

**Experimentelle Neuro-Onkogenese in der Ratte:
Identifizierung von Genen, welche das Krebsrisiko in
geschlechtsspezifischer Weise modifizieren**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Linda van den Berg

aus Oberhausen (Rheinland)

Mai 2013

Die Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit von August 2010 bis Mai 2013 unter der Leitung von PD Dr. med. Andrea Kindler-Röhrborn am Institut für Pathologie und Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Jürgen Thomale
2. Gutachter: PD Dr. med. Andrea Kindler-Röhrborn

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. rer. nat. Daniel Hering

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Entstehung von Tumorerkrankungen.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Exogene Faktoren	1
1.1.3 Genetische Risikofaktoren	2
1.2 Tumoren als komplexe genetische Erkrankungen	2
1.3 Die Identifizierung von Suszeptibilitäts- und Resistenzgenen	4
1.4 Das BDIX/BDIV Rattenmodell.....	5
1.4.1 Mutagene Wirkung von Ethylnitrosoharnstoff.....	6
1.4.2 Tumorigenese und mögliche Mechanismen der Tumorresistenz.....	6
1.4.4 Suszeptibilitäts- bzw. Resistenz-vermittelnde Loci.....	8
1.5 Zielsetzung des vorliegenden Promotionsvorhabens.....	10
2. Material.....	11
2.1 Versuchstiere	11
2.2 Geräte.....	11
2.3 Verbrauchsmaterialien	12
2.4 Chemikalien	13
2.5 Kits und Fertiglösungen.....	14
2.6 Antikörper.....	15
2.7 Zelllinien und Proteinlysate.....	15
2.8 Software und Datenbanken.....	16
2.9 Primer-Design	16
2.10 Puffer und Lösungen.....	17
3. Methoden	21
3.1 Genotypisierung der Nachkommen aus Kreuzungen der BDIX und BDIV Stämme mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker.....	21
3.1.1 „Quick and Dirty“ DNA-Isolation	21
3.1.2 „Mikrosatelliten-PCR“	21
3.1.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese einzelsträngiger DNA.....	22
3.1.4 Silberfärbung	22
3.2 PCR zur Genotypisierung von „ β erKO“ Mäusen	23
3.3 Kanzerogen-Behandlung.....	23
3.4 Entnahme von Organen und Isolation von hämatopoetischen Zellen.....	24
3.4.1 Organpräparation.....	24
3.4.2 Isolation von Zellen des Immunsystems aus dem Peritoneum	24
3.4.3 Isolation von Lymphozyten aus dem Blut.....	25
3.5 Zellkultivierung.....	26

3.6	<i>Aufbereitung Formalin-fixierter Gewebe</i>	26
3.7	<i>Aufbereitung kryokonservierter Gewebe</i>	26
3.7.1	DNA-Isolation.....	26
3.7.2	RNA-Isolation.....	27
3.7.3	Protein-Isolation.....	27
3.7.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
3.7.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	27
3.8	<i>Sequenzierung regulatorischer und proteinkodierender Bereiche der Kandidatengene im Mss4 Locus und Vergleich der BDIX und BDIV Allele</i>	28
3.8.1	PCR.....	28
3.8.2	One-Step RT-PCR.....	30
3.8.3	Native Agarosegel-Elektrophorese.....	30
3.8.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	31
3.8.5	Sequenzierung.....	31
3.9	<i>Vergleichende Analysen der mRNA Expression von Kandidatengenen in den Trigemiusnerven von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter</i>	33
3.9.1	cDNA-Synthese	33
3.9.2	Realtime PCR.....	34
3.9.3	Auswertung.....	35
3.10	<i>Analyse der Proteinexpression von Kandidatengenen im Mss4 Locus in Geweben von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter</i>	35
3.10.1	SDS-PAGE und Western Blot.....	35
3.10.2	Immunhistochemische Färbungen	38
3.10.3	Hämalaun-Färbung	40
3.10.4	Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase-Färbung	40
3.11	<i>Durchflusszytometrie</i>	40
3.11.1	Zellzählung	41
3.11.2	Immunfärbung.....	41
3.11.3	Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung der Daten	42
3.12	<i>Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten und statistische Auswertung</i>	42
3.13	<i>Auswertung der Microarray Daten</i>	43
4.	<i>Ergebnisse</i>	44
4.1	<i>Feinkartierung des Mss4 Locus auf Chr. 6</i>	44
4.1.1	Zucht kongener und subkongener Rattenstämme.....	44
4.1.2	Genomische Charakterisierung der kongenen und subkongenen Stämme	45
4.1.3	Effekt der kongenen und subkongenen BDIV Fragmente <i>Mss4b</i> , <i>Mss4c</i> und <i>Mss4d</i> auf die Tumorzinzidenz und Überlebenszeit.....	46
4.1.4	Geschlechtsspezifische Effekte der BDIV Inserts <i>Mss4b</i> und <i>Mss4d</i>	49
4.2	<i>Identifizierung von Kandidatengenen im Mss4 Locus</i>	56
4.2.1	Positionelle Kandidatengene.....	56
4.2.2	Sequenzanalyse der Kandidatengene im <i>Mss4 Locus</i>	58
4.2.3	Relative mRNA Expression in den Trigemiusnerven der Stämme BDIX, BDIV und BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> am Postnataltag 85.....	62
4.2.4	Rangfolge der Kandidatengene auf der Basis von Sequenz-, Expressions- und Funktionsdaten	64

4.3	<i>Glutathionperoxidase 2</i>	66
4.3.1	Transkriptionsfaktorbindestellen in der Promotorregion von <i>Gpx2</i>	66
4.3.2	<i>Gpx2</i> Expression auf Proteinebene.....	67
4.4	<i>Östrogenrezeptor beta: Transkriptanalysen in Wildtyp und βerKO Mäusen</i>	80
4.5	<i>Immunhistochemische Charakterisierung der prämaligen Zellen in den Trigemiusnerven von weiblichen und männlichen BDIX.BDIV-Mss4d Ratten</i>	84
4.5.1	Ngfr.....	84
4.5.2	Cyclin D1.....	87
5.	Diskussion.....	89
5.1	<i>Feinkartierung des Mss4 Locus</i>	89
5.2	<i>Geschlechtsspezifische Effekte der kongenen und subkongenen BDIV Fragmente Mss4a, Mss4b und Mss4d</i>	90
5.3	<i>Identifizierung potentiell bedeutsamer Kandidatengene im Hinblick auf den geschlechtsspezifischen Tumoresistenz-Effekt des Mss4 Locus</i>	92
5.3.1	Glutathionperoxidase 2 (<i>Gpx2</i>).....	93
5.3.2	Östrogenrezeptor Beta (<i>Esr2</i>).....	94
5.4	<i>Charakterisierung der zellulären Vorgänge in Trigemiusnerven ENU-behandelter BDIX.BDIV-Mss4d Ratten</i>	96
	Abstract.....	98
	Ausblick.....	100
	Literaturverzeichnis.....	101
	Anhang 1.....	106
	Anhang 2.....	112
	Anhang 3.....	115
	Anhang 4.....	116
	Danksagung.....	117
	Lebenslauf.....	118
	Publikationen.....	119

Abkürzungsverzeichnis

x g	x-fache Erdbeschleunigung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>Antioxidant response element</i> , Antioxidant responsive Element
AS	Aminosäure
ASDCL	AS-D-Chloroacetat Esterase
BD-Ratten	Berlin Druckrey Ratten
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
DAB	Diaminobenzidin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DBD	DNA-bindende Domäne
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENU	<i>Ethylnitrosourea</i> ; Ethylnitrosoharnstoff
ERE	<i>Estrogen response element</i> , Östrogen responsive Element
F ₂	Filialgeneration 2
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FSC	Forward Scatter; Vorwärtsstreulicht
G	Gauge
g	Gramm
GC	Guanin/Cytosin
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
h	Hour; Stunde(n)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
KO	Knockout
l	Liter
mA	Milliampere
mb	Megabasen
mg	Milligramm
Min.	Minute

ml	Milliliter
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
<i>Mss</i>	<i>Mediating Schwannoma Susceptibility</i>
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PND	<i>Postnatal Day</i> ; Postnatahtag
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNO	Rattenchromosom Nummer
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ; Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ; Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSC	<i>Side Scatter</i> ; Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UTR	<i>Untranslated Region</i> ; Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zelluläre und molekulare Prozesse in den Trigeminiernerven von BDIX und BDIV Ratten in Folge der Ethylnitrosoharnstoff-Exposition am PND1.	7
Abb. 2 Lokalisierung der <i>Mss</i> Loci im Genom der BDIX bzw. BDIV Ratten und ihre Effekte auf das MPNST Risiko.....	9
Abb. 3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Mikrosatelliten-gestützten Genotypisierung von Ratten zur Erzeugung kongener und subkongener Stämme beispielhaft dargestellt am Marker <i>D6Rat72</i>	45
Abb. 4 Physikalische Lage der kongenen und sub-kongenen BDIV Fragmente <i>Mss4a</i> , <i>Mss4b</i> , <i>Mss4c</i> und <i>Mss4d</i> im BDIX Genom in Bezug auf den Tumor-resistenzhaplotyp.	46
Abb. 5 Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der Stämme BDIX und BDIV nach ENU-Exposition am PND1.....	47
Abb. 6 Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven von Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> , - <i>Mss4c</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU-Exposition am PND1.	48
Abb. 7 Geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der Tiere des BDIX und BDIV Stammes nach ENU-Exposition am PND1.	49
Abb. 8 Geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der Stämme BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU-Exposition am PND1.	51
Abb. 9 Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten weiblicher Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU-Exposition am PND1.	52
Abb. 10 Kaplan Meier Analyse der Überlebenskurven von männlichen Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU-Exposition am PND1.	53
Abb. 11 A) MPNST-Inzidenzen (%) am Tag 200 und B) mediane Überlebenszeiten der Stämme BDIX, BDIV, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> , - <i>Mss4c</i> und - <i>Mss4d</i> beider Geschlechter nach ENU-Exposition am PND1.....	54
Abb. 12 Physikalische Lage und Struktur der Kandidatengene im Überlappungsbereich der BDIV Fragmente <i>Mss4a</i> und <i>Mss4d</i> auf Chr. 6.	56
Abb. 13 Transkriptionsfaktor-Bindestellen im <i>Gpx2</i> Promotor, die den SNP A) 15 bp und B) 53 bp vor Transkriptionsstart umfassen.....	67
Abb. 14 Vergleich der Spezifität der <i>Gpx2</i> -Antikörper ab64322 und GBF mittels Western Blot Analyse im Kolon und in HepG2-Zellen.....	68
Abb. 15 Immunhistochemische Analyse der <i>Gpx2</i> Expression im Kolon der Ratte.....	69
Abb. 16 Immunhistochemische Analyse der <i>Gpx2</i> Expression in der Milz.	70
Abb. 17 Immunhistochemische Analyse der <i>Gpx2</i> Expression in Lymphknoten.	71
Abb. 18 Immunhistochemische Analyse der <i>Gpx2</i> Expression im Thymus.....	72
Abb. 19 Mastzellnachweis und immunhistochemische Analyse der <i>Gpx2</i> -Expression in Gewebsmastzellen der Trigeminiernerven ENU-behandelter Ratten.....	73
Abb. 20 Mastzellnachweis und immunhistochemische Analyse der <i>Gpx2</i> Expression in Gewebsmastzellen in MPNSTs ENU-behandelter Ratten.....	74
Abb. 21 Western Blot Analyse der <i>Gpx2</i> -Expression in peritonealen Immunzellen von BDIX- und BDIV-Ratten beider Geschlechter.	75

Abb. 22 Identifizierung von Mastzellen und Makrophagen im Peritonealexudat von BDIX und BDIV Ratten.	75
Abb. 23 Immunhistochemische Analyse der Gpx2 Expression in peritonealen Mastzellen von weiblichen und männlichen Ratten der Stämme BDIX und BDIV.	77
Abb. 24 Identifizierung und Charakterisierung von peritonealen Immunzellen der Ratte mittels FACS-Analyse.	78
Abb. 25 FACS-Analyse der Gpx2 Expression in peritonealen Mastzellen von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter.	79
Abb. 26 Genotypisierung von Mäusen für die <i>Esr2</i> Transkriptanalyse in KO Tieren.	81
Abb. 27 PCR-Nachweis der <i>Esr2</i> Transkripte (Exon 2 - 6) in den Trigeminusnerven einer Wildtyp und β erKO Maus.	82
Abb. 28 PCR-Nachweis von <i>Esr2</i> Transkripten (Exon 2 – 3 und 5 – 6) im Ovar einer Wildtyp, C57Bl/6 und β erKO Maus.	82
Abb. 29 PCR-Nachweis von <i>Esr2</i> Transkripten (Exon 2, 3, 4) im Ovar einer Wildtyp, C57Bl/6 und β erKO Maus.	83
Abb. 30 Mittels PCR identifizierte Abschnitte der <i>Esr2</i> mRNA in Wildtyp und β erKO Mäusen.	83
Abb. 31 Immunhistochemische Analyse der Ngfr-Expression in prä malignen Schwann Zellen in einem Trigeminusnerv eines ENU-behandelten männlichen und weiblichen BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i> Tieres und im MPNSTs eines 245 Tage alten BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i> Männchens.	86
Abb. 32 Immunhistochemische Analyse der Cyclin D1-Expression in pä malignen Schwann Zellen in einem Trigeminusnerv eines ENU-behandelten BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i> Männchens und Weibchens und einem MPNST eines 245 Tage alten BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i> Männchens.	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Geräte.	11
Tab. 2 Verbrauchsmaterialien.	12
Tab. 3 Chemikalien.	13
Tab. 4 Kits und Fertiglösungen.	14
Tab. 5 Primärantikörper.	15
Tab. 6 Sekundärantikörper und -reagenzien.	15
Tab. 7 Antikörper-Verdünnungen für den Western Blot.	38
Tab. 8 Antikörper-Verdünnungen für die Immunhistochemie.	40
Tab. 9 Fluorophore und deren Emmissionsspektren für die FACS-Analyse.	42
Tab. 10 Paarweiser Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven der Stämme BDIX, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> , - <i>Mss4c</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU-Exposition am PND1.	48
Tab. 11 Paarweiser Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven weiblicher Tiere der Stämme BDIX, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , <i>Mss4b</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU-Exposition am PND1.	52
Tab. 12 Paarweiser Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven männlicher Tiere der Stämme BDIX, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU-Exposition am PND1.	54
Tab. 13 Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten und Tumorinzidenzen weiblicher und männlicher Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> , - <i>Mss4b</i> , - <i>Mss4c</i> und - <i>Mss4d</i> nach ENU- Exposition am PND1.	55
Tab. 14 Position der <i>Mss4</i> Kandidatengene auf Chr. 6 der Ratte den Assemblies RGSC v3.4 und RGSC 5.0 zufolge.	57
Tab. 15 Identifizierte SNPs in mutmaßlich regulatorischen Bereichen der Kandidatengene im <i>Mss4</i> Locus.	59
Tab. 16 Identifizierte SNPs in proteinkodierenden Bereichen der Kandidatengene im <i>Mss4</i> Locus.	61
Tab. 17 Relative mRNA Expression der Kandidatengene in Trigemiusnerven von BDIV, BDIX und BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> Ratten am Tag 85.	63
Tab. 18 Annotationen der <i>Mss4</i> Kandidatengene.	65
Tab. 19 Ranking der Kandidatengene anhand von SNPs, einer potentiell stammspezifischen mRNA Expression und funktioneller Daten.	66
Tab. 20 Abhängigkeit der Bindekoeffizienten einiger Transkriptionsfaktoren im mutmaßlichen Core- Promotor des <i>Gpx2</i> Gens von BDIV bzw. BDIX Allelen in den Bindemotiven.	67
Tab. 21 Zusammenfassung der Western Blot und immunhistochemischen Analysen der <i>Gpx2</i> Expression in verschiedenen Organen und Zelltypen von BDIX und BDIV Ratten.	80
Tab. 22 <i>Ngfr</i> Expression in den Trigemiusnerven ENU-behandelter weiblicher und männlicher BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i> Ratten.	85
Tab. 23 Cyclin D1 Proteinexpression in den Trigemiusnerven ENU-behandelter weiblicher und männlicher BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i> Ratten.	87

1. Einleitung

1.1 Die Entstehung von Tumorerkrankungen

1.1.1 Epidemiologie

Maligne Tumoren stellen weltweit eine der häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen dar (Kanavos 2006). Im Jahr 2008 verstarben rund 7,6 Millionen Menschen aufgrund eines Krebsleidens (Jemal, Bray et al. 2011). Für die nächsten Jahrzehnte wird eine Zunahme der Krebsneuerkrankungen prognostiziert (GLOBOCAN 2008, IARC 2010). Da Krebs eine Erkrankung des höheren Alters darstellt, wird diese Zunahme in den Industrienationen durch die sich ständig verbessernde medizinische Versorgung und die damit einhergehende steigende Lebenserwartung der Menschen verursacht, während in den Entwicklungsländern in Afrika, Südamerika und Asien die allmähliche Anpassung an den westlichen Lebensstil, wie z.B. den vermehrten Zigaretten- und Alkoholkonsum, verantwortlich gemacht wird (Kanavos 2006; Jemal, Bray et al. 2011).

Eine Vielzahl von Tumoren, die nicht in den Geschlechtsorganen entstehen, tritt mit einer deutlichen Geschlechtspräferenz auf. In einer US-amerikanischen Studie wurde festgestellt, dass Männer ca. 1,4-fach häufiger an Tumoren erkranken als Frauen. Werden die Tumoren der Geschlechtsorgane und der weiblichen Brust aus der Statistik ausgeschlossen, sind Männer sogar 1,8-fach häufiger von Tumoren betroffen (Cook, Dawsey et al. 2009). Tumoren mit höherer Prävalenz bei Männern sind z.B. Harnblasen-, Leber- und Hirntumoren (Sun, Warrington et al. 2012 ; Bosch, Ribes et al. 2004; Horstmann, Witthuhn et al. 2008). Schilddrüsenkarzinome, Tumoren der Gallenblase, des Analkanals und des Bauchfells entstehen häufiger bei Frauen, sind generell jedoch sehr selten (Cook, Dawsey et al. 2009; Rosenbaum und McHenry 2009; Kirsch-Volders, Bonassi et al. 2010).

Die Ursache der meisten Tumorerkrankungen und ebenfalls der Geschlechtspräferenz mancher Tumoren ist bislang unbekannt. Man weiß jedoch, dass sowohl exogene als auch genetische Faktoren bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen.

1.1.2 Exogene Faktoren

Krebsauslösende exogene Faktoren können physikalischer, chemischer oder biologischer Natur sein. Physikalische Kanzerogene stellen z.B. ultraviolette oder ionisierende Strahlungen dar und chemische z.B. Asbest oder Aflatoxin. Infektionen mit onkogenen Viren, Bakterien oder Parasiten können ebenfalls Tumoren induzieren (WHO, 2013). Ein hoher Bodymass Index, eine ungesunde Ernährung, Bewegungsmangel, Rauchen und ein

übermäßiger Alkoholkonsum können die Entstehung von Tumoren ebenfalls begünstigen, wie dies u.a. für kolorektale Karzinome, Prostatatumoren und Bronchialkarzinome nachgewiesen wurde (Porter und Stanford 2005; Kubik, Zatloukal et al. 2008; Huxley, Ansary-Moghaddam et al. 2009; Weiderpass 2010). Diese sog. ungünstigen Lifestylefaktoren sind Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge für ca. 30 % aller krebsbedingten Todesfälle verantwortlich (Danaei, Van der Hoorn et al. 2005; Kirsch-Volders, Bonassi et al. 2010). Die Exposition gegenüber chemischen Karzinogenen im Zigarettenrauch scheint einen besonders gravierenden Risikofaktor darzustellen. Etwa 22 % aller Todesfälle aufgrund maligner Tumoren und 71 % der Lungenkrebserkrankungen werden auf den Kontakt mit karzinogenen Substanzen im Tabakrauch zurückgeführt (WHO, 2013).

Ein geschlechtsspezifisches Verhalten im Hinblick auf die genannten Lifestylefaktoren und auch die durch eine geschlechertypische Berufswahl berufsbedingte Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen begünstigen die Geschlechtspräferenz einiger Tumorentitäten (Kirsch-Volders, Bonassi et al. 2010).

1.1.3 Genetische Risikofaktoren

Die sog. Tumorsuszeptibilitätssyndrome sind seltene monogene Erkrankungen mit einer familiären Häufung, die ein hohes individuelles Tumorrisiko vermitteln. Ursächlich beteiligt an der Entstehung derartiger Syndrome ist meist eine dominant vererbte Keimbahnmutation in einem Tumorsuppressorgen (Mohandas 2001; Kohno, Yokota 2002; Frank 2004; Hodgson 2008; Luzzatto 2011). Im Fall des familiären kolorektalen Karzinoms weisen Träger einer Mutation im *APC* Gen ein Erkrankungsrisiko von ca. 80 % auf (Aarnio, Mecklin et al. 1995). Li-Fraumeni Patienten, deren Erkrankung durch eine Mutation im Gen *TP53* verursacht wird und sich in der Entstehung von Tumoren in unterschiedlichen Organen ausdrückt, weisen ein Tumorrisiko von 90 % auf (Malkin, Li et al. 1990). Trotz ihrer Seltenheit zeigen Tumorsuszeptibilitätssyndrome jedoch eindrücklich, wie bedeutsam die genetische Prädisposition für die Entstehung von Tumoren sein kann.

Die große Mehrheit der Tumorerkrankungen tritt sporadisch ohne familiäre Häufung auf, an deren Entstehung eine Vielzahl genetischer und exogener Faktoren beteiligt ist (Dean 1998; Kohno, Yokota 2002).

1.2 Tumoren als komplexe genetische Erkrankungen

Trotz genetischer Prädisposition für die Entstehung einer bestimmten Tumorentität muss es jedoch nicht zwangsläufig zur Krankheitsmanifestation kommen, nämlich dann nicht, wenn

die Exposition gegenüber der kanzerogenen Noxe ausbleibt (Dean 1998). Im Umkehrschluss stellt ein potentiell karzinogener Umwelteinfluss nicht für jedes Individuum einen Risikofaktor dar, so entwickelt z.B. nicht jeder Raucher trotz starker, oftmals jahrelanger Exposition gegenüber Karzinogenen im Tabakrauch ein Bronchialkarzinom (Karahalil, Emerce et al. 2008). Diesen Beobachtungen folgt die Erkenntnis, dass Tumoren komplexe genetische Erkrankungen darstellen, deren Entstehung auf dem Vorhandensein und der Interaktion von Suszeptibilitäts- und Resistenzallelen sowohl miteinander als auch mit exogenen Risikofaktoren basiert (Fearon 1997).

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entstehung von Tumorerkrankungen, welche durch den schädlichen Einfluss exogener Faktoren induziert werden, äußern sich in unterschiedlichen Inzidenzen, klinischen Manifestationen, Krankheitsverläufen und dem Therapieansprechen (Federman 2006). Sexuelle Dimorphismen werden generell durch Gene auf den Geschlechtschromosomen und eine hormonell bedingte geschlechtsspezifische Expression vieler autosomaler Gene verursacht (Wijchers und Felsenstein 2011). Während die Frau über zwei X-Chromosomen verfügt, besitzt der Mann je ein Y- und X-Chromosom (Kirsch-Volders, Bonassi et al. 2010; Arnold, Chen et al. 2012). Im Rahmen der Dosiskompensation wird in allen Zellen des weiblichen Individuums jeweils eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert, wodurch nur die Gene des jeweils aktiven X-Chromosoms exprimiert werden (Kirsch-Volders, Bonassi et al. 2010). Da ca. 15 % der X-chromosomalen Gene der Inaktivierung entkommen, kann in der Frau im Vergleich zum Mann die bis zu doppelte Menge des entsprechenden Proteins gebildet werden (Federmann 2006; Isensee und Ruiz-Noppinger 2007). Ausgeprägte geschlechtsspezifische Genexpressionsunterschiede zeigen sich in allen Organen, die nicht dem Reproduktionstrakt angehören, wie z.B. in der Niere, der Leber und dem Gehirn (Rinn und Snyder 2005; Ellegren und Parsch 2007; Isensee und Ruiz Noppinger 2007; Ober, Loisel et al. 2008). Als Resultat der geschlechterabhängigen Genexpression bestehen gravierende physiologische Unterschiede zwischen Frauen und Männern, die sich auch auf das Tumorrisiko auswirken.

Genvarianten, die sowohl das Tumorrisiko beider als auch nur eines Geschlechts modifizieren, können mit unterschiedlicher Frequenz in den Populationen vertreten sein. Seltene Allele (Frequenz < 0,5 %) scheinen i.d.R. einen größeren und häufige Allele (Frequenz > 5 %) einen schwächeren Einfluss auf das Tumorrisiko auszuüben (Bond, Hirshfield et al. 2006; Flint und Mackay 2009; Manolio, Collins et al. 2009; Liu, Schaub et al. 2012). Die Effekte von Suszeptibilitäts- oder Resistenzallelen können darüber hinaus durch den Einfluss anderer Loci modifiziert werden (Fearon 1997; Nadeau 2001; Dragani 2003; Fijneman 2005).

Da die Tumorentstehung von multiplen Faktoren begünstigt bzw. inhibiert wird, von denen keiner notwendig oder hinreichend ist, ist die Identifizierung von individuellen Tumorrisiko-assoziierten Genvarianten und/oder dem krebsauslösenden Stimulus äußerst schwierig.

1.3 Die Identifizierung von Suszeptibilitäts- und Resistenzgenen

Gene, deren Varianten ein Individuum gegenüber Tumorerkrankungen prädisponieren, können dies auf vielfältige Weise tun. Im Gegensatz zu Tumorsuppressorgenen müssen Suszeptibilitätsgene nicht zwangsläufig im Ursprungsgewebe des Tumors exprimiert sein. Intrazellulär können Suszeptibilitätsgene z.B. die Apoptose, die DNA-Reparatur oder epigenetische Prozesse, wie das Methylierungsmuster, modulieren. Im Gegensatz dazu können systemisch agierende Gene z.B. die Metabolisierung karzinogener Substanzen beeinflussen oder Verhaltensunterschiede in Bezug auf die bereits genannten Lifestylefaktoren bewirken. Die Expression einer risikomodifizierenden Genvariante in Zellen des Immunsystems könnte z.B. die Interaktion von Tumorzellen mit diesen bestimmen (Houlston und Tomlinson 2000; Klein 2009).

Mithilfe genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) konnten Genvarianten identifiziert werden, die mit der Suszeptibilität gegenüber einer humanen Tumorerkrankung assoziiert sind (Amos, Wu et al. 2008; Easton und Eeles 2008; Chang, Cramer et al. 2009). In großen Kohorten erkrankter und gesunder Individuen wird dazu analysiert, ob bestimmte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP; *single nucleotide polymorphism*) mit dem Auftreten eines Tumors in Zusammenhang stehen (Quigley und Balmain 2009). Problematisch an diesen Analysen ist jedoch, dass die identifizierten Suszeptibilitätsallele aufgrund der großen genetischen Heterogenität der Populationen oft nur für die ausgewählte Stichprobe relevant sind und beeinflussen in anderen Kollektiven das Krebsrisiko nicht (Pearson und Manollo 2008). Ferner werden regelmäßig SNPs identifiziert, die in nicht kodierenden Bereichen des Genoms oder in Introns liegen. Auf welche Gene diese Polymorphismen Einfluss nehmen, ist in den meisten Fällen bisher unbekannt (van de Bunt und Gloyn 2010). Überraschenderweise wurde das Geschlecht in humanen GWAS trotz umfangreicher Kenntnisse über die physiologischen Unterschiede zwischen Frauen und Männern und den daraus resultierenden geschlechtsspezifischen Unterschieden in z.B. dem Schweregrad einer Tumorerkrankung, lange nicht berücksichtigt (Federmann 2006).

Ingezüchtete Tiermodelle sind im Zusammenhang mit der Identifizierung von risikomodulierenden Faktoren in vielerlei Hinsicht von Vorteil. Durch gezielte Züchtung wurden genetisch klar definierte Tierstämme erzeugt, die hoch suszeptibel oder resistent gegenüber der Entstehung bestimmter Tumorentitäten sind. Diese Stämme werden unter

standardisierten Lebensbedingungen gehalten, wodurch der Einfluss geschlechtsspezifischer exogener Faktoren im Vergleich zur menschlichen Situation stark reduziert ist. Da auch in Nagern Tumoren mit Geschlechtspräferenz entstehen, eignen sich diese insbesondere auch zur Analyse der genetischen und molekularen Grundlagen der geschlechtsspezifischen Tumorentstehung (Ober, Loisel et al. 2008). Die genetische Manipulierbarkeit von Mäusen und Ratten ermöglicht darüber hinaus umfangreiche funktionelle oder interventionelle Studien zu den identifizierten Suszeptibilitäts- und Resistenzgenen, die im Menschen nicht durchführbar sind.

Lange Zeit wurde eine Übertragbarkeit der im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen stark angezweifelt. Besonders in den letzten Jahren wurden jedoch einige Studien veröffentlicht, die mindestens für einige Tumorentitäten eine Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Nagermodell auf den Menschen belegen (Ober, Loisel et al. 2008; Quigley und Balmain 2009). Beispielsweise wurden unter Verwendung des Wistar-Kyoto/Wistar-Furth Rattenmodells Suszeptibilitätsloci für den Brustkrebs identifiziert, deren orthologe Loci ebenfalls das humane Tumorrisiko modulieren (Samuelson, Hesselson et al. 2007).

Langfristig gesehen könnten tierexperimentell erzeugte Daten somit einerseits zum grundlegenden Verständnis der Tumoresistenz bzw. –suszeptibilität beitragen, andererseits könnten anhand von Tierstudien niedermolekularen Substanzen getestet werden, die in der Humanmedizin für therapeutische oder präventive Zwecke eingesetzt werden könnten.

1.4 Das BDIX/BDIV Rattenmodell

Die Ratten der ingezüchteten Berlin Druckrey (BD) Stämme IX und IV weisen eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber chemisch induzierten Tumoren des peripheren Nervensystems (PNS) auf (Druckrey 1971). Tieren beider Stämme wird postnatal innerhalb der ersten 24 h das chemische Kanzerogen Ethylnitrosoharnstoff (ENU; 80 µg ENU /g Körpergewicht) subkutan injiziert. Daraufhin entstehen in BDIX Ratten maligne Tumoren der Trigeminierven, sog. maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST), mit einer Inzidenz von > 85 %, die im Median nach 200 Tagen den Tod der BDIX Ratten verursachen. Im Gegensatz dazu sind die Ratten des BDIV Stammes nahezu vollständig tumorresistent (Druckrey, Schagen et al. 1970; Kindler-Rohrborn, Kolsch et al. 1999). Die BDIX und BDIV Stämme eignen sich demzufolge dazu, die genetischen Grundlagen der Tumorsuszeptibilität und Tumorresistenz am Beispiel des PNS zu analysieren.

1.4.1 Mutagene Wirkung von Ethylnitrosoharnstoff

Die mutagene Wirkung von ENU basiert auf der Entstehung des Diazoniumions in wässriger Lösung und dessen Reaktion mit der DNA (Kleihues, Burger et al. 1984). Durch die Alkylierung der Stickstoff- und Sauerstoffatome der DNA entstehen u.a. O⁶-Ethylguanin, O²- und O⁴-Ethylthymine und O²-Ethylcytosin, welche zwar nur einen geringen Anteil aller Alkyladdukte ausmachen, jedoch eine starke mutagene Wirkung vermitteln (Beranek 1990). Die Alkylierung der Basen verursacht Fehlpaarungen während der DNA-Replikation, welche als Mutationen persistieren können. Während das Diazoniumion in jedem Gewebe in ähnlichen Konzentrationen entsteht, werden die verursachten Schäden in der DNA in einer gewebsspezifisch unterschiedlichen Geschwindigkeit beseitigt (Goth und Rajewsky 1974).

1.4.2 Tumorigenese und mögliche Mechanismen der Tumoresistenz

Die MPNSTs gehen aus mutierten unreifen Vorläufern der Schwann Zellen in den Trigemiusnerven hervor. Die ENU-Exposition am PND1 und die damit einhergehende Entstehung des O²-Ethylthymins verursacht eine T:A → A:T Transversionsmutation an Position 2012 des *Neu/ErbB2* Gens in Schwann Zellen an der Grenze zwischen den Trigemiusnerven und dem Gehirn. Diese Mutation ist ab PND7 nachzuweisen und gilt als das initiale Ereignis in der Tumorigenese (Nikitin, Jin et al. 1996; Abb. 1). Die *Neu/ErbB2* Mutation entsteht allerdings mit ähnlicher Frequenz in BDIX und BDIV Ratten. Während sich die prämaligen Schwann Zellen in BDIX Ratten zu MPNSTs entwickeln, ist in BDIV Ratten ab Postnataltag 80 ein stetiger Rückgang der Anzahl von *Neu/ErbB2* mutierten Schwann Zellen zu beobachten, bis schließlich keine Mutation mehr nachzuweisen ist (Kindler-Rohrborn, Kind et al. 2000). Zwischen Tag 80 und 90 nach ENU-Exposition findet eine ausgeprägte, allerdings stammenspezifische Invasion von CD4⁺ T-Helferzellen und Makrophagen, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und ED1⁺ Makrophagen in die Trigemiusnerven statt (Gering, Marx et al. 2006; Abb. 1). Dennoch scheint die Tumoresistenz der BDIV Ratten mindestens zum Teil von T-Zellen vermittelt zu werden (Marx, Rohrborn et al. 2009). Das unterschiedliche Tumorrisiko der BDIX bzw. BDIV Ratten könnte demzufolge auf der unterschiedlichen Interaktion von Immunzellen mit prämaligen Schwann Zellen beruhen (Marx, Rohrborn et al. 2009).

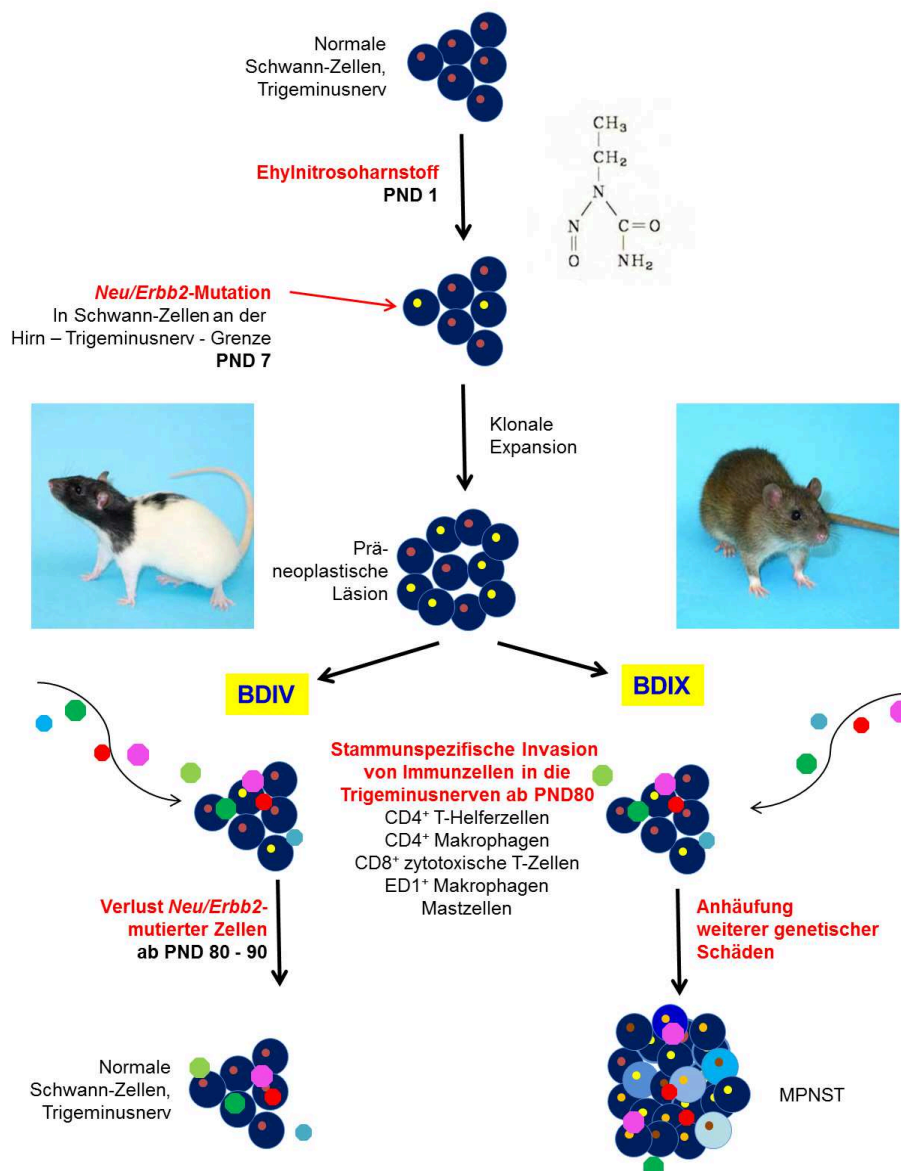


Abb. 1 Zelluläre und molekulare Prozesse in den Trigeminasnerven von BDIX und BDIV Ratten in Folge der Ethylnitrosourea-Exposition am PND1.

Die Applikation des chemischen Kanzerogens ENU induziert in beiden Rattenstämmen eine Punktmutation im *Neu/ErbB2* Gen in Schwann Zellen der Trigeminasnerven an der Hirn/Nerv-Grenze. In BDIX Ratten entarten diese Zellen zu MPNSTs und verursachen den Tod der Tiere, während diese Zellen in BDIV Ratten eliminiert werden.

1.4.4 Suszeptibilitäts- bzw. Resistenz-vermittelnde Loci

Um die Gene und im Weiteren die Mechanismen der Tumorsuszeptibilität der BDIX Ratten bzw. Tumorresistenz der BDIV Ratten aufzuklären, waren zuvor von unserer Arbeitsgruppe GWAS an ENU behandelten segregierenden Kreuzungen der beiden Stämme durchgeführt worden. Es zeigte sich eine signifikant höhere Tumorzinzidenz und niedrigere Überlebenszeit der männlichen im Vergleich zu weiblichen Tieren der F₂ Generation. Dies legte die Vermutung nahe, dass einige der ursächlich beteiligten Gene geschlechtsspezifisch agieren könnten. Mit Hilfe der GWAS wurden 7 autosomale Loci (*Mss1* – *Mss7*; *Mss* = *mediating schwannoma susceptibility*) kartiert, die das Tumorrisiko in allel- und geschlechtsspezifischer Weise beeinflussen (Kindler-Rohrborn, Koelsch et al. 1999; Koelsch, Fischer et al. 2006; Winzen, Koelsch et al. 2009). BDIX Allele am Locus *Mss1* auf Chromosom (Chr.) 10 waren unabhängig vom Geschlecht mit einer erniedrigten Überlebenszeit und erhöhten Tumorzinzidenz assoziiert. BDIX Allele am Locus *Mss2* auf Chr. 1 und *Mss6* auf Chr. 15 vermittelten jeweils Tumorsuszeptibilität ausschließlich in männlichen Tieren. Am Locus *Mss3* auf Chr. 3 als auch *Mss5* auf Chr. 13 vermittelten hingegen homozygote BDIV Allele eine erhöhte Tumorzinzidenz und erniedrigte Überlebenszeit nach ENU-Exposition in männlichen Tieren, wobei *Mss5* zusätzlich die Überlebenszeit von weiblichen Tieren verkürzte. Homozygote BDIV Allele sowohl am Locus *Mss4* auf Chr. 6 als auch am Locus *Mss7* auf Chr. 10 vermittelten jeweils einen starken Tumorresistenzeffekt in weiblichen F₂ Hybriden (Kindler-Rohrborn, Koelsch et al. 1999; Koelsch, Fischer et al. 2006; Winzen, Koelsch et al. 2009; Abb. 2).

Durch die bei der GWAS erhaltenen Daten wurde für den Locus *Mss4* (Chr. 6) der stärkste geschlechtsspezifische Tumorresistenzeffekt vorhergesagt, weshalb dieser als Erster einer detaillierten Analyse unterzogen wurde. Dieser Locus konnte anhand einer Haplotypanalyse auf einen Bereich, den sog. Tumorresistenzhaplotyp, zwischen den Mikrosatellitenmarkern *D6Rat218* (90,9 Mb) und *D6Ngb* (111,2 Mb) eingengt werden. Die ENU-Exposition weiblicher und männlicher Ratten des kongenen BDIX.BDIV-*Mss4a* Stammes, der BDIV Allele im Bereich der telomerischen 60 % des Tumorresistenzhaplotyps auf dem genetischen Hintergrund des BDIX Stammes trägt, und die nachfolgende geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten konnte den Effekt des *Mss4* Locus experimentell bestätigen (Winzen, Koelsch et al. 2009; Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011).

