bzw. Immunhistologie untersucht, jedoch konnte auch mit diesen Untersuchungsmethoden keine durchgängige Erhöhung bzw. Reduktion der Expression von TGF-beta RII in den untersuchten Tiergruppen festgestellt werden.

3.4.13 Expression der Proteine Keratin 8 und Keratin 18

Die Expression von K8 und 18 wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Es erfolgte eine Bestimmung der relativen Expression im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäuse in der akuten Phase des Gewichtsverlustes, sowie im Ileum einfach transgener TgEfloxEIf-Mäuse. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ Methode. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der K8 Expression bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEIf x TgRosaCreER-Mäusen, bei diesen Tieren betrug die relative Expression im Ileum 0,69 (N=10), der Wert der Kontrollgruppe war 1,06 (N=7). Es zeigte sich ein Anstieg der K18 Expression, der jedoch nicht signifikant

war. Die relative Expression von K18 im Ileum betrug bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen 1,78 (N=8) gegenüber einfach transgenen TgEfloxE1f-Mäusen 1,13 (N=6).

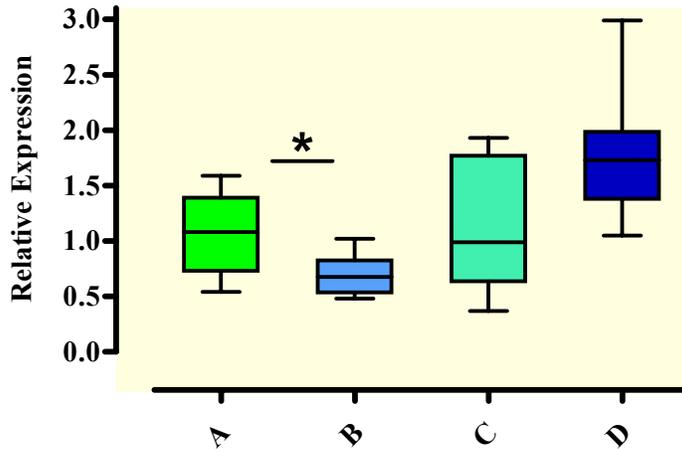


Abb. 3.31 Relative Expression von Keratin 8 und Keratin 18

Die relative Expression von K8 (A, B) und K18 (C, D) wurde im Ileum einfach transgener TgEfloxE1f-Mäuse (A, C) und doppeltransgener, induzierter TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäuse (B, D) bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT1. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der K8 Expression bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen, die relative Expression im Ileum betrug 0,69 (N=10), der Wert der Kontrollgruppe war 1,06 (N=7), $p=0,014$. Es konnte keine signifikante Veränderung der K18 Expression festgestellt werden.

4. Diskussion

Ets-Transkriptionsfaktoren bilden eine große Familie mit unterschiedlichen, wichtigen Funktionen in Entwicklung und Pathogenese. Zahlreiche Ets-Transkriptionsfaktoren werden im sich entwickelnden oder im erwachsenen Darm zellspezifisch und/oder zeitabhängig exprimiert (Choi *et al.*, 2006; Hollenhorst *et al.*, 2004; Lepourcelet *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Transkriptionsfaktors Elf3 im Epithel des murinen Darms genauer untersucht werden. Der Transkriptionsfaktor Elf3 wurde 1997 als erster epithel-spezifischer Transkriptionsfaktor der Ets-Familie beschrieben (Oettgen *et al.*, 1997). Besonders stark ist die Expression im gastrointestinalen Trakt (Hollenhorst *et al.*, 2004), hier spielt Elf3 eine wichtige Rolle in der terminalen Differenzierung der epithelialen Zellen (Ng *et al.*, 2002). In einem transgenen Mausmodell konnte unter Kontrolle von Enhancer- und Promotor-Fragmenten des humanen K20-Gens ein dominant-negativer Elf3 Transkriptionsfaktor mittels Cre/loxP-System exprimiert werden.

4.1 Regulatorische Elemente des K20-Gens und die Expression von EGFP in Zellkultur

Regulatorische Elemente des humanen K20-Gens ermöglichen die Expression des Reportergens EGFP in humanen Colon-Karzinom-Zelllinien. K20 wird in gastrointestinalen Epithelien und in Tumoren dieser Gewebe exprimiert. Auch Zelllinien, die aus Tumoren des Colon gewonnen wurden, wie die humanen Colon-Karzinom-Zelllinien HT-29, DLD-1 oder CaCo-2 exprimieren K20 (Moll *et al.*, 1995; Moll *et al.*, 1992; Moll *et al.*, 1993). Wilhelmi konnte eine Reporterexpression in HT-29 Zellen, die mit verschiedenen EGFP-Expressionsvektoren transfiziert wurden, zeigen. Die Expressionsvektoren enthielten unterschiedlich große *upstream* Bereiche des K20-Gens, die komplette Exon/Intronsequenz ohne die ersten 347 bp des ersten Exons oder nur ein Fragment aus dem Exon/Intronbereich und einen 3,9 kb großen *downstream* Bereich des humanen K20 (Wilhelmi, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden HT-29 Zellen mit verschiedenen EGFP-Expressionsvektoren transfiziert, die putative Enhancer- und Promotor-Fragmente des humanen K20-Gens enthalten. Als mögliche Enhancersequenzen galten DNA-Abschnitte mit potentiellen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1,

die eine wichtige Rolle bei der Regulation epithelialer Promotoren spielen (Sinha *et al.*, 2000; Wilhelmi, 2002).

Es zeigte sich nur eine schwache Expression bei den Vektoren, die potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1 in kurzen Fragmenten in direkter Abfolge enthielten. Die Transfektion der HT-29 Zellen mit Expressionsvektoren, welche die potentiellen regulatorischen Elemente entsprechend der genomischen Anordnung im *upstream* Bereich des K20-Gens enthielten, führte zu einer starken Expression des Reportergens. Möglicherweise entsprechen die von dem Programm 'Proscan' vorhergesagten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1 nicht den tatsächlichen Bindungsstellen. Die genannten Ergebnisse lassen jedoch auch die Schlussfolgerung zu, dass isolierte Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1 in Kombination mit dem K20-Promotor nicht ausreichen um eine starke Expression in Zellkultur zu gewährleisten und Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren nötig sind.

4.2 Regulatorische Elemente des K20-Gens und die Expression von Transgenen im murinen Darmepithel

Regulatorische Elemente des humanen K20-Gens ermöglichen die darmepithelspezifische Expression im murinen Darm. K20 transgene Mäuse wurden erstmals 2003 publiziert. Die transgenen Tiere wurden mit einer 18 kb großen, genomischen DNA für humanes K20 generiert. Diese DNA umfasst einen 4,8 kb großen *upstream* Bereich, die komplette Exon/Intronsequenz und einen 3,9 kb großen *downstream* Bereich. Bei diesen Mäusen konnte eine Expression von humanem K20 in Dünndarm- und Dickdarm, Blase und Merkelzellen mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2003). Wilhelmi generierte transgene Mäuse, die ebenfalls einen 4,8 kb großen *upstream* Bereich, die komplette Exon/Intronsequenz und einen 3,9 kb großen *downstream* Bereich des humanen K20 enthielten. Lediglich die ersten 347 bp des ersten Exons waren entfernt und durch eine cDNA für TGF-beta bzw. eine cDNA für den dnTGF-beta RII ersetzt. Es konnte eine Expression der Transgene auf mRNA-Ebene gezeigt werden, der Nachweis auf Proteinebene gelang nicht. Auch die Verlängerung des *upstream* Bereiches auf 21,5 kb führte nicht zu einer nachweisbaren Proteinexpression in transgenen Mäusen (Wilhelmi, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Expressionsvektoren enthalten putative regulatorische Elemente, die bis zu 26,5 kb vom Transkriptionsstart entfernt

sind, jedoch keine Exon/Intronsequenzen bzw. *downstream* Bereiche des humanen K20-Gens. Es konnte bei zwei transgenen Mausmodellen eine Expression des Transgens auf Proteinebene festgestellt werden. Bei der Untersuchung der transgenen Mäuse mit dem EGFP-Expressionsvektor EV II konnte die Expression des Reportengens EGFP im gesamten gastrointestinalen Trakt, auch im Magen, gezeigt werden. Im Mausmodell von Zhou konnte keine Expression des transgenen, humanen K20 im Magen nachgewiesen werden, wohingegen das endogene, murine K20 im Magen vorhanden war. Es wurde schlussfolgert, dass regulatorische Elemente, die die Expression im Magen steuern außerhalb des 18kb großen genomischen Konstruktes liegen oder von der murinen Transkriptionsmaschinerie nicht erkannt werden (Zhou *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die regulatorischen Elemente des humanen K20-Gens, die eine Expression in Zellkultur humaner Colon-Karzinomzellen zulassen auch eine gewebespezifische und ausreichend starke Expression im transgenen Mausmodell gewährleisten. Das heißt, dass die regulatorischen Elemente, die für eine Expression im Epithel des gastrointestinalen Traktes nötig sind, weder im *downstream* Bereich noch in der Exon/Intronsequenz des humanen K20-Gens liegen und von der murinen Transkriptionsmaschinerie erkannt werden.