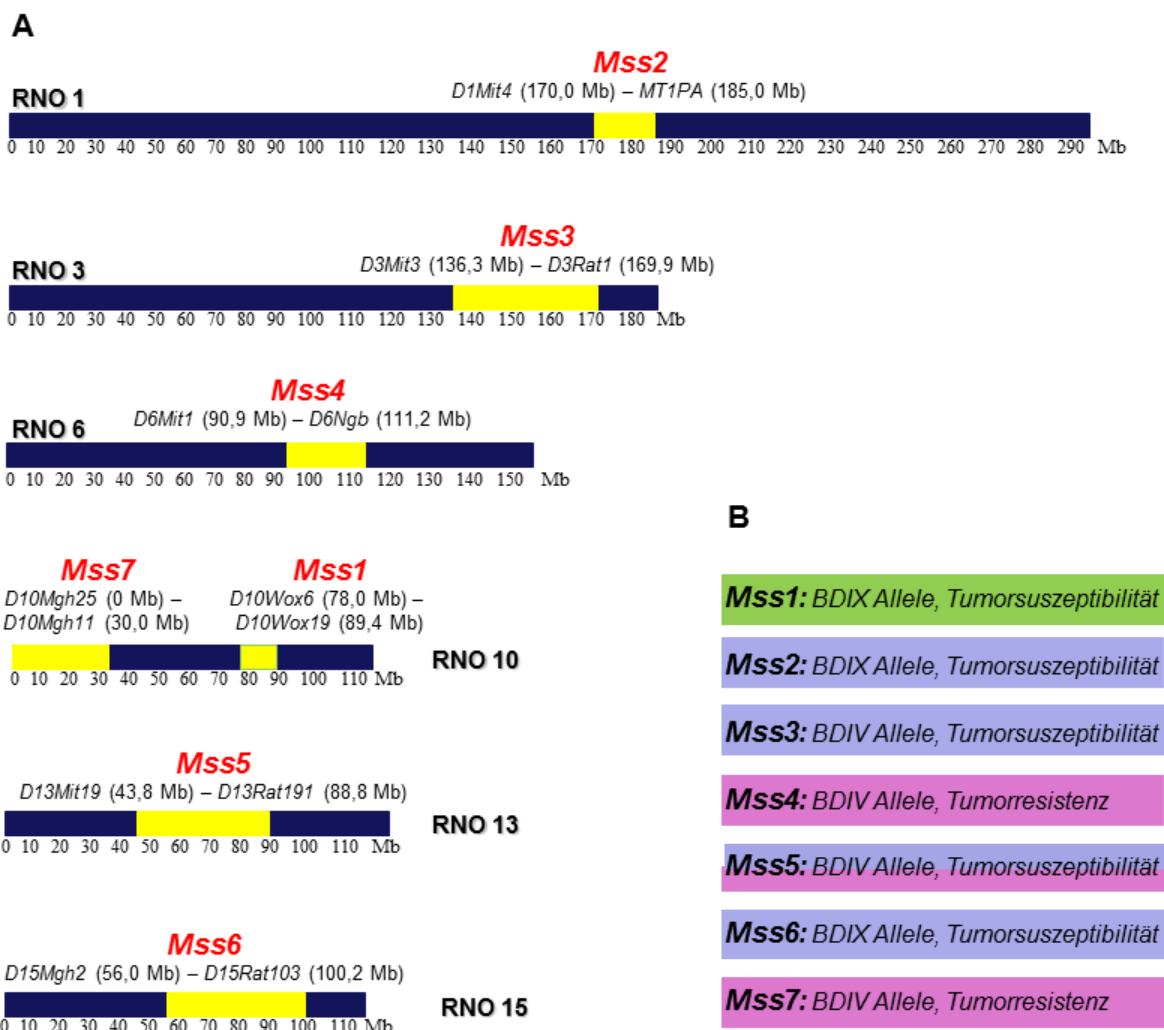


Abb. 2 Lokalisierung der *Mss* Loci im Genom der BDIX bzw. BDIV Ratten und ihre Effekte auf das MPNST Risiko.

A) In Gelb dargestellt ist die Lage der *Mss* Loci im Genom (blau). Polymorphe Mikrosatellitenmarker geben die ungefähre Position in Mb der Loci an. B) Allel- und geschlechtsspezifische Effekte der *Mss* Loci. Blau hinterlegt: männchenspezifischer Effekt. Rosa hinterlegt: weibchenspezifischer Effekt. Grün hinterlegt: Einfluss auf das Tumorrisiko beider Geschlechter. RNO = Rattenchromosom. *Mss* = *Mediating schwannoma susceptibility*.

1.5 Zielsetzung des vorliegenden Promotionsvorhabens

Das langfristige Ziel des Projektes ist die Identifizierung von Genen, die geschlechtsspezifisch Tumoresistenz bzw. -suszeptibilität vermitteln. Dies soll zum Verständnis der molekularen und zellulären Prozesse, die dem Tumorrisiko zu Grunde liegen, beitragen und Ansatzpunkte für effektive, geschlechtsspezifische Therapie- und/oder Präventionsmaßnahmen bieten.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Feinkartierung des *Mss4* Locus durch ENU Behandlung weiterer kongener und subkongener Rattenstämme, deren BDIV Inserts unterschiedliche Abschnitte des Tumoresistenzhaplotyps umfassten, und die nachfolgende geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten und geschlechtsgetrennte Analyse der Tumorzinidenzen.

Alle im feinkartierten *Mss4* Locus befindlichen Gene wurden sequenziert und ein Vergleich der BDIX und BDIV Allele durchgeführt. Darüber hinaus wurde die mRNA Expression der Kandidatengene in den Trigemiusnerven weiblicher und männlicher BDIX und BDIV Ratten analysiert. Die Kombination der erhaltenen Sequenz- und Expressionsdaten mit Informationen zur potentiellen Funktion der jeweiligen Genprodukte sollte eine Identifizierung der wahrscheinlichsten funktionellen Kandidatengene ermöglichen. Deren Relevanz für den Tumoresistenzmechanismus der BDIV Ratten sollte durch Proteinexpressionsanalysen in verschiedenen Geweben und Zelltypen weiter untersucht werden.

2. Material

2.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden Ratten der ingezüchteten BDIX und BDIV Stämme verwendet (Druckrey 1971). Aus diesen Stämmen wurden die kongenen und subkongenen Linien BDIX.BDIV-*Mss4a*, BDIX.BDIV-*Mss4b*, BDIX.BDIV-*Mss4c* und BDIX.BDIV-*Mss4d* gezüchtet. Des Weiteren wurden die sog. „berKO“ Mäuse verwendet, welche einen Knockout des *Esr2* Gens aufweisen (Krege, Hodgkin et al. 1998).

Die Züchtung und Haltung der Tiere fand unter Standardbedingungen bei einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus durch geprüfte Versuchstierpfleger im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Duisburg-Essen statt. Sie erhielten Wasser und „Altromin Zucht- und Haltungsfutter“ *ad libitum*. In Übereinstimmung mit § 8 des Tierschutzgesetzes wurden die Anzeige- bzw. genehmigungspflichtigen Tierversuche bei der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), beantragt und genehmigt.

2.2 Geräte

Tab. 1 Geräte.

Gerät	Typ	Firma, Standort
Brutschrank	Heraeus Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer	FACS Diva	BD Biosciences, San Jose, USA
Einbettautomat	Tissue-Tek® VIP 2000	Miles Scientific, Naperville, USA
Elektrophoresekammer	Multigel long	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Model S2	Biometra, Göttingen
ELISA Reader	Multiskan®FC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gel-Dokumentationsanlage	Transilluminator	Core Life Sciences, Laguna Niguel, USA
Vakuum-Geltrockner	Model SE1160	Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg
Heiz/Magnet-Rührer	Typ IKA-Combimag RHC	Janke & Kunkel, Staufen
Heizbarer Rüttler	HTML 133	HLC, Bovenden
Heizblock	DIGI-Block JR	Laboratory Devices Inc., USA
Homogenisator	Polytron PT 2100	Kinematica, Littau-Luzern
Horizontales Mischgerät	RM5.40	Karl Hecht GmbH, Sondheim
Kühlzentrifuge	Heraeus Biofuge PrimoR	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Mikroskop	Olympus IX50	Olympus America Inc., USA
pH-Meter	pH Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Supply	PS 3002	Biometra, Göttingen
Präzisionswaage	Kern 470-36	Kern und Sohn, Balingen

Fortsetzung Tabelle 1

Gerät	Typ	Firma, Standort
Real-Time-Cycler	7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rotationsmikrotom	Typ HM 355 S	Microm, Walldorf
Thermoschüttler	Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler, Tübingen
Sequenziergerät	3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spektralphotometer	NanoDrop® ND-1000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Sterilbank	Heraeus Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	T Gradient	Biometra, Göttingen
Thermocycler	T Personal	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Advanced Primus 25	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Waage	AE 100 S	Mettler-Toledo, Gießen
Wärmebad	W350t	Memmert, Schwabach
Wetblot-Tank	Mini Trans Blot	Bio Rad, München
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge mit Ausschwingrotor	Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Profuge 10K	Agilent, Santa Clara, USA

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2 Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Firma, Standort	Bestellnummer
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Braunschweig	RPN3103K
Einwegspritze, 10 ml	Terumo, Leuven, B	SS10ES
Eppendorf-Safelock tubes, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg	0030123328
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen	188271
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen	227261
BD Microlane 3, 20 G, 0,9 x 40 mm	BD Biosciences, San Jose, USA	301300
Monovette, EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Newton, USA	061664001
Multititerplatten, 96-well Format; Mikrosatellitenanalyse	Bioplastics, Landraaf, NL	B70501
Multititerplatten, 96-well Format; Sequenzierung	Applied Biosystems, Foster City, USA	4346906
Multititerplatten, 96-well Format; Realtime-PCR	Bioplastics, Landraaf, NL	AB19800
Amersham Hybond ECL, Nitrocellulose-Membran, 0,45 µm	GE Healthcare, Braunschweig	RPN303D
Objektträger Superfrost Plus	Langenbrinck, Emmendingen	030060
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, USA	4311971
Verschluss der Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Foster City, USA	4315933
Whatman Papier	Schleicher & Schuell, Dassel	3003-911
Zellkulturflasche 25 cm ²	Sarstedt, Newton, USA	831810302

2.4 Chemikalien

Tab. 3 Chemikalien.

Chemikalie	Firma, Standort	Bestell-Nr.
Aqua destillata	B. Braun, Melsungen	2351744
(19:1) 40% (w/v) Acrylamid-Bis Lösung	Serva, Heidelberg	1068701
(29:1) 30% (w/v) Acrylamid-Bis Lösung	Serva, Heidelberg	1067902
2-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg	28625
3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma-Aldrich, Steinheim	A3648
Aceton	Merck, Darmstadt	1000142511
Agarose	Roth, Karlsruhe	22674
Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, Steinheim	A4503
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim	A3678
Borsäure	Roth, Karlsruhe	59352
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim	B8026
Chlorophorm	Merck, Darmstadt	1024450250
Dinatrium-EDTA-Dihydrat	Amresco, Solon, USA	105
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	65800500
Dithioerythritol	Sigma, Steinheim	D9779
Essigsäure (96%)	KMF Laborchemie, Lohmar	KMF08206
Ethanol (100%)	Merck, Darmstadt	1009832511
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg	21251
Ethylendiamintetraacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim	E5134
Ethylnitrosoharnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim	N3385
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt	1039991000
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim	221198
Fötales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein	10270106
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim	G5516
Glycin	Roth, Karlsruhe	39082
Hämalaun	Merck, Darmstadt	1092490500
Harnstoff	Merck, Darmstadt	1084885000
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA	4311320
Isofluran (Forene)	Abbott, Wiesbaden	4831850
Isopropanol	Sigma Aldrich, Steinheim	190764
Kaliumdihydrogenphosphat	KMF Laborchemie, Lohmar	KMF08407
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg	-
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt	2464769
Methanol	Merck, Darmstadt	1060092511
Mineralöl für die PCR	Sigma-Aldrich, Steinheim	M5904
Natriumacetat	Merck, Darmstadt	6268
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt	106392500
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe	39573
Natriumdodecylsulfat ultra pure	Roth, Karlsruhe	23261
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe	67711
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim	N6507
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim	P6148
Percoll	GE Healthcare, Braunschweig	17-0891-02

Fortsetzung Tabelle 3

Chemikalie	Firma, Standort	Bestell-Nr.
Pertex	Medite, Burgdorf	41401200
10-fach PBS Trockensubstanz	Biochrom AG, Berlin	L18210
Salpetersäure (65%)	Merck, Darmstadt	1004562500
Salzsäure (25%)	Merck, Darmstadt	1003162511
Sigmacote®	Sigma-Aldrich, Steinheim	SL2
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe	79082
Tetramethylethyldiamin	Bio Rad, München	1610801
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe	35801
Trizma®Base	Sigma-Aldrich, Steinheim	T1503
Trizma®Hydrochloride	Sigma-Aldrich, Steinheim	T3253
Tween®-20	Sigma-Aldrich, Steinheim	P9416
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck, Darmstadt	1072090250
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim	X4126
Xylol	KMF Laborchemie, Lohmar	KMF300609025

2.5 Kits und Fertiglösungen

Tab. 4 Kits und Fertiglösungen.

Produkt	Firma, Standort	Bestell-Nr.
0.25 % Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein	25200056
Accu Prime GC rich DNA polymerase	Life Technologies, Darmstadt	12337016
Amersham ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Braunschweig	RPN2108
BD Perm/Wash Buffer	BD Biosciences, San Jose, USA	554723
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA	4337457
Complete-Protease-Inhibitoren Cocktail	Roche, Mannheim	4719956001
DAB Substrate Kit	Zytomed Systems, Berlin	DAB057
Dako Pen for Immunocytochemistry	Dako, Hamburg	S2002
DC Protein Assay	Bio Rad, München	5000116
DMEM/F12 GlutaMAX	Gibco BRL, Eggenstein	31331093
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden	69506
1-fach DPBS	Gibco BRL, Eggenstein	14190086
Ficoll Paque PLUS	Amersham, Freiburg	17144002
GeneRuler 100 bp Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot	SM1143
One Step RT- PCR Kit	Qiagen, Hilden	210212
PCR Mastermix (2x)	Fermentas, St. Leon-Rot	K0171
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein	15070063
Platinum Sybr Green qPCR Supermix UDG	Life Technologies, Darmstadt	11733038
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim	P7170
Prestained SDS PAGE Protein Marker	Serva, Heidelberg	3921601
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	28706
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	28104

Fortsetzung Tabelle 4

Produkt	Firma, Standort	Bestell-Nr.
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden	74104
Röntgen Entwickler Konzentrat	Adefo Chemie Gmbh, Dietzenbach	706
Röntgen Fixierer Konzentrat	Adefo Chemie Gmbh, Dietzenbach	1564
SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR	Life Technologies, Darmstadt	18080051
Taq 2 x Master Mix	New England BioLabs, Frankfurt	M0270
TRIzol Reagenz	Life Technologies, Darmstadt	15596026
Zytochem Plus HRP-Polymer system	Zytomed Systems, Berlin	POLHRP-100

2.6 Antikörper

Tab. 5 Primärantikörper.

Antigen	Wirtsspezies	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
Beta-Aktin	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	ab8227
CD68	Maus	Abd Serotec, Kidlington, UK	MCA341R
Gpx2	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	ab64322
Gpx2	Kaninchen	R. Brigelius-Flohé, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke	-
IgE + Biotin	Maus	Abd Serotec, Kidlington, UK	MCA193B
Cyclin D1	Zellkultur	DCS, Hamburg	C1677R06

Tab. 6 Sekundärantikörper und -reagenzien.

Antikörper/Reagenz	Spezies	Konjugation	Hersteller	Bestell-Nr.
ECL Anti rabbit IgG	Esel	HRP	GE Healthcare, Braunschweig	NA934
Anti rabbit IgG	Esel	FITC	Dianova, Hamburg	711-096-152
Streptavidin		APC	Abd Serotec, Kidlington, UK	STAR119

2.7 Zelllinien und Proteinlysate

Als Positivkontrolle für die durchflusszytometrische Analyse der Gpx2 Expression in peritonealen Mastzellen wurde die humane Adenokarzinom-Zelllinie „LoVo“ verwendet, welche eine Gpx2 Überexpression aufweist und freundlicherweise von Frau Kerstin Heise, AG Molekulare Genetik, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt wurde.

Des Weiteren wurden Proteinlysate der humanen HepG2-Zelllinie eines epithelialen Leberkarzinoms freundlicherweise von Frau Prof. Brigelius-Flohé, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden

entweder nicht, mit 50 μM oder 100 μM Selen behandelt. Die Proteinlysate Selen-behandelter HepG2-Zellen galten als Positivkontrollen für die Western Blot Analyse der Gpx2-Expression. Da Gpx2 ein Selenoprotein darstellt, korreliert dessen Expressionsstärke mit der Verfügbarkeit der Selenmenge.

2.8 Software und Datenbanken

Die im Folgenden aufgelistete Software wurde für die Auswertung der Daten verwendet:

Beadstudio Gene Expression Module, Version 3 (Macrogen)

Microsoft Excel (Microsoft)

Sequencher 4.3 (GeneCodes)

Sigma Plot (Systat Software Inc.)

Den nachfolgend aufgelisteten Datenbanken wurden Informationen, die zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation dienten, entnommen:

BioGPS (<http://biogps.gnf.org/#goto=welcome>)

DataBase for Transcriptional Start Sites (<http://dbtss.hgc.jp/>)

Genecards (<http://www.genecards.org/>)

NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>)

NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>)

NCBI PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)

Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>)

TFSearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)

UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>)

2.9 Primer-Design

Die Sequenzen der proteinkodierenden und mutmaßlich regulatorischen Bereiche der positionellen Kandidatengene im *Mss4* Locus wurden der in der NCBI Nucleotide Datenbank hinterlegten Rattenreferenzsequenz (*Rattus norvegicus*) entnommen. Die Primer wurden anhand dieser Sequenzen erstellt und von der Firma Life Technologies/Invitrogen (Custom Oligonucleotides) synthetisiert.

2.10 Puffer und Lösungen

Agarosegel-Elektrophorese

6-fach Probenpuffer

5 ml Glycerin
0,02 g SDS
0,005 g Bromphenolblau
0,005 g Xylencyanol FF
ad 10 ml 1-fach TAE

50-fach TAE-Puffer/HCl, pH 8,5

242 g Tris Base
37,2 g Na₂EDTA-2H₂O
57,1 ml Eisessig
ad 1 l A. dest.

1-fach Laufpuffer

600 ml A. dest.
12 ml 50-fach TAE
18 µl Ethidiumbromid

Cycle Sequencing

Fällungsreagenz

1,5 ml 3 M Natriumacetat, pH 5.2
12 ml A.dest.
ad 50 ml Ethanol (100%)

Dichtegradientenzentrifugation

70 %-ige Percoll-Lösung

7 ml Percoll
1 ml 10 x DPBS
ad 10 ml A. dest.

Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

100 ml PBS
1 g BSA

2% Paraformaldehyd/HCl, pH 7,2

2 g Paraformaldehyd + 50 ml A. dest.
Bei 70 °C im Wasserbad lösen
50 ml 2-fach PBS
2 Tropfen NaOH zum Klären
2 Tropfen HCl

Kanzerogen-Behandlung

Mc Ilvaine-Puffer/HCl, pH 6.0

368 ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

632 ml 0,2 M Na₂HPO₄

ad 1 l A. dest.

Mikrosatelliten-Analyse

1 M Tris/HCl, pH 5,0

6,056 g Tris

ad 50 ml A. dest.

50 mM NaOH

0,1 g NaOH

ad 50 ml A. dest.

Polyacrylamidgel-Mix (6 %)

150 ml 40% Bis-/Acrylamid-Mix (19:1)

200 ml 5 x TBE

336 g Harnstoff

ad 1 l A. dest.

5-fach TBE-Puffer

108 g Tris Base

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA/HCl, pH 8.0

ad 1 l A. dest.

0,5 M EDTA/HCl pH 8,0

186,1 g EDTA

ad 1 l A. dest.

2-fach Formamid-Ladepuffer

0,5 ml 0.5 M EDTA

6 mg Xylencyanol FF

6 mg Bromphenolblau

ad 25 ml Formamid

Silbernitratlösung

1,2 g Silbernitrat

ad 400 ml A. dest.

Entwicklerlösung

29,68 g Natriumcarbonat

512 µl Formaldehyd

ad 1 l A. dest.

SDS-PAGE und Western Blot

Saline-Tris-Puffer/HCl, pH 7,5

60,5 mg Tris Base

4,09 mg NaCl

ad 50 ml A. dest.

Lysepuffer

930 µl Saline-Tris-Puffer

50 µl NP40 (10 % v/v in Saline-Tris-Puffer)

20 µl Protease-Inhibitor

6 x Lämmli-Puffer

1,25 ml Tris/HCl pH 6,8

0,002 g Bromphenolblau

1 ml 20% SDS

1 g Glycerin

1 ml 2-Mercaptoethanol

ad 10 ml A. dest.

1 M Tris/HCl, pH 6,8

60,55 g Tris

ad 500 ml A. dest.

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

181,65 g Tris

ad 1 l A. dest.

20 % SDS

20 g SDS

ad 100 ml A. dest.

10 % SDS

10 g SDS

ad 100 ml A. dest.

10 % APS

1 g APS

ad 10 ml A. dest.

10-fach Laufpuffer

20 g SDS

60 g Tris

288 g Glycin

ad 2 l A. dest.

Transferpuffer	6,06 g Tris 28,86 g Glycin 400 ml Methanol ad 2 l A. dest.
Waschpuffer TBS(T)/HCl, pH 7,6	80 g NaCl 24,2 g Tris (2 ml Tween-20) ad 1 l A. dest.
Waschpuffer TTBS/HCl pH 7,5	8,77 g NaCl 7,88 g Tris 1 ml Tween 20 ad 1 l A. dest.
Zellkultivierung	
Medium	45 ml DMEM/F-12 GlutaMAX 5 ml FCS 100 µl Penicillin/Streptomycin

3. Methoden

3.1 Genotypisierung der Nachkommen aus Kreuzungen der BDIX und BDIV Stämme mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker

Mikrosatelliten sind nicht kodierende DNA-Sequenzen aus 2 - 4 Basenpaaren (bp), die in tandemartigen Wiederholungen auftreten. Die Anzahl der Wiederholungen ist individuell unterschiedlich und unterliegt den Mendel'schen Vererbungsregeln. Aufgrund der Inzucht stellt ein Stamm genetisch gesehen ein einzelnes Individuum dar. Daher tragen ingezüchtete Nagerstämme jeweils homozygote Allele für Mikrosatelliten und andere genetische Marker, unterscheiden sich jedoch untereinander im Hinblick auf die Länge des Allels. Daher wurden Mikrosatelliten zur genetischen Charakterisierung der Stämme BDIX und BDIV und der aus deren Kreuzung hervorgehenden kongenen und subkongenen Linien genutzt.

3.1.1 „Quick and Dirty“ DNA-Isolation

Zur Genotypisierung von Nachkommen aus der Zucht der kongenen und subkongenen Rattenstämme bzw. der β erKO Mäuse wurden Schwanzbiopsien von ca. 1 mm Länge bzw. Stanzen aus dem Ohr verwendet. Diese wurden in 100 μ l 50 mM NaOH (siehe 2.10) aufgenommen und bis zur vollständigen Lyse bei 95 °C im Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l 1 M Tris gestoppt (siehe 2.10) und die DNA 1/40 (Mikrosatellitenanalyse) bzw. 1/10 (β erKO-Genotypisierung) mit A. dest. verdünnt und bei – 20 °C gelagert.

3.1.2 „Mikrosatelliten-PCR“

Die Mikrosatellitenanalyse erfolgte via PCR. Zur Amplifikation eines Mikrosatellitenmarkers wurde folgender Reaktionsansatz für eine Probe hergestellt:

Reagenz	Volumen (μl)
NEB 2 x Mastermix	8,1
Sense Primer (10 μ M)	0,6
Antisense Primer (10 μ M)	0,6
1/40 verdünnte DNA	7,0

Der PCR-Ansatz wurde zuletzt mit Öl überschichtet. Es wurde ein sog. „Hot Start“ der PCR durchgeführt, d.h. die Proben wurden erst in den Thermocycler gestellt, wenn der Block eine

Temperatur von 95 °C erreicht hatte. Die PCR fand nach einer initialen Denaturierung (5 Min. 95 °C) unter folgenden Bedingungen statt:

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
95	1 Min.	} 50
55	1 Min.	
72	1 Min.	
72	10 Min	1

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben entweder kurzzeitig bei 4 °C gelagert oder längerfristig bei – 20 °C.

3.1.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese einzelsträngiger DNA

Zur Herstellung eines Polyacrylamidgels, das zur Auftrennung einzelsträngiger DNA diente, wurde zunächst ein „Sandwich“, bestehend aus zwei unterschiedlich langen Glasplatten und zwei Spacern hergestellt, welches durch einen gummierten Rahmen zusammengehalten wurde. Beide Glasplatten wurden vor dem Zusammenbau des Sandwiches gründlich mit A. dest. gereinigt, die längere Glasplatte zusätzlich mit 70 %-igem Ethanol. Die kürzere Glasplatte wurde mit Sigmacote beschichtet, um diese im Anschluss an die Elektrophorese vom Polyacrylamidgel abheben zu können. Das Gel wurde aus 80 ml Polyacrylamid-Gelmix (siehe 2.10), 160 µl einer 20 %-igen APS-Lösung und 80 µl TEMED hergestellt, luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen, ein Haifischzahnkamm mit der glatten Kante zwischen die Glasplatten geschoben und das „Sandwich“ mit mehreren Klammern fixiert. Nach vollständiger Polymerisierung (ca. 1,5 h) wurde der Rahmen entfernt, das Sandwich in die Elektrophoresekammer eingespannt und die obere und untere Kammer mit jeweils ca. 400 ml 1-fach TBE-Puffer (siehe 2.10) gefüllt. Nach „Warmlaufen“ des Gels für 20 Min. bei 70 W wurden 5 µl der mit Formamid-Ladepuffer versetzten PCR-Produkte aufgetragen. Zur Vorbereitung der Proben wurde zu den 16 µl PCR-Volumen 8 µl Formamid-Ladepuffer (siehe 2.10) hinzugegeben. Die Proben wurden vor dem Auftrag für 3 Min. bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Die Elektrophorese wurde schließlich bei 70 W für 90 Min. durchgeführt.

3.1.4 Silberfärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sandwich aus der Elektrophoresekammer entnommen, die kürzere Glasplatte abgehoben und die längere Glasplatte mit dem darauf befindlichen Gel in einen Färberahmen eingespannt. Für die folgenden Inkubationsschritte

wurden jeweils ca. 400 ml Lösung benötigt. Zunächst wurde die DNA durch eine 5-minütige Inkubation mit 10 %-igem Ethanol im Gel fixiert. Anschließend wurde das Gel für 2 Min. mit 1 %-iger Salpetersäure und dann für 20 Min. mit Silbernitratlösung inkubiert. Um überschüssiges Silber zu entfernen, wurde es für 2 Min. mit A. dest. gespült und die Entwicklerlösung, bestehend aus Natriumcarbonat und Formaldehyd (siehe 2.10), hinzugegeben. Nach einer zufriedenstellenden Entwicklung der Banden wurde die Färbereaktion durch eine 5-minütige Inkubation mit 10 %-iger Essigsäure gestoppt und das Gel zur Archivierung auf Whatman-Papier gezogen und bei 75 °C ca. 1 h auf einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

3.2 PCR zur Genotypisierung von „ β erKO“ Mäusen

Zur Durchführung der „ β erKO-PCR“ wurde folgender Reaktionsansatz für eine Probe hergestellt:

Reagenz	Volumen (μ l)
10 x Standard Puffer	10
dNTP-Mix (je 10 mM)	4
Taq-Polymerase	0,8
Primermix (je 10 μ M)	7,5
A. dest.	ad 25

Der Primermix bestand aus folgenden drei Primern (je 10 μ M): 8 μ l β erKO-F-Neu, 12 μ l Neo-25 und 10 μ l Exon-3-R. Die jeweiligen Sequenzen sind in Anhang 1 aufgelistet.

In jedes Reaktionsgefäß wurden 20 μ l des Mastermixes vorgelegt und 5 μ l der 1/10 verdünnten DNA hinzugegeben. Die „ β erKO-PCR“ erfolgte unter nachfolgend beschriebenen Reaktionsbedingungen.

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
95	2 Min.	1
95	45 Sek.	} 50
61	1 Min.	
72	1 Min.	
72	10 Min.	1

3.3 Kanzerogen-Behandlung

24 h postnatal erhielten Tiere der Stämme BDIX, BDIV, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b*, -*Mss4c* und -*Mss4d* eine einmalige subkutane Injektion mit N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (80 μ g ENU/g

Körpergewicht in Mc Ilvaine-Puffer; siehe 2.10). Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich kontrolliert. Bei Auftreten von äußerlich sichtbaren Tumoren, Kurzatmigkeit, starkem Gewichtsverlust, Lähmung von Gliedmaßen oder Verhaltensabnormalitäten wurden die Tiere durch Isofluran-Inhalation getötet und autopsiert. Trigeminierven und -tumoren wurden in gepufferter 4 %-iger Formalin-Lösung für mindestens 24 h fixiert und anschließend im Routinelabor automatisiert in Paraffin eingebettet.

3.4 Entnahme von Organen und Isolation von hämatopoetischen Zellen

3.4.1 Organpräparation

Weiblichen und männlichen unbehandelten Ratten der Stämme BDIX und BDIV wurden zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (im Alter von 10 bis 500 Tagen) Organe entnommen und teilweise in Formalin fixiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden beide Trigeminierven (sowohl der ganze Nerv für immunhistochemische Analysen als auch der Teil zwischen Ganglion und Gehirn, der nur Schwann Zellen und Axone enthält, für Expressionsanalysen) und weitere Organe entnommen.

Von allen ENU behandelten Ratten der Stämme BDIX, BDIV, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b*, -*Mss4c* und -*Mss4d* wurden die Trigeminierven und ggf. MPNSTs entnommen. Die Weiterverarbeitung der Formalin-fixierten Gewebe ist in Kapitel 3.6 im Detail erläutert. Die kryokonservierten Gewebe wurden bis zur weiteren Verwendung (siehe 3.7) bei – 80 °C gelagert.

3.4.2 Isolation von Zellen des Immunsystems aus dem Peritoneum

3.4.2.1 Peritoneal-Lavage

Die Ratten wurden durch Isofluran-Inhalation getötet und auf den Rücken gelegt. Nachdem die Haut vom Bauch entfernt war, wurde die Bauchhöhle durch einen ca. 0,5 cm großen Schnitt eröffnet und mittels einer serologischen Pipette 50 ml eiskaltes DPBS eingefüllt. Der Schnitt wurde mit einer Klemme verschlossen und die peritonealen Immunzellen durch eine 1-minütige Massage unterhalb des Zwerchfells in Lösung gebracht. Anschließend wurde der Schnitt wieder eröffnet und die zellhaltige Suspension in ein konisches Zentrifugenröhrchen (50 ml Volumen) überführt. Die Zellsuspension wurde 2 x mit jeweils 10 ml DPBS für 5 Min. bei 400 x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend für Western Blot, immunhistochemische oder durchflusszytometrische Analysen weiterverarbeitet.

3.4.2.2 Percoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die durch eine Peritoneal-Lavage gewonnenen Zellen wurden über einen Percoll (Polyvinylpyrrolidon-beschichtete Kieselgelpartikel)-Gradienten in zwei Fraktionen, einerseits Mastzellen und andererseits Makrophagen und Monozyten, aufgespalten. Zunächst wurden die Zellen in 8 ml einer 70 %-igen Percoll-Lösung aufgenommen (siehe 2.10) und anschließend mit 2 ml DMEM/F12-Medium vorsichtig überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Min. bei RT und 580 x g. Die entstandene Grenzschicht zwischen DPBS und Medium enthielt die Makrophagen-/Monozytenfraktion, die Mastzellfraktion befand sich am Boden des verwendeten 15 ml Zentrifugenröhrchens. Beide Fraktionen wurden getrennt entnommen, in neue 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 2 x mit jeweils 10 ml DPBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend entweder lysiert und der SDS-PAGE zugeführt oder auf APES-beschichtete Objektträger aufgebracht, um immunhistochemische Analysen durchzuführen.

3.4.3 Isolation von Lymphozyten aus dem Blut

3.4.3.1 Herzpunktion

Zur Gewinnung von zirkulierenden Lymphozyten wurde die Ratte zunächst per Isofluran-Inhalation getötet und der Thorax eröffnet. Mit einer Kanüle (20 G) wurde in die Herzvorkammer gestochen, über eine Spritze Unterdruck erzeugt, das Blut entnommen und in ein EDTA-Röhrchen überführt.

3.4.3.2 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Kopolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin), diente der Trennung von im Blut zirkulierenden Zellen in einzelne Fraktionen. Zur Lymphozyten-Isolation wurden 2 ml Blut mit 2 ml DPBS gemischt. In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml Ficoll vorgelegt und diese mit 4 ml Blut/DPBS-Gemisch überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 40 Min. bei 400 x g und 18 °C. Die entstandene oberste klare Schicht wurde bis zur Interphase, die die Lymphozytenfraktion enthielt, abgesaugt. Die Lymphozyten wurden abgenommen, in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 3 x mit 6 ml DPBS gewaschen und für 10 Min. bei 100 x g und 18 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und dem Protokoll entsprechend für die SDS-PAGE weiterverarbeitet.

3.5 Zellkultivierung

Die Kultivierung der adhärenenten Zelllinie „LoVo“ erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² in einem Brutschrank bei konstanten 37 °C, 5 % Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit. Eine Subkultivierung wurde bei Erreichen von ca. 70 % Konfluenz (alle 3 bis 5 Tage) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml sterilem DPBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 ml einer 0,25 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung und einer Inkubation von 1 - 2 Min. im Brutschrank vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Trypsin ist eine Protease, die Proteine der extrazellulären Matrix abbaut. Um die Protease zu inhibieren, wurden 4 ml des FCS-haltigen Mediums zugegeben. Eine Vereinzelnung der Zellen wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit Hilfe einer sterilen Pipette erreicht. Ein Zehntel der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche transferiert und 5 ml des frischen Mediums hinzugegeben.

3.6 Aufbereitung Formalin-fixierter Gewebe

Nach mindestens 24-stündiger Fixierung in gepuffertem 4 %-igen Formalin wurden die Organe zugeschnitten und repräsentative Areale eingekapselt. Die Gewebe wurden automatisiert entwässert und eingebettet. Zur Entwässerung wurden sie sukzessive durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt, mit Xylol und darauffolgend mit erwärmtem Paraffin durchtränkt. Die so aufbereiteten Gewebe wurden abschließend in kleine Paraffinquader eingeblockt und bei RT gelagert.

Zur Erstellung von Gewebeschnitten für immunhistochemische Analysen wurde der Paraffinblock ca. 15 Min. auf einer Kühlplatte (- 15 °C) vorgekühlt. Der Block wurde in ein Rotationsmikrotom eingespannt und bis zum Erreichen einer geraden Anschnittfläche „getrimmt“ (10 µm). Nun wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die zum Strecken für 1 - 2 Min. auf ein erwärmtes Wasserbad (37 °C) gegeben und auf Glasobjektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden innerhalb von 2 Wochen nach Anfertigung für immunhistochemische Analysen verwendet.

3.7 Aufbereitung kryokonservierter Gewebe

3.7.1 DNA-Isolation

Zur Extraktion von DNA aus kryokonservierten Geweben wurde das „DNA Blood and Tissue“ Kit der Firma Qiagen und das vom Hersteller empfohlene Protokoll verwendet. Nach Messung der Konzentration wurde die isolierte DNA bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

3.7.2 RNA-Isolation

Zur Extraktion von RNA aus kryokonservierten Geweben wurde das „*TRIzol-Reagenz*“ der Firma Invitrogen verwendet. 1000 µl TRIzol-Lösung wurde in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß mit flachem Boden vorgelegt und max. 1 mg Gewebe zugefügt. Das Gewebe wurde nun mit Hilfe eines Ultrathorax ca. 15 Sek. bei Stufe 7 zerkleinert und anschließend nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll weiterverarbeitet. Nach Messung der Konzentration wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

3.7.3 Protein-Isolation

1 mg des kryokonservierten Gewebes bzw. ein einzelner Trigeminierv wurde in 100 µl Lysepuffer (siehe 2.10; in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flachem Boden) aufgenommen und für 15 Sek. im Ultrathorax auf Stufe 7 zerkleinert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation für 30 Min. bei 17500 x g und 4 °C. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Messung der Proteinkonzentration bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

3.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten DNA und RNA wurde mithilfe des Nanodrop Spektrophotometers der Firma Peqlab gemessen. Es wurden die Wellenlängen 230, 260 und 280 nm verwendet. Das Verhältnis von 260:280 nm sollte für DNA ca. 1,8 und für RNA ca. 2,0 betragen. Die 260:230 Ratio sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Beide Quotienten geben Auskunft über die Reinheit der isolierten Nukleinsäure. Niedrigere Werte sind auf eine Verunreinigung mit UV-absorbierenden Stoffen, wie Phenol oder Proteinen, zurückzuführen.

3.7.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „*DC Protein Assay*“ Kit der Firma Bio Rad verwendet. Dieser Assay beruht auf dem Prinzip des Lowry Assays, ist aber speziell an detergentzhaltige Lysepuffer angepasst. Zuerst wird ein Komplex zwischen Proteinen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung gebildet. Cu(II) wird zu Cu(I) reduziert und reagiert anschließend mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz, was zu einer intensiven Blaufärbung der Lösung mit einem Absorptionsmaximum von 750 nm führt. Für die Messung der Proteinkonzentration wurde ein 4-facher Ansatz für jede Probe, die 1/5 in Lysepuffer verdünnt wurde, angesetzt.

Reagenz	Volumen (μl)
1/5 verdünnte Probe	20
Lösung A´	100
Lösung B	800

Dieser Mix wurde 15 Min. im Dunkeln inkubiert und anschließend als Triplikat (jeweils 230 μ l) auf eine 96-well Platte aufgetragen und bei 750 nm gemessen.

3.8 Sequenzierung regulatorischer und proteinkodierender Bereiche der Kandidatengene im *Mss4* Locus und Vergleich der *BDIX* und *BDIV* Allele

Die unterschiedliche Sensibilität der *BDIX* und *BDIV* Ratten gegenüber chemisch induzierten MPNSTs ist wahrscheinlich auf Sequenzunterschiede in Suszeptibilitäts- oder Resistenzgenen zurückzuführen. Daher wurden sowohl die proteinkodierenden Sequenzen als auch die mutmaßlich regulatorischen Bereiche der positionell in Frage kommenden Gene mittels Sanger Sequenzierung analysiert und die *BDIX* und *BDIV* Allele miteinander verglichen.

3.8.1 PCR

Zum Vergleich der Basenabfolge regulatorischer Sequenzen der Kandidatengene des *Mss4* Locus wurden Primer verwendet, die den 5´ UTR, den 3´ UTR und einen Bereich von etwa 500 bp vor Transkriptionsstart inklusive des mutmaßlichen Promotors des jeweiligen Gens abdeckten. Zur Amplifizierung der regulatorischen Fragmente mit einer Länge von maximal 700 bp wurden 500 ng DNA aus *BDIX* oder *BDIV* Gewebe eingesetzt und je nach GC-Gehalt der Zielsequenz entweder der „2 x *Mastermix*“ der Firma Fermentas oder das „*Accu Prime GC rich DNA Polymerase*“ Kit der Firma Life Technologies verwendet.

Für die Amplifizierung von Templates mit einem GC-Gehalt von 40 – 60 % wurde der „2 x *Mastermix*“ und folgender Ansatz für eine Probe verwendet:

Reagenz	Volumen (μl)
2 x <i>Mastermix</i>	12,5
Sense Primer (10 μ M)	1
Antisense Primer (10 μ M)	1
500 ng DNA	X
A. dest.	ad 25

Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
94	5 Min.	1
94	1 Min.	} 30
X	1 Min.	
72	2 Min.	
72	10 Min.	1

Das „*Accu Prime GC rich Polymerase*“ Kit empfiehlt sich, wenn der GC-Gehalt über 65 % liegt. Das Kit enthält die thermostabile Polymerase des Archaeobakteriums *Pyrolobus fumarius*. Der verwendete Puffer enthält zudem Proteine, die die Primer/Template-Hybridisierung verstärken und damit die Spezifität der PCR erhöhen.

Für die Amplifizierung GC-reicher Sequenzen wurde folgender Ansatz für eine Probe verwendet:

Reagenz	Volumen (µl)
500 ng DNA	x
Sense Primer (10 µM)	0,5
Antisense Primer (10 µM)	0,5
5 x Puffer A	5
Accuprime GC-rich DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5
A. dest.	ad 25

Folgendes Protokoll wurde zur Amplifizierung GC-reicher Sequenzen verwendet:

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
95	3 Min.	} 30
95	30 Sek.	
X	30 Sek.	
72	1 Min.	
72	10 Min.	1

Nach Abschluss der Reaktion wurden die PCR-Produkte auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen. Entsprechend der Größe des PCR-Produktes der berechneten Produktgröße, wurde die Probe aufgereinigt.

3.8.2 One-Step RT-PCR

Um proteinkodierende Sequenzen der Kandidatengene zu amplifizieren, wurde das „*One-Step RT-PCR*“ Kit der Firma Qiagen verwendet. Nachstehender Reaktionsansatz wurde für eine Probe hergestellt:

Reagenz	Volumen (µl)
5 x PCR Puffer	5
Sense Primer (10 µM)	1,5
Antisense Primer (10 µM)	1,5
dNTPs	1
Enzym-Mix	1
1 µg RNA	X
A. dest.	ad 25

Die cDNA-Synthese und die sich direkt anschließende PCR fanden unter folgenden Bedingungen statt:

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
<u>Reverse Transkription</u>		
50	30 Min.	1
95	15 Min.	1
<u>PCR</u>		
94	1 Min.	} 30
60	1 Min.	
72	2 Min.	
72	10 Min.	1

Nach erfolgter PCR wurden die Produkte auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen. Entsprach die Größe des PCR-Produktes der berechneten Produktgröße, wurde die Probe aufgereinigt.

3.8.3 Native Agarosegel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegel-Elektrophorese (1 h bei 120 V) aufgetrennt und deren Größe festgestellt. Dazu wurde ein 2 %-iges Agarosegel gegossen.

Reagenz	Menge
Agarose	1,6 g
50 x TAE	1,6 ml
A.dest.	80 ml
Ethidiumbromid	3 μ l

5 μ l des PCR Produktes wurden mit 1 μ l des 5 x DNA-Ladepuffers versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Aufgrund der negativen Eigenladung der DNA wandert diese bei Anlegung eines elektrischen Feldes in Richtung Anode, wobei die Wanderungstrecke direkt mit der Größe des DNA Fragmentes korreliert. Die Größe der Fragmente wurde unter Zuhilfenahme eines 100 bp Größenstandards, welcher parallel zu den Proben durch das Gel wanderte, bestimmt. Da Ethidiumbromid zwischen den DNA Strängen interkaliert und unter Einfluss von UV-Licht fluoresziert, konnte die Auftrennung der DNA mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage optisch erfasst werden.

3.8.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach erfolgter PCR bzw. One-Step RT-PCR wurden die Produkte mithilfe des „*QIAquick PCR Purification*“ Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und das Eluat bei - 20 °C gelagert.

3.8.5 Sequenzierung

Das sog. „Cycle-Sequencing“ basiert auf der Kettenabbruchsynthese nach Sanger. Während in der Sanger-Sequenzierung radioaktiv-markierte Di-desoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) Verwendung finden, nutzt das Cycle-Sequencing fluoreszenz-markierte ddNTPs. Da jedes ddNTP mit einem anderen Fluorophor gekoppelt ist, können alle vier in einen Reaktionsansatz gegeben werden. Wie bei der konventionellen Sanger-Sequenzierung werden die ddNTPs in den neusynthetisierten Strang eingebaut. Da sie keine 3'-Hydroxygruppe besitzen, kann keine Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids erfolgen und die Kette bricht ab. Als Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die an ihren Enden je nach Abschlussnukleotid unterschiedlich farblich fluoreszenzmarkiert sind. Zur Trennung der Fragmente wird eine Kapillargelelektrophorese durchgeführt. Die Abfolge der unterschiedlichen Farbsignale wird in Form eines Chromatogramms dargestellt und gibt die Basenabfolge des analysierten DNA-Stranges wieder.

3.8.5.1 Cycle-Sequencing

Für die Sequenzierung wurde das „*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*“ Kit (Applied Biosystems) verwendet. Der folgende Mastermix für eine Probe wurde verwendet:

Reagenz	Volumen (µl)
A. dest.	10,8
Sequence Reaction Mix	2
5 x Puffer	3
Mastermix pro Probe	15,8
aufgereinigtes PCR-Produkt	1
Sense <i>oder</i> Antisense Primer (1 µM)	3,2

Die Reaktion fand unter nachfolgend aufgelisteten Bedingungen statt:

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
96 °C	10 Sek.	} 25
50 °C	0 Sek.	
55 °C	5 Sek.	
60 °C	2 Min.	

3.8.5.2 Aufreinigung der Cycle-Sequencing Produkte

Zur Aufreinigung des Cycle-Sequencing Produktes wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 400 µl Fällungsreagenz (siehe 2.10) auf den Cycle-Sequencing Ansatz gegeben und alles mit Hilfe eines Vortex-Gerätes ca. 5 Sek. durchmischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation der Mischung im Dunkeln und eine 30-minütige Zentrifugation bei 20000 x g. Das Fällungsreagenz wurde nach erfolgter Zentrifugation abgesaugt und 400 µl 70 %-iges Ethanol zur Probe gegeben und alles leicht gemischt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 20000 x g wurde das Ethanol abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde für 10 Min. bei 37 °C und offenem Deckel des Reaktionsgefäßes im Heizblock getrocknet. Zu dem getrockneten DNA-Pellet wurden 20 µl HIDI-Formamid geben, welches die DNA denaturiert und diese einzelsträngig hält. Die vorbereiteten Proben wurden luftblasenfrei auf eine 96-well Platte aufgetragen und mithilfe des ABI Genetic Analyzer 3130 sequenziert.

3.8.5.3 Auswertung der Sequenzdaten

Zum Vergleich der BDIV und BDIX Sequenzen wurde die Sequencher 4.3 Software verwendet. Ein Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit der Referenzsequenz (*Rattus norvegicus*) wurde unter Verwendung der NCBI BLAST Funktion durchgeführt.

3.9 Vergleichende Analysen der mRNA Expression von Kandidatengenen in den Trigeminiernerven von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter

Zur Detektion potentieller mRNA Expressionsunterschiede der Kandidatengene in Geweben von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter wurden Realtime PCRs durchgeführt. Die konventionelle PCR erlaubt lediglich eine Aussage über die Produktmenge nach einer bestimmten Zyklenzahl. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Realtime PCR einerseits ein zeitliches Nachverfolgen der Amplifikation in jedem Ansatz, andererseits kann daraus eine Aussage über die Ausgangsmenge des Transkripts in einem Gewebe abgeleitet werden. Ermöglicht wird dies durch die Verwendung des unspezifisch zwischen die DNA-Stränge interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green I. Dessen Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und korreliert direkt mit der Produktmenge im Reaktionsansatz.

3.9.1 cDNA-Synthese

1 µg RNA wurde mithilfe des „*SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR*“ Kits der Firma Invitrogen in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurden die im Kit mitgelieferten Random Hexamer-Primer und das vom Hersteller empfohlene Protokoll. Für eine Probe wurde zunächst folgender Ansatz hergestellt und dieser für 5 Min. bei 65 °C inkubiert:

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen (µl)</u>
1 µg RNA	x
Random Hexamer-Primer (50 ng/µl)	1
10 mM dNTP-Mix	1
DEPC-Wasser	ad 10

Die Probe wurde anschließend kurz abzentrifugiert und für mindestens 1 Min. auf Eis inkubiert. Nun wurde der sogenannte „DNA-Mix“ hergestellt. Für eine Probe bestand dieser aus:

Reagenz	Volumen (µl)
10 x RT Puffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0,1 M DTT	2
RNAse OUT (40 U/µl)	1
SuperScript III RT (200 U/µl)	1

Nach Zugabe von 10 µl „DNA-Mix“ wurde die Probe für 10 Min. bei 25 °C, 50 Min. bei 50 °C und 5 Min. bei 85 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl RNAseH wurde die Probe abschließend für 20 Min. bei 37 °C inkubiert. Die cDNA wurde 1/5 mit A. dest. verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

3.9.2 Realtime PCR

Zur relativen Quantifizierung der Transkriptmengen im Gewebe von BDIX und BDIV Ratten beiderlei Geschlechts wurde das 7500 Fast Realtime PCR System von Applied Biosystems und das „*Platinum Sybr Green qPCR Supermix UDG*“ Kit der Firma Invitrogen verwendet. Ein einfacher Mastermix bestand aus nachfolgend aufgezählten Komponenten, wobei jede Probe im Triplikat gemessen wurde:

Reagenz	Volumen (µl)
Sybr Green qPCR SuperMix-UDG	12,5 µl
Sense Primer (10 µM)	0,5 µl
Antisense Primer (10 µM)	0,5 µl
Rox-Verdünnung (25 nM)	1 µl
cDNA (1/5 verdünnt)	5 µl
A. dest.	ad 25 µl

Für die Realtime PCR wurde das Standard Cycling Programm verwendet, welches nachfolgend genannte Bedingungen umfasste.

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
50	2 Min.	} 40
95	10 Min.	
95	15 Sek.	
60	1 Min.	

3.9.3 Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurde die deltaCT-Methode verwendet. Diese setzt eine interne Kontrolle voraus, d.h. ein Housekeepinggen, dessen Expressionsstärke parallel zu der des Zielgens analysiert wird. Mithilfe eines gleichmäßig exprimierten Housekeepinggens, in unserem Fall *Hprt* (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), werden Variationen in der Ausgangsmenge der RNA ausgeglichen. Die Normierung wird durch folgende Berechnung erzielt:

$$\Delta CT = CT_{\text{Target-Gen}} - CT_{\text{Housekeeping-Gen}}$$

Um den Expressionsunterschied zwischen den Stämmen und Geschlechtern zu ermitteln, wurde die Formel $2^{-\Delta Ct}$ angewendet.

3.10 Analyse der Proteinexpression von Kandidatengen im *Mss4* Locus in Geweben von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter

Da die Stärke der mRNA Expression nicht zwingend mit der Proteinmenge korreliert, wurde letztere von besonders interessanten Kandidatengen mittels immunhistochemischer und Western Blot Analysen in verschiedenen Geweben von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter verglichen.

3.10.1 SDS-PAGE und Western Blot

3.10.1.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Molekülmasse. Als Trennmittel dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis. Durch ein Denaturieren der Proteine bei 95 °C und den Einsatz von 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel liegen die Proteine in ihrer Primärstruktur vor. Das anionische Detergenz SDS überdeckt die Eigenladungen der linearisierten Proteine, wodurch die Auftrennung des Proteingemisches lediglich nach dem Molekulargewicht ermöglicht wird.

Zunächst wurde ein „Sandwich“ aus einer größeren Glasplatte mit zwei fixierten Spacern und einer kleineren Glasplatte hergestellt. Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde zunächst ein Trenngel (15 ml Volumen) gegossen. Nach dessen Polymerisierung (ca. 45 Min.) wurde

ein Sammelgel (5 ml Volumen) zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesetzt.

Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
<u>Trenngel</u>		<u>Sammelgel</u>	
A. dest.	4,9 ml	A. dest.	3,4 ml
30 % Acrylamid Mix	6 ml	30 % Acrylamid Mix	830 µl
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	3,8 ml	1 M Tris/HCl, pH 6,8	630 µl
10 % SDS	150 µl	10 % SDS	50 µl
10 % APS	150 µl	10 % APS	50 µl
TEMED	6 µl	TEMED	5 µl

50 µg Protein wurden in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und durch Zugabe von Lysepuffer ein Endvolumen von 20 µl eingestellt. Nun wurden 5 µl Lämmli-Puffer (siehe 2.10) hinzugegeben, die Mischung für 5 Min. bei 95 °C im Heizblock inkubiert und anschließend sofort für ca. 5 Min. auf Eis gestellt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurde ein Proteingewichtsmarker mitgeführt. Nach Polymerisierung des Sammelgels (ca. 15 Min.) wurde der Kamm herausgezogen, das Sandwich in die Elektrophoresekammer eingespannt und die obere und untere Kammer mit jeweils ca. 200 ml des 1-fachen Laufpuffers gefüllt (siehe 2.10). Vor dem Auftrag der Proben wurden die Taschen mit Laufpuffer durchgespült. Jeweils 25 µl der vorbereiteten Proben bzw. 5 µl des Proteingewichtsmarkers wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 150 V für 1 h durchgeführt.

3.10.1.2 Western Blot

Der sog. Western Blot wird genutzt, um die durch eine SDS-PAGE separierten Proteine einer Immunfärbung zugänglich zu machen und damit eine Identifizierung spezifischer Proteine in einem Proteingemisch zu ermöglichen. Hierzu werden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran elektrophoretisch übertragen. Der Transfer mit Hilfe des sog. Tankblot-Verfahrens erfolgte in einem vertikalen Puffertank an dessen Seitenwänden Elektroden befestigt waren. Durch eine ständige Umwälzung des Puffers wurde eine homogene Temperatur im Tank erreicht und die Bildung eines Ionengradienten verhindert. Vor dem Transfer wurde zunächst ein „Sandwich“, von außen nach innen bestehend aus einer Gitterkassette, einem Schwämmchen, zwei Lagen Whatman-Papier und einer Nitrocellulosemembran, hergestellt und alle Komponenten des Sandwiches mit Transferpuffer durchtränkt. Das Polyacrylamidgel wurde vorsichtig auf die

Nitrocellulosemembran aufgelegt. Nun wurden zwei weitere Lagen mit Transferpuffer durchtränkten Whatman-Papiers auf das Gel gelegt und vorhandene Luftblasen durch vorsichtiges darüber rollen mit einem 15 ml Zentrifugenröhrchen entfernt. Ein weiteres Schwämmchen wurde aufgelegt, die Gitterkassette geschlossen und das Sandwich in den mit Transferpuffer (siehe 2.10) gefüllten Tank eingespannt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 280 mA unter ständiger Kühlung.

3.10.1.3 Ponceau Rot Färbung

Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde Ponceau Rot, ein Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen bindet, verwendet. Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran für 5 Min. mit unverdünnter Ponceau S Lösung inkubiert. Die überschüssige Färbelösung wurde mit A. dest. von der Membran gewaschen und das Färbemuster fotodokumentiert. Das an die Proteine gebundene Ponceau S wurde vor einer weiteren Verwendung der Nitrocellulosemembran mithilfe von Waschpuffer (TBST oder TTBS; siehe 2.10) entfernt.

3.10.1.4 Immundetektion

Antikörper ermöglichen die Detektion und einen semiquantitativen Vergleich der Expression bestimmter Proteine in einem Gewebe oder Zelltyp. Die hier verwendeten polyklonalen Antikörper binden an verschiedene Epitope des Zielproteins und werden selbst anschließend von einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. HRP überführt das in der Detektionssubstanz enthaltene Luminol in seine oxidierte Form, wodurch Chemolumineszenz entsteht und auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann.

Für die Detektion der Glutathionperoxidase 2 in Geweben und Zelltypen von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter wurde der kommerziell erhältliche Gpx2 Antikörper ab64322 und der freundlicherweise von Prof. Brigelius-Flohé zur Verfügung gestellte Gpx2-Antikörper GBF (GBF, Braunschweig; Böcher et al., 1997) verwendet. Für den Gpx2-Antikörper der Firma Abcam und den Beta-Aktin-Antikörper, welcher zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteinauftrags Verwendung fand, wurde die Membran mit einer 5 %-Magermilchlösung (in TBST) blockiert und die Antikörper in einer 5 %-igen Magermilchlösung (in TBS) verdünnt. Im Falle des GBF Antikörpers wurde zur Blockierung und Antikörperverdünnung eine 3 %-ige BSA-Lösung (in TTBS) verwendet. Die verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind in Tab. 7 aufgelistet.

Die Membran wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zunächst für 1 h bei RT mit 5 ml Blockierungslösung auf einem horizontalen Mischgerät inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei 4 °C über Nacht mit 5 ml primäantikörperhaltiger Lösung inkubiert. Es folgten drei Waschschritte à 10 Min. mit 10 ml TTBS oder TBST. Die Inkubation mit Anti-Rabbit Sekundäantikörper fand für 1 h bei RT statt. Nach dreimaligem Waschen für 10 Min. mit TTBS oder TBST wurde die Membran für 30 Min. mit 5 ml ECL-Reagenz im Dunkeln (in mit Alufolie umwickelten 50 ml Zentrifugenröhrchen) inkubiert. Die Membran wurde in eine Filmkassette überführt und in einer Dunkelkammer der Röntgenfilm für 15 Sek. aufgelegt. Vor Verwendung wurde die 5-fache Stocklösung sowohl des Entwicklers als auch des Fixierers auf eine 1-fache Arbeitslösung mit A. dest. verdünnt. Jeweils 500 ml der Entwickler- bzw. Fixierlösung und 500 ml A. dest. wurden in separate Plastikwannen gefüllt. Der Röntgenfilm wurde zunächst in der Entwicklerlösung geschwenkt. Wurden Banden sichtbar, wurde der Röntgenfilm kurz in A. dest. gewaschen und möglichst schnell in die Fixierlösung überführt. Die Fixierung war nach ca. 1 Min. abgeschlossen und der Röntgenfilm wurde gründlich mit A. dest. gewaschen und luftgetrocknet.

Tab. 7 Antikörper-Verdünnungen für den Western Blot.

Antikörper		Spezies	Bestellnummer/Bezugsquelle	Verdünnung
Primär	Gpx2	Kaninchen	ab64322, Abcam	1/5000
	Gpx2	Kaninchen	Prof. Regina Brigelius-Flohé	1/5000
	β-Aktin	Kaninchen	ab8227, Abcam	1/5000
Sekundär	Anti-Kaninchen IgG + HRP	Esel	NA934, GE Healthcare	1/10000

3.10.2 Immunhistochemische Färbungen

Um zu untersuchen, ob und in welchem spezifischen Zelltyp ein Protein exprimiert war, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Diese Methode beruht auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers an ein (monoklonal) oder mehrere (polyklonal) Epitop(e) eines Proteins. Im Falle der indirekten Detektion bindet ein enzymgekoppelter Sekundär- an den Primäantikörper. Diese Nachweismethode hat den Vorteil, dass ein deutlich stärkeres Signal zu erwarten ist, da ein Primäantikörper gleichzeitig von mehreren Sekundäantikörpern gebunden werden kann. Die konjugierte HRP reagiert mit Wasserstoffperoxid, wodurch Protonen frei werden. Diese oxidieren das vorher nahezu farblose Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu seinem braunen Endprodukt.

3.10.2.1 Entparaffinierung von Gewebsschnitten

Paraffineingebettete Gewebeschnitte mussten vor Versuchsbeginn entparaffiniert werden. Die 2 µm dicken Schnitte wurden zunächst 1,5 h bei 60 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 5 Min. in Xylol, 2 Min. in 100 %-igem Ethanol und 2 Min. in 96 %-igem Ethanol. Abschließend wurden die Schnitte in eine mit A. dest. gefüllte Küvette überführt.

3.10.2.2 APES-Beschichtung von Objektträgern

Da Mastzellen sich im Verlauf der immunhistochemischen Färbung von unbeschichteten Objektträgern lösten, wurden die Objektträger mit Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtet. Dazu wurden die Objektträger kurz in A. dest. gespült, 5 Min. mit Aceton und anschließend 5 Min. mit 2 %-igem APES (in Aceton verdünnt) inkubiert. Nun wurden die Objektträger 2 x kurz in Aceton und 2 x in DEPC-Wasser geschwenkt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Die isolierten Mastzellen bzw. Makrophagen/Monozyten wurden auf den beschichteten Objektträgern großflächig ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet.

3.10.2.3 Immunhistochemische Färbung

Aus dem Peritoneum isolierte Zellen und Schnitte von formalinfixierten Geweben wurden zunächst für 10 Min. in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend kurz in DPBS gewaschen. Die Gewebeschnitte bzw. die ausgestrichenen Zellen wurden nun mit einem Fettstift auf dem Objektträger eingegrenzt. Nachdem dieser getrocknet war, wurden die peritonealen Zellen für 1 Min. und Gewebeschnitte für 5 Min. mit 100 – 200 µl einer 3 %-igen H₂O₂-Lösung inkubiert und anschließend 1 x mit DPBS gewaschen. Im Weiteren wurde das „*Zytochem Plus Polymer Kit*“ der Firma Zytomed verwendet. Zunächst wurden die Zellen bzw. Schnitte 10 Min. mit 100 – 200 µl der sog. „Blocking Solution“ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen bzw. Schnitte für 1 h mit 100 – 200 µl der Antikörper-Verdünnung in einer feuchten Kammer inkubiert (Tab. 8). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ausstrichpräparat bzw. ein Gewebeschnitt lediglich mit „Antibody Diluent“ inkubiert. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit einem HRP-konjugierten Polymer an, das als Sekundärantikörper fungierte und eine 2-minütige Inkubation mit DAB (ca. 1000 µl Substratpuffer + 5 µl DAB-Konzentrat). Abschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt, um zelluläre Strukturen, wie z.B. die Nuklei sichtbar zu machen.

Tab. 8 Antikörper-Verdünnungen für die Immunhistochemie.

Antikörper	Bestellnummer/Bezugsquelle	Verdünnung
Gpx2	ab64322, Abcam	1/5000
	Prof. Brigelius-Flohé	1/12000
Cyclin D1*	C1677R06, DCS	Fertiglösung
Ngfr	N3908, Sigma	1/500
CD68**	MCA341R, AbD Serotec	1/40

* Für den Cyclin D1-Antikörper musste nach Entparaffinierung zunächst eine Vorbehandlung in einem 98 °C Wasserbad für 20 Min. bei pH 9,0 durchgeführt werden.

** Monoklonarer Antikörper aus der Maus.

Zur Verdünnung der Antikörper wurde das im Kit enthaltene „Antibody Diluent“ verwendet.

3.10.3 Hämalau-Färbung

Die Gewebsschnitte bzw. Ausstriche wurden nach erfolgter Immunfärbung 30 Sek. in der rötlich-braunen Hämalau-Lösung inkubiert. Ein Anheben des pH-Wertes durch einen ca. 1-minütigen Spülschritt in Leitungswasser erzeugt die typisch blau-violette Anfärbung der Zellen. Eine Entwässerung des Gewebeschnittes bzw. des Ausstrichpräparates fand durch eine aufsteigende Ethanolreihe statt. Der Schnitt wurde nacheinander jeweils für ca. 10 Sek. in einer 70 %-, 96 %- und 100 %-igen Ethanollösung geschwenkt. Abschließend wurde der Gewebsschnitt 2 x für 10 Sek. in Xylol geschwenkt und schließlich mit Pertex eingedeckt.

3.10.4 Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase-Färbung

Die Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase (ASDCL)-Färbung diente dem Nachweis von Mastzellen in Gewebeschnitten von Trigeminierven, MPNSTs, weiteren lymphatischen Geweben und in Ausstrichpräparaten. Die Mastzellen waren spezifisch anhand eines rot-violetten Farbniederschlags zu erkennen. Die ASDCL-Färbungen wurden von Mitarbeitern des Hauptlabors des Instituts für Pathologie und Neuropathologie angefertigt.

3.11 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Messung von Streulicht oder Fluoreszenzsignalen. Streulicht entsteht, wenn eine Zelle an einem Laserstrahl vorbeigeführt wird. Mithilfe des Vorwärtsstreulichtes (FSC = *Forward Scatter*) wird die Beugung des Lichts im flachen Winkel gemessen und hängt von der Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel. Diese hängt von der Granularität und inneren Struktur der Zelle ab. Ferner kann mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Expression sowohl von Oberflächen- als auch intrazellulären Antigenen analysiert werden. Entsprechend des Absorptionsspektrums der

jeweiligen Fluorophore werden diese mit einem Laser angeregt und das emittierte Licht gemessen. Die Messung des Streulichts bzw. Fluoreszenzsignals mit geeigneten Detektoren erlaubt eine multiparametrische Korrelation von Zelleigenschaften und objektive Quantifizierung der Proteinexpression.

3.11.1 Zellzählung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit der gleichen Menge einer 0,2 % igen Trypanblau-Lösung versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer transferiert. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Zellzahl ermittelt, indem die lebenden (hell erscheinenden) innerhalb von vier Quadraten befindlichen Zellen ausgezählt wurden. Nach Bildung des Mittelwertes errechnete sich die Zellzahl nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Susp.}} [\text{Zellen/ml}] = n \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.11.2 Immunfärbung

Zur spezifischen Markierung von Antigenen wurden in der vorliegenden Arbeit indirekte Immunfärbungen durchgeführt. Ein gegen Gpx2 gerichteter Primärantikörper wurde von einem fluorophorkonjugierten Sekundärantikörper gebunden. Zur Markierung der Mastzellen mit IgE wurde sich die starke Wechselwirkung von Biotin, das an den IgE-Antikörper konjugiert war, mit dem fluorophorgekoppelten Streptavidin zunutze gemacht.

Die mittels Lavage aus dem Peritoneum der Ratte gewonnenen Immunzellen wurden für 5 Min. bei 400 x g und 15 °C mit eingeschalteter Bremse zentrifugiert. Die DPBS-Lösung wurde verworfen, die Zellen in 1 ml FACS-Puffer (siehe 2.10) resuspendiert und gezählt.

Ungefähr 2×10^6 Zellen wurden in jedes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit 1,5 ml FACS-Puffer gewaschen und in diesem Fall und allen weiteren Zentrifugationsschritten für 5 Min. bei 17 x g und 15 °C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor und gelöster Bremse pelletiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Puffers wurden die Zellen für 30 Min. in 1 ml einer 2 % igen Paraformaldehyd-Lösung (siehe 2.10) fixiert, pelletiert und einmal mit 1,5 ml FACS-Puffer gewaschen.

Da Gpx2 im Zytoplasma der Zellen exprimiert wurde, erfolgte zunächst eine Permeabilisierung der Zellmembran, um die intrazelluläre Färbung zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde der Saponin-haltige Permeabilisierungspuffer „BD Perm/Wash Buffer“ der Firma BD-Biosciences verwendet. Die 10-fache Stocklösung wurde auf eine 1-fache konzentrierte Arbeitslösung mit DPBS verdünnt. Die Zellen des Peritoneums wurden nun für 15 Min. bei RT permeabilisiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Min. bei 17 x g wurden die

Zellen 1 h bei RT mit 100 µl einer 1/200-Verdünnung des Gpx2-Antikörpers ab64322 inkubiert. Zur Verdünnung des Gpx2-Antikörpers wurde der 1-fache Permeabilisierungspuffer verwendet. Nach erfolgter Pelletierung der Zellen wurden diese mit 1,5 ml des 1-fachen Permeabilisierungspuffers gewaschen und dunkel für 1 h bei RT mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (1/100 Verdünnung mit 1-fachem Permeabilisierungspuffer; 100 µl Endvolumen) inkubiert, anschließend pelletiert und erneut gewaschen. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden lichtgeschützt durchgeführt.

Zur Identifizierung von Mastzellen im Peritonealexudat wurde eine Oberflächemarkierung mit Anti-IgE Antikörper durchgeführt. Der biotinkonjugierte Anti-IgE Antikörper wurde 1/5 mit FACS-Puffer verdünnt (Endvolumen 100 µl) und die Zellen für 1 h bei RT inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 1,5 ml FACS-Puffer folgte eine Inkubation mit dem APC-konjugierten Streptavidin (1/5 Verdünnung; 100 µl Endvolumen) für ebenfalls 1 h bei RT. Nach letztmaligem Pelletieren und Waschen wurden die Zellen bis zur FACS-Analyse in 500 µl FACS-Puffer lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Tab. 9 Fluorophore und deren Emissionsspektren für die FACS-Analyse.

Fluorophor	Absorption	Emission
Allophycocyanin	650 nm	660 nm
Fluoresceinisothiocyanat	492 nm	520 nm

3.11.3 Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung der Daten

Die Analyse wurde freundlicherweise von Dipl. ing. Klaus Lennartz, Mitarbeiter der AG Molekulare Genetik, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt und ausgewertet.

3.12 Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten und statistische Auswertung

Zur Durchführung der Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten von Ratten nach ENU-Exposition wurde die Sigma Plot Software verwendet. Tiere, die aufgrund einer anderen Erkrankung als einem MPNST verstarben, wurden als zensierte Ereignisse geführt und sind in der Kaplan Meier Überlebenskurve als „ticks“ angegeben. Auf der Basis der Kaplan Meier Überlebenskurven wurde die mediane Überlebenszeit und MPNST-Inzidenz am Tag 200 (%) abgelesen. Die 95 %- Konfidenzintervalle für die mediane Überlebenszeit, MPNST-Inzidenz am Tag 200 (%) und der überlebenden Fraktion am Tag 200 (%) wurden berechnet.

Zur statistischen Auswertung der Kaplan Meier Überlebenszeiten von kongenen und subkongenen Rattenstämmen wurde der sog. Log-Rank Test bzw. dessen Erweiterung für den paarweisen Vergleich mehrerer Gruppen (Holm-Sidak Test) verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wird als statistisch signifikant erachtet. Die statistische Auswertung der Daten wurde unter Verwendung der Sigma Plot Software durchgeführt.

3.13 Auswertung der Microarray Daten

Zur Auswertung der Microarray Daten wurde das Beadstudio Expression Module (Macrogen) verwendet. Eine Normalisierung der Expression wurde durch die sog. Rank Invariant Funktion erreicht. Gene mit einer Expression < 100 (in arbiträren Einheiten) wurde als nicht exprimiert definiert. Um Expressionsunterschiede zwischen den Stämmen anzugeben, wurde die jeweils niedrigere Expression in dem einen oder anderen Stamm gleich 1 gesetzt und darauf basierend das Verhältnis (x:y) berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Feinkartierung des *Mss4* Locus auf Chr. 6

4.1.1 Zucht kongener und subkongener Rattenstämme

Zur Feinkartierung des in weiblichen Tieren Tumoresistenz-vermittelnden *Mss4* Locus wurden zusätzlich zum BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm weitere kongene und subkongene Linien gezüchtet, bei denen entweder der komplette *Mss4* Locus oder nur einen Teil davon aus Fragmenten des tumorresistenten BDIV Stammes bestand und sich auf dem genetischen Hintergrund des tumorsuszeptiblen BDIX Stammes befand. Nach ENU-Applikation folgten die Analyse und der Vergleich des jeweiligen Effektes der BDIV Fragmente auf die Tumorzinzidenz und Überlebenszeit weiblicher und männlicher Tiere.

Die Zucht des kongenen Stammes BDIX.BDIV-*Mss4b* war bereits zu Beginn dieser Dissertation abgeschlossen. Zwei weitere Stämme wurden erzeugt, BDIX.BDIV-*Mss4c* und BDIX.BDIV-*Mss4d*, indem heterozygote männliche BDIX.BDIV-*Mss4b* Ratten mit BDIX Weibchen sukzessive rückgekreuzt wurden. Die heterozygoten männlichen BDIX.BDIV-*Mss4c* Ratten wurden anschließend mit weiblichen BDIX Tieren verpaart, um eine Verkürzung des *Mss4c* Fragmentes und somit den BDIX.BDIV-*Mss4d* Stamm zu erzeugen.

Die Nachkommen aus den entsprechenden Kreuzungen wurden im Bereich des kartierten Tumoresistenzhaplotyps (*D6Rat218* bei 90,9 Mb bis *D6Ngb* bei 111,2 Mb) mit Hilfe der PCR-Amplifikation polymorpher Mikrosatellitenmarker und anschließender Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel genotypisiert. Trug ein Nachkomme ein zur Feinkartierung geeignetes heterozygoten BDIV Fragment, wurden durch Bruder-Schwester Verpaarungen homozygote Tiere gezüchtet. Die auf der Amplifikation von polymorphen Mikrosatelliten basierende Genotypisierung der Abkömmlinge von BDIX und BDIV Kreuzungen ist exemplarisch in Abb. 3 dargestellt. Durch Vergleich mit den Mikrosatellitenallelen reiner BDIX, BDIV und auch heterozygoten (BDIX x BDIV)_{F₁} Tieren wurde der Genotyp der Nachkommen bestimmt.

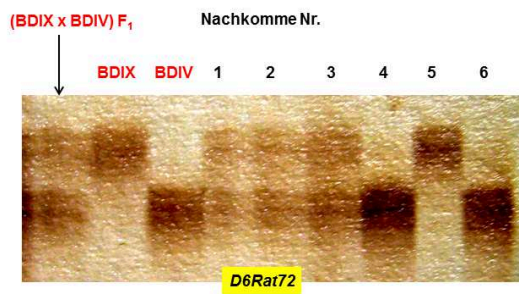


Abb. 3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Mikrosatelliten-gestützten Genotypisierung von Ratten zur Erzeugung kongener und subkongener Stämme beispielhaft dargestellt am Marker *D6Rat72*.

Zur Genotypisierung wurde die Größe der Mikrosatelliten-Allele in den Stämmen BDIX und BDIV (homozygot) und der F₁ Generation (heterozygot) mit der Größe der Marker in den Nachkommen verglichen.

4.1.2 Genomische Charakterisierung der kongenen und subkongenen Stämme

Der zuvor analysierte BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm trägt ein kongenes BDIV Fragment, das von dem Mikrosatellitenmarker *D6Mit1* (98,8 Mb) bis *D6Mgh2* (133,1 Mb) reicht (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011). Der BDIX.BDIV-*Mss4b* Stamm trägt ein 75.2 Mb großes BDIV Insert, das den Bereich zwischen den Markern *D6Rat132* (52,8 Mb) und *D6Mgh3* (128,0 Mb) und damit den gesamten Tumoresistenzhaplotyp umfasst. Der BDIX.BDIV-*Mss4c* Stamm trägt BDIV Allele von *D6Rat132* (52,8 Mb) bis *D6Rat229* (99,7 Mb) und somit die zentromerischen 40 % des Tumoresistenzhaplotyps. Der BDIX.BDIV-*Mss4d* Stamm trägt das derzeit kleinste zur Verfügung stehende BDIV Fragment. Dieses Fragment deckt einen Bereich zwischen den Mikrosatellitenmarkern *D6Mit8* (97,6 Mb) und *D6Rat229* (99,7 Mb) ab und umfasst damit den Kernbereich der Assoziation am Marker *D6Mit1* (98,8 Mb; Koelsch, Fischer et al. 2006; Abb. 4).

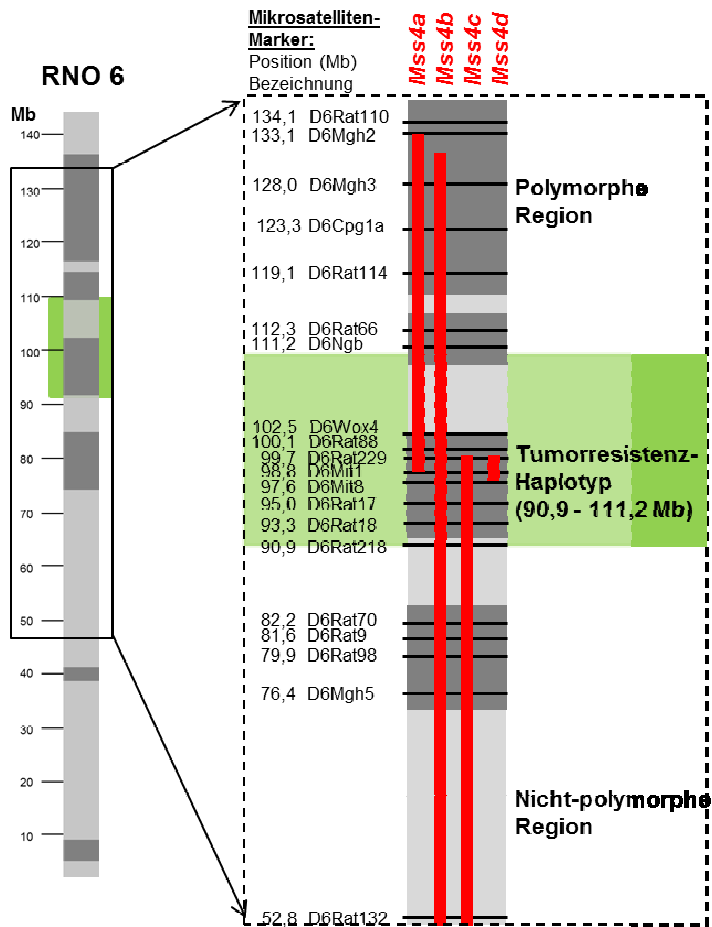


Abb. 4 Physikalische Lage der kongenen und subkongenen BDIV Fragmente *Mss4a*, *Mss4b*, *Mss4c* und *Mss4d* im BDIX Genom in Bezug auf den Tumorresistenzhaplotyp.

Die kongenen Fragmente sind als rote Balken dargestellt, der Haplotyp grün hinterlegt. Polymorphe Bereiche des Chromosoms zwischen BDIX und BDIV Ratten sind dunkelgrau und nicht polymorphe hellgrau hinterlegt. Die Lage der Mikrosatellitenmarker ist durch horizontale schwarze Linien dargestellt.

4.1.3 Effekt der kongenen und subkongenen BDIV Fragmente *Mss4b*, *Mss4c* und *Mss4d* auf die Tumorzinzidenz und Überlebenszeit

Die Kaplan Meier Analysen der Überlebenszeiten der Parentalstämme BDIX und BDIV nach ENU-Exposition an PND1 zeigten deutlich, dass BDIX Ratten signifikant schneller an MPNSTs verstarben als BDIV Ratten (109 BDIX Ratten, 112 BDIV Ratten; $p < 0,001$). Einige wenige BDIV Ratten entwickelten MPNSTs, während die große Mehrheit resistent gegenüber ENU-induzierten MPNSTs war (Abb. 5 und 11).

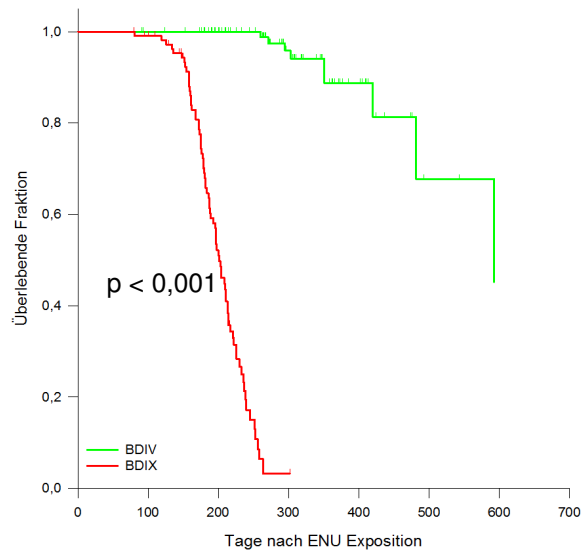


Abb. 5 Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der Stämme BDIX und BDIV nach ENU-Exposition am PND1.

Das zuvor im Hinblick auf die Überlebenszeit und Tumorzinzidenz analysierte kongene *Mss4a* Fragment vermittelte nach ENU-Exposition einen signifikanten, aber schwächer ausgeprägten Resistenzeffekt als die Assoziationsanalyse vorhergesagt hatte. Eine mögliche Begründung ist, dass in den zentromerischen 40 % des Tumoresistenzhaplotyps, die von BDIX Allelen im BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm abgedeckt sind, bei der BDIV Ratte zusätzliche risikomodulierende Genvarianten lokalisiert sein könnten (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde weiblichen und männlichen Tieren der Stämme BDIX.BDIV-*Mss4b* und -*Mss4c* ENU am Postnataltag 1 appliziert und der Einfluss dieser BDIV Inserts, die jeweils die zentromerischen 40 % umfassten, hinsichtlich der Überlebenszeiten und der Tumorzinzidenzen analysiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss des derzeit kleinsten zur Verfügung stehenden BDIV Inserts *Mss4d*, das den Kernbereich der Assoziation bei *D6Mit1* (98,8 Mb) umfasst, auf die Tumorzinzidenz und Überlebenszeit analysiert. Die jeweiligen Überlebenszeiten und Tumorzinzidenzen der kongenen bzw. subkongenen Stämme wurden sowohl untereinander als auch mit denen der Parentalstämme BDIX, BDIV und dem BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm verglichen.

Es war bereits bekannt, dass das *Mss4a* Insert einen starken tumorprotektiven Effekt nach ENU-Applikation vermittelte: Während BDIX Tiere beider Geschlechter eine mediane Überlebenszeit von 201 Tagen aufwiesen, lebten BDIX.BDIV-*Mss4a* Tiere 33 Tage länger. Die MPNST-Inzidenz am Tag 200 der BDIX Ratten betrug 49 %, während BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten eine Inzidenz von lediglich 24 % aufwiesen (Abb. 6 und 11; Tab. 13; Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011).

Die Kaplan Meier Analyse zeigte, dass sich die Überlebenskurven der Stämme BDIX.BDIV-*Mss4a* (n = 100), BDIX.BDIV-*Mss4b* (n = 86), BDIX.BDIV-*Mss4c* (n = 24) und BDIX.BDIV-*Mss4d* (n = 118) nach ENU-Exposition nicht voneinander, jedoch von der Überlebenskurve der BDIX Tiere unterschieden (Abb. 6). BDIX.BDIV-*Mss4b* Ratten lebten 36 Tage, BDIX.BDIV-*Mss4c* Ratten 26 Tage und BDIX.BDIV-*Mss4d* Ratten 27 Tage länger als BDIX Ratten. Die MPNST-Inzidenz am Tag 200 der BDIX.BDIV-*Mss4b* Ratten betrug 25 %, der BDIX.BDIV-*Mss4c* Ratten 19 % und der BDIX.BDIV-*Mss4d* Ratten 25 % (Abb. 11; Tab. 10 und 13). Die fehlende statistische Signifikanz der beobachteten Überlebenszeitverlängerung der BDIX.BDIV-*Mss4c* im Vergleich zu den BDIX Ratten war lediglich auf die geringe Fallzahl des kongenen Stamms (24 BDIX.BDIV-*Mss4c* vs. 109 BDIX Ratten) zurückzuführen.

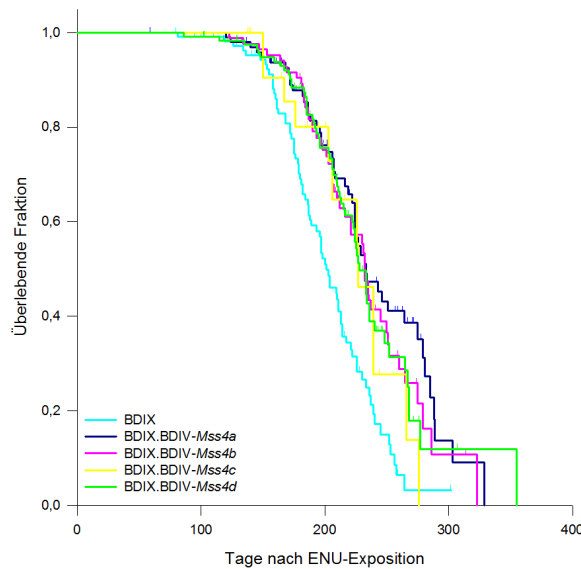


Abb. 6 Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven von Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b*, -*Mss4c* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

Tab. 10 Paarweiser Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven der Stämme BDIX, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b*, -*Mss4c* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

Beide Geschlechter: Vergleichsgruppen	p-Wert
BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,861
BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4c</i>	0,763
BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i>	0,903
BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,944
BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4c</i>	0,860
BDIX.BDIV- <i>Mss4c</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,839
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i>	0,0000425
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i>	0,000661
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4c</i>	0,354
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,000322

Ein p-Wert < 0,05 gilt als statistisch signifikant.

4.1.4 Geschlechtsspezifische Effekte der BDIV Inserts *Mss4b* und *Mss4d*

Es wurde ebenfalls eine geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der Parentalstämme BDIX und BDIV nach ENU-Exposition durchgeführt (Abb. 7 und 11). BDIX Weibchen (n = 52) wiesen eine mediane Überlebenszeit von 214 Tagen und BDIX Männchen (n = 57) von 197 Tagen auf. Die weiblichen Tiere überlebten nach ENU-Exposition demzufolge 17 Tage länger als die Männchen, allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz ($p = 0,106$). Die MPNST-Inzidenz am Tag 200 der BDIX Weibchen betrug 41 % und die der BDIX Männchen 55 % (Abb. 7 A; Tab. 13). Ein einziges BDIV Weibchen (n = 49) verstarb aufgrund eines MPNSTs, jedoch deutlich nach dem Tag 200. Acht männliche BDIV Tiere (n = 63) erkrankten an einem MPNST. Die Tumorzinzidenz am Tag 200 lag jedoch auch bei männlichen Tieren bei 0 % (Abb. 11; Tab. 13). Es konnte ein deutlicher Unterschied in den Überlebenskurven der weiblichen und männlichen BDIV Ratten nach ENU-Applikation beobachtet werden, der allerdings vom verwendeten statistischen Test (Log-Rank Test) allerdings nicht als signifikant erkannt wurde (Abb. 7 B; $p = 0,067$).

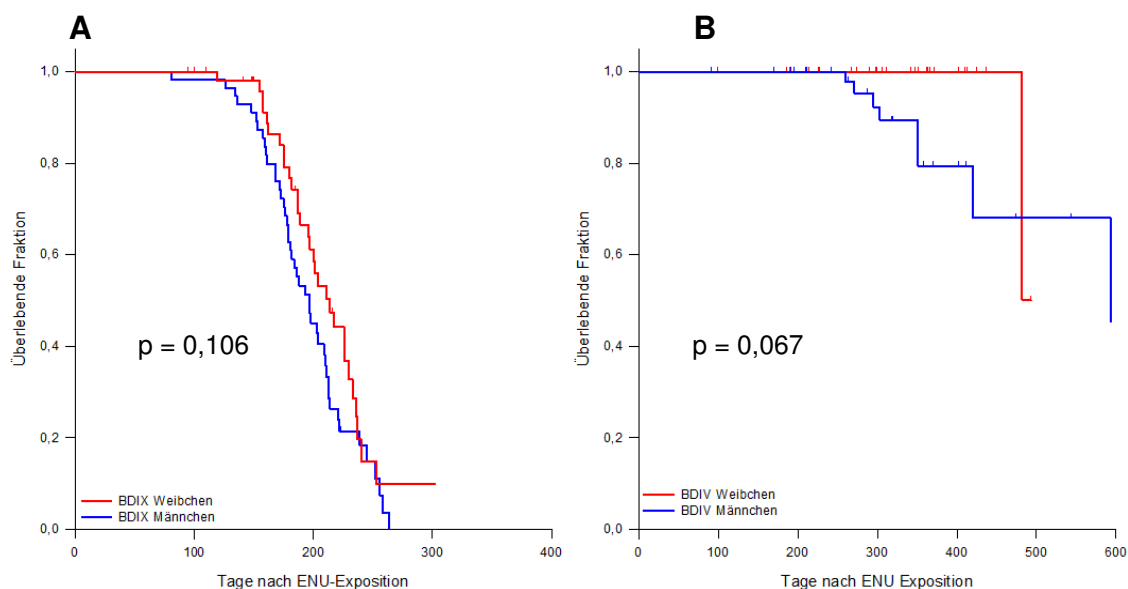


Abb. 7 Geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der Tiere des BDIX und BDIV Stammes nach ENU-Exposition am PND1.