4.3 Generierung und Phänotyp transgener EGFP^{flox}/dnElf3-Mauslinien

Fünf transgene Foundertiere ermöglichten die Züchtung von vier transgenen Linien. Die transgenen Tiere zeigten keinerlei sichtbare Auffälligkeiten, sondern waren fertil und zeigten normale Größe und Gewicht. Daher ist davon auszugehen, dass die Zufallsintegration der Vektor-DNA in einen Bereich des Genoms erfolgte, der nicht für die Vitalität der generierten Tiere entscheidend ist. Die EGFP Expression der TgEflorfloxElf-Mauslinien (EV VII) war deutlich schwächer als die EGFP-Expression der EGFP-Mauslinien (EV II). Dies könnte auf eine fehlende Polyadenylierungssequenz für EGFP oder eine geringere Kopienzahl der integrierten DNA zurückzuführen sein. Jedoch sind auch andere Faktoren für die Expressionsstärke ausschlaggebend.

Wird ein Transgen unter Kontrolle einer LCR (*locus control region*) exprimiert, so ist die Expression des Transgens abhängig von der Kopienzahl und unabhängig vom Integrationsort der DNA (Grosveld *et al.*, 1987; Zhuma *et al.*, 1999). Ohne LCR ist der Integrationsort für die Expressionsstärke und -muster entscheidender als die Kopienzahl. Sequenzen die proximal der

Integrationsseite liegen, können die Transgenexpression positiv oder negativ beeinflussen. Eine hohe Kopienzahl kann sogar zu einer schwächeren Expression führen, da der repetitive Charakter der integrierten DNA die Bildung von Heterochromatin induzieren kann (Clark *et al.*, 1994; Garrick *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2008). Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die loxP-Sequenzen, die 5' und 3' des EGFP einkloniert wurden, die Transkription des Reportergens beeinflussen.

4.4 Konstitutive Expression des dominant-negativen Transkriptionsfaktors E1f3

Die konstitutive Expression von dnE1f3 hat pränatal letale Wirkung. Bei der Verpaarung von homozygoten TgE1floxE1fA-Tieren mit homozygoten TgAktinCre-Mäusen war eine signifikant reduzierte Zahl von Jungtieren pro Wurf auffällig. Bei der Verpaarung von heterozygoten Tieren war die Anzahl der geborenen doppeltransgenen Tiere deutlich geringer als die theoretisch erwartete Anzahl. Bei Verpaarungen von heterozygoten TgE1floxE1fC-Tieren mit TgAktinCre-Mäusen wurde kein doppeltransgenes Tier geboren. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der von Ng beschriebenen Beobachtung, dass 30% der E1f3-Knockout-Föten *in utero* sterben (Ng *et al.*, 2002).

Pränatal letale Effekte bei der Verwendung von Cre-Rekombinase Linien mit ubiquitärer, früher Expression wurden bereits von verschiedenen Autoren publiziert. Bei der Verpaarung dieser Cre-Rekombinase-Mäuse mit Linien, deren Transgen gefloxt ist, werden keine doppeltransgenen Tiere geboren, bzw. die Anzahl der geborenen doppeltransgenen Tieren entspricht nicht den theoretischen Erwartungen (Klopčic, 2002; Lázaro, 2005; Meyer, 2003).

Bei der Untersuchung der Rolle von Ets-Faktoren bei der Entwicklung muriner Embryos wurde mittels Microarray-Analyse festgestellt, dass die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie, unter anderem E1f3, nach der Befruchtung der Keimzellen anstieg. Die Unterdrückung dieser Transkriptionsfaktoren mittels RNA-Interferenz reduzierte signifikant die Anzahl der sich entwickelnden Embryonen (Kageyama *et al.*, 2006).

Ein Merkmal embryonaler Transkription ist die häufige Verwendung von Promotoren ohne TATA-Sequenz. Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung dieser Promotoren. Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie bei

der Bildung des Initiationskomplexes bei Promotoren mit fehlender TATA Sequenz wurde bereits 1993 beschrieben (Nothias *et al.*, 1995; Wasylyk *et al.*, 1993).

Aufgrund der signifikant reduzierten Anzahl von Jungtieren pro Wurf bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElf-Tieren mit homozygoten TgAktinCre-Mäusen und der deutlichen Abweichung der Anzahl der doppeltransgenen, geborenen Tiere bei der Verpaarung von heterozygoten Tieren von der theoretisch erwarteten Anzahl, muss davon ausgegangen werden, dass die frühe Expression von dnElf3 pränatal letale Effekte hat. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass Ets-Bindungsstellen in Promotoren von Genen, die für die Embryonal-Entwicklung entscheidende Bedeutung haben, durch dnElf3 blockiert sind. Überlebende, doppeltransgenen Jungtiere waren phänotypisch unauffällig, offensichtlich können sich einzelne Embryonen *in utero* an die dnElf3 Expression adaptieren.

4.5 Konditional-induzierbare Expression von dnElf3

Durch die konditional-induzierbare Expression von dnElf3 können pränatal letale Effekte verhindert werden. Bei der Verpaarung von homozygoten TgEfloxElfA-Tieren mit homozygoten TgRosaCreER-Mäusen war keine signifikant reduzierte Zahl von Jungtieren pro Wurf auffällig. Bei der Verpaarung von heterozygoten Tieren der Linie A entsprach die Anzahl der geborenen doppeltransgenen Tiere der theoretisch erwarteten Anzahl.

Durch die konditional-induzierbare Expression von dnElf3 kann die von Ng (Ng *et al.*, 2002) beim Elf3-Knockout beschriebene fötale Letalität umgangen werden. Es wird möglich die Funktion von Elf3 nicht nur im Embryo, sondern in einem späteren Entwicklungsstadium zu untersuchen.

Eine Hintergrundaktivität der Cre-Rekombinase bei Tamoxifen-induzierbaren Mausmodellen wurde von verschiedenen Autoren publiziert. Eine starke Hintergrund-Rekombination wurde unter anderem für epitheliale Zellen des Dünndarms beschrieben. Bei einem Vergleich der spontanen Rekombination in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Mauslinien zeigte sich bei 12% der Dünndarmkrypten einer R26Cre-Mauslinie ligandenunabhängige Rekombination (Kemp *et al.*, 2004). Hintergrundaktivität der Cre-Rekombinase konnte auch in 1-5% der Zellen in Duodenum und Pankreas einer R26Cre-Mauslinie festgestellt werden (Vooijs *et al.*, 2001). Hayashi zeigte Hintergrund-Rekombination in verschiedenen Mausgeweben (Hayashi and McMahon, 2002).

Die oben genannten Ergebnisse sprechen dafür, dass bei der Linie TgEfloxE1fA die Hintergrundexpression ohne Induktion so minimal ist, dass keine pränatal letalen Effekte auftreten. Bei der Verpaarung von heterozygoten TgEfloxE1fC-Tieren mit TgRosaCreER-Mäusen wurden nur halb so viele doppeltransgene Tiere geboren als theoretisch erwartet, was für eine Hintergrundexpression mit pränatal letalen Effekten spricht. Da es unwahrscheinlich ist, dass die Hintergrundaktivität der Cre-Rekombinase bei den untersuchten Linien unterschiedlich stark ist, kann nur der Einfluss des jeweiligen Integrationsortes die beobachteten Effekte erklären.

Wenn das Transgen in eine Genregion integriert, die früh in der Embryonalentwicklung transkribiert wird, kann es zu einer, durch Hintergrundexpression der Cre-Rekombinase bedingten, frühen Expression des dnE1f3 kommen, mit letalen Effekten in der Embryogenese. Falls das Transgen in eine Genregion integriert, die nicht oder nur schwach während der Embryonalentwicklung transkribiert wird, bleiben letale Effekte in der Embryonalentwicklung aus.

Die Integration eines Transgens in entwicklungsabhängiges, fakultatives Heterochromatin beeinflusst dessen Expression. Das Phänomen der *position effect variegation* wurde bereits mehrfach beschrieben (Festenstein and Kioussis, 2000; Williams *et al.*, 2008).

Unvollständige Rekombination und die Entstehung von Mosaik-Gewebe kann zu widersprüchlichen oder schwer interpretierbaren Ergebnissen führen. Ob eine vollständige oder unvollständige Rekombination bei Tamoxifen-induzierter Cre-Rekombinase-Aktivität stattfindet ist abhängig vom untersuchten Gewebe, Gewebespezifität der Cre-Rekombinase, gefloxtem Gen und Menge des verabreichten Tamoxifens (Brake *et al.*, 2004; Hayashi and McMahon, 2002; Kemp *et al.*, 2004; Vooijs *et al.*, 2001).