Da bereits ein Unterschied in der Überlebenszeit weiblicher und männlicher BDIX Ratten von 17 Tagen bestand, wurde dieser als Basisdifferenz von dem Unterschied in der Überlebenszeit der kongenen bzw. subkongenen Stämme abgezogen, also z.B. 55 Tage im Fall des BDIX.BDIV-*Mss4a* Stammes – 17 Tage des BDIX Stammes = 38 Tage. Somit konnte festgestellt werden, ob das kongene bzw. subkongene BDIV Fragment selbst einen geschlechtsspezifischen Effekt vermittelt.

Im BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm konnte ein Unterschied in der medianen Überlebenszeit der weiblichen (n = 49) und männlichen Tiere (n = 51) nach ENU-Exposition von 38 Tagen beobachtet werden (p = 0,026; Abb. 8 A). Auch die Tumorzinzidenz am Tag 200 unterschied sich deutlich zwischen den Geschlechtern: Während lediglich 10 % der BDIX.BDIV-*Mss4a* Weibchen bis zum Tag 200 an MPNSTs verstarben, waren es bereits 38 % der Männchen (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011; Abb. 8 A und 11; Tab. 13).

Nach ENU-Applikation wiesen die weiblichen (n = 47) und männlichen (n = 39) Tiere des Stammes BDIX.BDIV-*Mss4b* (n = 47) keinen Unterschied in den medianen Überlebenszeiten auf (p = 0,326; Abb. 8 B und 11). Eine MPNST-Inzidenz von 26 % am Tag 200 konnte für weibliche BDIX.BDIV-*Mss4b* Ratten beobachtet werden, während männliche Tiere eine Inzidenz von 22 % aufwiesen (Tab. 13).

Aufgrund der geringen Fallzahl der BDIX.BDIV-*Mss4c* Ratten (n = 24) konnte keine zuverlässige Aussage über den geschlechtsspezifischen Effekt des *Mss4c*-Fragmentes getroffen werden.

Weibliche (n = 62) und männliche (n = 56) BDIX.BDIV-*Mss4d* Ratten (n = 62) wiesen keine Unterschiede in den medianen Überlebenszeiten nach ENU-Applikation auf (p = 0,102; Abb. 8 C und 11; Tab. 13). Die MPNST-Inzidenzen am Tag 200 von weiblichen und männlichen BDIX.BDIV-*Mss4d* Tieren war mit 26 % und 25 % ebenfalls fast identisch (Tab. 13).

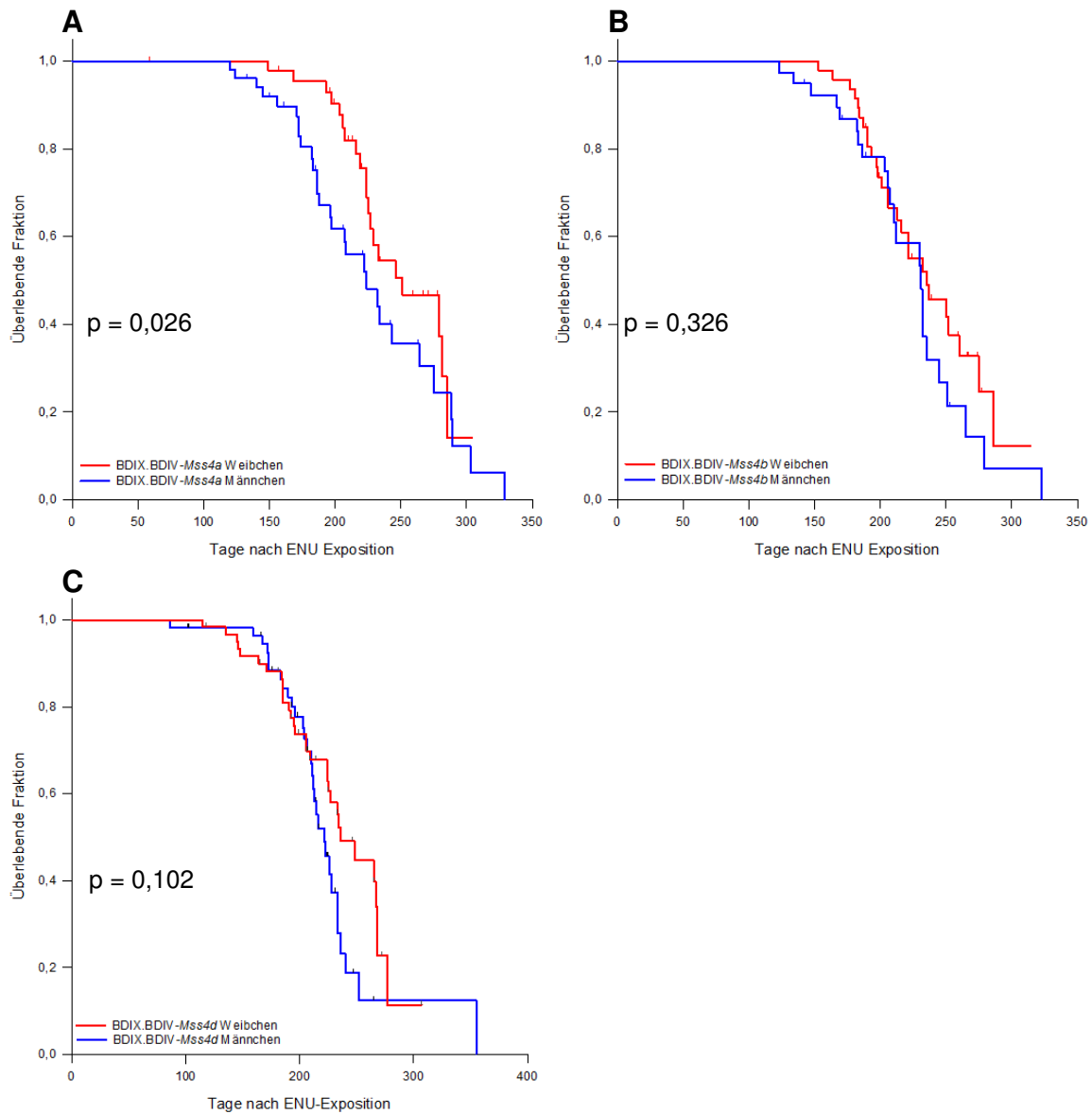


Abb. 8 Geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der Stämme BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

Es wurde ebenfalls ein Vergleich der Überlebenszeiten und Tumorinzidenzen nach ENU-Applikation zwischen den weiblichen bzw. der männlichen Ratten der kongenen und subkongenen Rattenlinien untereinander und mit den weiblichen bzw. männlichen Tieren des suszeptiblen BDIX Stamms durchgeführt.

Eine signifikant verlängerte Überlebenszeit von 65 Tagen der BDIX.BDIV-*Mss4a* Weibchen gegenüber den BDIX Weibchen wurde beobachtet ($p = 0,00630$; Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011). BDIX.BDIV-*Mss4b* Weibchen lebten 19 Tage und BDIX.BDIV-*Mss4d* Weibchen 22 Tage länger als weibliche BDIX Ratten. In beiden Fällen erreichte die verlängerte mediane Überlebenszeit der kongenen bzw. subkongenen Weibchen im Vergleich zu weiblichen BDIX Ratten keine statistische Signifikanz ($p = 0,0947$ bzw. $p = 0,0679$; Abb. 9

und 11; Tab. 11 und 13). Eine Vergrößerung der Fallzahl würde jedoch wahrscheinlich dazu führen, dass diese Unterschiede in den medianen Überlebenszeiten der kongenen bzw. subkongenen Ratten im Vergleich zu den BDIX Ratten statistisch signifikant werden.

Der Vergleich der kongenen und subkongenen Stämme zueinander zeigte, dass sich die Kaplan Meier Überlebenskurven der weiblichen Tiere der Stämme BDIX.BDIV-*Mss4a* und BDIX.BDIV-*Mss4b* nicht signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,368$). Es konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Kaplan Meier Überlebenskurven der weiblichen Tiere der Stämme BDIX.BDIV-*Mss4a* und -*Mss4d* ($p = 0,409$) bzw. der weiblichen Tiere der Stämme BDIX.BDIV-*Mss4b* und -*Mss4d* ($p = 0,957$) nachgewiesen werden (Abb. 9 und 11; Tab. 11 und 13).

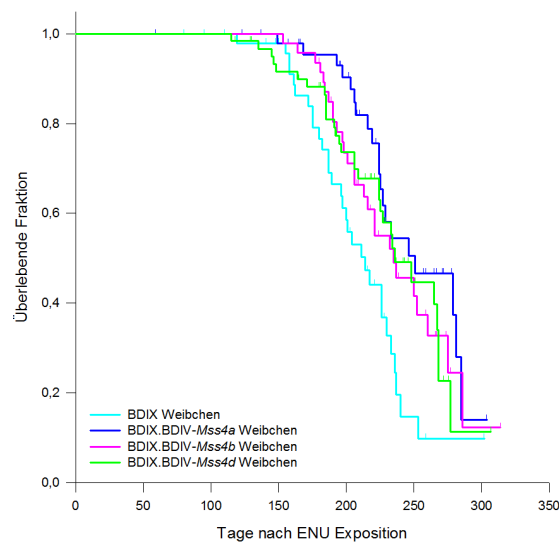


Abb. 9 Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten weiblicher Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

Tab. 11 Paarweiser Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven weiblicher Tiere der Stämme BDIX, BDIX.BDIV-*Mss4a*, *Mss4b* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

Weibchen: Vergleichsgruppen	p-Wert
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i>	0,00630
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i>	0,0947
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,0679
BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i>	0,368
BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,409
BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,957

Ein p-Wert < 0,05 gilt als statistisch signifikant.

Männliche Tiere des Stammes BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten wiesen nach ENU-Exposition im Vergleich zu männlichen BDIX Ratten eine signifikant verlängerte mediane Überlebenszeit von 27 Tagen auf ($p = 0,0106$). Ferner war sowohl das um 19 Tage verlängerte mediane Überleben der männlichen BDIX.BDIV-*Mss4b* Tiere im Vergleich zu männlichen BDIX Ratten ($p = 0,0186$) und als auch das um 25 Tage verlängerte mediane Überleben der männlichen BDIX.BDIV-*Mss4d* im Vergleich zu männlichen BDIX Ratten ($p = 0,0178$) statistisch signifikant (Abb. 10 und 11; Tab. 12 und 13).

Der Vergleich der kongenen und subkongenen Stämme zueinander zeigte, dass sich die Kaplan Meier Überlebenskurven der männlichen Tiere des BDIX.BDIV-*Mss4a* und -*Mss4b* Stammes nach ENU-Exposition nicht signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,996$). Ebenfalls konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Kaplan Meier Überlebenskurven männlicher Ratten der Stämme BDIX.BDIV-*Mss4a* und -*Mss4d* ($p = 0,986$) bzw. männlicher BDIX.BDIV-*Mss4b* und -*Mss4d* Tiere ($p = 0,971$) beobachtet werden (Abb. 10 und 11; Tab. 12 und 13).

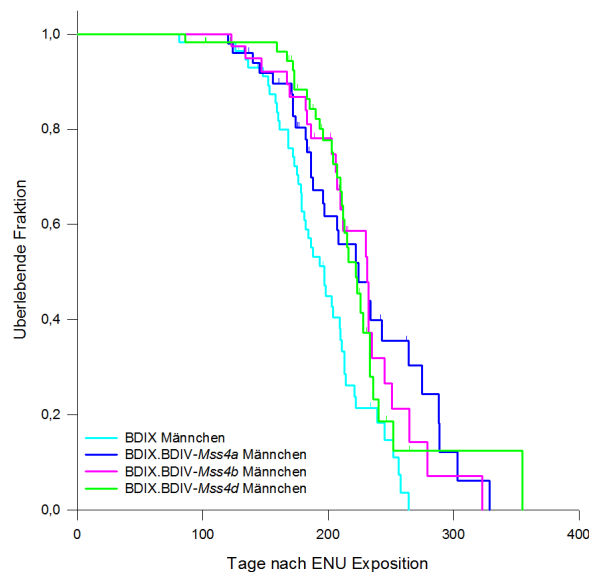


Abb. 10 Kaplan Meier Analyse der Überlebenskurven von männlichen Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

Tab. 12 Paarweiser Vergleich der Kaplan Meier Überlebenskurven männlicher Tiere der Stämme BDIX, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

Männchen: Vergleichsgruppen	p-Wert
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i>	0,0106
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i>	0,0186
BDIX vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,0178
BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i>	0,996
BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,986
BDIX.BDIV- <i>Mss4b</i> vs. BDIX.BDIV- <i>Mss4d</i>	0,971

Ein p-Wert < 0,05 gilt als statistisch signifikant.

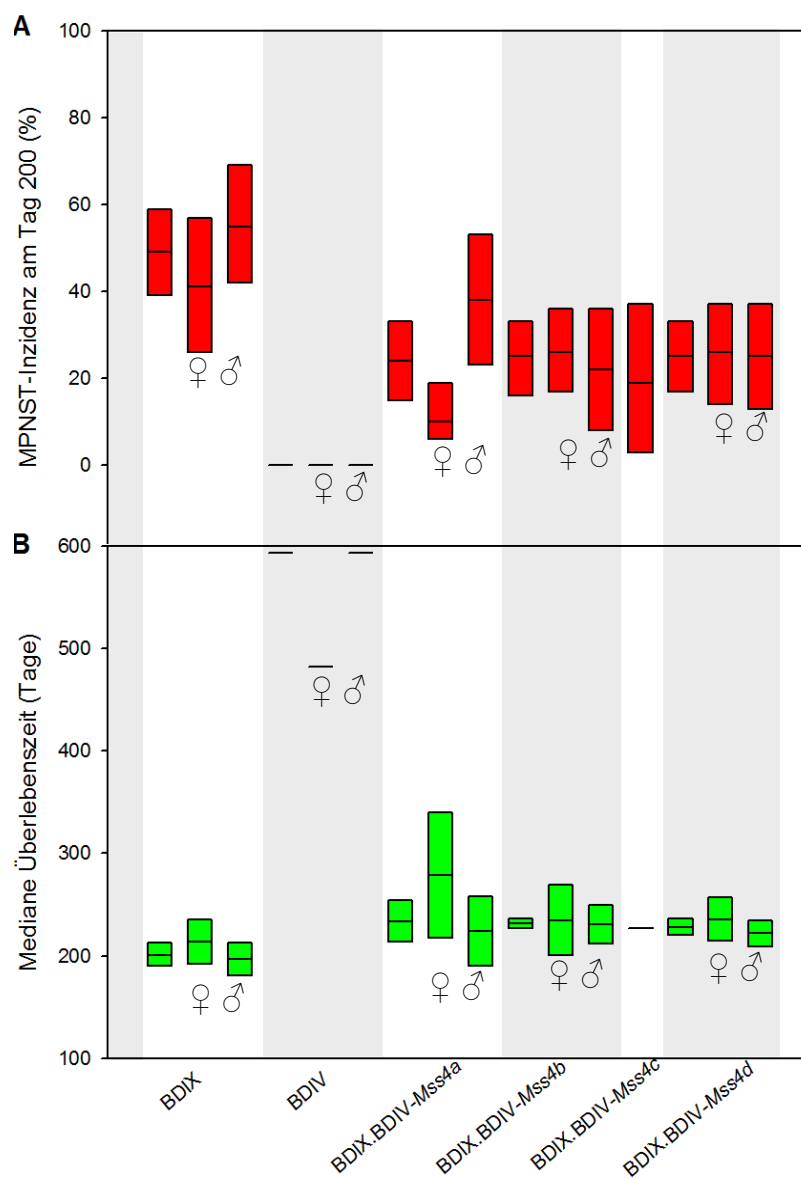


Abb. 11 A) MPNST-Inzidenzen (%) am Tag 200 und B) mediane Überlebenszeiten der Stämme BDIX, BDIV, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b*, -*Mss4c* und -*Mss4d* beider Geschlechter nach ENU-Exposition am PND1.

Tab. 13 Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten und Tumorzinzen weiblicher und männlicher Ratten der Stämme BDIX, BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b*, -*Mss4c* und -*Mss4d* nach ENU-Exposition am PND1.

	BDIX			BDIX.BDIV-<i>Mss4a</i>			BDIX.BDIV-<i>Mss4b</i>		
	Beide Geschlechter n = 109	Männchen n = 57	Weibchen n = 52	Beide Geschlechter n = 100	Männchen n = 51	Weibchen n = 49	Beide Geschlechter n = 86	Männchen n = 39	Weibchen n = 47
Medianes Überleben, Tage	201 (190-213)	197 (181-213)	214 (192-236)	234 (214-254)	224 (190-258)	279 (218-340)	232 (227-237)	231 (212-250)	235 (201-269)
MPNST-Inzidenz, Tag 200, %	49 (39 – 59)	55 (42 – 69)	41 (26 – 57)	24 (15 – 33)	38 (23 – 53)	10 (6 – 19)	25 (16 – 33)	22 (8 – 36)	26 (17 – 36)
Überlebende Fraktion, Tag 200, %	51 (41 – 61)	45 (32 – 59)	59 (43 – 74)	76 (67 – 85)	62 (47 – 77)	90 (81 – 99)	75 (67 – 84)	78 (64 – 92)	74 (64 – 83)
	BDIX.BDIV-<i>Mss4c</i>			BDIX.BDIV-<i>Mss4d</i>			BDIV		
	Beide Geschlechter n = 24			Beide Geschlechter n = 118	Männchen n = 56	Weibchen n = 62	Beide Geschlechter n = 112	Männchen n = 63	Weibchen n = 49
Medianes Überleben, Tage	227			228 (220-237)	222 (209-235)	236 (215-257)	593	593	482
MPNST-Inzidenz, Tag 200, %	19 (3 – 37)			25 (17 – 33)	25 (13 – 37)	26 (14 – 37)	0	0	0
Überlebende Fraktion, Tag 200, %	80 (63 – 98)			75 (67 – 83)	75 (63 – 87)	74 (63 – 86)	100	100	100

In Klammern angegeben sind die 95 %-Konfidenzintervalle sowohl für die mediane Überlebenszeit, die MPNST-Inzidenz (%) am Tag 200 als auch der überlebenden Fraktion am Tag 200 (%).

4.2 Identifizierung von Kandidatengenem im *Mss4* Locus

4.2.1 Positionelle Kandidatengene

In den vorherigen Kaplan Meier Analysen der Überlebenszeiten der kongenen und subkongenen Stämme konnte das *Mss4d* Fragment als das kürzeste identifiziert werden, das den Tumoresistenzeffekt des *Mss4* Locus vermittelte. Es ist Teil der Fragmente *Mss4b* und *Mss4c*. Mit *Mss4a* ergibt sich eine Überlappung von 1,1 Mb. Da sowohl das *Mss4a* als auch das *Mss4d* Fragment Tumoresistenz in einem ähnlichen Maß vermittelten, ist davon auszugehen, dass ein oder mehrere Gen(e) im minimalen Überschneidungsbereich dieser BDIV Inserts, also von 98,7 bis 99,8 Mb, lokalisiert (ist) sind.

Unter Zuhilfenahme der NCBI Datenbanken wurden 15 bekannte Gene zwischen 98,7 und 99,8 Mb identifiziert: *Esr2*, *Tex21*, *Mthfd1*, *Akap5*, *Zbtb25*, *Zbtb1*, *Hspa2*, *Ppp1r36*, *Plekhhg3*, *Sptb1*, *Churc1*, *Gpx2*, *Rab15*, *Fntb* und *Max*.

Die Positionsangaben wurden der Rattengenom-Assembly Version 3.4 (November 2004), erstellt durch die Atlas Gruppe am Baylor Human Genome Sequencing Center (HGSC), entnommen (Abb. 12; Tab. 14).

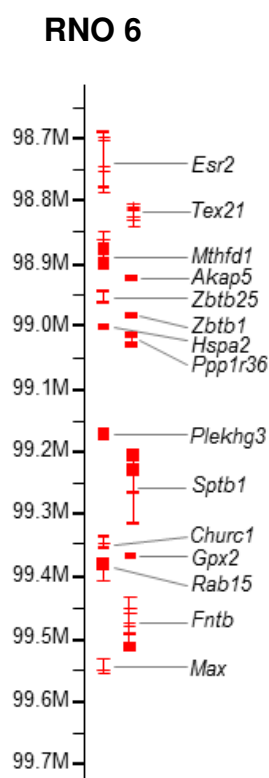


Abb. 12 Physikalische Lage und Struktur der Kandidatengene im Überlappungsbereich der BDIV Fragmente *Mss4a* und *Mss4d* auf Chromosom 6.

Während der Arbeiten an dieser Dissertation wurde eine neue Assembly des Rattengenoms, RGSC 5.0 (März 2012), öffentlich zugänglich gemacht. Da diese allerdings noch als vorläufig zu betrachten ist und für alle von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Arbeiten die RGSC v3.4 Assembly verwendet wurde, fand auch für die vorliegende Arbeit letztere Assembly Verwendung.

In Tab. 14 sind die Positionen der im *Mss4* Locus gelegenen bekannten Gene in beiden Assemblies gegenüber gestellt. Abgesehen von 5 Pseudogenen sind die annotierten Gene in beiden Assemblies wieder zu finden. Der feinkartierte *Mss4* Locus liegt in der RGSC 5.0 Assembly zwischen 108,6 und 109,4 Mb, während die Grenzen in RGSC v3.4 bei 98,7 Mb und 99,8 Mb liegen.

Tab. 14 Position der *Mss4* Kandidatengene auf Chromosom 6 der Ratte den Assemblies RGSC v3.4 und RGSC 5.0 zufolge.

Gensymbol	RGSC v3.4 Start (Mb)	Nov 04 Stop (Mb)	RGSC 5.0 Start (Mb)	März 12 Stop (Mb)
<i>Esr2</i>	98691165	98775299	108576433	108625992
<i>Tex21</i>	98798019	98840865	108648678	108685306
<i>Mthfd1</i>	98849446	98916936	108694405	108761891
<i>Akap5</i>	98923120	98928505	108768060	108773460
<i>Zbtb25</i>	98947494	98956229	108791850	108800583
<i>Zbtb1</i>	98981038	98984303	108825981	108936519
<i>Hspa2</i>	99000305	99003041	108843800	108846300
<i>Ppp1r36</i>	99010770	99028528	108854074	108874066
<i>RGD1562381</i> *	99105239	99105720		
<i>Plekhg3</i>	99131740	99175135	109011147	109053763
<i>Sptb1</i>	99194202	99315691	109073103	109181206
<i>LOC679700</i> *	99315372	99315776		
<i>Churc1</i>	99349223	99364032	109213899	109228034
<i>Gpx2</i>	99372423	99376230	109236420	109239718
<i>Rab15</i>	99378937	99403340	109242425	109266332
<i>Fntb</i>	99427967	99511373	109278424	109361572
<i>Max</i>	99529905	99553851	109380103	109403573
<i>LOC366670</i> *	99606825	99607402		
<i>LOC679849</i> *	99633927	99739363		
<i>LOC679866</i> *	99740358	99817698		

* Pseudogene

4.2.2 Sequenzanalyse der Kandidatengene im *Mss4* Locus

Das oder die Gene, die ursächlich an dem unterschiedlichen MPNST-Risiko der BDIX und BDIV Ratten beteiligt sind, sollten entweder in proteinkodierenden oder regulatorischen Bereichen Polymorphismen aufweisen, um diese unterschiedliche Sensitivität hervorrufen zu können. Daher wurden ca. 500 bp der mutmaßlichen Promotorregion inklusive des Core-Promotors, die 5´ und 3´ UTRs und die proteinkodierenden Bereiche der Kandidatengene sequenziert. Zu diesem Zweck wurde DNA bzw. RNA sowohl aus Geweben von BDIX als auch BDIV Ratten isoliert und die jeweiligen Sequenzen miteinander verglichen. Über das Vorkommen möglicher Spleißvarianten der Kandidatengene in den Trigeminierven können keine Aussagen getroffen werden, da die RNAs jeweils aus Geweben isoliert wurden, welche der Literatur zufolge die relativ höchste mRNA Expression des entsprechenden Kandidatengens aufwiesen.

Sptb1, *Zbtb1*, *Zbtb25*, *Ppp1r36* und *Tex21* wiesen zwischen BDIX und BDIV Ratten keinerlei Polymorphismen in den untersuchten regulatorischen Bereichen auf.

Mthfd1, *Fntb*, *Churc1*, *Rab15* und *Gpx2* trugen jeweils mindestens einen SNP im 3´ UTR.

Die Gene *Churc1*, *Max*, *Rab15*, *Akap5*, *Gpx2*, *Hspa2* und *Plekhg3* wiesen jeweils mindestens einen Polymorphismus im mutmaßlichen Promotor bzw. Core-Promotor auf.

Das Gen *Esr2* wurde bereits zuvor sequenziert und wies u.a. einen Polymorphismus ebenfalls im mutmaßlichen Core-Promotor auf (Winzen 2007).

Die Details der Sequenzierungen der mutmaßlich regulatorischen Bereiche der Kandidatengene im *Mss4* Locus sind in Tabelle 15 dargestellt.

In Anhang 3 befinden sich größere, die Polymorphismen umgebende Sequenzabschnitte.

Tab. 15 Identifizierte SNPs in mutmaßlich regulatorischen Bereichen der Kandidatengene im *Mss4* Locus.

Gensymbol	SNP Position (bp), Chr.6	Regulatorischer Bereich	BDIX Allel	BDIV Allel
<i>Tex21</i>	-			
<i>Mthfd1</i>	98,916,955	3' UTR	G	A
<i>Akap5</i>	98,923,071	Promotorregion	G	C
<i>Zbtb25</i>	-			
<i>Zbtb1</i>	-			
<i>Hspa2</i>	99,000,228	Promotorregion	A	G
<i>Ppp1r36</i>	-			
<i>Plekhg3</i>	99,132,363	Core-Promotor	C	T
<i>Sptb1</i>	-			
<i>Churc1</i>	99,363,987	3' UTR	G	A
	99,364,008	3' UTR	G	A
	99,349,163	Promotorregion	T	C
<i>Gpx2</i>	99,376,282	Core-Promotor	T	C
	99,376,244	Core-Promotor	G	A
	99,372,574	3' UTR	A	G
<i>Rab15</i>	99,379,214	3' UTR	A	G
	99,379,894	3' UTR	C	T
	99,380,291	3' UTR	A	G
	99,380,588	3' UTR	A	G
	99,380,623	3' UTR	G	A
	99,380,971	3' UTR	G	A
	99,403,882	Promotorregion	T	A
<i>Fntb</i>	99,510,582	3' UTR	A	G
<i>Max</i>	99,554,395	Promotorregion	C	T

Churc1, *Zbtb25*, *Rab15*, *Hspa2*, *Ppp1r36*, *Gpx2* und *Zbtb1* wiesen zwischen BDIX und BDIV Ratten keine SNPs in proteinkodierenden Bereichen auf.

In den Genen *Mthfd1*, *Max*, *Akap5*, *Sptb1*, *Plekhg3* und *Tex21* wurden Basenaustausche in der dritten, sogenannten „wobble“ Position des Codons gefunden (Tab. 16). SNPs an dieser Position sind synonym und nehmen keinen Einfluss auf die Abfolge der Aminosäuresequenz, da mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan immer zwei bis vier unterschiedliche Codons jeweils dieselbe Aminosäure kodieren.

Im Gen *Plekhg3* wurden 4 nicht-synonyme SNPs im proteinkodierenden Bereich identifiziert. Der SNP In Exon 1 (99,157,433 Mb) betraf ein Codon, dass in BDIV Ratten die unpolare Aminosäure Glycin und im BDIX Stamm die polare Aminosäure Serin kodierte. Ein Codon in Exon 11 (SNP an Position 99,163,099 Mb) kodierte im BDIV Stamm die polare Aminosäure Serin und im BDIX Stamm die unpolare Aminosäure Leucin. Das BDIX Allel an Position

99,172,311 Mb in Exon 14 führte zur Kodierung der polaren Aminosäure Serin, während im BDIV Stamm die ebenfalls polare Aminosäure Cystein kodiert wurde. Der Polymorphismus in Exon 16 (99,173,135 Mb) betraf ein Codon, das die polare Aminosäure Asparagin in BDIX Ratten und die saure Asparaginsäure in BDIV Ratten kodierte.

Im Gen *Sptb1* wurden 3 SNPs identifiziert, die Einfluss auf die Aminosäuresequenz zwischen BDIX und BDIV Ratten nahmen. Der SNP in Exon 13 an Position 99,217,599 Mb betraf ein Codon, das im BDIV Stamm die unpolare Aminosäure Alanin und im BDIX Stamm die polare Aminosäure Threonin kodierte. Der SNP in Exon 14 (99,216,442 Mb) lag in einem Codon, das im BDIV Stamm die polare Aminosäure Serin und im BDIX Stamm die unpolare Aminosäure Glycin kodierte. Der SNP an Position 99,209,710 Mb in Exon 16 betraf ein Codon, das im BDIX Stamm die unpolare Aminosäure Methionin und im BDIV Stamm die unpolare Aminosäure Leucin kodierte.

Im proteinkodierenden Bereich des *Fntb* Gens wurde lediglich 1 SNP identifiziert, der Einfluss auf die Aminosäuresequenz zwischen den BDIX und BDIV Stämmen nahm. In Exon 12 fand an Position 99,511,356 Mb eine Transversion, also der Austausch einer Purin- gegen eine Pyrimidinbase, statt. Im BDIX Stamm wurde als Folge die saure Asparaginsäure und im BDIV Stamm die basische Aminosäure Histidin kodiert.

Die Details der Sequenzierungen der proteinkodierenden Bereiche der Kandidatengene im *Mss4* Locus sind in Tabelle 16 dargestellt.

In Anhang 3 befinden sich größere, die Polymorphismen umgebende Sequenzabschnitte.

Tab. 16 Identifizierte SNPs in proteinkodierenden Bereichen der Kandidatengene im *Mss4* Locus.

Gen Symbol	SNP Position (bp), Chr. 6	Exon	BDIX Allel	BDIV Allel	Einfluss auf die AS-Kodierung?	Kodierte AS* in BDIX und BDIV Ratten
<i>Tex21</i>	98,798,137	7	G	A	-	
<i>Mthfd1</i>	98,883,958	10	A	G	-	
	98,883,961	10	A	C	-	
	98,884,200	11	G	T	-	
	98,884,224	11	T	C	-	
	98,910,742	26	C	T	-	
<i>Akap5</i>	98,927,230	1	A	T	-	
<i>Zbtb25</i>	-					
<i>Zbtb1</i>	-					
<i>Hspa2</i>	-					
<i>Ppp1r36</i>	-					
<i>Plekhg3</i>	99,157,433	1	A	G	Ja	BDIX Serin, BDIV Glycin
	99,157,489	1	G	T	-	
	99,163,099	11	T	C	Ja	BDIX Leucin, BDIV Serin
	99,172,311	14	C	G	Ja	BDIX Serin, BDIV Cystein
	99,173,135	16	A	G	Ja	BDIX Asparagin, BDIV Asparaginsäure
<i>Sptb1</i>	99,258,622	1	T	C	-	
	99,227,419	4	G	A	-	
	99,222,176	9	G	A	-	
	99,223,104	8	T	G	-	
	99,217,599	13	A	G	Ja	BDIX Threonin, BDIV Alanin
	99,216,442	14	G	A	Ja	BDIX Glycin, BDIV Serin
	99,204,964	21	C	T	-	
	99,200,179	24	G	A	-	
	99,209,710	16	A	C	Ja	BDIX Methionin, BDIV Leucin
<i>Churc1</i>	-					
<i>Gpx2</i>	-					
<i>Rab15</i>	-					
<i>Fntb</i>	99,511,356	12	A	C	Ja	BDIX Asparaginsäure, BDIV Histidin
<i>Max</i>	99,529,923	5	A	C	-	

Zur Amplifizierung von Kandidatengen-Sequenzen wurde RNA aus Gewebe isoliert, das der Literatur zufolge die stärkste mRNA Expression aufwies.

* AS = Aminosäure

4.2.3 Relative mRNA Expression in den Trigeminnerven der Stämme BDIX, BDIV und BDIX.BDIV-*Mss4a* am Postnataltag 85

Eine stammspezifische mRNA Expression könnte auf Polymorphismen in regulatorischen Bereichen, wie z.B. im Promotor, zurückzuführen sein. Darüber hinaus könnten mRNA Expressionsunterschiede durch bisher unbekannte SNPs in z.B. Enhancer-Elementen, die i.d.R. mehrere kb entfernt vom Gen liegen und in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert wurden, verursacht werden. Zunächst wurde die mRNA Expression der Kandidatengene in den Trigeminnerven, also dem Ursprungsgewebe der MPNSTs, von 85 Tage alten BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter analysiert.

Die bereits im Rahmen einer früheren Studie mit Hilfe von Microarrays (Illumina Chip RatRef-12-v1) erzeugten mRNA Expressionsdaten der Gene in den Trigeminnerven weiblicher und männlicher Ratten der Stämme BDIX, BDIV und BDIX.BDIV-*Mss4a* wurden erneut im Hinblick auf die mRNA Expression der *Mss4* Kandidatengene analysiert (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011). Die relative mRNA Expression der Kandidatengene, die nicht auf dem verwendeten Microarray repräsentiert waren (*Plekhg3*, *Ppp1r36*, *Sptb1*, *Tex21*), wurde mittels Realtime PCR in den Trigeminnerven von 85 Tage alten BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter untersucht.

Weder in den Trigeminnerven von BDIX noch von BDIV Ratten konnte am Postnataltag 85 eine Expression der Gene *Esr2*, *Tex21*, *Akap5*, *Zbtb25*, *Sptb1* und *Max* nachgewiesen werden. *Ppp1r36* wurde relativ niedrig exprimiert und wies keinen geschlechts- oder stammspezifischen Expressionsunterschied auf. *Mthfd1*, *Churc1* und *Fntb* wiesen einen kaum messbaren stammspezifischen und keinen geschlechtsspezifischen Expressionsunterschied zwischen BDIX und BDIV Ratten auf. Das *Rab15* Gen wurde nur in den BDIV Ratten exprimiert. Das Gen *Plekhg3* wurde in den Trigeminnerven der BDIX Ratten ca. 2,5-fach höher exprimiert als in denen der BDIV Ratten. *Zbtb1*, *Hspa2* wiesen jeweils eine zweifach höhere mRNA Expression in den Trigeminnerven der tumorsuszeptiblen BDIX Ratten im Vergleich zu den resistenten BDIV Ratten auf. *Gpx2* wies den von allen untersuchten Genen stärksten stammspezifischen, jedoch keinen geschlechtsspezifischen mRNA Expressionsunterschied auf. In den Trigeminnerven von BDIV Ratten wurde *Gpx2* ca. 9-fach höher exprimiert als in BDIX Tieren (Tab. 17).

Ferner wurde die relative mRNA Expression der Kandidatengene in den Trigeminnerven der kongenen BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten, unter der Annahme, dass die bzw. das dem Effekt des *Mss4* Locus zugrunde liegende(n) Gen(e) eine ähnliche Genexpression im tumorresistenten BDIV und dem relativ tumorresistenten kongenen Stamm aufweist/en, analysiert. Da mit Hilfe der Realtime PCR Analyse keine Unterschiede in der mRNA Expression der Gene *Plekhg3*, *Ppp1r36*, *Sptb1*, *Tex21* in den Trigeminnerven von BDIX

und BDIV Ratten nachgewiesen werden konnten, wurde auf die Analyse ihrer Expression im kongenen Stamm BDIX.BDIV-*Mss4a* verzichtet. *Akap5*, *Zbtb25*, *Rab15* und *Max* wurden in den Trigemiusnerven von 85 Tage alten kongenen Ratten nicht exprimiert. *Mthfd1*, *Hspa2*, *Fntb* und *Churc1* wurden in BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten in einem ähnlichen Maß wie in den suszeptiblen BDIX Ratten exprimiert. *Esr2* wies eine gegenüber den Ausgangsstämmen höhere mRNA Expression in den Trigemiusnerven von BDIX.BDIV-*Mss4a* Tieren auf, während das Gen *Zbtb1* in den kongenen Ratten eine intermediäre Expression aufwies. Das *Gpx2* Gen wies in den Trigemiusnerven der BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten eine ähnliche Expressionsstärke wie in den tumorresistenten BDIV Ratten auf, d.h. es wurde ca. 4-fach höher im Vergleich zum BDIX Stamm exprimiert (Tab. 17).

Weder in den Stämmen BDIX, BDIV noch BDIX.BDIV-*Mss4a* wurde eine geschlechtsspezifische Expression der untersuchten Genen festgestellt.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der Analysen der mRNA Expression der Kandidatengene in den Trigemiusnerven von BDIX, BDIV und BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten zusammengefasst. In Anhang 2 sind die detaillierten Ergebnisse der Microarray und Realtime PCR Analysen der einzelnen Kandidatengene in den Trigemiusnerven 85 Tage alter BDIX, BDIV und BDIX.BDIV-*Mss4a* Tiere beider Geschlechter dargestellt.

Tab. 17 Relative mRNA Expression der Kandidatengene in Trigemiusnerven von BDIV, BDIX und BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten am Tag 85.

Gensymbol	Relative mRNA Expression in den Trigemiusnerven	
	der BDIX und BDIV Ratten	der BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> Ratten
<i>Esr2</i>	nicht exprimiert	Höher als in BDIX und BDIV
<i>Tex21</i>	nicht exprimiert	nicht untersucht
<i>Mthfd1</i>	BDIX = BDIV	BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> = BDIX
<i>Akap5</i>	nicht exprimiert	nicht exprimiert
<i>Zbtb25</i>	nicht exprimiert	nicht exprimiert
<i>Zbtb1</i>	BDIX > BDIV (2:1)	intermediär
<i>Hspa2</i>	BDIX > BDIV (2:1)	BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> = BDIX
<i>Ppp1r36</i>	BDIX = BDIV	nicht untersucht
<i>Plekhg3</i>	BDIX > BDIV (2,5:1)	nicht untersucht
<i>Sptb1</i>	nicht exprimiert	nicht untersucht
<i>Churc1</i>	BDIX = BDIV	BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> = BDIX
<i>Gpx2</i>	BDIV > BDIX (9:1)	BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> > BDIX (4:1)
<i>Rab15</i>	nur in BDIV	nicht exprimiert
<i>Fntb</i>	BDIX = BDIV	BDIX.BDIV- <i>Mss4a</i> > BDIX (1,7:1)
<i>Max</i>	nicht exprimiert	nicht exprimiert

Gene mit einer Expression unterhalb des arbiträren Wertes 100 galten als nicht exprimiert. Genexpressionsunterschiede ab einem Faktor von 1,5 wurden aufgeführt.

4.2.4 Rangfolge der Kandidatengene auf der Basis von Sequenz-, Expressions- und Funktionsdaten

Um die vielversprechendsten Kandidatengene im Hinblick auf den geschlechtsspezifischen Tumorresistenzeffekt des *Mss4* Locus zu identifizieren, wurden die zuvor erzeugten Sequenz- und Expressionsdaten zusammengetragen und mit der Annotation der einzelnen Genprodukte zusammengeführt.

Als zu erfüllende Kriterien für vielversprechende Kandidatengene sollten diese Polymorphismen zwischen BDIX und BDIV Ratten aufweisen. SNPs in der mutmaßlichen Promotorregion könnten Unterschiede in der mRNA Expressionsstärke zwischen BDIX und BDIV Ratten und/oder den Geschlechtern verursachen, indem sie z.B. die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. SNPs in den proteinkodierenden Bereichen der Kandidatengene könnten Einfluss auf die Struktur des korrespondierenden Proteins und damit eventuell auf dessen Funktion nehmen. Als ein weiteres zu erfüllendes Kriterium galt, dass die Funktion des Kandidatengens in die bekannten Effektormechanismen der Tumorresistenz der BDIV Ratten passen oder bereits in Zusammenhang mit der Entstehung von Tumorerkrankungen gebracht worden sein sollte (Tab. 18).

Als interessanteste Kandidaten erschienen nach abschließender Bewertung der vorliegenden Daten die Gene *Esr2* und *Gpx2* (Tab. 19).

In der Literatur finden sich einige Hinweise, dass *Gpx2*, welches für die Glutathionperoxidase 2 kodiert, an der Resistenz gegenüber der Entstehung von Tumoren des Gastrointestinaltrakts, der Brust und der Lunge beteiligt sein könnte, indem es durch Beseitigung potentiell DNA-schädigender reaktiver Sauerstoffspezies die Tumorentstehung verhindert (Tab. 18).

Obwohl keine Expression von *Esr2* in Trigeminierven nachgewiesen werden konnte, wurde dieses trotzdem insbesondere im Hinblick auf den geschlechtsspezifischen Effekt des *Mss4* Locus als vielversprechendstes Kandidatengen erachtet. Der vom *Esr2* Gen kodierte Östrogenrezeptor Beta (Er β) ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Bindung von Östrogen die Expression einer Vielzahl von Genen geschlechtsspezifisch reguliert und ebenfalls in Zusammenhang mit der Entstehung diverser Tumorentitäten gebracht wurde (Tab. 18).

Weiterführende Analysen der Gene *Esr2* und *Gpx2* auf Proteinebene sollten Aufschluss über ihre Beteiligung am geschlechtsspezifischen Tumorresistenzeffekt des *Mss4* Locus geben.

Tab. 18 Annotationen der *Mss4* Kandidatengene.

Gensymbol	Genname	Molekulare Funktion
<i>Esr2</i>	<i>estrogen receptor 2 beta</i>	Nukleärer Hormonrezeptor
<i>Tex21</i>	<i>similar to testis expressed gene 21</i>	unbekannt
<i>Mthfd1</i>	<i>methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, - cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthase</i>	Hydrolase, Oxidoreduktase, Ligase
<i>Akap5</i>	<i>A kinase (PKA) anchor protein 5</i>	Bindung von Proteinkinasen und Calcineurin
<i>Zbtb25</i>	<i>zinc finger and BTB domain containing 25</i>	Transkriptionsfaktor in T-Lymphozyten (NF-AT)
<i>Zbtb1</i>	<i>zinc finger and BTB domain containing 1</i>	Transkriptionsfaktor
<i>Hspa2</i>	<i>heat shock 70kDa protein 2</i>	Chaperon
<i>Ppp1r36</i>	<i>protein phosphatase 1, regulatory subunit 36</i>	Phosphatase Bindung
<i>Plekhg3</i>	<i>similar to common-site lymphoma leukemia guanine nucleotide exchange factor like</i>	Phospholipid Bindung, Rho Guanyl-Nukleotid Austausch
<i>Sptb1</i>	<i>erythroid spectrin beta 1</i>	Ankyrin - und Aktin-Bindung
<i>Churc1</i>	<i>churchill domain containing 1 (predicted)</i>	Transkriptionsfaktor
<i>Gpx2</i>	<i>glutathione peroxidase 2</i>	Glutathionperoxidase
<i>Rab15</i>	<i>RAB15, member RAS oncogene family</i>	GTP -, Nukleotid -, Protein-Bindung
<i>Fntb</i>	<i>farnesyltransferase, CAAX box, beta</i>	Farnesyltransferase
<i>Max</i>	<i>Max protein</i>	Transkriptionsfaktor

Gensymbol	Biologischer Prozess	Krankheitsassoziation
<i>Esr2</i>	Entwicklung von Reproduktionsorganen und Gehirn, Apoptose, Proliferation, Differenzierung	Brust-, Eierstock-, Prostatakrebs, Osteosarkom, Hypophysentumor, Endometriose, Osteoporose, u.a.
<i>Tex21</i>	Unbekannt	-
<i>Mthfd1</i>	Aminosäuresynthese, Folsäuresynthese	Neuralrohrdefekte, Spina bifida, Lymphoblastische Leukämie
<i>Akap5</i>	Regulierung postsynaptischer Events, Hemmung von NF-AT	-
<i>Zbtb25</i>	Inhibierung der Transkription von Zytokinen	-
<i>Zbtb1</i>	B Zell Differenzierung, T Zell Differenzierung	-
<i>Hspa2</i>	Proteinfaltung, Schutz vor Hitzestress und Proteinaggregation	-
<i>Ppp1r36</i>	Inhibierung der Aktivität von Protein-Phosphatase-1-Komplexen	-
<i>Plekhg3</i>	Rho Signaltransduktion	-
<i>Sptb1</i>	Hämatopoese, Plasmamembran-Organisation	Hereditäre Spherocytose, Duchenne Muskeldystrophie, Kongenitale hämolytische Anämie
<i>Churc1</i>	Mesoderm und Neural-Entwicklung, Zellmigration	-
<i>Gpx2</i>	Reduzierung von oxidativem Stress	Barrett Ösophagus, Brust-, Darm-, Lungenkrebs
<i>Rab15</i>	Endocytose	
<i>Fntb</i>	Wachstum, Zellzyklus, Proteinfaltung	
<i>Max</i>	Myc Signalweg, Proliferation, Differenzierung, Apoptose	Leukämie, Phäochromozytom

- = keine Assoziation mit einer Krebserkrankung bekannt. Unbekannt = Funktion des Genprodukts unbekannt.

Tab. 19 Ranking der Kandidatengene anhand von SNPs, einer potentiell stammspezifischen mRNA Expression und funktioneller Daten.

Gen-symbol	SNP	SNP im Promotor	SNP in Exon(s)	Stammspezifische Expression, Trigeminierv	Krebs-assoziati on	Ranking
<i>Esr2</i>	X	X	X		X	4
<i>Tex21</i>	X		X			2
<i>Mthfd1</i>	X		X		X	3
<i>Akap5</i>	X	X	X			3
<i>Zbtb25</i>						0
<i>Zbtb1</i>				X		1
<i>Hspa2</i>	X	X		X		3
<i>Ppp1r36</i>						0
<i>Plekhg3</i>	X	X	X	X		4
<i>Sptb1</i>	X		X			2
<i>Churc1</i>	X	X			X	3
<i>Gpx2</i>	X	X		X	X	4
<i>Rab15</i>	X					1
<i>Fntb</i>	X		X			2
<i>Max</i>	X	X	X		X	4

4.3 Glutathionperoxidase 2

4.3.1 Transkriptionsfaktorbindestellen in der Promotorregion von *Gpx2*

Die identifizierten Polymorphismen im mutmaßlichen Promotor des *Gpx2* Gens zwischen BDIX und BDIV Ratten könnten die Bindung von Transkriptionsfaktoren und damit die mRNA Expression stammspezifisch beeinflussen. Unter Zuhilfenahme der Datenbank TFSearch wurden unter anderem Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Nrf2, Gata-x, C/ebp-alpha und -beta identifiziert und ihre Bindungskoeffizienten in Abhängigkeit vom BDIV bzw. BDIX Allel verglichen.

Der A/G Polymorphismus 15 bp vor Transkriptionsstart des *Gpx2* Gens beeinflusste die Bindungskoeffizienten der Transkriptionsfaktoren Nrf2, Gata-x, C/Ebp-alpha und -beta. Diese Transkriptionsfaktoren wiesen bei Vorliegen des A-Allels (BDIV) eine höhere Bindekapazität auf als beim Vorliegen des G-Allels (BDIX; Abb. 13; Tab. 20).

Der SNP an Position 99,376,282 bp, also 53 bp vor Transkriptionsstart, lag ebenfalls in einer C/ebp-Bindestelle. Bei Vorliegen des T-Allels (BDIX) an dieser Position konnte ein höherer Bindekoeffizient für den Transkriptionsfaktor C/ebp-alpha festgestellt werden. Das Vorliegen des C-Allels (BDIV) führte jedoch zu einem höheren Bindekoeffizient für C/ebp-beta (Tab. 20).

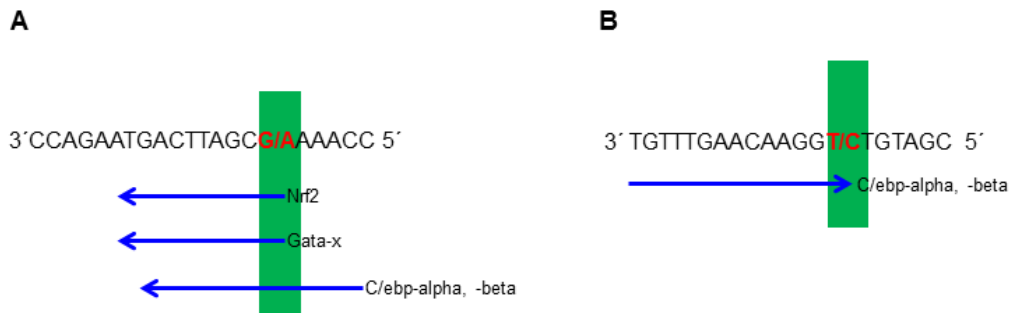


Abb. 13 Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *Gpx2* Promotor, die den SNP A) 15 bp und B) 53 bp vor Transkriptionsstart umfassten.

Der SNP ist grün hinterlegt und das BDIX bzw. BDIV Allel rot dargestellt. Die blauen Pfeile geben einerseits Auskunft über die Bindestelle des jeweiligen Transkriptionsfaktors und andererseits darüber, in welcher Richtung die Faktoren ihre Transkriptionsaktivität ausüben.

Tab. 20 Abhängigkeit der Bindekoeffizienten einiger Transkriptionsfaktoren im mutmaßlichen Core-Promotor des *Gpx2* Gens von BDIV bzw. BDIX Allelen in den Bindemotiven.

		Bindekoeffizient des Transkriptionsfaktors			
Position des SNPs	Allel	Nrf2	Gata-x	C/ebp-alpha	C/ebp-beta
99,376,244 Mb, RNO6	A (BDIV)	88,9	79,9	79,9	76,7
	G (BDIX)	85,2	75,8	74,1	72,3
99,376,282 Mb, RNO6	C (BDIV)			76,8	76,0
	T (BDIX)			80,3	74,4

4.3.2 Gpx2 Expression auf Proteinebene

Eine Analyse der Proteinexpression von Gpx2 wurde in ausgewählten Geweben und Zelltypen weiblicher und männlicher Tiere der Rattenstämme BDIX und BDIV durchgeführt. Als vielversprechende Gewebe bzw. Zelltypen galten zunächst die Trigeminierven, aus denen die MPNSTs hervorgehen, die Organe des lymphatischen Systems und die Zellen des Immunsystems, welche nach ENU-Applikation in die Trigeminierven beider Rattenstämme einwandern.

4.3.2.1 Gpx2 Expression im Kolon

Im Vorfeld wurde die Expression von Gpx2 im Kolon untersucht, das aufgrund der bereits in der Literatur beschriebenen starken Expression als Positivkontrolle für die nachfolgenden

Untersuchungen dienen sollte. Zunächst wurde die Spezifität zweier Gpx2-Antikörper verglichen: Ein kommerziell erhältlicher, ab64322 und ein von Böcher et al. hergestellter Antikörper, der im Weiteren als „GBF“ bezeichnet wurde und freundlicherweise von Frau Prof. Brigelius-Flohé zur Verfügung gestellt und dessen Spezifität bereits gezeigt wurde. In der Western Blot Analyse konnte unter Verwendung beider Antikörper eine spezifische Gpx2 Bande bei 21 kDa detektiert werden, jedoch erzeugte der GBF-Antikörper ein stärkeres Signal (Abb. 14).

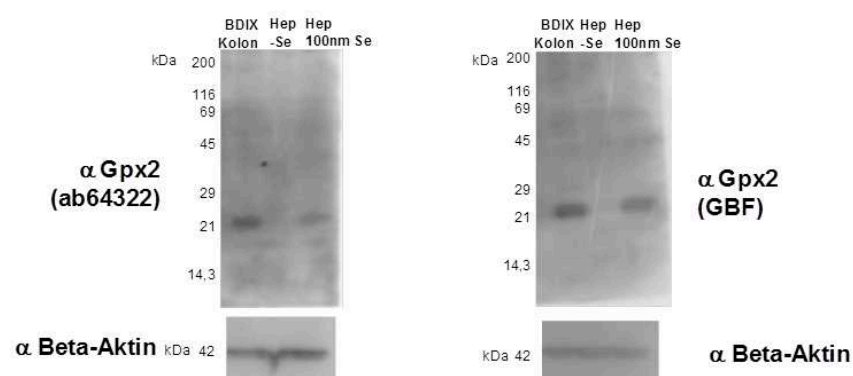


Abb. 14 Vergleich der Spezifität der Gpx2-Antikörper ab64322 und GBF mittels Western Blot Analyse im Kolon und in HepG2-Zellen.

Die Gpx2 Expression ist abhängig von der Verfügbarkeit von Selen (Se). Ohne Se kultivierte HepG2-Zellen exprimierten folglich kein Gpx2 und dienten als Negativ- und Se-behandelte Zellen als Positivkontrolle. Beta-Aktin (42 kDa) wurde als Ladekontrolle verwendet. Es wurden jeweils 50 µg des Lysats aufgetragen.

In immunhistochemischen Untersuchungen zeigte ab64322 eine gleichmäßige zytoplasmatische Anfärbung des Epithels. Unter Verwendung des GBF-Antikörpers konnte eine stärkere Gpx2 Expression in dem Kryptengrund als in den oberen Anteilen detektiert werden (Abb. 15).

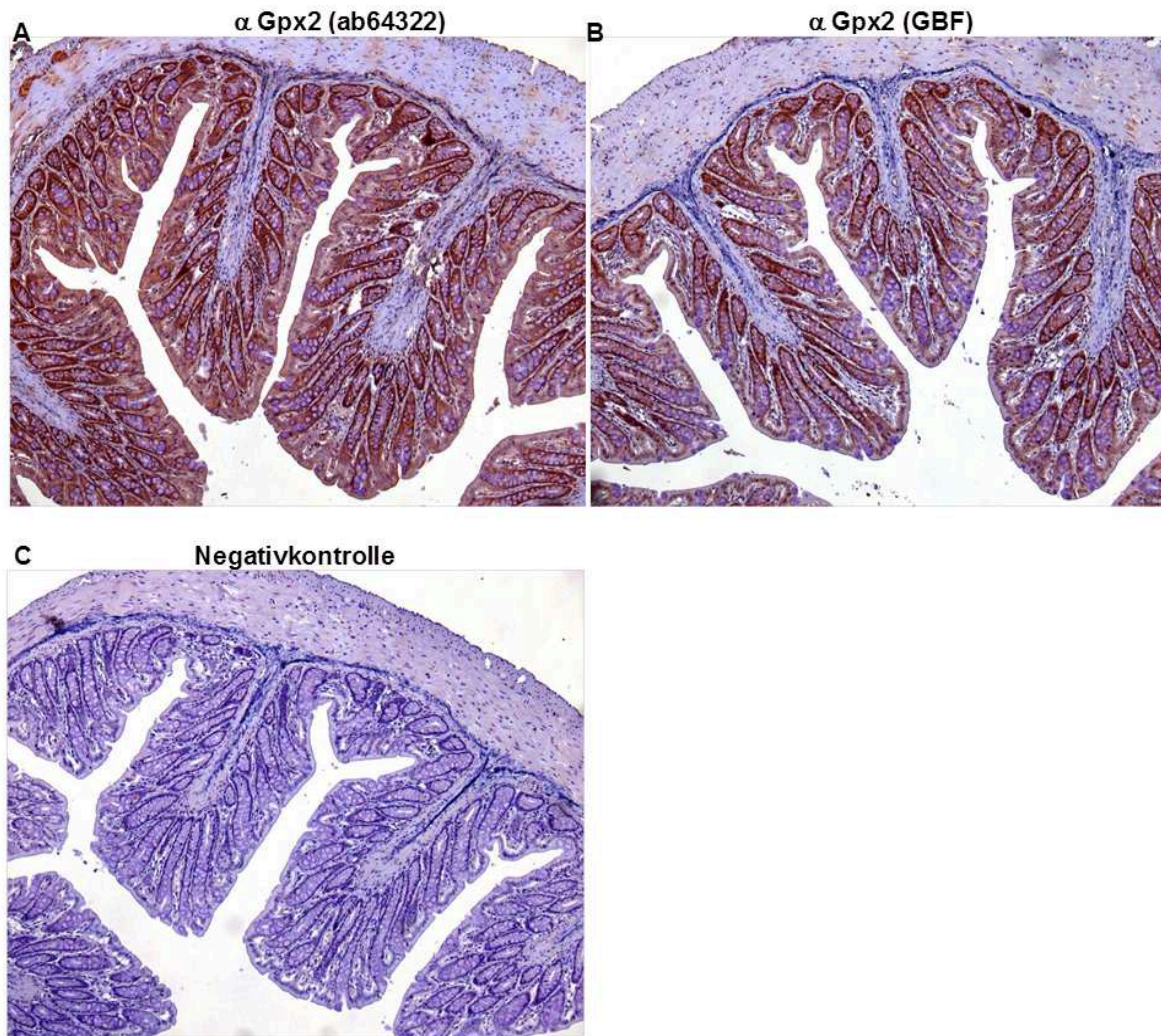


Abb. 15 Immunhistochemische Analyse der Gpx2 Expression im Kolon der Ratte.

Der Vergleich der Antikörper A) ab64322 und B) GBF zeigte eine spezifische Anfärbung des Epithels. Als Negativkontrolle C) wurde das Gewebe ohne Primärantikörper inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungen des HRP-Polymers zu detektieren. Originalvergrößerung 400-fach.

Da der Gpx2-Antikörper ab64322 ein ähnliches Ergebnis wie der Antikörper von Frau Prof. Brigelius-Flohé erbrachte, wurde für die folgenden Analysen der kommerziell erhältliche verwendet.

4.3.2.2 Gpx2 Expression in den Trigemiusnerven

Im Verlaufe der immunhistochemischen und Western Blot Analysen wurden bislang divergierende Ergebnisse in Bezug auf die Expression von Gpx2 in den Trigemiusnerven ENU-behandelter und unbehandelter Ratten beider Stämme erhalten. Trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse kann mit einer relativ großen Wahrscheinlichkeit davon

ausgegangen werden, dass keine geschlechts- oder stammspezifischen Expressionsunterschiede bestehen (Daten nicht gezeigt). Letztendlich werden weitere Analysen durchgeführt werden müssen, um die Gpx2 Expression in den Trigeminiernerven von BDIX und BDIV Ratten abschließend beurteilen zu können.

4.3.2.3 Gpx2 Expression in lymphatischen Organen

Da Suszeptibilitäts- und Resistenzgene nicht zwingend in dem Ursprungsgewebe des Tumors exprimiert werden müssen, um Einfluss auf das Tumorrisiko zu nehmen, wurde die Gpx2 Expression ebenfalls in den Organen des lymphatischen Systems von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter analysiert.

In der Milz konnte eine schwache zytoplasmatische Gpx2 Expression beobachtet werden. Da jedoch weder stamm- noch geschlechtsspezifischen Expressionsunterschiede nachgewiesen wurden, ist hier exemplarisch die Gpx2 Expression in der Milz einer männlichen adulten BDIX Ratte dargestellt (Abb. 16).

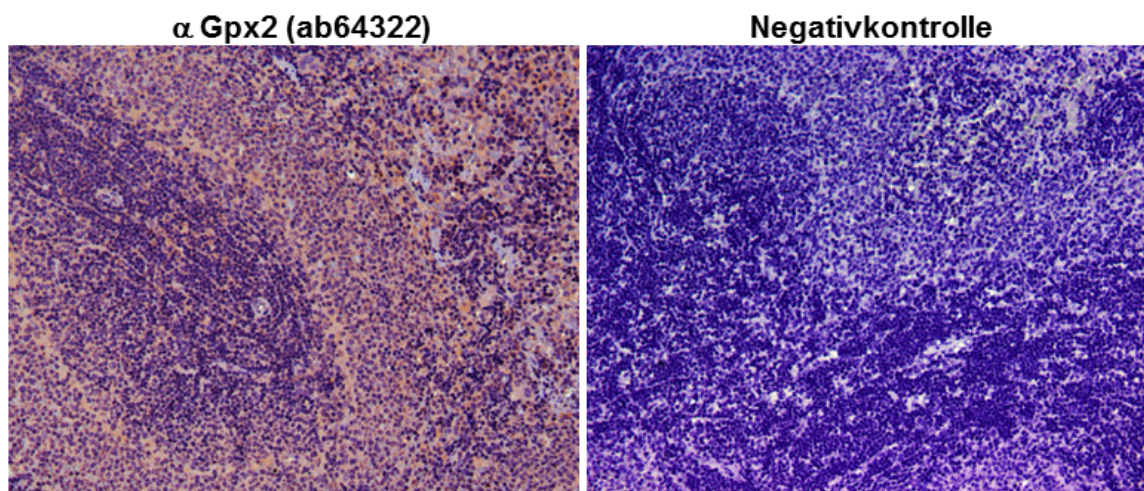


Abb. 16 Immunhistochemische Analyse der Gpx2 Expression in der Milz.

Exemplarisch dargestellt ist die Gpx2 Färbung in der Milz einer männlichen BDIX Ratte. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte nur mit Sekundärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Originalvergrößerung ist 200-fach.

In Lymphknoten konnte eine schwache zytoplasmatische Gpx2 Expression nachgewiesen werden. Die in Lymphknoten befindlichen Mastzellen wiesen eine sehr starke Gpx2 Expression im Vergleich zum umliegenden Gewebe auf (Abb. 17). Da keine stamm- oder geschlechtsspezifischen Expressionsunterschiede beobachtet werden konnten, ist

exemplarisch die Gpx2 Expression lediglich in einem Lymphknoten eines BDIV Weibchens gezeigt.

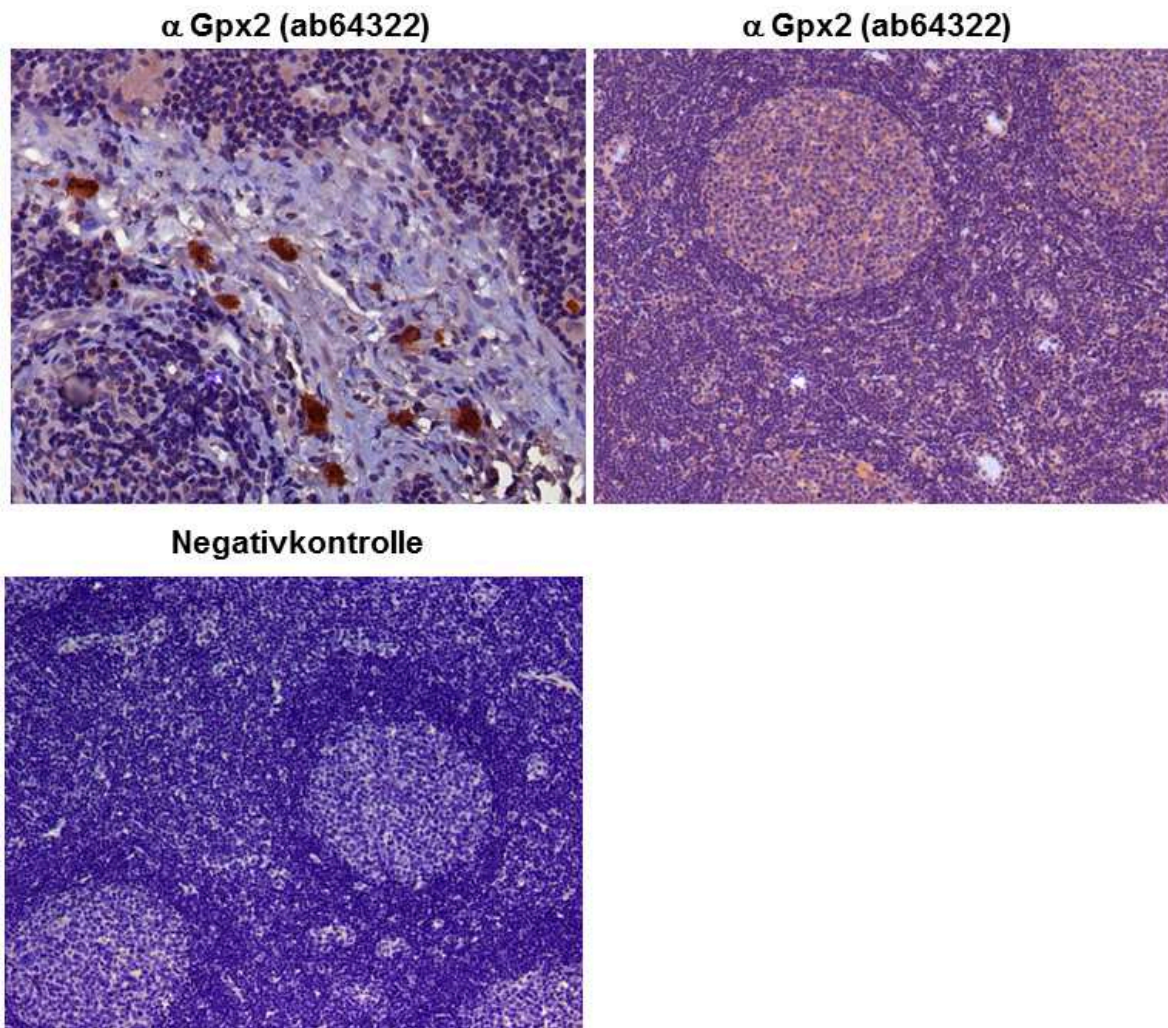


Abb. 17 Immunhistochemische Analyse der Gpx2 Expression in Lymphknoten.

Exemplarisch dargestellt ist die Gpx2 Färbung in einem Lymphknoten einer weiblichen BDIV Ratte. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte nur mit Sekundärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Originalvergrößerung ist 200- bzw. 400-fach.

Des Weiteren wurde die Gpx2 Expression im Thymus vor Abschluss der T-Zell Reifung (bis zum Tag 45) untersucht. Die Zellen des Thymus exprimierten Gpx2 nur schwach. Wie bereits im Lymphknotengewebe beobachtet, wiesen auch Mastzellen im Thymus eine starke Gpx2 Expression auf (Abb. 18). Es konnten abermals keine stamm- oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Gpx2 Expression detektiert werden, daher ist die Färbung lediglich am Beispiel einer weiblichen BDIV Ratte dargestellt.

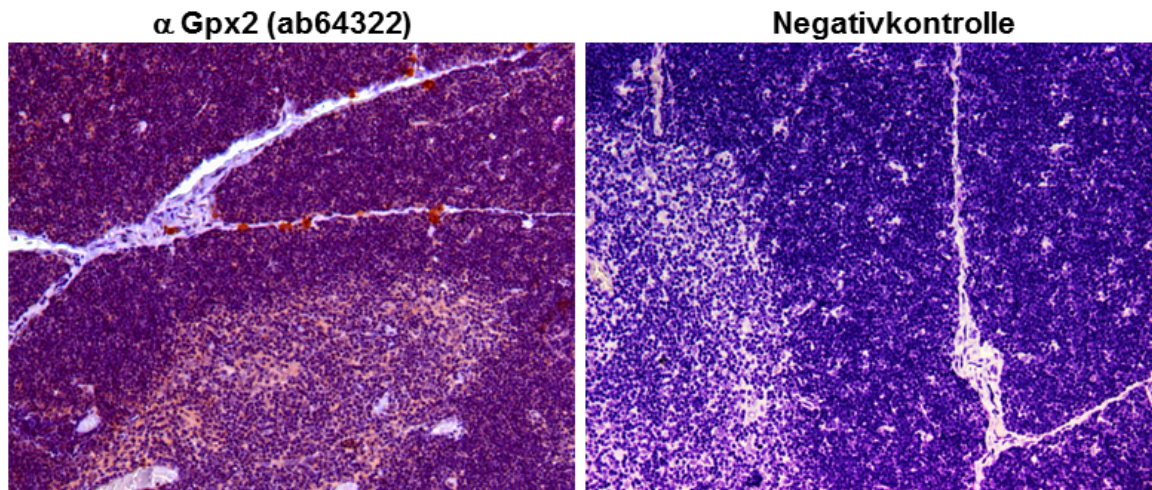


Abb. 18 Immunhistochemische Analyse der Gpx2 Expression im Thymus.

Exemplarisch dargestellt ist die Gpx2 Färbung im Thymusgewebe einer weiblichen BDIV Ratte. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte nur mit Sekundärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Originalvergrößerung ist 200-fach.

4.2.2.4 Gpx2 Expression in Zellen des Immunsystems

Da als Folge der ENU-Exposition eine Einwanderung von Makrophagen, T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in die Trigeminierven der BDIX und BDIV Ratten stattfindet und bereits gezeigt werden konnte, dass mindestens die T-Zellen eine bedeutende Rolle für den Tumoresistenzmechanismus der BDIV Ratten spielen, wurde die Gpx2 Expression in Zellen des Immunsystems analysiert.

In den peripheren Lymphozyten von BDIX und BDIV Ratten konnte keinerlei Gpx2 Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In den Trigeminierven ENU-behandelter Tiere konnte eine starke Gpx2 Expression in eingewanderten Immunzellen beobachtet werden. Eine Charakterisierung dieser Immunzellen mit Hilfe diverser Marker erbrachte schließlich anhand einer ASDCL-Färbung, dass es sich um Mastzellen handelte. Somit konnte einerseits erstmals eine Einwanderung von Mastzellen in die Trigeminierven als Folge der ENU-Behandlung und andererseits eine Gpx2 Expression in Mastzellen nachgewiesen werden. In Abb. 19 ist exemplarisch die Gpx2 Expression in Mastzellen der Trigeminierven weiblicher und männlicher Tiere des kongenen BDIX.BDIV-*Mss4b* Stammes dargestellt.

In MPNSTs von Tieren des BDIX Stammes und den daraus abgeleiteten kongenen und subkongenen Stämmen konnten ebenfalls Gpx2 exprimierende Mastzellen detektiert werden. Exemplarisch dargestellt ist die Einwanderung von Mastzellen und die starke Gpx2

Expression dieser in einem MPNSTs eines 189 Tage alten ENU-behandelten BDIX.BDIV-*Mss4a* Weibchens. Die Tumorzellen selbst exprimierten Gpx2 nur schwach (Abb. 20).

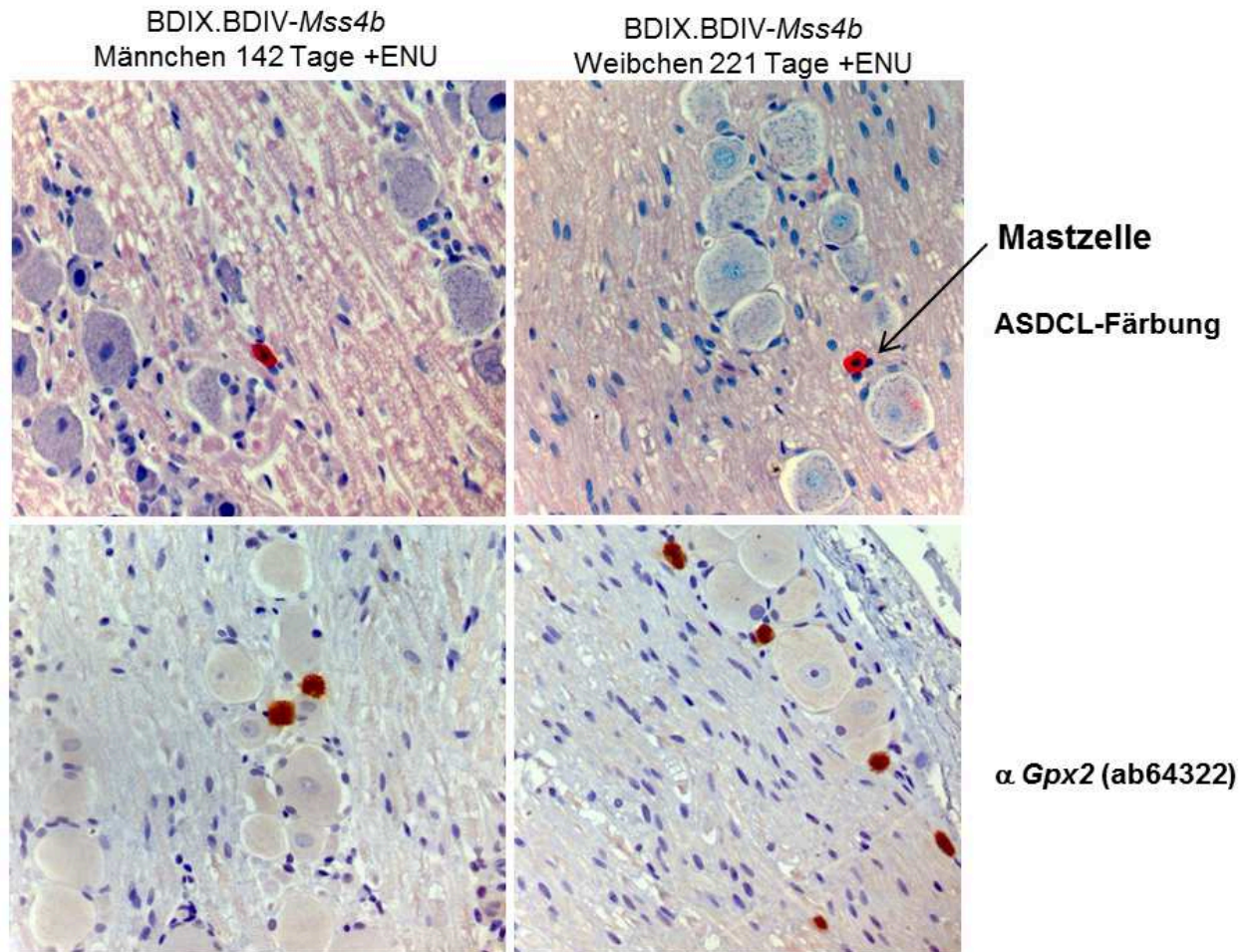


Abb. 19 Mastzellnachweis und immunohistochemische Analyse der Gpx2 Expression in Gewebsmastzellen der Trigemiusnerven ENU-behandelter Ratten.

Exemplarisch dargestellt sind die Färbungen anhand eines 142 Tage alten BDIX.BDIV-*Mss4b* Männchens und eines 221 Tage alten BDIX.BDIV-*Mss4b* Weibchens nach ENU-Exposition am PND1. Die Originalvergrößerung ist 400-fach.

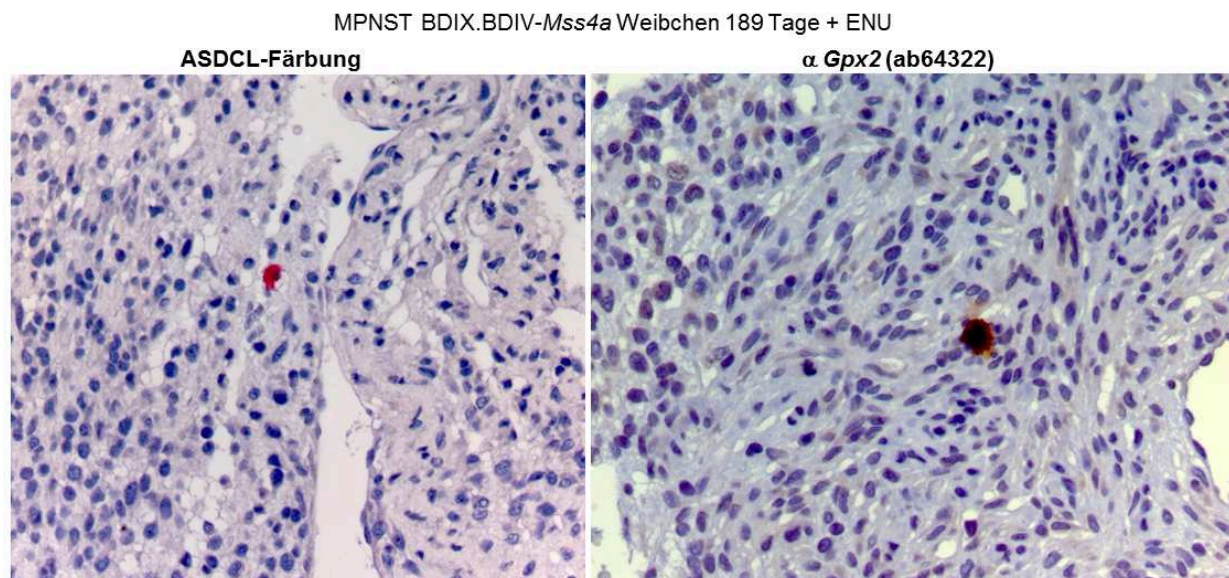


Abb. 20 Mastzellnachweis und immunhistochemische Analyse der Gpx2 Expression in Gewebsmastzellen in MPNSTs ENU-behandelter Ratten. Exemplarisch dargestellt sind die immunhisto- und zytochemischen Färbungen eines MPNSTs eines 189 Tage alten BDIX.BDIV-*Mss4a* Weibchens. Die Originalvergrößerung ist 400-fach.

Vermutlich aufgrund der relativ geringen Zahl in die Trigeminierven eingewanderter Mastzellen nach ENU-Exposition konnten keine stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Anzahl der eingewanderten Mastzellen oder deren Gpx2 Expressionsstärke nachgewiesen werden.

Um eine erfolgreiche Quantifizierung der Gpx2 Expression in Mastzellen durchzuführen, wurden mit Hilfe einer Peritoneal-Lavage größere Mengen an Immunzellen gewonnen. Das Peritonealexsudat setzte sich u.a. aus eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen zusammen (eigene Beobachtungen). Die Gpx2 Expression in den peritonealen Immunzellen von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter wurde zunächst mittels Western Blot und immunhistochemischer Analysen untersucht und verglichen.

In der Western Blot Analyse zeigte sich im Gesamt-Peritonealexsudat aller Ratten eine deutliche Gpx2 Expression (Molekulargewicht 21 kDa). Es fiel auf, dass in diesen Proben eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa auftrat. Bisher konnte allerdings nicht geklärt werden, ob diese z.B. durch unspezifische Bindung des Antikörpers an ein anderes Protein oder posttranslationale Modifikationen von Gpx2 zurückzuführen waren (Abb. 21).

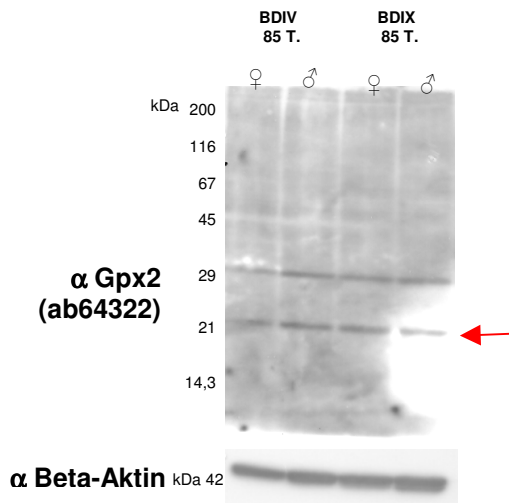


Abb. 21 Western Blot Analyse der Gpx2 Expression in peritonealen Immunzellen von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter.

Die Analyse wurde an 85 Tage alten Ratten durchgeführt. Es wurden jeweils 50 µg Lysat aufgetragen. Der rote Pfeil markiert die spezifische Gpx2 Bande bei 21 kDa. Als Ladekontrolle wurde Beta-Aktin (42 kDa) verwendet.

Um festzustellen, welche Zellen des Peritonealexsudats Gpx2 exprimierten, wurden die Zellen auf APES-beschichtete Objektträger ausgestrichen.

Während der als Resultat der ASDCL-Färbung entstehende rote Niederschlag spezifisch in Mastzellen entstand, konnten mithilfe der CD68 Immunfärbung Makrophagen im Peritonealexsudat anhand einer braunen Anfärbung identifiziert werden (Abb. 22). Diesen Färbungen zufolge machten die Mastzellen und Makrophagen einen großen Teil der Immunzellpopulationen im Peritonealexsudat aus.

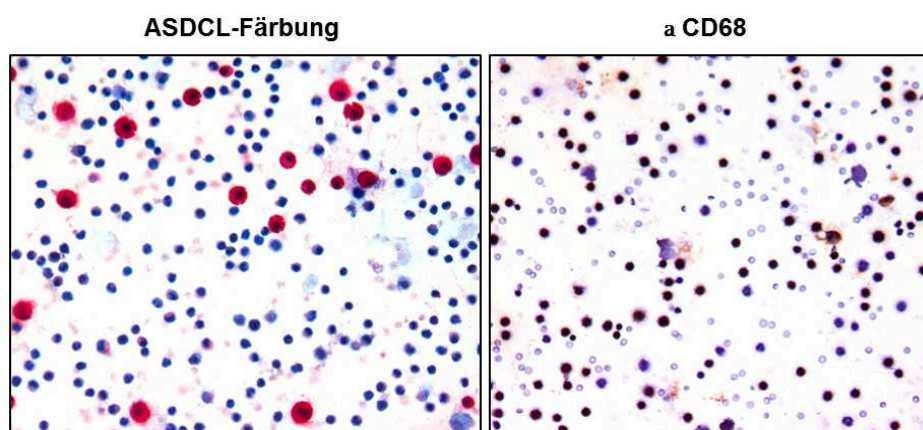


Abb. 22 Identifizierung von Mastzellen und Makrophagen im Peritonealexsudat von BDIX und BDIV Ratten.

Dargestellt ist eine exemplarische ASDCL- Färbung zur Identifizierung von Mastzellen und eine CD68 Immunfärbung zur Identifizierung von Makrophagen. Die Originalvergrößerung ist 400-fach.

Da eine relativ starke Gpx2 Expression im Gesamt-Peritonealexsudat von BDIX und BDIV Ratten detektiert wurde und ein beträchtlicher Teil der Immunzellen im Peritoneum Mastzellen darstellten, wurden anschließend Vergleiche der Gpx2 Expression in peritonealen Mastzellen von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter durchgeführt (Abb. 23).

Eine deutliche zytoplasmatische Gpx2 Expression wurde in den peritonealen Mastzellen von sowohl BDIX als auch von BDIV Ratten beider Geschlechter detektiert. Anhand der durchgeführten immunhistochemischen Analysen konnte allerdings keine ganz eindeutigen Unterschiede im Hinblick auf eine geschlechts- und/oder stammspezifische Expression detektiert werden, weshalb durchflusszytometrische Analysen durchgeführt wurden, welche einerseits eine objektive Quantifizierung der Gpx2 Expression und andererseits die Analyse einer deutlich größeren Anzahl von Zellen erlaubten.

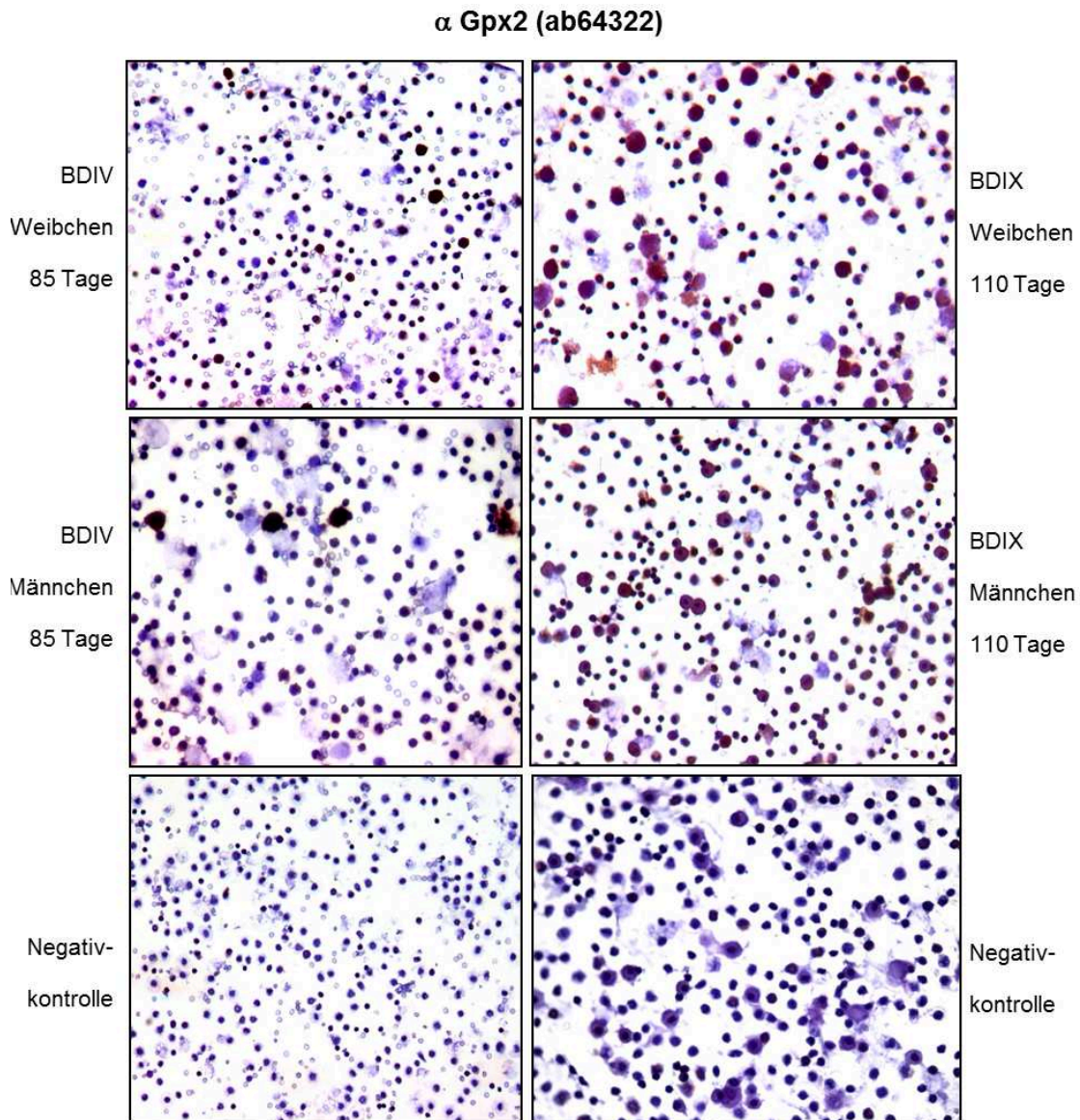


Abb. 23 Immunhistochemische Analyse der Gpx2 Expression in peritonealen Mastzellen von weiblichen und männlichen Ratten der Stämme BDIX und BDIV.