4.6 Pathologische Veränderung der Villus-Architektur

Die induzierte Expression von dnE1f3 bedingt pathologische Veränderungen der Villus-Architektur. Bei der histologischen Untersuchung von Dünndarmgewebe von doppeltransgenen, induzierten TgEfloxE1f x TgRosaCreER-Mäusen zeigte sich eine deutliche Veränderung der Villus-Architektur. Zellkontakte zwischen den Epithelzellen waren nur unzureichend ausgeprägt, es bildeten sich abgerundete Einstülpungen durch einzelne Zellen. Das einschichtige Zylinderepithel erschien ungeordnet, zahlreiche Enterozyten zeigten nicht den normalen zylindrischen Phänotyp, sondern beliebige Gestalt. Damit weist der von uns beschriebene

Phänotyp Ähnlichkeit mit dem von Ng für den Elf3-Knockout beschriebenen Phänotyp auf. Die Arbeitsgruppe von Ng konnte bei dem untersuchten Knockout eine starke Veränderung der Gewebearchitektur mit Einstülpungen des Zylinderepithels der Villi feststellen. (Ng *et al.*, 2002). Obwohl die Expression von 24 Mitgliedern der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren im humanen Colon und die Expression von 25 Ets-Transkriptionsfaktoren im humanen Dünndarm mittels RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Hollenhorst *et al.*, 2004), wurde bis heute nur ein Mausmodell mit genetisch inaktiviertem Ets-Transkriptionsfaktor publiziert, das einen intestinalen Phänotyp zeigt (Jedlicka and Gutierrez-Hartmann, 2008; Ng *et al.*, 2002). Das mag darauf zurückzuführen sein, dass kein anderer Ets-Transkriptionsfaktor so stark und weitgehend gewebespezifisch im Darm exprimiert wird wie Elf3. ESE-3 wird ebenfalls stark in Dün- und Dickdarm exprimiert, zeigt aber die stärkste Expression in der Prostata. Ets-2, neben Elf3 und ESE-3 der am stärksten im Darm exprimierte Ets-Transkriptionsfaktor, wurde in allen untersuchten Geweben nachgewiesen und lies keine Gewebespezifität erkennen (Hollenhorst *et al.*, 2004). Die beschriebenen pathologischen Veränderungen der Villus-Architektur wurden auch bei einer erblichen, bei 1 von 50.000 bis 100.000 Lebendgeburten in Westeuropa auftretenden Krankheit festgestellt, der '*Intestinal epithelial dysplasia*' (IED), auch als '*Tufting enteropathy*' beschrieben. Bei der IED konnte eine erhöhte Expression von Desmoglein und eine veränderte Struktur der Desmosomen beobachtet werden, Ursachen der Pathogenese sind jedoch bis jetzt ungeklärt (Goulet *et al.*, 2007). Ob ähnliche Veränderungen bei Zellverbindungen zu einem vergleichbaren pathologischen Phänotyp führen, bedarf der weiteren Untersuchung.

4.7 Becherzellen und Schleimproduktion

Die induzierte Expression von dnElf3 führt zu einer erhöhten Anzahl von Becherzellen und einer verstärkten Muzin-Produktion im Ileum. Im Ileum zeigte sich bei zahlreichen Darmzotten von doppeltransgenen, induzierten TgEflorElf x TgRosaCreER-Mäusen in der Phase des Gewichtsverlustes eine erhöhte Anzahl von Becherzellen mit deutlich vergrößerter muköser Granula. In diesem Punkt unterscheidet sich das hier untersuchte transgene Mausmodell deutlich von dem von Ng publizierten Elf3-Knockout, der eine reduzierte Anzahl von Sialomuzine produzierenden Becherzellen und eine gleich bleibende Anzahl vom Sulfomuzine produzierenden Becherzellen in Duodenum und Ileum von Embryonen (E18.5) zeigt. Laut Ng reguliert Elf3 die Entwicklung der Becherzellen und wird für eine gesunde Morphogenese benötigt. (Ng *et al.*,

2002). Bei Kreuzungen von Elf3-Knockout-Mäusen mit darmspezifisch TGF-beta RII überexprimierenden Tieren wurde ebenfalls die Anzahl der Sialomuzine produzierenden Becherzellen bei doppel- und einzeltransgenen Embryonen (E 18.5) bestimmt, auch hier war bei den Elf3-Knockout-Tieren die Anzahl der Sialomuzine produzierenden Becherzellen reduziert (Flentjar *et al.*, 2007). Außer von der genannten Arbeitsgruppe wurde bis jetzt kein Zusammenhang zwischen Elf3 und Becherzellen publiziert.

In vitro Untersuchungen des MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9) -Promotors in Plattenepithel-Karzinomzellen lassen darauf schließen, dass Elf3 die Expression von MMP-9 durch transkriptionelle Suppression über die Ets-Bindungsstelle hemmt (Iwai *et al.*, 2008).

MMP-9 Knockout-Mäuse haben eine erhöhte Anzahl von Becherzellen und zeigen eine verstärkte Expression des Muzins MUC-2 im Colon. Mittels semi-quantitativer PCR wurde eine verstärkte Expression von Elf3 bei MMP-9 *-/-* Tieren nachgewiesen. Bei der Gabe von Colitis-auslösenden Agenzien zeigen die MMP-9 Knockout-Mäuse eine verminderte inflammatorischer Reaktion. In Zellkultur inhibiert eine erhöhte MMP-9-Expression die Differenzierung von Becherzellen (Garg *et al.*, 2007).

Die bisher publizierten Daten würden bei dem in dieser Arbeit beschriebenen transgenen Tiermodell eine verminderte Anzahl von Becherzellen und eine reduzierte Schleimproduktion erwarten lassen. Das ist nicht der Fall. Allerdings sind die hier beschriebenen Ergebnisse nur bedingt mit den bis dato veröffentlichten Daten vergleichbar. Ng und Flentjar untersuchten Dünndarmgewebe von Embryonen, der Darm dieser Tiere war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme noch nicht mit Nahrung in Berührung gekommen und hatte keinen Verdauungsprozess erfahren (Flentjar *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2002). Zwar nehmen Embryonen intrauterin Fruchtwasser auf und resorbieren aus diesem Aminosäuren und Glucose, dieser Vorgang kann jedoch nicht als vollständiger Verdauungsprozess betrachtet werden (Ross and Nijland, 1998).

Der Zusammenhang zwischen Elf3 und MMP-9 bzw. MMP-9 und Becherzellen wurde in Plattenepithel-Karzinomzellen und im Colon untersucht (Garg *et al.*, 2007; Iwai *et al.*, 2008). Eine vermehrte Anzahl von Becherzellen und eine erhöhte Schleimproduktion konnte nur im Ileum von doppeltransgenen, induzierten TgEflorElf x TgRosaCreER-Mäusen in der Phase des Gewichtsverlustes festgestellt werden. Im Colon konnte kein Unterschied in Bezug auf Anzahl der Becherzellen und Größe der Granula festgestellt werden. Ob die vergrößerte muköse Granula

der hier untersuchten Tiere nur auf die verstärkte Produktion von Muzinen oder auch auf eine gestörte Degranulation zurückzuführen ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.8 Gewichtsverlust und Mortalität

Die induzierte Expression von dnElf3 führt zu einem Gewichtsverlust bis hin zum Tod der betroffenen Tiere. Doppeltransgene, induzierte Tiere zeigten nach Induktion einen deutlichen Verlust von Körpergewicht. Beim Elf3-Knockout ist das Körpergewicht von homozygoten Tieren gegenüber heterozygoten bzw. Wildtyp-Tieren bereits bei der Geburt signifikant geringer. Dieser signifikante Gewichtsunterschied besteht auch noch im Alter von 21 Tagen. Ng führt das reduzierte Körpergewicht bei homozygoten Knockout-Mäusen auf Probleme bei der Verdauung und/oder Resorption der Nährstoffe zurück. Erst im Alter von 6 Wochen haben überlebende, homozygote Knockout-Mäuse ein Gewicht, das dem der Kontrollgruppe entspricht. (Ng *et al.*, 2002). Ein reduziertes Körpergewicht bei homozygoten Elf3-Knockout-Föten (E18.5) wurde 2007 bestätigt (Flentjar *et al.*, 2007).

Bei Mausföten im Alter von 18.5 Tagen läuft kein vollständiger Verdauungsprozess ab, sondern es erfolgt lediglich eine Resorption von Aminosäuren, Glucose und anderen gelösten Stoffen aus dem Fruchtwasser (Ross and Nijland, 1998). Dennoch haben homozygote Elf3-Knockout-Föten ein reduziertes Körpergewicht. Dass dieses reduzierte Körpergewicht Folge einer gestörten Resorption ist, scheint also nahe liegender als eine gestörte Verdauung als Ursache.

Während in Duodenum und Jejunum vor allem der enzymatische Abbau der Nahrung erfolgt, findet die Resorption von Nährstoffen weitgehend im Ileum statt (Campbell, 1997). Bei der Untersuchung von doppeltransgenen, induzierten TgEflxElf x TgRosaCreER-Mäusen in der Phase des Gewichtsverlustes wurden pathologische Veränderung der Villus-Architektur im Ileum festgestellt, die dafür sprechen dass die Resorption der veränderten Enterozyten gestört ist.

Darüber hinaus ist bei doppeltransgenen, induzierten TgEflxElf x TgRosaCreER-Mäusen die Zahl der Becherzellen bei einzelnen Darmzotten stark erhöht und die muköse Granula der Becherzellen deutlich vergrößert. Eine vermehrte Schleimproduktion und der damit verbundene Schleimfluss bewegt den Lumeninhalt mit Nährstoffen von den Epithelzellen fort und reduziert die Diffusion von Molekülen aus dem Darmlumen zu den Enterozyten (Snoeck *et al.*, 2005).

Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde auch eine verminderte Zahl von Mikrovilli bei Elf3-Knockout-Mäusen festgestellt (Ng *et al.*, 2002). Mikrovilli vergrößern die

Darmoberfläche erheblich und sind somit für eine Resorption des Darmes unerlässlich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen ebenfalls die Zahl der Mikrovilli reduziert ist.

Der Gewichtsverlust der untersuchten, doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse und die pathologische Veränderung der Villus-Architektur im Ileum dieser Tiere sprechen dafür, dass die Resorption der veränderten Enterozyten gestört ist. Möglicherweise tragen aber auch eine gesteigerte Mukusproduktion und eine verminderte Anzahl von Mikrovilli zum Gewichtsverlust der betroffenen Tiere bei.