Die Analysen wurden an 85 Tage alten BDIV und 110 Tage alten BDIX Ratten beider Geschlechter durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen lediglich mit Sekundärantikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Originalvergrößerung ist 400-fach.

In einer ersten durchflusszytometrischen Analysen wurden die im Gesamt-Peritonealexsudat befindlichen Immunzellpopulationen anhand ihrer Größe und inneren Struktur charakterisiert. Diese Analysen bestätigten, dass sich die Mehrzahl der Immunzellen im Peritoneum aus Makrophagen (grün), Mastzellen (blau) und Granulozyten/Lymphozyten (rot) zusammensetzte (Abb. 24 A und B). Die mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation erzeugte Anreicherung der Makrophagen- (Abb. 24 C) und Mastzellpopulation (Abb. 24 D)

zeigte, dass die Mastzellen die größten Zellen mit der höchsten Granularität im Peritonealexsudat darstellten und somit leicht zu identifizieren waren.

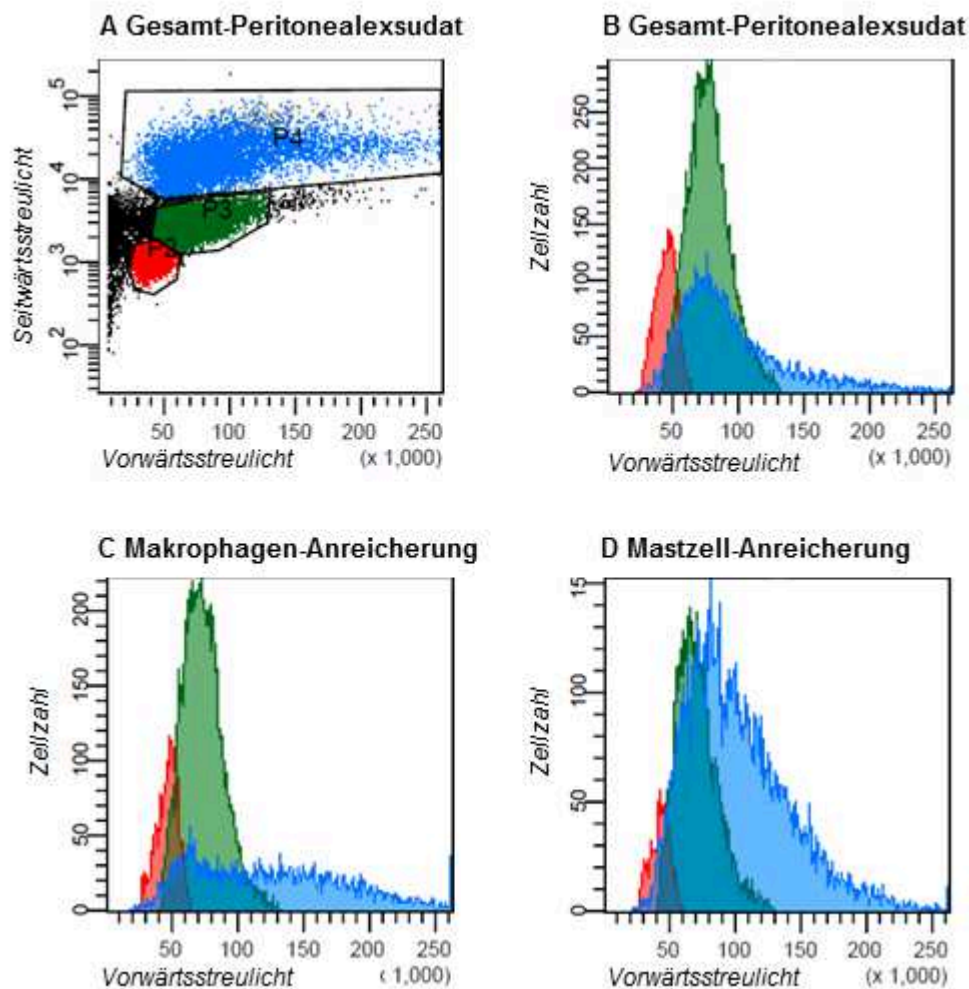


Abb. 24 Identifizierung und Charakterisierung von peritonealen Immunzellen der Ratte mittels FACS-Analyse.

A) Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts von Zellen des Peritoneums. B) Relative Zellzahl der analysierten Fraktionen. C) Anreicherung von Makrophagen. D) Anreicherung von Mastzellen. Grün = Makrophagen, blau = Mastzellen, rot = Lymphozyten.

Die durchflusszytometrische Analyse der Gpx2 Expression in peritonealen Mastzellen einer 206 Tage alten weiblichen bzw. männlichen BDIV Ratte und einer 213 Tage alten weiblichen bzw. männlichen BDIX Ratte konnte erstmals einen stamm-, jedoch nicht geschlechtsspezifischen Expressionsunterschied nachweisen. Aufgrund des fehlenden geschlechtsspezifischen Gpx2 Expressionsunterschieds wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) beider BDIV Ratten bzw. beider BDIX Ratten gemittelt.

Die Mastzellen des BDIV Stammes zeigten eine MFI von 1461 und die des BDIX Stammes eine MFI von 1064. Somit wiesen die Mastzellen des BDIV Stammes eine ca. 1,4-fach stärkere Gpx2 Expression auf als die Mastzellen des BDIX Stammes (Abb. 25).

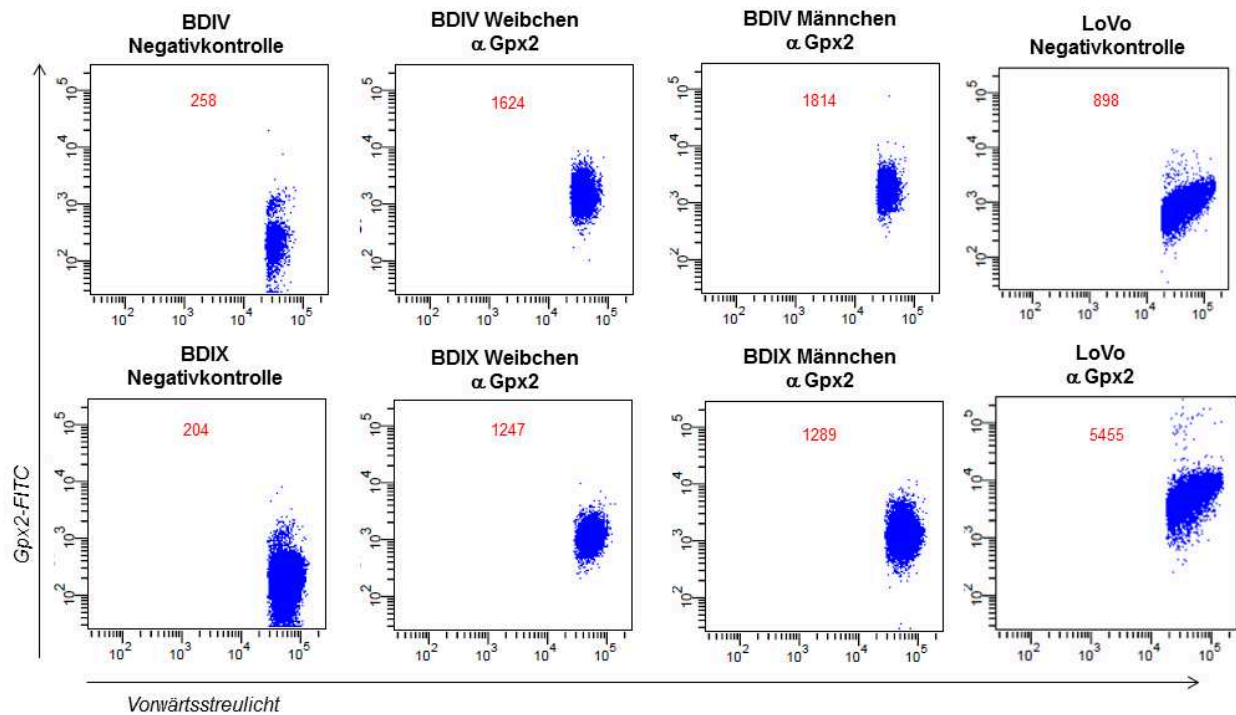


Abb. 25 FACS-Analyse der Gpx2 Expression in peritonealen Mastzellen von BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter.

Die gezeigten Analysen wurden an einer weiblichen und einer männlichen 206 Tage alten BDIV und einer weiblichen und einer männlichen 213 Tage alten BDIX Ratte durchgeführt. Rot dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität des FITC-Signals. Als Positivkontrolle wurden LoVo-Zellen, als Negativkontrollen nur mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper inkubierte LoVo- und Mastzellen verwendet.

Die Identität der Mastzellen wurde der ersten Analyse zufolge einerseits anhand der Größe und Granularität der Zellen und andererseits durch eine IgE-Oberflächenmarkierung bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die LoVo-Zellen wurden als Positivkontrolle für die Gpx2 Färbung verwendet. Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der Gpx2 Expression in verschiedenen Geweben und Zelltypen zusammen.

Tab. 21 Zusammenfassung der Western Blot und immunhistochemischen Analysen der Gpx2 Expression in verschiedenen Organen und Zelltypen von BDIX und BDIV Ratten.

Organ/Zelltyp	Gpx2 Proteinexpression	
	Western Blot	Immunhistochemie
Trigeminusnerv	Nicht eindeutig	
MPNST	Nicht eindeutig	
Periphere Lymphozyten	-	-
Peritoneale Mastzellen	+	+++
Peritoneale Makrophagen	++	+++
Gewebsmastzellen Trigeminusnerv	+	+++
Gewebsmastzellen Thymus	n.u.	+++
Gewebsmastzellen Lymphknoten	n.u.	+++
Milz	-	+
Thymus	-	+
Lymphknoten	-	+

- = keine Expression, + = schwache Expression, ++= mittelstarke Expression, +++ = starke Expression, n.u. = nicht untersucht

4.4 Östrogenrezeptor beta: Transkriptanalysen in Wildtyp und β erKO Mäusen

Das *Esr2* Genprodukt könnte für den Geschlechtseffekt des *Mss4* Locus verantwortlich sein, indem es östrogenabhängig Signalwege aktiviert, die in einer Inhibierung des Tumorwachstums in weiblichen, jedoch nicht in männlichen Ratten münden. Da lange Zeit die Knockout (KO)-Technologie in Ratten nicht zur Verfügung stand, wurden in der Vergangenheit Experimente an *Esr2* KO Mäusen (β erKO) durchgeführt, um die Bedeutung des *Esr2* Gens für die Tumorentstehung im peripheren Nervensystem zu untersuchen. Im Verlauf von Analysen der Er β Proteinexpression in Geweben von β erKO Mäusen wurde jedoch die Spezifität der verwendeten Antikörper (PA1-310B, Thermo Scientific; SP5198P, Acris; Chicken Polyclonal ER beta 503 IgY, J.A. Gustafsson, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) in Frage gestellt.

Sowohl in Wildtyp als auch KO Mäusen wurde ein Protein mit der molekularen Größe des Volllängen-Er β detektiert. Dem Erzeuger der β erKO Maus zufolge sollte jedoch keine oder lediglich eine stark verkürzte mRNA in diesen Mäusen synthetisiert werden, deren korrespondierendes Protein eine deutlich unterschiedliche molekulare Masse im Vergleich zum Volllängen-Er β aufweisen sollte (Krege, Hodgkin et al. 1998).

Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob in β erKO Mäusen *Esr2* mRNA synthetisiert wird, aus der ein Protein mit einer zum Volllängen-Er β ähnlichen molekularen Masse gebildet werden könnte, was Rückschlüsse auf die Spezifität der verwendeten Er β -Antikörper

erlauben könnte. Letztendlich sollte anhand dieser Untersuchungen festgestellt werden, ob die bereits erzeugten Ergebnisse bezüglich der mRNA- und Proteinexpression des *Esr2* in β erKO Mäusen und den Ratten der BDIX und BDIV Stämme weiterhin Gültigkeit besitzen.

Für die Transkriptanalysen wurden geeignete Mäuse anhand ihres Genotyps ausgewählt. Ein PCR-Produkt mit der Größe von 500 bp entstand, wenn das *Esr2* Gen vollständig ausgeknockt war. Ein PCR-Produkt mit der Größe von 457 bp entsprach dem Wildtyp, d.h. das *Esr2* Gen war nicht ausgeknockt. Heterozygote Tiere waren in diesem PCR-Design anhand einer Doppelbande (500 und 457 bp) zu erkennen (Abb. 26).

Für die folgenden Untersuchungen wurden je eine weibliche KO und eine weibliche Wildtyp Maus ausgewählt.

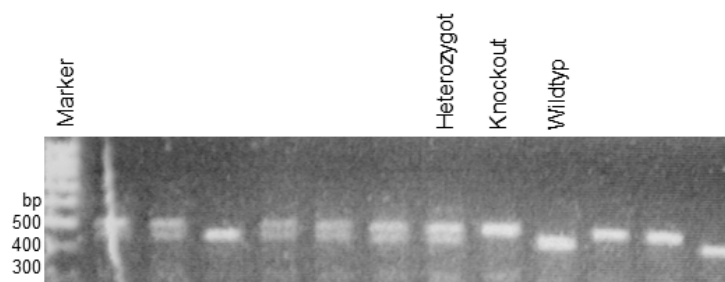


Abb. 26 Genotypisierung von Mäusen für die *Esr2* Transkriptanalyse in KO Tieren.

Zunächst wurde analysiert, ob in den Trigeminiernerven von β erKO Mäusen Transkripte gebildet wurden, welche die Exons 3, 4, 5 und 6 enthalten. Dazu wurde ein Forward Primer in Exon 2 mit verschiedenen Reverse Primern kombiniert. Ein Reverse Primer lag in Exon 3 (hinter der Integrationsstelle der Neokassette gelegen), einer in Exon 4, Exon 5 oder Exon 6. Wie in Abb. 27 ersichtlich, konnte keinerlei PCR-Produkt in der KO Maus nachgewiesen werden. Im Wildtyp zeigten sich PCR-Produkte für alle verwendeten Primerpaare. Obwohl auf dem Foto kaum zu sehen, wurde in der Wildtyp Maus auch eine schwache Bande in der „Exon 2 - 6“ PCR detektiert (Abb. 27).

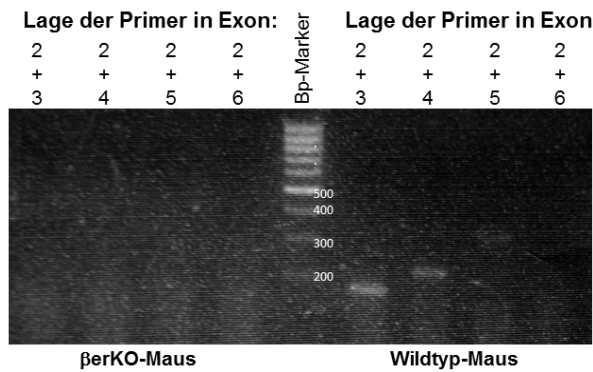


Abb. 27 PCR-Nachweis der *Esr2* Transkripte (Exon 2 - 6) in den Trigemini-nerven einer Wildtyp und einer β erKO Maus.

Der verwendete Reverse Primer in Exon 3 lag hinter der Integrationsstelle der Neokassette.

Ein Forward Primer in Exon 5 und ein Reverse Primer in Exon 6 wurde verwendet, um festzustellen, ob im Gewebe der β erKO Maus *Esr2* Transkripte gebildet werden könnten, die der Integrationsstelle der Neokassette nachfolgende Exons, wie z.B. Exon 5 und 6, enthalten. Zur Bestätigung des zuvor erzielten Ergebnisses wurde die PCR mit dem Forward Primer in Exon 2 und dem Reverse Primer in Exon 3 (hinter der Integrationsstelle der Neokassette) erneut durchgeführt (Abb. 28). Da in den Trigemini-nerven offenbar nur wenig *Esr2* mRNA gebildet wurde, wurden diese und alle folgenden Analysen mit aus dem Ovar isolierter RNA durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde in jedem Fall RNA aus dem Ovar einer C57Bl/6 Maus mitgeführt.

Es zeigte sich, dass in der Wildtyp und C57Bl/6 Maus *Esr2* Transkripte hergestellt wurden, welche die Exons 2, 3, 5 und 6 umfassten. In der β erKO Maus konnte das Vorhandensein von *Esr2* Transkript jenseits der Neokassette, Exon 5 und 6 umfassend, nachgewiesen werden (Abb. 28). Es zeigte sich erneut kein PCR-Produkt in der β erKO Maus, wenn der Reverse Primer in Exon 3 hinter der Integrationsstelle der Neokassette lag.

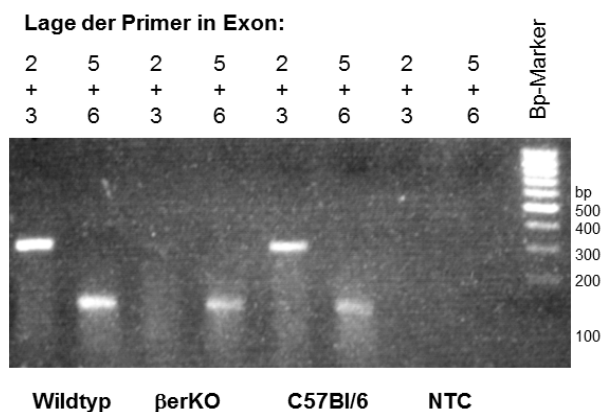


Abb. 28 PCR-Nachweis von *Esr2* Transkripten (Exon 2 – 3 und 5 – 6) im Ovar einer Wildtyp, C57Bl/6 und β erKO Maus.

Der Reverse Primer in Exon 3 lag hinter der Integrationsstelle der Neokassette. NTC = No template control.

Mittels einer weiteren PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass *Esr2* Transkripte in der β erKO Maus sowohl Exon 2 als auch den der Neokassette vorangehenden Teil von Exon 3 beinhalteten (Abb. 29). Erneut konnte kein PCR-Produkt in der β erKO Maus erzielt werden, wenn der Forward Primer in Exon 2 und der Reverse Primer in Exon 4 lag, womit das vorangegangene Ergebnis der *Esr2* Transkription in den Trigeminiernerven der β erKO Maus bestätigt wurde. In der Wildtyp und C57Bl/6 Maus wurde in jedem Fall ein Produkt erzielt.

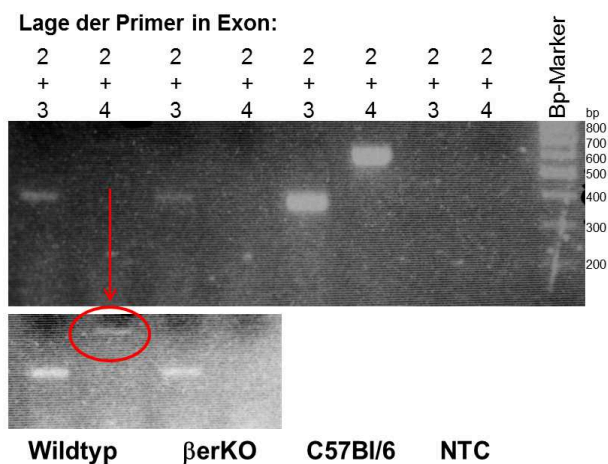


Abb. 29 PCR-Nachweis von *Esr2* Transkripten (Exon 2, 3, 4) im Ovar einer Wildtyp, C57Bl/6 und β erKO Maus.

Der verwendete Reverse Primer in Exon 3 lag vor der Integrationsstelle der Neokassette. NTC = No template control.

In Abb. 30 sind die Ergebnisse der PCR-Amplifikation von Abschnitten der *Esr2* mRNA in Wildtyp und β erKO Mäusen zusammengefasst.

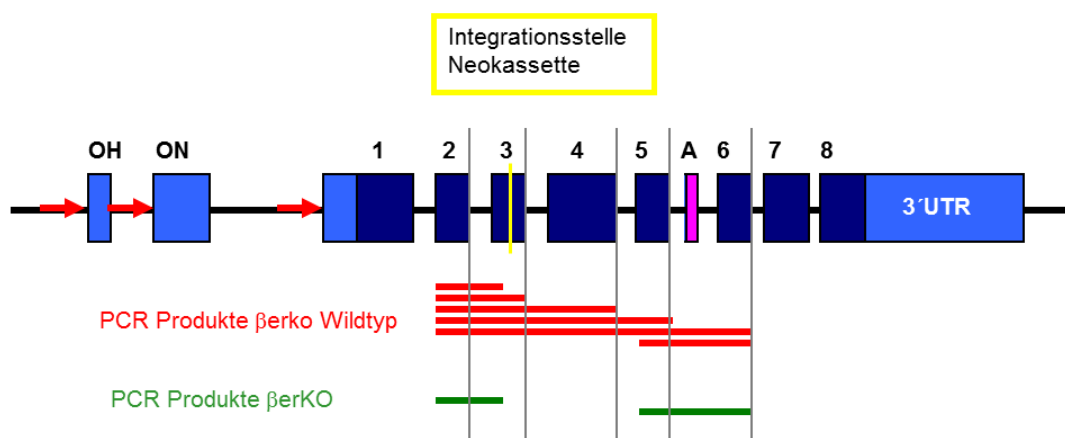


Abb. 30 Mittels PCR identifizierte Abschnitte der *Esr2* mRNA in Wildtyp und β erKO Mäusen.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden die PCR-Produkte sequenziert und die Wildtyp und β erKO Maus Sequenzen miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Sequenzen spezifisch für das *Esr2* Gen und darüber hinaus identisch zwischen der Wildtyp und KO Maus waren. Exemplarisch dargestellt sind die Sequenzen und die BLAST Ergebnisse für die Exons 3 und 6 (Anhang 4).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass aufgrund des Vorhandenseins dieser *Esr2* Transkripte möglicherweise auch funktionelle Proteinvarianten in β erKO Mäusen gebildet werden könnten.

4.5 Immunhistochemische Charakterisierung der prämaligen Zellen in den Trigeminiernerven von weiblichen und männlichen BDIX.BDIV-Mss4d Ratten

Als initiales Ereignis der ENU-induzierten Entstehung von MPNSTs in den ingezüchteten Rattenstämmen BDIX und BDIX wird die Mutation im *Neu/ErbB2* Gen gesehen (Nikitin, Jin et al. 1991; Kindler-Rohrborn, Kind et al. 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Mutation auch in den Trigeminiernerven der BDIX.BDIV-Mss4d Ratten entsteht (unveröffentlichte Daten).

Zur weiteren Charakterisierung der prämaligen Zellen in den Trigeminiernerven von BDIX.BDIV-Mss4d Tieren im Hinblick auf ihr proliferatives Potential und ihren Differenzierungsstatus wurden Antikörper gegen die Proteine Ngfr und Cyclin D1 verwendet.

4.5.1 Ngfr

In 8 von 10 untersuchten Trigeminiernerven ENU-behandelter BDIX.BDIV-Mss4d Ratten beider Geschlechter konnte eine mittelstarke zytoplasmatische Ngfr Expression sowohl in Schwann Zellen an der Hirn-Nerv-Grenze als auch in distal abwandernden Schwann Zellen beobachtet werden (Tab. 22).

Es zeigte sich eine teilweise Korrelation der Ngfr Expression mit der Morphologie prämaligener Schwann Zellen an der Hirn-Nerv-Grenze, welche durch eine abgerundete Form und eine verschobene Kern-Plasma-Relation im Vergleich zur langgestreckten Form nicht mutierter Schwann Zellen gekennzeichnet waren (Abb. 31).

Im Vergleich zu den untersuchten Trigeminiernerven zeigte sich im MPNST eines 245 Tage alten BDIX.BDIV-Mss4b Männchens viele lokale Anhäufungen von Zellen, die Ngfr stark zytoplasmatisch exprimierten (Abb. 31). Diese Überexpression von Ngfr konnte ebenfalls in MPNSTs von BDIX Ratten beobachtet werden (unveröffentlichte Daten).

In Abb. 31 ist die Ngfr Expression in den Trigeminiernerven ENU-behandelter BDIX.BDIV-*Mss4d* Tiere unterschiedlichen Alters exemplarisch dargestellt.

Tab. 22 Ngfr Expression in den Trigeminiernerven ENU-behandelter weiblicher und männlicher BDIX.BDIV-*Mss4d* Ratten.

		α -Ngfr
Geschlecht	Alter (Tage)	Prä maligne Schwann Zellen an der Hirn-Nerv-Grenze
Männlich	227	++
Männlich	224	-
Männlich	222	++
Männlich	183	-
Männlich	120	++
Männlich	100	++
Weiblich	242	+
Weiblich	237	++
Weiblich	228	+
Weiblich	180	-
Weiblich	115	++

		α -Ngfr
Geschlecht	Alter (Tage)	Auswandernde prä maligne Schwann Zellen
Männlich	227	++
Männlich	224	-
Männlich	222	++
Männlich	183	+
Männlich	120	++
Männlich	100	++
Weiblich	242	+
Weiblich	237	+
Weiblich	228	+
Weiblich	180	-
Weiblich	115	+

- = keine, + = schwache, ++ = mittelstarke, +++ = starke Expression

α Ngfr

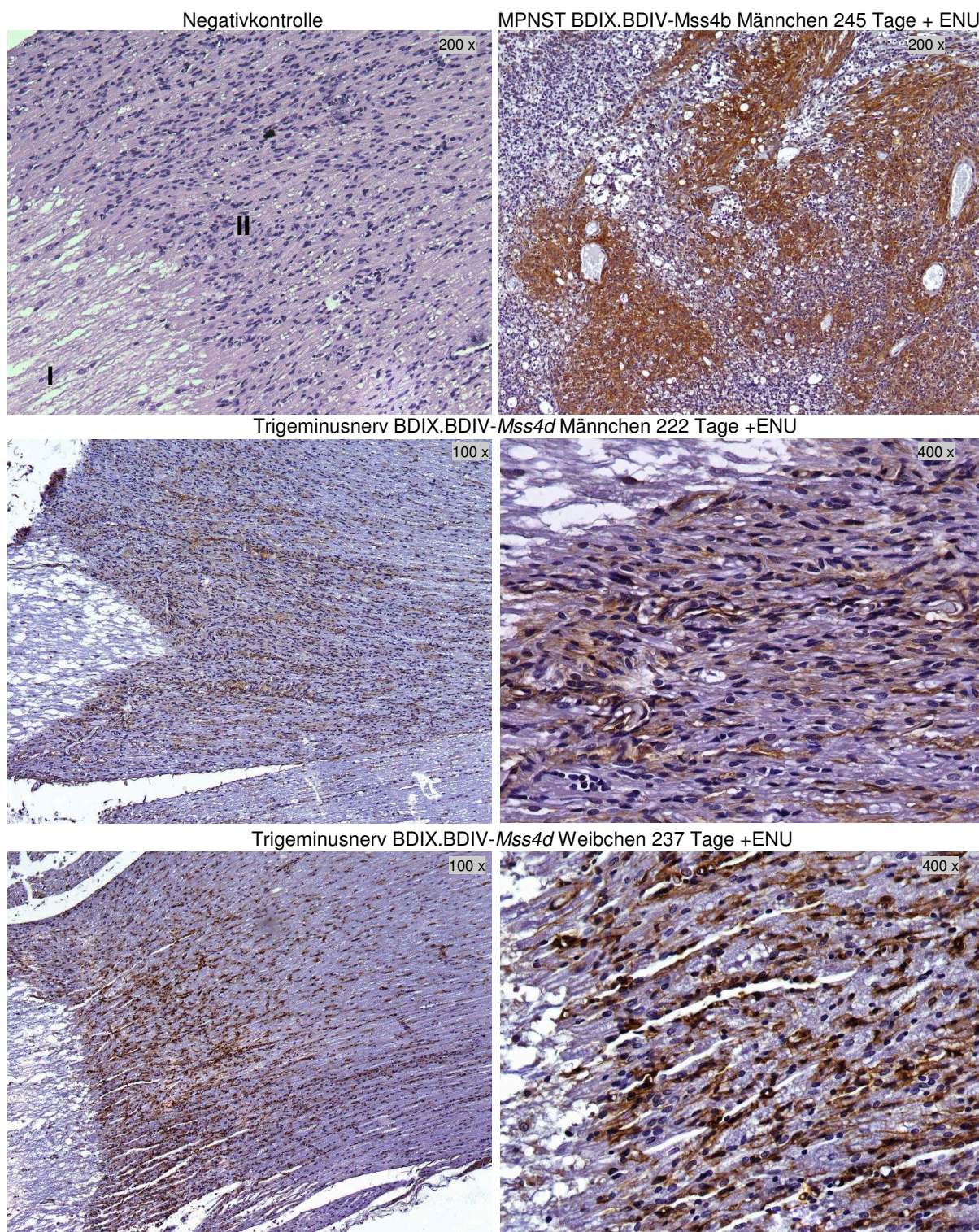


Abb. 31 Immunhistochemische Analyse der Ngfr Expression in prämaligen Schwann Zellen in einem Trigeminusnerv eines ENU-behandelten männlichen und weiblichen BDIX.BDIV-*Mss4d* Tieres und im MPNSTs eines 245 Tage alten BDIX.BDIV-*Mss4b* Männchens.

I = Gehirn; II = Trigeminusnerv

4.5.2 Cyclin D1

In lediglich 3 von 11 untersuchten Trigeminierven wiesen die morphologisch prämaligen Schwann Zellen an der Hirn-Nerv-Grenze eine Cyclin D1 Expression auf. In den Trigeminierven von 2 dieser 3 Tiere wurde eine relativ große Anzahl Cyclin D1 exprimierender Zellen sowohl an der Hirn-Nerv-Grenze als auch in weiter distalen Bereichen detektiert (Abb. 32; Tab. 23). Während die morphologisch normalen Schwann Zellen kein Cyclin D1 in messbarer Menge exprimierten, schienen einige der morphologisch prämaligen Schwann Zellen eine vermehrte nukleäre Cyclin D1 Expression aufzuweisen (Abb. 32). In den übrigen 8 Trigeminierven wurde keinerlei Cyclin D1 Expression in den Schwann Zellen beobachtet, lediglich einige Satellitenzellen waren Cyclin D1 positiv (Abb. 32; Tab. 23). In dem MPNST eines 245 Tage alten BDIX.BDIV-*Mss4b* Männchens wurde eine gleichmäßige Verteilung von Cyclin D1 positiven und –negativen Zellen beobachtet.

Tab. 23 Cyclin D1 Proteinexpression in den Trigeminierven ENU-behandelter weiblicher und männlicher BDIX.BDIV-*Mss4d* Ratten.

		α-Cyclin D1
Geschlecht	Alter (Tage)	Prämalige Schwann Zellen an der Hirn-Nerv-Grenze
Männlich	227	-
Männlich	224	-
Männlich	222	++
Männlich	183	-
Männlich	120	-
Männlich	100	-
Weiblich	242	-
Weiblich	237	-
Weiblich	228	-
Weiblich	180	+
Weiblich	115	+

		α-Cyclin D1
Geschlecht	Alter (Tage)	Auswandernde Schwann Zellen
Männlich	227	-
Männlich	224	-
Männlich	222	-
Männlich	183	-
Männlich	120	++
Männlich	100	-
Weiblich	242	++
Weiblich	237	-
Weiblich	228	-
Weiblich	180	-
Weiblich	115	-

- = keine, + = schwache, ++ = mittelstarke, +++ = starke Expression

α Cyclin D1

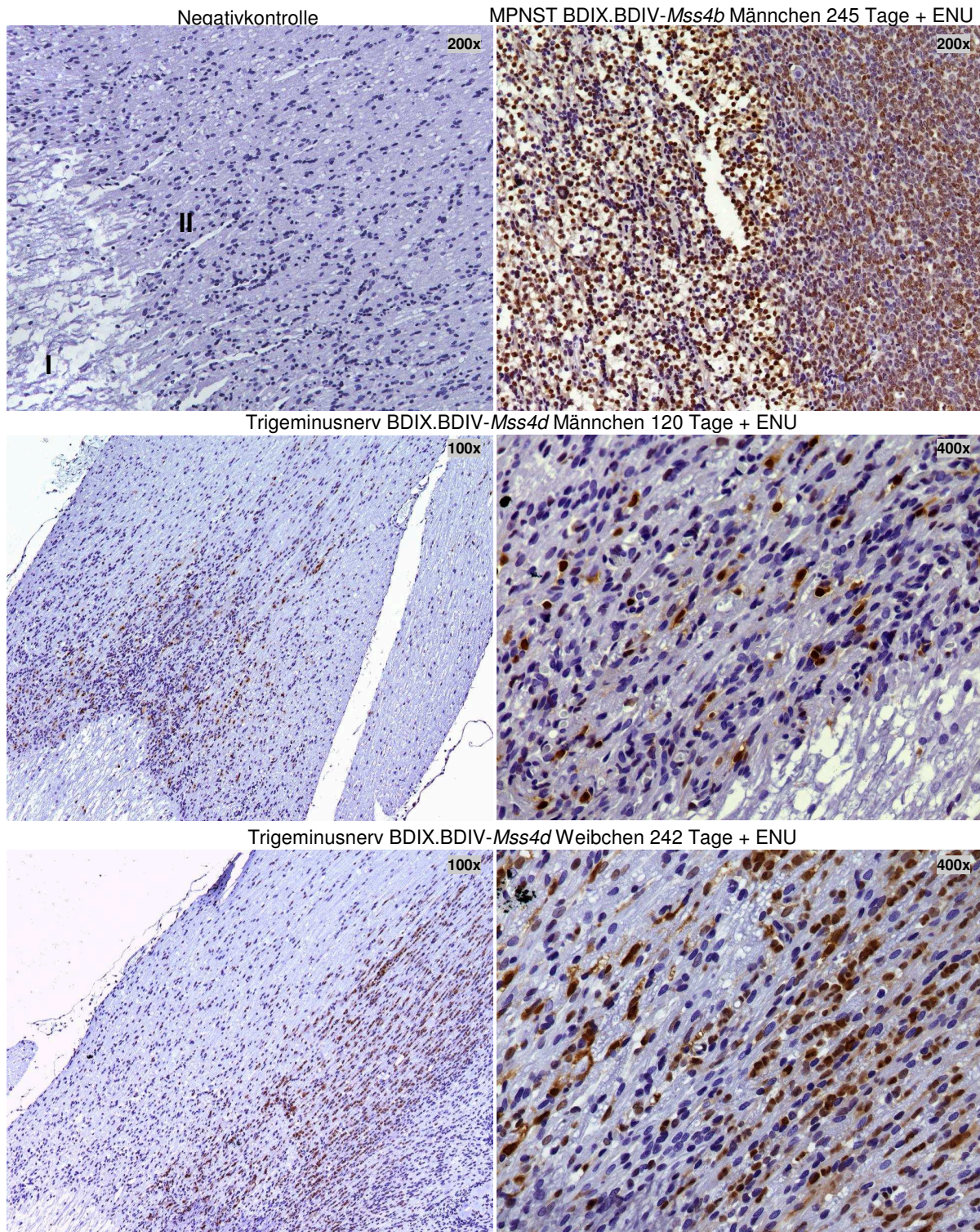


Abb. 32 Immunhistochemische Analyse der Cyclin D1-Expression in prämaligen Schwann-Zellen in einem Trigemiusnerv eines ENU-behandelten BDIX.BDIV-*Mss4d* Männchens und Weibchens und einem MPNST eines 245 Tage alten BDIX.BDIV-*Mss4b* Männchens.

I = Gehirn; II = Trigemiusnerv

5. Diskussion

Die große Mehrheit der Tumorerkrankungen tritt sporadisch auf, wird in ihrer Entstehung neben exogenen Faktoren auch durch den individuellen genetischen Hintergrund beeinflusst und zeigt eine Geschlechtspräferenz im Hinblick auf die Inzidenz, den Krankheitsverlauf und das Überleben (Nadeau 2001; Frank 2004; Flint und Mackay 2009). Die Anstrengungen im Rahmen von GWAS Suszeptibilitätsgene für humane Tumorerkrankungen zu identifizieren sind durch die hohe genetische Heterogenität der Populationen, unbekannte Einflüsse von Umweltfaktoren, der variablen Penetranz und den z.T. niedrigen Frequenz von Resistenz- oder Suszeptibilitätsallelen erschwert. Dennoch konnten einige SNPs identifiziert werden, die mit der Suszeptibilität gegenüber der Entstehung bestimmter Tumoren assoziiert sind (Amos, Wu et al. 2008; Easton und Eeles 2008; Chang, Cramer et al. 2009). In vielen Fällen sind diese SNPs jedoch nur für die ausgewählte Stichprobe relevant und beeinflussen in anderen Kollektiven das Krebsrisiko nicht (Pearson und Manollo 2008).

Ingezüchtete Maus- oder Rattenstämme eignen sich hingegen besonders gut als Modelle für die Suche nach genetischen Faktoren, die dem geschlechtsspezifischen Tumorrisiko zugrunde liegen. Diese Tiere sind genetisch weitestgehend identisch und werden unter standardisierten Lebensbedingungen gehalten, wodurch die genetische Ursache der Tumorresistenz bzw. -suszeptibilität relativ isoliert von anderen Einflussgrößen untersucht werden kann. In Mäusen und Ratten entstehen Tumoren auch mit Geschlechtspräferenz (Ober, Loisel et al. 2008). Die genetische Manipulierbarkeit der Versuchstiere bietet zusätzlich die Möglichkeit detaillierte funktionelle Studien zu den identifizierten Suszeptibilitäts- und Resistenzgenen durchzuführen.

Ich habe mich im Rahmen meiner Dissertation mit dem Locus *Mss4* auf Chromosom 6 beschäftigt, der durch eine GWAS an einer segregierenden Kreuzung der tumorsuszeptiblen BDIX und tumorresistenten BDIV Ratten identifiziert wurde. Homozygote BDIV Allele am *Mss4* Locus waren mit einem starken Tumorresistenzeffekt ausschließlich in weiblichen F₂ Hybriden assoziiert (Winzen, Koelsch et al. 2009). Der Effekt dieses Locus wurde durch die Analyse des kongenen BDIX.BDIV-*Mss4a* Stammes bereits experimentell bestätigt (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011).

5.1 Feinkartierung des *Mss4* Locus

Der BDIX.BDIV-*Mss4b* Stamm trägt ein BDIV Fragment, das den gesamten Tumorresistenzhaplotyp umfasst. Sowohl die Tumorzinzidenz als auch die mediane Überlebenszeit dieser Ratten unterschied sich nicht signifikant von der des

BDIX.BDIV-*Mss4a* Stammes, jedoch von signifikant von der des BDIX Stamms. Die BDIX.BDIV-*Mss4c* Ratten, welche BDIV Allele lediglich im Bereich der zentromerischen 40 % des Tumorresistenzhaplotyps tragen, wiesen im Vergleich zu BDIX.BDIV-*Mss4a* bzw. BDIX.BDIV-*Mss4b* Ratten keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenszeiten oder Tumorinzidenzen auf, allerdings eine signifikant verlängerte Überlebenszeit und erniedrigte Tumorinzidenz im Vergleich zu den tumorsuszeptiblen BDIX Ratten. Demzufolge schienen in den zentromerischen 40 % des Tumorresistenzhaplotyps keine weiteren Risikomodifizierenden Gene der BDIV Ratte lokalisiert zu sein. Das mit 2,1 Mb derzeit kleinste zur Verfügung stehende subkongene BDIV Fragment *Mss4d* umfasst den Kernbereich der Assoziation bei *D6Mit1* (98,8 Mb). Diese Ratten wiesen eine nahezu identische Tumorinzidenz und Überlebenszeit wie die BDIX.BDIV-*Mss4a*, -*Mss4b* und -*Mss4c* Ratten auf. Diesen Ergebnissen zufolge müsste das bzw. die Resistenz vermittelnden Gen(e) einerseits auf dem *Mss4d* Insert und andererseits im minimalen Überlappungsbereich aller kongenen und subkongenen Fragmente liegen. Somit wurde der *Mss4* Locus von ursprünglich ca. 20 Mb (90,9 - 111,2 Mb) auf einen Bereich von ca. 1 Mb (98,8 - 99,7 Mb; RGSC v3.4) und 15 positionelle Kandidatengene eingegrenzt.