4.9 Expression von EGFP und dnElf3

Die Entfernung des geflochten Reportergens EGFP durch Cre-Rekombinase in adulten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen führt zu einer Expression von dnElf3 auf mRNA und Proteinniveau. Die Expression des Markergens EGFP konnte im Dünn- und Dickdarm einfach transgener TgEfloxElf-Mäuse auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse in und nach der akuten Phase des Gewichtsverlustes konnte mittels qRT-PCR nur eine sehr geringe Expression von EGFP nachgewiesen werden, die einer Verminderung der Expression auf ca. ein Tausendstel des Expressionsniveaus einfach transgener TgEfloxElf-Mäuse entspricht. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Erholung der betroffenen Tiere nicht darauf zurückzuführen ist, dass Stammzellen bzw. Progenitorzellen mit nicht-rekombinierter DNA zu einem Austausch von dnElf3 exprimierenden Enterozyten durch EGFP exprimierende Epithelzellen entlang der Villi führen.

Würde eine Verdrängung von Enterozyten mit rekombinierter DNA durch Zellen mit nicht-rekombinierte DNA erfolgen, dürfte keine Expression von dnElf3 im Ileum der doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse nach der akuten Phase des Gewichtsverlustes nachgewiesen werden. Das ist nicht der Fall. Bei diesen Tieren, die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt haben und wieder ein Körpergewicht entsprechend der einzeltransgenen Vergleichsgruppe erreicht hatten, konnte eine deutliche Expression von dnElf3 nachgewiesen werden, allerdings auf einem geringeren Niveau.

Darüber hinaus könnte die Rekonvaleszenz der Versuchstiere auch auf eine Hochregulation des endogenen Elf3, das transgenes dnElf3 von den Ets-Bindungsstellen verdrängt, zurückzuführen sein. Tatsächlich konnte mittels qRT-PCR ein signifikanter Unterschied der Expressionsstärke

auf mRNA-Ebene von endogenem Elf3 im Ileum der doppeltransgenen, induzierten TgEflxElf x TgRosaCreER-Mäuse während und nach der akuten Phase des Gewichtsverlustes nachgewiesen werden.

Es ist auch in Betracht zu ziehen, dass andere Familienmitglieder der Ets-Familie hochreguliert werden und transgenes dnElf3 von den Ets-Bindungsstellen verdrängen. In Frage kommen mit Elf3 nah verwandte Ets-Familienmitglieder wie ELF1, ELF2, ELF4, ELF5/ESE-2 und Ehf/ESE-3. Dass diese Transkriptionsfaktoren im murinen Dünndarm exprimiert werden, konnte mittels SAGE (*serial analysis of gene expression*) und RT-PCR nachgewiesen werden (Choi *et al.*, 2006; Lepourcelet *et al.*, 2005). Auch eine potentielle kompensatorische Aktivität durch ko-exprimierte Ets-Transkriptionsfaktoren wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Bartel *et al.*, 2000; Cesari *et al.*, 2004; Jedlicka and Gutierrez-Hartmann, 2008; Paratore *et al.*, 2002). Dass eine Kompensation von Elf3 erfolgen kann, zeigt der Elf3-Knockout von Ng, immerhin 30% der homozygoten Tiere überleben und haben im Alter von 6 Wochen ein normales Körpergewicht (Ng *et al.*, 2002).

4.10 Vorkommen und Expression von Claudin-7

Der Transkriptionsfaktor Elf3 reguliert die Expression des Transmembranproteins Claudin-7 in murinen Enterozyten. Die Expression eines dominant-negativen Expressionsfaktors dnElf3 führt zu einer verminderten Expression von Claudin-7 und dadurch zu morphologischen Veränderungen des Darmepithels.

Claudine wurden zunächst als Transmembranproteine der in Epithelien vorkommenden Zellverbindungen, den so genannten *tight junctions* beschrieben. *Tight junctions* liegen im apikalen Bereich der Zelle und bilden eine Grenze zum basolateralen Membranbereich. In den letzten Jahren wurde jedoch auch ein Vorkommen von Claudin-7 im basolateralen Membranbereich verschiedener Zellen bzw. Gewebe publiziert. Ladwein untersuchte die Lokalisation von Claudin-7 im humanen Jejunum mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und wies ein Vorkommen von Claudin-7 sowohl im apikalen Bereich der *tight junctions*, als auch in den lateralen Zellmembranen nach (Ladwein *et al.*, 2005). Bei Untersuchungen von Epithelzellen muriner Brustdrüsen, Nieren und Lungen konnte Claudin-7 im basolateralen Membranbereich und Cytoplasma nachgewiesen werden (Blackman *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2004).

Auch in den Epithelzellen humaner Atemwege wurde eine Lokalisation von Claudin-7 in lateralen Zellmembranen gezeigt (Coyne *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich im immunhistologischen Nachweis eine Expression von Claudin-7 sowohl im apikalen als auch im basolateralen Membranbereich. Um sicherzustellen, dass es sich nicht um einen Artefakt aufgrund der Präparation der Gewebe bzw. Schnittdicke handelt, wurden zusätzliche Aufnahmen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt. Licht wird im Gewebe stark gestreut, in Laserscanmikroskopen wird dieses störende Streulicht unterdrückt und man erhält hochauflösende und kontraststarke Bilder. Die Expression von Claudin-7 im basolateralen Membranbereich der Enterozyten wurde mit dieser Methode bestätigt.

Dieser Befund stimmt auch überein mit den Ergebnissen von Fujita, der Claudin-7 als im apikalen und basolateralen Membranbereich von murinem Duodenum, Jejunum, Ileum, und Colon vorkommendes Protein beschreibt. (Fujita *et al.*, 2006).

Es konnte eine deutlich reduzierte Expression von Claudin-7 in doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen, also Tieren, die eine dominant-negative Form des Transkriptionsfaktors Elf3 exprimieren, sowohl auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR, als auch auf Protein-Ebene mittels Immunhistologie und Western-Blot gezeigt werden.

Dass Elf3 einen regulatorischen Effekt auf Claudin-7 hat, konnte Kohno in humanen Synovialsarkomen und humanen Zelllinien zeigen. Bei den untersuchten Geweben stimmten die mRNA Expression und Protein-Lokalisation von Claudin-7 und Elf3 überein. Der Claudin-7-Promotor enthält eine Ets-Bindungsstelle 150 bp *upstream* des Transkriptionsstartes, die Bindung von Elf3 an diese Ets-Bindungsstelle wurde mittels Gel-Shift-Analyse and Chromatin-Immunopräzipitation nachgewiesen. Die Inhibierung der Elf3 Expression durch siRNA führte zu einer gleichzeitigen Herunterregulation der mRNA Expression von Claudin-7 (Kohno *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch erstmal eine Regulation von Claudin-7 durch Elf3 im murinen Darm gezeigt.

Bei männlichen, doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen, die sich von der akuten Phase des Gewichtsverlustes erholt und wieder ein Körpergewicht entsprechend der Vergleichsgruppe erreicht hatten, war die Expression von Claudin-7 wieder auf das Niveau der einfach transgenen Vergleichsgruppe angestiegen. Dieses Ergebnis ist konsistent zu der

Beobachtung, dass die Darmzotten der rekonvaleszenten Tiere eine weitestgehend normale Morphologie zeigten.

Ein erhöhtes Expressionsniveau von Claudin-7 trotz einer deutliche Expression von dnElf3 spricht für eine Hochregulation des endogenen Elf3, eine Hochregulation anderer Familienmitgliedern der Ets-Familie oder für bis jetzt unbekannter Regulationsmechanismen, die der weiteren Aufklärung bedürfen.

4.11 Expression des TGF-beta Rezeptor Typ II

Der Transkriptionsfaktor Elf3 kann die Expression des TGF-beta RII in murinen Enterozyten regulieren. Eine mögliche Herabregulation der TGF-beta RII-Expression durch dnElf3 kann durch andere Regulationsmechanismen überdeckt werden.

TGF-beta ist ein pleiotropes Zytokin, das Wachstum und Differenzierung von Zellen und die Suppression des Immunsystems beeinflusst. Seine Wirkung vermittelt es über verschiedene TGF-beta Rezeptoren. Die TGF-beta Rezeptoren Typ I und Typ II sind transmembrane Kinasen, die gemeinsam ein intrazelluläres Signal weiterleiten.

Zwei Ets-Bindedomänen des murinen TGF-beta RII-Promotors ermöglichen eine Aktivierung durch Elf3 (Kopp *et al.*, 2004).

Die von der Arbeitsgruppe um A. Ng generierten Mäuse mit einer Nullmutation von Elf3 zeigen im Dünndarm eine gestörte Morphogenese. Die Elf3 defizienten Epithelzellen exprimierten deutlich reduzierte Mengen von TGF-beta RII (Ng *et al.*, 2002). Durch Verpaarung mit Mäusen, die den TGF-beta RII spezifisch im Darmepithel überexprimieren, wurden doppeltransgene Tiere generiert, deren Dünndarm eine normale Morphologie zeigte. Schlussfolgernd wurde Elf3 als kritischer Regulator von TGF-beta RII im murinen Dünndarmepithel bezeichnet (Flentjar *et al.*, 2007).

Bei der Expression eines dnElf3 würde man eine verminderte Expression des TGF-beta RII erwarten. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Herabregulation des TGF-beta RII in doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen, also in Tieren, die eine dominant-negative Form des Transkriptionsfaktors Elf3 exprimieren, gezeigt werden. Vielmehr wurde eine verstärkte Expression des murinen TGF-beta RII bei einzelnen doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen mittels qRT-PCR gefunden. Innerhalb dieser Versuchsgruppe wurde eine hohe Varianz der Messwerte festgestellt.