5.2 Geschlechtsspezifische Effekte der kongenen und subkongenen BDIV Fragmente *Mss4a*, *Mss4b* und *Mss4d*

Die geschlechtsgetrennte Kaplan Meier Analyse der Überlebenszeiten der kongenen und subkongenen Stämme zeigte, dass der im BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm beobachtete geschlechtsspezifische Effekt im BDIX.BDIV-*Mss4b* Stamm nahezu vollständig verloren gegangen war. Es ließ sich eine leichte Tendenz zugunsten einer größeren Resistenz der weiblichen BDIX.BDIV-*Mss4b* Tiere erkennen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Eine ähnliche Beobachtung konnte in einem Rattenmodell für die Kollagen-induzierte Arthritis gemacht werden. Im kongenen DA.F344-*Cia5* Stamm vermittelten Allele des F344 Stammes männlichen Tieren einen leichten, aber nicht statistisch signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu weiblichen Ratten. Es zeigte sich, dass der *Cia5* Locus aus zwei Subloci besteht, welche entgegengesetzte geschlechtsspezifische Effekte vermittelten (Joe, Remmers et al. 2000). Wir konnten im Rahmen der GWAS einen überwiegend männchenspezifisch tumorprotektiven Locus, zentromerisch (*D6Rat132* bei 52,7 Mb) des *Mss4* Locus gelegen, identifizieren (Koelsch, Fischer et al. 2006). Da das *Mss4b* Fragment sowohl den *Mss4* als auch diesen männchenspezifischen Locus umfasste, könnte die zeitgleiche Ausprägung ihrer Einzeleffekte eine Abschwächung der Geschlechtspräferenz im BDIX.BDIV-*Mss4b* Stamm verursacht haben. Ähnlich wie das *Mss4b* Fragment vermittelte auch das subkongene *Mss4d* Fragment Tumorresistenz

unabhängig vom Geschlecht. Im Modell der Squalen-induzierten Arthritis wurde ein weibchenspezifischer Effekt des *Oia3* Intervalls beobachtet, der auf den Effekt des subkongenen *Oia3c* Fragments zurückgeführt werden konnte. Eine Aufhebung des geschlechtsspezifischen Effekts des Locus wurde bei einer Verlängerung des *Oia3c* Fragments beobachtet, die auf die Existenz eines weiteren risikomodifizierenden Gens zurückgeführt wurde (Holm, Xu et al. 2001). Möglicherweise enthält auch der *Mss4* Locus mehrere Gene, deren Interaktion zur Ausprägung des geschlechtsspezifischen Tumorresistenzeffekts des Locus führt. Im *Mss4d* Fragment könnte nur ein Gen der BDIV Ratte lokalisiert sein, das Tumorresistenz vermittelt, während das *Mss4a* Fragment ein zusätzliches, geschlechtsspezifisch agierendes Gen der BDIV Ratte tragen könnte.

Das BDIV Allel des *Esr2* Gens, das den Transkriptionsfaktor Östrogenrezeptor Beta kodiert, war in allen untersuchten kongenen und subkongenen Stämmen vorhanden. Im telomerischen Bereich des Tumorresistenzhaplotyps, der lediglich im BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm von BDIV Allelen abgedeckt war, konnte das *Med6* Gen bzw. dessen Genprodukt als möglicher Cofaktor des Östrogenrezeptor Beta identifiziert werden (105,432,911 bis 105,446,503 Mb; RGSC v3.4; Kang, Guermah et al. 2002). Möglicherweise könnte lediglich die Interaktion der BDIV Varianten der *Esr2* und *Med6* Genprodukte zur Ausprägung der Geschlechtspräferenz des *Mss4* Locus führen. Da im BDIX.BDIV-*Mss4d* Stamm das *Med6* Gen der BDIX Ratte vorlag, könnte eine Aktivierung geschlechtsspezifischer Signalwege unterblieben sein. Ähnliches wurde für die Interaktion der *Foxa1* und *Foxa* Transkriptionsfaktoren mit dem Östrogenrezeptor Alpha bzw. dem Androgenrezeptor, welche zur Regulation der Transkription hormonsensitiver Gene in weiblichen bzw. männlichen Mäusen führten, beobachtet. Eine fehlende Interaktion dieser Faktoren mit den Hormonrezeptoren verursachte sogar eine Reversion des bis dahin männchenspezifischen Leberkrebsrisikos (Li, Tuteja et al. 2012). Eine Beeinflussbarkeit des MPNST Risikos durch Östrogen zeigte u.a. durch die Ovariectomie weiblicher zuvor tumorresistenter (WF x LE)_{F1} Ratten. Der dadurch erzeugte Östrogenmangel führte zu einer signifikanten Steigerung der Tumorzinzidenz. Die Tumorzinzidenz konnte durch eine Substitution von Östrogen erneut gesenkt werden (Aoyama, Naito et al. 1989). In einem Xenograftmodell, in dem Schwann Zellen humaner MPNSTs in den Ischiasnerv immunkompromittierter weiblicher Mäuse injiziert wurden, zeigte sich ebenfalls ein vermehrtes MPNST Wachstums nach Östrogen- oder Progesterongabe (Li, Zhang et al. 2010). Diesen Daten zufolge ist eine Beteiligung von Genen, welche an der östrogenabhängigen Transkriptionsregulation von Zielgenen und damit einer Bildung der Geschlechtsspezifität des *Mss4* Locus als wahrscheinlich einzustufen. Durch den relativen „Östrogenmangel“ der Männchen könnte die Aktivierung hormonabhängiger, potentiell tumorprotektiver Signalwege unterbleiben und die höhere Tumorzinzidenz in männlichen Ratten verursachen. In einer früheren Studie konnte

festgestellt werden, dass das kongene *Mss4a* Fragment genomweit die Expression von 159 Genen reguliert. Diese Gene werden in männlichen BDIX Ratte höher exprimiert als in weiblichen, während diese Gene im kongenen Stamm eine ähnliche Expressionsstärke wie in weiblichen BDIV Ratten aufweisen. Diese „Feminisierung“ der Genregulation könnte ebenfalls auf die Existenz eines geschlechtsspezifischen Masterregulatorgens im *Mss4* Locus hinweisen (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011).

5.3 Identifizierung potentiell bedeutsamer Kandidatengene im Hinblick auf den geschlechtsspezifischen Tumoresistenz-Effekt des *Mss4* Locus

Um die Gene zu identifizieren, die dem geschlechtsspezifischen Tumoresistenzeffekt des *Mss4* Locus zugrunde liegen, wurden die 15 positionellen Kandidatengene zunächst sequenziert. Da BDIX und BDIV Ratten eine stark unterschiedliche Sensitivität gegenüber ENU-induzierten MPNSTs aufweisen, wurden solche Gene als vielversprechend eingestuft, die Sequenzunterschiede zwischen den Stämmen tragen. Diese SNPs könnten, sofern sie in regulatorischen Elementen liegen, z.B. eine differentielle Genexpression zwischen den Stämmen hervorrufen. SNPs im proteinkodierenden Bereich könnten strukturelle Unterschiede in dem korrespondierenden Protein verursachen, die Einfluss auf dessen Funktion nehmen könnten. Entsprechende molekulare Unterschiede könnten anteilig für das unterschiedliche Tumorrisiko der BDIX bzw. BDIV Ratten verantwortlich sein.

In 12 von 15 Kandidatengenen konnten SNPs in proteinkodierenden und/oder mutmaßlich regulatorischen Bereichen identifiziert werden. Anschließend wurde die mRNA Expression dieser Gene in den Trigeminiernerven von 85 Tage alten BDIX und BDIV Ratten beider Geschlechter untersucht. Da Suszeptibilitätsgene im Unterschied zu Tumorsuppressorgenen jedoch nicht zwingend im Ursprungsgewebe des Tumors exprimiert werden müssen, um Einfluss auf die Tumorigenese zu nehmen, stellten diese Expressionsanalysen nur einen ersten Anhaltspunkt in Bezug auf einen möglicherweise stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Expressionsunterschied dar. Weitere Organe, die im Hinblick auf die Expression systemisch wirkender risikomodifizierender Gene von Interesse wären, sind die Organe des Immunsystems, aber z.B. auch die endokrinen Drüsen. Ferner ist unbekannt, zu welchem Zeitpunkt das oder die Gene exprimiert werden müssen, um die Tumorigenese zu beeinflussen. Der Tag 85 wurde als Startpunkt der Analysen gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Eliminierung präaligner Schwann Zellen in den Trigeminiernerven der BDIV Ratten beginnt (Kindler-Rohrborn, Kind et al. 2000). Ferner wurden alle Expressionsanalysen an unbehandelten Tieren durchgeführt, da im Gegensatz zu Mutationen in

Tumorsuppressorgenen, die entweder das initiale Ereignis in der Tumorigenese darstellen oder im Verlauf der Tumorentwicklung entstehen, Polymorphismen in Suszeptibilitäts- bzw. Resistenzgenen bereits vor Kontakt mit einer karzinogenen Substanz vorliegen und das Risiko an einem Tumor zu erkranken modulieren. Die Mehrzahl der Kandidatengene wies keinen stammspezifischen mRNA Expressionsunterschied in den Trigeminiernerven auf. Ferner konnte für keines der Gene eine geschlechtsspezifische Expression nachgewiesen werden.

Das Gen *Gpx2* wies 2 SNPs im Promotor auf, die u.a. die Bindung der Transkriptionsfaktoren Nrf2, Gata-x, C/epb-alpha und -beta beeinflussen könnten, und zeigte den stärksten stammspezifischen Expressionsunterschied in den Trigeminiernerven. Aufgrund dieser Daten und der Annotation wurde *Gpx2* als vielversprechendster Kandidat im Hinblick auf den Tumoresistenzeffekt des *Mss4* Locus erachtet.

Einen weiteren besonders interessanten Kandidaten für die Vermittlung des geschlechtsspezifischen Effekts des *Mss4* Locus stellte das *Esr2* Gen dar. *Esr2* wurde zwar nicht auf mRNA Ebene, aber bereits auf Proteinebene in Trigeminiernerven nachgewiesen (Winzen 2007). Dieses Gen kodiert den Östrogenrezeptor Beta, welcher östrogenabhängig die Expression von Genen, möglicherweise auch in den Trigeminiernerven oder den Zellen des Immunsystems, reguliert und somit den geschlechtsspezifischen Masterregulator im *Mss4* Locus darstellen könnte.

5.3.1 Glutathionperoxidase 2 (*Gpx2*)

Während physiologischer und pathologischer Vorgänge in der Zelle können DNA schädigende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. *Gpx2* vermittelt einen zytoprotektiven Effekt, indem es die Reduktion dieser ROS katalysiert und dadurch eine Schädigung verhindert. In Mammakarzinomen von Menschen und Ratten steht eine hohe *Gpx2* Expression mit der Tumorprogression in Zusammenhang (Naiki-Ito, Asamoto et al. 2007). Ferner wurde in mehreren Nagernmodellen bereits ein Zusammenhang zwischen der *Gpx2* Expression und der Resistenz gegenüber der Entstehung von Tumoren des Gastrointestinaltrakts hergestellt (Chu, Esworthy et al. 2004; Florian, Krehl et al. 2010; Brigelius-Flohe und Kipp 2012).

Wie bereits erwähnt wies das *Gpx2* Gen zwischen BDIX und BDIV Ratten zwei SNPs im Promotor auf. Der Polymorphismus 15 bp vor Transkriptionsstart lag an einer kritischen Stelle des sog. ARE (*antioxidant response element*) Motivs (99,376,235 bis 99,376,244 bp; RNO 6), das als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Nrf2, der als Antwort auf oxidativen Stress die Transkription zytoprotektiver Gene reguliert, fungiert (Brigelius-Flohe 2006; Singh, Rangasamy et al. 2006; Malhotra, Portales-Casamar et al. 2010). Die höhere mRNA

Expression von *Gpx2* in den Trigeminiernerven der tumorresistenten BDIV Ratten könnte auf den höheren Bindungskoeffizienten von Nrf2 bei Vorliegen des BDIV Allels zurückzuführen sein. Im kongenen BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm konnte eine BDIV ähnliche Expressionsstärke von *Gpx2* beobachtet werden (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011). Dies wies auf eine *cis*-Regulation der Genexpression durch den BDIV Promotor im kongenen Stamm hin, somit könnte *Gpx2* ursächlich an der relativen Tumorresistenz der kongenen Ratten beteiligt sein. Anders als erwartet, konnte auf der Proteinebene keine eindeutige Expression von *Gpx2* in den Trigeminiernerven unbehandelter BDIX und BDIV Tiere nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass als Folge der ENU Exposition eine Einwanderung von Mastzellen in die Trigeminiernerven stattfand, die eine starke *Gpx2* Expression aufwies. Die *Gpx2* Expression in Mastzellen schien ein allgemeines Phänomen darzustellen, da ebenfalls die in Lymphknoten, im Thymus und im Peritoneum befindlichen Mastzellen *Gpx2* exprimierten. Eine Quantifizierung der *Gpx2* Expression wurde an Mastzellen aus dem Peritonealexsudat weiblicher und männlicher BDIX und BDIV Ratten mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Diese Analysen konnten unabhängig vom Geschlecht erstmals eine ca. 1,4-fach höhere *Gpx2* Expression in peritonealen Mastzellen adulter BDIV im Vergleich zu BDIX Ratten zeigen. Somit könnte die Beobachtung, dass *Gpx2* exprimierende Mastzellen nach ENU-Exposition in die Trigeminiernerven einwandern, wohlmöglich mit dem Tumorresistenzeffekt des *Mss4* Locus in Zusammenhang stehen.

5.3.2 Östrogenrezeptor Beta (*Esr2*)

In der sog. klassischen Signalkaskade dimerisieren Erβ Moleküle nach Ligandenbindung und translozieren in den Nukleus, binden mit ihrer DNA bindenden Domäne (DBD) an ein ERE (*estrogen responsive element*) im Promotor eines östrogensensitiven Zielgens und aktivieren dessen Transkription. Er kann jedoch auch unabhängig von EREs Einfluss auf die Transkription von Zielgenen nehmen, indem er nach Ligandenbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert (Acconcia und Marino 2011; Zhao, Dahlman-Wright et al. 2010; Bjornstrom und Sjoberg 2005; Marino, Galluzzo et al. 2006). In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass der Östrogenrezeptor Beta Einfluss auf die Tumorentstehung nehmen kann. Beispielsweise wurde gezeigt, dass dieser inhibitorisch auf die Proliferation von Brustkrebszellen wirkt (Paruthiyil, Parmar et al. 2004). Somit könnte der Erβ einen Masterregulator darstellen, der die Expression einer Reihe von Genen geschlechtsspezifisch reguliert (Koelsch, Winzen-Reichert et al. 2011).

In früheren Experimenten konnte bereits eine deutliche Expression von Erβ sowohl in Trigeminiernerven von weiblichen und männlichen BDIX und BDIV Ratten als auch in

MPNSTs von weiblichen und männlichen BDIX, F₁ und F₂ Ratten nach ENU-Exposition nachgewiesen werden (Winzen 2007). Um die Rolle des *Esr2* Gens für den Tumoresistenzmechanismus der BDIV Ratten weiter zu analysieren, wurden nachfolgend mRNA Expressionsanalysen in Trigeminiernerven von *Esr2* Knockout Mäusen, den sog. β erKO Mäusen, im Vergleich zu Wildtypmäusen durchgeführt, da erst seit kurzem die KO-Technologie auch für Ratten zur Verfügung steht. Diese Untersuchungen sollten Hinweise auf Signalwege geben, die im peripheren Nervensystem durch *Esr2* reguliert werden und für die Neuro-Onkogenese eine Rolle spielen könnten (Winzen 2007). Im Verlauf von Proteinexpressionsanalysen wurde jedoch mittels Western Blot Analysen auch in den β erKO Mäusen ein Protein mit der molekularen Größe des Vollängen Er β detektiert.

In der vorliegenden Dissertation wurde daher analysiert, ob in der β erKO Maus Transkripte erzeugt werden, die eine Er β Variante mit einem dem Vollängen Er β ähnlichen molekularen Gewicht kodieren könnten. Anhand dieser Daten sollten Rückschlüsse auf die Vertrauenswürdigkeit der bisher erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Er β Expression in den Trigeminiernerven von Ratten der BDIX und BDIV Stämme gezogen werden können.

Der *Esr2* Knockout war erzeugt worden, indem die sog. Neokassette in Exon 3, das für die DBD kodiert, integriert wurde. Dies führte zu einem Frameshift und Erzeugung eines frühzeitigen Stoppcodons in Exon 4. Den Herstellern der KO Maus zufolge sollte in diesen Tieren folglich kein oder lediglich ein stark verkürztes Er β Protein gebildet werden (Krege, Hodgkin et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch mit Hilfe von PCR Analysen in der β erKO Maus *Esr2* Transkripte detektiert werden, die mindestens Teile der Exons 2, 3, 5 und 6 enthielten. Da das *Esr2* Transkript in mehreren Spleißvarianten auftreten kann (Shupnik 2002), ist nicht auszuschließen, dass durch die Integration der Neokassette die Bildung von Spleißvarianten ohne das Exon 3 provoziert wurde, wodurch es letztlich nicht zur Erzeugung des frühzeitigen Stoppcodons käme. Der Verlust von Exon 3 wäre nur schwer mittels Western Blot Analysen nachzuweisen, da dies einem Verlust von 0,4 kDa im Vergleich zum Vollängenprotein entsprechen würde. Da die kommerziell erhältlichen Antikörper darüber hinaus zumeist entweder im C- oder N-Terminus binden, könnte keine Unterscheidung des intakten Er β und einer Spleißvariante auf Proteinebene erfolgen.

Anhand dieser Daten schienen die zuvor in den BD Ratten erzeugten Ergebnisse weiterhin Gültigkeit zu besitzen, da das im Gewebe der β erKO Mäuse detektierte Protein tatsächlich eine um wenige kDa kleinere Er β Spleißvariante darstellen könnte und somit eine unspezifische Bindung der Er β Antikörper unwahrscheinlich erscheint.

5.4 Charakterisierung der zellulären Vorgänge in Trigeminiernerven ENU-behandelter BDIX.BDIV-Mss4d Ratten

Als das initiale Ereignis in der Entstehung von ENU-induzierten malignen peripheren Nervenscheidentumoren in den Stämmen BDIX und BDIV gilt die Transversionsmutation an Position 2012 im *Neu/ErbB2* Gen. Diese Mutation wurde auch in den Trigeminiernerven und MPNSTs ENU behandelter BDIX.BDIV-Mss4d Ratten nachgewiesen (Nikitin, Ballering et al. 1991; unveröffentlichte eigene Daten). Der niedrig affine Nervenwachstumsfaktorrezeptor (Ngfr) stellt einen guten Marker für *Neu/ErbB2* mutierte Schwann Zellen dar, die ein hohes Potential zur malignen Entartung aufweisen (unveröffentlichte eigene Daten). In ca. 60 % der morphologisch prämaligen Schwann Zellen weiblicher und männlicher BDIX.BDIV-Mss4d Ratten konnte eine im Vergleich zu morphologisch normalen Schwann Zellen vermehrte Expression des Ngfr detektiert werden. In einem MPNST eines kongenen Männchens zeigte sich eine starke Ngfr Expression, wie dies auch für MPNSTs von BDIX Ratten charakteristisch ist (unveröffentlichte eigene Daten). In humanen Schwannomen des *Nervus vestibulocochlearis* und in Gliomen verursachte eine Ngfr Überexpression eine Inhibition der Apoptose und Steigerung der Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (Bonetti, Panzeri et al. 1997; Johnston, Lun et al. 2007; Yue, Woodson et al. 2010).

In den Trigeminiernerven von lediglich zwei BDIX.BDIV-Mss4d Ratten konnte eine Cyclin D1 Expression, die mit dem proliferativen Potential der Zellen korreliert, in morphologisch prämaligen Schwann Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Trigeminiernerven unbehandelter Tiere wiesen MPNSTs eine starke Cyclin D1 Expression auf (Koelsch, van den Berg et al. 2013). Die *Neu/ErbB2* Mutation, welche zu einer konstitutiven Aktivierung des *ErbB2* Signalweges in Schwann Zellen führt, könnte eine Cyclin D1 Deregulation nach sich ziehen (Rahmatullah, Schroering et al. 1998; Muraoka, Lenferink et al. 2002; Nahta, Iglehart et al. 2002). Da Cyclin D1 an der Kontrolle der G1/S-Transition im Verlauf des Zellzyklus beteiligt ist, könnte dessen Deregulation die Tumorzellproliferation fördern (Fu, Wang et al. 2004). In einem Mausmodell zur *ErbB2* vermittelten Mammakarzinogenese konnte beobachtet werden, dass eine Defizienz von Cyclin D1 sogar mit einer Resistenz gegenüber Brustkrebs einherging (Yu, Geng et al. 2001). Eine Deregulation von Cyclin D1 könnte demnach einen kritischen, der *Neu/ErbB2* Mutation nachgeschalteten, Schritt in der ENU-induzierten Neuro-Onkogenese darstellen.

Im BDIX Stamm persistieren nach Exposition gegenüber ENU *Neu/ErbB2* mutierte Schwann Zellen in den Trigeminiernerven und entwickeln sich zu MPNSTs. Im Gegensatz dazu findet eine Eliminierung der prämaligen Schwann Zellen im BDIV Stamm statt. Anhand der vorgestellten Analysen zeigte sich, dass die prämaligen Zellen in den Trigeminiernerven des BDIX.BDIV-Mss4d Stammes ebenfalls persistieren und eine zu den *Neu/ErbB2*

mutierten Schwann Zellen der BDIX Ratten ähnliche Tendenz zur malignen Entartung, jedoch nur ein geringes proliferatives Potential aufzuweisen schienen. Demzufolge schienen die prämaligen Zellen in den Trigeminiernerven der BDIX.BDIV-*Mss4d* Ratten einerseits an einem bestimmten Punkt der Tumorigenese stehen zu bleiben und andererseits nicht durch die Zellen des Immunsystems eliminiert zu werden. Abschließend kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht eindeutig geklärt werden, auf welcher Ebene der *Mss4* Locus seinen geschlechtsspezifischen Tumorresistenzeffekt ausübt.

Abstract

Cancer, one of the leading causes of death world wide, frequently exhibits a marked sex preference with respect of incidence, course of disease and survival time. The development of malignant tumors is determined by exogenic factors as well as risk modifying gene variants. The specific causes of cancers and of their sex preference are mostly unknown. The identification of tumor risk modifying gene variants is an essential prerequisite for the development of efficient prevention measures and curative therapies on the long run. Importantly, in contrast to tumor suppressor genes cancer risk modifying gene variants are not necessarily expressed in the tissue the tumor arises from, but also can act systemically. Inbred rodent models are particularly suitable for the analysis of the genetic basis of tumor susceptibility and resistance, respectively, since these animals are genetically identical and can be maintained under standardized living conditions.

After application of ethylnitrosourea (ENU) on postnatal day 1, BDIX rats develop malignant tumors of the peripheral nervous system with an incidence of > 85 %, arising from *Neu/ErbB2* mutated premalignant Schwann cells in the trigeminal nerves. In MPNST resistant BDIV rats, the premalignant cells are eliminated under the participation of the immune system, thereby preventing tumor development. Genome wide association analyses using ENU-treated segregating crosses of BDIX and BDIV rats identified seven autosomal loci controlling tumor risk in an allele- and sex-specific manner. Homozygous BDIV alleles at the locus *Mss4* on chromosome 6 mediated tumor resistance in female (BDIV x BDIX) F₂ rats. The effect of the locus was confirmed by ENU application to congenic BDIX.BDIV-*Mss4a* rats. This strain carries BDIV alleles exclusively in the telomeric 60 % of the tumor resistance haplotype, which was previously identified in the F₂ generation.

This dissertation included fine mapping of the *Mss4* locus originally spanning 20 Mb to approximately 1.1 Mb by exposing three additional congenic and subcongenic rat strains, carrying BDIV alleles in different segments of the tumor resistance haplotype, to ENU and subsequently analyzing their tumor incidences and survival times. The fine mapped *Mss4* interval comprised 15 positional candidate genes. Comparative sequencing of protein coding and regulatory portions of the candidate genes in BDIX and BDIV rats, transcriptional analyses in the trigeminal nerves and functional information were used to prioritize candidate genes with respect to their potential relevance for the sex-specific tumor risk.

Gpx2, encoding glutathione peroxidase 2, has been associated with resistance towards tumor initiation repeatedly, and therefore represented a particularly interesting candidate gene. However the trigeminal nerves of the parental as well as of the (sub)congenic rat strains did not unequivocally express Gpx2 protein. However, an invasion of Gpx2 expressing mast cells in the trigeminal nerves of ENU-exposed BDIX and BDIV rats could be

noticed. Notably peritoneal BDIV mast cells expressed *Gpx2* to a higher extent than BDIX mast cells.

The *Esr2* gene encodes the estrogen receptor beta. While in congenic strains each BDIV insert mediated tumor resistance to a similar degree, only the *Mss4a* fragment mediated a sex-specific effect. In contrast to the *Mss4c* and *Mss4d* fragments, it covers the telomeric third of the tumor resistance haplotype which might contain the BDIV variant of a cofactor of *Esr2*. The *Med6* gene constitutes an interesting functional and positional candidate, the BDIV allele of which might interact with *Esr2* to mediate the sex preference of MPNST development by inducing a sex biased regulation of gene expression in trigeminal nerves.

Ausblick

Zur weiteren Eingrenzung der potentiell bedeutsamen Gene für den geschlechtsspezifischen Tumorresistenzeffekt des *Mss4* Locus sollten zunächst weitere kongene und subkongene Rattenstämme gezüchtet und mit ENU behandelt werden. Optimalerweise würde man am Ende einer solchen weiteren Feinkartierung die dem Effekt des Locus zugrunde liegenden Gene identifizieren können.

Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob der Verlust der Geschlechtsspezifität in BDIX.BDIV-*Mss4d* Ratten im Zusammenhang mit dem *Med6* Gen steht. Dazu könnte ein subkongener Stamm gezüchtet werden, dessen BDIV Allele sowohl den feinkartierten *Mss4* Locus als auch den das *Med6* Gen tragenden Bereich umfassen. Sollte der geschlechtsspezifische Effekt dieses Stammes vergleichbar zu dem des BDIX.BDIV-*Mss4a* Stammes sein, wäre dies ein Hinweis auf eine notwendige Interaktion *Esr2* und *Med6* Genprodukte.

Da mittlerweile die KO-Technologie auch in Ratten zur Verfügung steht, können Tiere mit einem KO in einem besonders vielversprechenden Kandidatengens erzeugt werden und dessen Effekt auf das MPNST Risiko analysiert werden.

Die Bedeutung der Sexualhormone Östrogen und Testosteron für die Resistenz bzw. Suszeptibilität gegenüber MPNSTs könnte über Kastrationsversuche analysiert werden. Vergleichbar mit den Experimenten von Aoyama et al. sollten zu diesem Zweck Hoden bzw. Eierstöcke männlicher bzw. weiblicher ENU-behandelter BDIX und BDIV Ratten entfernt und die Tumorinzidenz und Überlebenszeit dieser Ratten untersucht werden. In einer weiteren Tiergruppe könnte Östrogen bzw. Testosteron z.B. in Form von hormonhaltigen Implantaten supplementiert werden. Somit ließe sich der direkte Einfluss der Sexualhormone auf die MPNST-Entstehung analysieren.

Transplantationsversuche können Aufschluss darüber geben, ob die Tumorresistenz-vermittelnden Gene des *Mss4* Locus in den Trigeminierven exprimiert werden oder in anderen Geweben bzw. Zelltypen (Smits, Sharma et al. 2011). Dazu könnten z.B. die Trigeminierven ENU-behandelter BDIX oder BDIV Ratten auf ENU-behandelte BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten subkutan transplantiert werden (Svenberg, Clendendon et al. 1975). Sollten in diesem Fall lediglich MPNSTs von den BDIX Trigeminierven ausgehen, würden die Resistenz-vermittelnden Gene in dem Ursprungsgewebe des Tumors exprimiert. Durch einen Knockout des *ckit* Gens in Ratten der BDIV und BDIX Stämme könnte eine Mastzelldefizienz erreicht werden. Die ENU-Behandlung dieser Tiere und nachfolgend die Analyse der Tumorinzidenz und Überlebenszeit könnte die Bedeutung der Mastzellen für den Tumorresistenzeffekt der BDIV Ratten aufklären (Wasiuk, Dalton et al. 2012).

Literaturverzeichnis

- Aarnio, M., J. P. Mecklin, et al. (1995). "Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome." *Int J Cancer* **64**(6): 430-3.
- Acconcia, F. und M. Marino (2011) "The Effects of 17beta-estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane." *Front Physiol* **2**: 30.
- Amos, C.I., X. Wu et al. (2008). "Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25." *Nat Genet* **40**: 616-22.
- Aoyama, H., M. Naito, et al. (1989). "Effects of sex difference, gonadectomy and estradiol on N-ethyl-N-nitrosourea-induced trigeminal nerve tumors in rats." *Carcinogenesis* **10**(8): 1505-9.
- Arnold, A.P., X. Chen et al. (2012). "What a difference an X or Y makes: sex chromosomes, gene dose, and epigenetics in sexual differentiation." *Handb Exp Pharmacol* **214**: 67-88.
- Beranek, D. T. (1990). "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents." *Mutat Res* **231**(1): 11-30.
- Bjornstrom, L. und M. Sjoberg (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." *Mol Endocrinol* **19**(4): 833-42.
- Bond, G.L., K.M. Hirshfield et al. (2006). "MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner." *Cancer Res* **66**(10): 5104-10.
- Bonetti, B., L. Panzeri, et al. (1997). "Human neoplastic Schwann cells: changes in the expression of Neurotrophins and their low-affinity receptor p75." *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**(5): 380-6.
- Bosch, F. X., J. Ribes, et al. (2004). "Primary liver cancer: worldwide incidence and trends." *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S5-S16.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). "Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors." *Biol Chem* **387**(10-11): 1329-35.
- Brigelius-Flohe, R. und A. P. Kipp (2012). "Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **1259**: 19-25.
- Chang, B.L., S.D. Cramer et al. (2009). "Fine mapping association study and functional analysis implicate a SNP in MSMB at 10q11 as a causal variant for prostate cancer risk." *Hum Mol Genet* **18**(7):1268-75
- Chu, F. F., R. S. Esworthy, et al. (2004). "Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes." *Cancer Res* **64**(3): 962-8.
- Cook, M. B., S. M. Dawsey, et al. (2009). "Sex disparities in cancer incidence by period and age." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(4): 1174-82.
- Danaei, G., S. Vander Hoorn, et al. (2005). "Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors." *Lancet* **366**(9499): 1784-93.
- Davydov, I. V., P. H. Krammer, et al. (1995). "Nuclear factor-IL6 activates the human IL-4 promoter in T cells." *J Immunol* **155**(11): 5273-9.
- Dean, M. (1998). "Cancer as a complex developmental disorder--nineteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture." *Cancer Res* **58**(24): 5633-6.
- Dragani, T. A. (2003). "10 years of mouse cancer modifier loci: human relevance." *Cancer Res* **63**(12): 3011-8.
- Druckrey, H. (1971). "Genotypes and phenotypes of ten inbred strains of BD-rats." *Arzneimittelforschung* **21**(8): 1274-8.
- Druckrey, H., B. Schagen, et al. (1970). "[Induction of neurogenic malignancies by one single dose of ethyl-nitrosourea (ENU) given to newborn and juvenile BD IX-strain rats]." *Z Krebsforsch* **74**(2): 141-61.
- Easton D.F., und R.A. Eeles (2008). "Genome-wide association studies in cancer." *Hum Mol Genet* **17**(2): 109-115.
- Ellegren, H. und J. Parsch (2007). "The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression." *Nat Rev Genet* **8**(9): 689-98.

- Fearon, E. R. (1997). "Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer." Science **278**(5340): 1043-50.
- Federman D.D. (2010). "The Biology of human sex differences." N Engl J Med **354**: 1507-14.
- Fijneman, R. J. (2005). "Genetic predisposition to sporadic cancer: how to handle major effects of minor genes?" Cell Oncol **27**(5-6): 281-92.
- Flint, J. und T. F. Mackay (2009). "Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans." Genome Res **19**(5): 723-33.
- Florian, S., S. Krehl, et al. (2010). "Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice." Free Radic Biol Med **49**(11): 1694-702.
- Frank, S. A. (2004). "Genetic predisposition to cancer - insights from population genetics." Nat Rev Genet **5**(10): 764-72.
- Fu, M., C. Wang, et al. (2004). "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology **145**(12): 5439-47.
- Gering, K. M., J. A. Marx, et al. (2006). "The interaction mode of premalignant Schwann and immune effector cells during chemically induced carcinogenesis in the rat peripheral nervous system is strongly influenced by genetic background." Cancer Res **66**(9): 4708-14.
- Goth, R. und M. F. Rajewsky (1974). "Persistence of O6-ethylguanine in rat-brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(3): 639-43.
- Greenwel, P., S. Tanaka, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins." Mol Cell Biol **20**(3): 912-8.
- Haqq, C.M. und P.K. Donahoe (1998). "Regulation of sexual dimorphisms in mammals." Physiol Rev **78**(1): 1-33.
- Hodgson, S. (2008). "Mechanisms of inherited cancer susceptibility." J Zhejiang Univ Sci B **9**(1): 1-4.
- Holm, B. C., H. W. Xu, et al. (2001). "Rats made congenic for Oia3 on chromosome 10 become susceptible to squalene-induced arthritis." Hum Mol Genet **10**(6): 565-72.
- Horstmann, M., R. Witthuhn, et al. (2008). "Gender-specific differences in bladder cancer: a retrospective analysis." Gend Med **5**(4): 385-94.
- Houlston, R. S. und I. P. Tomlinson (2000). "Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead." J Med Genet **37**(3): 161-7.
- Huxley, R. R., A. Ansary-Moghaddam, et al. (2009). "The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence." Int J Cancer **125**(1): 171-80.
- Isensee, J. und P. Ruiz Noppinger (2007). "Sexually dimorphic gene expression in mammalian somatic tissue." Gend Med **4 Suppl B**: S75-95.
- Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Joe, B., E. F. Remmers, et al. (2000). "Genetic dissection of collagen-induced arthritis in Chromosome 10 quantitative trait locus speed congenic rats: evidence for more than one regulatory locus and sex influences." Immunogenetics **51**(11): 930-44.
- Johnston, A. L., X. Lun, et al. (2007). "The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion." PLoS Biol **5**(8): e212.
- Kanavos, P. (2006). "The rising burden of cancer in the developing world." Ann Oncol **17 Suppl 8**: viii15-viii23.
- Kang, Y. K., M. Guermah, et al. (2002). "The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2642-7.
- Karahalil, B., E. Emerce, et al. (2008). "The association of OGG1 Ser326Cys polymorphism and urinary 8-OHdG levels with lung cancer susceptibility: a hospital-based case-control study in Turkey." Arh Hig Rada Toksikol **59**(4): 241-50.
- Kindler-Rohrborn, A., A. B. Kind, et al. (2000). "Suppression of ethylnitrosourea-induced schwannoma development involves elimination of Neu/ErbB-2 mutant premalignant cells in the resistant BDIV rat strain." Cancer Res **60**(17): 4756-60.

- Kindler-Rohrborn, A., B. U. Kolsch, et al. (1999). "EthylNitrosourea-induced development of malignant schwannomas in the rat: two distinct loci on chromosome of 10 involved in tumor susceptibility and oncogenesis." Cancer Res **59**(5): 1109-14.
- Kirsch-Volders, M., S. Bonassi, et al. (2010). "Gender-related differences in response to mutagens and carcinogens." Mutagenesis **25**(3): 213-21.
- Kleihues, P., M. F. Rajewsky, et al. (1984). "Chemical neuro-oncogenesis: role of structural DNA modifications, DNA repair and neural target cell populations:" Prog Exp Tumor Res **27**: 1-16.
- Klein, G. (2009). "Toward a genetics of cancer resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(3): 859-63.
- Koelsch, B., L. van den Berg, et al. (2013). "Chemically Induced Rat Schwann Cell Neoplasia as a Model for Early-Stage Human Peripheral Nerve Sheath Tumors: Phenotypic Characteristics and Dysregulated Gene Expression." J Neuropathol Exp Neurol.
- Koelsch, B., B. Winzen-Reichert, et al. (2011). "Sex-biased suppression of chemically induced neural carcinogenesis in congenic BDIX.BDIV-Mss4a rats." Physiol Genomics **43**(10): 631-9.
- Koelsch, B.U., A. Kindler-Röhrborn (2009). "Neurooncogenesis induced by nitroso compounds in rodents and strain-specific genetic modifiers of predisposition." CNS Cancer, Cancer Drug Discovery and Development2009, pp 207-226
- Koelsch, B. U., C. Fischer, et al. (2006). "Gender-specific polygenic control of ethylnitrosourea-induced oncogenesis in the rat peripheral nervous system." Int J Cancer **118**(1): 108-14.
- Kohno T., J. Yokota (2002). "Genetic factors involved in cancer susceptibility." Gan To Kagaku Ryoho **29**(7):1255-62.
- Krege, J. H., J. B. Hodgkin, et al. (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15677-82.
- Kubik, A., P. Zatloukal, et al. (2008). "A case-control study of lifestyle and lung cancer associations by histological types." Neoplasma **55**(3): 192-9.
- Li, H., X. Zhang, et al. (2010). "Analysis of steroid hormone effects on xenografted human NF1 tumor schwann cells." Cancer Biol Ther **10**(8): 758-64.
- Li, Z., G. Tuteja, et al. (2012). "Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer." Cell **148**(1-2): 72-83.
- Liu, L. Y., M. A. Schaub, et al. (2012). "Sex differences in disease risk from reported genome-wide association study findings." Hum Genet **131**(3): 353-64.
- Luzzatto, L. (2011). "Somatic mutations in cancer development." Environ Health **10 Suppl 1**: S12.
- Malhotra, D., E. Portales-Casamar, et al. (2010). "Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis." Nucleic Acids Res **38**(17): 5718-34.
- Malkin, D., F. P. Li, et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science **250**(4985): 1233-8.
- Manolio, T. A., F. S. Collins, et al. (2009). "Finding the missing heritability of complex diseases." Nature **461**(7265): 747-53.
- Marino, M., P. Galluzzo, et al. (2006). "Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription." Curr Genomics **7**(8): 497-508.
- Marx, J. A., A. J. Rohrborn, et al. (2009). "Ablation of T cell immunity differentially influences tumor risk in inbred BD rat strains." Cancer Immunol Immunother **58**(8): 1287-95.
- Muraoka, R. S., A. E. Lenferink, et al. (2002). "ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells." Mol Cell Biol **22**(7): 2204-19.
- Nadeau, J. H. (2001). "Modifier genes in mice and humans." Nat Rev Genet **2**(3): 165-74.
- Nahta, R., J. D. Iglehart, et al. (2002). "Rate-limiting effects of Cyclin D1 in transformation by ErbB2 predicts synergy between herceptin and flavopiridol." Cancer Res **62**(8): 2267-71.

- Naiki-Ito, A., M. Asamoto, et al. (2007). "Gpx2 is an overexpressed gene in rat breast cancers induced by three different chemical carcinogens." Cancer Res **67**(23): 11353-8.
- Natsuka, S., S. Akira, et al. (1992). "Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6." Blood **79**(2): 460-6.
- Nikitin, A. Y., J. J. Jin, et al. (1996). "Wild type neu transgene counteracts mutant homologue in malignant transformation of rat Schwann cells." Oncogene **12**(6): 1309-17.
- Ober, C., D. A. Loisel, et al. (2008). "Sex-specific genetic architecture of human disease." Nat Rev Genet **9**(12): 911-22.
- Paruthiyil, S., H. Parmar et al. (2004). "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." Cancer Res **64**: 423-28.
- Pearson, T.A. und Manollo T.A. (2008): How to interpret a genome-wide association study. Jama. **299**(11): 1335-44.
- Porter, M. P. und J. L. Stanford (2005). "Obesity and the risk of prostate cancer." Prostate **62**(4): 316-21.
- Quigley, D. und A. Balmain (2009). "Systems genetics analysis of cancer susceptibility: from mouse models to humans." Nat Rev Genet **10**(9): 651-7.
- Rahmatullah, M., A. Schroering, et al. (1998). "Synergistic regulation of Schwann cell proliferation by heregulin and forskolin." Mol Cell Biol **18**(11): 6245-52.
- Rinn, J. L. und M. Snyder (2005). "Sexual dimorphism in mammalian gene expression." Trends Genet **21**(5): 298-305.
- Rosenbaum, M. A. und C. R. McHenry (2009). "Contemporary management of papillary carcinoma of the thyroid gland." Expert Rev Anticancer Ther **9**(3): 317-29.
- Ruffell, D., F. Mourkioti, et al. (2009). "A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(41): 17475-80.
- Samuelson, D. J., S. E. Hesselson, et al. (2007). "Rat Mcs5a is a compound quantitative trait locus with orthologous human loci that associate with breast cancer risk." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6299-304.
- Schafer, K.L. und P.N. Goodfellow (1996). "Sex determination in humans." Bioessays **18**(12): 955-63.
- Shupnik, M. A. (2002). "Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis." J Neuroendocrinol **14**(2): 85-94.
- Singh, A., T. Rangasamy, et al. (2006). "Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(6): 639-50.
- Smits, B. M., D. Sharma, et al. (2011). "The non-protein coding breast cancer susceptibility locus Mcs5a acts in a non-mammary cell-autonomous fashion through the immune system and modulates T-cell homeostasis and functions." Breast Cancer Res **13**(4): R81.
- Sun, T., N. M. Warrington, et al. (2012) "Why does Jack, and not Jill, break his crown? Sex disparity in brain tumors." Biol Sex Differ **3**: 3.
- Swenberg, J.A., N. Clendendon et al. (1975). "Sequential development of ethylnitrosourea induced neurinomas: morphology, biochemistry and transplantability." J Natl Cancer Inst **55**(1): 147-52.
- van de Bunt, M. und A. L. Gloyn (2010). "From genetic association to molecular mechanism." Curr Diab Rep **10**(6): 452-66.
- van Dijk, T. B., B. Baltus, et al. (1999). "A composite C/EBP binding site is essential for the activity of the promoter of the IL-3/IL-5/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c gene." J Immunol **163**(5): 2674-80.
- Wasiuk, A., D. K. Dalton, et al. (2012). "Mast cells impair the development of protective anti-tumor immunity." Cancer Immunol Immunother **61**(12): 2273-82.
- Weiderpass, E. (2010). "Lifestyle and cancer risk." J Prev Med Public Health **43**(6): 459-71.
- Wijchers, P.J. und R.J. Felsenstein (2011). "Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes." Trends Genet **27**(4): 132-40.

- Winzen, Bettina (2007). "Experimentelle Neuroonkogenese in der Ratte: Identifizierung von Risiko-modifizierenden Genen." Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. des Fachbereiches Biologie und Geografie an der Universität Duisburg-Essen.
- Winzen, B., B. Koelsch, et al. (2009). "Genetic basis of sex-specific resistance to neuro-oncogenesis in (BDIX x BDIV) F(2) rats." Mamm Genome **20**(11-12): 741-8.
- WHO, Cancer Fact Sheet N°297, 2013
- Yu, Q., Y. Geng, et al. (2001). "Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation." Nature **411**(6841): 1017-21.
- Yue, W., E. Woodson et al. (2010). "Abstract 4008: p75^{ntr} is overexpressed in vestibular schwannomas and protects cells from apoptosis due to suppressed c-jun n-terminal kinase (JNK) activity." Cancer Res **70**(8): 1
- Zhao, C., K. Dahlman-Wright, et al. (2010) "Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}." J Biol Chem **285**(51): 39575-9.

Anhang 1

Primersequenzen, die zur Amplifizierung proteinkodierender Bereiche der Kandidatengene verwendet wurden.