Eine Diskrepanz zu den Ergebnissen von Ng könnte auf den unterschiedlichen, verwendeten Mauslinien bzw. den untersuchten Geweben beruhen. In der vorliegenden Arbeit wurden Colon und Ileum der Versuchstiere untersucht, die publizierten Ergebnisse der Gruppe von Ng zum TGF-beta RII bezogen sich auf murines Jejunum. Darüber hinaus fehlt den Elf3-defizienten Mäusen bereits in der embryonalen Entwicklung der funktionierende Transkriptionsfaktor, während die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, induzierbaren TgEfloxElf-Mäuse eine normale embryonale Entwicklung durchlaufen (Ng *et al.*, 2002).

Die Wirkungsmechanismen von TGF-beta im Darm sind äußerst komplex. Vereinfacht dargestellt kann man jedoch sagen, dass TGF-beta durch die Induktion peripherer, regulatorischer T-Zellen mögliche Entzündung verhindert (Becker *et al.*, 2006). Darüber hinaus steigert und schützt TGF-beta die Barrierefunktion des Darmepithels durch Hochregulation des *tight junction* Proteins Claudin-1 (Howe *et al.*, 2005; Snoeck *et al.*, 2005). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen in der akuten Phase des Gewichtsverlustes, deren Dünndarmepithel starke pathomorphologische Veränderungen aufwies, könnte eine Hochregulation des TGF-beta RII erfolgen um die Integrität des Dünndarmepithels wieder herzustellen bzw. Entzündungen zu verhindern.

Die Komplexität der Regulationsmechanismen wird erhöht durch die Tatsache, dass Elf3 selbst ein Zielgen von TGF-beta ist. Bei Versuchen mit Brustkrebs-Zelllinien wurde das relative Transkriptionsniveau von Elf3 durch die Wirkung von TGF-beta stark herab reguliert (Lindemann *et al.*, 2003).

Auch wurde experimentell nachgewiesen, dass Elf3 nicht das einzige Ets-Protein ist, welches den TGF-beta RII stimuliert. Im Rahmen der Untersuchung von Ets-Fusionsproteinen, die bei Ewing-Sarkomen auftreten, wurde festgestellt, dass zahlreiche Mitglieder der Ets-Familie die Expression des TGF-beta RII-Gens regulieren (Im *et al.*, 2000). Bei Versuchen mit F9 embryonalen Karzinomzellen zeigte sich außerdem eine Abhängigkeit der Effekte vom Differenzierungsgrad der Zellen, so stimulierte Elf3 den TGF-beta RII-Promotor in F9 differenzierten Zellen, jedoch nicht in undifferenzierten F9-Zellen (Kopp *et al.*, 2004).

Es besteht also die Möglichkeit, dass einerseits eine Herabregulation der TGF-beta RII Expression durch den dnElf3 erfolgt, durch die krankhaft veränderte Morphologie des Darmepithels und den dadurch wahrscheinlich verstärkten Kontakt der Lamina propria mit

Antigenen, Regulationsmechanismen in Kraft treten, die eine erhöhte TGF-beta RII Expression zur Folge haben.

4.12 Expression der Keratine K8 und K18

Der Transkriptionsfaktor Elf3 reguliert die Expression des Intermediärfilaments K8 in murinen Enterozyten. Die Expression eines dominant-negativen Expressionsfaktors dnElf3 führt zu einer verminderten Expression von K8.

Das murine K8-Gen besitzt einen 3' gelegenen Enhancer mit mehreren Ets-Bindungsstellen. Mittels Reporter-Gen-Tests und EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) konnte gezeigt werden, dass der murine K8-Enhancer durch die Ets-Proteine Ets-1 und Ets-2 über Interaktion mit multiplen Ets-Bindungsstellen reguliert wird (Seth *et al.*, 1994).

Oettgen stellte fest, dass K8 und K18 Ets-Bindungsstellen in ihren Promotoren besitzen und mögliche direkte bzw. indirekte Zielgene von Elf3 sind (Oettgen *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Reduktion der Expression von K8 im Ileum doppeltransgener, induzierter TgEfloxEfA x TgRosaCreER-Mäuse, also in Tieren, die eine dominant-negative Form des Transkriptionsfaktors Elf3 exprimieren, gezeigt werden.

Dieses Ergebnis ist konsistent mit Beobachtungen von gleichzeitig verstärkter Expression von Elf3 und K8 bzw. K18 in verschiedenen Tumoren. Bei einer cDNA *Microarray*-Analyse von Synovialsarkomen wurde bei biphasischen Synovialsarkomen eine signifikant gesteigerte Expression von Elf3, Keratin 14, 8, 5 und 7 festgestellt (Allander *et al.*, 2002). Eine relative Expressionsanalyse von Brusttumoren zeigte erhöhte Expression von Elf3, K8 und K18 (Galang *et al.*, 2004)

Ng *et al.* konnten in ihrem Elf3-Knockout-Modell keinen Einfluss von Elf3 auf die Expression von K8 und 18 feststellen. Die untersuchten Elf3-defizienten Enterozyten zeigten eine K8- und 18-Expression, deren Stärke mit dem Niveau der Wildtyp-Expression vergleichbar war (Ng *et al.*, 2002).

Dass bei den von Ng untersuchten Elf3-Knockout-Mäusen im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen doppeltransgenen, induzierten TgEfloxEfA x TgRosaCreER-Mäusen kein Einfluss von Elf3 auf die Expression von K8 und K18 festgestellt werden konnte, kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass Dünndarmgewebe von Embryonen untersucht wurde. Der Darm dieser Tiere war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme noch nicht

mit fester Nahrung in Berührung gekommen und hatte keinen echten Verdauungsprozess erfahren (siehe auch 4.7).

Darüber hinaus wurde die Expression von K8 und K18 der Elf3-Knockout-Mäuse nur auf Proteinebene mittels Immunhistologie untersucht. Es ist schwierig eine Verminderung der Proteinexpression um den Faktor 0,3, wie für die doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse beschrieben, mittels Immunhistologie festzustellen. Die Untersuchung der Expression mittels quantitativer RT-PCR erlaubt hingegen eine relativ einfache Quantifizierung der Expression.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse haben eine deutlich erhöhte K18 Expression, auch wenn eine signifikante Differenz zum Mittelwert der Kontrollgruppe nicht festgestellt werden konnte, da die Varianz der Einzelwerte sehr hoch war. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei Elf3-Knockout-Mäusen die Expression von K18 erhöht ist.

K8 und K18 bilden zusammen Keratinfilamente, die zu den Intermediärfilamenten gehören. Intermediärfilamente bilden zusammen mit den Mikrotubuli und Mikrofilamenten das Zytoskelett der eukaryotischen Zellen.

Allerdings bilden die K8/K18 Intermediärfilamente nicht nur Teile des Stützskelettes der Zelle. K8/K18 schützt in murinen Hepatozyten gegen Fas-induzierte Apoptose durch Modulation des Fas-Transports zur Zelloberfläche (Gilbert *et al.*, 2001). Bei der Untersuchung von Enterozyten aus K8 Knockout-Mäusen wurde eine verminderte Expression von apikalen Membranproteinen festgestellt. K8/K18 Intermediärfilamente scheinen auch wichtig für die Zellpolarität in epithelialen Zellen zu sein (Ameen *et al.*, 2001; Kim and Coulombe, 2007). Eine deregulierte K8/K18 Expression kann also nicht nur die mechanische Stabilität der betroffenen Zelle verändern, sondern auch die Expression bzw. die Lokalisation von Membranproteinen beeinflussen. Inwieweit bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen doppeltransgenen, induzierten TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäusen die Expression von apikalen Membranproteinen verändert ist, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.13 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transkriptionsfaktor Elf3 im murinen gastrointestinalen Trakt in Hinblick auf potentielle Zielgene und Einfluss auf die Morphologie des Darms untersucht.

Unter der Kontrolle von putativen Enhancer- bzw. Promotor-Fragmenten des in Enterozyten exprimierten K20-Gens konnte eine darmepithelspezifische Expression des Reportergens EGFP und eines dominant-negativen Transkriptionsfaktors Elf3 erreicht werden. Bis heute wurden keine Expressionsvektoren beschrieben, die Promotor- und Enhancer-Fragmente des humanen K20-Gens zur Transgenexpression verwenden. Es ist also in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen ein Transgen unter regulatorischen Elementen des humanen K20-Gens zu exprimieren. Dabei liegen die wichtigen Transkriptionselemente, die eine korrekte Expression in allen Teilen des gastrointestinalen Traktes, auch im Magen, erlauben, sehr weit *upstream* des Transkriptionsstartes.

Zum ersten Mal gelang die Expression eines dominant-negativen Transkriptionsfaktors Elf3 *in vivo*. Bis dato wurden dominant-negative Elf3-Transkriptionsfaktoren nur in Zellkultur untersucht. Das hier beschriebene Tiermodell erlaubt eine zeitlich steuerbare Expression des dominant-negativen Transkriptionsfaktors Elf3 nach Verpaarung mit Cre-Mäusen, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase exprimieren. Die Expression des dominant-negativen Transkriptionsfaktors Elf3 führt in den betroffenen, doppeltransgenen, induzierten Tieren zunächst zu einem Gewichtsverlust und deutlichen morphologischen Veränderungen des Darmepithels.