F = Forward Primer

R = Reverse Primer

Primersequenz (5' - 3')	Primername	Annealing- temperatur	Produkt- Größe
CTGGACGAAGCTGAGTCCTATAC	Fntb-F1	60 °C	748 bp
TGCTATCCATTCCAGCAGTGCCTTC	Fntb-R1		
GAAGCTCCTTCAGTACTTGTACTC	Fntb-F2	60 °C	573 bp
AGCATGGCTCCACTTCCAAAATGC	Fntb-R2		
CAGGAGTACATCCTCATGTGCTG	Fntb-F3	60°C	423 bp
GTGTATTCCAACCCAGAGCTGATG	Fntb-R3		
TCTTTGGTGACAGTCTTCTTGCTG	Mthfd1-F1	60 °C	673 bp
TTGATGAGTTCCAAGCATCCTTTG	Mthfd1-R1		
TGAGAAGGATGTGGACGGGTTGAC	Mthfd1-F2	60 °C	519 bp
TTGTTATACTGAATTGTCCACTTC	Mthfd1-R2		
CAAGGAGAAGGCGAGCTTTATCAC	Mthfd1-F3	60 °C	657 bp
CTGCGGATTTGGATGTCAGAGAAC	Mthfd1-R3		
CTATTGACGCTCGGATATTTTCATG	Mthfd1-F4	60 °C	735 bp
AAGAGGCAGTCCAGCGGTGACCG	Mthfd1-R4		
AGTGCCGGTATTCTGGTCTCCAGC	Mthfd1-F5	60 °C	800 bp
CAGACTTTCAAGACTTCTCTGCAC	Mthfd1-R5		
AGAGACACCGTGGGTCACTACTGC	Tex21-F1.1	60 °C	675 bp
GAAGTCTGGTGGTGGGAATGCTC	Tex21-R1.1		
TTGTTTACTCGGAAGGACCAACTG	Tex21-F2	60 °C	506 bp
CAAATCACTAAGCTGCTTCTGAAG	Tex21-R2		
GGTTAGAGATGTTATTGGATATTG	Tex21-F3	60 °C	540 bp
TAATATAGCTATACTCTGGGAGCTG	Tex21-R3		
ATAGGAGGAATCAGACCTGGTGTG	Akap5-F1	60 °C	706 bp
TCTCATCCGGAGAGCAGAAGATTC	Akap5-R1		
GGTAAGGAGATCCAAGAATCACAC	Akap5-F2	55 °C	733 bp
CTTCCTCTGCTTGACCCACTGTAG	Akap5-R2		
GTCAGGCAGAGGAAGCTACAGTTG	Akap5-F3	55 °C	881 bp
TCCTCTTCCCGTGACCTGGAAATG	Akap5-R3		
ATGAGCGATAACGATGACATCGAG	Max-F1	55 °C	480 bp
TACGTGGCCTCCATCCGCAGTTTC	Max-R1		
GTTTCGTCTTCCGGGTGTCGCTG	Churc1-F1	60 °C	414 bp
TATTAGCCAAACCTTTAGGCCTG	Churc1-R1		
CTCCGGCCGCGATGGCAGAGGCTG	Rab15-F1.1	60 °C	794 bp
AAAGCCCAGACTCCCTGCCTCCAC	Rab15-R1		
AGGATCTCAGAAGAAAATGGACAG	Zbtb25-F.1.1	60 °C	814 bp
GGAGGTGCTGTCTCAGGTTACTTC	Zbtb25-R1		
CTCATCAGAGGTGACTGGCTCCTC	Zbtb25-F2	60 °C	657 bp
GGCATGTGAATCTCTTCCAAGATTG	Zbtb25-R2		
AGAGTGGGGCTTTCTGTGCGACTG	Zbtb1-F1	60 °C	684 bp
CTCTGGTAGGAGTGCCTGTTGGTG	Zbtb1-R1		
GGAGTTTTACCTGTGACAGTTGTG	Zbtb1-F2	60 °C	553 bp
CATCCACGCCGACGGACATCCGAG	Zbtb1-R2		
CGAGCCCGAGGAGCCGTTCTACAG	Zbtb1-F3	60 °C	649 bp
GAAATGTTTCCGTCTGTGATCTCG	Zbtb1-R3		

Fortsetzung: Primersequenzen für die Amplifizierung proteinkodierender Bereiche der Kandidatengene

Primersequenz (5' - 3')	Primername	Annealing- temperatur	Produkt- größe
AAATCTAGTGGTGGAGCATATGTC	Zbtb1-F4	60 °C	590 bp
GTTATAAAATCAGTTCTAAATAGC	Zbtb1-R4		
GCAGTGC GAAGCGACCGTTGGCTC	Hspa2-F1	60 °C	646 bp
CAGGCCATAAGCGATGGCCGCTGC	Hspa2-R1		
CGCAGCGCCAGGCCACCAAGGATG	Hspa2-F2	60 °C	645 bp
TCGGGATTGATGCTCTTGTTTCAGC	Hspa2-R2		
GGCCAGATCCAGGAGATAGTGCTG	Hspa2-F3	60 °C	666 bp
CTTGATGTTGTAGGTATAGGACTC	Hspa2-R3		
GTCTGCTGAGCAAAGACGACATTG	Hspa2-F4	60 °C	556 bp
ACTTTTTATAACTAACTAAGTTG	Hspa2-R4		
ATGCCCGTCTCTACTGCCCTCCAC	Plekhg3-F1	60 °C	707 bp
CAGTTAATGAGCAGTGAAGTGGATC	Plekhg3-R1		
GACGCCATTGACACCATGACGTG	Plekhg3-F2	60 °C	694 bp
ACCGGTCACTGGCCTTCTGCAGC	Plekhg3-R2		
CCACCAGGCACCTGCTCAGGCAGC	Plekhg3-F3	60 °C	711 bp
GGCCAGTGTCCGTGACTGTATCTG	Plekhg3-R3		
CAGCGTGCTCAGCCTGGAGGGCAG	Plekhg3-F4	60 °C	634 bp
GATGAACAGTGGCTCTTGTAGCTC	Plekhg3-R4		
CGTCCATCTTCAGAAATTGCCAAG	Plekhg3-F5	60 °C	659 bp
CCAGGTGAGGTGGTTCTTGGGCTG	Plekhg3-R5		
TCAGGAGCCTGGCACCTCCAAGTC	Plekhg3-F6	60 °C	780 bp
AGAAGAATGGAGAACAGCCTGGTG	Plekhg3-R6		
GCAGGGACTCTTCCATGAAGACTG	Sptb-F1	60 °C	735 bp
TTTAGCTTGTCAAAGTCAATGAG	Sptb-R1		
AGTCAACGTAACCAACTTCACCTC	Sptb-F2	60 °C	771 bp
GTTATCCTGGGTCACCAGGCGCTG	Sptb-R2		
AGGAGCGAGCTCATTCCGGCAGGAG	Sptb-F3	60 °C	829 bp
GAGCTCGTCCTCGAAGGCCTTGTG	Sptb-R3		
GAACAGATCTACTCCTCCCTGGAC	Sptb-F4	60 °C	749 bp
CCATCAATCTGCGCCATCAAGGTC	Sptb-R4		
ACGCTGGAGGATCTGGAGGTTGTG	Sptb-F5	60 °C	665 bp
CCCGGTGGTAATCGTCTTTGTGAG	Sptb-R5		
TCCAGAGGCTGAGCAACTCCTAC	Sptb-F6	60 °C	781 bp
CTTTCTGACACCACATCCGTGAAC	Sptb-R6		
GGCATTATGGCAGAGCTGGCTTC	Sptb-F7	60 °C	757 bp
CGTGTCCCACGAGCTCTGCAGATG	Sptb-R7		
CACGGGTGGAGGATGTGCTACATC	Sptb-F8	60 °C	754 bp
AGCAGATCTGCCACATGTCATTG	Sptb-R8		
CTATCATTGAGCGTCTCATCGATG	Sptb-F9	60 °C	686 bp
GATCTCGTCTGAAGCCTGGTGTG	Sptb-R9		
CTCTTGAAGTATCACCAGGGCATC	Sptb-F10	60 °C	706 bp
GGCTGGCTTCTGGGTTGGAAGGAG	Sptb-R10		
TGGTTTCCTCTTCTTCTCCATG	Gpx2 E2F1	60 °C**	635 bp
GCTGAGCAGCCCTCATTTAGATG	Gpx2 E2R1		
TCCGTCGCTACAGCCGCACCTTC	Gpx2 E2F2	60 °C**	492 bp
AGGGAATAACTCCCCAAAGTTGTC	Gpx2 E2R2		

** PCR auf genomischer Ebene, um die Exonsequenzen zu amplifizieren

Primersequenzen, die für die Amplifizierung regulatorischer Bereiche der Kandidatengene verwendet wurden.

Primersequenz (5' - 3')	Primernamen	Annealing- temperatur	Produkt- Größe
AGACAAGCTCAGGCTTCTCCTAAG	Fntb-G-F1	60 °C	736 bp
CCCGCAAACGCTCCACTCAGAAG	Fntb-G-R1		
CCTGTGTATGTATCACTCACGCTC	Fntb-G-F2	60 °C	737 bp
CAATCTAAGACCCTTCTTCATTC	Fntb-G-R2		
AGTCAGCAGATGGGCTCCTCTCTG	Fntb-G-F3	60 °C	933 bp
TAACAACACCTATACTAAGATCAG	Fntb-G-R3		
ACACAGGCTCTGCAGGAGACTGTC	Mthfd1-G-F1	60 °C	567 bp
AAGCCCATCTAAGCACCTCTCCTG	Mthfd1-G-R1		
GTGAACAGCTTTGAGATGTAGCTG	Mthfd1-G-F2	60 °C	445 bp
CACAAGTGCCTCTTGCTTCTTTAG	Mthfd1-G-R2		
CAATATCATGCTTGTGAAAATGAG	Tex21-G-F1.1	54 °C	497 bp
TATAATTAATGCATGATATAATG	Tex21-G-R1.1		
TCTGTATGTCTTACTTTCTTACAC	Tex21-G-F2.1	60 °C	721 bp
TATCTGAACGGACCTTATAGATTC	Tex21-G-R2.1		
GTCAAGTTTCGTCAGTGCTTATTG	Tex21-G-F3.1	60 °C	683 bp
CTCTAACAAATCAAAGATGGATTC	Tex21-G-R3.1		
TCGAGGGCGATTTACGGTGGGAAC	Akap5-G-F1.1	60 °C	660 bp
AGGAAAAGGGTTAGGCAGCCGGTG	Akap5-G-R1		
GGCCAGCTTTGTCTACAGAGCGAG	Akap5-G-F2	60 °C	765 bp
GAATCGTATGCAAGGAATCTTAAG	Akap5-G-R2		
TGGGCCTCCATTAACGCCTTGTG	Akap5-G-F3	60 °C	776 bp
GTTCTCTGTGTGGCCACTGTAG	Akap5-G-R3		
CCAGGCAGACAAAAGTGTACTAAG	Akap5-G-F4-1	60 °C	738 bp
TGCCTGAGCAACTATAGCTTCCTC	Akap5-G-R4		
CAGAGGAAGCCACAGTGGATCAAG	Akap5-G-F5.2	GC rich 60 °C	670 bp
TGAGATAGAAGTGCCACAAATGTG	Akap5-G-R5.1		
TGTGCACAGAGAATGATAAGAATC	Churc1-G-F1	60 °C	644 bp
CCGCTGACGTCAGTCACCAAGGAG	Churc1-G-R1		
TGGAGCAGTGGTTTATAAAGCGTC	Churc1-G-F2	60 °C	338 bp
GACTTTAGCAGAGCAACTCAACTC	Churc1-G-R2		
TGGCTGAGAGCCCTGGCCGCTGTC	Max-G-F1	65 °C	733 bp
CAGTCTAGCCAAGAAGAGACAGTG	Max-G-R1		
AGTAGCCTCCCGAAAGGATCTTC	Max-G-F2	60 °C	501 bp
TCGATATTGTAAGCGACAGATTC	Max-G-R2		
GTACCAGGTAAGTCGCTCTTGGTG	Max-G-F3	60 °C	623 bp
AGCCCTCAGAGCATGTGCCTGGAG	Max-G-R3		
CAAAGTAGAGCAGTTCAGAGATTC	Max-G-F4	60 °C	703 bp
TTAGGAAGAACAGGCTGGACCCTG	Max-G-R4		
CTTCCGGGCTGGGGATGAATTAGC	Rab15-G-F1	60 °C	594 bp
CATTCCAACCTCCGCCTCTCAGATC	Rab15-G-R1		
CCTGTGGCTGTCCGGGGCGGTGTC	Rab15-G-F2	60 °C	616 bp
AACACATTTGGCAGTAGTAAACTG	Rab15-G-R2		
CTCTTCTACCGTTTCACTCTGTCTC	Rab15-G-F3	60 °C	684 bp
ATAGTAGGCCATTGTTCACTAAAG	Rab15-G-R3		
ACCTAGGACCTGCTACTACCTAAG	Rab15-G-F4	60 °C	615 bp
GTATGGGTAGAATACTTGGTGCTG	Rab15-G-R4		
TAGCCACTCAGCAGTTGGCAAAGC	Rab15-G-F5	60 °C	733 bp
TGGGCTGAAGGCTAAGGGTGCTTC	Rab15-G-R5		

Fortsetzung: Primersequenzen für die Amplifizierung regulatorischer Bereiche der Kandidatengene

Primersequenz (5' - 3')	Primername	Annealing- temperatur	Produkt- Größe
CTCATAGTGTTCCTTCCTACCTC	Rab15-G-F6	60 °C	865 bp
ATGGATACGCTGGCCTAACTTGTG	Rab15-G-R6		
CGGGGGCACCTGCCTCGCCGCTAG	Sptb-G-F1.1	60 °C	686 bp
GTTCCCTGCAAGCCGCCATGTTC	Sptb-G-R1.1		
TAGTGGGAAGAGAGACCGTGTACC	Sptb-G-F2	60 °C	486 bp
TGCTCCCAGTGGGTGGAAAGCCAG	Sptb-G-R2		
GGTTGTGAGCCTCAGTCATCTATC	Zbtb25-G-F1	60 °C	448 bp
CTGCCTGAAACTGACTTTCCTGTG	Zbtb25-G-R1		
ACAGAATTC AAGTTTAAATAACAC	Zbtb25-G-F2	60 °C	603 bp
TTTACTAAACATCAAGTATACCTC	Zbtb25-G-R2		
CTGTTCAAGACTTCTTTACCACTG	Zbtb25-G-F3	60 °C	699 bp
TGCCATTTCTAATTCATAAGTTAG	Zbtb25-G-R3		
GTTTATAGCCATGTCTGTGGTGAG	Zbtb25-G-F4	60 °C	648 bp
ATGACCTTGGTGAAGTGCATCCAC	Zbtb25-G-R4		
TGCTGCCATCCTCCTCGGCAAGG	Zbtb25-G-F5	60 °C	768 bp
GTTAGAAACCAAAGGCCAACTAG	Zbtb25-G-R5		
TTCTGGTAGTCCTCATGCTTGCTC	Zbtb1-G-F1.1	60 °C	696 bp
ACAGGCAGCTAGCACGGCCTTGTG	Zbtb1-G-R1.1		
ATTTGAGGAAGGATATGAGATCAC	Zbtb1-G-F2	60 °C	631 bp
GATTTCAATTTATAAGGGAGAATAG	Zbtb1-G-R2		
AATTATTTAAACTATTCTATTTG	Zbtb1-G-F3	50 °C	640 bp
TGCACTCTACTTTTATAGAACAAC	Zbtb1-G-R3		
TGCTTCTCGCACTGGCGGAAAGC	Hspa2-G-F1	60 °C	626 bp
GGAAACTCTCAGAGCCAATCGGTC	Hspa2-G-R1		
TCAGCAAACCTTACCAAGGCGGTC	Hspa2-G-F2	60 °C	620 bp
CACATTTTCTTAAAGAGCGACGTG	Hspa2-G-R2		
CTGGGCTCGGAGTCCTCTCTAGTC	Plekhg3-G-F1.1	GC rich 60 °C	681 bp
CCTCCTCTGAGTGCGTCCGAAGCAG	Plekhg3-G-R1.1		
CCATTCAACAGTGACTTCCCATTTC	Plekhg3-G-F2	60 °C	477 bp
TACATGCGCTCTGTCTCCACGATC	Plekhg3-G-R2		
AGCGGACACAAACAAACAGGGTAG	Plekhg3-G-F3	60 °C	665 bp
CTGGACATTGAGTGAGCATCCATG	Plekhg3-G-R3		
GGAAATCGATTGCTTCTAGAAAAC	Gpx2 P1 F	60 °C	310 bp
CCTATTTACAGCCACTGAACAAAG	Gpx2 P1 R		
TCCAGCAAGGAGTGAATTATTCAC	Gpx2 P2 F	60 °C	462 bp
CACTCAATCCTTTCTTTATCCCAC	Gpx2 P2 R		

Verwendete Primersequenzen für die β erKO-Genotypisierung.

Primersequenz (5' - 3')	Primername	Annealing- temperatur	Produkt- Größe
AGAGTGTGCAGCTGCCCTGCTGC	β erKO-F-Neu	61 °C	500 bp und/oder 457 bp
GCAGCCTCTGTTCCACATACACTTC	NEO-25		
CATCCTTCACAGGACCAGACAC	EXON-3-R		

Verwendete Primersequenzen für die β ERKO-Transkriptanalysen.

Primersequenz (5' - 3')	Primername	Annealing- temperatur	Produkt- größe
CTAGAACACACCTTGCCTGTAAAC	MouseESR2-CompFwEx2	60 °C	160 bp
CTTACATCCTTCACAGGACCAGAC	MouseESR2-CompRvEx3		
CTAGAACACACCTTGCCTGTAAAC	MouseESR2-CompFwEx2	60 °C	230 bp
ATTCGTGGCTGGACAGATATAGTC	MouseESR2-CompRvEx4		
CTAGAACACACCTTGCCTGTAAAC	MouseESR2-CompFwEx2	60 °C	350 bp
CTATTCGGTACCCACACCTTTCTC	MouseESR2-CompRvEx5		
CTAGAACACACCTTGCCTGTAAAC	MouseESR2-CompFwEx2	60 °C	640 bp
TCCAACAGGCTGAGCTCCACAAAG	MouseESR2-CompRvEx6		
GAGGCCTCCATGATGATGTCCCTC	MouseESR2-CompFwEx5	60 °C	115 bp
TCCAACAGGCTGAGCTCCACAAAG	MouseESR2-CompRvEx6		
GTCCTGCTGTGATGAACTACAGTG	Forward Exon 2.2	60 °C	300 bp
GACTAGTAACAGGGCTGGCACAAC	Reverse Exon 3		
GTCCTGCTGTGATGAACTACAGTG	Forward Exon 2.2	60 °C	500 bp
TCGTAACACTTGCGAAGTCGGCAG	Reverse Exon 4		

Primersequenzen zur Amplifizierung von Mikrosatelliten zur Zucht und genomischen Charakterisierung der kongenen und subkongenen Stämme; die Primersequenzen wurden der RGD-Datenbank entnommen.

Mikrosatelliten- marker	Position (Mb)	Primersequenz (5' - 3')	
		Forward	Reverse
<i>D6Rat110</i>	134,1	AAGGGACAAGCTTAGCCACA	CCTCCAGCCTAGCCTACAAC
<i>D6Mgh2</i>	133,1	GTTCTTCTCATTCTCTGACTCTG	AGCTGGGCTGAGAAAAACA
<i>D6Mgh3</i>	128,0	TTCATCTATGCCACAGCTCTG	AGAACATTCAAACCATAGCTTTCT
<i>D6Cpg1a</i>	123,3	GCTCCCATCTTCAAATACAAACAC	TAGTCTCCTCTTCTTAACTTC
<i>D6Rat114</i>	119,1	CCAAGAGAACTACAAACATCTCTC	TGGTGATAAAGGAATTTCTGTTTCT
<i>D6Rat66</i>	112,3	TCAGGTCATAATTTTATTTTTCTGA	TGAGGAGGACACAGATGTGG
<i>D6Ngb</i>	111,2	TCCCCAGTGCTGGGATTAGACTAC	TGAGGACAGGAGTTCAATCACCAG
<i>D6Wox4</i>	102,5	TGTTCCACATGCACAGTAGC	TGTGGGATTAACGACTGGAC
<i>D6Rat88</i>	100,1	CCCATTAGGAGGACCAAGGT	ATGTCTTCAGGGACCTCCA
<i>D6Rat229</i>	99,7	CCACCCATTTAACATCCAC	GTGTCTTCCCAGAGATGGA
<i>D6Mit1</i>	98,8	TTAGGAGAGAACTGAAAGTTGTCC	ATGGTGCATATGGTGGTCA
<i>D6Mit8</i>	97,6	AGCCTAAAATTTGACTCTCTTTGC	GGTTCACACCATGGTGATTG
<i>D6Rat17</i>	95,0	TCCTTTCATTTTATCCATCCG	GGAATGAATTCATTTTGCCTT
<i>D6Rat18</i>	93,3	TGTGGCTCCCTTCAGTCTTC	CACAAATACCTGGCTGGTT
<i>D6Rat218</i>	90,9	GGCACAGGGTTTCTCAACAT	CCCCATCACCTAGCAATTA
<i>D6Rat70</i>	82,2	CACCATGAACCTTTCAACAAA	GTGGTGTGCGAGGGAACATCAT
<i>D6Rat9</i>	81,6	ACCAGCACACTGCTGTGAAC	GGTACAGCATATCCCTTCTGC
<i>D6Rat98</i>	79,9	TAGTGGTGGCTGAGGCTTGT	CTGCTCCTCTAGCCCTTGAG
<i>D6Mgh5</i>	76,4	ATAGGAATAAAGAGTGCACGTTTG	CAGTTAGCATAGAAAGCAAAGGG
<i>D6Rat132</i>	52,8	CCTCAAAGGAGAGGTGTCAG	GCCTGCTGTTTTGGAAGAAC

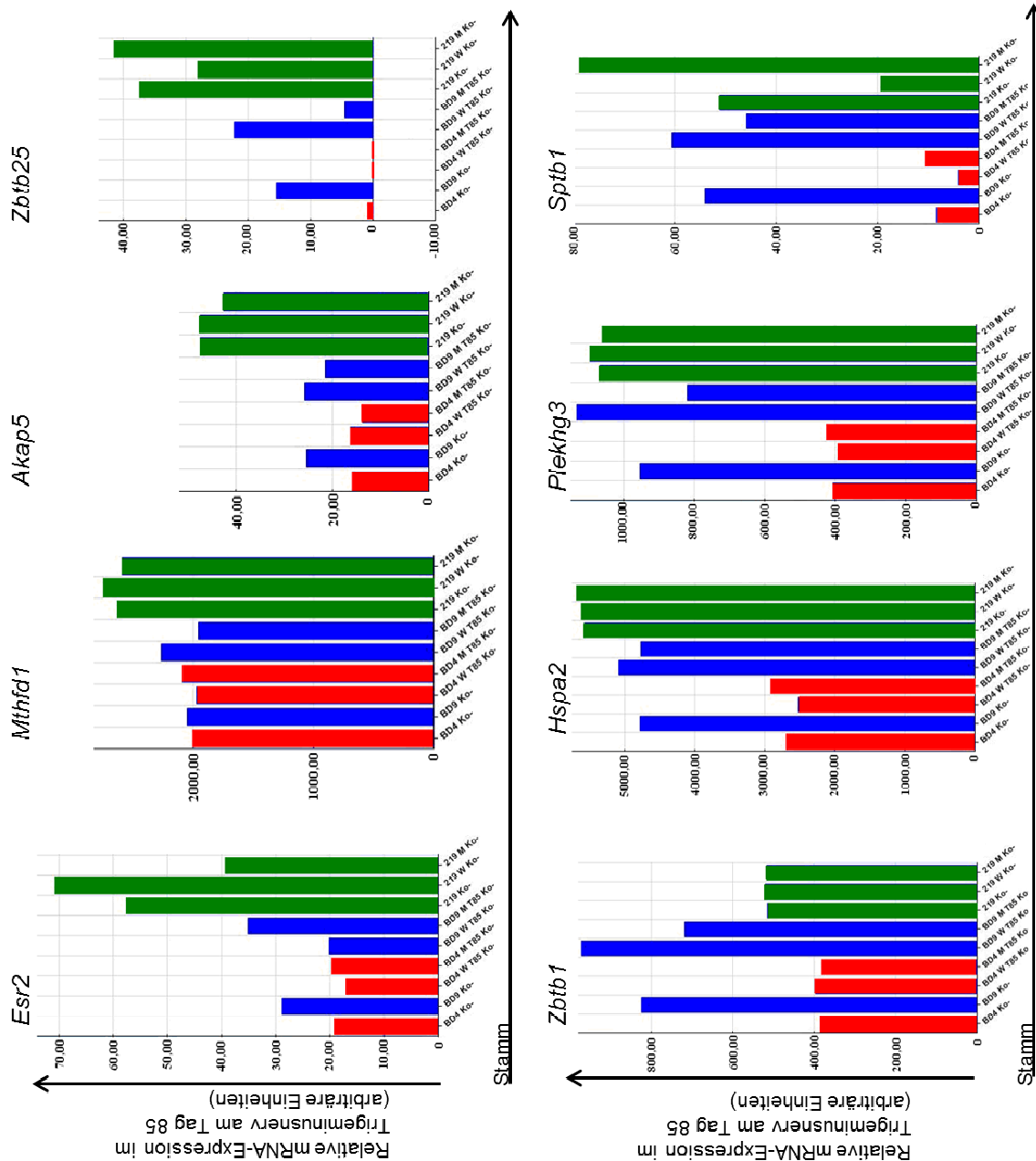
Verwendete Primersequenzen für die Realtime PCR.

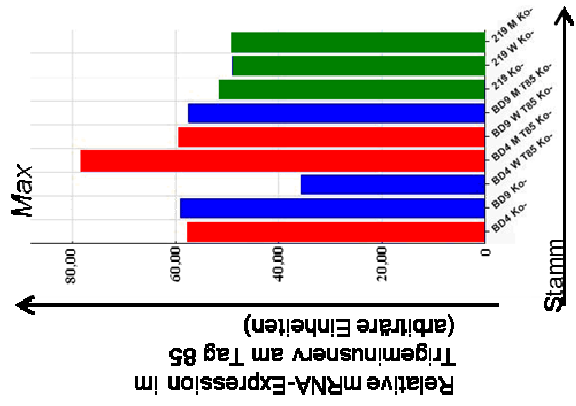
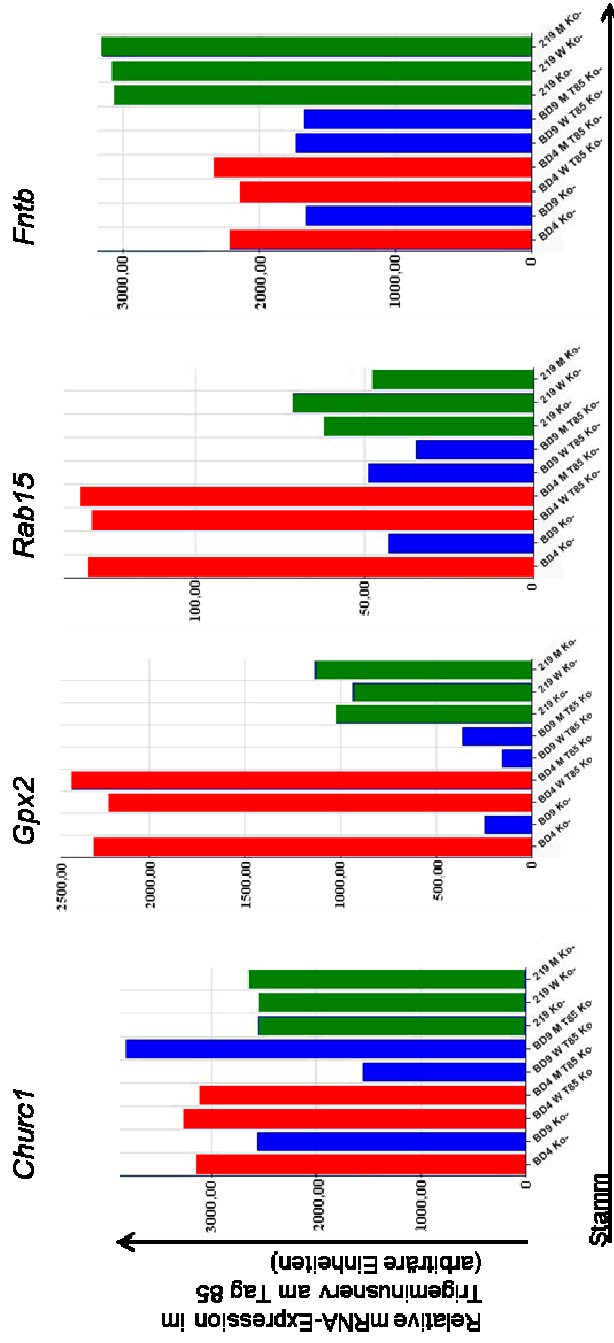
Primersequenz (5' - 3')	Primername	Annealing- temperatur	Produkt- größe
TCGGACATCAGGAGAACTGTCA	Gpx2-R	60 °C	91 bp
AGACTGAAGGTGGGCTGGAA	Gpx2-F		
AGCTTCAGCTGATTAATGAC	Tex21-Q-F	60 °C	135 bp
CTACAGTCAGAAGCATGCTG	Tex21-Q-R		
AGCTCCCTTTGGTATTCTGC	Sptb-Q-F	60 °C	118 bp
AATCCCGAATGAGAGCCAAC	Sptb-Q-R		
ACGCATGAGCTTTGAGTCTG	Plekhg3-Q-F	60 °C	98 bp
AGTAAAGGCCTCCTGCTCAG	Plekhg3-Q-R		
GAAGTACTGCAAACCTCGTGC	Ppp1r36-Q-F	60 °C	94 bp
AGGCTATGCAGGTACAGAAG	Ppp1r36-Q-R		
CACTGGATGACATCTCCAAG	Syne2-Q-F	60 °C	146 bp
AGCCTTCTTTAATGCGCTGC	Syne2-Q-R		
TTGTTGGATATGCCCTTGACT	Hprt-Q-F	60 °C	78 bp
CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG	Hprt-Q-R		

Anhang 2

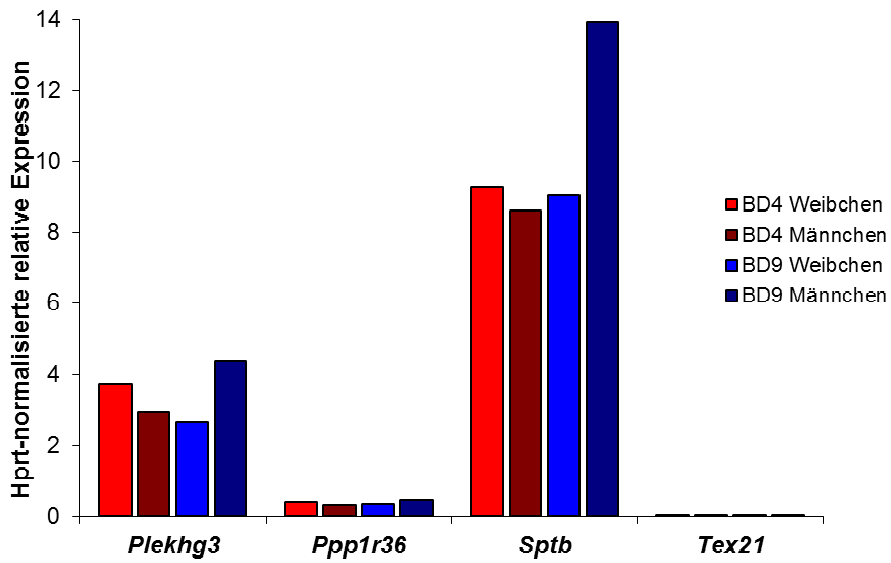
mRNA-Expression der Kandidatengene im Trigemiusnerv von BDIX (blau), BDIV (rot) und BDIX.BDIV-*Mss4a* (grün; hier als 219 bezeichnet) Ratten;
 Verwendeter Microarray: RatRef-12v1 der Firma Illumina

Die Stammbezeichnung „219“ ist ein Synonym für den BDIX.BDIV-*Mss4a* Stamm.
 „Ko-“, bedeutet, dass keine ENU-Behandlung durchgeführt wurde, W = Weibchen, M = Männchen

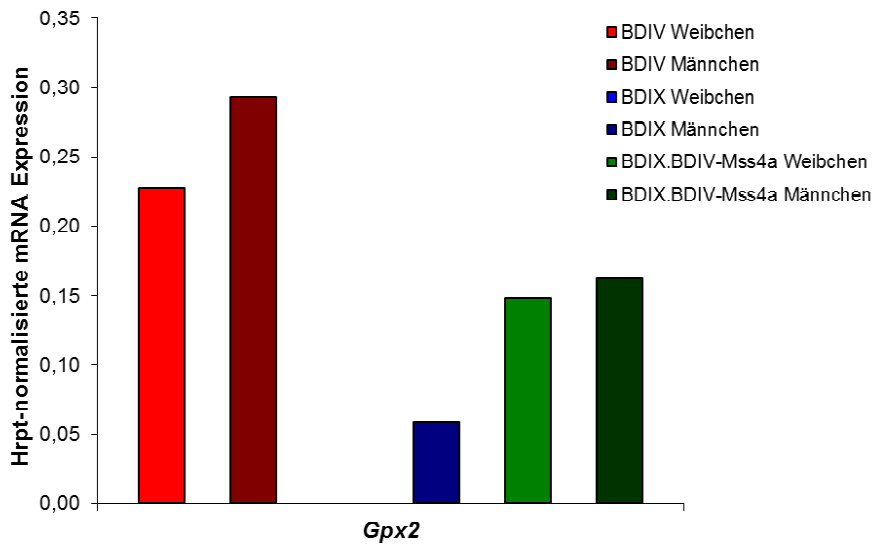




Realtime-PCR Analyse der Kandidatengene im Trigemiusnerv un behandelter BDIX und BDIV Ratten, die nicht auf dem Microarray vertreten waren.



Validierung der Microarray Ergebnisse für *Gpx2* mittels Realtime PCR.



Anhang 3

SNPs in mutmaßlich regulatorischen Bereichen; die betroffene Base ist rot markiert

Gensymbol	SNP	
	Position (bp)	Sequenz (5' - 3')
<i>Mthfd1</i>	98,916,955	TGCTACTTTT G TGTTGAAACG
<i>Akap5</i>	98,923,071	CCCCGCT C CTCCACGCGCATT
<i>Hspa2</i>	99,000,228	GGCAAAGAG A GAGGGGAAAC
<i>Plekhg3</i>	99,132,363	GGACCT T GGTTCGGCCGCAAC
<i>Churc1</i>	99,363,987	CTAT A TTGGGTTGCTTTAAAATAT A GCAGG
	99,364,008	
	99,349,163	CTAAGGAGT C CTTAGAACGC
<i>Gpx2</i>	99,376,282	TTAGC G AAACCAGGTACCCA
	99,376,244	ACTGTTTGAACAAG G TTGTA
	99,372,574	AGTGGACTCC C AAGAGCCT
<i>Rab15</i>	99,379,214	CTTCTT G TAGACACGAGAGAGAG
	99,379,894	TCCGGGGAGT C TTTTTTTTTT
	99,380,291	TTCTC A TCTCCCCGAAGTG
	99,380,588	GACCTCAAACCG G AACGGA
	99,380,623	GACCTGACCG G AGAAGACGG
	99,380,971	CCTCGATA A GCTGTCACTTC
	99,403,882	TGGTAAACAC A TGTCTTTATA
<i>Fntb</i>	99,510,582	CAGAGAGCGT G TATTGGCTGG
<i>Max</i>	99,554,395	CTGAGCT C TGGGCGCCCGGC

SNPs in proteinkodierenden Bereichen; die betroffene Base ist rot markiert

Gensymbol	SNP		Exon	Sequenz (5' - 3')
	Position (bp)			
<i>Tex21</i>	98,798,137		7	CACTCGGACCTGG G CGGTTC
<i>Mthfd1</i>	98,883,958		10	CTCAAGACGCCTGT A CC A AG
	98,883,961		10	
	98,884,200		11	GAGAAATTGG G CTACTCACT
	98,884,224		11	CCAAGCTCAT C GGTAACCTG
	98,910,742		26	CCATCCGGGAC A TCCGGGCC
<i>Akap5</i>	98,927,230		1	AAAGAAATC A GGAGAGACTG
<i>Plekhg3</i>	99,157,433		1	CCCATTCAAC G GCCGTGCAGGG
	99,157,489		1	GCCGGGTGGT G CGAGAGATC
	99,163,099		11	AGGCTTGGTCCT C GCAGGATG
	99,172,311		14	ACTGGCCCTT C TGTCAATGGG
	99,173,135		16	ACTCCT G ATGGGGATGAGCC
<i>Sptb</i>	99,258,622		1	TCGGTGG T ATGTGGCCTAA
	99,227,419		4	TCCACGAGAG G CCTCTCTAC
	99,222,176		9	TGGAT G GCGTGACACCTTT
	99,223,104		8	CCGTT C TCTCAGCCGTTCCA
	99,217,599		13	CCGACGAAAG G GCACTTCTA
	99,216,442		14	GTTTCACTT G TGGTAGTGCC
	99,204,964		21	CGACGG C AACCGCGTCAGTC
	99,200,179		24	TAAAGATGTGCCCGT G GCTCT
	99,209,710		16	CAGCTCTT C TACACCTTCCC
<i>Fntb</i>	99,511,356		12	CCAGCCAAT A CATGCTCTCT
<i>Max</i>	99,529,923		5	GCCTCCATCC G CAGTTTC

Anhang 4

BLAST-Vergleich der amplifizierten Sequenz des Exon 3 des *Esr2* –Gens aus dem Ovar einer β KO-Maus.

Subject = Die amplifizierte Sequenz; Query = Rattenreferenz-Sequenz, *Rattus norvegicus*

```
> \[ref|NT\_039551.8\] D Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 12 genomic contig, GRCm38
C57BL/6J MMCHR12_CTG7
Length=78455223
```

Features in this part of subject sequence:
[estrogen receptor beta isoform 2](#)
[estrogen receptor beta isoform 1](#)

Score = 396 bits (214), Expect = 8e-108
 Identities = 214/214 (100%), Gaps = 0/214 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```
Query 24 CTGTTTACAGGCAAGGTGTGTTCTAGTGATCTTGCTTCACACCAAGGACTCTTTTGAGGT 83
      |||
Sbjct 34593458 CTGTTTACAGGCAAGGTGTGTTCTAGTGATCTTGCTTCACACCAAGGACTCTTTTGAGGT 34593517

Query 84 TCTGCATAGAGAAGCGATGATTGGCAGTGGGTGGCTAAAGGAGAGAGGTGTCCAGAAGTT 143
      |||
Sbjct 34593518 TCTGCATAGAGAAGCGATGATTGGCAGTGGGTGGCTAAAGGAGAGAGGTGTCCAGAAGTT 34593577

Query 144 GGCCATAGCACATTTGGGCTTGCAGTCTGGCGAACAGGCCACCTTCCAGGTTACCGGTG 203
      |||
Sbjct 34593578 GGCCATAGCACATTTGGGCTTGCAGTCTGGCGAACAGGCCACCTTCCAGGTTACCGGTG 34593637

Query 204 CTGCTGGGAACACTGTAGTTCATCACAGCAGGAC 237
      |||
Sbjct 34593638 CTGCTGGGAACACTGTAGTTCATCACAGCAGGAC 34593671
```

BLAST-Vergleich der amplifizierten Sequenz des Exon 6 des *Esr2* –Gens aus dem Ovar einer β KO-Maus.

Subject = Die amplifizierte Sequenz; Query = Rattenreferenz-Sequenz, *Rattus norvegicus*

```
> \[ref|NT\_039551.8\] D Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 12 genomic contig, GRCm38
C57BL/6J MMCHR12_CTG7
Length=78455223
```

Features in this part of subject sequence:
[estrogen receptor beta isoform 2](#)
[estrogen receptor beta isoform 1](#)

Score = 124 bits (67), Expect = 7e-27
 Identities = 72/74 (97%), Gaps = 2/74 (3%)
 Strand=Plus/Minus

```
Query 1 GAGGCCTCCATGATGATGTCCCTCACGAAGCTGGCTGACAAGGAACTGGTGCACATGAT- 59
      |||
Sbjct 34571526 GAGGCCTCCATGATGATGTCCCTCACGAAGCTGGCTGACAAGGAACTGGTGCACATGATT 34571467

Query 60 GGCTGG-CCAAGAA 72
      |||
Sbjct 34571466 GGCTGGCCAAGAA 34571453
```

Danksagung

Kurz und knapp, aber sehr herzlich, möchte ich einer Reihe von Menschen danken:

Meiner Doktormutter PD Dr. med. Andrea Kindler-Röhrborn für die freundliche Aufnahme in die AG, viele anregende Gespräche, die Unterstützung und die vielen tollen Möglichkeiten,

Dr. rer. nat. Bernd Kölsch für seine große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft (und Geduld!),

Andrea Kutritz,

Prof. Schmid,

den Molpath-Damen und Karl,

Armin und Markus,

der wechselnden charmanten Besetzung unserer AG, in der letzten Zeit waren dies Julia, Nadine, Olga, Franziska, Nina, Max, Yuichiro...

den vielen netten Arbeitskollegen im Institut,

last, but not least, meiner Familie und meinen Freunden.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationen

Heikaus S., van den Berg L., Kempf T., Mahotka C., Gabbert H.E., Ramp U.:

HA14-1 is able to reconstitute the impaired mitochondrial pathway of apoptosis in renal cell carcinoma cell lines; *Cell Oncol.* 2008;30(5):419-33.

van den Berg L., Segun A.D., Mersch S., Blasberg N., Grinstein E., Wai D., Anlauf M., Gabbert H.E., Mahotka C., Heikaus S.: Regulation of p53 isoform expression in renal cell carcinoma; *Front Biosci (Elite Ed).* 2010 Jun 1;2:1042-53.

Koelsch B.U., Winzen-Reichert B., Fischer C., Kutritz A., van den Berg L., Kindler-Röhrborn A.: Sex-biased suppression of chemically induced neural carcinogenesis in congenic BDIX.BDIV-*Mss4a* rats; *Physiol Genomics.* 2011 May 1;43(10):631-9.

van den Berg L., Kindler-Röhrborn A.: Das individuelle Krebsrisiko – Spielt das Geschlecht eine Rolle? UNIKATE 41. Geschlechterforschung – Blick hinter die Kulissen (2012-07-04)

Koelsch B.U., van den Berg L., Grabellus F., Fischer C., Kutritz A., Kindler-Röhrborn A.: Chemically induced rat Schwann cell neoplasia as a model for early-stage human peripheral nerve sheath tumors: phenotypic characteristics and dysregulated gene expression; *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 May;72(5):404-415.