Bei der Untersuchung des potentiellen Zielgens Claudin-7 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression bei doppeltransgenen, induzierten Mäusen, sowohl im Colon als auch im Ileum. Diese Reduktion konnte auf mRNA-Ebene sowie auch auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Der regulatorische Effekt von Elf3 auf Claudin-7 wurde bereits in Synovialsarkomen gezeigt, in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch erstmals eine Regulation von Claudin-7 durch Elf3 in nicht-malignem Gewebe gezeigt.

Doppeltransgene, induzierte TgEfloxElf x TgRosaCreER-Mäuse zeigen Symptome die auch bei den Darmerkrankungen Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und bei der Intestinalen, epithelialen Dysplasie auftreten können. Eine weitere Charakterisierung unseres Tiermodells könnte auch zu einem besseren Verstehen der Pathogenese genannter Krankheitsbilder führen.

5. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	<i>basepairs</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnElf3	dominant-negativer <i>E74-like factor-3</i>
dnTGF-beta RII	dominant-negativer <i>transforming growth factor-beta</i> Rezeptor II
dNTP	Desoxyribonukleotid
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
°C	Grad Celsius
h	Stunde, human
HPRT 1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
K20	Keratin 20
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
λ	Lambda, Wellenlänge
l	Liter
Lsg.	Lösung
loxP	<i>Locus of crossingover of P1 phage</i>
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mMol	Millimol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
μg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µM	mikromolar
NF-κB	<i>nuclear transcription factor kappaB</i>
nm	Nanometer
PAC	<i>P1-derived artificial chromosom</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline tween</i>
p.c.	<i>post coitus</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidindifluorid
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute'
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tbp	<i>TATA box binding protein-transcription factor IID</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TgAktinCre	FVB/N-TG(ACTB-cre)2MRT/J
TGF-beta	<i>transforming growth factor-beta</i>
TGF-beta RII	<i>transforming growth factor-beta</i> Rezeptor II
TgRosaCreER	ROSA-cre/Esr1(B6;129-t(Rosa)26Sor ^{tm1(cre/Esr1)Nat/J})
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UBC	Ubiquitin C
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

6. Abbildungsverzeichnis

ABB. 1.1 DIE VERSCHIEDENEN DOMÄNEN DES ELF3 PROTEINS	4
ABB. 1.2 MODELL DER ETS-DOMÄNE	4
ABB. 1.3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON ZELLVERBINDUNGEN IN INTESTINALEN EPITHELZELLEN	7
ABB. 1.4 ZIELGENE DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS ELF3	9
ABB. 3.1 PUTATIVE ENHANCER- UND PROMOTOR-FRAGMENTE DES HUMANEN K20-GENS	35
ABB. 3.2 DIE EGFP-EXPRESSIONSVEKTOREN EV I UND EV III	36
ABB. 3.3 DIE EGFP-EXPRESSIONSVEKTOREN EV II UND EV IV	37
ABB. 3.4 EGFP-EXPRESSION IN TRANSFIZIERTEN HT-29-ZELLEN	38
ABB. 3.5 RELATIVE EGFP EXPRESSION DER KONSTRUKTE IN HT-29-ZELLEN	38
ABB. 3.6 EGFP-EXPRESSION IN ENTEROZYTEN DES MÄUSEDÜNNDARMS (ILEUM)	40
ABB. 3.7 EGFP-EXPRESSION IN DEN ENTEROZYTEN DES MÄUSEDARMS	41
ABB. 3.8 K20-EXPRESSION IN EPITHELZELLEN DES MURINEN COLON	41
ABB. 3.9 EGFP WESTERN-BLOT VERSCHIEDENER MURINER GEWEBE DER LINIE EV II A	42
ABB. 3.10 DER EGFP ^{FLOX} /DNELF3 -EXPRESSIONSVEKTOR	43
ABB. 3.11 GENOMISCHE REKOMBINATION UND INTRON-ENTFERNUNG DURCH SPLEIßEN	44
ABB. 3.12 NACHWEIS DER DNA-REKOMBINATION AUF GENOMISCHER EBENE MITTELS PCR I	45
ABB. 3.13 NACHWEIS DER EGFP EXPRESSION AUF mRNA-EBENE	46
ABB. 3.14 NACHWEIS DER DNELF3 EXPRESSION AUF mRNA-EBENE I	46
ABB. 3.15 NACHWEIS DER DNA-REKOMBINATION AUF GENOMISCHER EBENE MITTELS PCR II	47
ABB. 3.16: WURFGRÖßE BEI VERPAARUNG VON TGEFLOXELF TIEREN	48
ABB. 3.17 NACHWEIS DER EGFP- UND DNELF3-EXPRESSION AUF mRNA-EBENE	49
ABB. 3.18 KÖRPERGEWICHT MÄNNLICHER TIERE NACH INDUZIERTER CRE-REKOMBINASE AKTIVITÄT	50
ABB. 3.19 KÖRPERGEWICHT WEIBLICHER TIERE NACH INDUZIERTER CRE-REKOMBINASE AKTIVITÄT	51
ABB. 3.20 PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNG DER VILLUS-ARCHITEKTUR	53
ABB. 3.21 BECHERZELLEN UND SCHLEIMPRODUKTION	55
ABB.3.22: RELATIVE EXPRESSION VON DNELF3	56
ABB.3.23: RELATIVE EXPRESSION VON ENDOGENEM ELF3	57
ABB. 3.24 ELF3- UND KERATIN 20- EXPRESSION IM MURINEN DARM	58
ABB. 3.25 RELATIVE EXPRESSION VON CLAUDIN-7	60
ABB. 3.26 IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS VON CLAUDIN-7 IM MURINEN ILEUM	61
ABB. 3.27 IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS VON CLAUDIN-7 IM MURINEN ILEUM II	62
ABB. 3.28 KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE ZUM NACHWEIS VON CLAUDIN-7 IM ILEUM	63
ABB. 3.29 WESTERN-BLOT ZUM NACHWEIS VON CLAUDIN-7 IM MURINEN ILEUM	64
ABB. 3.30 RELATIVE EXPRESSION DES TGF-BETA RII IM MURINEN ILEUM	65
ABB. 3.31 RELATIVE EXPRESSION VON KERATIN 8 UND KERATIN 18	66

7. Literatur

- Allander, S.V., P.B. Illei, Y. Chen, C.R. Antonescu, M. Bittner, M. Ladanyi, and P.S. Meltzer. 2002. Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am J Pathol.* 161:1587-95.
- Ameen, N.A., Y. Figueroa, and P.J. Salas. 2001. Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J Cell Sci.* 114:563-75.
- Andreoli, J.M., S.I. Jang, E. Chung, C.M. Coticchia, P.M. Steinert, and N.G. Markova. 1997. The expression of a novel, epithelium-specific ets transcription factor is restricted to the most differentiated layers in the epidermis. *Nucleic Acids Res.* 25:4287-95.
- Badea, T.C., Y. Wang, and J. Nathans. 2003. A noninvasive genetic/pharmacologic strategy for visualizing cell morphology and clonal relationships in the mouse. *J Neurosci.* 23:2314-22.
- Bartel, F.O., T. Higuchi, and D.D. Spyropoulos. 2000. Mouse models in the study of the Ets family of transcription factors. *Oncogene.* 19:6443-54.
- Becker, C., M.C. Fantini, and M.F. Neurath. 2006. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:97-106.
- Blackman, B., T. Russell, S.K. Nordeen, D. Medina, and M.C. Neville. 2005. Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res.* 7:R248-55.
- Blessing, M., L.B. Nanney, L.E. King, C.M. Jones, and B.L. Hogan. 1993. Transgenic mice as a model to study the role of TGF-beta-related molecules in hair follicles. *Genes Dev.* 7:204-15.
- Brake, R.L., P.J. Simmons, and C.G. Begley. 2004. Cross-contamination with tamoxifen induces transgene expression in non-exposed inducible transgenic mice. *Genet Mol Res.* 3:456-62.
- Brown, C., J. Gaspar, A. Pettit, R. Lee, X. Gu, H. Wang, C. Manning, C. Volland, S.R. Goldring, M.B. Goldring, T.A. Libermann, E.M. Gravallese, and P. Oettgen. 2004. ESE-1 is a novel transcriptional mediator of angiopoietin-1 expression in the setting of inflammation. *J Biol Chem.* 279:12794-803.

- Campbell, N.A. 1997. *Biologie*; Dt. Übers. hrsg. von Jürgen Markl; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Cereijido, M., R.G. Contreras, D. Flores-Benitez, C. Flores-Maldonado, I. Larre, A. Ruiz, and L. Shoshani. 2007. New diseases derived or associated with the tight junction. *Arch Med Res.* 38:465-78.
- Cesari, F., S. Brecht, K. Vintersten, L.G. Vuong, M. Hofmann, K. Klingel, J.J. Schnorr, S. Arsenian, H. Schild, T. Herdegen, F.F. Wiebel, and A. Nordheim. 2004. Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Mol Cell Biol.* 24:294-305.
- Chang, C.H., G.K. Scott, M.A. Baldwin, and C.C. Benz. 1999. Exon 4-encoded acidic domain in the epithelium-restricted Ets factor, ESX, confers potent transactivating capacity and binds to TATA-binding protein (TBP). *Oncogene.* 18:3682-95.
- Chang, C.H., G.K. Scott, W.L. Kuo, X. Xiong, Y. Suzdaltseva, J.W. Park, P. Sayre, K. Erny, C. Collins, J.W. Gray, and C.C. Benz. 1997. ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis. *Oncogene.* 14:1617-22.
- Choi, M.Y., A.I. Romer, M. Hu, M. Lepourcelet, A. Mechoor, A. Yesilaltay, M. Krieger, P.A. Gray, and R.A. Shivdasani. 2006. A dynamic expression survey identifies transcription factors relevant in mouse digestive tract development. *Development.* 133:4119-29.
- Choi, S.G., Y. Yi, Y.S. Kim, M. Kato, J. Chang, H.W. Chung, K.B. Hahm, H.K. Yang, H.H. Rhee, Y.J. Bang, and S.J. Kim. 1998. A novel ets-related transcription factor, ERT/ESX/ESE-1, regulates expression of the transforming growth factor-beta type II receptor. *J Biol Chem.* 273:110-7.
- Clark, A.J., P. Bissinger, D.W. Bullock, S. Damak, R. Wallace, C.B. Whitelaw, and F. Yull. 1994. Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression. *Reprod Fertil Dev.* 6:589-98.
- Coyne, C.B., T.M. Gambling, R.C. Boucher, J.L. Carson, and L.G. Johnson. 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285:L1166-78.
- Deplancke, B., and H.R. Gaskins. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr.* 73:1131S-1141S.

- Dittmer, J., and A. Nordheim. 1998. Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta*. 1377:F1-11.
- Donaldson, L.W., J.M. Petersen, B.J. Graves, and L.P. McIntosh. 1994. Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry*. 33:13509-16.
- Donaldson, L.W., J.M. Petersen, B.J. Graves, and L.P. McIntosh. 1996. Solution structure of the ETS domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *Embo J*. 15:125-34.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, and P. Chambon. 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:10887-90.
- Festenstein, R., and D. Kioussis. 2000. Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Curr Opin Genet Dev*. 10:199-203.
- Fischer, D.F., M.W. Sark, M.M. Lehtola, S. Gibbs, P. van de Putte, and C. Backendorf. 1999. Structure and evolution of the human SPRR3 gene: implications for function and regulation. *Genomics*. 55:88-99.
- Flentjar, N., P.Y. Chu, A.Y. Ng, C.N. Johnstone, J.K. Heath, M. Ernst, P.J. Hertzog, and M.A. Pritchard. 2007. TGF-betaRII rescues development of small intestinal epithelial cells in Elf3-deficient mice. *Gastroenterology*. 132:1410-9.
- Fogh. 1975. Human Tumor Cells in Vitro. Plenum Press, New York. 557 pp.
- Fujita, H., H. Chiba, H. Yokozaki, N. Sakai, K. Sugimoto, T. Wada, T. Kojima, T. Yamashita, and N. Sawada. 2006. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem*. 54:933-44.
- Furuse, M., and S. Tsukita. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*. 16:181-8.
- Galang, C.K., J. Garcia-Ramirez, P.A. Solski, J.K. Westwick, C.J. Der, N.N. Neznanov, R.G. Oshima, and C.A. Hauser. 1996. Oncogenic Neu/ErbB-2 increases ets, AP-1, and NF-kappaB-dependent gene expression, and inhibiting ets activation blocks Neu-mediated cellular transformation. *J Biol Chem*. 271:7992-8.
- Galang, C.K., W.J. Muller, G. Foos, R.G. Oshima, and C.A. Hauser. 2004. Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem*. 279:11281-92.

- Garg, P., A. Ravi, N.R. Patel, J. Roman, A.T. Gewirtz, D. Merlin, and S.V. Sitaraman. 2007. Matrix metalloproteinase-9 regulates MUC-2 expression through its effect on goblet cell differentiation. *Gastroenterology*. 132:1877-89.
- Garrick, D., S. Fiering, D.I. Martin, and E. Whitelaw. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet*. 18:56-9.
- Gilbert, S., A. Loranger, N. Daigle, and N. Marceau. 2001. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol*. 154:763-73.
- Goulet, O., J. Salomon, F. Ruemmele, N.P. de Serres, and N. Brousse. 2007. Intestinal epithelial dysplasia (tufting enteropathy). *Orphanet J Rare Dis*. 2:20.
- Grall, F.T., W.C. Prall, W. Wei, X. Gu, J.Y. Cho, B.K. Choy, L.F. Zerbini, M.S. Inan, S.R. Goldring, E.M. Gravallesse, M.B. Goldring, P. Oettgen, and T.A. Libermann. 2005. The Ets transcription factor ESE-1 mediates induction of the COX-2 gene by LPS in monocytes. *Febs J*. 272:1676-87.
- Grosveld, F., G.B. van Assendelft, D.R. Greaves, and G. Kollias. 1987. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell*. 51:975-85.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*. 166:557-80.
- Hayashi, S., and A.P. McMahon. 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.
- Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*. 329:219-22.
- Hesse, M., T.M. Magin, and K. Weber. 2001. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci*. 114:2569-75.
- Hewitt, K.J., R. Agarwal, and P.J. Morin. 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*. 6:186.
- Hollenhorst, P.C., D.A. Jones, and B.J. Graves. 2004. Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 32:5693-702.

- Howe, K.L., C. Reardon, A. Wang, A. Nazli, and D.M. McKay. 2005. Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced increased permeability. *Am J Pathol.* 167:1587-97.
- Im, Y.H., H.T. Kim, C. Lee, D. Poulin, S. Welford, P.H. Sorensen, C.T. Denny, and S.J. Kim. 2000. EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res.* 60:1536-40.
- Iwai, S., S. Amekawa, K. Yomogida, T. Sumi, M. Nakazawa, Y. Yura, Y. Nishimune, and M. Nozaki. 2008. ESE-1 inhibits the invasion of oral squamous cell carcinoma in conjunction with MMP-9 suppression. *Oral Dis.* 14:144-9.
- Jahnen-Dechent, W., T. Schinke, A. Trindl, W. Muller-Esterl, F. Sablitzky, S. Kaiser, and M. Blessing. 1997. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem.* 272:31496-503.
- Jedlicka, P., and A. Gutierrez-Hartmann. 2008. Ets transcription factors in intestinal morphogenesis, homeostasis and disease. *Histol Histopathol.* 23:1417-24.
- Kageyama, S., H. Liu, M. Nagata, and F. Aoki. 2006. The role of ETS transcription factors in transcription and development of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 344:675-9.
- Kemp, R., H. Ireland, E. Clayton, C. Houghton, L. Howard, and D.J. Winton. 2004. Elimination of background recombination: somatic induction of Cre by combined transcriptional regulation and hormone binding affinity. *Nucleic Acids Res.* 32:e92.
- Kim, J.H., P.J. Wilder, J. Hou, T. Nowling, and A. Rizzino. 2002. Activation of the murine type II transforming growth factor-beta receptor gene: up-regulation and function of the transcription factor Elf-3/Ert/Esx/Ese-1. *J Biol Chem.* 277:17520-30.
- Kim, S., and P.A. Coulombe. 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* 21:1581-97.
- Klopčič, B. 2002. Untersuchungen zur Funktion des TGF-beta-Signaltransduktionsweges bei der Bildung von Haaren und Zähnen. In Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.

- Kodandapani, R., F. Pio, C.Z. Ni, G. Piccialli, M. Klemsz, S. McKercher, R.A. Maki, and K.R. Ely. 1996. A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature*. 380:456-60.
- Kohno, Y., T. Okamoto, T. Ishibe, S. Nagayama, Y. Shima, K. Nishijo, K.R. Shibata, K. Fukiage, S. Otsuka, D. Uejima, N. Araki, N. Naka, Y. Nakashima, T. Aoyama, T. Nakayama, T. Nakamura, and J. Toguchida. 2006. Expression of claudin7 is tightly associated with epithelial structures in synovial sarcomas and regulated by an Ets family transcription factor, ELF3. *J Biol Chem*. 281:38941-50.
- Kominsky, S.L., P. Argani, D. Korz, E. Evron, V. Raman, E. Garrett, A. Rein, G. Sauter, O.P. Kallioniemi, and S. Sukumar. 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 22:2021-33.
- Kopp, J.L., P.J. Wilder, M. Desler, J.H. Kim, J. Hou, T. Nowling, and A. Rizzino. 2004. Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3, and PU.1, on the promoter of the type II transforming growth factor-beta receptor gene. *J Biol Chem*. 279:19407-20.
- Kopp, J.L., P.J. Wilder, M. Desler, L. Kinarsky, and A. Rizzino. 2007. Different domains of the transcription factor ELF3 are required in a promoter-specific manner and multiple domains control its binding to DNA. *J Biol Chem*. 282:3027-41.
- Kwiatkowski, B.A., L.S. Bastian, T.R. Bauer, Jr., S. Tsai, A.G. Zielinska-Kwiatkowska, and D.D. Hickstein. 1998. The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem*. 273:17525-30.
- Kwon, J.H., S. Keates, S. Simeonidis, F. Grall, T.A. Libermann, and A.C. Keates. 2003. ESE-1, an enterocyte-specific Ets transcription factor, regulates MIP-3alpha gene expression in Caco-2 human colonic epithelial cells. *J Biol Chem*. 278:875-84.
- Ladwein, M., U.F. Pape, D.S. Schmidt, M. Schnolzer, S. Fiedler, L. Langbein, W.W. Franke, G. Moldenhauer, and M. Zoller. 2005. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res*. 309:345-57.
- Laudet, V., C. Hanni, D. Stehelin, and M. Duterque-Coquillaud. 1999. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene*. 18:1351-9.

- Lázaro, J.F.G. 2005. The role of Interleukin-12 in liver inflammation. A study with transgenic mice. *In* Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Lee, H.J., J.H. Chang, Y.S. Kim, S.J. Kim, and H.K. Yang. 2003. Effect of ets-related transcription factor (ERT) on transforming growth factor (TGF)-beta type II receptor gene expression in human cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res.* 22:477-80.
- Lei, W., R.J. Jaramillo, and K.S. Harrod. 2007. Transactivation of Lung Lysozyme Expression by Ets Family Member ESE-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*
- Lepourcelet, M., L. Tou, L. Cai, J. Sawada, A.J. Lazar, J.N. Glickman, J.A. Williamson, A.D. Everett, M. Redston, E.A. Fox, Y. Nakatani, and R.A. Shivdasani. 2005. Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development.* 132:415-27.
- Lewandoski, M., E.N. Meyers, and G.R. Martin. 1997. Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 62:159-68.
- Li, W.Y., C.L. Huey, and A.S. Yu. 2004. Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286:F1063-71.
- Lindemann, R.K., A. Nordheim, and J. Dittmer. 2003. Interfering with TGFbeta-induced Smad3 nuclear accumulation differentially affects TGFbeta-dependent gene expression. *Mol Cancer.* 2:20.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-8.
- Meyer, E. 2003. Ein transgenes Mausmodell zur Untersuchung des Einflusses von Matrix Metalloproteinase-2 und -14 auf die Leber. *In* Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Moll, I., C. Kuhn, and R. Moll. 1995. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol.* 104:910-5.
- Moll, R., M. Divo, and L. Langbein. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 129:705-33.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31:11-24.

- Moll, R., A. Lowe, J. Laufer, and W.W. Franke. 1992. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 140:427-47.
- Moll, R., D.L. Schiller, and W.W. Franke. 1990. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol.* 111:567-80.
- Moll, R., R. Zimbelmann, M.D. Goldschmidt, M. Keith, J. Laufer, M. Kasper, P.J. Koch, and W.W. Franke. 1993. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation.* 53:75-93.
- Munk, K. 2001. Genetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Murphy K. M., T.P., Walport M. 2008. Janeway's Immunobiology. Taylor & Francis.
- Murumagi, A., O. Silvennoinen, and P. Peterson. 2006. Ets transcription factors regulate AIRE gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 348:768-74.
- Nagy, A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26:99-109.
- Neurath, M.F., and G. Schurmann. 2000. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]. *Chirurg.* 71:30-40.
- Ng, A.Y., P. Waring, S. Ristevski, C. Wang, T. Wilson, M. Pritchard, P. Hertzog, and I. Kola. 2002. Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 122:1455-66.
- Nothias, J.Y., S. Majumder, K.J. Kaneko, and M.L. DePamphilis. 1995. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem.* 270:22077-80.
- Oettgen, P., R.M. Alani, M.A. Barcinski, L. Brown, Y. Akbarali, J. Boltax, C. Kunsch, K. Munger, and T.A. Libermann. 1997. Isolation and characterization of a novel epithelium-specific transcription factor, ESE-1, a member of the ets family. *Mol Cell Biol.* 17:4419-33.
- Oettgen, P., M. Barcinski, J. Boltax, P. Stolt, Y. Akbarali, and T.A. Libermann. 1999. Genomic organization of the human ELF3 (ESE-1/ESX) gene, a member of the Ets transcription factor family, and identification of a functional promoter. *Genomics.* 55:358-62.
- Pankov, R., N. Neznanov, A. Umezawa, and R.G. Oshima. 1994. AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells. *Mol Cell Biol.* 14:7744-57.

- Paratore, C., G. Brugnoli, H.Y. Lee, U. Suter, and L. Sommer. 2002. The role of the Ets domain transcription factor Erm in modulating differentiation of neural crest stem cells. *Dev Biol.* 250:168-80.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Picard, D. 1994. Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 5:511-5.
- Potten, C.S., and M. Loeffler. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 110:1001-20.
- Rabault, B., and J. Ghysdael. 1994. Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J Biol Chem.* 269:28143-51.
- Rajewsky, K., H. Gu, R. Kuhn, U.A. Betz, W. Muller, J. Roes, and F. Schwenk. 1996. Conditional gene targeting. *J Clin Invest.* 98:600-3.
- Reddy, S.P., H. Vuong, and P. Adiseshaiah. 2003. Interplay between proximal and distal promoter elements is required for squamous differentiation marker induction in the bronchial epithelium: role for ESE-1, Sp1, and AP-1 proteins. *J Biol Chem.* 278:21378-87.
- Ross, M.G., and M.J. Nijland. 1998. Development of ingestive behavior. *Am J Physiol.* 274:R879-93.
- Rudders, S., J. Gaspar, R. Madore, C. Volland, F. Grall, A. Patel, A. Pellacani, M.A. Perrella, T.A. Libermann, and P. Oettgen. 2001. ESE-1 is a novel transcriptional mediator of inflammation that interacts with NF-kappa B to regulate the inducible nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 276:3302-9.
- Sambrook, F., Maniatis. 1987. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual.*
- Sancho, E., E. Batlle, and H. Clevers. 2004. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:695-723.
- Scott, G.K., C.H. Chang, K.M. Erny, F. Xu, W.J. Fredericks, F.J. Rauscher, 3rd, A.D. Thor, and C.C. Benz. 2000. Ets regulation of the erbB2 promoter. *Oncogene.* 19:6490-502.

- Seth, A., L. Robinson, A. Panayiotakis, D.M. Thompson, D.R. Hodge, X.K. Zhang, D.K. Watson, K. Ozato, and T.S. Papas. 1994. The EndoA enhancer contains multiple ETS binding site repeats and is regulated by ETS proteins. *Oncogene*. 9:469-77.
- Sinha, S., L. Degenstein, C. Copenhaver, and E. Fuchs. 2000. Defining the regulatory factors required for epidermal gene expression. *Mol Cell Biol*. 20:2543-55.
- Snoeck, V., B. Goddeeris, and E. Cox. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect*. 7:997-1004.
- Stappenbeck, T.S., M.H. Wong, J.R. Saam, I.U. Mysorekar, and J.I. Gordon. 1998. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*. 10:702-9.
- Tootle, T.L., and I. Rebay. 2005. Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *Bioessays*. 27:285-98.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:285-93.
- Tymms, M.J., and I. Kola. 1994. Regulation of gene expression by transcription factors Ets-1 and Ets-2. *Mol Reprod Dev*. 39:208-14.
- Tymms, M.J., A.Y. Ng, R.S. Thomas, B.C. Schutte, J. Zhou, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, A. Seth, M. Rosenberg, T. Papas, C. Debouck, and I. Kola. 1997. A novel epithelial-expressed ETS gene, ELF3: human and murine cDNA sequences, murine genomic organization, human mapping to 1q32.2 and expression in tissues and cancer. *Oncogene*. 15:2449-62.
- Vooijs, M., J. Jonkers, and A. Berns. 2001. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep*. 2:292-7.
- Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2007. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*. 220:199-213.
- Wasylyk, B., S.L. Hahn, and A. Giovane. 1993. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem*. 211:7-18.
- Wilhelmi, A. 2002. Identifizierung und Charakterisierung cis regulatorischer Elemente des humanen Gens für Keratin 20 in vitro und im transgenen Mausmodell. *In* Fachbereich Biologie. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.

- Williams, A., N. Harker, E. Ktistaki, H. Veiga-Fernandes, K. Roderick, M. Tolaini, T. Norton, K. Williams, and D. Kioussis. 2008. Position effect variegation and imprinting of transgenes in lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 36:2320-9.
- Wrzesinski, S.H., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell. 2007. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res.* 13:5262-70.
- Wu, H., K. Moulton, A. Horvai, S. Parik, and C.K. Glass. 1994. Combinatorial interactions between AP-1 and ets domain proteins contribute to the developmental regulation of the macrophage scavenger receptor gene. *Mol Cell Biol.* 14:2129-39.
- Zhou, Q., D.M. Toivola, N. Feng, H.B. Greenberg, W.W. Franke, and M.B. Omary. 2003. Keratin 20 helps maintain intermediate filament organization in intestinal epithelia. *Mol Biol Cell.* 14:2959-71.
- Zhuma, T., R. Tyrrell, B. Sekkali, G. Skavdis, A. Saveliev, M. Tolaini, K. Roderick, T. Norton, S. Smerdon, S. Sedgwick, R. Festenstein, and D. Kioussis. 1999. Human HMG box transcription factor HBP1: a role in hCD2 LCR function. *Embo J.* 18:6396-406.

8. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. _____ für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die Bereitstellung der finanziellen und technischen Mittel bedanken.

Herrn Prof. Dr. _____ danke ich für die Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie und die Überlassung des PAC Klons RP5-1110E20.

Herrn Dr. _____ danke ich für die Durchführung der Pronukleus-Injektionen.

Herrn Prof. _____ und Herrn Dr. _____ danke ich für die Durchführung der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.

Besonderer Dank gilt auch meinen Arbeitskollegen die mich stets fachlich und moralisch unterstützt haben:

Darüber hinaus geht mein herzlicher Dank an _____ für das Korrekturlesen der Arbeit und die konstruktiven Kritiken.

Lebenslauf:

Name:

Geburtsdatum:

Geburtsort:

Staatsangehörigkeit:

Adresse:

Studium und wissenschaftliche Arbeiten:

Schule:

Berufliche Tätigkeit: