

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel

Charakterisierung der physiologischen Funktion des neuartigen Tumorsuppressors SASH1 und seiner Rolle in der Tumorgenese

Melanie Martini

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Haller
2. Priv.-Doz. Dr. K.-P. Janssen

Die Dissertation wurde am 12.11.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.05.2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DER GASTROINTESTINALTRAKT	1
1.2	MOLEKULARGENETIK DER TUMORENTSTEHUNG AM BEISPIEL DES KOLOREKTALKARZINOMS	3
1.2.1	PROTO-ONKOGENE	6
1.2.2	TUMORSUPPRESSORGENE	6
1.3	SIGNALADAPTER-PROTEINE	7
1.3.1	SRC HOMOLOGY 3-DOMÄNE (SH3-DOMÄNE)	7
1.3.2	STERILE ALPHA MOTIF-DOMÄNE (SAM-DOMÄNE)	8
1.3.3	DIE FAMILIE DER SLY-ADAPTER-PROTEINE	9
1.3.3.1	SH3 protein expressed in lymphocytes (SLy1)	10
1.3.3.2	SAM domain, SH3 domain and NLS 1 (Samsn1)	11
1.3.3.3	SAM and SH3 domain containing protein 1 (SASH1)	11
1.3.3.3.1	Physiologische Funktion	12
1.3.3.3.2	Interaktionspartner	13
1.3.3.3.3	SASH1 in der Tumorgenese	13
1.4	DYNAMIK UND STRUKTUR DES ZYTOSKELETTS IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN	16
1.4.1	AKTINPOLYMERISATION	17
1.4.2	DAS ZYTOSKELETT IN DER ZELLMIGRATION	18
1.4.3	CORTACTIN	19
2	<u>ZIELSETZUNG</u>	21
3	<u>MATERIAL</u>	23
3.1	CHEMIKALIEN	23
3.2	VERBAUCHSMATERIAL	25
3.3	GERÄTE UND TECHNISCHES ZUBEHÖR	25
3.4	ENZYME	26
3.5	STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER	27
3.6	ANTIKÖRPER UND -SEREN	29
3.6.1	ERSTANTIKÖRPER UND FÄRBE-REAGENZIEN	29
3.6.2	ZWEITANTIKÖRPER	30
3.6.3	ANTISEREN	30
3.7	OLIGONUKLEOTIDE	30
3.8	REAGENZIENKITS	31
3.9	MEDIEN	32
3.9.1	NÄHRMEDIEN FÜR BAKTERIENKULTUREN	32

3.9.2	NÄHRMEDIEN FÜR ZELLKULTUREN	32
3.9.2.1	Zellkultur-Medien	32
3.9.2.2	Zusätze für Zellkultur-Medien	32
3.9.2.3	Zelltyp-spezifische Medienzusammensetzung	33
3.9.3	ANTIBIOTIKA DER PROKARYOTEN-KULTUREN	33
3.10	BAKTERIEN UND ZELLINIEN	33
3.11	VERSUCHSTIERE	34
3.12	KLONIERUNGSVEKTOREN/EXPRESSIONSPASMIDE	34
3.12.1	KLONIERUNGSVEKTOREN UND AUSGANGSPASMIDE	34
3.12.2	EXPRESSIONSPASMIDE UND KONSTRUKTE	35
3.13	MIKROSKOPIE UND AUSWERTUNG	36
4	METHODEN	37
4.1	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	37
4.1.1	ANTISERUMGENERIERUNG UND -AUFREINIGUNG	37
4.1.1.1	Immunisierung	37
4.1.1.2	Affinitätsaufreinigung des Antiserums	38
4.1.1.2.1	Peptidkopplung an Säule	38
4.1.1.2.2	Affinitätsreinigung	39
4.1.2	IMMUNPRÄZIPITATION	39
4.1.3	WESTERN BLOT (IMMUNOBLOT)	39
4.1.4	SOUTHERN BLOT	40
4.1.5	IMMUNHISTOCHEMIE	42
4.1.5.1	Einbetten von Geweben	42
4.1.5.1.1	Paraffin	42
4.1.5.1.2	Kryoschnitte	42
4.1.5.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	42
4.1.6	IMMUNZYTOCHEMIE	43
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	43
4.2.1	ARBEITEN MIT DNA	43
4.2.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Gewebe oder Zellen	43
4.2.1.1.1	Southern Blot-Analyse, Klonierung und Sequenzierungen	43
4.2.1.1.2	Genotypisierungen	44
4.2.1.2	Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellklonen	44
4.2.1.3	Enzymatische Behandlung von DNA	44
4.2.1.3.1	Restriktionsverdau	44
4.2.1.3.2	Ligation	44
4.2.1.4	Topo [®] TA-Klonierung	45
4.2.1.5	Transformation von Bakterien	45
4.2.1.5.1	OneShot [®] Top10 Transformation	45
4.2.1.5.2	Standardisierte Transformation von chemo-kompetenten <i>E.coli</i> -Stämmen	46
4.2.1.6	Plasmidisolation	46
4.2.1.6.1	Minipräp	46
4.2.1.6.2	Maxipräp	46
4.2.1.7	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	46

4.2.1.8	Sequenzanalyse	46
4.2.2	ARBEITEN MIT RNA	47
4.2.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	47
4.2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	47
4.2.3	QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	47
4.2.4	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	48
4.2.5	cDNA-SYNTHESE (REVERSE TRANSKRIPTION)	48
4.2.6	POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	48
4.2.7	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (QRT-PCR)	49
4.2.8	GENOMWEITE GENEXPRESSIONSANALYSE MITTELS MICROARRAY	50
4.2.8.1	Synthese der doppelsträngigen cDNA	50
4.2.8.2	Biotin-Markierung	51
4.2.8.3	RNA-Fragmentierung und Hybridisierung	51
4.2.8.4	Qualitätsanalyse und Datenaufbereitung	51
4.3	BIOCHEMISCHE METHODEN	52
4.3.1	PROTEINLYSATE	52
4.3.1.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen	52
4.3.1.2	Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe	53
4.3.2	ZELLKERNFRAKTIONIERUNG	53
4.3.3	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	53
4.3.4	RAC1 AKTIVIERUNGSASSAY	54
4.3.5	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	55
4.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	55
4.4.1	<i>IN VITRO</i> -DEMETHYLIERUNG VON DNA	55
4.4.2	ZELLKULTUR	55
4.4.2.1	Embryonale Stammzellen	55
4.4.2.1.1	Kultivierung	56
4.4.2.1.2	Elektroporation	56
4.4.2.1.3	Selektion rekombinanter ES-Zellklone	56
4.4.2.1.4	<i>In vitro</i> -Cre-Rekombination	56
4.4.2.1.5	Einfrieren	57
4.4.2.2	Embryonale Fibroblasten („feeder“)	57
4.4.2.3	Herstellung des ES-Medien-Zusatzes LIF mittels CHO-Zellen	57
4.4.3	TRANSIENTE ZELLTRANSFEKTION	58
4.4.3.1	Transfektion mittels Lipofektamin	58
4.4.3.2	Transfektion mittels Kalzium-Phosphat	58
4.4.3.3	siRNA-Transfektion	59
4.5	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	59
4.5.1	ORGANENTNAHME	59
4.5.2	GEWINNUNG EMBRYONALER FIBROBLASTEN	59
4.5.3	GENERIERUNG CHIMÄRER MÄUSE	60
4.5.3.1	Superovulation	60
4.5.3.2	Blastozysteninjektion	60
4.5.3.3	Reimplantation der Blastozysten	60
4.6	STATISTISCHE AUSWERTUNGSVERFAHREN	61

5	ERGEBNISSE	63
5.1	LABOREIGENE VORARBEITEN	63
5.2	GENERIERUNG EINES POLYKLONALEN ANTISERUMS	64
5.2.1	CHARAKTERISIERUNG DER ANTISEREN GEGEN N-TERMINAL GELEGENE EPITOPE	64
5.2.1.1	Immunisierung und Aufreinigung	64
5.2.1.2	Spezifität der Antikörper-Reaktivität	67
5.2.1.3	Weitere Anwendungstests des Antiserums 1540	69
5.2.2	CHARAKTERISIERUNG DER ANTISEREN GEGEN C-TERMINAL GELEGENE EPITOPE	69
5.3	ANALYSE DER SASH1-EXPRESSION	69
5.3.1	EXPRESSION IM MAUSGEWEBE	69
5.3.2	EXPRESSION IN HUMANEN ZELLINIEN	71
5.3.3	DIE LOKALISATION DES SASH1-TRANSKRIPTS IN MURINEN EMBRYONEN	72
5.4	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON SASH1	73
5.4.1	UNTERSCHIEDLICHE LOKALISATION VON ENDOGENEM UND V5-MARKIERTEM SASH1	73
5.4.2	BIOCHEMISCHER NACHWEIS DER SASH1-LOKALISATION	75
5.5	REGULATION DER EXPRESSION	76
5.6	REGULATIONSMECHANISMEN DER SASH1-VERMITTELTEN LAMELLIPODIENINDUKTION	78
5.6.1	KO-LOKALISIERUNG VON AKTIVEM RAC1 MIT SASH1	78
5.6.2	SASH1-ABHÄNGIGER RAC1-AKTIVIERUNGSASSAY	80
5.7	TRANSKRIPTOM-ANALYSE	80
5.8	GENERIERUNG EINES KONDITIONALEN GEWEBSSPEZIFISCHEN SASH1^{KO}-MAUSSTAMMES	84
5.8.1	KLONIERUNG DER TARGETVEKTOREN	84
5.8.2	ERZEUGUNG VON SASH1 ^{ΔE14/15} ES-ZELLEN	87
5.8.2.1	PCR-Analyse auf homologe Rekombination	87
5.8.2.2	Sequenzierung	87
5.8.3	<i>IN VITRO</i> -CRE-REKOMBINATION	88
5.8.4	GENERIERUNG EINES SASH1 ^{3LOXP} -MAUSSTAMMES AUS EINEM REKOMBINANTEN ES-KLON	89
5.8.5	CHARAKTERISIERUNG DES PHÄNOTYPS DES SASH1 ^{3LOXP/WT} MAUSSTAMMES	93
6	DISKUSSION	95
6.1	HERSTELLUNG SASH1-SPEZIFISCHER HILFSMITTEL	95
6.1.1	ANTISERUM-GENERIERUNG ZUM NACHWEIS VON ENDOGENEM SASH1	95
6.1.2	GENERIERUNG EINES GEWEBESPEZIFISCHEN SASH1 ^{KO} -MAUSSTAMMES	97
6.1.2.1	Analyse des SASH1 ^{wt/neo} -Mausstammes	100
6.1.2.2	Ausblick I	100
6.2	<i>IN VITRO</i>-CHARAKTERISIERUNG DER PHYSIOLOGISCHEN FUNKTION VON SASH1	101
6.2.1	LOKALISIERUNGS- UND EXPRESSIONSANALYSEN VON SASH1	102
6.2.2	UNTERSUCHUNG MÖGLICHER REGULATIONSMECHANISMEN DER SASH1-EXPRESSION	104
6.2.3	EINFLUSS VON SASH1 AUF DIE ORGANISATION DES ZYTOSKELETTS	106
6.2.4	INTERAKTIONSPARTNER VON SASH1	110
6.2.5	AUSBLICK II	112
7	ZUSAMMENFASSUNG	115

8	SUMMARY	117
9	LITERATUR	119
10	ANHANG	I
10.1	SEQUENZEN UND ALIGNMENTS	I
10.1.1	SH3-DOMÄNEN SEQUENZ VON SASH1	I
10.1.2	SAM-DOMÄNEN SEQUENZ VON SASH1	I
10.1.3	SEQUENZ-ANALYSE DES ES-ZELLKLONS EPVIIF4	I
10.1.4	HOMOLOGIEN VON PROTEINSEQUENZEN DER SLY-ADAPTER-PROTEINFAMILIE	II
10.1.5	ALIGNMENT DER HUMANEN UND MURINEN PROTEINSEQUENZEN VON SASH1	III
10.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
10.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
10.4	TABELLENVERZEICHNIS	VIII

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1 Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die physiologische Relevanz des Signaladapter-Proteins SASH1 und seine Rolle in der Tumorprogression, am Beispiel des Kolonkarzinoms, untersucht werden.

1.1 Der Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt wird aus dem Ösophagus, dem Magen, dem Dünndarm (bestehend aus Duodenum, Jejunum und Ileum), Dickdarm (bestehend aus Caecum, Kolon, Sigma und Rektum) und After gebildet und stellt beim Menschen mit bis zu 400 m² Oberfläche die größte Grenzfläche zwischen Organismus und Umwelt dar. Er ist luminal mit einem einschichtigen Zylinderepithel aus parallel angeordneten Ein- (Lieberkühnsche Krypten) und Ausstülpungen (Villi) ausgekleidet, wobei Letztere nur im Epithel des Dünndarms vorkommen. Diese Villi dienen der Oberflächenvergrößerung des Darmlumens und sorgen so für eine verstärkte Resorption. Das Zylinderepithel besteht hauptsächlich aus absorbierenden Enterozyten (im Dünndarm) bzw. Kolonozyten (im Dickdarm), Mukus-sekretierenden Becherzellen, Panethzellen (Drüsenzellen des Dünndarms) und enteroendokrinen Zellen (Peptidhormon-sekretierend). Die Wände des Dün- und Dickdarms bestehen in allen Abschnitten aus vier Geweben, die in Schichten übereinander liegen. Diese Schichten gliedern sich (von innen nach außen) in Schleimhaut (Tunica mucosa), in eine Bindegewebsschicht (Tela submucosa), eine Muskelschicht der glatten Muskulatur (Tunica muscularis), welche für die Peristaltik des Darms verantwortlich ist, und in die äußeren Bindegewebsschichten Tunica adventitia (retroperitoneal) bzw. serosa (intraperitoneal).

Die Erneuerung des Darmepithels erfolgt durch die Wanderung von Epithelzellen entlang einer Krypten-Villus-Achse (Abb. 1). Der proliferierende Teil des Dünndarmepithels befindet sich innerhalb der Lieberkühnschen Krypten, wo an der Kryptenbasis pluripotente Stammzellen lokalisiert sind. Ihre genaue Lokalisation wird bis heute kontrovers diskutiert (Abb. 1). Das bis vor kurzem vorherrschende „Position +4“-Modell teilt einer Krypte ca. vier bis sechs Stammzellen in Position +4 bzw. +5 oberhalb der Panethzellen zu (Bach et al., 2000; Marshman et al., 2002). In einem neu aufgekommenen Modell, dem „Stammzellzonen“-Modell, werden die Stammzellen als zwischen den Panethzellen an der Kryptenbasis verstreut sitzend beschrieben (Barker et al., 2008). Die bei der Teilung der Stammzellen entstehenden differenzierten Tochterzellen wandern entlang der Krypten-Villus-Achse Richtung Darmlumen, in welches sie am Ende ihres Lebenszyklus abgestoßen werden. So kommt es alle 3-6 Tage zu einer Zellerneuerung des Darmepithels. Die Wanderung und Differenzierung der Tochterzellen werden hauptsächlich durch Ephrin-Rezeptoren und deren Liganden, sowie durch den Wnt-Signalweg kontrolliert (Sancho et al., 2003). Der kanonische Wnt-Signalweg spielt auch bei dem Erhalt der Stammzellen-Pluripotenz eine entscheidende Rolle. So kommt es in TCF4 (T-cell factor 4)-defizienten Mäusen

(Transkriptionsfaktor des Wnt-Signalweges) zu keiner Ausbildung von Progenitorzellen in den Krypten (Sancho et al., 2003). In transgenen Dkk-1 (Dickkopf-1)-exprimierenden Mutanten kommt es zu einem vollständigen Verlust der Krypten in adulten Mäusen (Pinto et al., 2003). Dkk-1 zählt zu den Wnt-Signalweg-Inhibitoren. Beide Beobachtungen machen deutlich, dass der kanonische Wnt-Signalweg essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase im intestinalen Epithel ist.

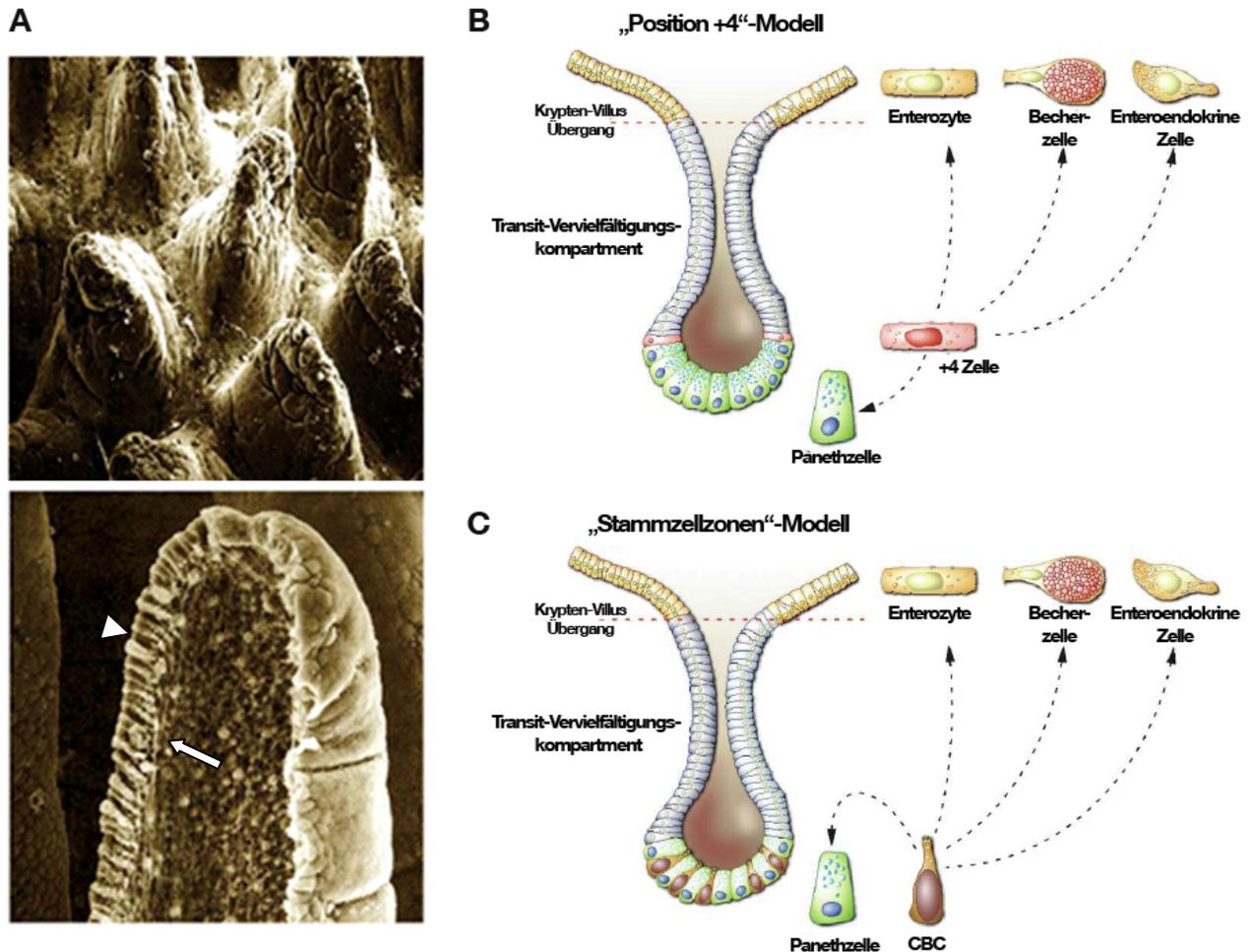


Abb. 1 Aufbau des Dünndarms.

A Elektronenmikroskopische Aufnahme der Villi der Dünndarm-Mucosa. Jeder einzelne Villus ist von einer Schicht aus Epithelzellen umkleidet, welche durch eine Basalmembran (Pfeil) vom darunterliegenden Gewebe abgegrenzt ist. Das Epithel besteht hauptsächlich aus absorbierenden Enterozyten (im Dünndarm) bzw. Kolonozyten (im Dickdarm), Mukus-sekretierenden Becherzellen (Pfeilspitze), Panethzellen und enteroendokrinen Zellen (Weinberg, 2007). **B & C** Schematische Darstellung des Aufbaus der Lieberkühnschen Krypten und der Lage der Stammzellen. (B) In dem konventionellen Modell liegen die Stammzellen oberhalb der Panethzellen an Position +4 bzw. +5 im unteren Teil der Krypte. (C) Neuere Untersuchungen beschreiben eine Stammzellzone, welche an der Kryptenbasis lokalisiert ist. In ihr wurden zwischen Panethzellen sogenannte Zylinderzellen der Kryptenbasis (CBC: crypt base columnar cells) als Stammzellen identifiziert (Barker et al., 2008).

Die Tochterzellen der Stammzellen können zu Mukus-sekretierenden, absorbierenden oder enteroendokrinen Zellen differenzieren, sobald sie die Krypten verlassen haben. Tochterzellen, die zu Panethzellen differenzieren, sind die einzigen Zellen, welche in Richtung Kryptenbasis migrieren, wo sie nach ca. 20 Tagen durch Phagozytose abgebaut werden (Sancho et al., 2003). Panethzellen, welche nur im Dünndarm vorkommen, besitzen einen hohen Anteil an nukleärem β -Catenin

und exprimieren TCF4. Sie benötigen für die Lokalisation an der Kryptenbasis aktiviertes β -Catenin/TCF zur Expression von EphB3 (Batlle et al., 2002). Als zentrales Kontroll-Element vermittelt TCF4 zusammen mit β -Catenin den Proliferations-/ Differenzierungswechsel entlang der Krypten-Villus-Achse im Wnt-Signalweg. Zellen der Kryptenbasis exprimieren β -Catenin/TCF-abhängige Gene, während in den differenzierten Zellen des intestinalen Epithels vornehmlich die Gene exprimiert werden, welche die β -Catenin/TCF-Aktivität inhibieren. Deregulierte β -Catenin/TCF-Aktivität resultiert hauptsächlich durch Mutationen in *APC* oder *CTNNB1*. Sie führt zu einer gestörten Zellproliferation und -differenzierung in den Kryptenbasen des Darmepithels aufgrund einer Daueraktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Dies kann zur Entstehung von Kolorektalkarzinomen führen (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Pinto et al., 2003; Powell et al., 1992; van de Wetering et al., 2002). Neben dem Wnt-Signalweg gibt es einen zweiten Signalweg, welcher bei der Zellproliferation und der Differenzierung im Darm eine komplementär zum Wnt-Signalweg wirkende Rolle übernimmt. Der sogenannte Notch-Signalweg hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung und reguliert die Selbsterneuerung der Stammzellen (Fre et al., 2005). Die Inhibition von Notch-Signalen führt zu einem Arrest der in den Krypten lokalisierten Zellproliferation und zu einer einheitlichen Zelldifferenzierung in Becherzellen (van Es et al., 2005). Das funktionierende Zusammenspiel beider Signalwege ist entscheidend für eine normale Darmentwicklung und die Aufrechterhaltung einer geregelten Homöostase. Eine Deregulation kann somit stimulierend auf die intestinale Tumorgenese wirken (Nakamura et al., 2007).

1.2 Molekulargenetik der Tumorentstehung am Beispiel des Kolorektalkarzinoms

Das Kolorektalkarzinom zählt neben Brust- und Lungenkrebs zu den häufigsten Krebsarten und der zweithäufigsten tumorbedingten Todesursache in westlichen Industrienationen (Abb. 2), obwohl durch die Einführung von Früherkennungsmaßnahmen und Vorsorgeuntersuchungen seit Anfang der 80er Jahre ein kontinuierlicher Rückgang der Mortalitätsrate beobachtet werden kann (Becker, 2003).

Das Risiko, Kolorektalkarzinome zu entwickeln, beginnt für gewöhnlich ab der 4. Lebensdekade und steigt mit zunehmendem Alter weiter an. Ab dem 70. Lebensjahr haben im Schnitt ca. 50 % der Bevölkerung in den Industrieländern einen benignen Darmtumor entwickelt, welcher in 10 % der Fälle eine maligne Form annehmen kann. Obwohl Tumore generell als genetische Erkrankungen einzustufen sind, sind die wenigsten Neoplasien hereditär. Nur 5 % der an einem Kolorektalkarzinom leidenden Patienten erkranken vor dem 40. Lebensjahr. Dies lässt sich auf eine erbliche Prädisposition der erkrankten Personen zurückführen (Griffin et al., 1991; Kinzler & Vogelstein, 1996). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie etwa Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa erhöhen ebenfalls das Risiko, frühzeitig an Darmkrebs zu erkranken (Kraus & Arber, 2009).

Bei den diagnostizierten Kolorektalkarzinomen handelt es sich hauptsächlich um Adenokarzinome (über 90 %), also um solide Tumore epithelialen Ursprungs. Die restlichen 10 % verteilen sich auf andere Tumorarten, wie etwa Karzinoide oder Lymphome.

Für die Entstehung des sporadischen Kolorektalkarzinoms werden vor allem Ernährungs- und Lebensgewohnheiten verantwortlich gemacht. Risikofaktoren sind hierbei eine zu hohe Kalorienaufnahme mit einem geringen Anteil an pflanzlichen Lebensmitteln, Rauchen (Tsoi et al., 2009), Bewegungsmangel und Übergewicht (Bergstrom et al., 2001; Vainio et al., 2002). Der protektive Effekt faserreicher Kost mit biologisch aktiven Substanzen wurde in zahlreichen Studien bestätigt (Boeing et al., 1999; Bueno-de-Mesquita et al., 2002; van Duijnhoven et al., 2009).

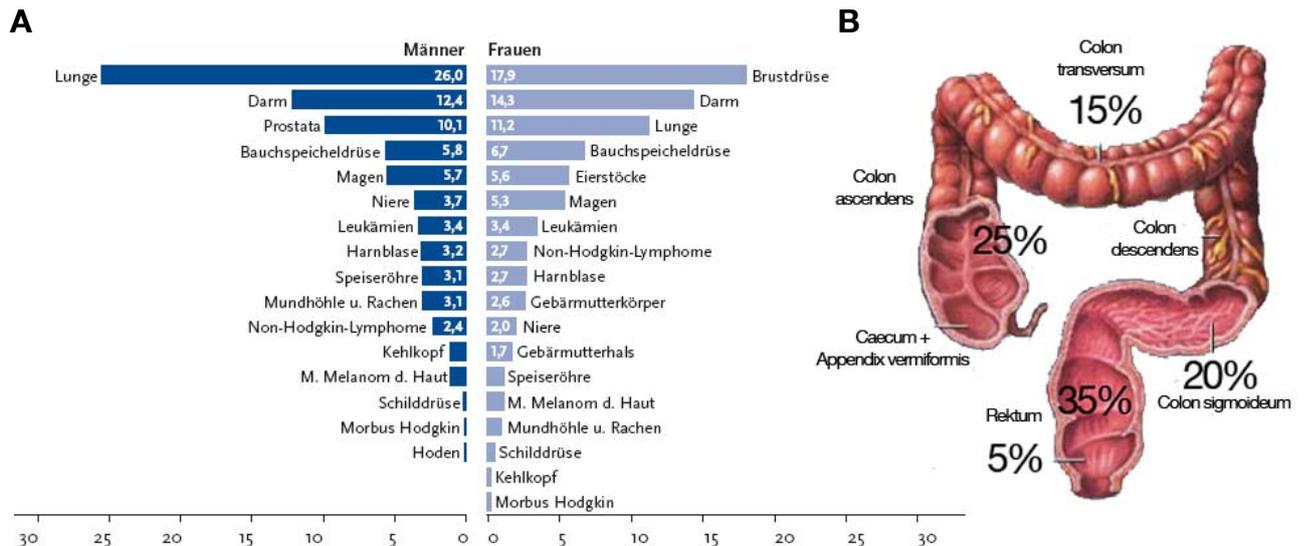


Abb. 2 Die häufigsten Krebstodesursachen innerhalb Deutschlands.

A Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland. Altersstandardisierte Mortalitätsrate pro 100.000 (Quelle: Robert Koch Institut 2004).
B Lokalisation und Häufigkeit von Darmtumoren in den unterschiedlichen Kolonregionen.

Kolorektalkarzinome gehören zu den auf molekulargenetischer und histopathologischer Ebene am besten untersuchten soliden Tumoren. Ihre molekulare Pathogenese umfasst genetische Alterationen sowie epigenetische Veränderungen (DNA- oder Protein-Modifikationen, die nicht mit einer Veränderung der DNA-Sequenz, sondern mit einer Veränderung der DNA-Replikation bzw. Transkription einhergehen). Das unkontrollierte Wachstum von Zellen der Epithelschicht, welches zur Bildung von Kolorektalkarzinomen führen kann, beruht vermutlich auf einer Akkumulation dieser Veränderungen in einer einzelnen Zelle. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, in welchem schrittweise die Kontrolle der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Zell-Zell-Interaktion aufgehoben werden (Hanahan & Weinberg, 2000). Durch die genetischen Veränderungen wie etwa Genmutationen, -amplifikationen, Translokationen oder Duplikationen ganzer Chromosomenabschnitte kann es zu einer genetischen Instabilität kommen, aus welcher weitere Mutationen und eine Tumorprogression resultieren. Die zwei Hauptformen der genetischen Instabilität in Kolorektalkarzinomen sind die chromosomale Instabilität (CIN) und die deutlich seltener auftretende Mikrosatelliten-Instabilität (MIN). Tumore mit CIN entwickeln sich häufig aus Vorläuferläsionen, wie etwa kolorektalen Polypen oder Adenomen und manifestieren sich vor allem durch eine ausgeprägte Aneuploidie und Chromosomen-Umordnung. Daneben zählen Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zu den Schlüsselereignissen der Tumorbildung. Speziell im Kolorektalkarzinom betrifft es Mutationen im *APC*-, *K-Ras*-, *p53*-, *c-myc*- oder *smad4*-Gen. *APC*-Mutationen finden sich in 60-80 %, *Ras*-Mutationen in etwa 50 % der sporadischen Kolorektalkarzinome (Bos et al., 1987; Thorstensen et al., 2005; Walther et al., 2009). Bei Tumoren mit MIN handelt es sich hauptsächlich um Tumore im rechten Kolon mit muzinösen Anteilen, tumorinfiltrierenden Lymphozyten und schlechter Differenzierung (Goel et al., 2003). Die Ursache ihrer Entstehung liegt in einem Funktionsverlust des DNA-MMR (mismatch repair)-Systems, welches Fehler während der DNA-Replikation korrigiert. Dieser Funktionsdefekt führt zu nicht-korrigierten Mutationen in sogenannten Mikrosatelliten. Diese kurzen, repetitiven DNA-Motive (meistens A_n oder CA_n) liegen überwiegend innerhalb intronischer Bereiche, so dass Mutationen in diesen Regionen keine Auswirkungen zeigen. Liegen die Mikrosatelliten jedoch in kodierenden Bereichen, kommt es bei einer Mutation zum Ausfall der betroffenen Proteine. Die Tumorgenese wird vorangetrieben, wenn es sich hierbei z.Bsp. um Proteine der Zellzykluskontrolle (E2F-4, CHK1), der

Wachstumskontrolle (TCF4, PTEN) oder um Proteine der Apoptoseregulation (Bax, Caspase-5) handelt (Grady & Carethers, 2008).

Eine weitere Form der genetischen Instabilität beruht auf epigenetischen Modifikationen und findet in ca. 25-30 % aller sporadischen Kolorektalkarzinome statt (Toyota et al., 1999; Toyota et al., 2000). Der Begriff Epigenetik wurde erstmals 1942 von Conrad Hal Waddington eingeführt und beschreibt aufgrund der griechischen Vorsilbe „epi-“, welche mit den Wörtern „nach“, „hinterher“ oder „zusätzlich“ übersetzt werden kann, alle meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind (Egger et al., 2004). In der Tumorgenese liegt der Epigenetik die DNA-Methylierung in transkriptionsregulierenden Abschnitten und eine daraus resultierende Blockade der Transkription zugrunde. Dieser CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) findet sich im Kolorektalkarzinom unter anderem in Genen der Zellzykluskontrolle (*Rb*, *p16^{INK4a}*, *p15*), der Apoptose (*caspase-8*, *PTEN*) und der Zelladhäsion (*E-Cadherin*, *APC*, *TIMP3*) (Toyota et al., 1999; Toyota et al., 2000).

Mutationen, welche einen Kontrollverlust einleiten, können entweder spontan in somatischen Zellen auftreten oder aufgrund von Keimbahnvererbung innerhalb aller Zellen vorliegen. Zu den Kolonkarzinomen, die aus genetischen Prädispositionen resultieren, zählen die sogenannte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC: Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer), auch Lynch-Syndrom genannt (1.2.2). Weitere Beispiele sind das Gardner- und das Turkot-Syndrom sowie das Peutz-Jeghers-Syndrom, welche sich jedoch hauptsächlich extrakolisch manifestieren.

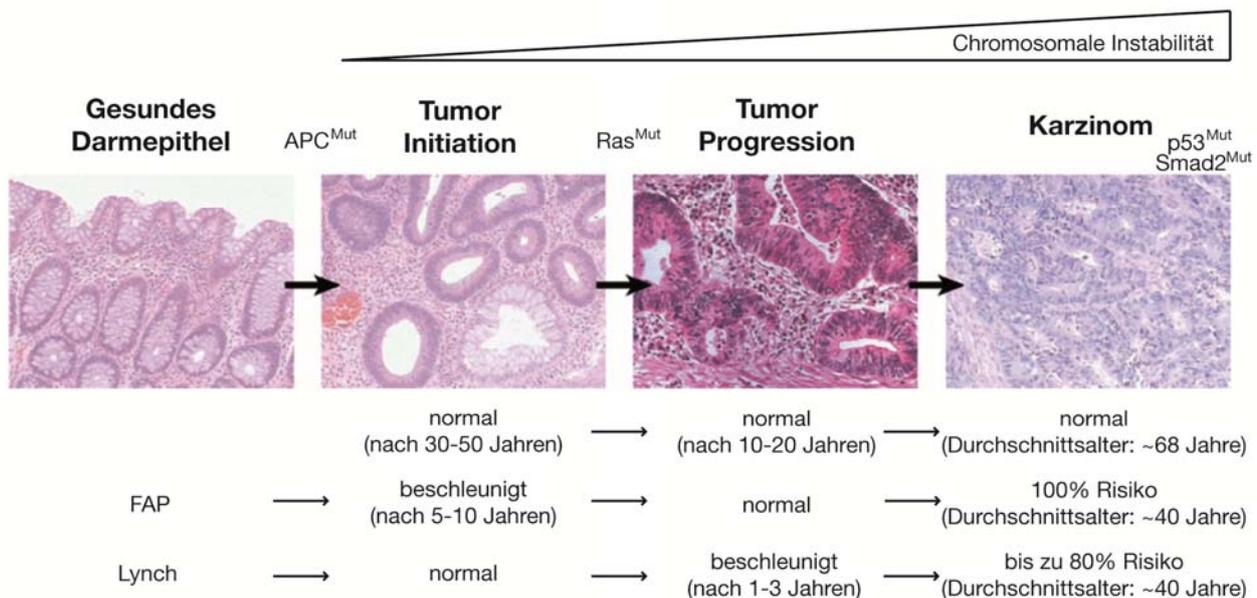


Abb. 3 Genetisches Modell zur Tumorentstehung am Beispiel des Kolonkarzinoms.

Die Tumorentstehung wird durch die Akkumulation von bis zu fünf verschiedenen Mutationen, wie etwa Mutationen in *APC* und *p53*, vorangetrieben. Die autosomal-dominant vererbaren Krankheitsbilder, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das Lynch-Syndrom, führen zu einer verfrühten Erkrankung (Grady & Carethers, 2008).

Die Tumor-Progression verläuft entlang einer sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz (Fearon & Vogelstein, 1990; Vogelstein & Kinzler, 1993). Darunter versteht man die gerichtete Entstehung eines Adenokarzinoms entlang charakteristischer Zwischenstufen. Ausgehend von einer Hyperplasie folgt eine zunehmende Entdifferenzierung der Zellen und die Entstehung einer benignen

Form, einem sogenannten Adenom oder Polypen, welche in der Bildung einer malignen, potentiell metastasierenden Form, dem Adenokarzinom (Abb. 3) endet.

Die genetischen Veränderungen, die zur Tumorinitiation und -progression führen, lassen sich in unterschiedliche Gruppen einteilen. So unterscheidet man zwischen Mutationen, welche zu einer Überproduktion tumorfavorisierender Gene, sogenannten Proto-Onkogenen, oder einer Expressionsreduktion tumorinhibierender Gene, sogenannten Tumorsuppressorgenen, führen.

1.2.1 Proto-Onkogene

Proto-Onkogene kodieren für Proteine, die Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren und steuern. Kommt es durch eine Mutation zu einem Funktionsverlust, führt das im Normalfall zum programmierten Zelltod (Apoptose). Mutationen können jedoch auch durch den Verlust eines Kontrollmechanismus zur ungebremsten Zellteilung führen („gain of function“). Proto-Onkogene werden dadurch zu Onkogenen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden ca. 100 Proto-Onkogene beschrieben. Dazu gehören Proteine der Signaltransduktion (z.B. K-Ras, H-Ras, Src), Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Myc, c-Jun, c-Fos), Wachstumsfaktoren und -rezeptoren (z.B. Wnt-1, PDGF, ErbB). Zu den dominanten Onkogenen in der Kolorektaltumorgenese gehört *K-Ras*. *K-Ras* kodiert für eine kleine GTPase, welche in 50 % humaner Kolorektalkarzinomen in mutierter Form vorliegt (McCormick, 1999) und an der Regulation der Zellproliferation und Apoptose beteiligt ist.

Proto-Onkogene können auf unterschiedlichen Wegen zu Onkogenen mutieren. So können Deletionen oder Punktmutationen in der DNA ausreichen, um eine Hyperaktivierung des Proteins auszulösen. Genamplifikationen und chromosomale Reorganisation des Genlokus wie etwa in die direkte Nachbarschaft eines Enhancers oder eines starken Promotors können ebenfalls in einer Überexpression eines Proto-Onkogens resultieren. Die Mutationen in Proto-Onkogenen weisen einen dominanten Charakter auf, d.h. dass die Mutation in einem der beiden Allele bereits ausreichend für die Aktivierung eines Onkogens ist.

1.2.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren oder Apoptose auslösen, also im Normalfall eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum ausüben. Diese Proteine sorgen dafür, dass die unkontrollierte Teilung genomisch entarteter Zellen direkt (Zellteilungszyklus) oder indirekt (programmierter Zelltod, terminale Differenzierung) verhindert wird. Kommt es durch Mutationen bzw. Deletionen zur Bildung eines funktionslosen Proteins („loss of function“), erhöht dies die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung. Dies kann etwa bei dem Retinoblastom im *Rb*-Gen beobachtet werden. Aufgrund ihrer regulatorischen Funktion und ihren Einfluss auf die Tumorgenese werden Tumorsuppressorgene auch als sogenannte „gatekeeper“ bezeichnet.

Im Gegensatz zu den Proto-Onkogenen sind die Mutationen in Tumorsuppressorgenen rezessiv. Das bedeutet, dass es für einen Funktionsverlust die Inaktivierung beider Allele bedarf. Dies kann durch fehlerhafte Chromosomen- bzw. Chromatidenteilung während der Zellteilung, durch mitotische Rekombination, durch Punktmutation oder durch Deletion erfolgen. Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens wird meist durch eine Punktmutation auf dem ersten Allel eingeleitet, gefolgt von einem Verlust des zweiten Allels durch LOH (loss of heterozygosity). Bekannte Tumorsuppressorgene beim Kolorektalkarzinom sind *APC* und *p53*, deren Ausfall eine Rolle bei der Tumorinitiation bzw. Tumorprogression spielt (Abb. 3).

Als Beispiele für autosomal-dominant vererbte Erkrankungen sind hier die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das Lynch-Syndrom aufgeführt. Bei der FAP kommt es aufgrund einer

Keimbahnmutation des *APC* (Adenomatous Polyposis Coli)-Gens zu einer frühzeitigen Polypenbildung im Dickdarm. *APC* ist ein Tumorsuppressorgen, welches auf Chromosom 5q21 lokalisiert ist. Das funktionstüchtige APC-Protein bindet an β -Catenin und vermittelt durch Ubiquitinierung dessen Abbau im Proteasom. β -Catenin wirkt im Zellkern zusammen mit anderen Faktoren als Transkriptionsfaktor des Wnt-Signalwegs. Liegt β -Catenin aufgrund des mutierten *APC*-Gens in der Zelle in erhöhter Konzentration vor, kommt es zu verstärktem Zellwachstum (Grady & Carethers, 2008; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997).

Das Lynch-Syndrom ist ein weiteres Beispiel für den hereditären Funktionsverlust eines Allels aufgrund einer Keimbahnmutation in Proteinen des Basen-„mismatch“-Reparatursystems (Boland et al., 2008). Dieser Reparaturmechanismus sorgt normalerweise dafür, dass bei Fehlpaarungen von Nukleinbasen die falsche Base aus dem nicht-methylierten Tochterstrang ausgeschnitten und ersetzt wird. In diesen Mechanismus ist eine Reihe von Genen wie etwa *MLH1* und *MSH2* involviert, die als Tumorsuppressorgene fungieren. Durch die fehlende Reparatur von Basenfehlpaarungen kommt es zur Anhäufung von Mutationen mit der Folge der Entstehung eines Tumorzellklones (Grady & Carethers, 2008).

Man schätzt, dass ungefähr 30 % des humanen Genoms für Proteine kodiert, die an der Aufrechterhaltung der DNA-Integrität beteiligt sind. Diese Genabschnitte bilden somit eine große Angriffsfläche für Mutationen, die Krebs zur Folge haben können (Grady & Carethers, 2008).

1.3 Signaladapter-Proteine

Zellwachstum, Differenzierung, Bewegung und Apoptose werden durch intrazelluläre Signalweiterleitung induziert (Sauro & Kholodenko, 2004). Dabei wird das Signal in der Regel durch die Bindung extrazellulärer Stimuli wie etwa Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren an spezifische Transmembranrezeptoren ausgelöst. Die Bindung kann eine Konformationsänderung des Rezeptors und die Aktivierung einer Signalkaskade im Inneren der Zelle induzieren. Bei der Signalkaskade spielen kleine Moleküle („second messenger“) wie etwa cAMP, Ca^{2+} , Lipide oder Proteine als Vermittler eine wichtige Rolle. Zusammen mit den Signaladapter-Proteinen bilden sie ein komplexes Netzwerk aus meist mehreren miteinander interagierenden Proteinen. Diese Interaktionen werden meist aus mehreren Modulen oder Domänen wie etwa SAM und SH3 (1.3.1 und 1.3.2) gebildet (Cohen et al., 1995; Pawson & Nash, 2003). Beide spielen eine zentrale Rolle in der Struktur von SASH1 und werden daher im Folgenden kurz vorgestellt.

1.3.1 Src Homology 3-Domäne (SH3-Domäne)

Die SH3-Domäne ist Teil von Signaladapter-Molekülen, Transkriptionsfaktoren und Gerüstproteinen. Sie wurde erstmalig von Mayer et al. als ein Peptidfragment in Src-Tyrosinkinasen beschrieben, welches als Bindungsstelle für prolinreiche Sequenzen mit einem PxxP-Kernmotiv dient (Mayer et al., 1988). Sie weist entlang unterschiedlicher Proteingruppen hohe Sequenzhomologien auf und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen.

SH3-Domänen bestehen aus 55 bis 70 Aminosäuren. Der Prototyp der SH3-Domäne besteht aus fünf anti-parallelen β -Strängen, welche zwei β -Faltblätter ausbilden (Larson & Davidson, 2000; Yu et al., 1992) (Abb. 5A).

SH3-Domänen sind nicht-katalytische Proteinmodule. Durch ihre Bindung an prolinreiche Motive können SH3-Domänen an eine Vielzahl verschiedener Proteine binden. Im humanen Genom finden sich allein 300 Proteine, welche eine SH3-Domäne aufweisen. Als Interaktionspartner können theoretisch 25 % des humanen Proteoms aufgrund ihres Besitzes prolinreicher Motive agieren.

Diese Vielzahl an Bindungs- und Interaktionspartnern resultiert in einem weiten Funktionsspektrum der SH3-Domänen. Sie spielen eine Rolle in einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse, wie etwa bei der intra- und extrazellulären Signalweiterleitung und bei der Reorganisation des Zytoskeletts mit den daraus resultierenden Abläufen wie etwa Zellbewegungen, Zellwachstum und -differenzierung. Außerdem wurde ihnen eine Rolle beim Proteintransport und der -degradierung, der Internalisierung von Membranrezeptoren sowie bei der Immunantwort zugeschrieben (Li, 2005; Mayer, 2001; Zarrinpar et al., 2003). SH3-Liganden besitzen PxxP-Bindungsmotive (P = invarianter Prolinrest, x = beliebiger Aminosäurerest), und werden anhand ihrer Konsensus-Sequenz in zwei Klassen, Klasse I und Klasse II-Liganden, unterteilt.

Zu den klassischen Bindepartnern der SH3-Domänen kommen Liganden mit atypischen Bindungsmotiven hinzu (Mongiovi et al., 1999; Tong et al., 2002). Außerdem wurden SH3-Domänen beschrieben, welche Proteine nur anhand ihrer Tertiärstruktur zu erkennen scheinen (Kaneko et al., 2008), und solche, welche Ubiquitin-enthaltende Strukturen erkennen und binden (He et al., 2007).

1.3.2 Sterile Alpha Motif-Domäne (SAM-Domäne)

Die SAM-Domäne ist ein aus ca. 70 Aminosäuren bestehendes Interaktionsmodul von Signalmolekülen, welches 1995 von C.P. Ponting beschrieben wurde. Ihren Namen erhielt die SAM-Domäne aufgrund ihrer helikalen Struktur und ihrer Rolle bei der geschlechtlichen Differenzierung in Hefen (Ponting, 1995). SAM-Domänen können sowohl Homo- und Heterodimere (Stapleton et al., 1999), aber auch Polymere ausbilden (Kim et al., 2001). Auf Strukturanalysen basierend, formen vier bis fünf alpha-Helices ein globuläres Bündel mit einem hydrophoben Kern (Peterson et al., 1997) (Abb. 5B).

SAM-Domänen enthaltende Proteine sind ubiquitär in der Zelle zu finden. SAM-Domänen sind in Gerüstproteinen, Transkriptions- und Translationsregulatoren, sowie Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen vertreten. So besitzen die transmembranären Rezeptor-Tyrosinkinasen der Ephrin-Familie (Eph) eine zytoplasmatische SAM-Domäne, über welche sie an der Signaltransduktion beteiligt sind (Stein et al., 1996; Stein et al., 1998). Das bislang einzig bekannte Protein, welches über eine extrazelluläre SAM-Domäne verfügt, ist das Stromal-Interaktionsmolekül 1 (STIM1) (Williams et al., 2002).

Neben der Bildung von Homodimeren können SAM-Domänen auch Heterodimere ausbilden. Dabei konnte neben der Bindung an SAM-negative Proteine auch eine Bindung an RNA beobachtet werden, wie bei dem Protein Smaug gezeigt werden konnte (Aviv et al., 2003; Green et al., 2003). Die Bindung der SAM-Domäne an die RNA erfolgt hierbei wahrscheinlich aufgrund positiv geladener AS-Reste innerhalb der SAM-Domäne.

SAM-Domänen besitzen außerdem onkogenes Potential wie im Fall von c-Abl (Golub et al., 1996), JAK2 (Lacronique et al., 1997) oder der chimären Fusion der aus dem TEL Transkriptionsfaktor gewonnenen SAM-Domäne in den bPDGF (bPDGF: basic platelet derived growth factor)-Rezeptor (Golub et al., 1994).

Zu den Proteinen, die sowohl eine SH3- als auch eine SAM-Domäne besitzen, gehört die Proteinfamilie der SLY-Adapter-Proteine.

1.3.3 Die Familie der SLY-Adapter-Proteine

Die Familie der SLY-Adapter-Proteine weist in Säugetieren bislang drei Mitglieder auf. SLY1 und Samsn1 wurden das erste Mal zeitgleich 2001 beschrieben (Beer et al., 2001; Claudio et al., 2001; Uchida et al., 2001). Entsprechend einer hohen Sequenzhomologie in den SH3- und SAM-Domänen wurde SASH1 als drittes Mitglied der Proteinfamilie identifiziert.

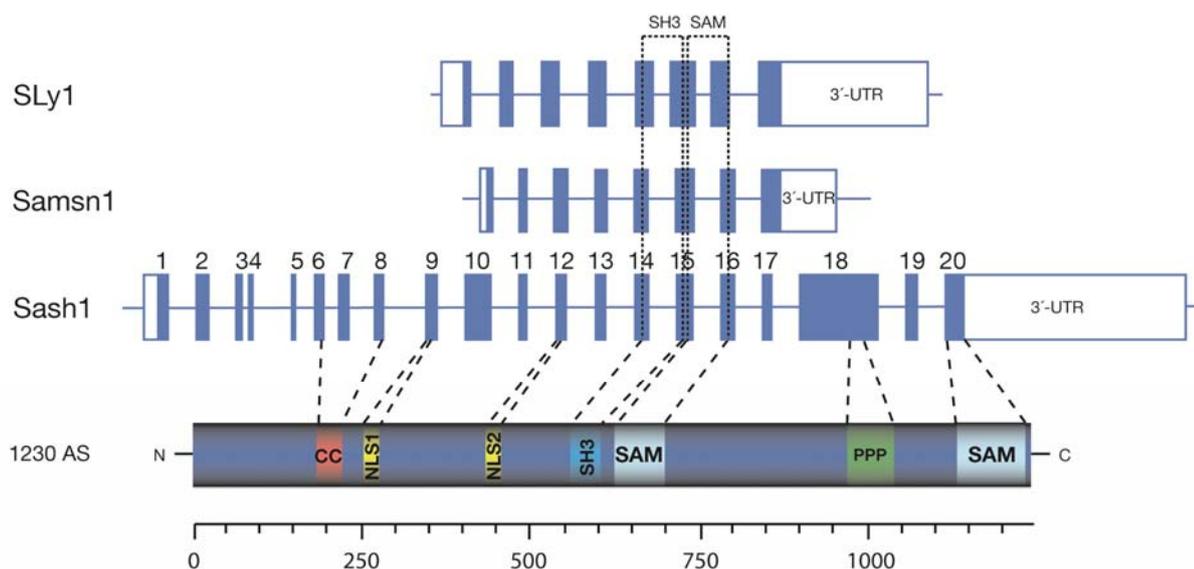


Abb. 4 Schematische Darstellung der Familie der murinen SLY-Adapter-Proteine.

SLy1 und *Samsn1* besitzen jeweils 8 Exons, während *SASH1* als größtes Mitglied der Proteinfamilie aus 20 Exons aufgebaut ist. Introngrößen entsprechen nicht dem wahren Verhältnis zu den Exongrößen. CC (coiled coil): zwei um sich gewundene alpha-Helices, NLS: nuclear localization sequence, PPP: prolinreiche Sequenz.

Tab. 1 Vergleich der SLY-Adapter-Proteine.

human	SLy1	Samsn1	SASH1
Genom. Locus	15.21 kb	36.61 kb	209.46 kb
Transkriptlänge	2623 bp	1770 bp	7685 bp/4407 bp
ORF	1143 bp	1086 bp	3244 bp
AS	380	361	1247
Molekülmasse	42 kDa	40 kDa	137 kDa
Exonanzahl	8	9	20
Chr. Region	Xq25-26.3	21q11.2	6q24.3
murin	SLy1	Samsn1	SASH1
Genom. Locus	15.10 kb	50.47 kb	163.85 kb
Transkriptlänge	2644 bp	1845 bp	7183 bp
ORF	1143 bp	1119 bp	3693 bp
AS	380	372	1230
Molekülmasse	42 kDa	42 kDa	136 kDa
Exonanzahl	8	8	20
Chr. Region	XA4	16C3.1	10A1

Die Angaben der Molekülmasse entsprechen der aus der Aminosäuren-Sequenz errechneten Größe. Von dem humanen SASH1-Transkript werden zwei Formen beschrieben. Beide sind hier angegeben (Zeller et al., 2003).

Alle drei Proteine weisen eine charakteristische Anordnung ihrer Module (Identifikation mittels SMART) auf. Sie besitzen eine Kernlokalisierungssequenz (NLS: nuclear localization sequence) am N-terminalen Ende, eine zentrale Src Homology 3-Domäne (SH3) und ein C-terminal gelegenes Sterile-Alpha-Motiv (SAM). Auf evolutionärer Ebene ist SASH1 ab den Knochenfischen und Vertebraten zu finden.

Die gemeinsame Rolle der neuen SLY-Proteinfamilie liegt vermutlich in der Bildung von hochmolekularen Signalkomplexen, die durch die Ausbildung von vielstufigen Protein-Protein-Interaktionen zahlreiche Möglichkeiten zur Positiv- und Negativ-Regulation bieten.

1.3.3.1 SH3 protein expressed in lymphocytes (SLy1)

Das in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Holzmann erstmals beschriebene Protein SLy1 wurde als Lymphozyten-spezifisch exprimiertes Adapter-Protein in murinen T-Zell-Lymphomen entdeckt (Beer et al., 2001) und ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert. Die Expression von SLy1 (auch als SASH3 bezeichnet) ist auf Zellen und Gewebe der lymphatischen Organe begrenzt. So zeigen *in situ*-Hybridisierungen eine hohe SLy1-Expression in der weißen Pulpa der Milz, in der Medulla und dem Kortex des Thymus, der B- und T-Zellregionen der Lymphknoten, sowie dem Knochenmark (Beer et al., 2001).

Die physiologische Funktion von SLy1 ist größtenteils ungeklärt. Astoul und ihre Mitarbeiter wiesen eine PKC- und PI3-Kinase-abhängige Serin-Phosphorylierung von SLy1 am Serinrest 27 (Ser27) nach einer T-Zell-Rezeptorstimulation nach (Astoul et al., 2003).

SLy1-defiziente Mäuse (SLy^{d/d}), welche eine verkürzte Form von SLy1, mit fehlender NLS-Sequenz und deletiertem Ser27, exprimieren, wiesen neben verkleinerten lymphatischen Organen Defekte in der Antigenrezeptor-vermittelten Lymphozyten-Aktivierung auf. Es kommt zu einer verminderten Proliferation von B- und T-Zellen sowie einer eingeschränkten Zytokinproduktion von T-Zellen. In einem Allograft-Modell transplanteder Herzen kam es zu einer verzögerten Abstoßung des Fremdgewebes und einem verlängerten Überleben des transplantierten Organs der SLy^{d/d}-Mutanten. Daraus lässt sich eine bisher noch nicht genauer definierte molekulare Rolle von SLy1 bei der vollständigen Aktivierung der humoralen Immunantwort ableiten (Beer et al., 2005). In einer kürzlich veröffentlichten Studie zur SLy1^{d/d}-Maus wurde eine reduzierte Notch-Aktivität zusammen mit einer unvollständigen Entwicklung von B-Zellen innerhalb der Marginalzone der Milz in den mutierten Mäusen festgestellt (Scheikl et al., 2009).

Obwohl die physiologische Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann man SLy1 eine Rolle in der Regulation der adaptiven Immunantwort zusprechen (Beer et al., 2005; Beer et al., 2001).

Tab. 2 Homologievergleich der kodierenden Aminosäure-Sequenzen der SLY-Adapter-Proteine.

	SLy1	Samsn1	SASH1
SLy1	95,0 %	40,3 %	15,7 % (42,3 %)
Samsn1	44,2 %	79,6 %	14,6 % (41,7 %)
SASH1	17,1 % (41,1 %)	15,5 % (42,6 %)	85,3 %

Bei *SASH1* wurden die C- und N-terminalen Überhänge bei den in Klammern stehenden Prozentzahlen entfernt. Für das Alignment wurde somit nur die funktionale Region (AS 377 bis 760), welche die homologe Sequenz zu *SLy1* und *Samsn1* aufweist, verwendet. Gelb: Vergleich humaner gegen murine Sequenzen; dunkelblau: Vergleich humaner Sequenzen, grau: Vergleich muriner Sequenzen.

SLy1 ist im humanen Genom in der Region q25-26.3 des X-Chromosoms zu finden. Innerhalb dieser Region finden sich zahlreiche Gene, die im Zusammenhang mit X-chromosomal vermittel-

ten Erkrankungen des lymphatischen Gewebes stehen. So führt eine erniedrigte CD40L-Expression zur Deregulation der Proliferation lymphatischer Zellen (Coffey et al., 1998), eine Mutation in *SH2D1A* zum sogenannten Hyper-IgG-Syndrom (Ramesh et al., 1995).

1.3.3.2 SAM domain, SH3 domain and NLS 1 (Samsn1)

Das von Claudio et al. (HACS1: hematopoietic adapter containing SH3 and SAM domains 1) und kurz darauf von Uchida et al. (Nash1: hematopoietic adapter containing SH3 and SAM domains 1) erstmals beschriebene Protein Samsn1 gehört aufgrund seiner starken Sequenzhomologie zu SLY1 zur Familie der SLY-Signaladapter-Moleküle (Claudio et al., 2001; Uchida et al., 2001).

Expressionsanalysen zeigten eine starke Expression von Samsn1 in hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen, Progenitorzellen, T-Zellen und Mastzellen. Die Expression in den humanen Geweben Herz, Lunge, Plazenta und Gehirn ist dagegen sehr gering (Claudio et al., 2001; Uchida et al., 2001). Expressionsanalysen unterschiedlicher maligner Knochenmarkserkrankungen wiesen eine Überexpression von Samsn1 in myeloider Leukämie, Lymphomen und Myelomen auf (Zhu et al., 2004). Darüber hinaus liegt *Samsn1* in einer chromosomalen Region, welche in Krankheitsbildern hämatopoetischen Ursprungs häufig Translokationen beherbergt (Mitelman et al., 1997).

1.3.3.3 SAM and SH3 domain containing protein 1 (SASH1)

Das Protein SASH1 besitzt wie die zwei anderen Mitglieder der Proteinfamilie die konservierten Proteinmodule SH3 und SAM. SASH1 ist jedoch mit ca. 135 kDa das größte der drei Proteine. Es besitzt neben der zentralen, homologen Region C- und N-terminale Überhänge, auf welchen eine zweite NLS-Sequenz, eine „coiled coil“-Domäne (N-terminal), sowie eine weitere SAM-Domäne (C-terminal) zu finden sind (Abb. 4). Die Expression von SASH1 ist ubiquitär, weist jedoch eine besonders hohe Expressionsrate in Brust, Lunge, Schilddrüse, Milz, Plazenta und Thymus auf (Zeller et al., 2003). Aufgrund von zwei Poly-Adenylierungssequenzen (+4407 bp und +7685 bp) in der 3'-UTR-Region von SASH1 wurden zwei Spleißvarianten beschrieben; eine 4,4 kb große Variante, welche eine starke Expression in allen Geweben zeigt und eine 7,5 kb große Spleißvariante, welche ebenfalls eine ubiquitäre, jedoch schwächere Expression aufweist. Im Gegensatz zum kleineren Transkript findet sich keine Expression des größeren Transkripts im Gewebe des Gehirns. Es konnte ebenfalls keine Expression beider SASH1-Transkripte in Lymphozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003).

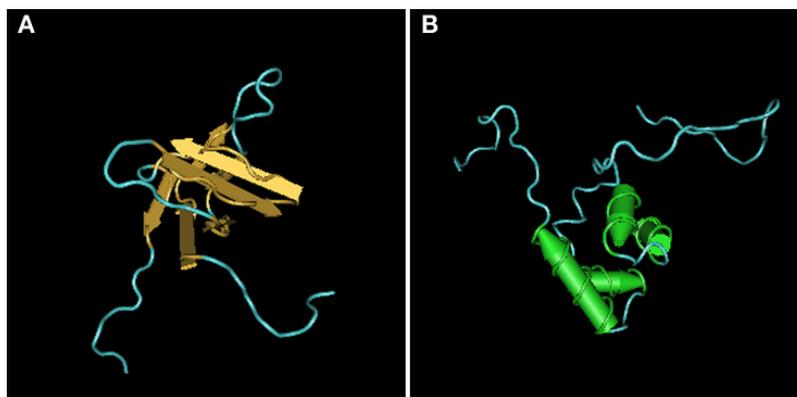


Abb. 5 Struktur der humanen SH3- und SAM-Domäne von SASH1.

A SH3 Domäne; Struktur entspricht 73 AS (10.1.1). **B** SAM Domäne; Struktur entspricht 97 AS (10.1.2). Quelle: Structural Genomics PROTEOMICS INITIATIVE (RSGI).

1.3.3.3.1 Physiologische Funktion

Die physiologische Funktion von SASH1 konnte bisher noch nicht geklärt werden. Laboreigene *in vitro*-Daten zur Bestimmung der SASH1-Lokalisation zeigen in unterschiedlichen epithelialen Zelllinien eine Anreicherung von transient exprimiertem SASH1 in F-Aktin-reichen Strukturen wie etwa Lamellipodien und eine Ko-Lokalisierung mit dem Signalprotein Cortactin (Abb. 6). Cortactin weist eine ubiquitäre Expression auf und zählt zu den F-Aktin-bindenden Proteinen (1.4.3). Die Ko-Lokalisierung von SASH1 mit Cortactin lässt die Vermutung zu, dass SASH1 eine direkte oder indirekte Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts übernimmt.

Des Weiteren konnten Lindvall und Mitarbeiter eine negative Regulation der SASH1-Expression durch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) nachweisen. Nach der *in vitro*-Stimulation mit Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA)+Ionomycin kam es zu einer Reduktion der SASH1-Expression in primären B-Lymphozyten (Lindvall et al., 2005). Auch für SLy1 wurde eine Regulation der Expression durch PKC beschrieben (Astoul et al., 2003). Diese Befunde sind besonders hervorzuheben, da PKC β II und PKC α eine Rolle bei der Entstehung von Kolorektalkarzinomen spielen (Pysz et al., 2009; Zhang et al., 2004b). Die Regulation der SASH1-Expression nach der PKC-Stimulierung konnte jedoch in laboreigenen Untersuchungen in epithelialen Zellen und in T- und B-Zelllinien nicht verifiziert werden (Rimkus et al., 2006).

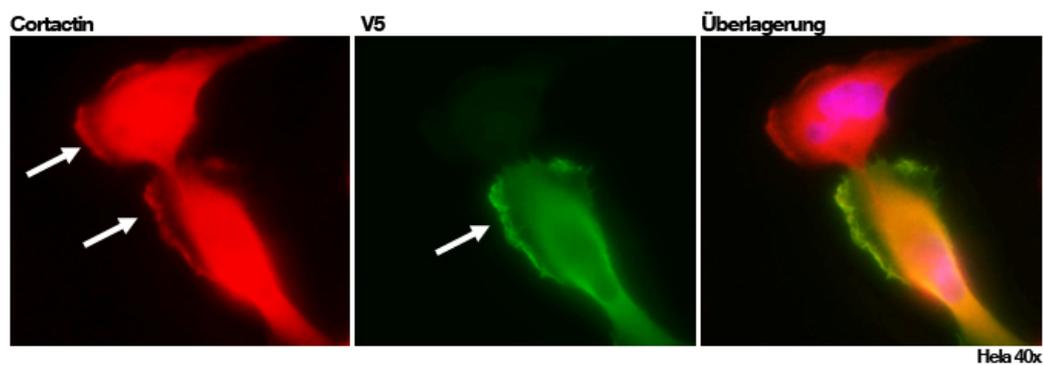


Abb. 6 Ko-Lokalisierung von V5-markiertem SASH1 und Cortactin in Lamellipodien und Membran-„Ruffles“.
 HeLa-Zellen wurden mit V5-markiertem SASH1 transfiziert und mit anti-V5-Ak angefärbt (grün). Endogenes Cortactin wurde ebenfalls fluoreszenzmarkiert (rot). Pfeile weisen auf die Anreicherungen von V5-FL-SASH1 und Cortactin in F-Aktin-reichen Membranstrukturen hin. 400-fache Vergrößerung.

Darüber hinaus wird in der Literatur eine Rolle von SASH1 im zentralen Nervensystem diskutiert. In Mausmodellen der zerebralen Malaria wurde eine starke Überexpression von SASH1 beschrieben (Oakley et al., 2008). Die zerebrale Malaria ist eine durch das *Plasmodium falciparum* ausgelöste Form der Malaria. Dabei fällt die erkrankte Person in ein Koma. Das Koma tritt auf, nachdem die mit Parasiten befallenen Erythrozyten an dem Endothel von Blutgefäßen vermehrt haften bleiben und somit zur Einengung des Blutgefäßlumens führen. Geschieht dies in Blutgefäßen des Gehirns, kommt es zu Gerinseln mit der Folge eines Komats.

Roth und Mitarbeiter wiesen eine Zunahme der SASH1-Expression im medial-basalen Hypothalamus während der Ausbildung der Geschlechtsreife in weiblichen Primaten nach. Die Expression von SASH1 steht hierbei während der Geschlechtsreife bei Säugern unter neuroendokriner Kontrolle (Roth et al., 2007).

SASH1 wird auch mit einer vererbaren Pigmentstörung in der Haut, der sogenannten Multiplen Lentiginosis (auch Leopard-Syndrom), in Zusammenhang gebracht. Die Arbeitsgruppe von Dr. Theresa Pacheco (Dermatologie der Universität von Colorado, USA) konnte in betroffenen Fami-

lien eine Keimbahnmutation innerhalb des *SASH1*-Lokus auf Chromosom 6q identifizieren. Hierbei handelt es sich um eine Punktmutation [Ser413] im *SASH1*-Gen (Persönliche Mitteilung).

1.3.3.3.2 Interaktionspartner

Bislang gibt es nur wenige Hinweise auf mögliche Interaktionspartner von SASH1, weshalb auch die physiologische Funktion weitestgehend spekulativ bleibt. Aufgrund der Ko-Lokalisierung mit Cortactin in F-Aktin-reichen Strukturen und aufgrund einer direkten Ko-Immunitäzitation konnte Cortactin als direkter Interaktionspartner identifiziert werden (laboreigene Daten). Welche Rolle dieser Interaktion jedoch zukommt, ist noch ungeklärt, da Cortactin selbst in zahlreichen unterschiedlichen Mechanismen der Zelle eine Rolle spielt (1.4.3).

In Expressionsstudien über 14-3-3 σ , einem p53-Effektorprotein, wurde SASH1 als ein potentieller direkter oder indirekter Interaktionspartner von 14-3-3 σ identifiziert (Benzinger et al., 2005; Dubois et al., 2009). 14-3-3 σ gehört zu den Phosphoserin-bindenden Proteinen. Es wird als einziges der sieben 14-3-3-Isoformen in Epithelzellen exprimiert. 14-3-3 σ wird eine Rolle bei der Krebsentstehung zugeschrieben. So kommt es in Mamma- und Ovarialkarzinomen, Prostata-, Haut-, Lungen- und Leberkrebs zu einer Herunterregulation der 14-3-3 σ -Expression aufgrund epigenetischer CpG-Methylierung (Ferguson et al., 2000; Iwata et al., 2000; Lodygin et al., 2004; Mhawech et al., 2005; Osada et al., 2002).

In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte eine c-Met-abhängige Phosphorylierung von Cortactin und SASH1 an Tyrosinresten nachgewiesen werden (Guo et al., 2008). *c-met* ist ein bekanntes Onkogen.

1.3.3.3.3 SASH1 in der Tumorgenese

In vielen Arten solider Tumoren wie etwa Mammakarzinome (Rodriguez et al., 2000) Gebärmutterhalskrebs (Acevedo et al., 2002), Bauchspeicheldrüsenkrebs (Barghorn et al., 2001), Prostatakrebs (Srikantan et al., 1999), Kolorektal- (Alcock et al., 2003) und Ovarialkarzinomen (Shridhar et al., 1999; Sukumar et al., 1999) wurde ein Verlust der chromosomalen Region 6q24 beschrieben, in welcher SASH1 lokalisiert ist.

Die erste Beschreibung von SASH1 im Zusammenhang der Tumorgenese erfolgte innerhalb einer Studie von primären Mammakarzinomen (Zeller et al., 2003). Hierbei wurde eine LOH-Analyse der Region 6q23-25 vorgenommen, welche als besonders anfällig für Mutationen in primären Mammakarzinomen gilt (Fujii et al., 2002; Rodriguez et al., 2000). In 30 % primärer Mammakarzinome wurde ein LOH in der Region des *SASH1*-Lokus festgestellt. Es wurde ebenfalls eine starke Herunterregulation von SASH1 in 74 % des untersuchten Tumorgewebes im Vergleich zu gesundem Brustgewebe festgestellt (Zeller et al., 2003). Auch *in vitro*-kultivierte Brustkrebszelllinien wiesen eine erniedrigte SASH1-Expression auf. Des Weiteren wurde eine Reduktion der SASH1-Expression in Lungen- und Schilddrüsenkrebs beschrieben (Zeller et al., 2003). Der gefundene LOH in primären Mammakarzinomen korrelierte mit einer schlechten Überlebensrate der Patienten und einem verstärkten Tumorwachstum. Es wurden jedoch keine tumorrelevanten Mutationen in der kodierenden Sequenz von *SASH1* gefunden. Es wird daher angenommen, dass der erniedrigten SASH1-Expression eine Promotormethylierung oder epigenetische Faktoren zugrunde liegen. Ein LOH ist ein klassisches Kennzeichen von Tumorsuppressorgenen (Knudson, 1971), weshalb *SASH1* als ein potentielles Tumorsuppressorgen bei der Entstehung von Mammakarzinomen eingestuft wurde (Zeller et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe „Onkogenomik“ von Prof. Dr. Christoph A. Klein, Universität Regensburg, isoliert disseminierte Tumorzellen (DTCs) primärer Brusttumore mittels Einzelzell-Technologie aus dem Knochenmark und untersucht diese auf charakteristische Mutationen (Klein, 2008; Klein &

Holzel, 2006). DTCs weisen generell eine geringere Anzahl an genetischen Aberrationen als Primärtumore auf. Interessanterweise haben Mitarbeiter der Arbeitsgruppe einen LOH in der *SASH1*-Region in 44 % der untersuchten DTCs von Brustkrebspatientinnen (n=41) gefunden. Außerdem kam es zu einer deutlichen Herunterregulation der *SASH1*-mRNA in den analysierten DTCs im Vergleich zu mikrodissiziertem Normalgewebe. Die Ergebnisse von Zeller et al. konnten durch die Arbeitsgruppe Klein in den Primärtumoren ebenfalls bestätigt werden. So wurde eine signifikante Herunterregulation von *SASH1* in 25 % der Primärtumore gefunden (Persönliche Mitteilung). Diese Daten weisen darauf hin, dass es sich bei der *SASH1*-Deletion um eine frühe Aberration in der Tumorprogression des Mammakarzinoms handelt. Laboreigene Untersuchungen der *SASH1*-Expression in murinen Darmtumoren konnten für murine Tumore ebenfalls einen LOH in der Region des *SASH1*-Lokus, sowie eine Herunterregulation der *SASH1*-Expression in humanen Tumorgeweben nachweisen (Rimkus et al., 2006). So wurde in 15 % von auf einer *K-Ras*^{V12G}-Mutation beruhenden murinen Läsionen ein LOH festgestellt (Abb. 7).

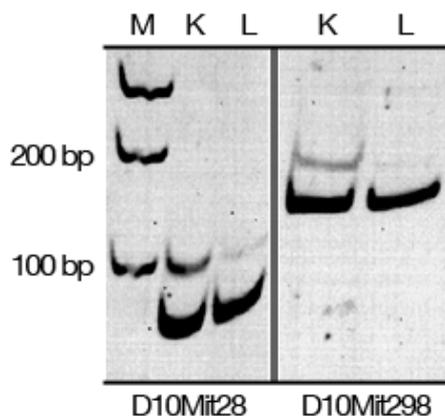


Abb. 7 LOH des *SASH1*-Lokus in murinen Läsionen des Darms. Die den *SASH1*-Lokus flankierenden Mikrosatelliten-Marker D10Mit28 und D10Mit298 auf dem murinen Chr. 10 wurden zu einer LOH-Analyse in Darmtumoren eingesetzt. Hierbei wurde in 15 % der untersuchten Tumore ein LOH festgestellt. M: Marker K: Kontrollgewebe L: Läsion.

In humanen Kolonkarzinomen war *SASH1* in den Tumorstadien UICC II (Infiltration des Primärtumors in alle Schichten der Darmwand oder in umliegende Organe, kein Lymphknotenbefall, keine Fernmetastasen), III (Lymphknoten sind befallen) und IV (Fernmetastasen sind vorhanden) sowie in Lebermetastasen deutlich herunterreguliert (Rimkus et al., 2006). Adenome und UICC I (Frühstadium, kleiner, lokaler Tumor) Tumorstadien zeigen keine signifikant erniedrigte *SASH1*-Expression (Abb. 8). Wie in der Studie von Zeller et al. konnte auch hier die erniedrigte *SASH1*-Expression in der multivariaten Analyse als ein negativer Prognose-Parameter für das Patientenüberleben definiert werden. Die erniedrigte *SASH1*-Expression korreliert zudem mit der Bildung von metachronen und synchronen Metastasen (Rimkus et al., 2006). Die spät in der Tumorgenese des Kolonkarzinoms erfolgende Herunterregulation der *SASH1*-Expression deutet darauf hin, dass *SASH1* eine Funktion in der Tumorprogression und bei der Metastasierung zukommt.

Des Weiteren wurden LOHs in der chromosomalen Region des *SASH1*-Lokus bei einer Untersuchung zur genetischen Prädisposition von Lungenkrebspatienten (Bailey-Wilson et al., 2004), in malignen Mesotheliomen (Bell et al., 1997) und in endokrinen Pankreastumoren (Barghorn et al., 2001) nachgewiesen. Die *SASH1*-Expression in zirkulierenden Leukozyten scheint durch Rauchen beeinflusst zu werden. So kommt es bei starken Rauchern durch einen erhöhten Cotinin-Gehalt (Abbauprodukt des Nikotins) im Plasma zu einer erhöhten *SASH1*-Expression in den Leukozyten (Charles et al., 2008). Wie hierbei der prokarzinogene Einfluss von *SASH1* zu bewerten ist, bleibt jedoch vorerst unklar.

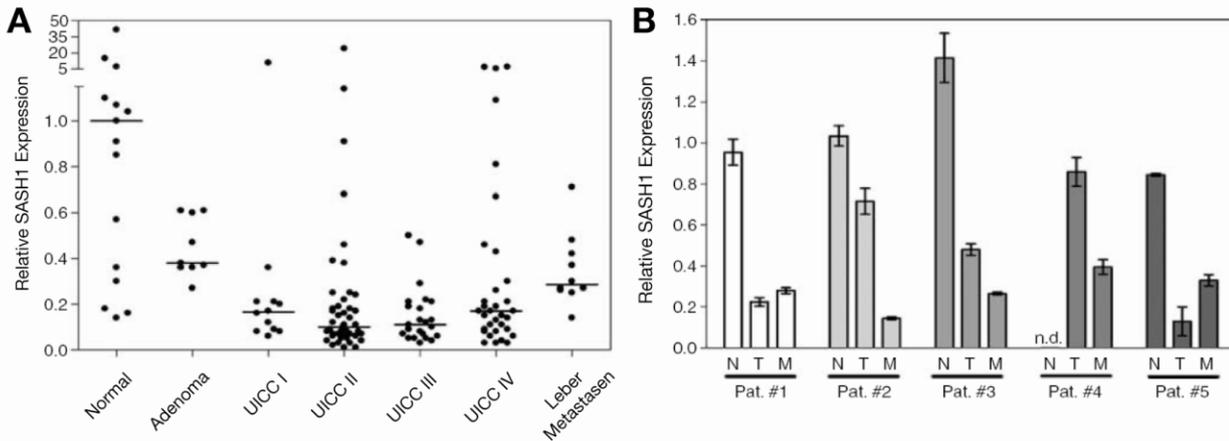


Abb. 8 SASH1-Expression in Kolonkarzinomen.

Relative SASH1-Expression in unterschiedlichen Tumorstadien des Kolonkarzinoms, durch qRT-PCR ermittelt und auf die relative SASH1-Expression in Normalgewebe normalisiert (n=1). **A** Verglichen zu Normalgewebe ist die SASH1-Expression in Tumorgeweben der UICC Stadien II (p=0.031), III (p=0.047) und IV (p=0.043) sowie in Lebermetastasen (p=0.030) signifikant herunterreguliert. Analysiert wurden eine Gesamtzahl von n=147 Gewebeprobe. **B** Die relative Expression von SASH1 wurde in Normal-, Primärtumor- und Metastasengewebe von fünf individuellen Kolonkarzinom-Patienten untersucht. Es kommt bereits im Primärtumor zu einer starken Erniedrigung der Expression, die in den Metastasen noch verstärkt wird. Von Patient #4 war kein Normalgewebe vorhanden (Rimkus et al., 2006).

Die Daten zu Mamma- und Kolonkarzinomen legen nahe, dass die SASH1-Erniedrigung erst spät innerhalb der Tumorprogression und bei der Metastasierung erfolgt. Zusätzlich sprechen auch die Daten der Analyse der disseminierten Tumorzellen für diese Hypothese. Um erfolgreich metastasieren zu können, muss eine Tumorzelle in der Lage sein, sich von dem invasiven Primärtumor zu lösen, in die Blut- bzw. Lymphgefäße einzuwandern und durch die Anhaftung an das Gefäßlumen wieder in umliegende Organe auszutreten. Für jeden dieser Schritte ist die Motilitätsfähigkeit der Tumorzelle entscheidend. Bei der Motilität spielt das Aktinzytoskelett eine tragende Rolle. In laboreigenen Vorarbeiten bezüglich SASH1 und einem möglichen Einfluss auf das Zytoskelett und das Migrationsverhalten von Zellen wurde eine Erhöhung des F-Aktin Gehalts in SASH1-überexprimierenden Zellen nachgewiesen (Abb. 9).

SASH1 ko-fraktioniert mit dem Aktinzytoskelett und induziert die Aktinpolymerisation. Das Onkoprotein Cortactin, mit welchem SASH1 interagiert, aktiviert ebenfalls die Polymerisation von Aktinfilamenten (Weaver, 2008). Es spielt eine wichtige Rolle bei tumorbiologisch wichtigen Prozessen wie etwa der Zellmigration und der Kontrolle des EGFR-Signalwegs (Timpson et al., 2005).

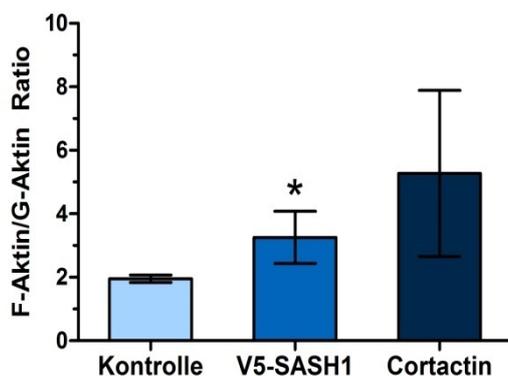


Abb. 9 Überexpression von V5-markiertem SASH1 erhöht den F-Aktin Gehalt in der Zelle.

Quantifizierung der Ko-Fraktionierung von V5-markiertem SASH1 mit dem Aktinzytoskelett. SASH1 bzw. Cortactin-transfizierte Hek293-Zellen wurden in einem F-Aktin-stabilisierenden Puffer lysiert und bei 100.000 g abzentrifugiert. In vier unabhängigen Versuchen führte die Überexpression von SASH1 zu einer signifikanten Erhöhung des F-Aktin Gehalts in der Zelle (p<0.05). Als Kontrollen wurden ein leerer Vektor und Cortactin verwendet, dessen F-Aktin-stabilisierende Wirkung bereits beschrieben wurde (Weaver, 2008).

SASH1 wurde in Vorarbeiten als Bestandteil von Strukturen des kortikalen Zytoskeletts, sogenannten Lamellipodien, identifiziert. Daher soll im Folgenden kurz auf den Aufbau des Zytoskeletts eingegangen werden.

1.4 Dynamik und Struktur des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen

Die Metastasierung eines Tumors ist ein mehrstufiger Prozess. Tumorzellen müssen in der Lage sein, sich vom Tumorsitus zu lösen und in das den Tumor umgebende Gewebe einzudringen, um über Blut- und Lymphgefäße in entfernte Gewebe transportiert zu werden. Nur wenige zirkulierende Tumorzellen besitzen dann die Fähigkeit, auch aus den Gefäßen in die umliegenden Organe zu extravasieren. Für jeden dieser Schritte ist die Motilität der Tumorzelle Grundvoraussetzung. Die Motilität einer Zelle wird durch die Reorganisation ihres Zytoskeletts reguliert.

Das Zytoskelett der Zelle ist zum einen für die mechanische Stabilisierung und die äußere Formgebung der Zelle verantwortlich. Zum anderen handelt es sich bei dem aus Proteinen aufgebauten Netzwerk im Zytoplasma einer jeden Zelle um eine hoch dynamische und flexible Zellstruktur, die Grundbaustein für die aktive Bewegung von Zellen und deren intrazellulären Transport ist. Das Zytoskelett spielt zudem eine tragende Rolle bei sensorischen Funktionen wie interzellulären Signalübertragungen.

In eukaryotischen Zellen erfolgt der Aufbau des Zytoskeletts durch Filamente, welche in drei Klassen eingeteilt werden - Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli (Abb. 10).

Die Mikrofilamente, auch Aktinfilamente genannt, sind lineare Protein-Polymere mit einem Durchmesser von ~7 nm. Ihre Fasern bestehen aus zwei helikal miteinander verwundenen Aktineinzelfäden, welche durch die Polymerisation des Strukturproteins Aktin gebildet werden. Sie kommen in der Zellmorphologie, -teilung und -beweglichkeit sowie bei der Interaktion mit unterschiedlichsten zell- oder gewebestabilisierenden Proteinen (wie etwa Cadherine, Integrine, Spektrin) zum Einsatz. Durch netzartige Anordnungen unterhalb der Plasmamembran und in Membranausstülpungen (Mikrovilli, Filo-, Pseudopodien) stabilisieren sie die äußere Form der Zelle. Sie gehen zudem Bindungen mit membranständigen Proteinen der Adhäsionsmoleküle ein und stabilisieren so Zell-Zell-Kontakte.

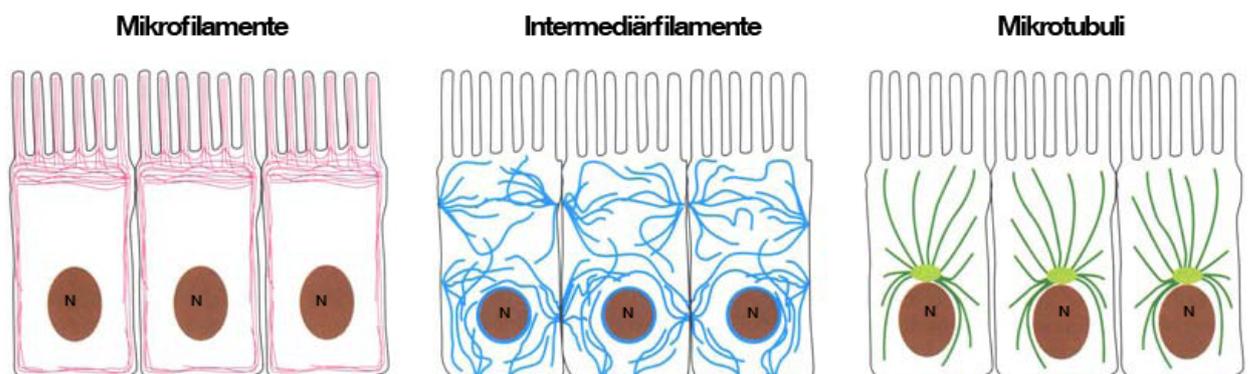


Abb. 10 Schema über die drei Klassen der Filamente.

Die drei Klassen weisen unterschiedliche Strukturen und eine charakteristische Verteilung in der Zelle auf (Alberts, 1994).

In Muskelzellen sind Aktinfilamente zusammen mit den Myosinfilamenten die molekulare Grundlage für die Zell-Kontraktion. Intermediärfilamente besitzen einen Durchmesser von ~10 nm und sind extrem stabil mit einer hohen Zugfestigkeit. Sie bilden ein Stützgerüst und dienen so hauptsächlich der mechanischen Stabilisierung der Zelle. Mikrotubuli bilden die dritte Klasse der Zyto-

skelettproteine. Sie bilden aus alpha- und beta-Tubulinen bestehende, polare Hohlzylinder mit einem Durchmesser von ~25 nm. Über sie laufen Transportvorgänge im Zytosol der Zelle. Dabei kommen die Motorproteine Dynein und Kinesin zum Einsatz. Eine wichtige Funktion ist der Aufbau der Mitosespindel, an welcher die replizierten Chromosomen bei der Zellteilung an die Kernpole gezogen werden.

Außer den drei Klassen der Filamente spielen sogenannte Adapter-Proteine eine wichtige Rolle bei dem Aufbau und der Regulation des Zytoskeletts. Sie bringen Zytoskelettstrukturen in räumliche Nähe zueinander und verbinden sie miteinander.

1.4.1 Aktinpolymerisation

Die Aktinpolymerisation ist der zentrale Mechanismus der Zellbewegung und bezeichnet die Verlängerung der Aktinfilamente (Theriot, 1994). Der Grundbaustein bildet hierbei die monomere Form des Aktins, das sogenannte globuläre Aktin (G-Aktin). Es ist 42 kDa groß, ubiquitär vertreten und hoch konserviert. Es wird in einer ATP-gebundenen Form und mit Hilfe von Mg^{2+} an die (+)-Enden von Aktinfilamenten gebunden (Elongation), durch ATP-Hydrolyse fällt es von den Filamenten ab (Depolymerisation) („treadmilling“). Die *de novo*-Bildung und auch die Elongation der helikalen Filamente sind keine spontanen Prozesse. Sie benötigen eine Reihe von regulatorischen Aktin-bindenden Proteinen (Nukleationsfaktoren). Zu den prominentesten Vertretern dieser Proteingruppe gehören der Arp2/3 (actin-related protein)-Komplex und Formin (Abb. 11). Der durch WASP, N-WASP, dem SASH1-Interaktionspartner Cortactin oder Scar/WAVE1-3 aktivierte Arp2/3-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten (Arp2, Arp3, ARPC1-5). Durch die seitliche Bindung an bereits bestehende Aktinfilamente ermöglicht er deren Verzweigung. Die Bindung von Arp2/3 an Aktin induziert die Filament-Verzweigung im 70° Winkel (Higgs & Pollard, 2001).

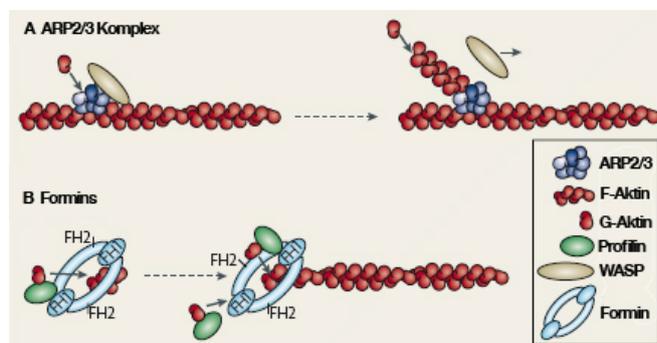


Abb. 11 Die zwei Hauptmechanismen zur Bildung von Aktinfilamenten.

A Der durch WASP aktivierte Arp2/3-Komplex unterstützt die *de novo*-Synthese und die Elongation von Aktinfilamenten. Durch seitliche Bindung an bereits bestehende Aktinfilamente induziert er die Filament-Verzweigung im 70° Winkel. **B** Formine unterstützen zusammen mit Profilin die Ausbildung linearer Aktinfilamente (Mattila & Lappalainen, 2008).

Bei der *de novo*-Bildung der Aktinfilamente bilden die Polypeptide Arp2 und 3 ein Aktin-Dimer als Plattform, von welchem die Elongation aus gestartet wird. Formin steuert dagegen nur die lineare Aktinpolymerisation wie etwa in Filopodien. Es bildet ein Dimer über seine FH2 (Formin Homology 2)-Domäne am (+)-Ende der Filamente aus. Die FH2-Domäne steuert durch die Bindung von Profilin an die FH1-Domäne auch die Aktinpolymerisation.

Nach der initialen Gruppierung von Aktin-Dimeren und Aktin-bindenden Proteinen erfolgt die Elongation schnell. Sie kann jedoch durch unterschiedliche Stimuli wie etwa Erhöhung des G-Ak-

tingehalts, die Erweiterung der (+)-Enden durch neu eingeführte Verzweigungen, Filament-Neubildung und die Inhibition der Depolymerisation vorangetrieben werden (Chhabra & Higgs, 2007).

G-Aktin kann an beiden Enden ab- und angebaut werden. Durch das schnell wachsende (+)-Ende und das langsamer wachsende (-)-Ende besitzen Aktinfilamente eine Polarität. In Nicht-Muskelzellen wird die Aktinpolymerisation durch die Bindung von Profilin an ATP-gebundenes G-Aktin beschleunigt (Chhabra & Higgs, 2007). Dieser Komplex agiert ausschließlich mit (+)-Enden der Filamente. Die Elongation wird durch die Bindung von CPs (capping proteins) wie etwa Gelsolin gestoppt, wogegen die Depolymerisation durch einen ADF/Cofilin-Komplex, welcher bevorzugt an ADP-gebundene Aktin-Formen bindet, positiv beeinflusst wird. Die durch Rac1 regulierte LIM-Kinase steuert wiederum die Aktivität von ADF/Cofilin durch reversible Phosphorylierung von Serinresten in der N-terminalen Region (Disanza et al., 2005).

Aktin ist nicht nur im Zytosol, sondern auch im Nukleus der Zelle als monomere Form und als Filament zu finden. Im Nukleus ist es zusammen mit Aktin-bindenden Proteinen bei der Genregulation, bei Prozessen wie mRNA-Regulation und dem Chromatin-Umbau, beteiligt (Gieni & Hendzel, 2009).

1.4.2 Das Zytoskelett in der Zellmigration

Zellmigration ist ein zentraler Mechanismus. Sie tritt nicht nur in physiologischen Prozessen wie etwa der Embryogenese, Immunantwort, Wundheilung und Regenerierung auf, sondern auch in pathologischen Prozessen wie Krebs und bei der Metastasierung. Die zelluläre Fortbewegung erfolgt durch sich wiederholende Schritte. Der Aktinpolymerisation in der Lamellipodienfront folgen die Adhäsion, die Akto-Myosin-Kontraktion im hinteren Teil der Zelle und die finale Deadhäsion. Hierbei spielen die dynamische Gestaltung von Aktin und die daraus hervorgehenden Strukturen wichtige Rollen (Abb. 12).

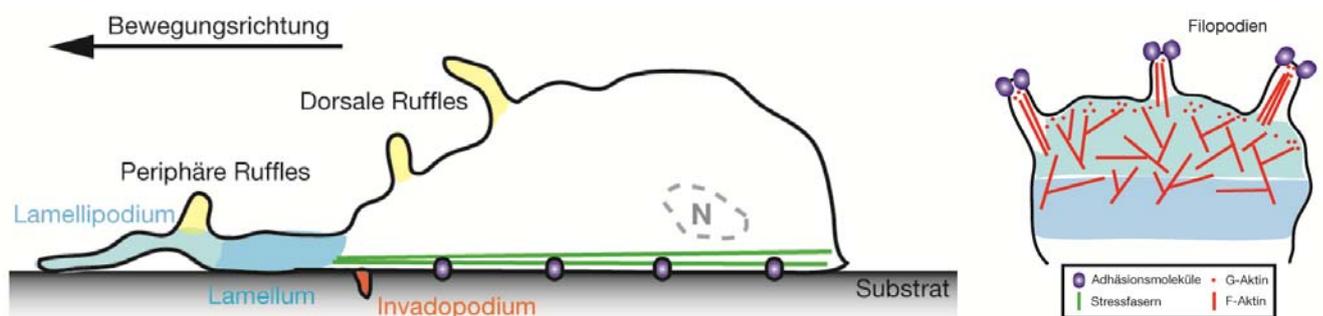


Abb. 12 Die Zellmigration hängt von unterschiedlichen Aktinfilament-Strukturen ab.

Die Strukturen einer migrierenden Zelle werden von Lamellipodien und Filopodien gebildet. „Ruffles“ sind dorsale Strukturen, Invadopodien ventrale. Lamellipodien sind nur schwach adhären zum Substrat. Aktinfilamente im Lamellipodium sind kürzer und verzweigter als im Lamellum. Periphere „Ruffles“ sind Teil der Zellmigration, dorsale „Ruffles“ haben auch eine Funktion bei der Rezeptor-Internalisierung und Makropinozytose (Buccione et al., 2004). N: Nukleus.

Lamellipodien sind dünne, blattähnliche Ausläufer aus direkt unterhalb der Plasmamembran verzweigten, parallel zum Substrat liegenden Aktinfilamenten (Ridley et al., 2003). Sie bilden einen Leitsaum, aus welchem Membran-„Ruffles“ (blattartige Membranausstülpungen bzw. -kräuselungen) und Filopodien hervortreten können. Membran-„Ruffles“ sind zu den Lamellipodien engverwandte Strukturen. Sie entstehen aus der Lamellipodien-Retraktion, wenn nicht-adhärenente Lamellipodien von der Zellfront der polarisierten Zelle entlang der dorsalen Zelloberfläche wellenförmig in Richtung Zellkern wandern. Sie werden generell als Indikator des retrograden Flusses F-Aktin-

reichen Materials angesehen (Borm et al., 2005). Fingerförmige Filopodien besitzen parallel angeordnete, gebündelte Aktinfilamente und befinden sich an der Front des Leitsaumes. In beiden Strukturen, den Lamellipodien und den Filopodien, liegt das (+)-Ende nahe der Plasmamembran. Durch die Aktinpolymerisation schieben sich die Aktinfilamente innerhalb der Zelle nach vorne und bilden somit Membranausstülpungen. Stressfasern sind aus antiparallelen Aktinfilamenten gebildete kontraktile Elemente in Nicht-Muskelzellen.

Filopodien sind nicht nur an der Zellmigration, sondern auch an Wundheilungsprozessen, der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, der Chemotaxis und Embryogenese beteiligt (Faix & Rottner, 2006; Gupton & Gertler, 2007). Sie besitzen Signalrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, wodurch sie wie Fühler der Zelle ihre Umgebung abtasten können. In den Ausläuferspitzen werden außerdem häufig die Adhäsionsmoleküle der Integrin- und Cadherinfamilie gefunden, welche wichtig bei der Zelladhäsion und -migration sind (Mattila & Lappalainen, 2008).

Weitere Aktinstrukturen, auf die jedoch nicht näher eingegangen werden soll, sind Mikrovilli, welche auf vielen Zelltypen wie etwa zirkulierenden Lymphozyten und als Struktur auf der dorsalen Oberfläche von kultivierten Zellen und Darmepithelzellen zu finden sind. Invadopodien sind ventrale Membranausstülpungen, die sich in das Substrat erstrecken. Sie können proteolytischen Matrix-Abbau betreiben und tragen somit zu dem invasiven Potential von Tumorzellen bei (Dustin, 2005). „Adherens junctions“ sind durch homophile Interaktion von Cadherinen vermittelte Zell-Zell-Adhäsionen. Ihre Kernkomponenten sind transmembranäres Cadherin sowie zwei zytoplasmatische Proteine (α - und β -Catenin) (Aberle et al., 1994; Nathke et al., 1994).

In der Tumorgenese spielen Strukturen der Zellmigration in der Tumorprogression und bei der Metastasenbildung eine zentrale Rolle.

1.4.3 Cortactin

Cortactin, welches mit SASH1 biochemisch interagiert, ist ein monomeres 63-65 kDa großes Protein, welches als Substrat der Tyrosinkinase v-Src entdeckt wurde (Kanner et al., 1990). Es kommt in zwei unterschiedlichen Konformationen vor und weist in unstimulierten Zellen eine Zytosol-Lokalisierung auf. Die sogenannte offene Form entspricht der schematischen Darstellung in Abb. 13. Am N-Terminus beginnend folgt auf die NTA (N-terminal acidic domain)-Domäne eine sechseinhalbfache Sequenzwiederholung. Dabei ist die vierte Wiederholungssequenz eine Bindestelle für F-Aktin. Cortactin-Konstrukte, denen die NTA oder die vierte Wiederholungssequenz fehlen, können nicht an die Zellperipherie rekrutiert werden (Weed et al., 2000). Die Bindungen an F-Aktin wirken stabilisierend auf das Aktinnetzwerk. Nach einer alpha-helikalen Domäne folgt eine prolinreiche Region, in welcher zahlreiche Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden. Am C-terminalen Ende findet sich zum Abschluss eine SH3-Domäne, welche als Bindedomäne zahlreicher prolinreicher Interaktionspartner von Cortactin dient. Die zweite, teilweise globuläre Konformation von Cortactin kommt durch intramolekulare Interaktion zwischen der SH3-Domäne und der helikalen und Aktin-bindenden Domänen zustande. Die Rolle der globulären Form ist noch nicht geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass sie einen autoinhibitorischen Regulationsmechanismus darstellt (Cowieson et al., 2008). Die posttranslationale Modifikation von Cortactin erfolgt durch unterschiedliche Kinasen (Abb. 13).

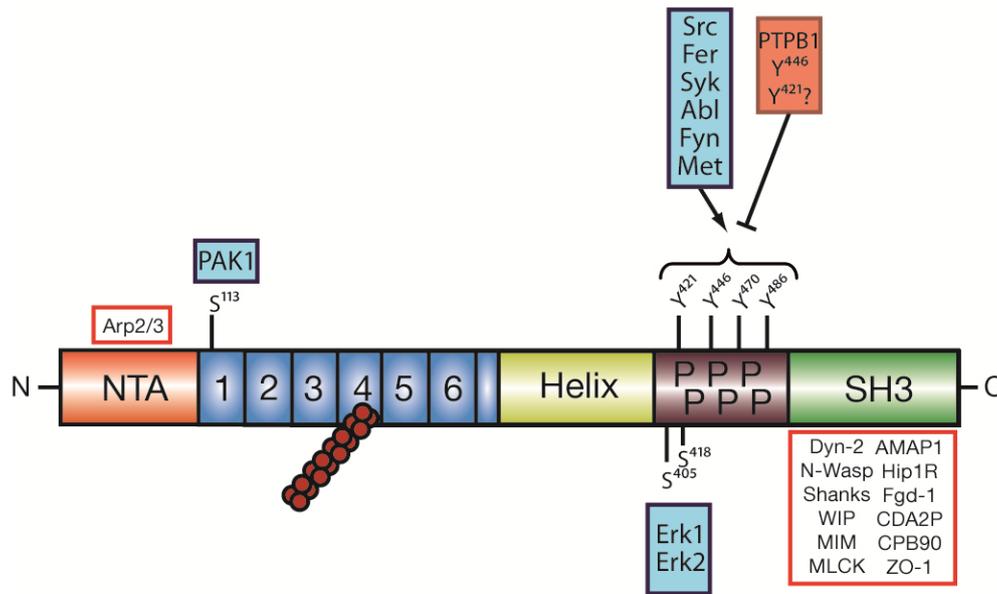


Abb. 13 Schematische Darstellung von Cortactin.

Die Domänen von Cortactin interagieren mit zahlreichen Proteinen wie etwa Aktin und Proteinen der Signaltransduktion. NTA: N-terminal acidic domain. Roter Kasten: bekannte Interaktionspartner der jeweiligen Domäne. Blaue Box: Cortactin-phosphorylierende Proteinkinasen. Orangefarbene Box: Inhibition der Cortactin-Phosphorylierung.

Aufgrund seiner zahlreichen Domänen und Bindepartner ist Cortactin in eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie etwa Zelladhäsion, Migration, Endozytose, neuronale Morphogenese und Wundheilung involviert. Auch bei verschiedenen Krankheitsbildern wie etwa der Osteoporose, bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, der Tumordinvasion und der Metastasenbildung wird Cortactin eine Rolle zugesprochen. In der Chromosomenregion 11q13, welche unter anderem für Cortactin kodiert, kommt es in Tumoren häufig zu Genamplifikationen. Die Cortactin-Expression ist deshalb in zahlreichen Tumoren wie etwa in Kolorektalkarzinomen, in Mamma- und Ovarialkarzinomen, in Magen- und Lebertumoren hochreguliert (Myllykangas et al., 2007; Rodrigo et al., 2000; Weaver, 2008), weshalb es zu den Proto-Onkogenen zählt (Schuurin et al., 1993). Mausmodelle zeigen, dass eine Überexpression von Cortactin die Tumorigenität steigert (Weaver, 2008). Cortactin fördert in Zellen wie etwa Fibroblasten und Endothelzellen die Motilität und die Invasionsbereitschaft (Huang et al., 1998; Kowalski et al., 2005; Patel et al., 1998). Viele Schlüsselproteine der Invadopodien-Regulation sind Bindungspartner von Cortactin wie etwa N-WASP, WIP und Dynamin-2 (Weaver, 2006).

2 Zielsetzung

In Industrienationen wie in Europa und Nordamerika ist das Kolorektalkarzinom die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache. Obwohl es aus molekulargenetischer und histopathologischer Sicht zu den bestcharakterisierten Tumoren zählt, kam es bis heute zu keinem großen Durchbruch bei der Früherkennung und Therapie. Trotz intensiver Forschungsanstrengungen konnte die Überlebensrate von Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen in den letzten Jahrzehnten nur minimal verbessert werden. Der Grund der unzureichenden Therapieformen in der klinischen Praxis ist der heterogene Krankheitsverlauf, der zwischen einzelnen Patienten stark variieren kann. Neben den bereits bekannten molekulargenetischen Faktoren wie etwa Mutationen in *APC*, *K-Ras* und *p53* sind noch zahlreiche, in ihrer Funktion unbekannte Gene an der Tumorgenese beteiligt. Hierzu zählt *SASH1* (SAM and SH3 domain containing protein 1), erstmalig 2003 als ein Mitglied der SLY-Adapter-Proteinfamilie und als ein neuartiges Tumorsuppressorgen in Brustkrebs beschrieben. Als Adapterprotein liegt die physiologische Rolle von SASH1 vermutlich in der Bildung von hochmolekularen Signalkomplexen, die über die Ausbildung von vielstufigen Protein-Protein-Interaktionen zahlreiche Möglichkeiten zur Positiv- und Negativ-Regulation bieten; die genaue Funktion ist jedoch für keines der drei Mitglieder der SLY-Proteinfamilie bislang ausreichend identifiziert.

In Vorarbeiten wurde das Tumorsuppressorpotential von SASH1 in humanen Kolorektalkarzinomen bestimmt. SASH1 wies eine deregulierte Expression in Geweben später Tumorstadien und Lebermetastasen auf. Im Vergleich zu Normalgewebe aus humanem Kolon kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der SASH1-Expression im Tumorgewebe (Rimkus et al., 2006), welche mit erhöhter Metastasenbildung und einem verminderten postoperativen Überleben korrelierte. Aufgrund dessen wurde die Expression von SASH1 als ein klinisch bedeutsamer Parameter in der Tumorprogression und der Aggressivität des Tumors eingestuft.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der physiologischen Funktion des SLY-Adapterproteins SASH1 und seiner Rolle in der Tumorgenese. Da die Funktion und subzelluläre Lokalisation sowie mögliche Bindungspartner von SASH1 noch nicht beschrieben wurden, sollte die Charakterisierung *in vitro* und *in vivo* erfolgen. Die für die Charakterisierung notwendigen Hilfsmittel, wie etwa ein funktionsfähiger anti-SASH1-Antikörper und eine konditionale SASH1^{KO}-Maus, sollten im Rahmen dieser Arbeit generiert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

3,5-3,7 % Formaldehyd	Fischar, Saarbrücken
38 % Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Stammheim
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) (10x)	MBI, San Francisco, USA
5-Aza-2'-deoxycytidin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Acrylamidlösung (30 % Acrylamid; 0.8 % N,N-Methylbisacrylamid)	Bio-Rad, München
Agar	Difco, Kansas, USA
Agarose	Invitrogen, Leek, NL
	FCM, Rockford, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ampizillin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
D(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Stammheim
Desoxynukleotide	Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylether	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
ECL Reagenz	Pierce, Bonn
Eosin Y	Sigma-Aldrich, Stammheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
GeneRuler™ 100 bp DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin-Gelatine	Sigma-Aldrich, Stammheim
Hämatoxylin	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München
Hefe-Extrakt	Difco, Kansas, USA
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamyzin	Sigma-Aldrich, Stammheim
Lachssperma-DNA	Invitrogen, Leek, NL
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Lipofektamin™	Invitrogen, Leek, NL
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Methothrexat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Stammheim
Mitomyzin C	Sigma-Aldrich, Stammheim
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Ethylaminsulfonsäure (BES)	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumazetat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Stammheim
NP-40 (Igepal)	MP Biomedicals, Eschwege
Oligo(dT) 18 Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
Orange G	Sigma-Aldrich, Stammheim
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Stammheim
Pefa-Block	Roche, Mannheim
Pepstatin A	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Stammheim
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Stammheim
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Biochrom, Berlin
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Stammheim
Protease Inhibitor Cocktail Mini	Roche, Mannheim
Random Hexamer Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
ReBlot™ Plus Mild	Chemicon, Hampshire, UK
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Stammheim
RNA-Marker	Promega, Mannheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sepharose (Protein A und G)	Sigma-Aldrich, Stammheim
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Stammheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
SYBR® Green PCR Master Mix	ABI, Foster City, USA
TEMED	Bio-Rad, München
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NL
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Stammheim

Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
Gel Doc XR System	Bio-Rad, München
Geltrockner	Biometra, Göttingen
Gene Pulser II	Bio-Rad, München
GeneAmp PCR-System 7900	Perkin Elmer, Boston, USA
GeneAmp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Boston, USA
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
	Kleinfeld, Gehrden
Inkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kryostat	Leica, Wetzlar
MasterCycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope (Stemi 2000-C, Axiovert 200M, Axiolab)	Zeiss, Jena
Mithras LB940	Berthold, Bad Wildbad
NanoDrop® ND-1000	Nanodrop Techn., Wilmington, USA
Neubauer-Zählkammern	Brandt, Berlin
pH-Meter	Inolab pH Level 1, WTW, Weilheim
Phosphoimager Storm 840	Molecular Dynamics, Krefeld
Phosphoscreen, -kassette (35x43 cm)	GE Healthcare Europe GmbH, München
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Proteintransfer Transblot SD	Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Rotationsrad Mixing Rotor	Renner, Darmstadt
Sterilbank	Kendro Laboratory Products, München
Stromquellen Power Pack P25	Biometra, Göttingen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tissue Lyser II	Qiagen GmbH/Retsch, Hilden
Typon Optimax X-Ray Film Processor	Protec GmbH & CoKG, Oberstenfeld
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau
	Hettich, Tuttlingen

3.4 Enzyme

Proteinase K	Sigma-Aldrich, Stammheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid™ H-Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

3.5 Stammlösungen und Puffer

3 % Paraformaldehyd in PBS (PFA), pH 7.4	3 %	Paraformaldehyd (w/v)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ erhitzen ➤ auf RT abkühlen lassen ➤ pH überprüfen ➤ steril filtrieren
Antikörper-Verdünnungslösung		Dako, Hamburg	
BES/NaOH, pH 6.95/6.96/6.97	50 mM	BES	
	273 mM	NaCl	
	1,9 mM	Na ₂ HPO ₄	<ul style="list-style-type: none"> ➤ steril filtrieren
CLB-Puffer	10 mM	HEPES	
Vor jeder Anwendung frisch dazugeben:	10 mM	NaCl	
▪ 2x Protease Inhibitor Cocktail	5 mM	NaHCO ₃	
▪ 1 mM Pefa-Block (AEBSF)	1 mM	CaCl ₂	
	0,5 mM	MgCl ₂	
	5 mM	EDTA	
Coomassie-Entfärbelösung	600 ml	Methanol	
	200 ml	Essigsäure	
	1200 ml	ddH ₂ O	
Coomassie-Färbelösung	100 ml	Essigsäure	
	2,5 g	Coomassie Brilliant Blue R-250	
	450 ml	Methanol	
	450 ml	ddH ₂ O	
Denaturierungslösung	0,5 M	NaOH	
	1,5 M	NaCl	
Depurinierungslösung	0,2 N	HCl	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	0,1 %	DEPC	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ü/N bei RT rühren ➤ autoklavieren
DNA-Auftragspuffer (6x)	1 ml	10x TAE-Puffer	
	1 ml	Orange G [10 mg/ml]	
	5 ml	Glycerin	
	3 ml	ddH ₂ O	
Eosin	1 g/l	Eosin in ddH ₂ O	
	10 Tropfen	Essigsäure (100 %)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ steril filtrieren
Hybridisierungspuffer		Sigma-Aldrich, Stammheim	
Prähybridisierungslösung	30 ml	Hybridisierungspuffer	
	300 µl	Lachssperma-DNA [10 mg/ml]	<ul style="list-style-type: none"> ➤ zuvorige Denaturierung (96°C, 5 min)
Mausschwanz-Lysepuffer	100 mM	NaCl	
	50 mM	Tris/HCl, pH 7.5	
	0,5 %	SDS (w/v)	

Material

	5 mM	EDTA
Neutralisationslösung, pH 8.0	0,5 M	Tris
	3 M	NaCl
P1-Puffer	50 mM	Tris-Cl, pH 8.0
➤ Aufbewahrung bei 4°C	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
P2-Puffer	200 mM	NaOH
	1 %	SDS (w/v)
P3-Puffer, pH 5.5	3 M	Kaliumazetat
Ponceau-Färbelösung	0,2 %	Ponceau S (w/v)
	5 %	Essigsäure (v/v)
RIPA-Puffer, pH 7.4	50 mM	Tris/HCl, pH 7.4
vor jeder Anwendung frisch dazu gegeben:	1 %	NP-40 (w/v)
▪ 2x Protease Inhibitor Cocktail	0.25 %	Natriumdeoxycholat (w/v)
▪ 1 mM Pefablock (AEBSF)	150 mM	NaCl
▪ 1 mM NaF	1 mM	EDTA
▪ 1 mM β-Glycerolphosphat		
▪ 0,1 % SDS		
▪ 1 mM Na ₃ VO ₄		
▪ 1 mM PMSF		
▪ 1 mM Benzamidin		
▪ 1 µg/ml Pepstatin A		
RNA-Auftragspuffer (2x)	160 µl	MOPS (10x)
➤ Aufbewahrung bei -20°C	80 µl	Bromphenolblau (gesättigt)
	720 µl	Formamid
	720 µl	37 % Formaldehyd
	160 µl	Glycerin
	120 µl	ddH ₂ O
SDS-Laufpuffer (5x)	248 mM	Tris
	2 M	Glycin
	17 mM	SDS
SDS-Probenpuffer (3x)	0,24 M	Tris/HCl, pH 6.8
	6 %	SDS (w/v)
	3 %	Glycerin (v/v)
	1,6 %	β-Mercaptoethanol (v/v)
	0,6 mg/ml	Bromphenolblau
SSC-Puffer (20x)	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
Strip-Lösung	0,2 M	NaOH
	0,1 %	SDS
TE-Puffer, pH 8.0	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1 mM	EDTA
TNE-Puffer	100 mM	Tris/HCl, pH 8.5
Für den Verdau Proteinase K [250 µg/ml]	5 mM	EDTA, pH 8.5
dazugeben	200 mM	NaCl
	0,1 %	SDS

Transferpuffer	48 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	39 mM	Glycin
	20 %	Methanol (v/v)
Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x)	2 M	Tris/HCl, pH 8.0
	0,05 M	EDTA
	1 M	Essigsäure
TSE-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
vor jeder Anwendung frisch dazu gegeben:	0,3 M	Saccharose
▪ 2x Protease Inhibitor Cocktail	1 mM	EDTA
▪ 1 mM Pefablock (AEBSF)	0,1 %	NP-40 (w/v)
Waschlösung I	2 M	SSC
	0,1 %	SDS
Waschlösung II	0,2 M	SSC
	0,1 %	SDS

3.6 Antikörper und -seren

3.6.1 Erstantikörper und Färbe-Reagenzien

Antikörper	Herkunft	Konzentration	Applikation	Referenz
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	-	1:5.000	IF	Sigma-Aldrich
Cortactin	Kaninchen	1:1.000 1:200	WB IF	Abcam
GFP	Kaninchen	1:2.000 2 µg	WB IP	BD
Integrin β1	Maus	1:2500	WB	Pharmingen
Ki67	Kaninchen	1:300 1:300	IF IHC	Novocastra Lab.
Lamin A/C	Maus	1:1.000	WB	Pharmingen
Rac1	Kaninchen	1:1.000	WB	Pierce
Tritc-Phalloidin	-	1:500	IF	Sigma-Aldrich
V5	Maus	1:2.000 1:200 2 µg	WB IF IP	Invitrogen
α-Tubulin	Maus	1:2.000	WB	Calbiochem
Aktin	Maus	1:2.000	WB	Sigma-Aldrich
anti-SASH1-Serum 1540	Kaninchen	1:1.000 1:200 1:100	WB IF IHC	Eigene Herstellung

3.6.2 Zweitantikörper

Antikörper	Herkunft	Konzentration	Applikation	Referenz
Anti-Maus IgG (H+L)-HRP	Ziege	1:4.000	WB	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP	Ziege	1:4.000	WB	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Cy3	Ziege	1:300	IF	Dianova, Hamburg
Anti-Maus A488	Ziege	1:300	IF	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen Cy3	Ziege	1:300	IF	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen A488	Ziege	1:300	IF	Dianova, Hamburg

3.6.3 Antiseren

Es wurden polyklonale Antiseren gegen SASH1-Peptid epitope durch Immunisierungen von Kaninchen generiert. Die komplementären Sequenzen der für die Immunisierung eingesetzten Antigene liegen entweder auf der C- oder auf der N-terminalen Region des murinen SASH1.

1. N-terminal gelegene Antigen-Sequenzen

Anti-Peptid-Sequenzen:

Peptid 1: CPEVERKYPLHKSNS (AS 117)

Peptid 2: CNSREQSDDTEDS (AS 235)

Die Synthese der Peptide und die Immunisierung zweier Kaninchen erfolgte durch Dr. Markus Moser, Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

2. C-terminal gelegene Antigen-Sequenzen

Anti-Peptid-Sequenzen:

Peptid 1: DLTEEPYSDKHGRC (AS 1090)

Peptid 2: CTAARLFKLPPSPEAM (AS 1216)

Die Synthese der Peptide und die Immunisierung dreier Kaninchen erfolgte durch die Firma Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg.

Die Auswahl der Peptidsequenzen erfolgte durch die Firma PINEDA, Berlin. Die Sequenzen wurden mittels BLAST auf ihre SASH1-Spezifität geprüft.

Für die genaue Lage der Peptidsequenzen siehe 5.2.

3.7 Oligonukleotide

Die Synthese aller Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Metabion, München.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
LA-NotI sense	TGGCGGCCGCGCTACCTGTCTCC	Klonierung
LA-SacII/BamHI antisense	GGGGATCCGCGGTTGGTACCCAGACCC	Klonierung
KA-ApaI/NsiI sense	GGGGCCCATGCATTTATAGACCTCGCTG	Klonierung
KA-ClaI/KpnI antisense	GGGTACCATCGATCTCCTGACAGGGTC	Klonierung
loxP-ApaI-SpeI/NsiI-Oligo sense	CCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGG CGCGCCATGCA	Klonierung
loxP-NsiI/SpeI-ApaI-Oligo antisense	TATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCAATT GCCGGGCC	Klonierung
Intern-XhoI sense	CCTCGAGACCCACCTGTCACCATCAGTGC	Klonierung

Intern- <i>Apa</i> I antisense	TGGGCCCTCTACATGTCTAGATATCCTC	Klonierung
p16 sense	CACGGCCGCGGCCCGGGGTC	Methylierung
p16 antisense	GGCCCGGTGCAGCACCACCA	Methylierung
GAPDH sense	TCCCATCACCATCTTCCAG	Methylierung
GAPDH antisense	ATGAGTCCTTCCACGATACC	Methylierung
E15/loxP(KO) sense	ATGGGTGATCATGCATATAACTTCG	Screening
E15(wt) sense	CTGTTACTCTTGCTTCCCTGTGTC	Screening
E16(wt/KO) antisense	CTAAGTCTTCTTCCCTCCAGGAGTTTG	Screening
Int/wt antisense	AATCAGTGGTGCTCACTGTCTG	Screening
neo (compliss) sense	CCTGAAGAACGAGATCAGCAGCCTC	Screening
Int-missing sense	GGTGTACTCCAAATGAGGTGTTGCATGC	Screening
Del Cre sense	ACCAGCCAGCTATCAACTCG	Screening
Del Cre antisense	TTACATTGGTCCAGCCACC	Screening
5'-Übergang-Sonde sense	GCTATGATCTTATGTCAGCCAGAG	SB Sonde
5'-Übergang-Sonde antisense	GAGACCGGGCTGCTGTACTTTTTAG	SB Sonde
3'-Übergang-Sonde sense	GAAGGAATTAGTTCCTTCTTAAGCCATT	SB Sonde
3'-Übergang-Sonde antisense	CTAAGTCTTCTTCCCTCCAGGAGTTTGAA	SB Sonde
hHPRT sense	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTATAAT	qRT-PCR
hHPRT antisense	AAGGGCATATCCTACAACAAACTTG	qRT-PCR
hSASH1791RT sense	GGGCCTGCTGAACAACAAAG	qRT-PCR
hL2145 antisense	CCAGGAGATCCTCCACAGAC	qRT-PCR
mSASH-sense	CGCACTAGTCTGCAGGAGCATGGTGTGAAAC	qRT-PCR
mSASH-SYBR_antisense	TCTGTACCAGGGCTTCCGGGATCCCACAA	qRT-PCR
mβ-Aktin/abbot5 sense	ACCCACACTGTGCCATCTAC	qRT-PCR
mβ-Aktin/abbot3 antisense	AGCCAGGTCCAGACGCAGG	qRT-PCR
<i>in situ</i> 3'UTR sense	GACAAGAGCCAGCCTCTCAC	<i>in situ</i> -Sonde
<i>in situ</i> 3'UTR antisense	CTGTGAGTCCCGATCGACTT	<i>in situ</i> -Sonde

3.8 Reagenzienkits

BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Envision+® System-HRP	Dako, Hamburg
EZ-Detect™ Rac1 Activation Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix, High Wycombe, UK
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Plasmid Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rediprime™ II	GE Healthcare Europe GmbH, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SulfoLink® Immobilization Kit für Peptide	Thermo Scientific, Rockford, USA

3.9 Medien

3.9.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

LB-Medium, pH 7.0	1 %	Trypton (w/v)
	0,5 %	Hefe-Extrakt (w/v)
	1 %	NaCl (w/v)
Niedrigsalz LB-Medium, pH 7.0	1 %	Trypton (w/v)
	0,5 %	Hefe-Extrakt (w/v)
	0,5 %	NaCl (w/v)
SOC-Medium	2 %	Trypton (w/v)
	0,5 %	Hefe-Extrakt (w/v)
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glukose (sterilfiltriert)

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium **1,5 % Agar** zugefügt.

3.9.2 Nährmedien für Zellkulturen

3.9.2.1 Zellkultur-Medien

VLE RPMI 1640	Biochrom, Berlin
DMEM	Invitrogen, Leek, NL
MEM	Invitrogen, Leek, NL
PBS	Biochrom, Berlin

3.9.2.2 Zusätze für Zellkultur-Medien

Penizillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
FCS Gold	PAN, Aidenbach
FCS	Biochrom, Berlin
LIF	Laboreigene Produktion
Mitomyzin C	Sigma-Aldrich, Stammheim
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Leek, NL
G418	Sigma-Aldrich, Stammheim
Ganciclovir	Sigma-Aldrich, Stammheim
Methothrexat	Sigma-Aldrich, Stammheim
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Zeozin	Invitrogen, Leek, NL

Zur Passage von adhärennten Zelllinien wurden die Zellen 10 min mit Trypsin/EDTA der Firma PAA, Parsching, Österreich, bei 37°C, 7 % CO₂ behandelt.

3.9.2.3 Zelltyp-spezifische Medienzusammensetzung

	ES	EF	CHO-LIF-D	humane oder murine Zelllinien
Basismedium	DMEM	DMEM	MEM	DMEM RPMI
<u>Zusätze</u>				
FCS Gold (v/v)	15 %	5 %		
FCS (v/v)			10 % dialysiert	7 %
Penizillin [U/ml]	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin [U/ml]	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
β -ME	0,05 mM	0,05 mM		
LIF (v/v)	1 %			
<u>Selektions-/Inhibitionszusätze</u>				
G418	200 μ g/ml			1800 μ g/ml
Ganciclovir	2 μ M			
Mitomycin C		10 μ g/ml		
Methothrexat			0,002 μ M	
Zeozin				125 μ g/ml

Um Zellen einzufrieren, wurde dem jeweiligen Kulturmedium 10 % DMSO zugesetzt. Bei dem ES-Einfriermedium wurde zusätzlich die FCS-Konzentration von 15 % auf 25 % erhöht.

Bei stabilen Transfektanten wurde das entsprechende Antibiotikum in das Kulturmedium zugegeben.

V5-SASH1-exprimierende Hek293-Klone (DM6/12):	Zeozin
anti-SASH1-shRNA-exprimierende SW480-Klone:	G418

3.9.3 Antibiotika der Prokaryoten-Kulturen

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampizillin	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert	100 μ g/ml
Kanamycin	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert	100 μ g/ml
Zeozin	100 mg/ml in ddH ₂ O	25 μ g/ml

3.10 Bakterien und Zelllinien

Bakterien:

<i>E.coli</i> TOP10	F ⁻ , mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, recA1, araD139, Δ (araleu)7697, galU, galK, rpsL (Str [®]) endA1 nupG
<i>E.coli</i> DH5 α	fhuA2, Δ (argF-lacZ)U169, phoA, glnV44, Φ 80 Δ (lacZ)M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17
<i>E.coli</i> JM110	rpsL thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) Φ F' traD36 proAB lacIqZ Δ M15

Zellen und Zelllinien:

CaCO2	Humane Kolorektal-Adenokarzinom-Zelllinie ATCC: HTB-37™, Rockville, Maryland, USA Referenz: (Didier et al., 1996; Jumarie & Malo, 1991)
CHO-LIF-D	LIF-exprimierende Ovarzelllinie aus dem Chinesischen Hamster Prof. Klaus Pfeffer, Düsseldorf Referenz: (Tjio & Puck, 1958)
CMT93	Epitheliale Darmkrebs-Zelllinie, gewonnen aus der C57Bl/ICRF-Maus ATCC: CCL 223™, Rockville, Maryland, USA Referenz: (Franks & Hemmings, 1978)
EF-Zellen	Embryonale Fibroblasten, gewonnen aus Embryonen d14.5 postcoitum aus CD1-Mäusen Laboreigene Herstellung
ES-Zellen E14.1	Embryonale Stammzellen; isoliert aus dem Mausstamm 129/SvJ Ola Joyner, Toronto, Kanada Referenz: (Kuhn et al., 1991)
Hek 293	Humane embryonale Nieren-Zelllinie ATCC: CRL-1573™, Rockville, Maryland, USA Referenz: (Graham et al., 1977)
HeLa	Humane Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie ATCC: CCL 2™, Rockville, Maryland, USA Referenz: (Scherer et al., 1953)
SW480	Humane Kolorektal-Adenokarzinom-Zelllinie ATCC: CCL-228™, Rockville, Maryland, USA Referenz: (Fogh et al., 1977; Trainer et al., 1988)

3.11 Versuchstiere

Die SASH1-KO-Mäuse wurden im optimierten Hygienebereich (OHB) des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gezüchtet, auf einen C57Bl/6-N-Hintergrund rückgekreuzt und gehalten.

Mausstamm	Herkunft
C57Bl/6-N	Charles-River, Wilmington, USA
CD1	Charles-River, Wilmington, USA
129/Sv	Klaus Pfeffer, Düsseldorf
Deleter-Cre	Jürgen Ruland, III. Med. Klinik, MRI, München

3.12 Klonierungsvektoren/Expressionsplasmide

3.12.1 Klonierungsvektoren und Ausgangsplasmide

pCR®2.1 TOPO®	3,9 kb	Invitrogen, Leek, NL
pGEM7-TK-NotI	5,8 kb	Sandra Beer, Düsseldorf
pBluescript II KS(-)MCS+	2,9 kb	Stratagene, La Jolla, USA
pEZ-neo ^R -Frt/loxP	6,0 kb	Klaus Rajewski, Boston, USA

3.12.2 Expressionsplasmide und Konstrukte

Name	Ausgangsplasmid	Insert	Eigenschaften
3'-UTR-Sonde	pCR [®] 2.1 TOPO [®]	murines SASH1 aus 3'-UTR Region	Ampizillin ^R
eGFP-Rac ^{N17}	pEGFP-C1	humanes Rac1	dominant negative Form Kanamycin ^R Monique Arpin (Curie,Paris)
eGFP-Rac ^{V12G}	pEGFP-C1	humanes Rac1	konstitutiv aktive Form Kanamycin ^R Monique Arpin (Curie,Paris)
mSASH1-KO ^{ΔE14/15}	pBS-LoxP-neo ^R -loxP	genomische DNA aus Maus, <i>SASH1</i> -Lokus: LA: E13 (2,5 kb) <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI, Int: E14+E15 (1,6 kb) <i>Sal</i> I/ <i>Nsi</i> I, KA: 0,6 kb <i>Xho</i> I/ <i>Kpn</i> I TK-Kassette (2,8 kb) <i>Not</i> I loxP-Stelle durch Oligolinker (34 bp + <i>Nsi</i> I Schnittstelle)	Ampizillin ^R Neomycin ^R Linearisierung: <i>Bsp</i> TI (<i>Afl</i> II) Daniela Mayr
mSASH1-KO ^{ΔE5}	pBS-neo ^R -loxP-FRT	genomische DNA aus Maus, <i>SASH1</i> -Lokus: LA: I4 (2,4 kb) <i>Not</i> I/ <i>Bam</i> HI, Int: E5 (1,4 kb) <i>Xho</i> I/ <i>Apa</i> I, KA: (0,8 kb) <i>Apa</i> I/ <i>Kpn</i> I TK-Kassette (2,8 kb) <i>Not</i> I loxP-Stelle durch Oligolinker (34 bp + <i>Nsi</i> I/ <i>Mfe</i> I Schnittstellen)	Ampizillin ^R Neomycin ^R Linearisierung: <i>Cla</i> I
pCR-neo ^{TK44}	pCR [®] 2.1 TOPO [®]	neo ^R -Sonde für Southern Blot	Sonden-Verdau mit <i>Eco</i> RI Ampizillin ^R Monika Semmrich
pBud-hSASH1	pBudCE4.1	humanes SASH1, full-length cDNA (3,7 kb) über <i>Not</i> I/ <i>Bgl</i> II-Schnittstellen	V5- und His-markiert am 3'- Ende Zeozin ^R (Zeller et al., 2003)
pBud-hSASH1-ΔCter	pBud-hSASH1 mit eingefügtem Linker am 3'-Ende: <i>Not</i> I-hSASH1- <i>Bgl</i> II- <i>Xho</i> I- <i>Eco</i> RV-	humanes SASH1, full-length cDNA (1,7 kb); AS 1-581	Verdau mit <i>Eco</i> RV und Religation V5- und His-markiert am 3'- Ende Zeozin ^R Alexandra Gnann

		<i>BstBI</i>	
pBud-hSASH1- ΔNter	pBud-hSASH1	humanes SASH1, full-length cDNA (1,7 kb); AS 657-1247	Verdau mit <i>EcoRV</i> und <i>NotI</i> (Klenow: blunt end) sowie Religation V5- und His-markiert am 3'-Ende Zeozin ^R Alexandra Gnann
pEGFP-hSASH- FL	pEGFP-C2	FL-hSASH1, <i>XhoI-XhoI</i> -Fragment (3,7 kb) aus pBud-hSASH1- <i>XhoI-XhoI</i> (eingefügter Linker am 3'- und 5'-Ende: <i>NotI-XhoI</i> -ATG-hSASH1- <i>BglIII-XhoI-EcoRV-BstBI</i>)	Kanamycin ^R Alexandra Gnann
pIC-Cre	pUC-19 (2,7 kb)	HSV-tk-Promotor+Polyoma Enhancer+Cre+Poly-A-Signal (1,6 kb)	Ampizillin ^R H. Gu, Institut für Genetik, Köln
pSuper-hSASH1	pSuper GFP/neo ^R RNAiSystem	Riesenoligo aus 5'-shRNA-Sequenz (19 bp) sense-TTC AAG AGA-shRNA-Sequenz antisense-3'	Verdau mit <i>BglIII</i> und <i>XhoI</i> und Religation (<i>XhoI</i> funktionslos durch Ligation) Neomycin ^R Alexandra Gnann

3.13 Mikroskopie und Auswertung

Alle Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Axiovert 200M der Firma Zeiss, Jena, durchgeführt. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte durch die Software AxioVision Rel.4.6 der Firma Zeiss.

4 Methoden

4.1 Immunologische Methoden

4.1.1 Antiserumgenerierung und -aufreinigung

Um endogenes SASH1 im Immunblot und in der Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurde durch die Immunisierung von Kaninchen ein polyklonales Antiserum gegen Peptidsequenzen von SASH1 generiert.

4.1.1.1 Immunisierung

Die Immunisierung der Kaninchen gegen die N-terminal gelegenen Peptidsequenzen (3.6.3) erfolgte in Martinsried durch Dr. Markus Moser am Max Planck-Institut für Biochemie. Hierfür wurden jeweils 2 mg des anti-SASH1-Peptids an das Trägerprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt, um eine ausreichende Immunogenität zu gewährleisten. Die Stimulierung der Immunantwort erfolgte durch mehrere Injektionen und durch die Verwendung eines Adjuvans. Adjuvantien bewirken eine Verstärkung und eine Verlängerung der Immunantwort durch ein Anlocken diverser Immunzellen zum Antigen und einer verzögerten Freisetzung durch Depotwirkung. Für die initiale Immunisierung wurden 400 µg des gekoppelten Antigens in einem Volumen von 500 µl mit einem gleichen Volumen des Adjuvans Titermax Gold (Sigma-Aldrich, Stammheim) versetzt und den Kaninchen subkutan injiziert.

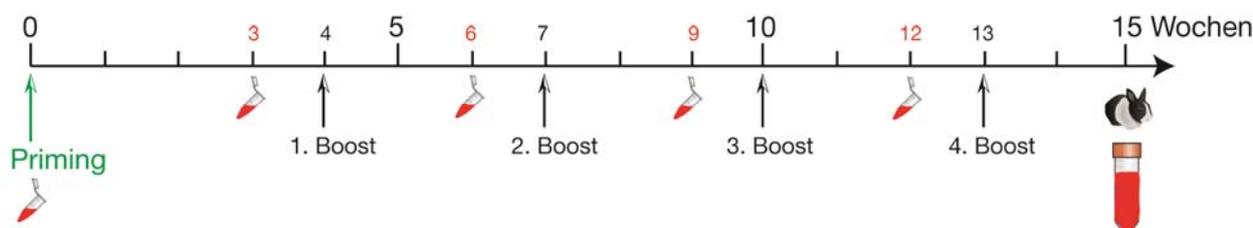


Abb. 14 Immunisierungsprotokoll für die Generierung des polyklonalen anti-SASH1-Antiseraums.

Das Protokoll beschreibt die Immunisierung der Kaninchen, welche gegen die N-terminal gerichteten Peptidsequenzen durch Dr. Markus Moser am MPI für Biochemie, Martinsried, immunisiert wurden. Die Antiseren, welche für den Titerstest gewonnen wurden, wurden auf Proteinlysaten im Western Blot getestet.

Vier Wochen nach der initialen Immunisierung wurde die erste Boosterinjektion durchgeführt. Durch diese Injektionen werden die im Zuge der Primärimmunisierung generierten Gedächtniszellen aktiviert. Die darauffolgenden Boosterinjektionen wurden in dreiwöchigen Abständen wieder-

holt. Hierfür wurden erneut 400 µg Antigen 1:1 mit 500 µl Freund-Adjuvans gemischt und appliziert. Zwei Wochen nach den jeweiligen Boosterinjektionen erfolgte zur Titerbestimmung eine Blutentnahme. Die Trennung des Serums von den festen Blutbestandteilen erfolgte durch die Blutgerinnung, indem das Blut ü/N bei 4°C gelagert wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Serum abgenommen und auf seine Antikörper-Konzentration im Western Blot getestet (Abb. 19 und Abb. 20). Nach der Beendigung der Immunisierung wurde das Kaninchen ausgeblutet und das Serum gewonnen. Die Aufreinigung des Serums erfolgte mittels des SulfoLink Immobilization Kits (Thermo Scientific, Rockford, USA). 15 ml-Aliquots des unaufgereinigten Serums werden zur längerfristigen Lagerung bei -80°C aufbewahrt.

Die Immunisierung der Kaninchen gegen die C-terminal gelegenen Peptidsequenzen (3.6.3) und die Aufreinigung des Serums erfolgten durch die Firma Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, entsprechend deren Standardprotokollen. Das Serum wurde ebenfalls nach den jeweiligen Boosterinjektionen auf seine Antikörper-Konzentration mittels Western Blot getestet.

4.1.1.2 Affinitätsaufreinigung des Antiserums

Die Aufreinigung erfolgte mit dem SulfoLink Immobilization Kit von Thermo Scientific, Rockford, USA entsprechend dem Herstellerprotokoll. Das Kit beruht auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie.

4.1.1.2.1 Peptidkopplung an Säule

Die Peptidkoppelung an die Agarose-Beads der Säule erfolgte über eine kovalente Thioetherbindung. Da die Sulfhydryl-Gruppen des Peptidgemisches (Kaninchen wurde gegen ein Gemisch aus beiden Peptidsequenzen (3.6.3) immunisiert) für die Bindung in reduzierter Form vorliegen müssen, wurde das Peptid zuerst mit dem Reduktanten 2-Mercaptoethanolamin (37°C, 90 min im Wasserbad) vorbehandelt.

Die Equilibrierung der Entsalzungssäule erfolgte durch 20 ml Koppelungspuffer, welcher zuvor entgast wurde. Das reduzierte, auf RT abgekühlte Peptidgemisch wurde über die Säule aufgereinigt und der Durchfluss in 1 ml Aliquots aufgefangen.

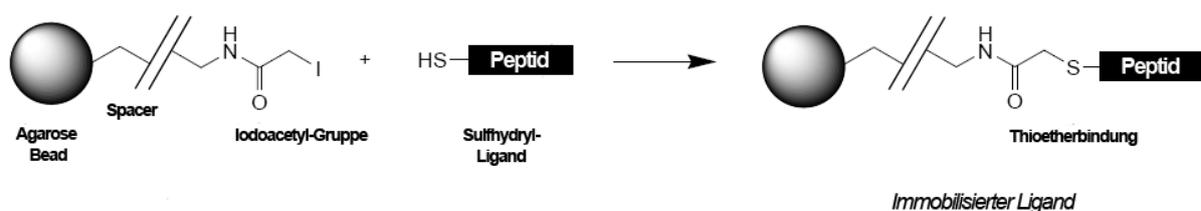


Abb. 15 Chemischer Aufbau der SulfoLink Koppelung.

Der 12 Atome lange Spacer-Arm minimiert sterische Behinderung der Peptidbindung. Die Thioetherbindung ist kovalent und irreversibel (Abbildung nach Thermo Scientific, Rockford, USA).

Die SulfoLink Koppelungssäule wurde auf RT gebracht und mittels 8 ml Koppelungspuffer equilibriert. Im Anschluss wurde das Austrittsende der Säule wieder verschlossen, die Peptidlösung auf die Säule gegeben, die Säule geschlossen und die Agarose-Beads mit der Peptidlösung gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation des Peptids mit den Beads in der Säule bei RT wurde die Flüssigkeit abgelassen und die Säule erneut mit Koppelungspuffer gewaschen. Der gesamte Durchfluss wurde in Aliquots aufgefangen. Die Koppelungseffizienz wurde durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine Inkubation des Säuleninhalts mit 0,05 M L-Cystein x HCl für 15 min unter konstantem Schwenken der Säule und 30 min im Ruhezustand bei RT geblockt.

Nachdem die Blockierungslösung abgelassen und die Säule mit Waschlösung und entgastem PBS gewaschen wurde, wurde sie direkt zur Aufreinigung des Antiserums eingesetzt.

4.1.1.2.2 Affinitätsreinigung

Es wurde ein maximales Serumvolumen von 1,5 ml auf die Säule aufgetragen, welches ins Gel-Bett einfließen gelassen wurde. Nach Zugabe von Probenpuffer wurde die Säule geschlossen und die Probe für 1 h bei RT mit den Agarose-Beads inkubiert. Nach dem darauffolgenden Waschschrift mit Probenpuffer erfolgte die Elution des gebundenen Proteins durch das Auftragen von Elutionspuffer auf die Säule. Das Eluat wurde in 1 ml-Fraktionen aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm getestet. Aliquots der Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach der Auftrennung mit Coomassie angefärbt. Die Fraktionen, welche in der Proteingehalt-Messung und im Coomassie-Gel die höchste IgG-Konzentration aufwiesen, wurden entsprechend vereinigt. Zur Konservierung und zur Unterdrückung von unerwünschtem Wachstum von Bakterien und Pilzen wurde das aufgereinigte Serum gegen eiskaltes PBS ü/N dialysiert und anschließend mit 0,1 % Natriumazid in 1 % BSA versetzt.

4.1.2 Immunpräzipitation

Als Immunpräzipitation wird die Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen bezeichnet. Die bei der Immunpräzipitation zum Einsatz kommenden Proteine A (42 kDa) und G (30-35 kDa) sind bakterielle Proteine aus *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus*. Sie werden als Liganden zur spezifischen Aufreinigung von IgG verwendet, indem sie an Sepharose gekoppelt sind. Die reversible Bindung von IgG an Proteine erfolgt über den Fc-Teil der Antikörper. Die Bindungseigenschaften sind Spezies- und IgG-Unterklassen-abhängig.

Alle Arbeiten wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. 400 µl Proteinlysate wurde für 1 h mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers auf dem Rotationsrad (Renner, Darmstadt) inkubiert. Währenddessen wurde Protein A- bzw. Protein G-Sepharose dreifach mit RIPA-Puffer (3.5) gewaschen. Nach der Beendigung der Antikörper-Inkubation wurden 30 µl Sepharose zum Ansatz pipettiert, und zur Antikörper-Sepharose-Bindung wurde der Ansatz erneut für >2 h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert (14.000 UpM, 1 min bei 4°C), der Überstand verworfen und das bleibende Sepharose-Pellet dreifach mit RIPA-Puffer gewaschen.

Das Immunpräzipitat wurde in 50 µl 1x SDS-Puffer solubilisiert, aufgeköcht (5 min, 96°C), abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

4.1.3 Western Blot (Immunoblot)

Für das klassische Western Blot-Verfahren wird das denaturierte Protein durch SDS-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, mittels elektrophoretischem Transfer auf eine Trägermembran übertragen und durch immunchemischen Nachweis mittels Chemilumineszenz visualisiert.

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der modifizierten Methode von H. Towbin (Towbin et al., 1979) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf welcher sie aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an die Membran gebunden wurden. Der Transfer erfolgte in einer „Semi-dry“ Elektrophorese-Apparatur (Bio Rad, München) bei 2 mA/cm² Membranfläche für

60 min (Kyhse-Andersen, 1984). Für den Transfer wurde in der Apparatur erst die Membran, dann das Gel zwischen zwei in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere gestapelt. Nach dem Transfer wurde die Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt, um die Transfereffizienz zu überprüfen (Salinovich & Montelaro, 1986).

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch eine Inkubation mit 5%-igem Milchpulver/PBST (w/v) (1 h auf einem Wippschüttler, RT) abgesättigt. Mit der im Folgenden aufgeführten Immundetektion können nun spezifische Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden zweierlei Antikörper eingesetzt. Zuerst wurde ein proteinspezifischer Erstantikörper in einer den Herstellerangaben entsprechenden Verdünnung (in 5 % Milchpulver/PBST) zusammen mit der Membran bei 4°C ü/N inkubiert. Nach einem Waschschrift (3x für 10 min mit PBST, RT) wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 5%-igem Milchpulver/PBST verdünnt und zusammen mit der Membran für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem darauffolgenden Waschschrift (siehe oben) erfolgte die Detektion der spezifischen Proteinbande mit Hilfe des ECL-Detektionsreagenz (enhanced chemiluminescence) (Pierce, Bonn). ECL dient als Substrat für die Peroxidase. Die Peroxidase sorgt für eine Umsetzung des Wasserstoffperoxids, wobei Sauerstoff frei wird und so die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Das Luminol wird in ein höheres Energieniveau transferiert. Beim Rückfall in den Grundzustand wird diese Energie als Chemilumineszenz frei. Dafür wurden die Detektionslösungen zu gleichen Teilen gemischt (1 ml Ansatz/6x9 cm Membrangröße), auf die Membran zwischen einer Klarsichtfolie aufgetragen und für 1 min vorinkubiert. In einer Dunkelkammer wurde das Chemilumineszenzsignal auf einem Röntgenfilm detektiert.

Um unterschiedliche Proteine auf ein und demselben Blot nachzuweisen (z.B. Tubulin-Nachweis als Ladekontrolle), konnte der Blot bis zu zwei Mal „gestrippt“ und rehybridisiert werden. Die Membran wurde hierfür kurz in PBST gewaschen und dann für 20 min in Strip-Lösung (Chemicon, Hampshire, UK) auf dem Wippschüttler inkubiert. Nachdem die unspezifischen Bindungsstellen durch eine dreimalige Inkubation mit 5%-igem Milchpulver/PBST (10 min, RT) abgesättigt wurden, konnte eine erneute Bindung eines Primärantikörpers durchgeführt werden.

4.1.4 Southern Blot

Bei dem Southern Blot handelt es sich um eine Nachweismethode einer spezifischen Gensequenz aus einem großen Pool von DNA-Fragmenten z.B. aus genomischer DNA, bei der zuerst die DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und dann fixiert wird. Durch eine anschließende Hybridisierung, d.h. der Reassoziaton von einzelsträngigen Nucleinsäuren zu einem Doppelstrang, mit einer markierten komplementären Sonde kann das gesuchte DNA-Fragment dargestellt werden.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden zunächst 15 µg genomischer DNA mit dem zugehörigen Restriktionsenzym [hc, 200 U/Ansatz] über Nacht bei 37°C auf einem Thermoschüttler in einem Gesamtvolumen von 60 µl verdaut. Nach dem ü/N-Verdau erfolgte nach der Zugabe von 2 µl Restriktionsenzym ein erneuter Verdau für 3 h bei 37°C. Die einzelnen Proben wurden mit einem Marker auf ein 0,8%-iges Agarosegel aufgetragen und ü/N bei 12 Volt entsprechend der Größen der DNA-Fragmente aufgetrennt. Das Gel wurde mit einem Lineal fotografiert, um am Ende die Größe des markierten Fragmentes nachvollziehen zu können. Das Gel wird anschließend nacheinander 10 min in verdünnter Salzsäure, 30 min in einer Denaturierungs- und 30 min in einer Neutralisierungslösung (3.5) geschwenkt, um es auf den DNA-Transfer vorzubereiten. Zur Equilibrierung wurde das Gel final für 10 min mit 2x SSC-Puffer gewaschen.

Die Nylonmembran wurde für den Transfer zunächst für 1 min in ddH₂O benetzt und anschließend für 15 min in 10x SSC-Puffer equilibriert.

Der Aufbau des Transfers ist schematisch in Abb. 16 dargestellt. Hierbei kommen Kapillarkräfte zum Einsatz, welche die DNA auf die Membran transferieren. Es wurde mit einem in 10x SSC-Puffer getränkten Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) und einer Glasplatte eine Brücke über einem Transferpuffer-Reservoir (10x SSC) gebaut, auf welche das Gel mit der Oberseite nach unten aufgelegt wurde. Die Seitenränder des Gels wurden mit Parafilmstreifen abgedichtet, um den Transfer über das Gel zu sichern. Die Hybond N⁺-Nylonmembran wurde unter Ausschluss von Luftblasen auf das Gel gelegt. Es folgten zwei Schichten von in Transfer-Puffer getränkten Whatman-Papieren sowie ein ca. 15 cm hoher saugfähiger Zellstoffstapel. Die zum Abschluss aufgelegte Glasplatte wurde mit einem Gewicht (<500 g) beschwert.

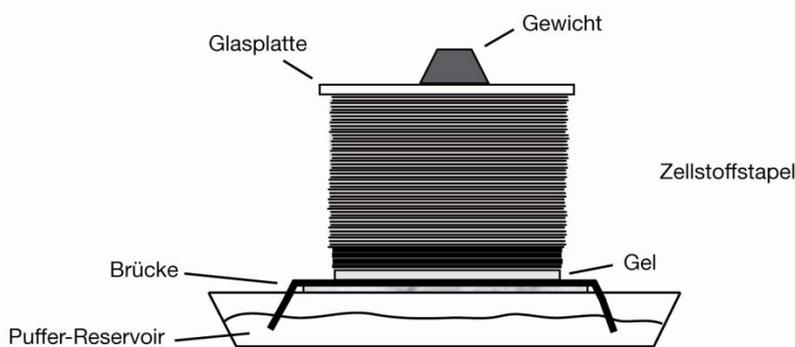


Abb. 16 Schematischer Aufbau eines Kapillar-Blots.

Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus einem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran.

Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Nach dem Abbau des Kapillar-Blots wurde die Membran in 2x SSC-Puffer gewaschen und die transferierte DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht im Crosslinker dauerhaft auf der Membran fixiert.

Vor der Hybridisierung wurde die Membran in 30 ml Prähybridisierungslösung (3.5) bei 65°C im Hybridisierungssofen für 2 h vorhybridisiert. Zur Blockierung von unspezifischen DNA-DNA-Wechselwirkungen wurde dem Puffer 300 µl denaturierte Lachssperma-DNA [10 mg/ml], welche 5 min bei 96°C aufgeköcht und 5 min auf Eis inkubiert wurde, zugefügt.

Nach der Prähybridisierung wurden 25 ng der DNA-Sonde (in einem Gesamtvolumen von 45 µl) denaturiert (96°C, 5 min, kurz auf Eis) und mit Hilfe des Rediprime-Kits entsprechend den Herstellerangaben mit 50 µCi α -³²P-dCTP (=1,85 MBq) markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch die Verwendung einer MicroSpin S-200HR-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, München) von der markierten Sonde entfernt. Zur Denaturierung der Doppelstränge wurde die DNA-Sonde für 3 min bei 96°C aufgeköcht und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde bis auf ~10 ml verworfen, zu welcher die markierte DNA-Sonde pipettiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zweifach mit 20 ml auf 65°C vorgewärmten Waschpuffer I für 10 min gewaschen, um ungebundene Sonden-DNA zu entfernen. Im Anschluss wurde der Waschschrift mit Waschpuffer II wiederholt. Die gewaschene Membran wurde in einer Phosphoscreen-Kassette (GE Healthcare Europe GmbH, München) belichtet und spezifisch gebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe des Phosphoimagers (Molecular Dynamics, Krefeld) visualisiert und dokumentiert.

Um eine Membran mit unterschiedlichen Sonden zu hybridisieren, wurde die Membran nach der Detektion in ddH₂O gewaschen und im Anschluss bei 37°C für 30 min in Strip-Lösung auf einem Wippschüttler inkubiert. Nachdem die spezifische radioaktive Sonde durch den Waschschrift

entfernt wurde, folgte die Equilibrierung der Membran in 2x SSC-Puffer und eine erneute Prähybridisierung.

4.1.5 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Färbung von murinen oder humanen Gewebeschnitten wurden Paraffinschnitte (4.1.5.1) in einer absteigenden Alkoholreihe (3x 5 min Xylol, 2x 10 min 96 % Ethanol, 1x 5 min 70 % Ethanol) entparaffiniert. Die Gewebefixierung beeinträchtigt oder zerstört die Immunreaktivität vieler Antigene und Epitope, indem es zu einer Quervernetzung der Proteine kommt (Maskierung). Um die verlorengegangene Immunreaktivität wiederherzustellen, erfolgte eine hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung durch das Aufkochen der Schnitte für 7 min in 10 mM Zitratpuffer, pH 6.0 und dem anschließenden Abkühlen auf RT im Puffer. Nach einem zweifachen Waschschrift in ddH₂O für 5 min, wurden die Schnitte für 20 min in 3 % H₂O₂ (30 % H₂O₂ verdünnt in Methanol) inkubiert. Nach erneuten Waschschriften (3x 5 min in Leitungswasser, 2x 5 min ddH₂O, 1x 5 min PBS) erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch eine Inkubation für 20 min bei RT mit 5 % Ziegenserum. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (SASH1=1:100 verdünnt in Antikörper-Verdünnungslösung (Dako, Hamburg)) in einer „feuchten“ Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper mit PBS (3x 5 min) gewaschen. Die Inkubation mit dem an HRP-gekoppelten sekundären Antikörper erfolgte für 30 min bei RT.

Die Peroxidaseaktivität wurde mit dem Envision+® System-HRP (Dako, Hamburg) nachgewiesen. Hierbei wird das Substrat-Chromogen DAB von an die Schnitte gebundener Peroxidase in ein unlösliches braunes Präzipitat umgesetzt. Für eine Kernfärbung wurden die Schnitte für 5 min mit Hämatoxylin gegengefärbt (4.1.5.2). Die fertigen Schnitte wurden mit Gelatine versehen und eingebettet. Die Analyse erfolgte mit einem Mikroskop Axiolab (Zeiss, Jena).

4.1.5.1 Einbetten von Geweben

4.1.5.1.1 Paraffin

Frisch entnommenes Mausgewebe wurde in Einbettkassetten (Roth, Karlsruhe) in 3,5-3,7 % Formaldehydlösung fixiert. Das Entwässern, Einbetten in Paraffin und Ausgießen der Proben erfolgte im Pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar nach Standardprotokollen. Die fertigen Paraffinblöcke wurden bei RT gelagert. Das Gewebe wurde mit einem Mikrotom 2 µm dick geschnitten und auf Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Lagerung der Schnitte erfolgte ebenfalls bei RT.

4.1.5.1.2 Kryoschnitte

Gewebe, die Mäusen entnommen wurden, wurden in Azetatpuffer (Infusionslösung Deltajonin, Pfullingen) und flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. in TissueTek (Sakura, Niederlande) eingebettet und auf Trockeneis langsam heruntergekühlt.

Die Lagerung erfolgte in beiden Fällen bei -80°C. Gewebeschnitte (6-8 µm) wurden mit einem Kryostaten (Leica, Wetzlar) angefertigt und auf Superfrost Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Gefrierschnitte wurden für einige Stunden luftgetrocknet und dann ebenfalls bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

4.1.5.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Zur histologischen Beurteilung des Gewebes wurden Schnitte mit den Farbstoffen Hämatoxylin (Zellkern) und Eosin (Zytoplasma) gefärbt. Hierfür wurden die auf Objektträger liegenden Schnitte

1 min lang in 4%-igem Formalin fixiert. Nach einem Waschschrift mit ddH₂O erfolgte die Zellkernanfärbung durch eine Inkubation für 5 min in Hämatoxylin. Der Hämatoxylin-Überschuss wurde 5 min unter fließendem Wasser entfernt. Daraufhin folgte die Gegenfärbung mit Eosin für 1 min. Nach einem kurzen Waschschrift wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 2x 100 % EtOH) dehydriert. Die Verdrängung des Alkohols erfolgte durch eine dreifache Inkubation in Xylol. Die Schnitte wurden final in Eukitt (Kindler, Freiburg) eingebettet. Paraffinschnitte wurden vor der HE-Färbung in einer absteigenden Xylol-/Alkoholreihe entparaffiniert.

4.1.6 Immunzytochemie

Zur spezifischen Detektion von Proteinen in Geweben oder Zellen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper eingesetzt.

Hierfür musste die Probe zuerst durch die Inkubation mit 3 % PFA für 20 min bei RT auf dem Objektträger fixiert werden. Nach einem Waschschrift (3x in PBS) wurde durch eine Inkubation (20 min, RT) in 50 mM NH₄Cl die PFA-Reaktion vollständig abgestoppt. Nach einem weiteren Waschschrift (3x in PBS) wurden die Zellmembranen durch 0,1%-ige Triton X-Lösung permeabilisiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte die Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mittels 2%-igem BSA (in PBS) für 20 min bei RT. Der primäre Antikörper wurde entsprechend in 2%-igen BSA verdünnt und mit der Probe für 1 h bei RT in einer „feuchten“ Kammer inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift mit 2%-igen BSA erfolgte die Bindung des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers für 1 h bei RT unter Lichtausschluss.

Für die Färbung der Zellkerne wurde standardmäßig eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die Proben wurden in 90%-igem Glyzerin/PBS eingedeckelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Arbeiten mit DNA

Die Lagerung genomischer DNA erfolgte bei 4°C. Plasmid-DNA wurde bei -20°C für längere Zeit aufbewahrt. Die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten der Wellenlängen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Zur weiteren Verwendung wurde nur DNA eingesetzt, die einer OD von $A_{260}/A_{280} \geq 1,70$ entsprach.

4.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe oder Zellen

Mausschwanz-Biopsien oder Zellpellets wurden in 500 µl Mausschwanz- bzw. TNE-Lysepuffer und 12,5 µl Proteinase K [10 mg/ml] über Nacht auf einem Thermoschüttler bei 56°C verdaut. Nach dem vollständigen Verdau der Probe wurde die DNA entsprechend der anschließenden Verwendung unterschiedlich aufgereinigt.

4.2.1.1.1 Southern Blot-Analyse, Klonierung und Sequenzierungen

Hierfür wurde die DNA durch die Zugabe von 500 µl eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) und Vortexen gefällt. Die zwei Phasen wurden durch einen Zentrifugations-schritt (14.000 UpM, 10 min bei 4°C) getrennt. Die obere, wässrige Phase, in welcher die DNA in gelöster Form enthalten ist, wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 900 µl eiskaltem 100%-igen Ethanol gefällt. Die ausgefällte DNA wurde 10 min bei 10.000 UpM abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde kurz

mit einer 70%-igen Ethanollösung gewaschen. Nachdem das Pellet luftgetrocknet war, wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

4.2.1.1.2 Genotypisierungen

Um Genotypisierungen mittels PCR durchzuführen, wurde die DNA der verdauten Mausschwanz-Biopsie durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und anschließende Inkubation für 10 min bei RT gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (14.000 UpM, 30 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 400 µl ddH₂O und durch Rotation über Nacht bei RT gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

4.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellklonen

Die Gewinnung genomischer DNA aus Zellen erfolgte im Zusammenhang mit der ES-Zell-Analyse nach zuvor erfolgter Elektroporation und Isolierung einzelner ES-Zellklone. Hierfür wurden die Zellen in 96well-Platten kultiviert. Nachdem sie eine Konfluenz von mind. 80 % erreicht hatten, wurden die adhärennten Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Das trockene Pellet wurde auf der 96well-Platte ü/N bei -20°C gelagert, was einen Zellaufschluss zur Folge hatte.

Für die Analyse der Klone mittels PCR-Screening wurden die Zellen in 25 µl ddH₂O gelöst und für das Screening 1 h bei 56°C mit 5 µl Proteinase K [10 mg/µl] verdaut. Für einen PCR-Ansatz wurden 10 µl des Verdau eingesetzt.

4.2.1.3 Enzymatische Behandlung von DNA

Alle verwendeten Enzyme wurden über die Firma Fermentas, St. Leon-Rot, bezogen.

4.2.1.3.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, gewonnen aus Bakterien (z.B. *CfrI*, welches das erste entdeckte Enzym aus dem Stamm *Citrobacter freundii* RFL1 benennt), welche von den Bakterien zur Abwehr von viraler Fremd-DNA genutzt werden. Sie erkennen eine spezifische Abfolge von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNA, die sie nach einem bestimmten Muster schneiden. Für ihre Entdeckung und ihre Anwendung in der modernen Molekulargenetik bekamen Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton Othanel Smith 1978 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen.

Der Restriktionsverdau diente in dieser Arbeit entweder dem Nachweis oder dem Umklonieren bestimmter DNA-Fragmente. Standardmäßig wurde der Verdau in einem Reaktionsvolumen von 20 µl angesetzt. Um eine inhibitorische Wirkung des dem Enzym zugesetzten Glycerins zu verhindern, wurde das Reaktionsvolumen bei großen Enzymeinheiten jedoch entsprechend erhöht. Das jeweilige Enzym wurde in einer Konzentration von 1 U/µg DNA unter den entsprechenden Pufferbedingungen eingesetzt. Der Verdau wurde bei 37°C im Wasserbad für mindestens 1 h inkubiert. Bei der Verwendung von FastDigest® (FD) Enzymen wurde die Inkubationszeit auf maximal 30 min beschränkt.

4.2.1.3.2 Ligation

Bei der Ligation wird enzymatisch das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende von Nukleinsäuren verbunden. Vektor und Insert wurden je nach Insert-Größe in den Verhältnissen 1:1, 1:3 oder 1:5 eingesetzt. Hierbei entsprach der Vektor einer Konzentration von 50-100 ng/Ligationsansatz. Die Berechnung der einzusetzenden Insertmenge wurde mittels einem Rechner, welcher von der Firma Fermentas, St. Leon-Rot, zur Verfügung gestellt wird (<http://www.fermentas.com/reviewer>) durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 20 µl. Die Ligation erfolgte je

nach Insertgröße in maximal 20 min bei RT. Für eine anschließende Transformation wurden 10 µl des Ansatzes eingesetzt.

4.2.1.4 Topo[®]TA-Klonierung

Mit dem Topo[®]TA System ist es möglich, PCR-Produkte direkt in einen Plasmid-Vektor zu subklonieren. Der pCR[®]2.1 Topo[®]-Vektor liegt linearisiert mit 3'-dT-Überhängen und aktivierter Topoisomerase I vor. Die Topoisomerase I ist kovalent an den Vektor gebunden.

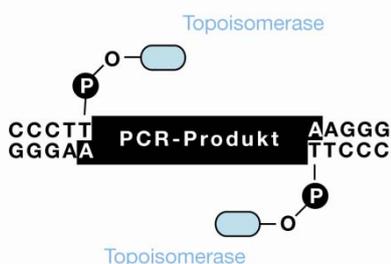


Abb. 17 Schematische Darstellung des Topo[®]TA-Systems.

Die Topoisomerase I (gewonnen aus dem *Vaccinia* Virus) bindet an doppelsträngige DNA und bricht das Phosphodiester-Rückgrat nach einer 5'-CCCTT-Sequenz auf (Shuman, 1991). Die Phosphotyrosin-Bindung zwischen Topoisomerase und DNA ist reversibel und kann durch die freie 5'-Hydroxygruppe des geschnittenen DNA-Stranges rückgängig gemacht werden (Shuman, 1994).

Die für die Amplifikation verwendete Taq-Polymerase besitzt eine terminale Transferaseaktivität, welche 3'-dA-Überhänge generiert. Durch diese Eigenschaften kann das PCR-Produkt direkt in den Vektor kloniert werden.

Direkt nach der finalen Elongationsphase wurde das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen, um sicherzustellen, dass ein einzelnes Produkt bei der PCR amplifiziert wurde. Ein Klonierungsansatz entsprach einem Gesamtvolumen von 6 µl. Hierfür wurden je nach Intensität der Gelbande 1-4 µl des PCR-Produktes eingesetzt. Nach der Zugabe von 1 µl Salzlösung [1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂] und 1 µl des linearisierten pCR[®]2.1 Topo[®]-Vektors wurde der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert.

4.2.1.5 Transformation von Bakterien

4.2.1.5.1 OneShot[®]Top10 Transformation

Nach einer Topo[®]TA-Klonierung folgte die Transformation von chemisch kompetenten OneShot[®] Top10 Bakterien, indem die Zellen mit 2 µl des Klonierungsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Durch einen Hitzeschock im 42°C-Wasserbad (30 sec) und 2-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNA in die Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium und einer Inkubation für 45 min bei 37°C in einem Inkubator wurden die Bakterien in zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf LB^{Amp}-Platten (+20 µl X-Gal [40 µg/ml]) ausgestrichen. Die ü/N bei 37°C hochgewachsenen Klone wurden mittels einer Blau-Weiß-Selektion vorselektiert.

Das Prinzip der Blau-Weiß-Selektion beruht auf der Unterbrechung des innerhalb der „multiple cloning site“ (MCS) liegenden *lacZ'*-Gens. *LacZ'* ist das Reportergen für β-Galaktosidase. Im Bakterium wird das Substrat X-Gal von dem aktiven Enzym β-Galaktosidase hydrolysiert und in ein blaues Abbauprodukt umgewandelt. Die blaue Farbe weist darauf hin, dass das Bakterium den unligierten Vektor aufgenommen hat. Kommt es zu einer Funktionsunfähigkeit der β-Galaktosidase aufgrund des Einbaus des PCR-Produktes, bildet das Bakterium eine weiße Kolonie.

Für die DNA-Isolierung wurden „Minipräps“ angeimpft und aufgereinigt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch einen Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, dessen Schnittstellen die Einbaustelle für das PCR-Produkt flankieren, analysiert.

4.2.1.5.2 Standardisierte Transformation von chemo-kompetenten *E.coli*-Stämmen

100 µl von chemisch kompetenten *E.coli*-Stämmen (DH5 α , Top10, JM110) wurden auf Eis aufgetaut und für 45 min mit 50-100 ng Plasmid-DNA inkubiert. Durch einen Hitzeschock im 42°C-Wasserbad (90 sec) und nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNA in die Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium und einer Inkubation von 45 min bei 37°C auf dem Rüttler [200 UpM] wurden die Bakterien auf LB-Platten, die der jeweiligen Plasmid-vermittelten Antibiotikum-Resistenz entsprachen, ausgestrichen.

4.2.1.6 Plasmidisolierung

4.2.1.6.1 Minipräp

Zur Präparation von geringen Mengen an Plasmid-DNA wurden 2 ml der über Nacht angeimpften Bakterienkulturen abzentrifugiert (3.000 UpM, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl P2-Puffer, 4-6-maligem Wenden und Inkubation für 10 min bei RT wurden die Zellen lysiert. Die Präzipitation erfolgt durch die Zugabe von 300 µl eisgekühltem P3-Puffer, erneutem Wenden und einer Inkubation von 15 min auf Eis. Das Präzipitat, welches genomische DNA, Proteine und Zelltrümmer enthält, wurde durch einen Zentrifugationsschritt (14.000 UpM, 30 min bei 4°C) von der flüssigen Phase getrennt. Der Überstand, in welchem die Plasmid-DNA in gelöster Form vorliegt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA geschah durch die Zugabe von 700 µl Isopropanol und eines darauffolgenden Zentrifugationsschrittes (14.000 UpM, 30 min bei 4°C). Nachdem der Überstand verworfen, das Pellet zweifach mit 70%-igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet wurde, wurde die DNA in 50 µl ddH₂O und bei 37°C im Wasserbad (1 h) gelöst.

4.2.1.6.2 Maxipräp

Zur Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde zunächst eine Vorkultur (2 ml LB-Medium plus entsprechendem Antibiotikum) der Bakterien für 5 h bei 37°C im Inkubator [200 UpM] angesetzt. Die Vorkultur diente anschließend zum Animpfen eines 200 ml-Kulturansatzes, welcher über Nacht bei den oben genannten Bedingungen weitergezogen wurde. Die Bakterien wurden pelletiert (1.500 UpM, 15 min bei 4°C) und die DNA mit Hilfe des QIAquick Plasmid Purification Kits isoliert. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und unter Verwendung des mitgelieferten Puffersystems.

4.2.1.7 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA erfolgte meist im Anschluss an einen Verdau oder eine PCR-Amplifikation zur Sequenzierung. Falls die Plasmid-DNA linearisiert wurde, so wurde der Verdau über das Säulchen-System QIAquick PCR Purification der Firma Qiagen, Hilden, aufgereinigt.

Die Isolierung und Aufreinigung von größeren DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits. Hierfür wurde der Verdau bzw. das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen, damit es zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente kommt. Das Gelstück, welches das gewünschte DNA-Fragment enthielt, wurde ausgeschnitten und die weitere Aufreinigung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers und unter Verwendung des mitgelieferten Puffersystems.

4.2.1.8 Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Eurofins MWG Operon in Martinsried, München.

4.2.2 Arbeiten mit RNA

Da RNA der Gefahr ausgesetzt ist, leicht mit allgegenwärtigen RNasen verunreinigt und abgebaut zu werden, wurden für die Arbeiten mit RNA ausschließlich RNase-freie Lösungen, Verbrauchsmaterialien und Geräte verwendet. Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem ddH₂O angesetzt. Die Geräte, die in direkten Kontakt mit der RNA kamen, wurden vor dem Gebrauch mit einer 3%-igen H₂O₂-Lösung oder mit einer NaOH-Lösung [1 N] behandelt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Photometer NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop® Techn., Wilmington, USA). Die RNA wurde kurzfristig bei -20°C und längerfristig bei -80°C gelagert.

4.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden, falls adhären, trypsinisiert und bei 1.500 UpM zentrifugiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit PBS und erneuter Zentrifugation. Je nach Zellzahl wurde das Zellpellet in 350 µl (<1x10⁶ Z) bzw. 600 µl (>1x10⁶ Z) RLT-Puffer, dem β-Mercaptoethanol zugefügt wurde, aufgenommen und die Zellen lysiert. Zur Homogenisierung wurde das Zelllysate über QIAshredder-Säulchen durch Zentrifugation (13.000 UpM, 2 min) aufbereitet. Die weitere RNA-Aufreinigung erfolgte mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden). Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem ddH₂O eluiert.

4.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA wurden in flüssigen Stickstoff schockgefrorene Gewebeproben verwendet, welche bei -80°C gelagert waren. Das Gewebe wurde im gefrorenen Zustand abgewogen (50-100 mg), mit Trireagenz [1 ml/100 mg Gewebe] versetzt und anschließend im TissueLyser (Qiagen/Retsch, Hilden) homogenisiert. Nach einem Inkubationsschritt (5 min bei RT) wurden 200 µl Chloroform/ml Trireagenz zum Ansatz pipettiert und für 1 min gevortext. Nach einem erneuten Inkubationsschritt (15 min bei RT) wurden die Phasen mittels Zentrifugation (13.000 UpM, 15 min bei 4°C) getrennt. Die wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die organische untere Phase wurde verworfen. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol (je 1 ml Trireagenz). Die RNA wurde nach einer Inkubation (10 min bei RT) und einem Zentrifugationsschritt (13.000 UpM, 15 min bei 4°C) sedimentiert, der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol/DEPC gewaschen und luftgetrocknet. Je nach eingewogenem Gewebe wurde das Pellet in 50-100 µl RNase-freiem ddH₂O und durch eine Inkubation im Wasserbad (10 min bei 56°C) gelöst.

Die Konzentration und der Reinheitsgrad wurden am NanoDrop® ND-1000 bestimmt. War der Reinheitsgrad der RNA unzureichend, wurde die Aufreinigung entsprechend dem Protokoll in 4.2.2.1 wiederholt.

4.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop® ND-1000. Nach der Kalibrierung des Gerätes mit dem jeweiligen DNA-/RNA-Lösungsmittel wurden 1,5 µl der Nukleinsäurelösung für die Bestimmung verwendet. Um zusätzliche Aussagen über eventuelle Proteinkontaminationen machen zu können, wurde der Quotient aus den ODs der Wellenlängen 260 nm und 280 nm berechnet. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ liegt bei reiner DNA/RNA zwischen 1,8-2,0.

4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe in einem konstanten elektrischen Feld. Agarosepolymere bilden je nach eingesetzter Konzentration ein engporiges Gel, durch welches die negativ geladenen Nukleinsäure-Stränge aufgrund der angelegten elektrischen Spannung wandern. Kleine Moleküle wandern danach schneller durch die Poren als große, linearisierte Moleküle.

Die Agarosekonzentration einer effektiven Auftrennung richtete sich nach der Molekülgröße der interessierenden DNA.

0,8-1 % Agarose (w/v)	0,5-30 kb
1,5-2 % Agarose (w/v)	100-500 bp

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst, mit Ethidiumbromid [50 ng/ml] versetzt und in den zusammengebauten Gelschritten gegossen. Nach dem vollständigen Erstarren des Gels wurde der DNA 5x Probenpuffer (Orange G) zugefügt. Das Gel wurde mit dem DNA-Puffer-Gemisch beladen und in einem elektrischen Feld von 100-130 V [5 V/cm Elektrodenabstand] aufgetrennt. Als Referenzmarker wurden DNA-GeneRuler™ der Firma Fermentas, St. Leon-Rot, verwendet. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren. Nach Anregung mit UV-Licht erscheint der gebildete Komplex im sichtbaren Bereich als rot-orange leuchtende DNA-Bande. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte durch einen Transilluminator und wurde mit einem digitalen Videosystem dokumentiert.

4.2.5 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Bei der Synthese von cDNA (von engl. *complementary DNA*) dient mRNA (von engl. *messenger RNA*) als Matrize für das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase. Diese DNA-Polymerase bindet durch einen Primer an die RNA. Hierfür dienen synthetische Oligo-dT-Nukleotide, welche komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA sind, und Random Hexamer-Oligonukleotide, bestehend aus zufälligen Kombinationen von sechs Nukleotiden. Für die cDNA-Synthese wurden Reagenzien der Firma Fermentas, St. Leon-Rot, verwendet. Hierbei wurden 2 µg RNA in einem Volumen von 38 µl eingesetzt. Zu Beginn wurde die RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₈ [0,5 µg/µl] und 1 µl Random Hexamer-Primer [0,2 µg/µl] für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gekühlt, um eventuelle Sekundärstrukturen der mRNA aufzulösen. Nach der Zugabe von 8 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl dNTP-Mix [10 mM], 1 µl Ribonuklease Inhibitor [40 U/µl] und 2 µl Reverse Transkriptase [200 U/µl] wurde der Ansatz für 10 min bei RT vorinkubiert und für eine weitere Stunde im 42°C-Wasserbad inkubiert, wobei die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte. Das Abstoppen der Reaktion wurde durch die Denaturierung des Enzyms (5 min bei 96°C) erzielt. Die gewonnene cDNA wurde als Template für die RT-PCR eingesetzt.

4.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um einen definierten DNA-Abschnitt, welcher durch spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, definiert wird, *in vitro* zu vervielfältigen, ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) die Methode der Wahl (<http://www.youtube.com/watch?v=fsVeK1d2O9E&feature=related>). 1983 wurde sie von Kary Mullis entwickelt (Saiki et al., 1988), wofür er 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.

Drei wesentliche Schritte zeichnen die PCR aus. Im ersten Schritt wird eine Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA (94°C) durchgeführt. Danach erfolgt die Anlagerung (Annealing) der gegenläufigen, zur DNA komplementären Primer. Diese Anlagerungstemperatur muss für jedes Primer-Paar optimiert werden. Dieser kurze Doppelstrang wird durch eine spezielle hitzestabile

DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) verlängert (Elongation). Die Temperatur für eine optimale Enzymaktivität für die Synthese in 3'→5'-Richtung liegt bei 72°C. Aus einem Doppelstrang werden so zwei neue DNA-Stränge synthetisiert. Durch die zyklische Wiederholung der drei Schritte (30-35x) kommt es somit zu einer exponentiellen Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnittes. Die Dauer der einzelnen Schritte variiert entsprechend der Größe des PCR-Produktes.

Alle hierfür verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Fermentas, St. Leon-Rot, bezogen. Für einen 50 µl Ansatz wurden 50-100 ng DNA als Template eingesetzt. Nach Zugabe der Komponenten 10x Reaktionspuffer, dNTPs [5 mM] als Bausteine für den zu synthetisierenden Strang, MgCl₂ [25 mM], welches für die Funktion der Polymerase essentiell ist, sowie den *sense* und *antisense* Primern [0,5 µM/Ansatz] wurde im Allgemeinen ein „Hotstart“ durchgeführt, bei dem die Taq-Polymerase [2 U/Ansatz] erst nach der Denaturierung (5 min bei 94°C) zum PCR-Ansatz gegeben wurde. Die Menge an dNTPs (1-2 µl) und MgCl₂ (2-5 µl) variierte entsprechend der Größe des PCR-Produktes und der Primerspezifität.

Tab. 3 PCR-Programme für Genotypisierungen¹, ES-Screening² und DNA-Methylierung³.

PCR	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklusanzahl	Produkt [bp]
Del Cre ¹	94°C, 45 sec	55°C, 45 sec	72°C, 45 sec	30	~200
neo/wt ¹	94°C, 45 sec	64°C, 45 sec	72°C, 45 sec	35	271/349
ES-Klone/wt ²	94°C, 60 sec	60°C, 60 sec	72°C, 60 sec	35	747/768
p16 ³	94°C, 30 sec	65°C, 30 sec	72°C, 30 sec	35	248
GAPDH ³	94°C, 30 sec	65°C, 30 sec	72°C, 30 sec	35	308

Der erste Denaturierungsschritt wurde für gewöhnlich um 5 min verlängert, um zu gewährleisten, dass die komplette, in der PCR eingesetzte Template-DNA als Einzelstrang vorliegt. Nach dem letzten Elongationsschritt folgte je nach Produktgröße ein Inkubationsschritt für 7-10 min bei 72°C.

4.2.7 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zum quantitativen Nachweis von cDNA wurde die sogenannte Real-Time PCR durchgeführt. Bei dieser Methode kann man durch die gebildete Menge an cDNA die im Ausgangsmaterial vorhandene Menge an mRNA herleiten. Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das SYBR[®]Green System der Firma Applied Biosystems Inc., Foster City USA, verwendet. Dabei handelt es sich um einen in die DNA interkalierenden Farbstoff. Die Fluoreszenz dieser Farbstoffe steigt durch die Anbindung an die DNA an und nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Nach einer bestimmten Zykluszahl wird Fluoreszenz messbar. Dieser Wert bildet den Schwellenwert oder C_T-Wert. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und steigt, wie auch die DNA-Menge, exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus und setzt dies ins Verhältnis zu einem ubiquitär exprimierten Kontroll-Gen, erhält man eine quantitative Aussage.

In einem Ansatz von 30 µl Gesamtvolumen wurden 100 ng cDNA [10 ng/µl] eingesetzt. Nach Zugabe von 3 µl ddH₂O, 1 µl *sense* und *antisense* Primern [20 nM] und 15 µl 2x SYBR[®]Green-Mastermix wird die qRT-PCR gestartet. Ein Reaktionszyklus umfasste für gewöhnlich vier Schritte.

50°C	120 sec	
95°C	600 sec	
95°C	15 sec	} 40 Zyklen
Annealing	60 sec	

Die Annealingtemperatur war primerspezifisch und wird in Tab. 4 aufgeführt.

Um die Spezifität der Fluoreszenz zu überprüfen, wurde im Anschluss eines Laufes zusätzlich der Schmelzpunkt der PCR-Produkte bestimmt. Der Reaktionszyklus dieser sogenannten Dissoziationskurve umfasste die im Folgenden aufgeführten Schritte:

95°C	15 sec
Annealing	20 sec
95°C	15 sec

Die qRT-PCR wurde mit dem ABIPrism™ 7300 Sequence Detector durchgeführt und mit dem Programm Sequence Detection Software v.1.4 ausgewertet. Gerät und Programm sind von der Firma Applied Biosystems Inc., USA, bezogen.

Tab. 4 Primerspezifische Annealingtemperaturen der qRT-PCR.

Primer	Annealing	Produkt
hSASH	60°C	142 bp
hHPRT	58-64°C	141 bp
mSASH	60°C	187 bp
mβ-Aktin	58-64°C	100 bp

4.2.8 Genomweite Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Die Microarray-Technologie ermöglicht die simultane, quantitative Messung der Expression tausender Gene gleichzeitig. Das Grundprinzip des Microarrays ist die Hybridisierung von zwei komplementären einzelsträngigen Nukleinsäuren. Die Genexpression wird bei der Hybridisierung durch Farb- und Helligkeitsintensitäten charakterisiert, welche die Identität und die Expressionsstärke eines Genes bestimmen. Zur Herstellung der Microarrays (GeneChips) benutzt die Firma Affymetrix (High Wycombe, UK) ein kombiniertes Verfahren aus chemischer Festphasensynthese und Photolithographie, bei welchem in einem mehrstufigen *in situ*-Prozess Oligonukleotide (25mere) auf eine Glasoberfläche synthetisiert werden.

Um die SASH1-abhängige Genexpression in Zelllinien zu untersuchen, wurden das Affymetrix-System One-Cycle Target Labeling & Control Reagents-Kit und der GeneChip® U133 Plus 2.0 (Affymetrix, High Wycombe, UK) verwendet und eine vergleichende Microarray-Analyse durchgeführt. Die RNA wurde aus wt-SW480-Zellen und SASH1 anti-SASH1-shRNA exprimierenden und V5-SASH1 überexprimierenden SW480 Zellen gewonnen (4.2.2.1) und auf ihre SASH1-Expression mittels qRT-PCR untersucht.

4.2.8.1 Synthese der doppelsträngigen cDNA

Zur Synthese des ersten cDNA-Stranges wurden 5 µg RNA zusammen mit 2 µl der Poly-A-Verdünnung (1:10.000) und 2 µl T7-Oligo(dT) Primern [50 µM] in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 10 min bei 70°C inkubiert und 2 min bei 4°C gekühlt. Nach der Zugabe von 7 µl First Strand Master Mix (4 µl First Strand Reaktion Mix (5x), 2 µl DTT [0,1 M] und 1 µl dNTPs [10 mM]) und einer 2-minütigen Inkubation bei 42°C wurde 1 µl SuperScript II zum Ansatz pipettiert. Der Ansatz wurde dann für 1 h bei 42°C inkubiert und im Anschluss auf 4°C heruntergekühlt.

Zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurde folgender Master Mix angesetzt:

- 91 µl RNase-freies ddH₂O
- 30 µl 5x Second Strand Reaktion Mix
- 3 µl dNTPs [10 mM]
- 1 µl *E.coli* DNA Ligase
- 4 µl *E.coli* DNA Polymerase I
- 1 µl RNase H

20 µl des Ansatzes von der ersten cDNA-Strang-Synthese wurden zusammen mit 130 µl Master Mix für die Synthese des zweiten cDNA Stranges für 2 h bei 16°C inkubiert. Nach der Zugabe von 2 µl T4 DNA Polymerase und einer 5-minütigen Inkubation des Ansatzes bei 16°C wurden 10 µl EDTA [0,5 M] dazugegeben. Die doppelsträngige cDNA (ds cDNA) wurde im Anschluss aufgereinigt, indem 600 µl cDNA Bindungspuffer zum Ansatz gegeben wurden, dieser kurz gevortext wurde und über ein Säulchen aufgereinigt wurde. Die Elution erfolgte durch 14 µl cDNA Elutionspuffer.

4.2.8.2 Biotin-Markierung

Die zweite *in vitro*-Transkription (IVT) dient nicht nur der weiteren Amplifikation sondern auch der Markierung der cRNA mit biotinylierten Nukleotiden. 12 µl ds cDNA wurden mit 28 µl des IVT Master Mixes [8 µl RNase-freies ddH₂O, 4 µl IVT-Puffer (5x), 12 µl IVT NTP Mix, 4 µl IVT Enzym-Mix] versetzt und für 16 h bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der markierten ds cDNA erfolgte bei RT und ohne Unterbrechung. Bei der schrittweisen Zugabe von 60 µl RNase-freiem ddH₂O, 350 µl IVT cRNA Bindungspuffer und 250 µl 100%-igem Ethanol wurde der Ansatz jeweils kurz gevortext. Die markierte cRNA wurde über ein Säulchen aufgereinigt und in drei Schritten (11 µl, 2x 20 µl) in einem Gesamtvolumen von 51 µl RNase-freiem ddH₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung am NanoDrop® ND-1000.

Die cRNA wurde zur Kontrolle fragmentiert und auf ein RNA-Gel aufgetragen. Hierfür wurden alle verwendeten Geräte und Utensilien vor Arbeitsbeginn mit 3 % H₂O₂ gereinigt. 2 µg cRNA wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 10 µl RNA-Auftragspuffer bei 75°C aufgeköcht und zusammen mit 1 µl Ethidiumbromid [1:10 Verdünnung] auf ein RNA-Gel aufgetragen. Das Gel wurde bei >60 mV zur langsamen Auftrennung laufen gelassen. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet.

Gelzusammensetzung:

- 1,2-1,5 % Agarose für RNA
- 1x MOPS
- 1/20 Formaldehyd [38 %]

4.2.8.3 RNA-Fragmentierung und Hybridisierung

20 µg Biotin-markierte cRNA wurden mit 8 µl Fragmentierungspuffer (5x) in einem Gesamtvolumen von 40 µl entsprechend den Herstellerangaben durch eine Inkubation für 35 min bei 94°C chemisch fragmentiert.

Die im Anschluss folgende Hybridisierung wurde von Gabriela Jusek (MTA) durchgeführt.

4.2.8.4 Qualitätsanalyse und Datenaufbereitung

Die Qualitätsanalyse und die Aufbereitung der Rohdaten wurden von PD Dr. med. Reinhard Hoffmann (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München) durchgeführt.

Die durch den Scanner ermittelten Messdaten werden zunächst als Bilddateien gespeichert. In der darauffolgenden Normalisierung werden die Fluoreszenzen der einzelnen Chips auf die durch-

schnittliche Fluoreszenz angeglichen. Aus den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Pixel für jede Zelle wird eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität ermittelt.

Jedem Gen sind auf dem Chip mehrere Zellen zugeordnet. Ein Teil der Zellen enthält die jeweils zu einem bestimmten Bereich des Gens vollständig komplementären Sonden. Dies ermöglicht eine optimale Hybridisierung von Sonde und cRNA (engl.: perfect match (PM)). Die verbleibenden Zellen enthalten Oligonukleotide, die mit den komplementären Sonden bis auf eine ausgetauschte Base identisch sind. Somit kommt es an einer Position zu einer Fehlpaarung zwischen Sonde und cRNA (engl.: mismatch (MM)) und folglich zu keiner oder einer wesentlich schwächeren Bindung. Die Relation der PM-Signale zu den MM-Signalen ist ein Maß für die Spezifität der Hybridisierung. Nach der Ermittlung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität wird von allen, einem Gen zugehörigen PM-MM-Paaren ein Vergleich aufgestellt. Durch das Verhältnis der beiden Signale kommt es zu der Berechnung eines positiven oder negativen Wertes. Die sogenannte *Average Difference* (*Avg Diff.*) ist ein relatives Maß für den Expressionsgrad eines Gens und wird durch die durchschnittliche Differenz der Durchschnittsintensitäten (*Average Intensities*) von PM-MM-Paaren berechnet. Sie stellt somit die zusammenfassende Beurteilung aller Zellen eines Genes dar.

Das Verhältnis der *Average Intensities* der PM-MM-Paare ist auch die Grundlage der Berechnung des *Absolut Calls*. Dieser Wert gibt an, ob ein bestimmtes Transkript auf dem Chip hybridisiert ist oder nicht und definiert somit ein Gen als *Present* (P) (= detektierbar), *Marginal* (M) (= Grenzwert) oder *Absent* (A) (= nicht detektierbar).

Bei einer vergleichenden Analyse werden die Messdaten eines Chips als Basislinie definiert und die Werte eines zweiten Chips (experimenteller Chip) als Differenz zur Basislinie berechnet. Der *Fold Change* (= x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression dar. Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens im experimentellen Chip gegenüber dem Basis-Chip erhöht ist, bzw. negativ, wenn die Transkription gegenüber dem Basis-Chip geringer ist.

Die Statistik definiert den linearen Korrelationskoeffizienten r . Er ist ein Maß für die Stärke des linearen Zusammenhanges. Ist der Zusammenhang deutlich, so ist es durchaus möglich, die Regressionsgerade in die Punktwolke zu legen. Für r gilt $-1 \leq r \leq +1$. Ist $r > 0$, spricht man von einer positiven, bei $r < 0$ von einer negativen Korrelation. Der lineare Zusammenhang ist hoch und die Punkte liegen dicht an der Regressionsgeraden. Je näher der Betrag von r bei 0 liegt, desto weiter ist die Punktwolke um die Regressionsgerade gestreut und desto geringer ist der Zusammenhang.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Proteinlysate

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung von Proteinlysaten wurden auf Eis bzw. in vorgekühlten Gerätschaften (4°C) durchgeführt. Generell wurden Proteinlysate max. drei Mal aufgekocht und auf ein Gel aufgetragen. Alle Proteinlysate wurden bei -20°C gelagert.

4.3.1.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Zellen wurden geerntet ($>5 \times 10^6$) und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in RIPA-Puffer (+Inhibitoren) lysiert und für 10 min bei 4°C geschüttelt. Nach einem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (15.000 UpM, 15 min bei 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 3x SDS versetzt (Endkonzentration 1x SDS) und für 5 min bei 96°C aufgekocht.

4.3.1.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Das Gewebe wurde zügig abgewogen ohne dass es zu einem Antauen der Gewebestücke kam, und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Gewebe wurde nach Zugabe von 100 µl RIPA-Puffer (+Pefa, +0,1 % SDS, +PIC, +Na₃VO₄) je 10 mg Gewebe im TissueLyser [30/s, 3 min] aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe zur vollständigen Lyse für 10 min auf dem Rotationsrad bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation (14.000 UpM, 15 min bei 4°C) wurden Gewebetrümmer vom Lysat getrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 3x SDS-Puffer versetzt und für 5 min bei 96°C aufgeköcht.

4.3.2 Zellkernfraktionierung

Um Proteine entsprechend ihrem Kompartiment (Zellkern, Membran, Zytoplasma) in der Zelle aufzutrennen, wurde eine Zellkernfraktionierung durchgeführt. Hierfür wurden 1x10⁷ Zellen am Vortag der Lyse ausgesät, um dann in 500 µl CLB-Puffer lysiert zu werden. Der CLB-Puffer ist eine hypotonische Lösung, durch welche die Zellen aufplatzen. Die Zellkerne bleiben jedoch intakt. Nach der Lyse und einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mittels eines vorgekühlten Dounce-Homogenisators (50x „douncen“) zusätzlich mechanisch aufgeschlossen und abzentrifugiert (3.000 UpM, 5 min bei 4°C). Das Pellet (P1), welches die unaufgeschlossenen Zellkerne enthält, wurde in 800 µl TSE-Puffer resuspendiert. Die Kernhüllen wurden durch 50x „douncen“ im Homogenisator aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (3.000 UpM, 5 min bei 4°C) folgte ein finaler Waschschrift in 800 µl TSE-Puffer. Nach abschließendem Zentrifugationsschritt (3.000 UpM, 5 min bei 4°C) wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 100 µl RIPA-Puffer (+1x PIC, +Pefa, +0,1 % SDS) resuspendiert.

Der zytosolische Überstand (Ü1) wurde bei 23.000 UpM für 15 min und 4°C zentrifugiert, um partikuläre Bestandteile und Membranen (P2) vom Zytoplasma (Ü2) zu trennen.

Alle Fraktionen wurden mit der entsprechenden Menge an SDS-Puffer versetzt und für 5 min bei 96°C aufgeköcht, bevor die Proben bei -20°C gelagert wurden.

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von mit SDS-Puffer versetzten Proteinen in einem elektrischen Feld dient die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). SDS ist ein anionisches Detergens, welches nicht-kovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen und somit Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört. Der Pufferzusatz β-Mercaptoethanol reduziert zusätzlich Disulfidbrücken. Die Proteine werden hauptsächlich entsprechend ihrer Masse aufgetrennt, da die negativ geladenen SDS-Moleküle durch Anlagerung an die Proteine deren Eigenladungen kompensieren.

Zuerst wird das Trenngel zügig zwischen zwei abgedichteten Glasplatten, welche durch einen Abstandshalter (Spacer) voneinander getrennt werden, gegossen. Um einen geraden Abschluss des Geles zu erreichen, wird die Gelgrenze mit einer Wasserschicht bedeckt. Nach der Auspolymerisierung des Trenngels wird das Wasser abgegossen und das Sammelgel gegossen, wobei in das noch flüssige Sammelgel der Probenkamm eingesetzt wird. Im Laemmli-System ist das Sammelgel notwendig, um allen Proteinen denselben Startpunkt für die Trennung zu ermöglichen; Proteine mit dem gleichen Migrationsverhalten erscheinen nach der Trennung als klare Bande im Trenngel. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren der Gele wird die Abdichtung der Kammer und der Probenkamm entfernt und die Platten werden in die mit SDS-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer eingespannt.

Tab. 5 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

Lösungen	Trenngel (20 ml) 5 ml/Gel				Sammelgel (10 ml) 2 ml/Gel
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	5 %
(Proteingröße kDa)	100-200	50-150	40-70	10-50	
ddH ₂ O	9,7 ml	8,0 ml	6,4 ml	4,7 ml	6,4 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	5 ml	6,7 ml	8,3 ml	10 ml	1,0 ml
1,5 M Tris, pH 8.8	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	
0,5 M Tris, pH 6.8					2,4 ml
10 % SDS	230 µl	230 µl	230 µl	230 µl	100 µl
10 % APS	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	200 µl
TEMED	11,4 µl	11,4 µl	11,4 µl	11,4 µl	5 µl

Die Porengröße der Gelmatrix entspricht der Konzentration an Acrylamid und wird je nachdem, in welchem Größenbereich die aufzutrennenden Proteine liegen, gewählt. Der Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) sowie der Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) werden zum Schluss dazugegeben.

Vor dem Auftragen der Proteinproben in die Gelkammern wurden sie 5 min bei 95°C aufgeköcht und kurz abzentrifugiert. Durch das Zusammenspiel von SDS, Hitze und dem Reduktionsmittel werden nun die Proteine in der Probe vollständig denaturiert, linearisiert und mit einer „Hülle“ aus negativ geladenen SDS-Molekülen versehen. Parallel wurde ein Referenzmarker (PageRuler™, Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 V (Sammelgel) bzw. 130 V (Trenngel).

4.3.4 Rac1 Aktivierungsassay

Die kleine GTPase Rac1 spielt in der Organisation von Aktinfilamenten und der Ausbildung von Membran-„Ruffles“ eine wichtige Rolle. Aktives Rac1 liegt in der GTP-gebundenen, inaktives Rac1 in der GDP-gebundenen Form vor. GTP-gebundenes Rac1 bindet spezifisch an die p21-Bindedomäne der p21-aktivierten Proteinkinase Pak1. Diese Eigenschaft wird im EZ-Detect™ Rac1 Activation Kit von Thermo Scientific, Rockford, USA, genutzt, um direkt und selektiv den Aktivierungsgrad von kleinen GTPasen zu bestimmen. Hierbei kommt ein GTS-Fusionsprotein, welches die Bindedomäne von humanen Pak1 (GST-human Pak1-PBD) enthält, zum Einsatz.

Der Assay wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Arbeiten wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Für den Assay wurde eine Protein-Menge von 650 µg eingesetzt, welche zuvor mittels des BCA-Proteinassays (4.3.5) bestimmt wurde. Das Proteinlysat wurde zunächst zusammen mit 20 µg des GST-markierten humanen Pak1-PBD und Glutathion-Immobilisierungsbeads für 1 h bei 4°C in dem Säulchen inkubiert. Dann erfolgte ein dreifacher Waschgang mit dem Lysepuffer (7.200 UpM, 1 min bei 4°C). Für die Elution des aktiven Rac1 wurde das Säulchen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl 2x SDS für 5 min bei 96°C aufgeköcht und abzentrifugiert (7.200 UpM, 2 min bei 4°C). Das Lysat wurde bis zur Weiterverwendung im Western Blot bei -20°C gelagert.

4.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Cu⁺-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. Proteine besitzen die Fähigkeit, Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen zu reduzieren.

Die Proteinkonzentration einer Probe wurde anhand einer BSA-Verdünnungsreihe bestimmt. Standardmäßig erfolgte eine Doppelbestimmung aller Proben auf einer Mikrotiterplatte. Zu 10 µl Probenvolumen wurden 200 µl des BCA™ Detektionsgemisches (50 Teile Reagenz A und ein Teil Reagenz B) von Thermo Scientific, Rockford, USA, pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min im Dunkeln bei 37°C wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 *In vitro*-Demethylierung von DNA

Jede Zelllinie besitzt ihr spezifisches Methylierungsmuster, so dass es zu einer zelltyp-spezifischen Proteinexpression kommt. Die Methylierung erfolgt mittels sogenannter DNA-Methyltransferasen, welche CpG-Inseln erkennen und methylieren. Diese Methyltransferasen können durch kovalente Bindung des Azanukleosidderivats 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza) irreversibel gehemmt werden (Jones & Taylor, 1980). Außerdem kommt es während der Replikationsphase von Zellen zu einem Einbau von 5-Aza in genomische DNA, welcher eine C5-ständige Methylierung von Cytosin inhibiert. Der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) wurde eingesetzt, um eine etwaige expressionshemmende Histondeacetylierung zu verhindern.

Um diesen demethylierenden Effekt auf die Transkriptionseffizienz methylierter Genpromotoren zu untersuchen, wurden am Vortag 1x10⁶ Zellen unterschiedlicher Zelllinien ausgesät. Die Demethylierung erfolgte in drei unterschiedlichen Versuchsansätzen. Die Inkubation mit 5-Aza [1 µM] wurde 72 h, die Inkubation mit TSA [100 nM] 16 h durchgeführt. Bei dem kombinierten Versuchsansatz wurden die Zellen zuerst 16 h mit 5-Aza inkubiert, woraufhin ein Mediumwechsel und ein weiterer Inkubationsschritt für 16 h mit TSA folgte. Kontrollzellen wurden methodengleich behandelt, wobei die Reagenzien 5-Aza und TSA mit dem gleichen Volumen ihres Lösungsmittels, hier: DMSO, ersetzt wurden. Die Zellen wurden jeweils direkt nach der Beendigung der Behandlung geerntet und für die RNA-Extraktionen aufbereitet.

4.4.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation von allen Zellen erfolgte generell in einem Brutschrank bei 37°C, 7 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mit frischem Medium versorgt und nach dem Erreichen der Konfluenz passagiert. Die Zellablösung adhärenter Zellen erfolgte durch eine 5-10-minütige Inkubation bei 37°C in einer Trypsin/EDTA-Lösung. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von frischem Zellkulturmedium.

Das Auftauen, Einfrieren und Passagieren der Zellen erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, nach Standardprotokollen.

4.4.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES) sind pluripotente Zellen, welche aus der inneren Zellmasse von murinen Blastozysten gewonnen wurden (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Diese verlieren auch bei einer längeren Kultivierung nicht ihre Fähigkeit, nach einer Reimplantation in murine

Blastozysten in der Keimbahn anzusiedeln (Bradley et al., 1984). Durch die Reimplantation genetisch veränderter ES-Zellen können somit genetisch veränderte Mauslinien erzeugt werden.

4.4.2.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung von ES-Zellen erfolgte grundsätzlich auf einem Rasen aus mit Mitomycin C vorbehandelten embryonalen Fibroblasten (EF). Um das Ausdifferenzieren der ES-Zellen zu verhindern, wurde das Medium täglich ausgetauscht. Außerdem wurde dem Medium LIF (leukemia inhibitory factor) zugegeben. LIF wird aus dem Medienüberstand von CHO-Zellen gewonnen (4.4.2.3). Undifferenzierte ES-Zellen wachsen kugelförmig mit einem glatten, glänzenden Rand, während ausdifferenzierte Zellkolonien matt und abgeflacht erscheinen und weite Ausläufer bilden.

4.4.2.1.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 5×10^7 ES-Zellen in 7 ml ES-Zellmedium aufgenommen. 200 µg des linearisierten und mittels Natriumazetat-Fällung aufgereinigten Plasmids wurden in einem Volumen von 1 ml PBS gelöst und mit der Zellsuspension gemischt. Jeweils 800 µl wurden in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und einem elektrischen Feld von 340 V und 250 µF ausgesetzt. Die Zeitkonstante (τ) lag in einem Bereich von 4 bis 6. Nach der Elektroporation wurden die Küvetten für 10 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde ein Elektroporationsansatz auf zwei 10 cm-Kulturschalen aufgeteilt. Diese Zellkulturschalen wurden vor der Elektroporation vorbereitet, indem mit Mitomycin C vorbehandelten EF-Zellen in ES-Medium ausgesät wurden.

4.4.2.1.3 Selektion rekombinanter ES-Zellklone

An Tag 2 nach der Elektroporation wurde mit der Selektion rekombinanter ES-Zellklone begonnen. Hierfür wurden die Zellen einem doppelten Selektionsdruck durch Antibiotika-Zugabe [+200 µg/ml G418, +2 µg/ml Ganciclovir] unterworfen. Innerhalb von 5-10 Tagen kommt es so zu einem Absterben aller nicht-rekombinanten Zellen. Nach ca. 14 Tagen sind deutlich sichtbare, Antibiotika-resistente ES-Zellkolonien herangewachsen. Diese wurden einzeln in 96well-Mikrotiterplatten überführt, indem die Klone in PBS gewaschen wurden und unter einem Binokular steril mit einer Mikropipette von der Platte gepickt wurden. In den 96well-Platten wurden die Kolonien zuerst für 10 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA vereinzelt und gut resuspendiert. Anschließend wurden sie auf eine frische 96well-Mikrotiterplatte überführt und mit EF-Zellen ko-kultiviert. Die Klone wurden sowohl auf 96well-, als auch auf 48well-Mikrotiterplatten expandiert. Die 96well-Platten dienen für die PCR-Analyse der Klone. Dafür wurden die dichtgewachsenen Klone mit PBS gewaschen, bei -20°C schockgefroren und in ddH₂O für die Durchführung der PCR lysiert. Währenddessen wurden die Klone auf den 48well-Platten zur Sicherung und bis zum Vorliegen der Ergebnisse der PCR-Analyse in ES-Einfriermedium eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.4.2.1.4 *In vitro* -Cre-Rekombination

Das aus dem Bakteriophagen P1 stammende Cre/loxP-Rekombinationssystem besteht aus der 38 kDa Cre-Rekombinase und deren 34 bp lange loxP (locus of X-over of P1)-Erkennungsstellen. Im Phagen ist das Rekombinasesystem für die Zirkularisierung des linearen Phagengenoms (Hochman et al., 1983) und die Auflösung postreplikativer zirkulärer Genom-Dimere in Monomere zuständig (Austin et al., 1981). Die loxP-Stelle besteht aus einem zentralen, nicht-symmetrischen Element (Spacer) aus 8 bp und aus zwei flankierenden 13 bp langen, palindromischen Wiederholungssequenzen. Durch die Asymmetrie des Spacers wird der Rekombination eine Direktionalität verliehen. Liegen zwei loxP-Stellen in gleicher Orientierung in der DNA vor, so wird die dazwischen liegende Sequenz herausgeschnitten (Exzision). Die daraus resultierenden Produkte tragen

jeweils eine loxP-Stelle. Bei dem reversen Vorgang, der Integration, befinden sich die beiden loxP-Stellen in gegensätzlicher Orientierung zueinander. Der dritte mögliche Reaktionstypus wird als Translokation bezeichnet. Hierzu kommt es, falls die loxP-Stellen auf unterschiedlichen Chromosomen liegen. Alle Reaktionen benötigen weder Energiezufuhr noch zusätzliche Ko-Faktoren. Das stöchiometrische Cre/loxP-Verhältnis entspricht 1:2. Ein Cre-Monomer bindet an eine 13 bp-Region einer loxP-Stelle.

Für die Cre-Elektroporation wurden 5×10^6 ES-Zellen mit dem Cre-Plasmid in einem Gesamtvolumen von 800 μ l ES-Zellmedium gelöst. Das Cre-Plasmid wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (100 pg bis 5 μ g) bei der Elektroporation eingesetzt. Das DNA-Zell-Gemisch wurde in Elektroporationsküvetten überführt und nach einer Inkubation auf Eis (5 min) bei 300 V und 250 μ F elektroporiert. Die Zeitkonstante (τ) lag hierbei bei 6. Nachdem die Zellen nach der Elektroporation für 10 min auf Eis gekühlt wurden, wurden sie auf vorbereitete, mit EF-Zellen beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. 48 h nach der Elektroporation erfolgte eine Vereinzelung der Zellen mittels einer Verdünnungsreihe (1:1.000, 1:5.000, 1:10.000 und 1:50.000) ebenfalls auf vorbereitete, mit EF-Zellen beschichtete 10 cm-Zellkulturschalen. Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Nach 10-14 Tagen konnten einzelne Kolonien wie unter 4.4.2.1.3 beschrieben gepickt und expandiert werden.

4.4.2.1.5 Einfrieren

Das Einfrieren von ES-Zellen erfolgte zur Sicherung rekombinanter Klone direkt auf 48well-Platten. Hierfür wurden die Zellen zuerst durch eine Inkubation mit 100 μ l Trypsin/EDTA-Lösung (10 min bei 37°C) gelöst und vereinzelt. Die Reaktion wurde mit 100 μ l ES-Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit 200 μ l ES-Einfriermedium gemischt, für 30 min bei -20°C und anschließend bei -80°C für bis zu einem Monat gelagert.

Das standardmäßige Einfrieren von ES-Zellen von Zellkulturplatten erfolgte durch Vereinzelung mittels Trypsinierung, Zentrifugation (1.200 UpM, 5 min), Aufnehmen in ES-Einfriermedium und Aliquotieren in Kryoröhrchen. Die Zellen wurden ebenfalls schrittweise heruntergekühlt (siehe oben) und zur langfristigen Lagerung nach 48 h bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt.

4.4.2.2 Embryonale Fibroblasten („feeder“)

Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen) sind für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) notwendig. Als einschichtiger Zellrasen liefern sie den ES-Zellen nicht klar definierte Stoffe, unter anderem Wachstumshormone, die das ES-Zellwachstum begünstigen und einer Ausdifferenzierung entgegenwirken.

EF-Zellen werden in EF-Medium dünn ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz bis zu vier Mal passagiert. Die Ko-Kultivierung mit ES-Zellen erfolgt nach einer Mitomycin C-Behandlung (2,5 h mit 10 μ g/ml) und einem dreifachen Waschschrift mit PBS.

Wurden die EF-Zellen einmal mit Mitomycin C behandelt, wurden sie spätestens nach drei Tagen verworfen.

4.4.2.3 Herstellung des ES-Medien-Zusatzes LIF mittels CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters gewonnen. Sie werden als Expressionssystem rekombinanter Proteine eingesetzt.

LIF (leukemia inhibitory factor) ist ein Zytokin, welches im Organismus von Immunzellen und primären Gliazellen gebildet wird. Das Zytokin spielt eine Rolle in der Hämatopoese, der T-Zellreifung, beim Zell-Turnover in der Neurologie und bei der Genexpression (Patterson, 1994). Bei der

Kultivierung von ES-Zellen bleibt deren Pluripotenz durch die Zugabe von LIF aufrechterhalten (Williams et al., 1988).

LIF wird von dem stabilen CHO-LIF-D-Zellklon produziert und in das Medium sekretiert (Geisse et al., 1996). Die CHO-Zellen wurden in Kulturmedium ausgesät, welches mit dialysiertem FCS (Dialyse: 24 h gegen 2 l PBS) versetzt wurde. Nach der Expansion der Zellen wurden die Zellen 7 Tage lang in Methothrexat-haltigem Medium [2 µM] kultiviert. Durch die Zugabe von Methothrexat wird die Expressionsrate des Produktgens durch Amplifizierung erhöht. Nach der Inkubation mit Methothrexat wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/15 cm-Zellkulturschale ausgesät und in Standardmedium für 24 h kultiviert. Im Anschluss wurde der LIF-haltige Überstand abgenommen, sterilfiltriert und an ES-Zellen zur Bestimmung der einzusetzenden LIF-Konzentration titriert.

4.4.3 Transiente Zelltransfektion

Zur Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurde je nach Zelllinie zwischen zwei unterschiedlichen Standard-Protokollen gewählt. Um eine Erniedrigung der SASH1-Expression zu erzielen, wurden entsprechende Zelllinien mit einer gegen SASH1-gerichteten siRNA transfiziert (4.4.3.3).

4.4.3.1 Transfektion mittels Lipofektamin

Bei der Lipofektamin-Transfektion handelt es sich um eine Methode, bei der die Plasmid-DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel Komplexe bildet, welche mit den Zielzellen fusionieren. Lipofektamin™ ist eine 3:1 (w/w) Liposomenlösung aus dem polykationischen Lipid DOSPA und dem neutralen Lipid DOPE. Diese Art der DNA-Transfektion wurde bei HeLa- und SW480-Zellen entsprechend den Herstellerangaben angewandt. Hierzu wurden die Zellen am Vortag vor der Transfektion in einer hohen Zelldichte ausgesät. Die Transfektionslösung wurde zusammen mit der DNA und einem geringen Volumen Medium für 45 min bei RT und für 5 weitere Stunden mit den Zellen in Serum- und Antibiotika-freiem Medium bei 37°C und 7 % CO₂ inkubiert.

Tab. 6 Pipettierschema der Lipofektamin-Transfektion.

Zellkulturplatten	6 cm	10 cm
Zellzahl	3×10^5	1×10^6
DNA [1 µg/µl]	5 µl	10 µl
Lipofektamin™	5 µl	40 µl
Medium	585 µl	1.550 µl
Gesamtvolumen	2,6 ml	6,4 ml

4.4.3.2 Transfektion mittels Kalzium-Phosphat

Die Kalzium-Phosphat Transfektion beruht auf der Methode von Graham und van der Eb von 1973 (Graham, 1973). In einem Gemisch aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat kommt es zur Ausbildung von DNA-Kalzium-Phosphat-Kristallen, welche von den Zellen vermutlich durch Endozytose („Negativer Stress“) aufgenommen werden.

Die Zellen wurden für die Kalzium-Phosphat-Transfektion am Vorabend ausgesät. Die Kalziumphosphatlösungen wurden anhand des Pipettierschemas in Tab. 7 angesetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Zugabe von BES tropfenweise und während konstantem Vortexen final zupipettiert wurde. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen, welche bereits das Volumen an frischem Medium erhalten hatten, dazugegeben und

ü/N bei 37°C und 3 % CO₂ inkubiert. Der Transfektionsstopp erfolgte am darauffolgenden Tag durch Medienwechsel.

Tab. 7 Pipettierschema der Kalzium-Phosphat-Transfektion.

Zellkulturplatten	6 cm	10 cm
Zellzahl	3x10 ⁵	1x10 ⁶
DNA [1 µg/µl]	8 µl	16 µl
2,5 M CaCl ₂	15 µl	40 µl
ddH ₂ O	150 µl	400 µl
BES	150 µl	400 µl
Gesamtvolumen Medium	2,5 ml	8 ml

4.4.3.3 siRNA-Transfektion

Die siRNA-Transfektion erfolgte je nach Zelltyp anhand der Angaben in 4.4.3.1 und 4.4.3.2. Es wurden jedoch nur 6well-Zellkulturplatten transfiziert, bei welchen ein Volumen von 10 µl siRNA [20 µM] eingesetzt wurde.

4.5 Tierexperimentelle Methoden

4.5.1 Organentnahme

Die Organe wurden entnommen, nachdem die Maus durch eine zervikale Dislokation getötet wurde. Die Entnahme der Organe erfolgte mit semi-sterilem (Desinfektion mit 70%-igem Ethanol) Operationsbesteck.

4.5.2 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Die für die Kultivierung von ES-Zellen notwendigen embryonalen Fibroblasten wurden aus Embryonen (d14 post coitum) von superovulierten CD1-Mäusen gewonnen. Nach der Tötung des trächtigen Spendertieres durch zervikale Dislokation wurden die Embryonen samt Uterus semi-steril entnommen. Die Föten wurden unter einer Sterilbank aus dem Uterus präpariert und mit PBS gewaschen. Im Anschluss wird den Föten der Kopf mittels Skalpell entfernt. Ebenso wurden bestmöglichst Herz, Lunge und Leber entfernt. Das verbleibende Gewebe wurde vereinigt, grob mit einem Skalpell zerkleinert und durch ein Sieb gedrückt. Entsprechend der Anzahl an Embryonen wurde 1 ml Trypsin/EDTA pro Embryo dazupipettiert. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 37°C in einem 50 ml-Falkon im Wasserbad. Es wurde während der Inkubation ein Resuspendierungsschritt durchgeführt. Durch Zugabe von 2-fachem Volumen EF-Medium wurde die Reaktion abgestoppt. Die Zell-/GewebeLösung wurde erneut durch ein Sieb in ein frisches Falcon überführt und kurz abzentrifugiert (1.200 UpM, 5 min). Die in frischem EF-Medium resuspendierten Zellen wurden ausgezählt und ausgesät (ca. 5x10⁶ Zellen/10 cm-Kulturschale). Die Expansion der Zellen erfolgte innerhalb der nächsten Tage. Hierfür wurden sie alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt, und sobald sie Konfluenz erreichten, auf 15 cm-Kulturschalen expandiert. Die Zellen wurden zum Schluss geerntet, in EF-Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen eingefroren. Das Einfrieren erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurden die EF-Zellen für 30 min bei -20°C heruntergekühlt, dann für 48 h bei -80°C zwischengelagert, um sie im Anschluss in flüssigen Stickstoff zu überführen.

4.5.3 Generierung chimärer Mäuse

Alle folgenden Schritte zur Generierung chimärer Mäuse wurden an der HHU in Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Sandra Beer durchgeführt (Abb. 18).

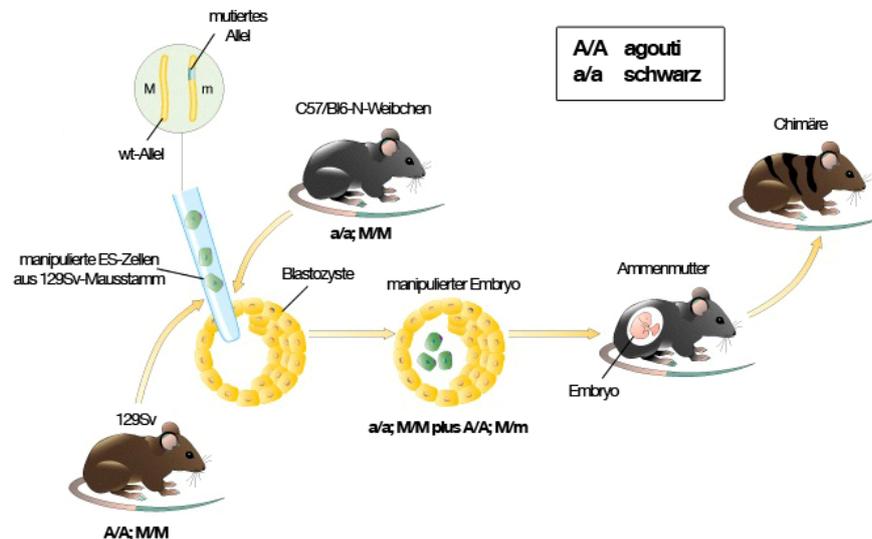


Abb. 18 Schematische Darstellung der Generierung chimärer Mäuse.

Durch homologe Rekombination manipulierte ES-Zellen werden in 2,5 Tage alte Blastozysten injiziert. Die Blastozysten werden anschließend in die Uteri pseudoschwangerer Weibchen implantiert. Die Fellfarbe der daraus resultierenden Jungtiere lässt auf die erfolgreiche Integration der ES-Zellen schließen (Gais, 2007).

4.5.3.1 Superovulation

Um eine hohe Anzahl an Embryonen im Blastozystenstadium für die Injektion des ES-Zellklons zu gewinnen, wurden weibliche C57Bl/6-Mäuse superovuliert. Hierfür wurde den Mäusen in einem 44-48 h Abstand 10 U PMSG und 10 U HCG intraperitoneal gespritzt. Die Verpaarung mit männlichen C57Bl/6-Mäusen erfolgte im Anschluss.

4.5.3.2 Blastozysteninjektion

Nach erfolgreicher Superovulation und Verpaarung wurden am Tag 3,5 post coitum die trächtigen Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri entnommen und die Blastozysten retrograd ausgespült. Mittels Mikromanipulatoren wurden ca. 20 der homolog rekombinierten 129/Sv ES-Zellen in das Blastozooel injiziert.

4.5.3.3 Reimplantation der Blastozysten

Die unter 4.5.3.2 beschriebenen Blastozysten wurden in Uteri pseudoschwangerer Ammenmütter transferiert. Bei der Reimplantation wurden den Ammenmüttern bis zu 10 Blastozysten pro Uterushorn eingesetzt. Bei den aus der Schwangerschaft der Leihmütter entstandenen Tieren weist eine mosaikartige gelb-schwarze Fellfarbe sofort auf die erfolgreiche Integration des ES-Zellklons in die Blastozyste hin. Diese chimären Mäuse wurden erneut mit C57Bl/6-Mäusen verpaart. Braunfarbige Mäuse der nächsten Generation wurden in den optimierten Hygienebereich (OHB) des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München überführt und auf Keimbahntransmission getestet.

4.6 Statistische Auswertungsverfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Student's t-Test für gepaarte Daten (GraphPad PRISM®, Version 5.00). Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$, d.h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5 % liegt.

5 Ergebnisse

5.1 Laboreigene Vorarbeiten

Aufgrund der Einstufung von SASH1 als Tumorsuppressorgen in Mammakarzinomen (Zeller et al., 2003), wurde SASH1 auf seine klinische Relevanz in Kolorektalkarzinomen getestet (Rimkus et al., 2006). Von primären Kolorektalkarzinomen (n=113) wurden qRT-Analysen durchgeführt, um die SASH1-Expression relativ zur Expression von SASH1 in normalen Kolonproben (n=15) zu bestimmen. Zusätzlich wurden Expressionsanalysen von benignen Adenomen (n=9) und Lebermetastasen (n=10) durchgeführt. In den Tumorstadien II, III und IV (nach UICC-Klassifikation) konnte eine deutliche und signifikante Herunterregulation der SASH1-Expression festgestellt werden. In 48 der 113 untersuchten Proben kam es im Vergleich zu der Expression im Normalgewebe zu einer Herunterregulation um einen Faktor ≥ 10 . Bei der Analyse der Lebermetastasen war ebenfalls eine signifikante Herabregulation zu beobachten. Diese Herabregulation konnte nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene beobachtet werden. Zusätzlich korrelierte die reduzierte SASH1-Expression mit einer metachronen Metastasenbildung; eine multivariate Analyse der Daten identifizierte SASH1 als einen unabhängigen negativen Prognoseparameter für das post-operative Überleben von Kolorektalkarzinom-Patienten.

Um die Rolle von SASH1 und die Auswirkung seiner reduzierten Expression in der Tumorgenese besser zu verstehen, wurden erste Schritte bezüglich der Aufdeckung seiner physiologischen Funktion durchgeführt. *In vitro*-Transfektionen epithelialer Zelllinien (Hek293 und HeLa) mit unterschiedlichen V5-markierten SASH1-Konstrukten (FL-SASH1, Δ Cter und Δ Nter (Abb. 20)) wurden auf die SASH1-Überexpression mittels Immunfluoreszenz untersucht. V5-FL-SASH1 weist eine vorwiegend zytosolische Lokalisation und eine Anreicherung in F-Aktin-reichen, membran-nahen Strukturen der Zellen auf (Abb. 6). FL-SASH1-transfizierte Zellen wiesen eine verstärkte Lamellipodienausbildung auf. Die SASH1-Deletionskonstrukte Δ Cter- und Δ Nter zeigen unterschiedliche subzelluläre Lokalisierungen. Während das Δ Nter-Konstrukt, welches vornehmlich aus den zwei C-terminal gelegenen SAM-Domänen besteht, eine ähnliche Lokalisierung wie das V5-FL-Konstrukt aufweist, ist das Δ Cter-Konstrukt vornehmlich im Zellkern lokalisiert. Da nur das Δ Cter-Konstrukt die zwei vorhergesagten NLS-Sequenzen besitzt, kann Δ Nter nicht in den Zellkern importiert werden.

Aufgrund der membranproximalen Konzentrierung des FL-SASH1 wurde eine Ko-Lokalisierung mit dem ebenfalls membran-nahen und in F-Aktin-reichen Strukturen angereicherten Cortactin untersucht und nachgewiesen. Die in der Immunfluoreszenz nachgewiesene Ko-Lokalisierung von SASH1 und Cortactin konnte biochemisch als eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen mittels einer Immunpräzipitation bestätigt werden.

In F-Aktin-Stabilisationsversuchen konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Überexpression von SASH1 zu einer Induktion der Aktinpolymerisation führt (Abb. 9). Der F-Aktin-gehalt nimmt in

der Zelle durch die SASH1-Überexpression zu. Diese F-Aktin-stabilisierende bzw. polymerisationsinduzierende Wirkung von SASH1 geht konform mit Beobachtungen in der Immunfluoreszenz, in welcher SASH1 eine verstärkte Lamellipodienausbildung bewirkte. Die Induktion der Lamellipodienausbildung führte in auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices (Fibronektin, Laminin) durchgeführten Adhäsionsversuchen zu einer signifikanten Erhöhung der Adhäsion von SASH1-exprimierenden Hek293-Zellen. Eine durch anti-SASH1-shRNA-Transfektion induzierte erniedrigte Expression in SW480 Zellen führte im Gegenzug zu einer signifikant erniedrigten Zelladhäsion auf den Substraten Fibronektin und Laminin.

Zusammenfassend weisen die Vorarbeiten auf eine Rolle von SASH1 bei der Zellmigration, und durch die Lokalisation des Δ Cter-Konstruktes auf eine mögliche regulatorische Funktion im Zellkern, beispielsweise bei der Transkription, hin. Die Ergebnisse sollen im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht und spezifiziert werden.

5.2 Generierung eines polyklonalen Antiserums

Da die laboreigenen Vorarbeiten auf einer Überexpression von rekombinantem SASH1 beruhen, sollte für den Nachweis von endogenem SASH1 ein anti-SASH1-Antiserum hergestellt werden. Zu Beginn des Projektes gab es keinen kommerziell erhältlichen Antikörper. Die Firma Novus Biologicals (Littleton, USA) brachte vor kurzem einen mono- bzw. polyklonalen anti-SASH1-Antikörper auf den Markt, welcher jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse im Western Blot und der Immunfluoreszenz liefert (eigene Beobachtung, sowie persönliche Mitteilung von T. Pacheco (Universität von Colorado, USA) bzw. C. Klein (Universität Regensburg)). Für den Nachweis von endogenem SASH1 wurden deshalb polyklonale Antiseren gegen mehrere SASH1-Peptidsequenzen in Kaninchen generiert.

Die Peptidsynthese und -koppelung, sowie die Immunisierung von zwei Kaninchen gegen zwei N-terminal gelegene SASH1-Epitope (Abb. 20) wurden von Dr. Markus Moser am Max Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Die Immunisierung von drei Kaninchen gegen zwei C-terminal gelegene Peptidsequenzen (Abb. 20) sowie die Serumaufreinigung wurde bei der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg) in Auftrag gegeben.

5.2.1 Charakterisierung der Antiseren gegen N-terminal gelegene Epitope

5.2.1.1 Immunisierung und Aufreinigung

Die Immunisierung der Kaninchen wurde von Dr. Markus Moser am Max Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) durchgeführt. Da im Vorfeld keine Vorhersage bzgl. der Antigenerkennung durch das Immunsystem des Versuchstieres möglich ist, wurden zwei Kaninchen (Nr. 1540 und 1542) mit einen geringen Antikörper-Titer für die Immunisierung mit dem Peptid-Cocktail ausgewählt (3.6.3). Die Testung dreier Kaninchen (1540-1542) auf ihren Antikörper-Titer erfolgte vor Beginn der Immunisierung mittels Western Blot-Analyse der Präimmunseren. Die Immunantwort der Kaninchen und der damit verbundene Anstieg des Antikörper-Titers wurden im Verlauf der Immunisierung und nach erfolgten Boosterinjektionen an Proteinlysaten im Western Blot getestet.

Das finale Bluten erfolgte nach vier durchgeführten Boosterinjektionen in der Immunisierungswoche 15 (Abb. 14). Die Seren 1540 und 1542 beider Kaninchen wurden mittels Affinitätschromatographie (SulfoLink Immobilization Kit, Thermo Scientific, Rockford, USA) aufgereinigt, um Verunreinigungen durch unspezifische Antikörper sowie durch im Serum vorliegende Proteine wie etwa Albumin, Transferrin oder α_2 -Makroglobulin zu entfernen. Im Anschluss wurde die Funktionalität

und Spezifität der Antiseren an Proteinlysaten aus dem Gewebe der Maus und an Zelllysaten getestet (Abb. 19 und Abb. 20).

Bei der Analyse von Proteinlysaten von murinem Gewebe kommt es bei beiden unaufgereinigten finalen Seren zu starken Hintergrundsignalen im Immunoblot (Abb. 19 und Abb. 20). Diese konnten mittels der Affinitätsaufreinigung reduziert werden, welche zu einer Ankonzentration der spezifischen polyklonalen Antikörper und einer Trennung von den unspezifischen Serumproteinen führt.

Abb. 19 zeigt den Vergleich von unaufgereinigtem und aufgereinigtem Serum an Proteinlysaten aus murinen Geweben. Da sich die Arbeit unserer Arbeitsgruppe auf die Tumorgenese des Kolo- rektalkarzinoms konzentriert und eine Herabregulation von SASH1 in Tumoren des Darms beschrieben wurde, wurden Gewebe des Darms (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon) auf ihre endogene SASH1-Expression analysiert. Außerdem wurden Proteinlysate des Gehirns, Thymus und der Milz als Positiv- und Negativkontrollen aufgetragen. Durch die Aufreinigung kam es in beiden Antiseren zu einer deutlichen Verminderung des Hintergrundes. Das Antiserum 1540 erkennt spezifische SASH1-Banden in der dem V5-markierten SASH1 entsprechenden Laufgröße von ~170 kDa (Abb. 20). Bei dem Antiserum 1542 geht dagegen die SASH1-Spezifität nach der Aufreinigung verloren. Erkennt das Serum im unaufgereinigten Antiserum-Blot (Abb. 19 oben rechts) noch Banden in der SASH1-entsprechenden Laufgröße von 170 kDa, so sind diese in dem Immunoblot des aufgereinigten Antiserums 1542 nicht mehr sichtbar (Abb. 19 rechts unten). Es werden Protein-Banden mit einer Größe kleiner als 40 kDa erkannt. Es könnte sich hierbei um kleinere SASH1-Transkripte handeln. Da es jedoch zu keiner Erkennung des Volllängen-SASH1 kommt, ist das Antiserum 1542 dem Antiserum 1540 gegenüber zu vernachlässigen.

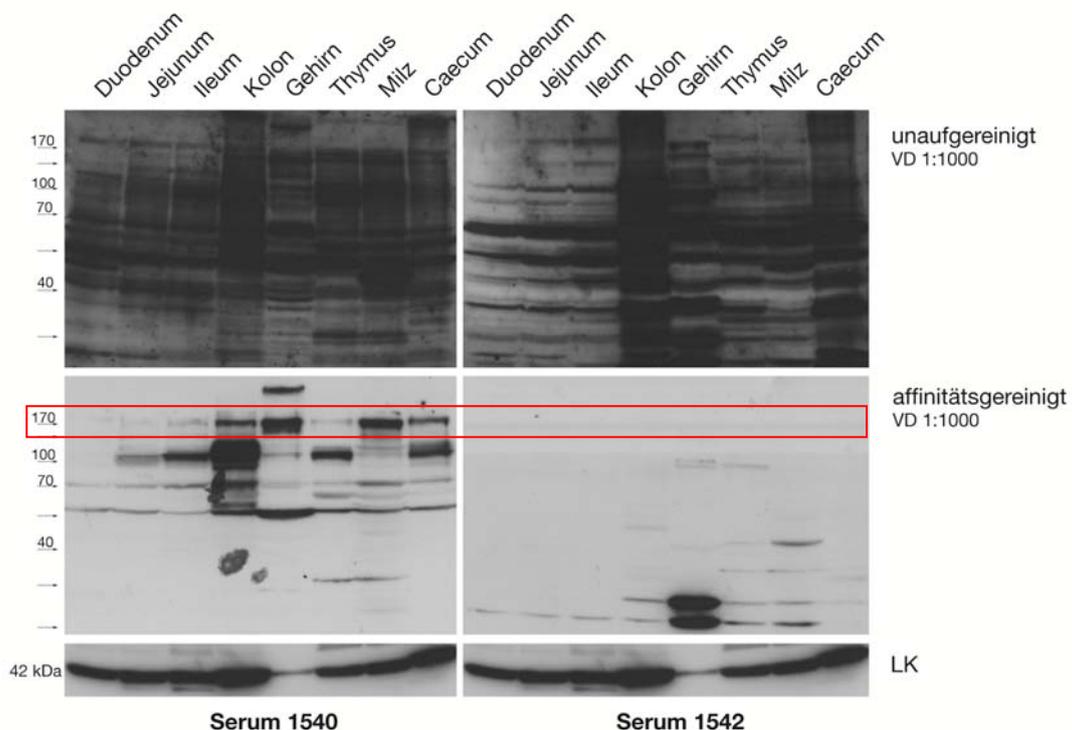


Abb. 19 Vergleich der affinitätsgereinigten Antiseren in Proteinlysaten aus murinem Gewebe.

Das affinitätsgereinigte Serum 1540 zeigt in den Geweben des Darmtrakts sowie in Gehirn und Milz eine starke SASH1-Expression (rote Box: ~170 kDa). Bei dem affinitätsgereinigten Serum 1542 sind dagegen keine der in dem unaufgereinigten Serum zuvor noch sichtbaren Banden erkennbar. Ladekontrolle (LK): Aktin.

Das aufgereinigte Serum 1540 erkennt eine zunehmende SASH1-Expression der unterschiedlichen Darmabschnitte entlang der proximal-distalen Achse. Hierbei weist das Proteinlysat des Kolons zusammen mit den Lysaten aus Gehirn und Milz die stärkste SASH1-Expression auf. Neben der 170 kDa-großen SASH1-Bande erkennt das Antiserum noch weitere Protein-Banden wie etwa im Proteinlysat des Gehirns, in welchem eine Protein-Bande bei ~200 kDa sichtbar wird. Auch die distinkten Banden bei 110 kDa in Lysaten des Jejunums, Ileums, Kolons, Thymus und Caecums sind deutlich erkennbar und aufgrund der zuvor durchgeführten Affinitätsreinigung als spezifisch zu werten. Sie könnten Hinweise auf eine eventuell unbekannte Spleißvariante, ein Abbauprodukt oder eine posttranslationale Modifikation von SASH1 sein. Hierbei sei auf die besonders starke Expression der p110-Bande im Kolon hingewiesen. Die in allen Geweben sichtbaren Banden bei ~70 kDa und ~55 kDa bleiben ebenfalls als mögliche Spleißvarianten von SASH1 zu vermerken.

Die SASH1-Spezifität wurde mittels eines weiteren Immunoblots überprüft (Abb. 20). Das hierfür verwendete Proteinlysat wurde durch die Transfektion von Hek293-Zellen mit drei unterschiedlichen V5-Epitop-markierten SASH1-Konstrukten hergestellt. Die Konstrukte entsprachen einem humanen FL (full length)-SASH1 und zwei Deletionskonstrukten des humanen SASH1, Δ Cter-SASH1 und Δ Nter-SASH1 (Abb. 20A). Die Lage der Antiserum-Erkennungsepitope ist in Abb. 20A markiert (rote Pfeile). Das V5-markierte FL-SASH1 wird von dem Serum 1540 nach dessen Affinitätsaufreinigung erkannt. Das Proteinlysat, welches das humane FL-SASH1 enthält, weist eine Bande oberhalb der 170 kDa-Markerbande auf. Ebenso erkennt das Antiserum 1540 eine p85-Bande im Hek293 Δ Cter-Lysat. Diese Bande entspricht einem SASH1-Konstrukt, bei welchem die C-terminal gelegene Region fehlt (3.12.2), die Region, auf welcher die Peptidsequenzen liegen, jedoch noch vorhanden ist (AS 1-581). Die Bande des Deletionskonstruktes im Hek293 Δ Nter-Lysat, welche im anti-V5-Blot bei ~100 kDa liegt, wird mit dem Serum 1540, wie erwartet, nicht erkannt. Dem Δ Nter-Konstrukt (AS 657-1230) fehlt die Region, auf welcher die Peptidsequenzen für die Immunisierung der Kaninchen lagen (3.6.3).

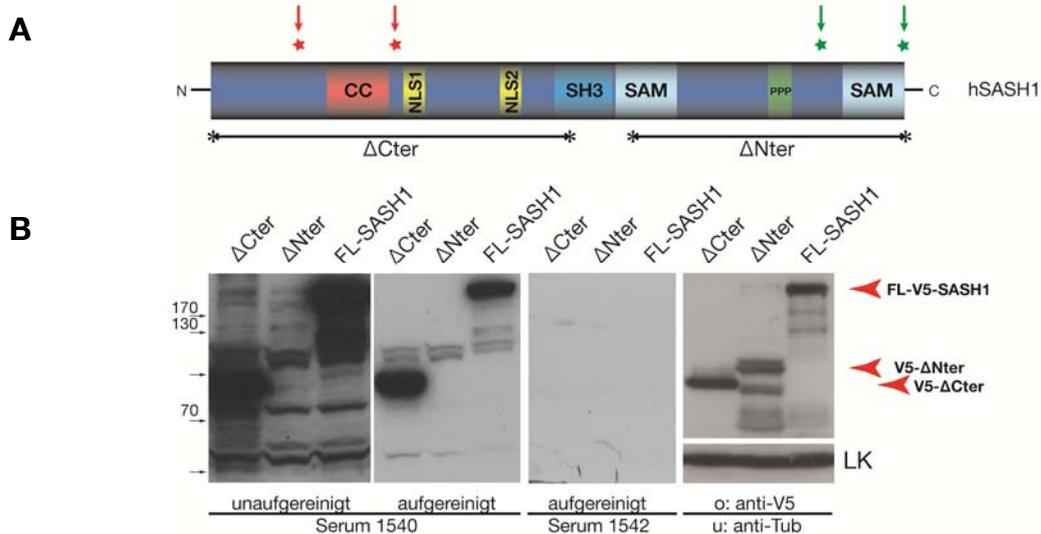


Abb. 20 Vergleich der Antiseren nach erfolgter Affinitätsaufreinigung.

A Schema des humanen SASH1 mit der Lage der C- bzw. N-terminal liegenden Epitope und den entsprechenden SASH1-Deletionskonstrukten Δ Cter und Δ Nter. Rot: Epitoplage der Seren 1540 und 1542. Grün: Epitoplage bei der Serengenerierung durch Davids Biotechnologie (Regensburg). **B** Zelllysate aus mit SASH1-Konstrukten transfizierten Hek293 werden nur von dem Serum 1540 nach der Affinitätsaufreinigung erkannt. Da die Peptide gegen N-terminal gelegene Epitope gerichtet waren, sollte keines der Antiseren eine Bande im Hek293 Δ Nter-Lysat erkennen. Als Transfektionskontrolle wurde anti-V5-Ak verwendet. Ladekontrolle (LK): Tubulin.

Diese p170-Bande entspricht dem V5-markierten FL-SASH1 auf dem Kontrollblot mit einem anti-V5-Ak. In beiden Fällen liegt die Bande von SASH1 deutlich über der errechneten Größe des Proteins von 137 kDa.

Das aufgereinigte Antiserum 1542 sollte wie das Antiserum 1540 ebenfalls das FL-SASH1-Konstrukt sowie das Δ Cter-Konstrukt erkennen. Das Antiserum 1542 erkennt in aufgereinigter Form jedoch keines der beiden Konstrukte, weshalb es nicht weiter als ein Nachweismittel von endogenem SASH1 charakterisiert und nicht für weitere Experimente herangezogen wurde.

5.2.1.2 Spezifität der Antikörper-Reaktivität

Bei polyklonalen Antisera kann es zu einer nicht-spezifischen Bindung des Antikörpers kommen. Um mögliche nicht-spezifische Proteinbanden zu identifizieren, erfolgte der Spezifitätsnachweis der Antiserum-Reaktivität durch die Neutralisierung des Antiserums. Für die Peptidblockade wurde das Antiserum mit den Peptiden, gegen welche der Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Der Antikörper, der aufgrund der Epitoperkennung spezifisch an die Peptide bindet, ist somit blockiert. So kann man im anschließenden Immunoblot unspezifische von spezifischen Banden unterscheiden, indem man die Proteinbanden des blockierten Antiserums gegen Banden des unblockierten Serums vergleicht. Die Ergebnisse der Peptidblockade, in welcher das Peptidgemisch in einem 10-fachen molaren Konzentrationsüberschuss mit dem Antiserum 1540 [Proteinkonzentration 0,2 mg/ml] ü/N bei 4°C inkubiert wurde, sind in Abb. 21 und Abb. 22 dargestellt.

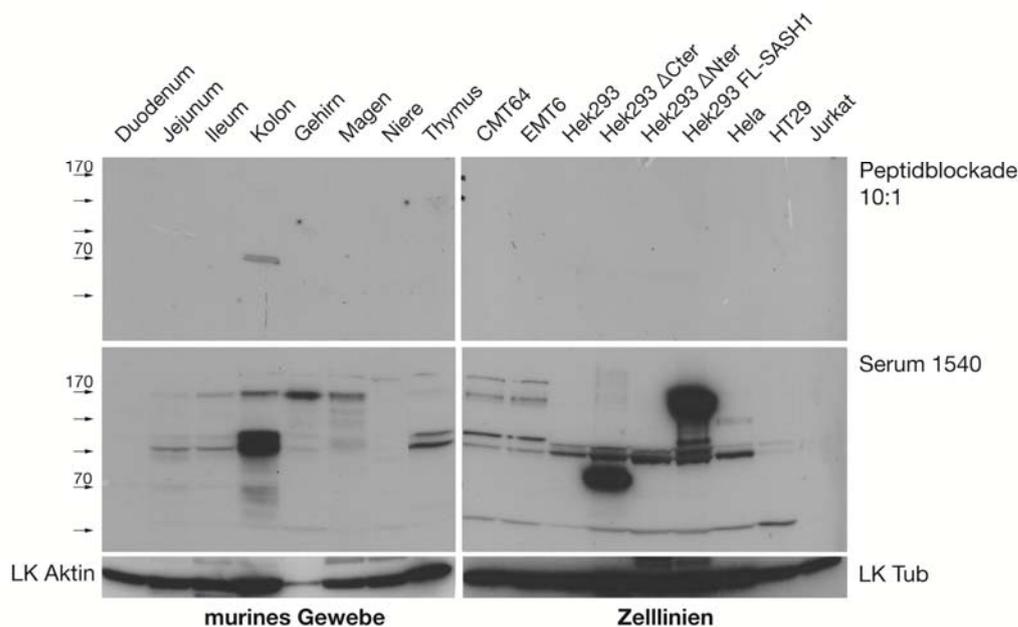


Abb. 21 Aufhebung der Proteinbanden-Erkennung nach Peptidblockade des Antiserums 1540.

Nach der ü/N Inkubation des Antiserums mit dem Peptidgemisch werden keine Banden im Western Blot von dem Serum 1540 erkannt. Das Peptidgemisch wurde im 10-fachen Konzentrationsüberschuss bei der Blockade, im Western Blot entsprechend einer Serum-VD von 1:1000 eingesetzt.

Die Immunoblots mit dem geblockten Antiserum (Abb. 21) zeigen, dass fast alle Proteinbanden, welche das Antiserum 1540 erkennt, Epitop-spezifisch und somit vermutlich auch SASH1-spezifisch sind. Nach der ü/N-Inkubation des Antiserums mit den Peptiden, gegen welche das Antiserum gerichtet ist, erkennt es bis auf eine 70 kDa große Bande im Kolon keine weiteren Banden in Proteinlysaten aus murinem Gewebe. Da diese 70 kDa große Bande auch in dem unteren Kontroll-Blot zu erkennen ist, kommt sie vermutlich durch eine unspezifische Bindung des Anti-

serums zustande. Der Immunoblot mit Proteinlysaten aus Zelllinien detektiert keinerlei Banden mehr. Auch in den mit den SASH1-Konstrukten transfizierten Hek293-Zelllysaten werden keine Banden mehr erkannt.

Da das Antiserum 1540 auch in der Immunfluoreszenz Anwendung finden soll, wurde das mit dem Peptidgemisch geblockte Antiserum auf seine Spezifität in der Immunfluoreszenz getestet. Hierzu wurden PFA-fixierte Gewebeschnitte von humanen Kolorektalkarzinomen mit dem über Nacht blockiertem Antiserum 1540, dem aufgereinigten Antiserum 1540 (1:200) sowie zur Kontrolle nur mit den Zweitantikörpern oder dem Präserum (nicht gezeigt) gefärbt und mit der gleichen Belichtungszeit (2 sec) analysiert (Abb. 22). Die Färbung wurde auf Gewebeschnitten angewandt, welche von zwei voneinander unabhängigen Patientenspenden (UICC I) stammen und welche eine in der qRT-PCR ermittelte, unterschiedlich starke SASH1-Expression aufweisen. Bei dem aufgereinigten Antiserum 1540 kommt es zu einer Kernfärbung auf den Gewebeschnitten, vor allem in Epithelzellen (in qRT-PCR nachgewiesene geringe SASH1-Expression). Diese Färbung ist nach der 10-(nicht gezeigt)/20-fachen Peptidblockade nicht mehr vorhanden (Abb. 22, Mitte). Es werden teilweise unspezifische Färbungen im Stroma sichtbar, welche jedoch nicht auf eine SASH1-Expression zurückzuführen sind. Sie sind mit dem aufgereinigten ungeblockten Antiserum 1540 nicht zu erkennen (Abb. 22, links).

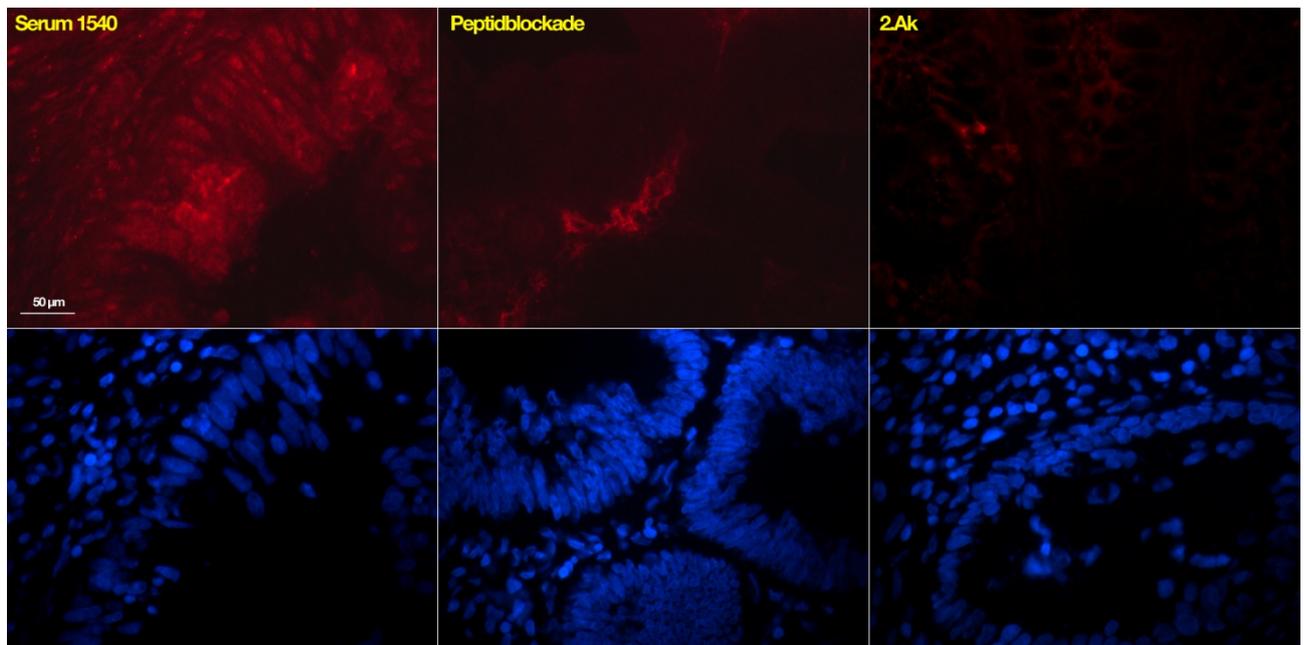


Abb. 22 Immunfluoreszenz der Peptidblockade an humanen Gewebeschnitten.

Die Färbungen von Gewebeschnitten von humanen Kolorektalkarzinomen (Tumorstadium UICC I) mit dem Serum 1540, der 20:1-Peptidblockade und dem sekundären Ak als Kontrolle (rot) wurden alle mit der gleichen Belichtungszeit (2 sec) aufgenommen. Zur besseren Übersicht wurden die Kerne mittels DAPI (blau) angefärbt. Größenmarkierung: 50 µm.

Bei der zweiten Patientenprobe, welche eine stärkere SASH1-Expression mit qRT-PCR aufwies, erfolgte mit dem Antiserum 1540 eine stärkere zytoplasmatische Färbung des Gewebes. Die Peptidblockade hob jedoch wie in der hier gezeigten Patientenprobe die Gewebefärbung komplett auf (nicht gezeigt).

5.2.1.3 Weitere Anwendungstests des Antiserums 1540

Das Antiserum wurde zu den Anwendungen im Immunoblot und der Immunfluoreszenz zusätzlich auf eine mögliche Anwendung bei der Immunpräzipitation bzw. in der Immunhistochemie getestet.

Während das Antiserum in der Immunhistochemie erfolgreich getestet werden konnte (Abb. 28), war es nicht möglich, endogenes SASH1 mit dem Antiserum 1540 zu präzipitieren. Das Antiserum 1540 konnte weder in der unaufgereinigten Form noch in der affinitätsgereinigten Form endogenes oder rekombinantes SASH1 immunpräzipitieren. Es wurden unterschiedliche Sepharosen (Sepharosen A CL4B und 6MB, sowie Sepharose G 4B) an Zelllysaten (SW480, HeLa, HT29 und mit V5-markiertem SASH1 transfizierte Hek293) und Lysaten aus Mausgeweben (Kolon, Gehirn, Milz, Thymus) getestet. Als Positivkontrollen wurden Immunpräzipitationen mit dem anti-V5-Antikörper und FL-V5-SASH1-positivem Zelllysate erfolgreich durchgeführt (nicht gezeigt). Es war jedoch unter keiner der genannten Bedingungen möglich, ein Immunpräzipitat des endogenen SASH1 mit dem Antiserum 1540 zu erzielen.

5.2.2 Charakterisierung der Antiseren gegen C-terminal gelegene Epitope

Durch die Firma Davids Biotechnologie, Regensburg, wurden drei Kaninchen mit Peptiden gegen C-terminal gerichtete Epitope immunisiert (3.6.3).

Kaninchen A: Immunisierung gegen Peptid 1

Kaninchen B: Immunisierung gegen Peptid 2

Kaninchen C: Immunisierung gegen Peptid-Cocktail aus Peptid 1 und 2

Die Antiseren wurden ebenfalls durch die Firma Davids, Regensburg, aufgereinigt. Die Seren wurden auf ihre Spezifität im Immunoblot entsprechend dem N-terminal gerichteten Antiserum getestet. Das Serum aus Kaninchen A erkannte die transgen exprimierten SASH1-Konstrukte FL-SASH1 und Δ N-ter (nicht gezeigt). Jedoch keines der drei Antiseren erkannte im Western Blot endogenes SASH1.

Auch in der Immunfluoreszenz zeigen die Antiseren keine spezifische Färbung (nicht gezeigt).

5.3 Analyse der SASH1-Expression

Vorbefunde in Expressionsanalysen hatten eine deutlich unterschiedliche Expression der einzelnen Mitglieder der SLY-Familie ergeben. Während SASH1 eine ubiquitäre Expression zeigte, mit Ausnahme von Lymphozyten, beschränkte sich die SLY1- und Samsn1-Expression auf hämatopoetische Zelllinien wie etwa Jurkat und Ramos.

Die Quantifizierung der mRNA-Expression von SASH1 unterschiedlicher Zelllinien und Geweben erfolgte mittels qRT-PCR. Die SASH1-Expression auf Proteinebene wurde im Western Blot mit dem neu generierten Antiserum 1540 analysiert.

5.3.1 Expression im Mausgewebe

Die Analyse der SASH1-Expression in unterschiedlichen Mausgeweben erfolgte auf mRNA- und Protein-Ebene. In der Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurde die relative SASH1-Expression in unterschiedlichen Geweben von C57Bl/6-Mäusen (n=3) bestimmt (Abb. 23A). Die Expressionswerte wurden dabei willkürlich auf die durchschnittliche Expression von SASH1 im Jejunum normalisiert. Auf mRNA-Ebene kam es zu einer kaum nachweisbaren SASH1-Expression in Magen, Milz und Thymus. Eine fünffach erhöhte SASH1-Expression zeigten die Gewebe des Kolon und des Skelettmuskels, sowie der Lunge. Eine bis zu zehnfach erhöhte Expression war in der Leber,

der Niere, dem Großhirn und dem Fettgewebe zu finden. Die Expression im Kleinhirn und im Herzen war mit einer bis zu 15-fach erhöhten Expression am stärksten.

Bei der relativen Quantifizierung von SASH1 auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen murinen Zelllinien wurde die relative Expression willkürlich auf die durchschnittliche Expression von SASH1 in der intestinalen Zelllinie ModeK normalisiert (Abb. 23B). Je Zelllinie wurden voneinander unabhängige Triplikate analysiert. Während CMT93-Zellen (Rektumkarzinom) eine deutliche Expression aufweisen, lässt sich in den Zelllinien CT26 (Kolonkarzinom) und EL4 (T-Zell-Lymphom) keine Expression detektieren. Auch die SASH1-Expression der Zelllinien EMT6 (Mammakarzinom) und NIH3T3 (Fibroblasten) ist im Vergleich zur Expression in ModeK-Zellen gering.

Auf Proteinebene zeigt sich eine deutliche Expression von SASH1 (bei 170 kDa) in den Geweben des Darmtraktes, in der Lunge und im Gehirn (Klein- und Großhirn) (Abb. 23C). In den Geweben der Blase, Leber, Herz und Milz ist eine schwache Expression erkennbar. Keine Expression weisen Thymus, Knochenmark, Fettgewebe, Skelettmuskel, Haut und Niere auf. Neben der 170 kDa-Bande ist in allen Geweben des Darmtraktes eine zweite distinkte p190-Bande und eine dritte Bande bei ca. 110 kDa erkennbar. Dies entspricht von der Größe den Banden, die bei der Überprüfung der Antiserum-Spezifität bereits in murinen Zelllinien detektiert wurden (Abb. 21).

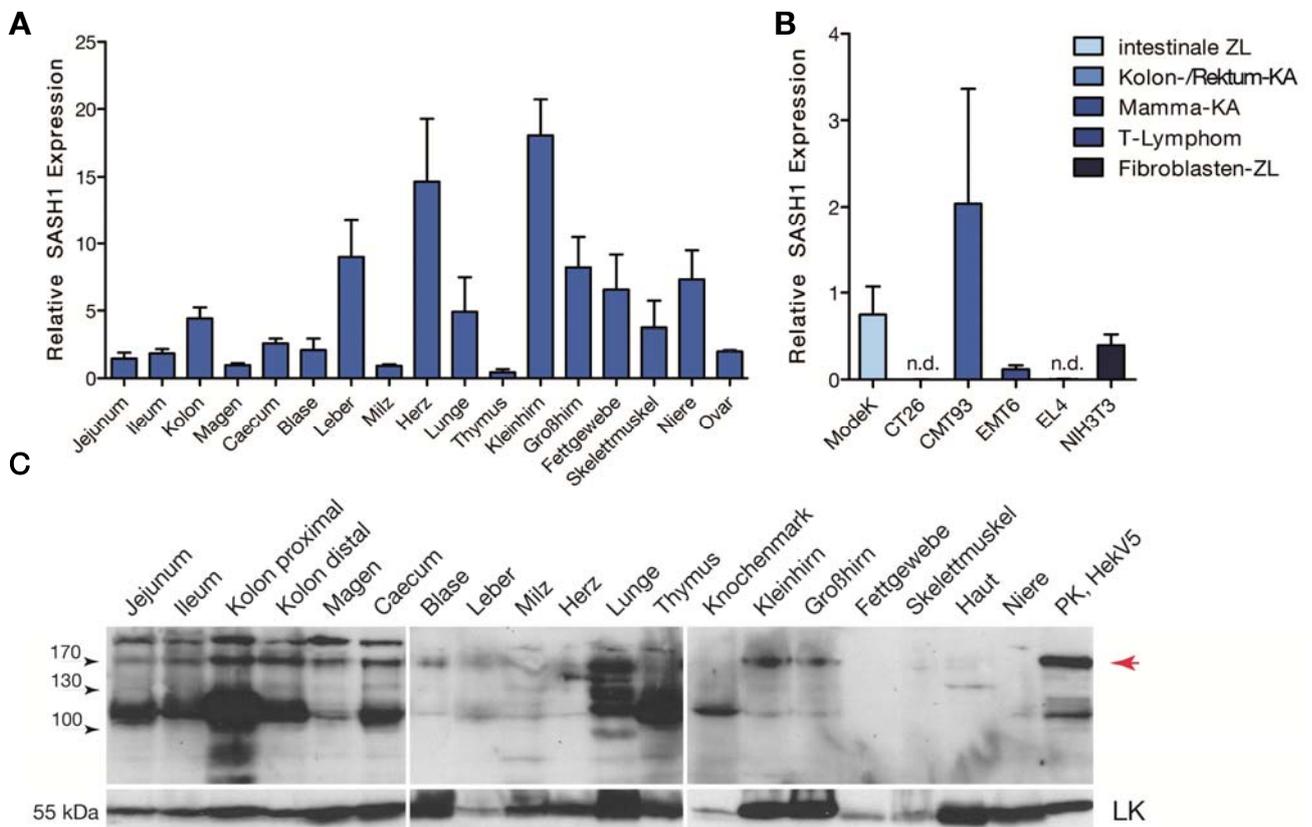


Abb. 23 Murine SASH1-Expression auf mRNA- und Proteinebene.

A Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR. Die Expression wurde auf die durchschnittliche Expression von SASH1 im Jejunum normalisiert. Es wurde RNA aus Geweben von drei C57Bl/6-Mäusen gewonnen und analysiert (MW±SD). **B** Die Bestimmung der mRNA-Expression in murinen Zelllinien erfolgte mittels qRT-PCR (MW±SD). Die relative Expression wurde auf die durchschnittliche Expression von SASH1 in ModeK-Zellen normalisiert. In CT26- und EL4-Zellen konnte keine SASH1-Expression nachgewiesen werden. Von allen Zelllinien wurde RNA aus unterschiedlichen Passagen gewonnen und analysiert (n=3). n.d.: nicht detektierbar. **C** Auf Protein-Ebene ist die SASH1-Expression in murinem Gewebe besonders stark im Magen-/Darmtrakt und im Gehirn ausgeprägt. Als Positivkontrolle (PK) wurde ein FL-V5-SASH1 enthaltendes Proteinlysate eingesetzt. Ladekontrolle (LK): Aktin.

Die p110-Bande ist in allen Geweben bis auf Fettgewebe, Skelettmuskulatur und Haut erkennbar. Auch Knochenmark und Thymus weisen diese Bande auf, obwohl sie keine SASH1-Expression bei 170 kDa erkennen lassen. Thymus weist auch in der qRT-PCR-Analyse keine SASH1-Expression auf. Die p110-Bande könnte unspezifisch oder aber ein Hinweis auf eine Spleißvariante von SASH1 sein, welche mit der qRT-PCR aufgrund der Primer-Wahl nicht erkannt werden kann.

5.3.2 Expression in humanen Zelllinien

Die Analyse der SASH1-Expression in humanen Zelllinien ist in Abb. 24 dargestellt. Zur Quantifizierung der relativen SASH1-Expression in der qRT-Analyse unterschiedlicher Zelllinien wurden die voneinander unabhängigen Messungen ($n=3$) auf die durchschnittliche Expression von SASH1 in Hek293 Zellen normalisiert. In der T-Lymphom- und Monozyten-Zelllinie (Jurkat und THP1) kommt es zu keiner nachweisbaren SASH1-Expression. Eine mit Hek293 vergleichbare SASH1-Expression zeigten die Zelllinien CaCO2, DLD1, HCT116, HeLa, MCF7 und A431. Die Zelllinien HT29, MDA-MB-435 und DanG wiesen einen doppelt bis vierfach so hohen mRNA-Gehalt von SASH1 auf. Diese erhöhte SASH1-Expression lässt sich z.B. für HT29-Zellen auf eine chromosomale Triploidie zurückführen, welche auch das Chromosom 6, auf welchem der *SASH1*-Lokus liegt, betrifft (Kawai et al., 2002).

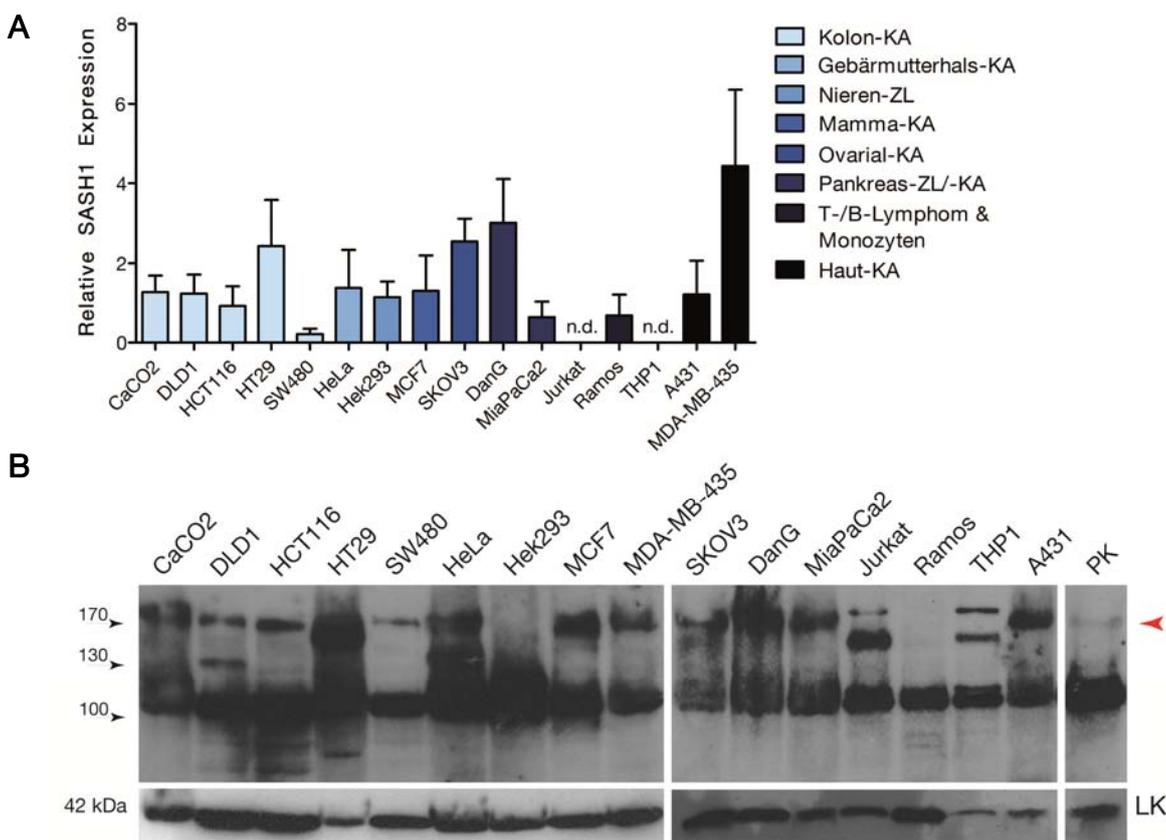


Abb. 24 SASH1-Expression in humanen Zelllinien.

A Die Bestimmung der Expression von SASH1-mRNA erfolgte mittels qRT-PCR. Die relative Expression wurde auf die durchschnittliche Expression von SASH1 in Hek293-Zellen normalisiert. In Jurkat- und THP1-Zellen kommt es zu keiner SASH1-Expression auf mRNA-Ebene. Von allen Zelllinien wurde RNA aus unterschiedlichen Passagen gewonnen und analysiert ($n=3$). n.d.: nicht detektierbar ($MW \pm SD$). **B** In den humanen Zelllinien weisen alle Zellen, bis auf Hek293 und die B- und T-Lymphomzelllinien, eine SASH1-Expression auf. Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen pro Spur aufgetragen. Als Positivkontrolle (PK) wurde ein FL-V5-SASH1 enthaltendes Proteinlysate eingesetzt. Ladekontrolle (LK): Aktin.

In den humanen Zelllinien ist die SASH1-Expression auf Proteinebene mit der Expression auf RNA-Ebene vergleichbar. In der Western Blot-Analyse weisen alle analysierten Zelllinien, besonders die Zelllinien CaCO2, HT29, MCF7, DanG, MiaPaCa2 und A431, eine deutliche SASH1-Expression auf. Eine Ausnahme bilden die epitheliale Zelllinie Hek293 sowie die B-/T-Lymphom- und Monozyten-Zelllinien Jurkat, Ramos und THP1. Die bereits in murinem Gewebe beschriebene, vermutlich unspezifische Bande bei ~110 kDa ist in allen humanen Zelllinien, auch in denjenigen, die keine SASH1-Expression auf mRNA-Ebene zeigen, präsent (Abb. 23C). Ein der im murinen Darmtrakt identifizierten p190 kDa-Bande entsprechendes Signal weisen nur die Zelllinien Jurkat und THP1 auf (Doppelbande p190/p150). Diese humanen Zelllinien exprimieren, entsprechend der murinen T-Lymphom-Zelllinie EL4, auf mRNA-Ebene jedoch kein endogenes SASH1. Die murinen lymphatischen Gewebe Milz und Thymus wiesen auch keine SASH1-Expression auf. Ein ebenfalls abweichendes Bandenmuster zeigen die Zelllinien DLD1 und HeLa, welche eine weitere Bande bei ~130 kDa aufweisen.

5.3.3 Die Lokalisation des SASH1-Transkripts in murinen Embryonen

Die nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung (ISH) ist eine molekularbiologische Methode, bei welcher eine Digoxigenin (Steroid aus den Blättern des Fingerhuts *Digitalis purpurea*)-markierte RNA-Sonde bestimmte Nukleinsäuren sichtbar macht. Durch die Generierung einer Sonde, welche hier spezifisch gegen die 3'UTR-Region von SASH1 gerichtet ist, kann so die SASH1-mRNA in Geweben angefärbt werden. Diese Färbung entspricht Regionen, in welchen das Gen SASH1 aktiv ist und abgelesen wird. Die *antisense* RNA, welche als Sonde gegen das 3'UTR-Ende von murinem SASH1 fungierte, wurde mittels PCR-Amplifikation (murines cDNA-Gemisch als Matrize) und Topo[®] TA-Klonierung generiert. Hierfür wurde das 789 bp große PCR-Amplifikat in das pCR[®]2.1 TOPO[®]-Plasmid eingebracht und mittels des Restriktionsenzym *Bam*HI linearisiert.

Die Sonden-Markierung und die ISH wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Markus Gerhard (II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, München) durchgeführt. Die Sonde wurde durch *in vitro*-Transkription hergestellt und mit Digoxigenin-UTP-markiert. Bei der *in vitro*-Transkription wird bei der Generierung die gesamte DNA-Sequenz von der Promotorregion (hier: T7-Promotor) bis zum freien DNA-Ende (der *Bam*HI-Linearisierung) transkribiert. Nach der Hybridisierung mit der Ziel-mRNA wird für die Anfärbung ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper gegen DIG eingesetzt. Es kommt zur Bildung eines unlöslichen blauen Präzipitats, welches lichtmikroskopisch detektiert werden kann.

Bei der Anwendung auf sagittalen Gewebeschnitten von murinen Embryonen (d14.5; Stadium 22) kam es zu einer Anfärbung von Darm- und Hirnregionen sowie des Riechepithels (Abb. 25C-E). Besonders markant ist die Färbung des Neocortex und des Striatums im Hirnbereich. Die Nabelschnur/Darmanlagen, welche sich noch außerhalb des Peritoneums befinden, zeigen ebenfalls eine Färbung. Als Kontrolle wurde eine Färbung gegen das SOX2-Transkript, welches einen Transkriptionsfaktor der HMG-Box-Familie darstellt, durchgeführt. Der Transkriptionsfaktor SOX2 weist ein mit SASH1 vergleichbares Expressionsmuster in den Regionen des Gehirns auf (Abb. 25B). Die starke Expression im Gehirn und im Darmtrakt deckt sich mit den Ergebnissen in der Expressionsanalyse von adulten murinen Geweben, bei welcher eine starke SASH1-Expression in Proteinlysaten des Gehirns und des Darms nachgewiesen wurde (Abb. 23).

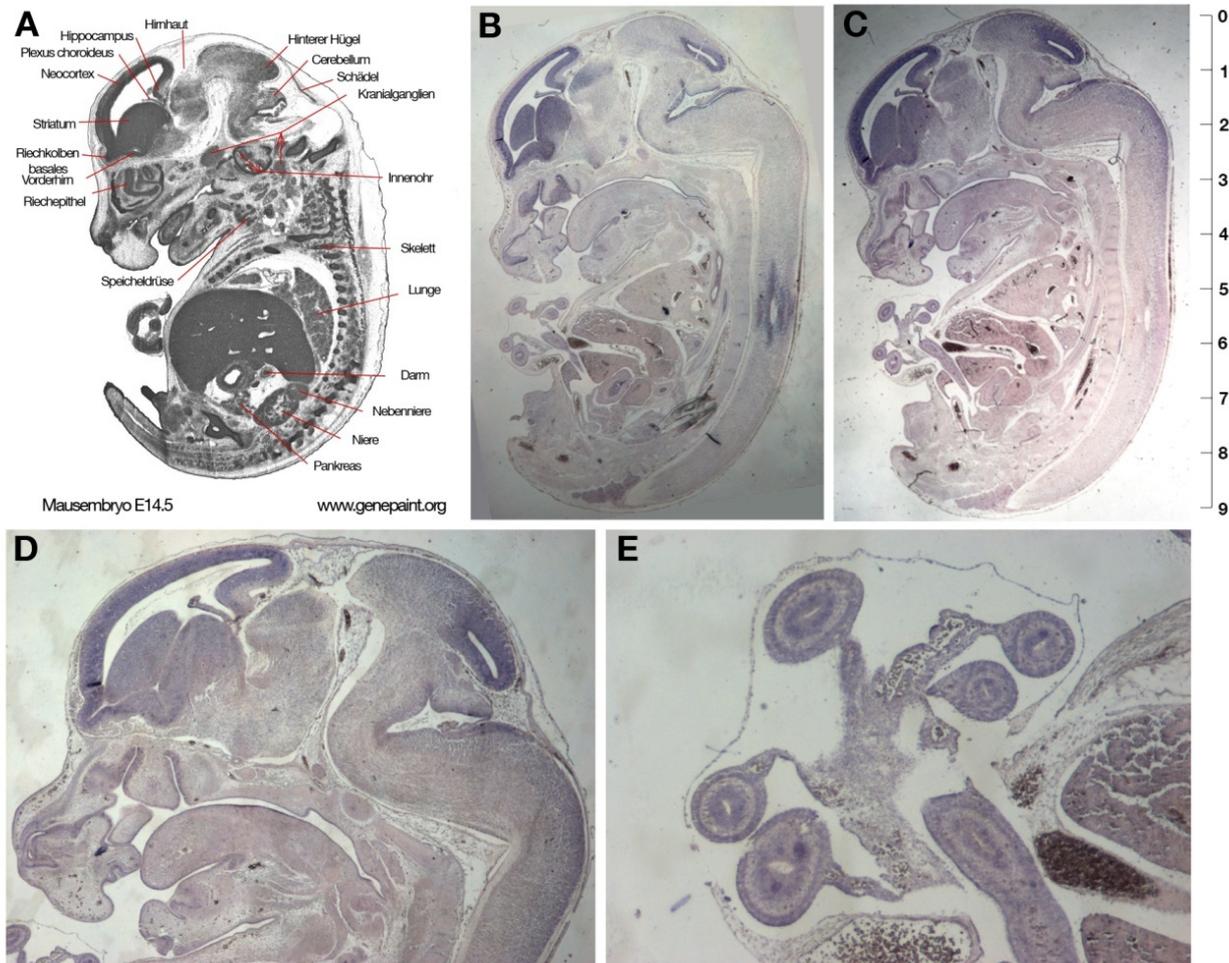


Abb. 25 Starke Expression des SASH1-Transkripts in Hirnregionen und im Darmtrakt.

Übersicht der gegen das SASH1-Transkript gerichteten *in situ*-Hybridisierung eines Mausembryos (d14.5). **A** Schema eines sagittalen Gewebeschnittes eines Mausembryos (Quelle: www.genepaint.org). **B** Immunhistochemische Färbung des SOX2-Transkripts als Kontrolle. SOX2 weist ein SASH1-ähnliches Expressionsmuster auf (Sonde: M.Allgäuer). **C** In der makroskopischen Querschnittsaufnahme des 14.5 Tage alten Embryos ist eine deutliche SASH1-Färbung in Darm, Riechepithel- und Hirnregion erkennbar. Eine Skalierungseinheit der Embryoübersicht entspricht 1 mm. **D & E** Vergrößerte Ausschnitte der Kopf- und Nabelschnur-/Darmregion.

5.4 Intrazelluläre Lokalisation von SASH1

5.4.1 Unterschiedliche Lokalisation von endogenem und V5-markiertem SASH1

Durch die Herstellung eines Antiserums konnte erstmals die Lokalisierung des endogenen SASH1 in Zelllinien und in Geweben untersucht werden. Zuerst wurde mittels Immunfluoreszenz ein Vergleich der Lokalisierung des endogenen SASH1 und des V5-markierten rekombinanten SASH1 in transfizierten Zellen durchgeführt (Abb. 26). Das Antiserum 1540 erkennt wie der anti-V5-Ak das rekombinante V5-markierte FL-SASH1 im Zytosol der transfizierten Zellen. Interessanterweise kommt es mit dem Antiserum auch zu einer relativ schwachen Färbung im Zellkern von untransfizierten Zellen, welche mit dem anti-V5-Ak nicht zu erkennen ist. Die Zellkern-Färbung entspricht möglicherweise der subzellulären Lokalisation von endogenem SASH1. Zellen, welche

das V5-markierte FL-SASH1 exprimieren, zeigen mit der anti-V5-Färbung eine überwiegend zytosolische Lokalisation.

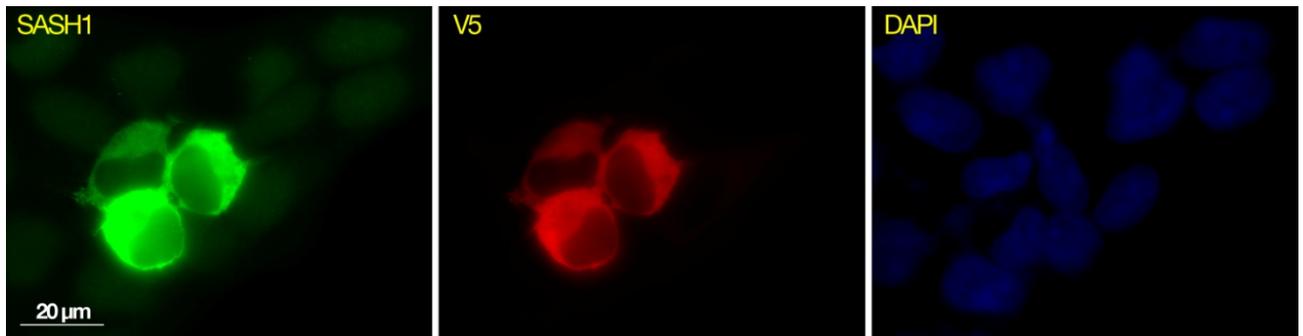


Abb. 26 Rekombinantes SASH1 weist eine vorwiegend zytosolische Lokalisation auf.

Rekombinantes SASH1 ist in Hek293-Zellen hauptsächlich zytosolisch lokalisiert und wird sowohl vom anti-V4-Ak (rot) als auch vom Antiserum 1540 (grün) erkannt. Die Zellkerne wurden DAPI-gefärbt (blau). Größenmarkierung: 20 µm.

In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten epithelialen Zelllinien zeigte sich ein einheitliches Bild der Lokalisation des endogenen SASH1. In allen Zelllinien befindet sich der Großteil des exprimierten SASH1 im Zellkern unter Aussparung der Nukleoli. Auch in den untersuchten mesenchymalen Fibroblasten NIH3T3 fand sich die gleiche Verteilung von SASH1. In mehreren Zelllinien konnte die Lokalisation von endogenem SASH1 zusätzlich in membrannahen, F-Aktinreichen Strukturen beobachtet werden (CaCO₂, HeLa, ModeK). Exemplarisch ist hier das Beispiel der SASH1-Lokalisation in CaCO₂-Zellen dargestellt (Abb. 27A). Die Anreicherungen im Zellkern und in den Membranausstülpungen (Ausschnittsvergrößerung) sind deutlich zu erkennen.

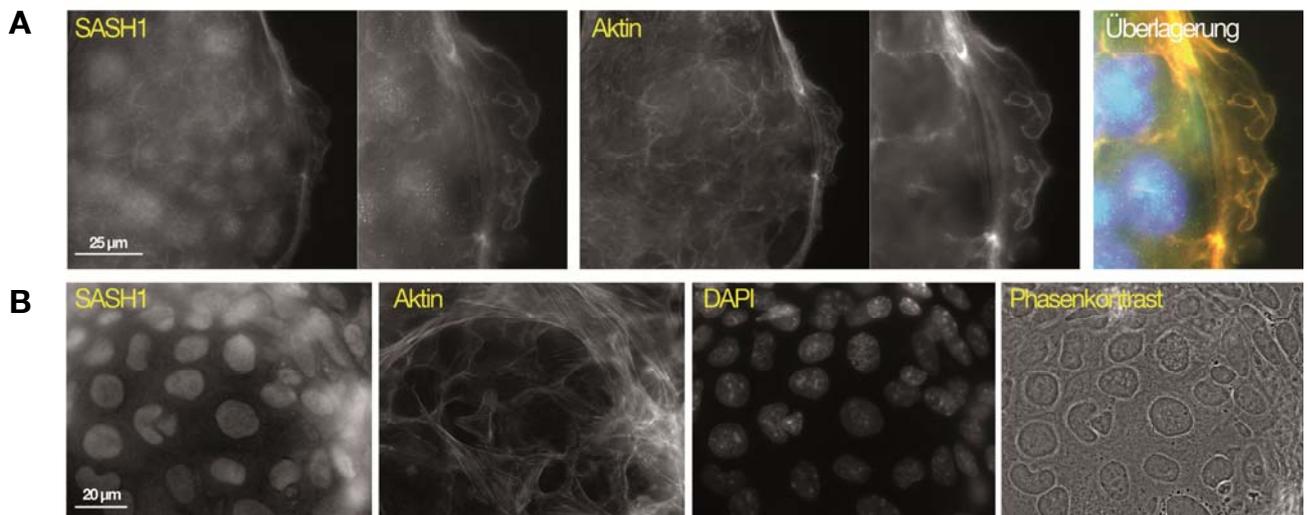


Abb. 27 Lokalisation von endogenem SASH1.

Endogenes SASH1 ist in F-Aktin-reichen Strukturen angereichert und weist eine Kernlokalisierung auf. **A** CaCO₂-Zellen exprimieren SASH1 in peripheren Regionen der Zellinseln (Ausschnittsvergrößerung), im Zellkern und in F-Aktin-reichen Strukturen. Größenmarkierung: 25 µm. **B** SASH1-Expression in murinen epithelialen Primärkulturen aus dem Kolon (d6). SASH1 ist in murinen Primärkulturen des Kolons hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Größenmarkierung: 20 µm.

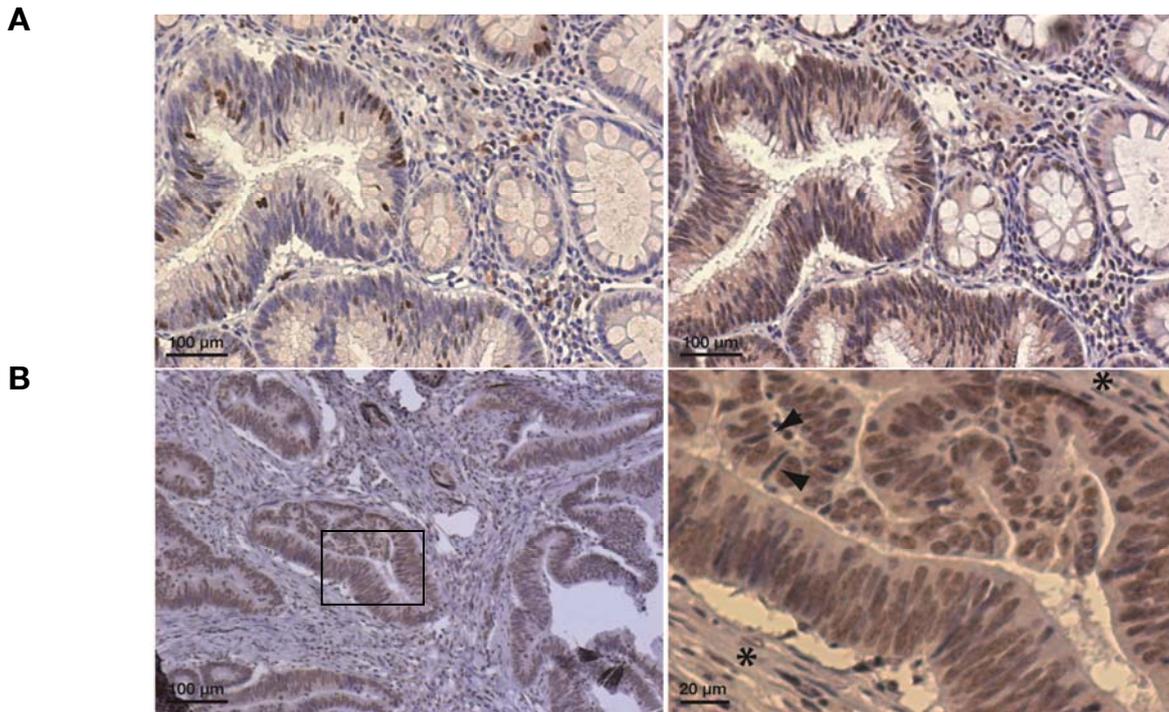


Abb. 28 Immunohistochemische Färbung humaner Kolorektalkarzinom-Schnitte.

IHC zweier unterschiedlicher Kolorektalkarzinom-Gewebeproben (**A** bzw. **B**; Tumorstadium UICC I). **A** Ki67 wurde als Proliferationsmarker und als Positivkontrolle eingesetzt (links). Das entdifferenzierte Gewebe weist für SASH1 eine deutliche Zellkernfärbung der Tumorzellen epithelialen Ursprungs auf (rechts). Außerdem zeigt das Zytoplasma eine leichte Färbung. Größenmarkierung: 100 µm. **B** Die Ausschnittsvergrößerung (rechts) zeigt, dass nicht alle Zellkerne angefärbt sind (Pfeilspitze). Auch das Stroma (*) spiegelt ein heterogenes Bild bei der SASH1-Färbung wieder. Größenmarkierungen: 100 µm & 20 µm.

Die Lokalisation von endogenem SASH1 veränderte sich nicht durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen (Abwesenheit von Serum, Re-Stimulation), und war somit unabhängig vom Proliferationsstatus. Murine epitheliale Primärkulturen des Kolons (d6 der Zellkultivierung) besitzen in der Immunfluoreszenz ebenfalls einen hohen SASH1-Gehalt innerhalb des Zellkerns (Abb. 27B). In der Immunhistochemie zeigt das Antiserum 1540 auf Kryo-Schnitten des humanen Kolorektalkarzinoms eine deutliche Zytosol- und eine starke Kernfärbung des dedifferenzierten Epithels (Abb. 28). Vereinzelt treten jedoch ungefärbte Zellkerne auf, die sich durch eine langgezogene, schlanke Form von den gefärbten Zellkernen unterscheiden. Als IHC-Kontrolle und als Tumormarker wurde parallel eine Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt (Abb. 28A, links).

5.4.2 Biochemischer Nachweis der SASH1-Lokalisation

Um die Lokalisation von endogenem SASH1 zu überprüfen, wurden subzelluläre Fraktionierungen von murinen epithelialen Primärzellen durchgeführt (Abb. 29). Die Zellen wurden für die Zellkernfraktionierung aus frischen Darmabschnitten des Jejunums und Kolons mittels EDTA-Inkubation abgelöst. Die Lysate der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Um die Reinheit der Fraktionen sicherzustellen, wurden als Kontrollen Antikörper gegen Lamin A/C (Kernfraktion), Integrin $\beta 1$ (Membranfraktion) und Tubulin (zytosolische Fraktion) eingesetzt.

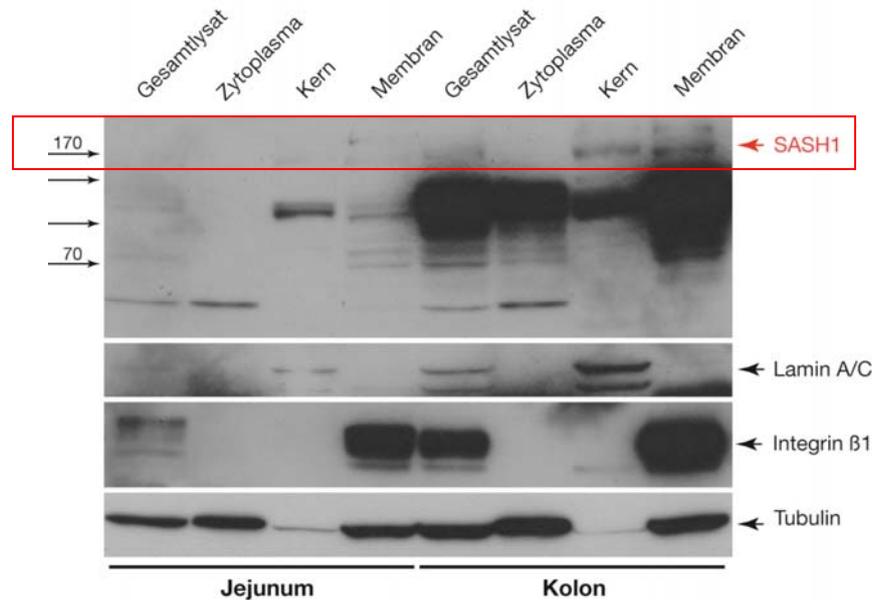


Abb. 29 SASH1-Nachweis in Kern- und Membranfraktionen.

Die Zellkernfraktionierung von Darmepithelzellen des Jejunums und des Kolons aus C57Bl/6-Mäusen deutet auf eine Kern- und Membranlokalisation von SASH1 hin. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde durch anti-Lamin A/C, Integrin β1 und Tubulin nachgewiesen.

Die Gesamtexpression von SASH1 ist im Jejunum niedriger als im Kolon (Gesamtlysat). Nach der Zellkernfraktionierung der murinen Primärzellen findet sich das im Gesamtlysat des Kolons nachgewiesene SASH1-Protein in den Fraktionen von Kern und den Membranen wieder. Durch die gewählten Pufferbedingungen (Anm.: kein Triton) enthält die Membranfraktion auch das Aktin-Zytoskelett. In der Zellkernfraktionierung der aus dem Jejunum gewonnenen Epithelzellen findet sich nach der Ankonzentrierung eine schwache SASH1-Expression ebenfalls in den Fraktionen des Kerns und der Membran, obwohl in der Gesamtlysat-Fraktion kein SASH1 nachgewiesen werden konnte. Die Befunde decken sich mit den Immunfluoreszenzanalysen, welche eine SASH1-Lokalisation im Kern und in F-Aktin-reichen Membranstrukturen zeigten. Die p110-Bande ist äußerst dominant in den Fraktionen der Membran und des Zytoskeletts des Kolons. In der Kernfraktion, in welcher eine hohe Konzentration des FL-SASH1 vorliegt, kommt es zu einer abgeschwächten Detektion der p110-Bande. Im Vergleich zum Kolon weisen die Fraktionen der Epithelzellen des Jejunums eine starke p110-Bande in der Kern- und ein schwächeres Signal in der Membranfraktion auf.

5.5 Regulation der Expression

Ein Großteil der in Säugern vorkommenden CpG-Dinukleotide ist durch eine kovalente Bindung von Methylgruppen an die C5-Position des Cytosinrings chemisch verändert. Innerhalb des Genoms kommt es vereinzelt zur „Cluster“-Bildung dieser CpG-Dinukleotide. Diese 0,5-2 kb langen DNA-Abschnitte weisen einen erhöhten GC-Gehalt (von über 60 %) gegenüber dem Gesamtgenom auf (Gardiner-Garden & Frommer, 1987) und werden als CpG-Inseln bezeichnet. Liegen die CpG-Inseln in Promotorregionen von Genen, so kann die Gen-Aktivität durch deren Methylierung beeinflusst werden. Tragen beide Cytosine auf beiden komplementären DNA-Strängen eine Methylgruppe, bewirken sie eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Doppelstrang-DNA, welche innerhalb einer Promotorregion zum sogenannten „gene-silencing“ führt.

Literaturbefunde beschreiben für die chromosomale Region 6q23-25 des *SASH1*-Lokus eine epigenetische Genregulation durch Promotormethylierung (Abdollahi et al., 2003; Tessema et al., 2008). Um eine derartige Genregulation von *SASH1* zu überprüfen, wurde eine experimentelle Demethylierung in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Demethylierung erfolgte durch den Inhibitor der DNA-Cytosin C5-Methyltransferase, das 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza). Außerdem wurde Trichostatin A (TSA) eingesetzt, welches die Histondeacetylasen der Klassen I und II inhibiert. So kann die DNA nicht mehr methyliert, bzw. in ihre kompakte inaktive Chromatin-Form gebracht werden.

Die experimentelle Demethylierung (n=3) wurde parallel mit drei unterschiedlichen Versuchsansätzen erzeugt. Die getesteten Zelllinien wurden hierfür 72 h mit 5-Aza, 16 h mit TSA oder erst 16 h mit 5-Aza, dann für weitere 16 h mit TSA inkubiert (Magdinier & Wolffe, 2001). Als Kontrolle wurden Zelllinien nur mit DMSO behandelt. Nachdem die Inkubation der Zellen beendet wurde, wurde cDNA generiert und in der qRT-PCR auf die relative *SASH1*-Expression getestet (Abb. 30).

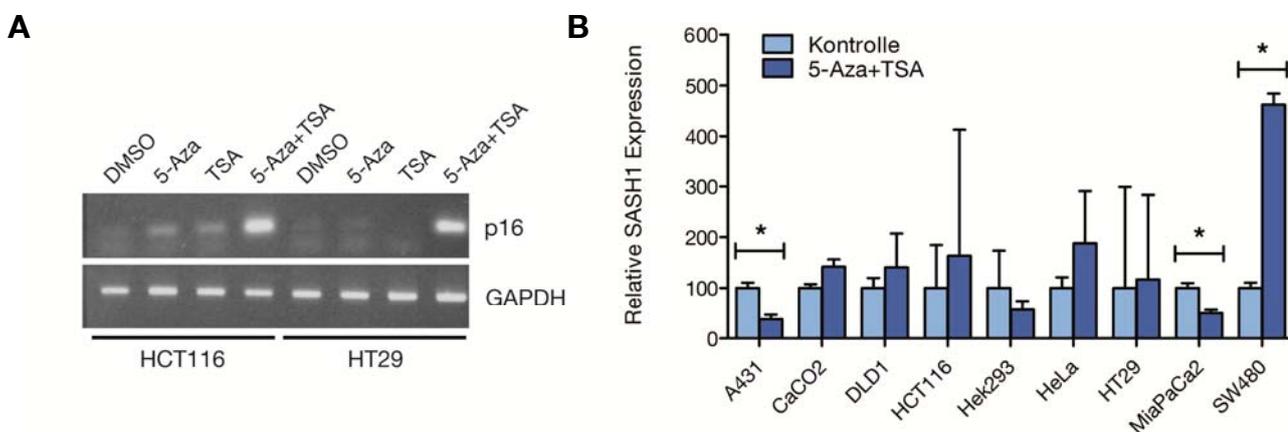


Abb. 30 Verstärkte Expression von $p16^{INK4a}$ und *SASH1* aufgrund von DNA-Demethylierung.

Die Demethylierung von CpG-Inseln erfolgte durch eine kombinierte Inkubation mit 5-Aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A. **A** Die Hypermethylierung des *p16*-Promotors ist in zahlreichen Zelllinien beschrieben worden. Die *p16*-Amplifikation wurde deshalb als Kontrolle für eine erfolgreiche Demethylierung verwendet. In HCT116 und HT29 kann nach der Inkubation mit 5-Aza und TSA eine *p16*-Transkription nachgewiesen werden. **B** In der qRT-Analyse kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der relativen *SASH1*-Expression nach der Stimulation mit 5-Aza und TSA in der SW480-Zelllinie ($p=0,0266$). Die relative *SASH1*-Expression wurde auf die *SASH1*-Expression in DMSO-stimulierten Hek293 normalisiert (n=3; MW \pm SD). Signifikanzniveau (*).

Um sicherzustellen, dass der Versuchsansatz eine DNA-Demethylierung zur Folge hat, wurde die Transkriptionsrate des Gens $p16^{INK4a}$ mittels PCR-Amplifikation untersucht (Abb. 30A). Die Transkription von $p16^{INK4a}$ wird durch Promotormethylierung reguliert. Die Demethylierung zeigt eine deutliche Zelltyp-Spezifität. So kommt es in der Zelllinie HCT116 bereits nach der 5-Aza- bzw. TSA-Behandlung zu einer schwachen *p16*-Transkription. Die Zelllinie HT29 benötigt jedoch eine kombinierte Inhibition durch 5-Aza und TSA, um einen Demethylierungseffekt des *p16*-Promotors zu erzeugen. In den in Abb. 30B dargestellten Expressionsraten von *SASH1* in unterschiedlichen Zelllinien ist eine Tendenz einer zelltyp-spezifischen Promotormethylierung zu erkennen. Die *SASH1*-Expression erhöhte sich nach der kombinierten Inkubation mit 5-Aza und TSA in CaCO₂, HCT116, DLD1, HeLa und SW480. In SW480-Zellen wurde eine signifikant verstärkte *SASH1*-Expression erst nach der Behandlung mit 5-Aza und TSA beobachtet. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorherigen qRT-PCR-Analyse (Abb. 24). Das *SASH1*-Transkript wurde auf RNA-Ebene kaum exprimiert. Hier wiesen SW480-Zellen die geringste *SASH1*-Expression auf, was möglicherweise auf einer Hypermethylierung der Promotorregion basiert. Die Zell-

linien A431 und MiaPaCa2 weisen nach der Behandlung eine signifikant geringere SASH1-Expression auf. Dieses Ergebnis kann allerdings im Zusammenhang der Zellvitalität stehen. Einzelne Zelllinien reagieren unterschiedlich sensitiv auf die Demethylierungsbehandlung.

5.6 Regulationsmechanismen der SASH1-vermittelten Lamellipodieninduktion

Die Expression von SASH1 induziert die Lamellipodienausbildung. Außerdem findet sich SASH1 in F-Aktin-reichen Strukturen wieder, und SASH1 interagiert mit Cortactin. Die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts wird über Cortactin unter anderem durch die membran-assoziierten kleinen GTPasen aus der Ras-Superfamilie reguliert (Weed et al., 1998). Eine Regulation von SASH1 durch die kleine GTPase Rac1, welche einen zentralen Regulator der Lamellipodienbildung darstellt, oder eine funktionelle Interaktion beider Proteine ist naheliegend und wurde deshalb durch Ko-Transfektionsstudien und mittels eines Rac1-Aktivierungsassays untersucht. Der Versuch einer Ko-Immünpräzipitation von GFP-markiertem Rac1^{V12}/Rac1^{N17} und V5-markiertem bzw. endogenem SASH1 war nicht erfolgreich (nicht gezeigt).

5.6.1 Ko-Lokalisierung von aktivem Rac1 mit SASH1

Hek293 Zellen wurden mit einer dominant negativen GFP-markierten Form des Rac1 (inaktives Rac^{N17}) bzw. einer konstitutiv aktiven GTP-markierten Form von Rac1 (Rac^{V12}) transfiziert. Zusätzlich wurden Hek293 Zellen mit V5-FL-SASH1 ko-transfiziert. Die Änderungen in der Zellmorphologie wurden in der Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 31). Die mit SASH1 transfizierten Zellen weisen die in vorherigen Experimenten charakterisierte SASH1-Lokalisation in F-Aktin-reichen Membranstrukturen und im Zytosol auf (Abb. 31A-C). Die aktive, GTP-gebundene Form von Rac1 induziert die Ausbildung von Membran-„Ruffles“ und Lamellipodien, die inaktive, GDP-gebundene Form von Rac1 inhibiert deren Ausbildung. In Hek293-Zellen führt die Expression von konstitutiv aktivem Rac1 zu einer Induktion eines breiten Lamellipodiensaums (Abb. 31D-F), während die dominant negative Form von Rac1 zu einer spindelförmigen Morphologie der Zellen führt (Abb. 31G-I). Bei den Ko-Transfektionen kommt es nun zu einer starken Veränderung der peripheren Zellstrukturen (Abb. 31J-O). Rac^{V12} führt zusammen mit SASH1 zu einem extremen Anstieg der Membran-„Ruffles“ in den transfizierten Zellen. Außerdem weisen Rac^{V12} und SASH1 eine exakte Ko-Lokalisierung in der Zellmembran auf (Abb. 31J-L). Die Ko-Transfektion von inaktivem Rac^{N17} und SASH1 führt zu einer sichelförmigen morphologischen Änderung der transfizierten Zelle. In der leicht spindelförmigen Zelle ist SASH1 allerdings nicht mehr in den F-Aktin-reichen Membranstrukturen, sondern nur noch im Zytoplasma der Zelle zu finden (Abb. 31M-O). Die Überexpression von SASH1 führt auch nicht mehr zu einer erhöhten Lamellipodieninduktion. Es kommt somit zu einer Blockade der SASH1-induzierten Lamellipodienausbildung.

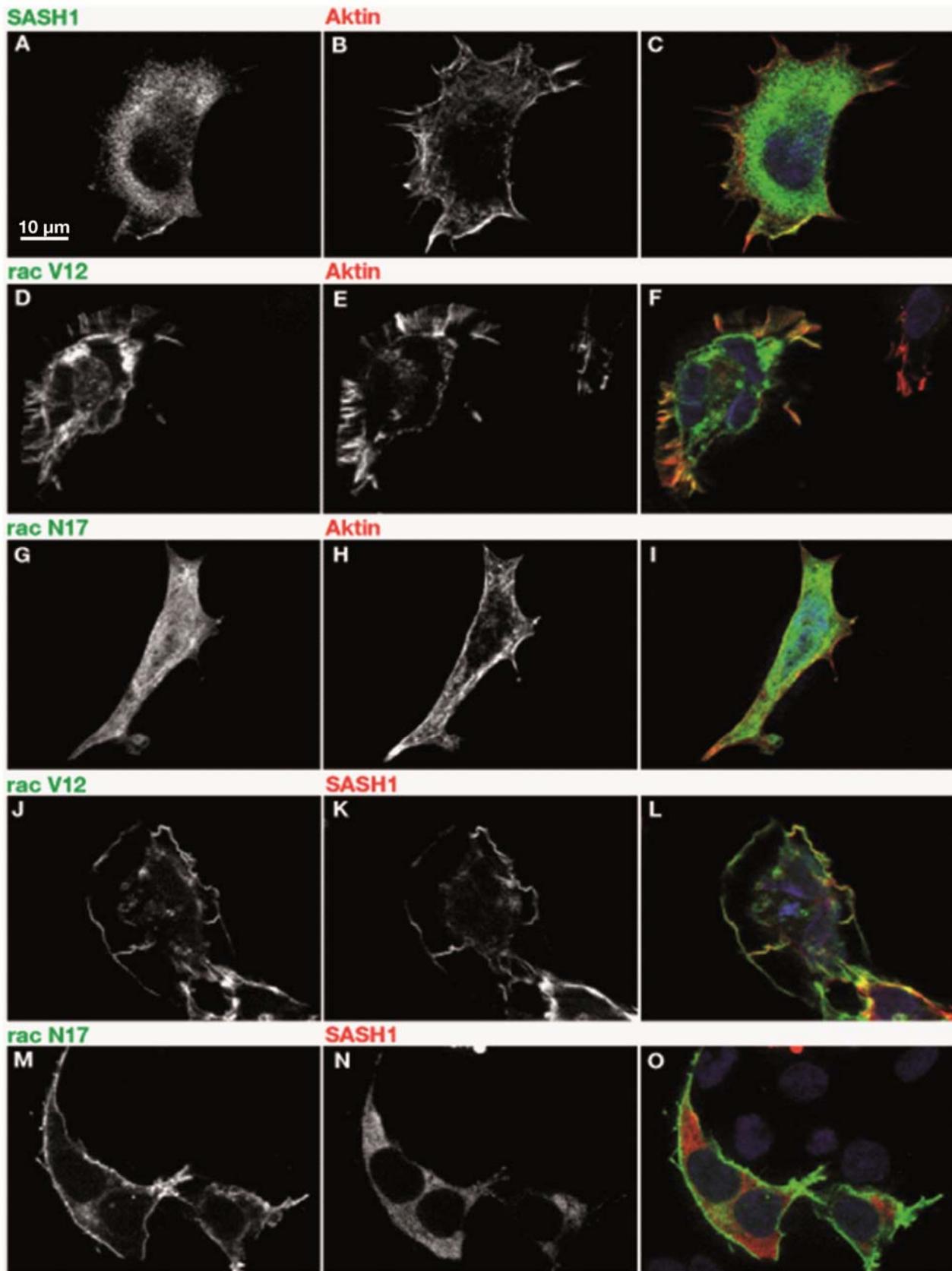


Abb. 31 Drastische Morphologieänderungen durch Ko-Transfektion von SASH1 und aktivem Rac1. Hek293 Zellen wurden mit V5-SASH1, der dominant negativen bzw. der konstitutiv aktiven Form von Rac1 transfiziert (A-I). Ko-Transfektionen bei der Rac1-Formen mit V5-SASH1 zeigten einen veränderten morphologischen Phänotyp (J-O). Größenmarkierung: 10 µm.

5.6.2 SASH1-abhängiger Rac1-Aktivierungsassay

Um eine mögliche Abhängigkeit des Rac1-Aktivierungsstatus von der SASH1-Expression nachzuweisen, wurde der Gehalt der endogenen Rac1-Aktivität in SASH1-transfizierten Zellen (HeLa und Hek293) bestimmt. Um GTP-gebundenes aktives Rac1 zu quantifizieren, wurde ein biochemischer Assay durchgeführt. Hierfür wurden Hek293 und HeLa-Zellen mit V5-FL-SASH1 transfiziert und 24 h nach der Beendigung der Transfektion lysiert. Das Proteinlysate wurde in einem Rac1-Aktivierungsassay der Firma Thermo Scientific, Rockford, USA, eingesetzt.

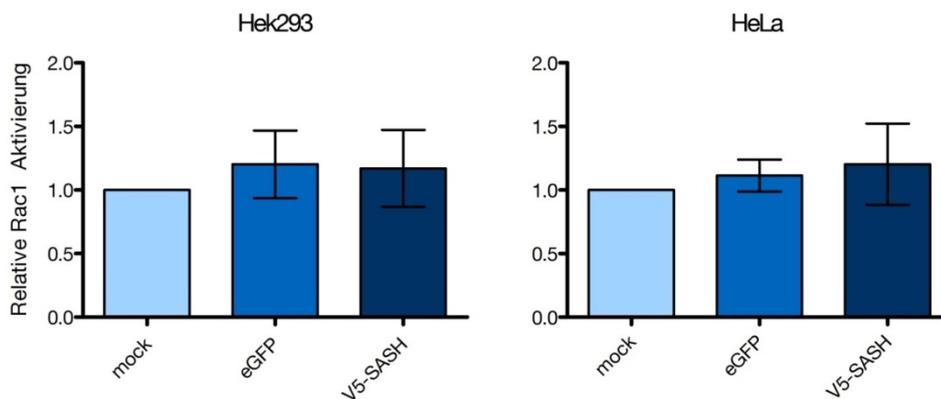


Abb. 32 Quantifizierung der Rac1-Aktivität zeigt keine Abhängigkeit von SASH1.

Die Quantifizierung der Rac1-Aktivität erfolgte durch die Quantifizierung der Western Blot-Banden relativ zur Tubulinexpression. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Rac1-Aktivität in V5-SASH1-transfizierten Hek293 (n=7; MW±SD) und HeLa (n=6; MW±SD)-Zellen zeigen keine signifikante Erhöhung der Rac1-Aktivität. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem eGFP-Vektor transfiziert.

Es kam weder in Hek293- noch in HeLa-Zellen zu einer bedeutsamen Veränderung der Rac1-Aktivität aufgrund einer SASH1-Überexpression. Beide Zelllinien zeigten einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Rac1-Aktivität in den SASH1-transfizierten Zellen im Vergleich zu den, mit einem Kontrollvektor transfizierten Zellen, da es vor allem in den Hek293-Zellen durch die Kontrolltransfektion mit einem eGFP-Vektor ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität kommt. Die Erhöhung der Aktivität ist somit eher auf die Transfektionsbehandlung der Zellen als auf die SASH1-Expression zurückzuführen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich der Einfluß von SASH1 auf Rac1 nicht auf den GTP-Status, sondern möglicherweise auf die intrazelluläre Verteilung von Rac1 bezieht.

5.7 Transkriptom-Analyse

Bei der Analyse der Genexpression wird die mRNA isoliert, unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und auf sogenannte „Gen-Chips“ hybridisiert. Durch die Analyse der erzeugten Daten kann eine quantitative und skalierbare Aussage über die Expressionsstärke der im gesamten Genom enthaltenen Gene getroffen werden.

Um eine veränderte Genexpression aufgrund eines erhöhten oder herunterregulierten SASH1 in Zelllinien zu untersuchen, wurde das Affymetrix-System „One-Cycle Target Labeling and Control Reagents“-Kit und der GeneChip® U133 Plus 2.0 (Affymetrix, High Wycombe, UK) verwendet. Die RNA wurde aus der SW480-Zelllinie, die auf Proteinebene eine deutliche SASH1-Expression aufweist, isoliert. Hierbei kamen SW480-wt-Zellen, ein stabiler anti-SASH1-shRNA exprimierender SW480-Klon sowie V5-SASH1-transfizierte SW480-Zellen zum Einsatz. Die relative SASH1-Expression wurde vor der Durchführung der RNA-Umschreibung und -Markierung mittels qRT-PCR

bestimmt und auf die durchschnittliche SASH1-Expression von wt-SW480 normalisiert. Stabile shRNA-exprimierende SW480-Klone weisen eine bis zu 80 % erniedrigte SASH1-Expression, V5-SASH1-transfizierte Zellen eine bis zu 300-fach verstärkte SASH1-Expression in der qRT-PCR auf (Abb. 33).

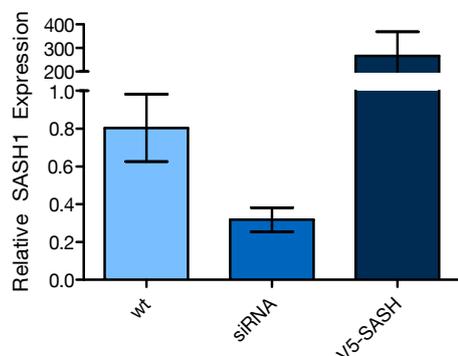


Abb. 33 Expression von SASH1 in SW480-Zellen.

Die relative SASH1-Expression ist in den V5-FL-SASH1-transfizierten SW480-Zellen deutlich erhöht, während die Expression der anti-SASH1-shRNA in den SW480-Klonen zu einer signifikanten Herabregulation der SASH1-mRNA führt. Die Expression wurde auf die durchschnittliche Expression von SASH1 in wt-SW480-Zellen ($n > 3$) normalisiert ($MW \pm SD$).

Tab. 8 Überblick der Expressionsanalyse.

	V5-SASH1	anti-SASH1-shRNA	Total
Hochregulierte Gene	34	201	235
Herunterregulierte Gene	12	166	178
Total	46	367	

In die Übersicht fließen alle signifikant deregulierten Gene ein, die eine Erhöhung um mindestens den Faktor $\geq 2,0$ bzw. eine Erniedrigung um den Faktor $\leq 0,5$ aufweisen.

Nachdem die cRNAs die Qualitätskontrollen bestanden hatten und kein RNA-Abbau in den Proben vorlag, wurde die Analyse der Microarray-Daten mit Hilfe des Programms „R“ automatisiert durchgeführt. Die Ergebnisse der differenziell ausgeprägten Gene der Microarray-Analysen ($n=3$) sind in den Tabellen 9-11 zusammengestellt. Die Tabellen führen nur die Gene auf, die eine Erhöhung um mindestens den Faktor 2 bzw. eine Erniedrigung um den Faktor 0,5 aufweisen. Mehrfach auftretende Transkripte wurden zugunsten des jeweils aussagekräftigeren Faktors aus der Liste entfernt. Insgesamt kam es in 367 Genen (davon 43 ohne Annotation) in SW480 Zellen mit einer verminderten SASH1-Expression zu einer veränderten Genexpression, in V5-SASH1-überexprimierenden Zellen belief sich die veränderte Genexpression auf 46 Gene (davon 6 ohne Annotation).

Tab. 9 und 10 führen die differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit einer reduzierten SASH1-Expression auf. Hierbei fällt das Gen RAP1A (RAS-related protein RAP1A) auf, welches eine um den Faktor 58 stärkere Expression aufgrund der SASH1-Unterdrückung besitzt Tab. 9. Das membranassoziierte und auch zytosolisch vorliegende RAP1-Protein vermittelt über eine Vielzahl von Effektormolekülen die Aktivierung von MAP-Kinasen und spielt auch bei der Transkription, der Differenzierung und bei der Zellmorphologie eine Rolle (Bos et al., 2001).

SASH1 selbst wurde ebenfalls als herunterreguliertes Gen mit einem Expressionsfaktor von 0,54 identifiziert; dies ist eine Bestätigung für eine erfolgreiche Herunterregulation von SASH1 in den mit anti-SASH1-shRNA-transfizierten Zellen.

Durch eine SASH1-Überexpression kommt es zu einer Herunterregulation von 12 einzelnen Genen. Da der Faktor der veränderten Expression jedoch jeweils oberhalb von 0,5 liegt, und somit als nur gering verändert einzustufen ist, werden sie hier nicht aufgeführt. Eine erhöhte Expression

weisen 34 Gene auf. Bei fünf dieser Gene handelt es sich mindestens um eine Verdoppelung der Expression. MAP2K5 (mitogen-activated protein kinase kinase 5) wird z.B. um den Faktor ~5 erhöht (Tab. 11). Die Kinase gehört zu der Familie der MAP Kinasen Kinasen und spielt eine Rolle in der Stress-induzierten Apoptose und der Angiogenese. Interessanterweise tritt die MAP2K5 ein zweites Mal auf; dieses Mal als ein erniedrigtes Transkript (FC=0,32) im Zusammenhang mit einer SASH1-Herunterregulation (Tab. 10). Die Herunterregulation von SASH1 bewirkt auch eine erniedrigte Expression des Aktin-bindenden Villin-Proteins (FC=0,19). Villin ist bei der Umorganisation des Zytoskeletts beteiligt und wirkt als „capping“- und Filament-bündelndes Protein bei der Aktinpolymerisation. Vergleicht man die Funktionsgruppen, fällt auf, dass es sich bei den aberrant exprimierten Transkripten um eine Mischung aus Chemokinen, Transkriptionsfaktoren, Signalmolekülen, etc. handelt und keine einzelne Funktionsgruppe überwiegt. Innerhalb der herunterregulierten Transkripte bei einer reduzierten SASH1-Expression kommt es zu einer auffällig starken Häufung von aberranten Chemokinen.

SASH1 selbst ist bei den aufgrund einer SASH1-Überexpression veränderten Genen nicht aufgelistet, was vermutlich am Fehlen der endogenen 3'-UTR-Region im rekombinant exprimierten V5-SASH1-Konstrukt liegen mag. Das Affymetrix-Prinzip beruht auf der Erkennung der 3'-Region von Genen.

Tab. 9 Gene mit differentiell erhöhter Genexpression aufgrund einer Herunterregulation von SASH1.

Affymetrix ID	Name	FC	Funktion
1555340_x_at	RAP1A	58,37	Signaltransduktion
204237_at	GULP	4,27	Apoptose
1564220_a_at	---	3,89	---
220663_at	IL1RAPL1	3,82	Signaltransduktion
205376_at	INPP4B	3,35	Hydrolase
206698_at	XK	3,29	Transport
1566764_at	7A5	3,10	Wachstumsfaktor
1555673_at	KRTAP2-4	3,09	Keratinfilament
205822_s_at	HMGCS1	2,97	Transferase
219263_at	RNF128	2,97	Signaltransduktion
1562019_at	NT5DC4	2,94	Hydrolase
206082_at	HCP5	2,86	Immunität
206068_s_at	ACADL	2,80	Metabolismus
242005_at	---	2,74	---
229800_at	DCLK1	2,66	Differenzierung
206584_at	LY96	2,59	Immunantwort
219181_at	LIPG	2,58	Transport
212190_at	SERPINE2	2,56	Differenzierung
243110_x_at	NPW	2,38	Proteinbindung
219355_at	CXorf57	2,37	
214285_at	FABP3	2,36	Differenzierung
203824_at	TSPAN8	2,36	Signaltransduktion
201012_at	ANXA1	2,30	Adhäsion
234835_at	---	2,30	---
203642_s_at	COBLL1	2,25	
1552799_at	TSNARE1	2,24	Proteinbindung
219655_at	C7orf10	2,22	
211019_s_at	LSS	2,21	
1569958_at	---	2,18	---
227759_at	PCSK9	2,15	
222549_at	CLDN1	2,14	
1553055_a_at	SLFN5	2,12	ATP-Bindung
235046_at	---	2,12	---
1569144_a_at	C9orf169	2,12	
204955_at	SRPX	2,11	Proteinbindung
219778_at	ZFPM2	2,06	Transkriptionsfaktor
1552632_a_at	ARSG	2,02	Hydrolase
229963_at	BEX5	2,02	Wachstumsfaktor
207768_at	EGR4	2,02	Transkriptionsfaktor
214321_at	NOV	2,01	Wachstumsfaktor
209040_s_at	PSMB8	2,01	ATP-Bindung
224941_at	PAPPA1	2,01	Enzym

Tab. 10 Gene mit differentiell verminderter Genexpression aufgrund einer Herunterregulation von SASH1.

Affymetrix ID	Genname	Name	FC	Funktion
222227_at	ARMETL1 /// GPER /// NFRKB	arginine-reich, mutated in early stage tumors-like 1 /// G protein-coupled estrogen receptor 1 /// nuclear factor related to kappaB binding protein	0,01	Wachstumsfaktor /// Östrogenrezeptor /// Transkriptionsfaktor
1555623_at	---	nicht annotiert	0,01	---
207529_at	DEFA5	defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	0,08	Abwehr
233847_x_at	---	nicht annotiert	0,10	---
209459_s_at	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	0,19	Enzym
205506_at	VIL1	villin 1	0,19	Zytoskelett
224354_at	---	nicht annotiert	0,23	---
208399_s_at	EDN3	endothelin 3	0,23	Hormon
1558826_at	ZNF831	zinc finger protein 831	0,24	
213113_s_at	SLC43A3	solute carrier family 43, member 3	0,24	Membrantransport
229725_at	ACSL6	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	0,25	Metabolismus
228581_at	KCNJ10	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10	0,25	Membranprotein
206224_at	CST1	cystatin SN	0,25	Enzym
206619_at	DKK4	dickkopf homolog 4 (Xenopus laevis)	0,25	Wnt-Signaling
226560_at	---	nicht annotiert	0,27	---
228044_at	SERP2	stress-associated endoplasmic reticulum protein family member 2	0,27	Proteintransport
201641_at	BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	0,29	Immunantwort
205890_s_at	GABBR1///	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1 /// ubiquitin D	0,29	Signaltransduktion
229777_at	CLRN3	clarin 3	0,30	Membrantransport
211371_at	MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	0,32	Kinase
205476_at	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0,33	Chemokine
202600_s_at	NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1	0,33	Transkription
204470_at	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	0,34	Chemokine
202859_x_at	IL8	interleukin 8	0,34	Zytokine
219594_at	NINJ2	ninjurin 2	0,34	Proteinbindung
220196_at	MUC16	mucin 16, cell surface associated	0,35	Proteinbindung
209460_at	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	0,35	Enzym
206994_at	CST4	cystatin S	0,36	
203559_s_at	ABP1	amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))	0,37	
204462_s_at	SLC16A2	solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	0,37	Transporter
206739_at	HOXC5	homeobox C5	0,38	Transkriptionsfaktor
215294_s_at	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	0,38	
210221_at	CHRNA3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3	0,40	
209774_x_at	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	0,40	Chemokine
203828_s_at	IL32	interleukin 32	0,41	Zytokine
209993_at	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	0,42	
230238_at	ANKRD43	ankyrin repeat domain 43	0,42	
1553602_at	MUCL1	mucin-like 1	0,43	
225681_at	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	0,44	Signaltransduktion
209994_s_at		ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 /// ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	0,46	
216598_s_at	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	0,44	Chemokine
238567_at	SGPP2	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	0,46	Hydrolase
207339_s_at	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	0,47	Zytokine
209425_at	AMACR /// C1QTNF3	alpha-methylacyl-CoA racemase /// C1q and tumor necrosis factor related protein 3	0,48	
211184_s_at	USH1C	Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)	0,49	Proteinbindung
206337_at	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	0,50	Chemokine

Tab. 11 Gene mit differentiell erhöhter Genexpression aufgrund einer SASH1-Überexpression.

Affymetrix ID	Genname	Name	FC	Funktion
211371_at	MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	4,47	Kinase
222227_at	ARMETL1 /// GPER /// NFRKB	arginine-reich, mutated in early stage tumors-like 1 /// G protein-coupled estrogen receptor 1 /// nuclear factor related to kappaB binding protein	3,04	Wachstumsfaktor /// Östrogenrezeptor /// Transkriptionsfaktor
234990_at	CBX5	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)	2,62	Transkriptionsrepressor
214657_s_at	TncRNA	Trophoblast-derived noncoding RNA	2,15	Transkriptionsfaktor
233847_x_at	---	nicht annotiert	2,09	---

5.8 Generierung eines konditionalen gewebsspezifischen SASH1^{KO}-Mausstammes

Um die physiologische Funktion von SASH1 und seine Rolle bei der Tumorgenese zu klären, wird ein *in vivo*-Modell angestrebt, welches im Rahmen dieser Arbeit in Form einer SASH1^{KO}-Maus generiert werden sollte. Das hierfür verwendete konditionale System der „knock-out“ (knock-out: außer Gefecht setzen)-Mutagenese wurde durch homologe Rekombination in pluripotente embryonale Stammzellen eingeführt. Bei der homologen Rekombination kommt es zu einer Anlagerung der Abschnitte des Gens auf dem generierten Vektor an die identischen Abschnitte auf dem Maus-Genom. In manchen Fällen kommt es zu einer Rekombination, d.h. einem Austausch der homologen Sequenzen mit der Folge der Vektorintegration in das Genom.

Der aus diesen Stammzellen hervorgegangene Mausstamm sollte so einen Genlocus mit einer mit loxP-Stellen flankierten spezifischen Region, hier SASH1 Exon 14/15, erhalten. Durch die Kreuzung mit verschiedenen Mauslinien, welche eine zelltyp-spezifische Expression der Cre-Rekombinase aufweisen, könnte so die SASH1-Expression gewebe- bzw. zelltyp-spezifisch unterdrückt werden. Durch diesen Funktionsverlust von SASH1 wäre es möglich, eine Aussage über dessen physiologische Funktion im Organismus zu machen.

Für ihre Arbeiten an dem „Knock-out“-System in Mäusen wurde 2007 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin an die Wissenschaftler Martin Evans, Mario Capecchi und Oliver Smithies vergeben.

5.8.1 Klonierung der Targetvektoren

Die zur Generierung einer SASH1^{KO}-Maus notwendigen Targetvektoren für die homologe Integration in das Mausgenom sind in Abb. 34 schematisch dargestellt. Der Targetvektor SASH1^{ΔE14/15} wurde im Vorfeld der Arbeit von Daniela Mayr (BTA) kloniert. Er basiert auf dem sogenannten Cre/loxP-System (Hamilton & Abremski, 1984), bei welchem die zu deletierenden Regionen mittels Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden (4.4.2.1.4). Die Cre-Rekombinase erkennt spezifische Sequenzen. Sind zwei dieser sogenannten loxP-Stellen in gleicher Richtung in einer DNA integriert, kommt es durch die Cre-Rekombinase-Aktivität zur Deletion der von den loxP-Stellen flankierten Region. Zusätzlich zu den 34 bp-langen loxP-Stellen enthält der Vektor zwei Resistenzkassetten als Selektionsmarker. Zum einen ist in den Vektor ein loxP-flankiertes Neomycinresistenz-Gen, zum anderen ein für die Thymidinkinase (tk) des Herpes-Simplex-Virus (HSV) kodierendes Gen integriert (Mansour et al., 1988). Da die homologe Rekombination in Säugerzellen nur sehr selten stattfindet und Zufallsintegrationen weit häufiger eintreten, sind die Selektionsmarker notwendig, um nach erfolgter Elektroporation rekombinante embryonale Stammzell (ES)-Klone zu selektieren. Die Selektion erfolgte durch die Zugabe des Antibiotikums Geneticin (G418) und des Virostatikums Ganciclovir. Durch diese doppelte Selektion können nur ES-Klone wachsen, welche durch den Einbau der Neomycin-Resistenzkassette in das Genom in der Lage sind, die Neomycinphosphotransferase zu exprimieren. Die Transferase erlaubt das Wachstum in Gegenwart des Antibiotikums G418. Die korrekte ortsspezifische Integration des Targetvektors bei der homologen Rekombination soll mittels der HSV-tk-Kassette gewährleistet werden. Diese liegt außerhalb des homologen Bereiches, und sollte somit bei der homologen Rekombination nicht in das ES-Genom integriert werden. Geschieht dies doch, lässt dies auf eine unvollkommene homologe Rekombination schließen. Diese ES-Klone können durch die negative Selektion mittels Ganciclovir abgetötet werden. Durch die virale Thymidinkinase ist die Zelle in der Lage, Ganciclovir zunächst zu einem Monophosphat zu phosphorylieren, danach durch zelleigene Kinasen in 5'-Triphosphate umzuwandeln. Das so synthetisierte Nukleosid-Analogon kann in die

DNA inkorporieren, was zum Kettenabbruch führt. Die Replikation der Zellen ist gehemmt, es kommt zu keinem Klon-Wachstum.

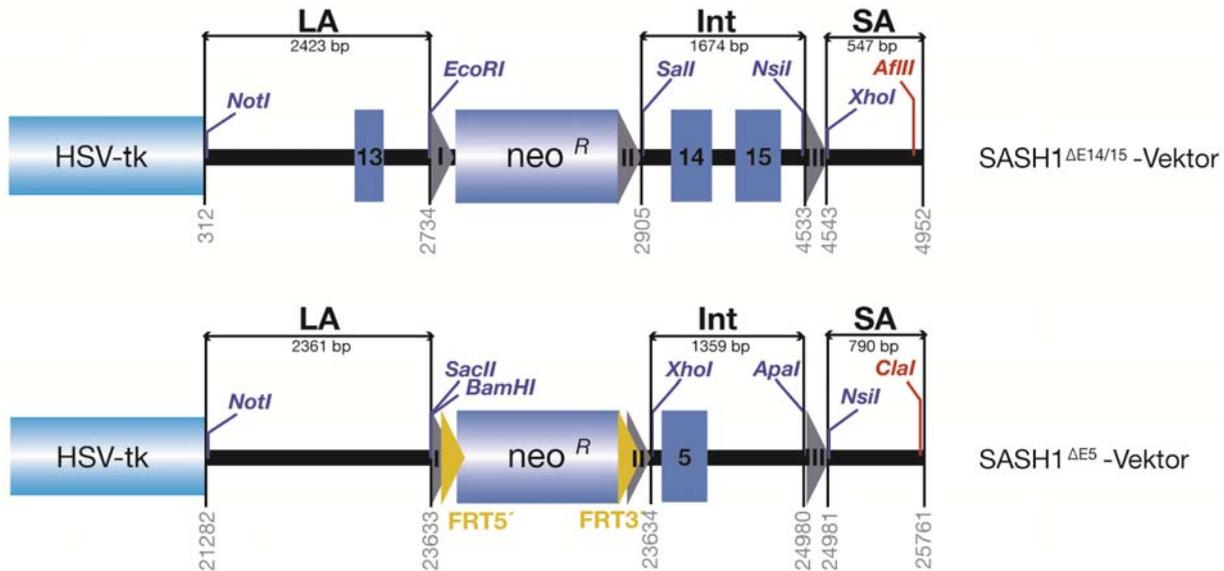


Abb. 34 Schema der Klonierungsstrategien.

Der erste Targetvektor $SASH1^{\Delta E14/15}$ beruht auf dem Cre/loxP-System (graue Pfeilspitzen I-III), der zweite Targetvektor $SASH1^{\Delta E5}$ verwendet eine Kombination des Cre/loxP- und dem Flp/FRT-System (gelb). LA: Langer Arm; KA: Kurzer Arm; Int: Internes Stück; Die HSV-tk- und die Neomycinresistenz-Kassette sind Selektionsmarker. Die Klonierungsschnittstellen sind kursiv in blauer Schrift, die Linearisierungsschnittstelle in kursiver roter Schrift dargestellt. Die Lage der zum Genom homologen Sequenzen wurde vom ersten Basenpaar in Exon 12 bzw. Exon 4 (=0) ausgehend angegeben.

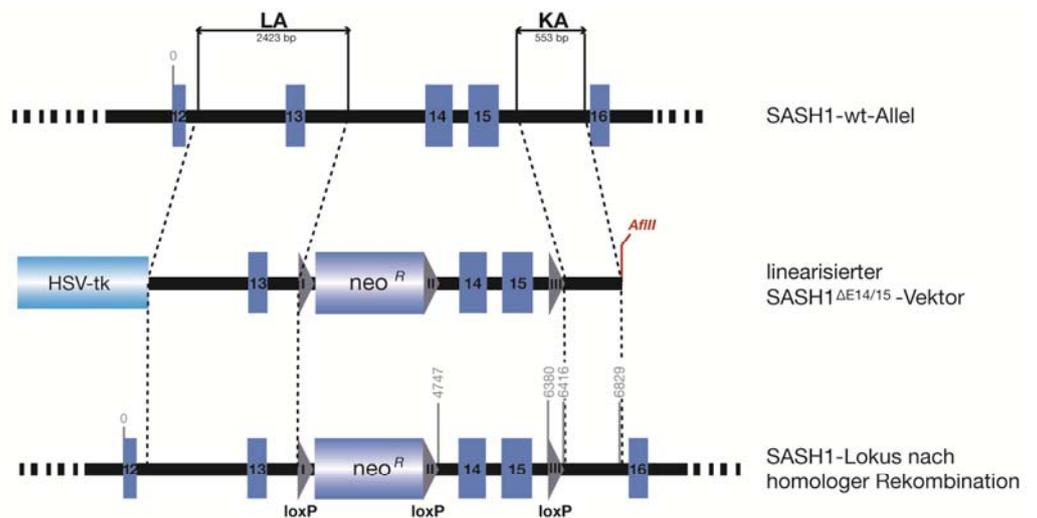
Der zweite Targetvektor wurde aufgrund der geringen Effizienz bei der homologen Rekombination des $SASH1^{\Delta E14/15}$ -Targetvektors in das ES-Genom im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Zusätzlich zu dem Cre/loxP-Rekombinationssystem (aus dem Bakteriophagen P1) basiert der $SASH1^{\Delta E5}$ -Targetvektor auf dem sogenannten Flp/FRT-System (Futcher, 1986; Sadowski, 1995). Das Flp/FRT-System ist ein Sequenz-spezifisches DNA-Rekombinationssystem aus der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Wie die Cre-Rekombinase gehört auch die daran beteiligte Flippase (Flp) zu der Superfamilie der λ Integrasen. Ihre FRT-Erkennungsstellen sind ebenfalls, wie die loxP-Stellen, aus einem 8 bp langen Spacer, flankiert von zwei 13 bp langen Palindromen, aufgebaut. Die Verwendung dieser FRT-Stellen in einem Targetvektor ermöglicht die Ausführung der gleichen Rekombinationstypen wie mit dem Cre/loxP-System (Integration/Exzision, Inversion, Translokation).

Die Generierung des Targetvektors $SASH1^{\Delta E5}$ erfolgte zunächst durch die PCR-Amplifikation des kurzen und des langen Armes sowie des internen Stückes. Als Matrize diente genomische DNA von E14.1-Zellen, welche auch für die homologe Rekombination herangezogen wurden. Die zur Amplifikation eingesetzten Primer führten die für die Ligation der einzelnen Vektor-Bausteine notwendigen Restriktionsschnittstellen ein. Alle amplifizierten PCR-Fragmente wurden mittels des Topo-TA-Vektorsystems subkloniert. Nach erfolgreicher Subklonierung wurde zunächst der lange Arm über die Schnittstellen *NotI* und *BamHI* in das Expressionsplasmid pBluescript II KS(-), in welchem zuvor die *SacII*-Restriktionsschnittstelle inaktiviert wurde, ligiert. Bei der Ligation wurde eine neue *SacII*-Schnittstelle am 3'-Ende des langen Armes eingeführt, um die FRT-flankierte Neomycinresistenz-Kassette über die Schnittstellen *SacII* und *XhoI* einzubauen. Parallel wurde der kurze Arm über die Schnittstellen *ApaI* und *KpnI* in das pBluescript II KS(-)-Plasmid kloniert.

In das so entstandene pBS-SA-Plasmid wurden anschließend loxP-Oligos über *NsiI*- und *ApaI*-Schnittstellen integriert. Das interne Stück wurde über *XhoI* und *ApaI* in den Vektor eingebaut. Das Klonierungsfragment pBS-LA-*neo^R* wurde zum Schluss in das pBS-Int-loxP-SA-Plasmid über die Schnittstellen *NotI* und *XhoI* integriert. Die Einführung der HSV-tk-Kassette erfolgte zum Schluss über die *NotI*-Schnittstelle (Abb. 35).

Der Targetvektor SASH^{ΔE5} wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert, jedoch noch nicht zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen verwendet. Hierfür wurde der bereits vorliegende SASH1^{ΔE14/15}-Targetvektor eingesetzt. Die Strategien der homologen Rekombination sind für beide Vektoren in Abb. 35 wiedergegeben.

A SASH1^{ΔE14/15}-Targetvektor:



B SASH1^{ΔE5}-Targetvektor:

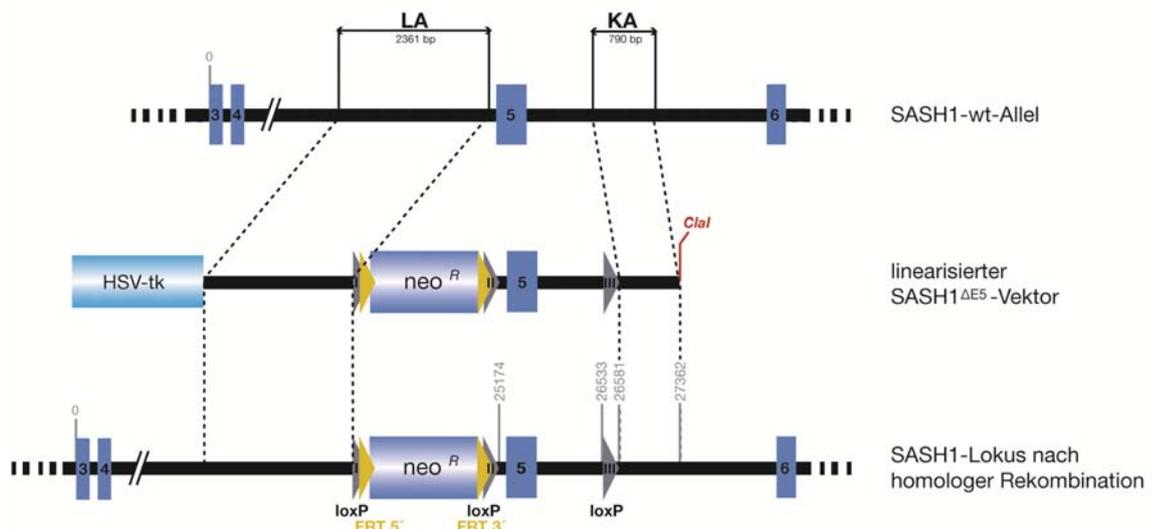


Abb. 35 Strategie der homologen Rekombination beider Targetvektoren.

A Der Targetvektor SASH1^{ΔE14/15} beruht auf einer Deletion der vermuteten funktionalen Regionen von SASH1, der SH3- sowie der ersten SAM-Domäne, mittels Cre/loxP **B** Die zweite Vektorstrategie kombiniert das Cre/loxP-System mit dem Flp/FRT-System. Die *neo^R*-Kassette ist hierbei von zwei FRT-Stellen flankiert, die Deletion von Exon 5 und eine daraus resultierende Verschiebung des Leserasters erfolgen mittels Cre-Rekombinase.

5.8.2 Erzeugung von SASH1^{ΔE14/15} ES-Zellen

Die Erzeugung mutierter SASH1^{ΔE14/15}-ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation pluripotenter embryonaler Stammzellen mit dem linearisierten Targetkonstrukt und dem Einbau des Vektors in das Genom durch einen zelleigenen Mechanismus, der sogenannten homologen Rekombination (Smithies et al., 1985). Der Rekombinationsvektor wurde vor der Elektroporation mit dem Restriktionsenzym *Afl*III linearisiert. Am Tag 2 nach der Elektroporation begann die Selektion der Zellkolonien, indem die Zellen in Anwesenheit von Geneticin und Ganciclovir kultiviert wurden. Je nach Wachstum der Kolonien wurden in den Tagen 12-14 nach dem Beginn der Selektion die dem Selektionsdruck gewachsenen Kolonien gepickt und in 96well-Platten überführt, expandiert und gesichert. Pro Elektroporation wuchsen im Schnitt 90 ES-Zellkolonien an, die expandiert und auf einen korrekten Einbau des Targetvektors mittels PCR überprüft wurden (insgesamt n=1252).

5.8.2.1 PCR-Analyse auf homologe Rekombination

Die Überprüfung der isolierten ES-Klone erfolgte mittels PCR-Amplifikation des 3'-Übergangs von dem homolog rekombinierten Targetvektor in die genomische DNA. Hierfür wurden Primer generiert und die PCR an genomischer wt-DNA und dem Targetvektor etabliert. Der *sense* Primer der KO-PCR wurde so entworfen, dass er die dritte loxP-Stelle des Targetvektors erkennt. Der *anti-sense* Primer liegt dagegen auf dem Exon 16 in der genomischen DNA. Das PCR-Produkt entspricht somit einer Amplifikation der dritten loxP-Stelle und einer Amplifikation des kurzen Armes bis zum Beginn des Exon 16 (Abb. 35). Zusätzlich wurde als Kontrolle der DNA-Qualität eine wt-PCR etabliert, bei der der *sense* Primer im wt-Allel lag und ein Produkt mit einer vergleichbaren Produktgröße wie mit dem KO-*sense* Primers ergab. Die gepickten Klone wurden jeweils mit beiden PCR-Systemen auf homologe Rekombination überprüft. Die wt-PCR sollte bei ausreichender DNA-Qualität immer ein wt-Fragment amplifizieren, da auch nach einer erfolgreichen homologen Rekombination ein hemizygoten wt-SASH1-Allel in den ES vorliegt. Von den auf diese Weise getesteten Klonen erhielt ein Klon bei der KO-PCR die erwartete Bande (Abb. 36).

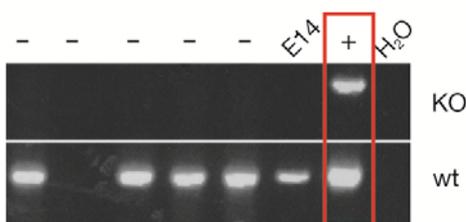


Abb. 36 Positive PCR-Analyse durch homologe Rekombination.

Die in dem Gel exemplarisch aufgetragenen PCR-Produkte von 6 unterschiedlichen Klonen (+wt(E14)- und H₂O-Kontrolle) bestehen bis auf den Klon der zweiten Spur die Überprüfung der DNA-Qualität, indem die wt-PCR in einem Amplifikat resultiert. Nur ein Klon (rot markiert) weist zusätzlich zu der wt-Bande ein KO-Amplifikat auf.

Der in der PCR-Überprüfung als positiv identifizierte Klon (EPVIIF4) wurde expandiert, indem er von den Platten, welche zur Sicherung der gepickten Klone eingefroren wurden (48well Platten bei -80°C), aufgetaut wurde. Nach erfolgter Expansion wurde eine größere Menge an Klon-DNA für eine Sequenzanalyse isoliert und zusätzliche Aliquots des Klons für spätere Analysen und für die Blastozysteninjektion eingefroren.

5.8.2.2 Sequenzierung

Der durch das PCR-Screening identifizierte Klon wurde aufgetaut und expandiert. Nach erfolgter Sicherung des Klons durch Einfrieren mehrerer Kryo-Aliquots wurde DNA für eine Sequenzanalyse isoliert (4.2.1.1.1). Die Sequenzierung ergab eine direkte Übereinstimmung mit der nach homologer Rekombination erwarteten Sequenz am 3'-Ende des Vektor-Genom-Übergangs. Somit konnte

eine erfolgreiche ortsspezifische Rekombination für den 3'-Übergang nachgewiesen werden (siehe 10.1.3).

5.8.3 *In vitro*-Cre-Rekombination

Vor der Injektion des oben beschriebenen ES-Klones in C57Bl/6-Blastozysten sollte die Deletion der Neomycinresistenz-Kassette des in den *SASH1*-Lokus eingebrachten Vektors durch eine *in vitro*-Cre-Rekombination erfolgen. Die Deletion der Neomycinresistenz-Kassette sollte bereits *in vitro* durchgeführt werden, da Untersuchungen eine mögliche Inhibition der Expression durch den Einbau der Kassette nahelegen. So kann die Insertion in Introns zu einer abgeschwächten Expression des Transkripts führen (Holzenberger et al., 2000). Es wurden auch Positionseffekte auf benachbarte Gene beschrieben (Fiering et al., 1995; Olson et al., 1996; Pham et al., 1996; Seidl et al., 1999). Außerdem sollte so die Anzahl des Maus-Zuchtausschusses durch eine Deletion der Kassette *in vivo* gering gehalten werden, da es durch drei im Genom vorliegende Cre-Erkennungssequenzen zu mehreren möglichen Rekombinationsergebnissen kommen kann (Abb. 37).

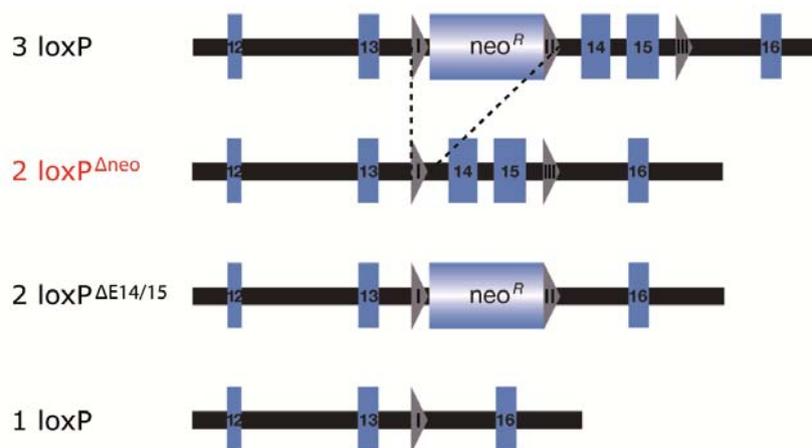


Abb. 37 Mögliche Formen der durch die Cre-Rekombinase durchgeführten loxP-Deletion.

Die durch die Cre-Rekombinase induzierte Exzision der von loxP-Stellen flankierten DNA-Abschnitte resultiert aufgrund drei integrierter loxP-Stellen in drei unterschiedlichen Rekombinationsergebnissen. Das erwünschte Rekombinationsereignis *in vitro* ist die Deletion der Neomycinresistenz-Kassette durch den Strangaustausch der loxP1 und loxP2-Stellen (rot).

Durch eine erneute Elektroporation mit einem Cre-Rekombinase-Expressionsplasmid (pIC-Cre) führt die transient exprimierte Cre-Rekombinase in Zellen eine Rekombination der loxP-Stellen durch. Die die Cre-Rekombinase aufnehmenden Klone erfahren eine Deletion der von den loxP-Stellen flankierten DNA-Abschnitte. Da nach der homologen Rekombination im Genom drei loxP-Stellen vorliegen, kann die Rekombinase-Aktivität theoretisch in drei unterschiedlichen Ergebnissen resultieren (Abb. 37). Das gewünschte Ereignis ist die Deletion der Neomycinresistenz-Kassette durch die Exzision des zwischen loxP1 und loxP2 liegenden DNA-Abschnittes (2loxP^{Δneo}). Die nach der Cre-Elektroporation vereinzelt Klone müssen erneut mittels PCR auf die richtige Exzision hin getestet werden.

Die Cre-Elektroporation wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Der Klon wurde hierfür aufgetaut, amplifiziert und entsprechend dem Protokoll mit dem Cre-Expressionsplasmid elektroporiert. Da die Klone nach der Vereinzelung jedoch einen differenzierten Phänotyp aufwiesen, und die *in vitro*-Cre-Rekombination erfahrungsgemäß zu einer totalen Deletion des integrierten Vektors (1loxP) führt (Gais, 2007), wurden die Klone verworfen. Der Klon EPVIIF4 wurde samt

Neomycinresistenz-Kassette zur Generierung eines SASH1^{3loxP}-Mausstammes herangezogen. Der SASH1^{ΔE14/15}-Mausstamm sollte im Anschluss durch Verpaarungen mit Deleter-Cre-Mäusen (z.B. CMV-Cre oder Ella-Cre) bzw. mit gewebspezifisch Cre-exprimierenden Mäusen *in vivo* erzeugt werden.

5.8.4 Generierung eines SASH1^{3loxP}-Mausstammes aus einem rekombinanten ES-Klon

Der erfolgreich modifizierte Klon wurde im 3loxP-Stadium in Kooperation mit Dr. Sandra Beer an der Universität Düsseldorf in Blastozysten injiziert, welche in den Uterus scheinchwangerer Empfängerweibchen implantiert wurden. Die embryonalen Stammzellen wurden aus dem Mausstamm 129/Sv isoliert (Kawase et al., 1994). Tiere dieses Stammes besitzen eine braune Fellfarbe (agouti). Die zur Reimplantation verwendeten Blastozysten (d2.5) stammen aus C57Bl/6-Spendertieren, welche eine schwarze Fellfarbe aufweisen. Die Vererbung der schwarzen Fellfarbe verläuft rezessiv im Vergleich zu agouti. Die aus der Blastozysteninjektion und -reimplantation in Ammenmütter hervorgehenden gemischtzelligen Tiere weisen so zwei unterschiedliche Fellfarben auf. Der Grad dieses sogenannten Chimärismus korreliert mit dem Anteil, den die injizierten ES-Zellen zum Gesamttier beitragen. Tragen die mutanten ES-Zellen zum Aufbau des Keimbahngebewebes bei, kann die Mutation durch eine Rückkreuzung der Chimären gegen den Wildtyp an ihre Nachkommen weitergegeben werden.

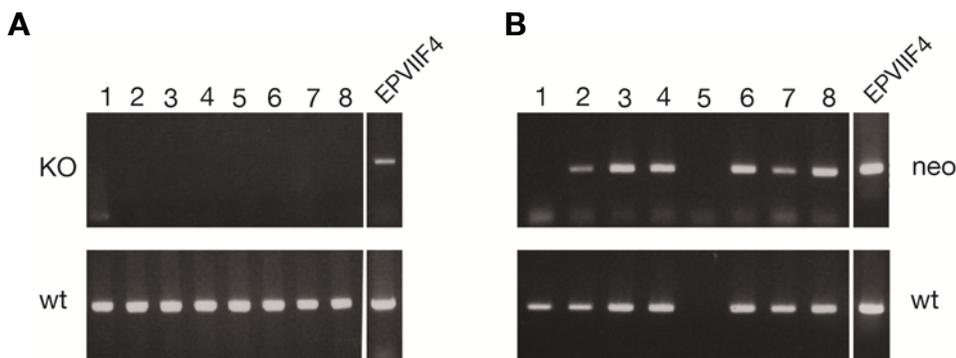


Abb. 38 PCR-Analysen der Mausschwanz-DNA.

Die Nachkommen der Chimären wurden durch zwei unterschiedliche PCRs auf das Vorhandensein des SASH1^{3loxP}-Allels geprüft. **A** Die PCR, welche bei der Überprüfung der ES-Klone angewandt wurde, ergibt in der KO-PCR keine Banden. **B** Die gegen die neo^R-Kassette gerichtete PCR liefert bei der Anwendung an Mausschwanz-DNA der Chimären-Nachkommen positive Ergebnisse. Probe 1 weist nur die wt-Bande auf. Das SASH1^{3loxP}-Allel wird in der neo^R-PCR nicht erkannt. Probe 5 scheint eine schlechte DNA-Qualität aufzuweisen.

Die agouti-farbenen Nachkommen (n=23) der Chimären, welche oberflächlich keinen Phänotyp erkennen ließen, vital und fertil waren, wurden auf die Integration des Vektors mittels PCR und Southern Blot getestet. Hierfür wurde genomische DNA aus Mausschwanz-Biopsien gewonnen. Die Mausschwanz-DNA wurde mit zwei unterschiedlichen PCR-Primer Paarungen analysiert. PCR-Amplifikationen mit der Primerpaarung, die den positiven ES-Klon nach der Elektroporation identifiziert hatten, zeigten entgegen der Erwartung keine KO-Bande (Abb. 38A). Eine mögliche Ursache könnte hierfür der Reinheitsgrad der DNA sein. Obwohl die DNA aus den Mausschwanzbiopsien mittels Phenol:Chloroform-Fällung isoliert wurde, kann ein unterschiedlicher Reinheitsgrad zu der aus Zellen isolierten DNA zu einer Inhibition einzelner PCR-Komponenten führen. Deshalb wurde eine PCR etabliert, die gegen die Neomycinresistenz-Kassette innerhalb des Vektors gerichtet ist. Der *sense* Primer hierfür liegt innerhalb der Kassette am 3'-Ende, der *antisense*

Primer innerhalb des internen Stückes des Vektors. Als Kontrolle wurde parallel eine wt-PCR durchgeführt. Der hierfür verwendete *sense* Primer liegt in einer Region des Genoms, die bei der Klonierungsstrategie des Vektors nicht verwendet wurde und diese somit bei der homologen Rekombination auf dem KO-Allel deletiert ist. Es handelt sich hierbei um ein 177 bp großes DNA-Fragment des Intron 13. Als *antisense* Primer wurde der gleiche Primer wie bei der neo^R-PCR verwendet. Die Ergebnisse dieser PCR-Analyse an Mausschwanz-DNA der Nachkommen sind exemplarisch in Abb. 38B dargestellt.

Zusätzlich zur PCR wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Die hierbei verfolgte Strategie ist in Abb. 39 wiedergegeben. Die Mausschwanz-DNA wurde mit drei unterschiedlichen Sonden analysiert. Es wurden Sonden generiert, die sowohl oberhalb (5'fp) als auch unterhalb (3'fp) des Vektors im Genom liegen. Außerdem wurde eine gegen die Neomycinresistenz-Kassette gerichtete Sonde eingesetzt (neo), um eine mehrfache Integration des Vektors in das Genom auszuschließen.

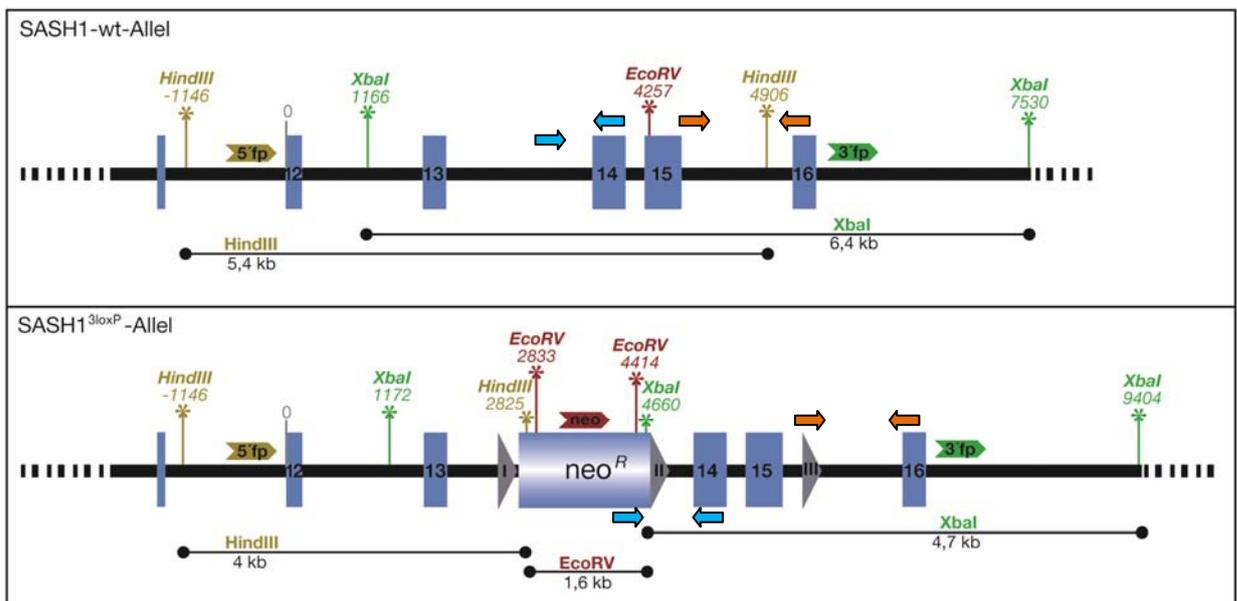


Abb. 39 Strategie der Southern Blot Analyse.

Die genomische DNA weist je nach Sonde und eingesetztem Restriktionsenzym unterschiedlich große Fragmente auf. Die Farbkodierung der Enzymschnittstellen entspricht der eingesetzten Sonde. 5'-flankierende Sonde (5'fp): gelb, neo^R-Sonde (neo): rot, 3'-flankierende Sonde (3'fp): grün. PCR-Screening der ES-Klone: orangefarbene Pfeile. Neo^R-PCR-Screening: türkisfarbene Pfeile (*sense* Primer der wt-PCR liegt auf genomischem Abschnitt, der auf dem Vektor nicht vorhanden ist).

Die genomische DNA der Mausschwanz-Biopsien wurden entsprechend der eingesetzten Sonde mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut. Für den Einsatz der 5'fp-Sonde wurde die genomische DNA mit *Hind*III, der 3'fp-Sonde mit *Xba*I und für den Einsatz der neo^R-Sonde mit *Eco*RV verdaut. Die Größen der daraus resultierenden DNA-Fragmente sind in Abb. 39 angegeben. 0 zeigt eine Zusammenfassung der Resultate der Southern Blot-Analysen. Mit der 3'fp-Sonde wurde für das wt-Allel eine Bande bei 6,4 kb, für das SASH1^{3loxP}-Allel eine Bande der Größe 4,7 kb erwartet. Die wt-Bande ist in allen aufgetragenen DNA-Proben mit der Ausnahme der DNA-Proben 11365, 11369 und 11370 gut erkennbar. Zusätzlich zur wt-Bande erscheint noch eine kleinere Bande in der Höhe von ~5,5 kb. Die SASH1^{3loxP}-Allel-Bande sollte dagegen eine errechnete Größe von 4,7 kb besitzen. Da die Bande bei 5,5 kb auch in der Spur der Negativkon-

trolle (E14(wt)-Zell-DNA) sichtbar ist, kann es sich nicht um das SASH1^{3loxP}-Allel handeln. Die Bande ist somit als unspezifisch zu werten.

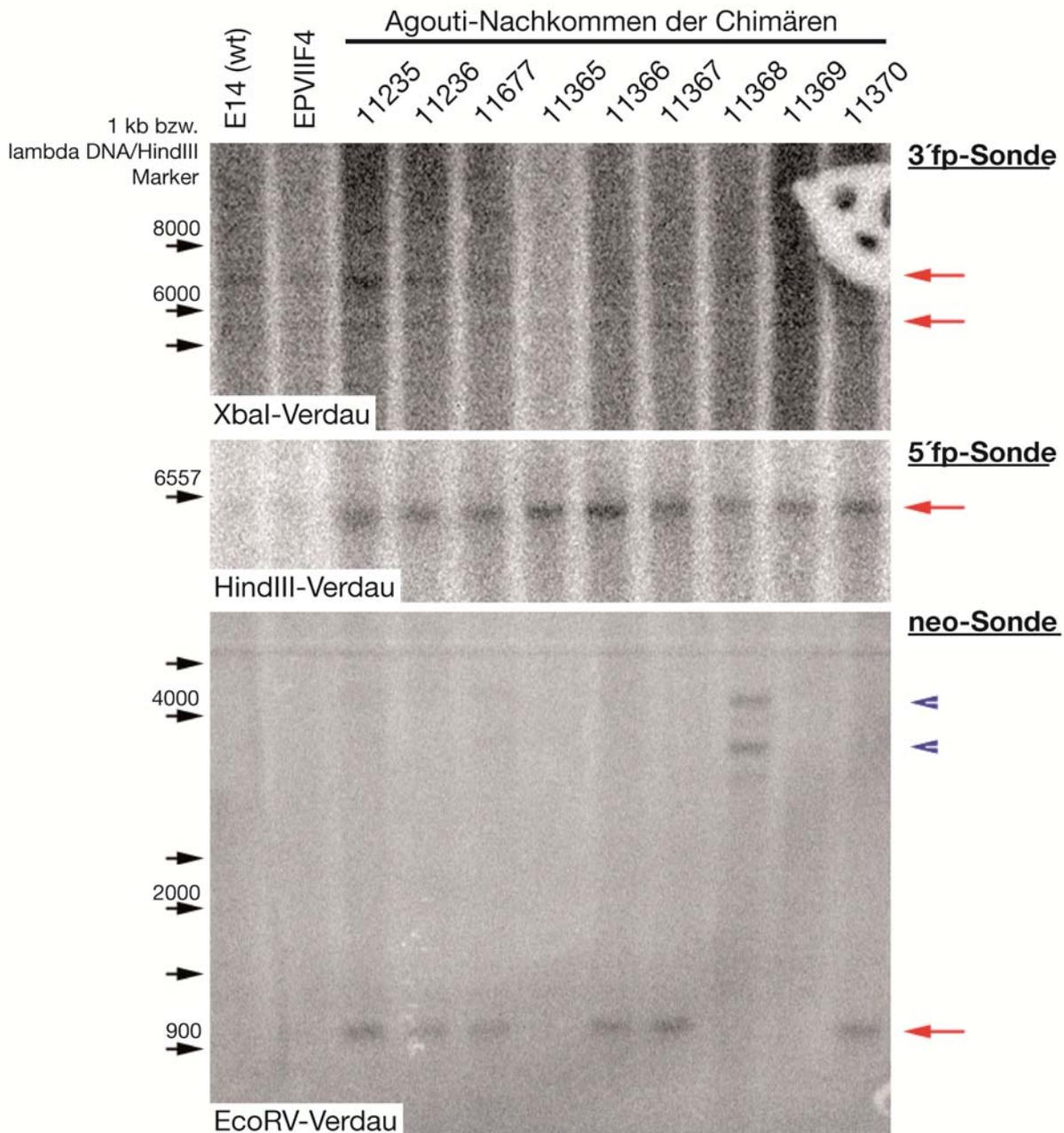


Abb. 40 Southern Blot Analyse der Agouti-Nachkommen der SASH1^{3loxP}-Chimären.

Die Ergebnisse aller drei verwendeten Sonden sind in den einzelnen Blots aufgezeigt. Getestet wurden unterschiedliche Mausschwanz-DNA-Proben sowie als Positiv- und Negativkontrolle aufgetragene DNA des ES-Zellklons EPV1IF4 und DNA der E14(wt)-Zellen. Die 3'fp-Sonde detektiert die wt-Bande und ein kleineres Fragment von 5,5 kb. Die Größe stimmt jedoch nicht mit der erwarteten Größe des SASH1^{3loxP}-Allels überein. Durch den Einsatz der 5'fp-Sonde wird nur die wt-Bande bei 5,4 kb nachgewiesen. Die neo^R-Sonde erkennt neben der neo^R-Kassette auch vermutlich unspezifische Banden (blaue Pfeilspitzen).

Bei der Southern Blot-Analyse mit der 5'fp-Sonde konnte nur die wt-Bande mit 5,4 kb detektiert werden. Die bei 4 kb erwartete SASH1^{3loxP}-Allel-Bande war nicht vorhanden. Die Analyse mit der neo^R-Sonde ergab die erwartete Größe des Neomycinresistenz-Kassettenfragments von ~1,6 kb. In einigen Proben erschienen zusätzlich größere Banden bei ca. 3,5 kb und 4,5 kb. Da die Restriktionsstellen innerhalb der neo^R-Kassette liegen, können diese kein Indiz für eine mehrfache

Integration des Vektors in das Genom sein und sind deshalb ebenfalls als unspezifische Bindungen zu werten.

Die Ergebnisse der Southern Blot-Analyse legen eine nicht ortsspezifische Integration des Vektors nahe. Der als Positivkontrolle immer mitanalysierte Klon EPVIF4 zeigt in Abb. 40 im neo^R-Sonden-Blot kein Signal. Dies liegt vermutlich an zuwenig aufgetragener DNA, da die Mausschwanz-DNA von Mäusen, welche aus diesem ES-Klon hervorgingen, die Neomycinresistenz-Kassette eindeutig aufweisen. Allerdings kann es auch ein Indiz für einen Mischklon sein, welcher mit wt-ES-Zellen verunreinigt wurde. Dies würde ebenfalls in einer zu geringen Konzentration an neo^R-positiver DNA resultieren.

Auch die Genotypisierung der Chimären-Nachkommen aus unterschiedlichen Verpaarungsansätzen weist auf eine unspezifische Integration des Vektors hin. Die Genotypisierungen erfolgten mittels PCR zum Nachweis der Neomycinresistenz-Kassette. Die durch den Einsatz der neo^R-Sonde in der Southern Blot-Analyse identifizierten Nachkommen wurden untereinander und mit C57Bl/6-Mäusen verpaart. Die Ergebnisse der Genotypisierungen sind in Tab. 12 aufgelistet. In Verpaarungen von neo^R-heterozygoten SASH1^{3loxP}-(neo/wt) und C57Bl/6 (wt/wt)-Mäusen kommt es zu einer nach den Mendelschen Regeln korrekten Weitergabe des SASH1^{3loxP}-Allels. Die neo^R-Sonde wird an die Nachkommen weitergegeben (Tab. 12, Spalte I). Der Nachwuchs aus Verpaarungen heterozygoter Tiere untereinander (neo/wt x neo/wt) konnte nur als wt- oder als heterozygoter neo^R-Genotyp identifiziert werden (Tab. 12, Spalte II). Alle in der PCR neo^R-positiven Tiere waren auch in der wt-PCR positiv. Hätte der Vektor in der korrekten Region homolog in das Genom rekombiniert, müssten durch die Primer-Kombinationen auch homozygote neo^R-positive SASH1^{3loxP}-(neo/neo) Mäuse (erwartete Anzahl n≈19) identifizierbar sein. Dies ist jedoch nicht der Fall. Alle Tiere besitzen mindestens ein wt-SASH1-Allel.

Zur Kontrolle der Integration der loxP-Stellen wurden Verpaarungen von SASH1^{3loxP}-Tieren mit Deleter-Cre-Mäusen angesetzt. Die Deleter-Cre-Mäuse (Cre/wt) exprimieren die Cre-Rekombinase ubiquitär. Deren Aktivität sollte in den Nachkommen die Deletion der Neomycinresistenz-Kassette aufgrund der flankierenden loxP-Stellen zur Folge haben. Wie sich herausstellte, gab es wie erwartet bei den Nachkommen keine Kombination des Cre- und neo^R-positiven Genotyps (Tab. 12, Spalte III). Von den Nachkommen (n=29) sollten mindestens 25 % die Neomycinresistenz-Kassette durch die Expression der Cre-Rekombinase deletiert haben. Da es womöglich zu einer nicht-ortsspezifischen Integration des Vektors kam, können diese Nachkommen (Cre/Δneo) nur durch das Fehlen der Neomycin-Resistenzkassette, nicht aber durch eine spezifische PCR für das KO-Allel nachgewiesen werden. Diese möglichen Cre/Δneo-Nachkommen lassen sich daher nicht von den Nachkommen unterscheiden, und fließen in deren Anzahl mit ein. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Neomycinresistenz-Kassette deletiert werden kann, was für zwei funktionsfähige flankierende loxP-Stellen spricht. Die daraus resultierende genomische DNA-Sequenz stimmt jedoch vermutlich nicht mit der vorhergesagten Sequenz überein.

Ohne die genaue Region der Integration des Targetvektors zu kennen, ist es nicht möglich, homozygote neo^R-positive SASH1^{3loxP}-Mäuse mittels PCR zu identifizieren. Zur Identifikation homozygoter neo^R-positiver Tiere kann allerdings die Verpaarung mit wt-C57Bl/6-Mäusen herangezogen werden. Hierbei sollte der gesamte F1 Nachwuchs eines homozygoten Tieres das neo^R-positive Allel aufweisen.

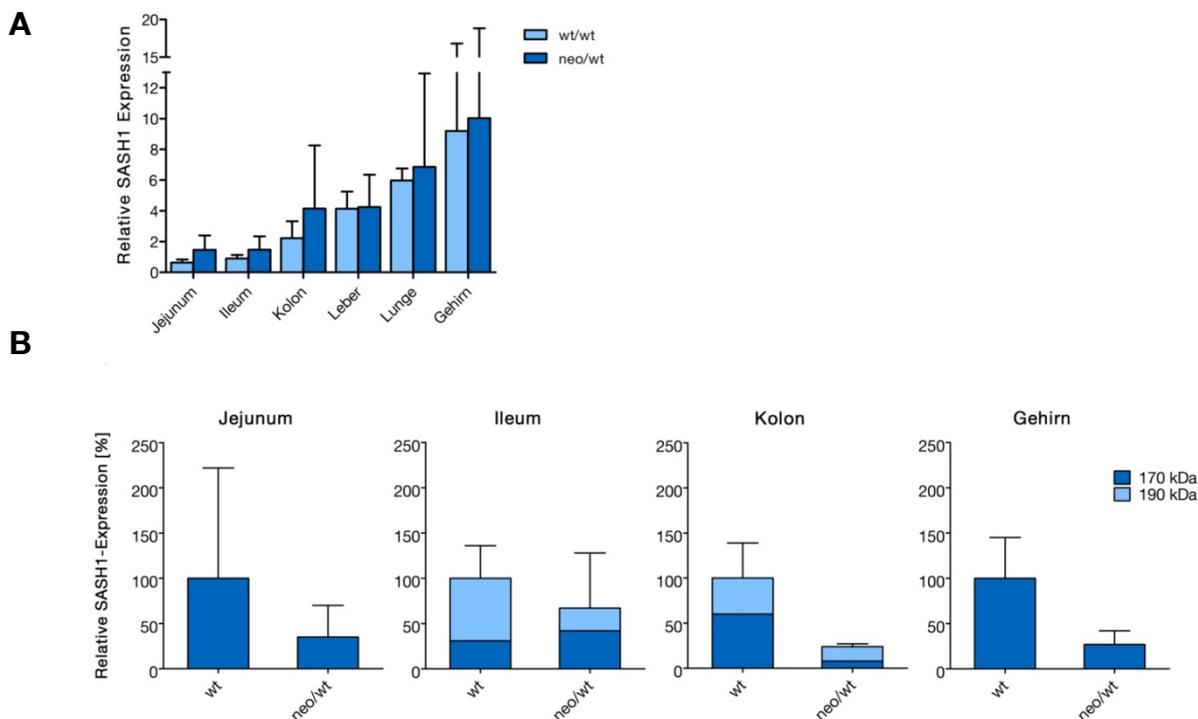
Tab. 12 Auflistung der Genotypen aus Verpaarungen der neo^R-positiven Chimären-Nachkommen.

Genotyp	I		II		III	
	neo/wt x wt/wt	MR	neo/wt x neo/wt	MR	neo/wt x Cre/wt	MR
wt/wt	7	6	17	19,25	8	7,25
neo/wt	5	6	60	38,5	11	7,25
Cre/ Δ neo	-	-	-	-	0	7,25
Cre/wt	-	-	-	-	10	7,25
Cre/neo	-	-	-	-	-	-
neo/neo	-	-	0	19,25	-	-
Total	12		77		29	

Die Tiere wurden anhand der Neomycinresistenz-Kassette mittels PCR typisiert. Tiere, die ein neo^R-positives Allel besitzen, wurden mit C57Bl/6-Mäusen verpaart (Spalte I). Die Genotypen der Nachkommen aus Verpaarungen neo^R-positiver Tiere untereinander sind in Spalte II dargestellt. In Spalte III sind die Tiere aus Verpaarungen neo^R-positiver Mäuse mit Deleter-Cre-Mäusen aufgelistet. Bei allen Verpaarungen ist die Anzahl der möglichen Genotypen angegeben, die nach den Mendelschen Regeln hätten auftreten müssen (MR).

5.8.5 Charakterisierung des Phänotyps des SASH1^{3loxP/wt} Mausstammes

Um mögliche Auswirkungen der in das Mausgenom integrierten Neomycinresistenz-Kassette (inklusive integrierter E14/E15-homologer Vektorsequenz) auf die Expression von SASH1 zu untersuchen, wurden Proteinlysate und mRNA von heterozygoten neo^R-positiven Mäusen gewonnen und im Western Blot bzw. mittels qRT-PCR auf die SASH1-Expression hin analysiert.

Abb. 41 Quantifizierung der SASH1-Expression in heterozygoten neo^R-positiven SASH1^{3loxP}-Mäusen.

A Die SASH1-Expression wurde mittels qRT-PCR relativ zu der Expression von SASH1 im Gewebe des Jejunums von C57Bl/6-wt-Mäusen normalisiert (MW \pm SD, n=3). **B** Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte relativ zu der Tubulin-Expression im Gewebe (MW \pm SD, n=3).

Die Analyse erfolgte durch die Quantifizierung der SASH1-Expression von jeweils drei heterozygoten SASH1^{3loxP}-Mäusen (neo/wt) und deren wt-Wurfgeschwister (wt/wt). Auf mRNA-Ebene wurde keine signifikante Veränderung der Expression von SASH1 in den untersuchten Geweben beobachtet (Abb. 41A). Die Expression wurde relativ zu der SASH1-Expression im Jejunum von C57Bl/6-wt-Mäusen normalisiert.

Die Protein-Analyse zeigt ein etwas anderes Bild (Abb. 41B). Bei der Proteinexpression von SASH1 wurden jeweils die 170 kDa-, und falls vorhanden, die 190 kDa-Banden der Gewebe Jejunum, Ileum, Kolon und Gehirn quantifiziert. Die integrierte Neomycinresistenz-Kassette scheint die Expression von SASH1 im Gehirn und Kolon zu beeinträchtigen. Es kommt zu einer Herabregulation der Expression, die allerdings nicht das Signifikanzniveau erreicht.

6 Diskussion

Die Tumorgenese des Kolorektalkarzinoms ist ein mehrstufiger Prozess, in dessen Verlauf es zu einer Anhäufung von genetischen und epigenetischen Mutationen in der Zelle kommt. Diese Mutationen führen zu einer Tumorinitiation, und resultieren schließlich in einer weiteren Tumorprogression und -proliferation. Zahlreiche Gene wurden bereits identifiziert, die das Fortschreiten der Tumorgenese beeinflussen. So können Mutationen und ein daraus resultierender Funktionsverlust in den Tumorsuppressorgenen *APC*, *p53* und *smad2* zur Initiation bzw. Metastasierung eines Tumors führen (Fre et al., 2009). Im Kolorektalkarzinom bildet der Funktionsverlust von *APC* für gewöhnlich den initiierenden Schritt der Tumorgenese. Bei einer vererbaren Form des Kolorektalkarzinoms, der sogenannten familiären adenomatösen Polyposis, triggert eine hereditär erworbene Mutation im *APC*-Gen zusammen mit einem LOH des *APC*-Lokus die Tumorentstehung. Eine mutationsbedingte Überaktivierung des Onkogens *K-Ras* im Kolonkarzinom führt dagegen meist in einer Aufhebung von Wachstums- und Differenzierungsregulatoren, die die Tumorprogression vorantreibt.

Das neuartige Tumorsuppressorgen *SASH1* zeigt eine deutliche Herunterregulation in Mammakarzinomen und Brustkrebszelllinien (Zeller et al., 2003). Im Kolorektalkarzinom kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Herunterregulation von *SASH1* (Rimkus et al., 2006). Diese erniedrigte *SASH1*-Expression korreliert in beiden Tumorvarianten mit einem schlechten Patientenüberleben, weshalb *SASH1* als ein unabhängiger negativer Prognosefaktor definiert wurde (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003).

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte eine genauere Charakterisierung von *SASH1* vorgenommen werden und seine Rolle bei der Tumorgenese spezifiziert werden.

6.1 Herstellung *SASH1*-spezifischer Hilfsmittel

6.1.1 Antiserum-Generierung zum Nachweis von endogenem *SASH1*

SASH1 ist ein Mitglied der SLY-Adapterprotein-Familie (Rimkus et al., 2006). Die Funktionen der einzelnen Mitglieder sind noch weitestgehend unbekannt und nicht beschrieben. Die Frage nach der physiologischen Rolle von *SASH1* blieb bislang unbeantwortet. Um die Klärung der *SASH1*-Funktion im Rahmen dieser Arbeit voranzutreiben, mussten die nötigen experimentellen Hilfsmittel und Werkzeuge generiert werden. Der einzig kommerziell erhältliche anti-*SASH1*-Antikörper der Firma Novus (Littleton, USA) wurde im Rahmen dieser Arbeit und von kooperierenden Arbeitsgruppen getestet, weist jedoch *SASH1*-unspezifische Signale im Western Blot und in der Immunfluoreszenz auf. Aufgrund dessen stand die Generierung und Charakterisierung eines Antiserums gegen definierte Epitope des *SASH1*-Proteins zu Beginn der Arbeit im Vordergrund. Für die Immunisierung von Kaninchen dienten als Immunogene synthetisch hergestellte Peptide

aus der C- bzw. N-terminalen SASH1-Aminosäuresequenz (www.ensembl.org). Die Epitopanalyse von SASH1 zur Ermittlung der geeigneten Peptidsequenzen zur Antikörpergewinnung wurde von der Firma Pineda (Berlin) durchgeführt. Bei der Epitopauswahl wurde auf eine vorhergesagte Oberflächennähe und auf eine einzigartige, für SASH1 spezifische Sequenzabfolge geachtet. Außerdem wurde die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität möglichst gering gehalten, indem die Epitopwahl auf Regionen fiel, welche innerhalb der in SLY1 und Samsn1 nicht vorhandenen, N- bzw. C-terminal gelegenen Sequenzen von SASH1 liegen. Eine Immunisierung gegen das Gesamtprotein hätte eine Fülle an Epitopen bei der Antikörpergenerierung zur Folge, was möglicherweise in einer Kreuzreaktivität mit den weiteren Mitgliedern der SLY-Adapterproteinfamilie resultieren würde, da diesen die zentrale Region gemein ist (10.1.4).

Für die Qualität des Antiserums sind, neben der Epitopwahl, das Immunisierungsprotokoll, aber auch die Epitop-Präsentation sowie das individuelle Versuchstier von Bedeutung. So kann die unter gleichen Bedingungen durchgeführte Immunisierung gleicher Tiergruppen zu einer völlig unterschiedlichen Antiseren-Spezifität führen. Die Variable „individuelles Versuchstier“ kann nicht beeinflusst werden, weshalb jeweils zwei Tiere bei den jeweiligen Immunisierungsansätzen eingesetzt wurden. Trotz identischer Immunisierungsprotokolle und einer identisch ablaufenden Affinitätsreinigung bestanden zwischen den aus unterschiedlichen Kaninchen gewonnenen Seren qualitative und quantitative Unterschiede. Die Antiseren wurden mit Hilfe des Peptidepitop-Gemischs affinitätschromatographisch aufgereinigt, um falsch-positive Ergebnisse durch die in den Immunseren vorkommenden, unspezifischen Antikörper auszuschließen. Im Western Blot erkennt das Antiserum 1540 neben den rekombinanten SASH1-Konstrukten, FL-V5-SASH1 und Δ Cter-SASH1, eine endogene SASH1-Bande mit einer Laufgröße von ~170 kDa. Das aus einem zweiten Kaninchen gewonnene Antiserum 1542 verliert nach der Affinitätsreinigung dagegen die Fähigkeit, die p170-Bande zu erkennen. Die vorhergesagte Größe des SASH1-Proteins liegt allerdings nur bei ~146 kDa (www.ensembl.de). Da das rekombinante V5-FL-SASH1 allerdings ebenfalls eine Laufgröße von 170 kDa aufweist, kann die p170-Bande des Antiserums trotz des Größenunterschieds von ~30 kDa einem vollständigen Transkript von SASH1 zugewiesen werden. Eine Erklärung für das unterschiedliche Laufverhalten im SDS-PAGE zwischen der apparenten und der vorhergesagten Bandengröße bieten die Aminosäuren-Zusammensetzung, mögliche SDS-stabile Sekundärstrukturen, aber auch posttranslationale Modifikationen. Zusätzlich zur p170-Bande nachgewiesene Banden (vorwiegend p110, p130 und p55) müssen aufgrund der Ergebnisse in der zur Sicherung der Spezifität durchgeführten Peptidblockade ebenfalls als potentiell SASH1- bzw. als Epitop-spezifisch gewertet werden, da bei der Epitopauswahl mittels BLAST mögliche Kreuzreaktivitäten ausgeschlossen wurden. Welche Formen von SASH1 hierbei jedoch erkannt werden, bleibt vorerst spekulativ. Die Frage könnte jedoch mit der Durchführung einer Northern Blot-Analyse beantwortet werden. Die Datenbank www.ensembl.org liefert für humanes SASH1 vier mögliche Transkripte, drei davon mit einer geringen Größe von <10 kDa (49-84 AS), welche nicht den zwei von Zeller et al. beschriebenen Vollängen-Transkripten von SASH1, welche sich in der Länge des Poly-A-Schwanzes unterscheiden, entsprechen (Zeller et al., 2003). Für das murine SASH1 ist bisher nur ein Transkript beschrieben worden (www.ensembl.org). Es kann sich bei den zusätzlichen Banden sowohl um Spleißvarianten als auch um Abbauprodukte von SASH1 handeln. Posttranslationale Modifikationen des Proteins, wie etwa Phosphorylierungen von Serin-/Threonin- und Tyrosinresten (Cantin et al., 2008; Chen et al., 2009; Dephore et al., 2008; Olsen et al., 2006; Trinidad et al., 2008; Tsai et al., 2008) sind ebenfalls in Erwägung zu ziehen, müssten jedoch noch experimentell bestätigt werden. Im Anhang sind die vorausgesagten Phosphorylierungsstellen von SASH1 rot markiert (10.1.5). Eine

SASH1-Phosphorylierung könnte eine mögliche Erklärung für die Proteinbanden mit geringerer elektrophoretischer Mobilität sein, welche in den Gewebelysaten des Intestinaltraktes auftreten. Durch die Einführung von zweifach negativ geladenen Phosphatgruppen erfährt das Protein eine Ladungsänderung, welche die Proteinfaltung, die Konformationsdynamik sowie die Protein-Protein und Protein-Liganden-Interaktionen beeinflussen kann.

Bei den Überlegungen bezüglich posttranslationaler Modifikationen bildet die sogenannte Sumoylierung (small ubiquitin-related modifier) eine interessante Möglichkeit. Die Modifikation von SAM-Domänen mit den ca. 12 kDa großen Ubiquitin-ähnlichen SUMO-Einheiten wurde wiederholt in anderen Proteinen beschrieben (Chakrabarti et al., 1999; Chakrabarti et al., 2000; Zhang et al., 2004a) und wäre eine Erklärung für die Größenverschiebung von SASH1 im Immunoblot. Die kovalente Bindung von SUMO-Einheiten an Lysinreste bestimmter Proteine (Mahajan et al., 1997) führt im Gegensatz zu Ubiquitin nicht zu einem Proteinabbau, sondern primär zu einer Modifizierung der Substrat-Aktivität in diversen biologischen Prozessen. Die Mehrheit der SUMO-Substrate zählt zu den Kernproteinen wie etwa Transkriptionsfaktoren und ihre Ko-Regulatoren. Ihre Sumoylierung führt vorwiegend zu einer Verstärkung bzw. Inhibition ihrer Funktion (Gill, 2005; Hay, 2006; Verger et al., 2003). In letzter Zeit wurde jedoch auch eine zunehmende Zahl an nicht-nukleären Proteinen von SUMO-Substraten entdeckt. Bei den meisten handelt es sich hierbei um Signaltransduktionsproteine, bei welchen die Sumoylierung deren Aktivität, die Stabilität oder ihre subzelluläre Verteilung verändert (Zhao, 2007).

Posttranslationale Modifikationen wie etwa die Sumoylierung, welche in der Region der Epitope oder in epitopnahen Bereichen liegen, können ein Grund dafür sein, dass das Antiserum 1540 SASH1 nicht immunpräzipitiert. Diese könnten die Antikörperbindung sterisch beeinträchtigen. In der Western Blot- bzw. Immunfluoreszenz-Analyse kommt es zu keiner sterischen Behinderung, da das Protein denaturiert oder chemisch modifiziert wird und nicht in der nativen Form vorliegt; so kann die Zugänglichkeit des im nativen Zustand möglicherweise nicht freigelegten Epitops positiv beeinflusst werden. Modifikationen bzw. Demaskierung ermöglichen somit erst die Antikörperbindung an das Protein.

Die Generierung eines Antiserums gegen C-terminal gelegene Epitope von SASH1 führte zu keinem funktionsfähigen, endogenes SASH1 erkennenden Antiserum. Dies kann auf die Wahl der Tiere zurückgeführt werden, möglicherweise wird SASH1 jedoch auch in den Regionen der am C-Terminus liegenden Epitope posttranslational modifiziert. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die gewählten Epitope aufgrund der Proteinfaltung nicht Oberflächen-exponiert liegen, oder durch proteolytischen Abbau verloren gehen.

Während das Antiserum gegen C-terminal gelegene Epitope keine SASH1-spezifische Funktionalität aufwies, zeigte das am Max Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) generierte Antiserum 1540 gegen N-terminal gelegene Epitope eine SASH1-spezifische Funktionalität im Western Blot, der Immunfluoreszenz sowie in der Immunhistochemie. Es ist nunmehr erstmals möglich, die subzelluläre Lokalisation von endogenem SASH1 in Zelllinien und in Geweben, sowie die Expression von SASH1 auf Proteinebene zu untersuchen.

6.1.2 Generierung eines gewebespezifischen SASH1^{KO}-Mausstammes

Um die physiologische Rolle von SASH1 *in vivo* zu untersuchen, sollte ein SASH1-spezifisches „knock-out“-Modell in der Maus etabliert werden. Aufgrund von Expressionsanalysen, welche auf eine besonders starke SASH1-Expression im Gehirn hinweisen, wurde die Generierung eines SASH1^{KO}-Mausstammes, welcher einen gewebe- bzw. zelltypspezifischen Funktionsverlust von

SASH1 ermöglicht, einem globalen „knock-out“ vorgezogen. Ein globaler Verlust von SASH1 in frühen Entwicklungsstadien würde möglicherweise letal wirken.

Für die Generierung eines SASH1^{ΔE14/15}-Mausstammes wurde durch Daniela Mayr (aus unserer Arbeitsgruppe) im Vorfeld ein Targetvektor kloniert, welcher durch homologe Rekombination in den *SASH1*-Lokus des Mausgenoms eingebracht werden sollte. Die Strategie des SASH1-„knock-out“-Vektors beruht auf dem Cre/loxP-System. Der Targetvektor trägt drei loxP-Stellen, welche den DNA-Abschnitt um die Exone 14 und 15 sowie die für die positive Selektion notwendige Neomycinresistenz-Kassette flankieren. Die Neomycinresistenz-Kassette sollte nach erfolgreicher homologer Rekombination durch die Einschleusung eines Cre-Expressionsplasmids *in vitro* deletiert werden, bevor die embryonalen Stammzellen in Blastozysten injiziert werden. So sollte eine mögliche unerwünschte Beeinträchtigung der SASH1-Expression durch das Einbringen der im Vektor enthaltenen Neomycinresistenz-Kassette in das Genom verhindert werden. Bei der Festlegung der Vektorstrategie fiel die Wahl der zu deletierenden Region auf die kodierenden Bereiche der Exons 14 und 15. Da es sich bei *SASH1* um ein Gen mit 20 Exons handelt, welche von großen Intronabschnitten unterbrochen sind, war die Auswahl der möglichen, zu deletierenden Regionen aus Klonierungsgründen beschränkt. Auf den Exonen 14 und 15 liegen die kodierenden Regionen für die SH3-Domäne und für einen Teil der ersten SAM-Domäne und somit für die potentiellen funktionalen Regionen von SASH1. Die durch eine Cre-vermittelte Exzision der Exone 14 und 15 auftretende Verschiebung des Leserasters („frame shift“) würde zusätzlich zu einem Abbruch der Transkription führen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der rekombinierte Bereich herausgespleißt wird und so eine verkürzte Form von SASH1 unbekannter Funktion entsteht.

Die homologe Rekombination trat nur mit einer äußerst geringen Frequenz auf. Die absolute Frequenz ist von der Chromatinstruktur und von der Zugänglichkeit des Locus abhängig (Muller, 1999). So kam es bei der Durchführung der Elektroporation und der anschließenden Selektion zu einer geringen Zahl an homolog rekombinierten Stammzellklonen. Obwohl Expressionsanalysen (qRT-PCR) zeigten, dass eine SASH1-Transkription in murinen embryonalen Stammzellen stattfindet und der Locus somit nicht in einer kondensierten, inaktiven DNA-Struktur vorliegt, ist der *SASH1*-Lokus vermutlich schlecht zugänglich. Bei der Analyse der Klone konnte nur ein positiver Klon (EPV1IF4) identifiziert werden, welcher einen korrekten Vektor/Genom-Übergang am 3'-Ende des integrierten Targetvektors aufwies. Weitere durchgeführte Elektroporationen ergaben keine weiteren positiven Stammzellklone. Der darauffolgende Schritt der Deletion der Neomycinresistenz-Kassette *in vitro* wurde zugunsten einer bestmöglichen Keimbahnfähigkeit des Klons verworfen. Die Lage der Neomycinresistenz-Kassette war in der Klonierungsstrategie so gewählt, dass der Einbau der Kassette innerhalb eines Introns stattfindet, um möglichst zu keiner Beeinflussung der Expression zu führen. In vorangegangenen Mausstamm-Generierungen zeigte die durch Elektroporation eingeführte Cre-Rekombinase eine hohe Effizienz bei der loxP-vermittelten Deletion. Es kam nicht, wie theoretisch vorhergesagt, zu mehreren Produkten nach der Einführung des Plasmids in die Zellen, sondern nur zu einem einzigen Produkt, der Deletion des kompletten Vektors durch die Fusion der jeweils endständigen 5'/3'-loxP-Stellen (Gais, 2007). Die Blastozysteninjektion des Klons EPV1IF4 wurde nach der Bestätigung der PCR durch eine Sequenzanalyse ohne die Deletion der Neomycinresistenz-Kassette durchgeführt. Eine aus der Blastozysteninjektion hervorgehende Chimäre brachte nach der Verpaarung mit einem C57Bl/6-Tier agouti-farbenen Nachwuchs hervor, welcher mittels Southern Blot-Analyse und PCR-Genotypisierung auf die Integration der Neomycinresistenz-Kassette in das Genom hin untersucht wurde. Mehrere Tiere wiesen die Neomycinresistenz-Kassette auf, was eine Keimbahnüber-

tragung belegt. Eine Southern Blot-Analyse der 5'- und 3'-Übergänge des integrierten Targetvektors in das Genom ergaben jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Mit der am 5'-Übergang liegenden Sonde konnte nur der Nachweis des wt-Allels erbracht werden. Die Southern Blot-Analyse der Mausschwanz-DNA mit der 3'-Sonde ergab neben der Bande des wt-Allels noch eine zweite, kleinere Bande, welche jedoch in allen, auch in Neomycinresistenz-Kassetten (neo^R)-negativen Tieren erkennbar war und nicht der Größe des erwarteten KO-Allels entsprach.

Auch homozygoter, die neo^R -Kassette aufweisender Nachwuchs aus heterozygoten Verpaarungen konnte mittels PCR und Southern Blot nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass homozygote Tiere bereits pränatal sterben und somit die Homozygotie der integrierten Neomycinresistenz-Kassette für die Embryonen letal ist. Unsere Beobachtungen bei der Geburtenrate und bei der Genotypisierung des Nachwuchses sprechen allerdings gegen diese Annahme. Die Anzahl der neo^R -positiven Jungtiere lässt darauf schließen, dass neo^R -homozygote Tiere in die Gruppe der als heterozygot genotypisierten Tiere mit eingeflossen sind (Tab. 12). Eine hierfür griffige Erklärung wäre ein nicht ortsspezifischer Einbau des Vektors. Da die Genotypisierungen mittels PCR mit Primern ausgeführt wurden, die eine korrekt abgelaufene homologe Rekombination und Integration des Vektors voraussetzen, erhält man bei einer zufälligen Integration des Vektors in die genomische DNA bei der PCR-Analyse immer ein wt-positives Ergebnis, da der endogene SASH1-Lokus unverändert bleibt. Die nicht-ortsspezifische Integration des ersten Vektors gilt als gesichert. Die Verpaarungen neo^R -positiver Tiere mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Tieren führten zu einer Deletion der Neomycinresistenz-Kassette im Genom des Nachwuchses. So kam es bei der homologen Rekombination des Vektors mindestens zur Integration der kompletten Neomycinresistenz-Kassette zusammen mit den zwei die Kassette flankierenden loxP-Stellen. Da die genaue Lage der Vektorintegration unbeantwortet bleibt, können keine geeigneten Primer bzw. Sonden für die Analyse generiert werden. Die homozygoten, neo^R -positiven Tiere sind mittels PCR nicht eindeutig zu genotypisieren. Die Unterscheidung zwischen hetero- und homozygoten Tieren müsste durch eine Quantifizierung der Neomycin Phosphotransferase-Expression erfolgen. Nach der Identifizierung der homozygoten Tiere könnte eine Sequenzanalyse der flankierenden genomischen Sequenz der Neomycinresistenz-Kassette in 5'- und 3'-Richtung Aufschluss bezüglich der Vektorintegration geben. Die Region der Vektorintegration könnte durch einen Sequenz-Vergleich charakterisiert werden.

Eine Verunreinigung des Klones durch einen zweiten Klon mit unspezifischer Integration der Neomycinresistenz-Kassette kann ebenfalls als Erklärung der neo^R -positiven, jedoch nicht auf homologe Rekombination genotypisierbaren Tiere angeführt werden. Bei der Applikation eines Mischklones bei der Blastozysteninjektion wäre es somit zur Integration des falsch-positiven Klons gekommen. Daraus hervorgehende Tiere würden in der Southern Blot Analyse jedoch die Neomycinresistenz-Kassette aufweisen.

Aufgrund der äußerst geringen Frequenz der homologen Rekombination wurden die Elektroporationen mit dem Vektor SASH1 $\Delta E14/15$ eingestellt und eine neue Vektorstrategie ausgearbeitet. Die Klonierung des zweiten Vektors greift neben dem Cre/loxP-System auf ein zweites Rekombinationssystem zurück, das sogenannte Flp/FRT-System. Hierbei wirken anstelle der loxP-Stellen Flippase-Erkennungssequenzen (FRT), welche von dem Enzym Flippase erkannt werden und entsprechend dem Cre/loxP-System deletiert bzw. invertiert werden können. Durch die Kombination beider Systeme wird eine *in vitro*-Behandlung der Stammzellen mit einem Cre-Expressionsplasmid unnötig; diese beeinträchtigt u.U. die Keimbahnfähigkeit und ist deshalb zu

vermeiden. Transgene Mäuse, welche ein *Flippase*-Gen besitzen, kommen bei der Deletion der Neomycinresistenz-Kassette *in vivo* zum Einsatz. Die Neomycinresistenz-Kassette, welche von den FRT-Stellen flankiert wird, kann deletiert werden, die Exone sind von loxP-Stellen flankiert und bleiben unbehelligt. Bei der zweiten Vektorstrategie wurde die Region der homologen Rekombination ebenfalls verändert. Dies könnte eventuell Einfluss auf die Integrationsfähigkeit des Vektors haben. Hierbei wird nun durch den Einsatz von Cre-Rekombinase-exprimierenden Tieren die Deletion des von zwei loxP-Stellen flankierten Exons 5 und eine daraus resultierende Verschiebung des Leserasters bewirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Elektroporation des zweiten Vektors begonnen.

6.1.2.1 Analyse des $SASH1^{wt/neo}$ -Mausstammes

Geht man davon aus, dass es zu einer ortsspezifischen homologen Rekombination des Vektors in den *SASH1*-Lokus kommt, kann die Integration der Neomycinresistenz-Kassette trotz ihrer Lage innerhalb eines Introns im Mausgenom zur Beeinträchtigung des Genexpressionsmusters führen. Die Ergebnisse der Southern Blot Analyse widersprechen allerdings der Annahme einer korrekten Integration (Abb. 40). Ob die Integration teilweise innerhalb der Region des *SASH1*-Lokus stattfand, sollte durch eine mögliche Beeinflussung der *SASH1*-Expression durch den Einbau der Neomycinresistenz-Kassette analysiert werden. Unterschiedliche Studien zeigen einen negativen Effekt der Insertion von bakterieller DNA in das Säuger-genom auf die Expression. So kann es zu einer Behinderung aufgrund von veränderter RNA-Spleißung kommen (Holzenberger et al., 2000). Das Genprodukt verliert auf Translationsebene seine Funktion. Ein sogenanntes hypomorphes Allel ist das Resultat der Bildung einer RNA-Spleißvariante aufgrund verborgener RNA-Spleißregionen innerhalb der Neomycinresistenz-Kassette. Da diese neo^R -abhängige Spleißung nicht spezifisch auf ein Gen, Entwicklungsstadium oder Gewebe beschränkt ist (Jacks et al., 1994; Nagy et al., 1998), könnte sie auch in den $SASH1^{neo/wt}$ -Mäusen zu der Ausbildung eines hypomorphen Allels führen. Der Einbau der Neomycinresistenz-Kassette kann, geschieht er innerhalb eines „Genclusters“ oder einer Lokus-Kontrollregion, zu einem Positionseffekt auf benachbarte Gene führen (Firing et al., 1995). Es kommt zu einem veränderten Expressionsmuster der umliegenden Gene, was zu einem nicht-*SASH1*-abhängigen Phänotyp führen kann.

Die Analyse der *SASH1*-Expression auf RNA-Ebene ergab jedoch keine erkennbaren Veränderungen der *SASH1*-Menge in den heterozygoten $SASH1^{wt/neo}$ -Mäusen. Auf Proteinebene liegt eine leicht verminderte *SASH1*-Expression in den Geweben des Kolons und des Gehirns vor. Die Herabregulation von *SASH1* ist jedoch in keinem der untersuchten Gewebe signifikant und resultiert in keinem erkennbaren Phänotyp.

6.1.2.2 Ausblick I

Die Ergebnisse der $SASH^{KO}$ -Mausstamm-Analyse führen zu der Schlussfolgerung, dass ein Mischklon bei der Blastozysteninjektion verwendet wurde. Durch eine Vereinzelung der ES-Zellen könnte eine mögliche Rückgewinnung des Klons erfolgen, bei welchem eine korrekte homologe Rekombination stattgefunden hat. Da in dem hier generierten Mausstamm eine nicht-ortsspezifische Integration des Targetvektors vorliegt, ist das Ziel nunmehr, den zweiten, bereits klonierten Targetvektor in ES-Zellen einzuführen, um so eine homologe Rekombination innerhalb des *SASH1*-Lokus zu erzielen. Die Generierung eines KO-Mausstammes ist für die Identifikation der physiologischen Rolle von *SASH1* und eine genauere Charakterisierung seiner Rolle innerhalb der Tumorgenese essentiell.

Da die Rolle von SASH1 in der Kolorektalkarzinogenese untersucht werden soll, wäre ein darmspezifischer „knock-out“ von SASH1 von Interesse. Hierfür stehen unterschiedliche transgene Mausstämme zur Verfügung, welche eine darmspezifische Cre-Expression besitzen (Madison et al., 2002; Pinto et al., 1999). In dem von der Gruppe von Sylvie Robine (Institut Curie, Paris, Frankreich) generierten Cre-System wurde die Expression der Cre-Rekombinase unter die Kontrolle einer regulatorischen Promotor-Region (~9 Kb) des murinen Villin-Gens gestellt (el Marjou et al., 2004). Das *Villin*-Gen kodiert für ein Aktin-bindendes Protein, welches als ein spezifischer Marker von epithelialen Zellen im Gastro- und Urogenitaltrakt wirkt. Nur dort ist sein Promotor aktiv (el Marjou et al., 2004; Meng et al., 2005). In den intestinalen Epithelzellen ist Villin an der strukturellen Organisation der F-Aktin-reichen Mikrovilli im „Bürstensaum“ beteiligt. Eine Erweiterung dieses Mausmodells ist die induzierbare Cre-Expression im Darmtrakt. Bei der sogenannten pVill-Cre-ERT²-Maus steht die Expression der Cre-Rekombinase ebenfalls unter der Kontrolle eines Villin-Promotors. Die Cre-Rekombinase ist jedoch zusätzlich an eine mutierte Liganden-Bindedomäne des humanen Östrogen-Rezeptors gebunden. Behandelt man die Maus mit einem Östrogen-Antagonisten wie etwa Tamoxifen, ist das Cre-Fusionsprotein durch dessen Bindung in der Lage, in den Zellkern zu gelangen und als Enzym aktiv zu werden (el Marjou et al., 2004). Weitere darmspezifische Mausmodelle sind durch eine Tet-Operator-Sequenz induzierbar (Roth et al., 2009; Saam & Gordon, 1999).

6.2 *In vitro*-Charakterisierung der physiologischen Funktion von SASH1

Der Aufbau von Adapterproteinen aus unterschiedlichen Modulen, wie etwa den SH3-, SH2- oder SAM-Domänen, ermöglicht ihnen die Bindung und Interaktion mehrerer unterschiedlicher Interaktionspartner gleichzeitig. Adapterproteine selbst besitzen keine katalytische Aktivität, ihre Aufgabe besteht in der Rekrutierung von Enzymen und anderen Proteinen aus dem Zytosol zur Bildung eines Multiproteinkomplexes, dem sogenannten „Signalosom“. Durch die räumliche Zusammenführung von Enzym und Substrat bilden sie folglich Plattformen, auf denen Entscheidungen bezüglich eines oder mehrerer Signalwege fallen. Es kommt zu einer stringenten Regulierung und schnelleren Verarbeitung intrazellulärer Signale.

Aufgrund seiner SH3- und SAM-Domänen und keinerlei vorhergesagter enzymatischer Aktivität zählt SASH1 zusammen mit den weiteren Mitgliedern der SLY-Proteinfamilie zu den Signaladapterproteinen. Ihre untereinander hohe Sequenzhomologie sowie die bei einer Sequenzanalyse ihrer SH3-Domänen mittels BLAST äußerst geringen Sequenzübereinstimmung mit SH3-Domänen anderer Signalmoleküle gruppiert SASH1, SLY1 und Samsn1 in eine neuartige Familie der Adapterproteine, der sogenannten SLY-Adapterproteinfamilie.

Der für Proteininteraktionen prädestinierte Aufbau der Proteine und das zusätzliche Vorhandensein von nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) werfen die Frage nach potentiellen Interaktions- und Bindungspartnern sowie nach der subzellulären Lokalisation der SLY-Proteine auf.

Das Vorhandensein von NLS lässt Spekulationen zu, dass eine regulatorische Funktion möglicherweise als Transkriptionsfaktor oder aus der Translokation von Proteinkomplexen in bzw. aus dem Nukleus besteht. NLS sind für den Transport von größeren Proteinen oder Proteinkomplexen (>40 kDa) notwendig, da diese nicht mehr in der Lage sind, durch passive Diffusion die Kernporen zu passieren (Paine et al., 1975).

6.2.1 Lokalisierungs- und Expressionsanalysen von SASH1

Durch die Herstellung eines anti-SASH1-spezifischen Antiserums ist es erstmals möglich, die Lokalisation von endogenem SASH1 in unterschiedlichen Systemen zu bestimmen. Die Lokalisation von endogenem SASH1 wurde in der Immunfluoreszenz und der Immunhistochemie in unterschiedlichen Zelllinien und in murinem bzw. humanem Gewebe untersucht. Hierbei kam es interessanterweise zu einer dem rekombinanten SASH1 widersprüchlichen Lokalisation von SASH1. Beide SASH1-Formen weisen eine Lokalisation in F-Aktin-reichen Strukturen auf. Jedoch ist endogenes SASH1 sowohl in den untersuchten Zelllinien als auch in murinen bzw. humanen Geweben vorwiegend im Nukleus lokalisiert, während die transgenen Konstrukte V5-FL-SASH1 bzw. eGFP-FL-SASH1 eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation in der Zelle aufweisen.

Aufgrund der Existenz der NLS in allen Proteinfamilien-Mitgliedern ist eine Kernlokalisierung der endogenen Form von SASH1 und der SLY-Familie auf jeden Fall in Betracht zu ziehen. Die in der Immunfluoreszenz bei SASH1 beobachteten Differenzen zwischen endogenem und rekombinant exprimierten SASH1 mögen bei der subzellulären Lokalisation auf eine ähnliche sterische Behinderung der NLS aufgrund der integrierten V5- oder eGFP-Markierung zurückzuführen sein. Auch die Lokalisation von rekombinanten Samsn1 kann mit Hilfe der Literatur nicht eindeutig geklärt werden. Zwei Studien zu Samsn1 beschreiben gegensätzliche subzelluläre Lokalisierungen der rekombinanten Form. In der Veröffentlichung von Uchida et al. wurde eine reine Kernlokalisierung beschrieben. In der Studie von Claudio et al. wurde dagegen ein überwiegend zytosolisch vorliegendes Samsn1-Protein beschrieben (Claudio et al., 2001; Uchida et al., 2001). Der erkennbare Unterschied zwischen beiden Überexpressionsstudien war eine unterschiedliche Markierung der Samsn1-Konstrukte. Während Uchida et al. eine N-terminale GFP-Markierung verwendete, setzten Claudio und Mitarbeiter eine HA-Markierung ein. Sterische Behinderungen der Markierungen und eine daraus resultierende Unzugänglichkeit für Importine bzw. Exportine können als eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Lokalisation von Samsn1 diskutiert werden. So ist die rekombinante Form von SASH1 aufgrund einer C-terminal gelegenen V5-Markierung eventuell nicht mehr in der Lage, eine für den Kerntransport notwendige Änderung in der Konformation oder des Phosphorylierungsstatus vorzunehmen. SASH1 mit einer GFP-Markierung am N-terminalen Ende weist allerdings die gleiche vorwiegend zytosolische subzelluläre Lokalisation wie V5-SASH1 auf, was eher gegen eine mögliche Inhibition der für einen Kerntransport notwendigen Konformationsänderung spricht. Das Deletionskonstrukt Δ Cter (Abb. 20) weist dagegen eine überwiegende Kernlokalisierung auf. Diese Daten weisen darauf hin, dass der C-Terminus von SASH1 eine inhibitorische Rolle bei der NLS-Funktion einnimmt.

Eine Translokation zwischen Zytoplasma und Nukleus beruht auf den nukleären Lokalisierungssignalen (NLS). SASH1 besitzt zwei vorhergesagte NLS. Für SLY1 und Samsn1 wurde ebenfalls eine Kernlokalisierung basierend auf der NLS beschrieben (Beer et al., 2005; Uchida et al., 2001). SLY1, welches eine Lokalisation sowohl im Nukleus als auch im Zytosol aufweist, zeigt in einem *in vivo*-Modell, dass neben einer Ser27-Phosphorylierung die Kernlokalisierung für die korrekte Ausübung seiner Funktion bei der adaptiven Immunantwort notwendig ist (Beer et al., 2005). In der Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten die erste NLS von SASH1 als essentiell für die Kernlokalisierung bestätigt werden (nicht gezeigt). Ein SASH1-Konstrukt, welches eine mutierte Form der NLS1 aufweist, ist nicht mehr in der Lage, in den Kern zu gelangen.

Im Kern sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren lokalisiert, weshalb die nukleäre Lage des endogenen SASH1 weitere Überlegungen bezüglich dessen physiologischer Funktion zulässt. Die Proteinstruktur von SASH1 weist neben den NLS-Sequenzen auch eine „coiled coil“-Region auf, welche ein häufiges Motiv in Transkriptionsfaktoren oder in beim Vesikeltransport beteiligten Proteinen ist (Gillingham & Munro, 2003).

Die Kernlokalisierung findet möglicherweise erst durch eine Aktivierung von SASH1 durch posttranslationale Modifikationen, wie etwa Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung statt. Für SLy1 und Samsn1 wurden *in vitro* bereits eine Phosphorylierung des Serinrestes 27 bzw. 23 nachgewiesen (Astoul et al., 2003; von Holleben, 2008). Außerdem konnten Interaktionen mit 14-3-3-Proteinen beobachtet werden (von Holleben, 2008). Diese Befunde sind von hohem Interesse, da auch für SASH1 eine phosphorylierungsabhängige Bindung an 14-3-3 σ beschrieben wurde (Benzinger et al., 2005). Für SASH1 liegt keine vorhergesagte Ser/Thr-Phosphorylierungsstelle in dem zu SLy1 und Samsn1 homologen Sequenzabschnitt vor, um welchen Serin-Rest es sich also bei SASH1 handelt, bleibt ungewiss. Die These einer zu SLy1 analogen Aktivierung von SASH1 mittels Phosphorylierung gilt es zukünftig zu untersuchen.

SH3-Domänen binden prolinreiche Proteinmotive (Pawson & Nash, 2003). Da SASH1 neben der SH3-Domäne auch eine prolinreiche Sequenz am C-terminalen Ende aufweist, kann eine mögliche Bindung der beiden Strukturen zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Aktivierung oder aber einer Autoblockade führen, bzw. die Kernlokalisierung beeinflussen.

In Expressionsanalysen kommt es zu unterschiedlichen Ergebnissen bei dem Vergleich der drei Mitglieder der SLY-Adapterproteinfamilie. Protein- und RNA-Expressionsanalysen zeigen, dass SASH1 in der Mehrzahl der Gewebe der Maus zu finden ist (Abb. 23). Hierbei kommt es zu einer besonders starken Expression in den Bereichen des Gehirns und des Magen-Darm-Traktes. Eine relativ schwache oder keine Expression weisen die lymphatischen Gewebe, wie etwa Thymus und Milz, auf. Für SLy1 und Samsn1 wurden zu SASH1 unterschiedliche Expressionsmuster beschrieben. SLy1 weist hierbei eine zu SASH1 komplementäre Expression ausschließlich in lymphatischen Geweben auf (Beer et al., 2001). Die Expression von Samsn1 ist im Vergleich zu SLy1 weitreichender. Samsn1 ist in Geweben des Gehirns (Claudio et al., 2001) und in hämatopoetischen Geweben wie etwa der Milz, mit der Ausnahme des Knochenmarks, nachzuweisen (Claudio et al., 2001; Uchida et al., 2001). Außerdem wurde eine Expression in der Skelett- und Herzmuskulatur beschrieben (von Holleben, 2008).

Die Proteinexpression von SASH1 im adulten murinen Gewebe wird durch die Ergebnisse der Expressionsdaten der *in situ*-Hybridisierung gestützt. Bei der *in situ*-Hybridisierung kommt es im Mausembryo zu einem starken Nachweis der SASH1-mRNA-Expression in Gehirn und Darm. Diese zwei Gewebearten weisen auch im Western Blot und der qRT-PCR einen hohen Gehalt an SASH1 auf. Diese Daten unterstreichen die Spezifität des Antiserums 1540 und weisen speziell auf eine mögliche Hauptfunktion von SASH1 in Gehirn und Darm hin. Die Charakterisierung der subzellulären SASH1-Verteilung gibt weitere Hinweise für die Funktionsaufklärung von SASH1. Die Kernlokalisierung könnte es SASH1 ermöglichen, transkriptionsregulatorische Funktionen zu übernehmen. Der hohe Anteil an SASH1 in dynamischen Membranstrukturen dagegen kann ein Hinweis auf eine mögliche Funktion bei der Organisation und Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts sein.

6.2.2 Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen der SASH1-Expression

SASH1 liegt innerhalb des humanen Genoms auf der chromosomalen Region 6q23-25, welche als ein kritischer Ort für Mutationen in malignen Krankheitsformen beschrieben wurde (Bailey-Wilson et al., 2004; Barghorn et al., 2001; Bell et al., 1997; Wallrapp et al., 1997). Speziell für SASH1 wurde bereits ein Krankheitsbild beschrieben, welches auf eine im *SASH1*-Lokus auftretende Punktmutation zurückzuführen ist (Pacheco et al., 2004). Die Mutation führt zu keiner erniedrigten SASH1-Expression, löst jedoch eine Pigmentstörung der Haut, das sogenannte Leopard-Syndrom, aus. Außerdem wurde eine paternale Deletion der SASH1-Region 6q24.3 beschrieben, welche zu multiplen kongenitalen Fehlbildungen wie etwa Wachstumsverzögerungen mit charakteristischen Gesichtszügen und Entwicklungsverzögerungen führt (Nowaczyk et al., 2008). Für SASH1 wurde in Mammakarzinomen und in einem Mausmodell für das Kolorektalkarzinom (K-Ras^{V12G}) (eigene Vorarbeiten, Abb. 7) stattfindende LOH nachgewiesen (Zeller et al., 2003). Trotz intensiver Analyse der Gewebe mit aberranter SASH1-Expression konnten keine weiteren Mutationen zusätzlich zu einem LOH beobachtet werden, welche eine Herunterregulation der SASH1-Expression erklären könnte. Es stellt sich die Frage, welche Mechanismen in Tumorgeweben zu den beobachteten Expressionsveränderungen von SASH1 führen. In den letzten Jahren finden neben „klassischen“ DNA-Mutationen epigenetische Veränderungen in der Tumorgenese zunehmend Beachtung. Sie treten mindestens genauso häufig wie genetische Veränderungen auf (Jones & Baylin, 2002) und sind vor allem im Zusammenhang mit Tumorsuppressorgenen zu finden. Chromosom 6 gehört zu den Gen- und CpG-reichen Chromosomen (Eckhardt et al., 2006; Mungall et al., 2003). Epigenetische Modifikationen in Form einer Promotormethylierung wurden bereits mehrfach um den Genlocus 6q23-25 in Tumoren der Lunge, des Magens und in Ovarial- und Mammakarzinomen beschrieben (Abdollahi et al., 2003; Choi et al., 2004; Schuebel et al., 2007; Tessema et al., 2008). Hierbei wird auch SASH1 als ein Gen genannt, welches nach *in silico*-Vorhersagen CpG-Inseln besitzt (Tessema et al., 2008). Epigenetische Modifikationen der genomischen DNA durch Methylierung und/oder Histondeazetylierung spielen eine wichtige Rolle bei der transkriptionalen Stilllegung von Genen. Methylierung kann die Transkription direkt beeinflussen, indem sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert, oder indem sie indirekt die Bildung eines Komplexes aus Methyl-CpG-Bindeproteinen und Histondeazetylasen fördert (Jones et al., 1998; Wade et al., 1999). Neben einem LOH und einer Punktmutation auf dem zweiten Allel kann die kovalente Bindung von Methylgruppen an die C5-Position des Cytidinrings in Cytosin-Guanosin-Nukleotid-Dimeren (CpG) der DNA von Tumorsuppressorgenen zu deren Funktionsverlust und damit zur Tumorentstehung führen. Die durch diesen Prozess herbeigeführte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beeinflusst zahlreiche, an der Tumorentstehung beteiligte Signalwege, wie etwa den Zellzyklus (*Rb*, *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}*), den Wnt Signalweg (*APC*, *E-Cadherin*), die DNA-Reparatur (*MGMT*, *hMLH1*, *BRCA1*) und Apoptose (*DAPK*) (Esteller, 2002). Auch die Metastasierung beeinflussende Gene sind von einer Hypermethylierung betroffen (*E-Cadherin*, *TIMP3*) (Esteller, 2002). Die Analyse der DNA-Methylierung von Tumorzellen ergab ein erhöhtes Methylierungsprofil von Tumorsuppressor-Promotoren in Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen (Esteller, 2002). Die Expression des Zellzyklus-Regulators *p16^{INK4a}* wird in fast allen menschlichen Tumorarten durch Hypermethylierung unterdrückt (Gonzalez-Zulueta et al., 1995; Herman et al., 1995; Merlo et al., 1995).

Die Promotormethylierung von Genen unterscheidet sich je nach Zelllinie (Lind et al., 2004), weshalb mehrere Zelllinien parallel untersucht wurden. Bei der Untersuchung des

Methylierungsprofil bezüglich des Tumorsuppressors SASH1 erzielte die Behandlung mit den Demethylierungsreagenzien 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza) und Trichostatin A (TSA) nur in einer Kolorektalkarzinom-Zelllinie, den SW480-Zellen, eine signifikante Verstärkung der SASH1-Expression ($p=0,0266$). Die Zelllinien CaCo2, HCT116, DLD1 und HeLa zeigten ebenfalls eine leicht erhöhte Expression von SASH1. Da unbehandelte SW480-Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien kaum SASH1 exprimieren (Abb. 24), kann dies als Resultat einer Promotormethylierung angesehen werden, da für eine funktionierende Transkription alle Faktoren in der Zelle vorliegen. Durch die Inkubation mit 5-Aza und TSA erfolgt eine Chromosomendekondensierung durch die Inhibition der Histonacetylase, die Methyltransferase kann besser greifen, eine Demethylierung der DNA wird durchgeführt und die Transkriptionsfaktoren können somit an den zuvor methylierten Promotor binden.

Eine Erklärung für die mittels Western Blot und qRT-PCR ermittelte Unterdrückung der SASH1-Expression in unterschiedlichen hämatopoetischen Geweben, wie etwa dem Thymus und der Milz, kann möglicherweise das Vorliegen einer Promotormethylierung sein. Im Gehirn und Darm, welche eine hohe SASH1-Expression aufweisen, ist die Expression möglicherweise ein Hinweis auf eine frei zugängliche, unmethylierte Promotorregion. Da die T-Lymphom-Zelllinie Jurkat nach der Behandlung jedoch keine messbare SASH1-Expression aufweist, ist auf den ersten Blick keine Promotermethylierung für die SASH1-Unterdrückung in hämatopoetischen Zellen verantwortlich. Hier muss ein Augenmerk auf die möglicherweise unterschiedliche zelluläre Ausstattung von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der SASH1-Expression beteiligt sind, geworfen werden; diese gilt es nunmehr zu identifizieren. Hierfür wurde mittels dem Programm „ConTra“ eine 1 kb große 5'-flankierende DNA-Einheit, von dem ersten in SASH1 auftretendem Startcodon ATG ausgehend, analysiert (Hooghe et al., 2008). Innerhalb dieser Region befindet sich eine potentielle Promotorregion, welche als mögliche Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren agieren könne. Eine *in silico*-Analyse ergab als ersten Anhaltspunkt eine Bindung des darmspezifischen Homeobox-Transkriptionsfaktors Isx innerhalb dieser Region (Choi et al., 2006).

Promotoren mit CpG-Inseln werden in einem gesunden Organismus selten mittels Methylierung reguliert (Bird, 2002). Soll die Transkription eines Gens im gesunden Organismus herunterreguliert werden, so geschieht dies wahrscheinlich eher durch eine vorübergehende Bindung von Repressoren an die DNA (Bird, 2002; Jones & Baylin, 2002). In Krebszellen und in Tumoren findet man dagegen häufig eine Hypermethylierung von Genpromotoren (Lind et al., 2004). Handelt es sich hierbei um ein Tumorsuppressorgen, hat die durch eine Promotormethylierung erreichte Abschaltung des Gens weitreichende Folgen. Die Promotormethylierung stellt somit einen wichtigen Mechanismus bei der malignen Entartung von Zellen dar.

Basierend auf der Hypothese, dass ein Funktionsverlust von SASH1 eine Rolle in der späten Tumorgenese und der Metastasierung spielt, sollten sich Zelllinien, welche unterschiedlich stark SASH1 exprimieren, in ihren tumorigenen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Vergleicht man die drei Kolorektalzelllinien HT29 (hohe SASH1-Expression), CaCO2 (mäßige SASH1-Expression) und SW480-Zellen (niedrige SASH1-Expression) miteinander, sollten SW480-Zellen, welche eine stark reduzierte SASH1-Expression auf RNA-Ebene aufweisen, ein erhöhtes Metastasierungspotential besitzen. SW480 Zellen wurden jedoch in unterschiedlichen Modellen als nicht besonders stark metastasierend charakterisiert (de Vries et al., 1995). In einem orthotopen Transplantationsmodell wurden CaCO2-Zellen als nicht-invasiv und kaum tumorigen beschrieben. Interessanterweise wiesen HT29, welche eine Hypertriploidie (Kawai et al., 2002)

und aufgrund dessen eine hohe SASH1-Expression besitzen, invasives Verhalten und die Fähigkeit zur Metastasierung auf (de Vries et al., 1995). Generell lassen sich Beobachtungen in Zelllinien allerdings nicht leicht auf die *in vivo*-Situation in einem Tumor übertragen. Die Metastasierung ist ein Prozess, der eine gewisse Dynamik und eine zelluläre Heterogenität erfordert. So stellen in einem Tumor die Zellen mit der höchsten Neigung zur Metastasierung meist nur eine Subpopulation dar. Der Vergleich unterschiedlicher Zelllinien ist zudem schwierig, da sich aufgrund jahrelanger Kultivierung und zur Anpassung an die *in vitro*-Kulturbedingungen unterschiedlichste Mutationen in den einzelnen Zelllinien manifestiert haben.

Alleine durch die Methylierungsanalysen an etablierten Zelllinien kann die reduzierte SASH1-Expression in Tumorgeweben und die Hypothese der verstärkten Neigung zur Metastasierung nicht gestützt werden. Da die Tumorgenese jedoch auf einem mehrstufigen, komplexen Mechanismus beruht, können die Ergebnisse der Promotormethylierung von Zelllinien nicht 1:1 auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. Auch auf Chromosom 6 wurden bereits Gene charakterisiert, welche ein unterschiedliches Methylierungsmuster in unterschiedlichen somatischen Zelltypen aufweisen (Eckhardt et al., 2006). Interessanterweise zeigten die Methylierungsergebnisse keine starke Korrelation mit der tatsächlichen Expression der Gene in den Geweben. Es spielen also noch andere Faktoren bei der Genexpression eine Rolle, die bei weiteren Überlegungen miteinbezogen werden müssen. Außerdem kommt es auf die Art der Transkriptionsfaktoren an. Können sie aufgrund von Promotormodifikationen nicht mehr binden, kommt es je nach Faktor (Aktivator oder Repressor) zu einer gehemmten bzw. verstärkten Expression. So müssen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren auch für SASH1 diskutiert werden. Der herunterregulierten SASH1-Expression in Mamma- und Kolorektalkarzinomen (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003) könnte eine aberrante Bindungseigenschaft eines Transkriptionsaktivators zugrundeliegen.

Liegt in der Zelle ein LOH vor, kann eine CpG-Methylierung im Promotorbereich einen Regulationsmechanismus der SASH1-Expression darstellen. Ob dieses Phänomen in Tumoren zu einer verminderten SASH1-Expression führt, kann in weiteren Methylierungsanalysen von Tumorgeweben mittels Bisulfitsequenzierung und PCR-Amplifikation der Promotorregion untersucht werden. Nur diese Methode lässt die Analyse einzelner Allele und CpG-Stellen zu. Da mittels der hier angewandten Methode das Gesamt-Genom demethyliert wurde, kann die aberrante SASH1-Expression auch im Zusammenhang mit der veränderten Transkription auf noch nicht näher identifizierte, an der SASH1-Regulation beteiligte Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sein.

6.2.3 Einfluss von SASH1 auf die Organisation des Zytoskeletts

Externe Signale veranlassen Zellen zu schnellen Änderungen ihrer Zellmorphologie und ihres Motilitätsverhaltens. Die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts wird unter anderem durch die membranassoziierten kleinen GTPasen aus der Rho-Superfamilie reguliert (Hall, 2009). Sie regulieren auch intrazelluläre Signalwege, welche bei der Tumorgenese, Invasion und Metastasierung eine Rolle spielen (Espina et al., 2008). Diese GTPasen haben eine molare Masse von 20-25 kDa und bilden eine aktive, GTP-gebundene und eine inaktive, GDP-gebundene Form aus. Der Wechsel von der inaktiven GDP- zu der aktiven GTP-gebundenen Form geht mit einer Konformationsänderung einher und wird aufgrund der geringen intrinsischen Hydrolyse-Aktivität durch Enzyme katalysiert. GEFs (guanine nucleotide exchange factors) katalysieren die Aktivierung, GAPs (GTPase activating proteins) die Inaktivierung der kleinen GTPasen.

Von drei Vertretern (RhoA, Rac1 und Cdc42) der Rho-Familie der kleinen GTPasen sind die Regulationsmechanismen besonders gut charakterisiert (Espina et al., 2008). Durch extrazelluläre Stimuli regulieren sie Aktin-bindende Proteine und dienen so als molekulare Regulatoren der Zellbewegung (Abb. 42). Die RhoA-Aktivierung unterstützt die Zellkontraktion durch die Ausbildung von Stressfasern, anti-parallelen Bündeln von linearen Aktinfilamenten. Die Aktivierung der anderen beiden GTPasen, Rac1 und Cdc42, induziert die Ausbildung von Zytoskelettstrukturen, die für Zellmotilität benötigt werden. Die Aktivierung von Rac1 fördert die Bildung von Lamellipodien, während Cdc42 in seiner aktiven Form die Bildung von Filopodien induziert. Beide Proteine aktivieren den Effektor PAK, wodurch es zu einer Auflösung der Stressfasern und der fokalen Adhäsionskontakte kommt. Die Zelle wird flexibler und motiler (Hall, 1998; Hall & Nobes, 2000). Eine tumorrelevante Überexpression von Rac1 wurde unter anderem in Mammakarzinomen, Magen- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen festgestellt (Gomez del Pulgar et al., 2005). Außerdem spielt Rac1 eine Rolle beim Leptin-vermittelten Invasionsverhalten von Epithelialzellen des Kolons (Attoub et al., 2000). In kolorektalen Tumoren stimuliert eine trunkierte Form des APC-Proteins die Aktivität von Asef, einem Rac-spezifischen GEF (Kawasaki et al., 2000).

Die kleine Rho GTPase Rac 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) ist ein pleiotroper Regulator vieler zellulärer Prozesse, wie etwa des Zellzyklus, der Proteinkinasenaktivierung und der Reorganisation des Zytoskeletts. Sie ist jedoch vor allem an Regulation der Zell-Zell-Adhäsion und der Zellmigration beteiligt. Durch die Aktivierung von Cortactin durch Rac1 erfolgt die Translokation von Cortactin an die Zellperipherie, was zu morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts führt (Espina et al., 2008). Zellmigration ist essentiell für die Embryonalentwicklung, die Funktion des Immunsystems und die Gewebereparatur. Sie trägt jedoch auch zur Tumorzellinvasion und verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen bei (Raftopoulou & Hall, 2004; Ridley et al., 2003). Für eine funktionierende Migration einer Zelle ist eine gerichtete, polarisierte Bewegung notwendig. Hierfür sind die Interaktion der Membran mit dem extrazellulären Substrat und ein dynamischer Umbau des Zytoskeletts genauso von Bedeutung wie die Ausbildung von Lamellipodien und Lamellae an der Zellfront.

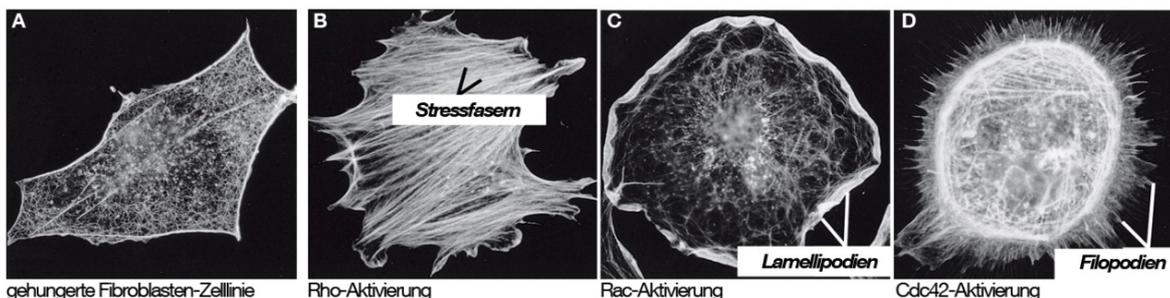


Abb. 42 Durch GTPasen der Rho-Familie induzierte Strukturveränderungen des F-Aktin-Zytoskeletts.

Murine Swiss 3T3 Fibroblasten weisen nach Aktivierung unterschiedlicher Rho-GTPasen deutliche Veränderungen im Zytoskelett auf. **A** Unbehandelter Fibroblast **B** Lyso-phosphatid-säure-Stimulation zur Aktivierung von Rho **C** Mikroinjektion von konstitutiv aktivem Rac1^{V12} **D** Mikroinjektion von Cdc42-GEF FGD1 zur Aktivierung von Cdc42 (modifiziert nach Hall 1998).

Die Lokalisierung von endogenem bzw. rekombinantem SASH1 in F-Aktin-reichen, membrannahen Strukturen ist ein Indiz einer möglichen Funktion des Adapterproteins bei der Strukturierung des Aktinzytoskeletts. SASH1-überexprimierende HeLa-Zellen zeigten in der Videomikroskopie einen hohen Grad an Lamellipodienausbildung und dorsalen Membrankräuselungen, den Membran-„Ruffles“ (nicht gezeigt). Aufgrund der Ko-Lokalisierung in

der Immunfluoreszenz und der direkten Interaktion von SASH1 und Cortactin wurde der Einfluss von SASH1 auf Rac1 untersucht. Cortactin, welches an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist, wird bei der Lamellipodieninduktion von Rac1 aktiviert (Weed et al., 1998).

Untersuchungen in der Immunfluoreszenz zeigten drastische Veränderungen in der Zellmorphologie aufgrund einer zeitgleichen Überexpression von aktivem Rac1 und V5-SASH1 (Abb. 31). Dauerhaft aktiviertes Rac1^{V12} induzierte, wie auch in Swiss 3T3-Fibroblasten beschrieben (Hall, 1998), in Hek293-Zellen einen breiten glatten Lamellipodiensaum (Abb. 31). Aktives Rac1 ist an der Plasmamembran lokalisiert (del Pozo et al., 2004) und weist die höchste Konzentration entlang der Zellfront im Lamellipodiensaum auf (Kraynov et al., 2000). Die Ko-Transfektion mit dem SASH1-Expressionsplasmid führte zu einer verstärkten Ausbildung von dorsalen Membran-„Ruffles“ und einer exakten Ko-Lokalisierung beider Konstrukte entlang der Zellmembran (Abb. 31J-L). Dominant negatives Rac1^{N17} alleine, bzw. in der Kombination mit SASH1, führte dagegen zu einer spindelförmigen Zellmorphologie; es kam zu keiner Lokalisationsübereinstimmung mit SASH1 (Abb. 31G-I, M-O). Die durch SASH1 resultierende Induktion von Lamellipodien ist somit Rac1-abhängig, da dominant-negatives Rac1 deren Ausbildung aufhebt. Eine direkte Interaktion der aktiven, bzw. der dominant negativen Rac1-Form mit SASH1 konnte mittels Immunpräzipitation allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch konnte in einem biochemischen Ansatz keine signifikant erhöhte Gesamtmenge an endogen aktivem GTP-gebundenen Rac1 in Abhängigkeit der SASH1-Expression festgestellt werden. HeLa- und Hek293-Zellen wiesen jedoch eine leicht erhöhte Rac1-Aktivität aufgrund einer SASH1-Expression auf.

Um als Zelle eine gerichtete Bewegung ausüben zu können, ist ein definiertes Maß an aktiviertem Rac1 nötig (Pankov et al., 2005). Ein zu hoher bzw. ein zu niedriger Gehalt an aktivem Rac1 inhibiert die Migration (Abb. 43). Eine gerichtete, dauerhafte Bewegung wird nur durch einen gemäßigten Rac1-Aktivierungsstatus ermöglicht. Kommt es zu einer nur geringen Reduktion der Rac1-Aktivität, werden bereits die peripheren Lamellipodien, die für eine gerichtete Bewegung nötig sind, inhibiert (Abb. 43). So ist eine kleine Änderung der Gesamtmenge von aktiven Rac1, wie sie nach einer SASH1-Transfektion vorliegt, möglicherweise für eine gerichtete Migration ausreichend.

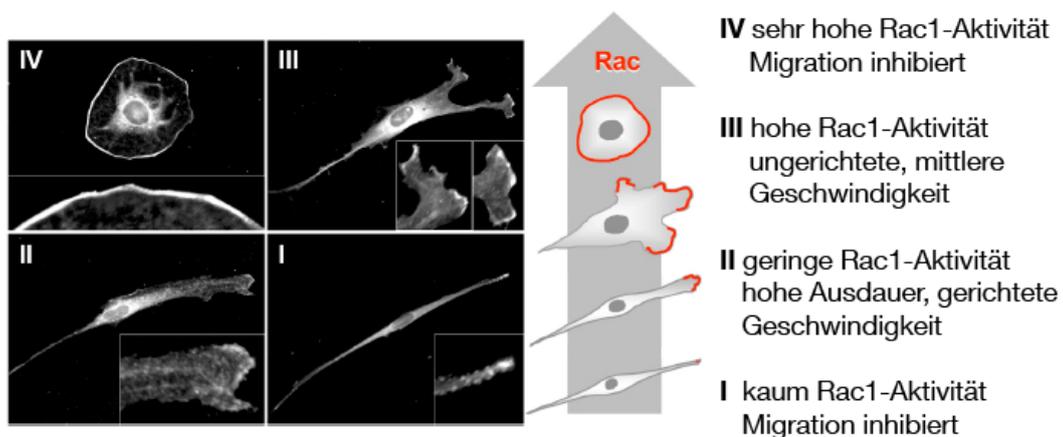


Abb. 43 Vier Stadien der Rac1-abhängigen Zellmorphologie und Zellmotilität.

Die Rac1-Lokalisierung in Membranstrukturen der Zelle (rot) verlagert sich durch eine erhöhte Rac1-Aktivität zunehmend in die Lamellipodien. Eine Rac1-Aktivierung, die zu niedrig (I) bzw. zu hoch (IV) ist, führt zu einer immobilisierten Zelle (Pankov et al., 2005).

Es gilt als anerkannt, dass Rac1 einen kritischen Faktor in der Progression von Kolorektalkarzinomen darstellt (Attoub et al., 2000; Kawasaki et al., 2003; Kawasaki et al., 2000). Ein Wechselspiel von SASH1 und Rac1 ist aufgrund der hier angeführten Ergebnisse wahrscheinlich und bietet einen neuen Ansatzpunkt zur Klärung der SASH1-Funktion. Da keine signifikant erhöhte Rac1-Aktivierung und keine direkte Interaktion von Rac1 und SASH1 als Ursache für die Morphologieänderung nachgewiesen werden konnte, muss eine andere, noch unbekannte Wechselwirkung zwischen SASH1 und Rac1 bestehen. Besonders aufgrund der Beobachtungen in der Immunfluoreszenz kann vermutet werden, dass SASH1 anstelle eines Einflusses auf den GTP-Status von Rac1, einen Einfluss auf die Rac1-Lokalisierung besitzt. SASH1 als Adapterprotein könnte indirekt, durch die Ausbildung eines Multiprotein-Komplexes, auf die Rac1-Lokalisierung wirken, und so die Translokation von Rac1 an die Zellmembran fördern.

Da es sich bei dem hier gewählten experimentellen Ansatz um eine Überexpression von SASH1 handelt, während im Tumor ein gegensätzlicher Zustand, nämlich eine SASH1-Erniedrigung, vorliegt, bietet das Protein Rap1A eine mögliche Verknüpfung der SASH1-Funktion mit Rac1. In der Transkriptomanalyse kam es zu einer stark erhöhten Rap1A-Expression aufgrund einer SASH1-Herunterregulation. Die SASH1-Erniedrigung entspricht der Situation im Tumorgewebe. Kommt es also aufgrund der erniedrigten SASH1-Expression im Tumorgewebe zu einer erhöhten Rap1A-Expression und -Aktivierung, kann die Rac1-Aktivität über Rap1A reguliert werden (siehe 6.2.4). Rap1A ist in der Lage, über Rac1-GEFs wie etwa Tiam1 eine Rac1-abhängige Zellausbreitung einzuleiten (Arthur et al., 2004). Rac1 wiederum wurde wiederholt als ein Regulator des Wnt-Signalproteins β -Catenin beschrieben (Wu et al., 2008), indem es die Kernlokalisierung von β -Catenin verstärkt. Dort agiert β -Catenin zusammen mit TCF als Transkriptionsfaktor. Eine Überaktivierung des β -Catenin/TCF-Transkriptionskomplexes führt zur Tumorprogression.

Rac1 besitzt eine polybasische Region (PBR), welche ein funktionierendes Kernlokalisierungssignal besitzt. Durch das integrierte Kernlokalisierungssignal können Protein-komplexe, welche Rac1 enthalten, in den Kern transportiert werden (Williams, 2003). Die Kernlokalisierung von Rac1 wurde auch im Zusammenhang mit der Transkription von Wnt-Signalproteinen beschrieben (Buongiorno et al., 2008). Möglicherweise kommt es aufgrund der SASH1-vermittelten Rac1-Lokalisierung in die Zellperipherie zu einer Veränderung des Wnt-Signalwegs. SASH1 zwingt aktives Rac1 in die Aktin-reichen Membranstrukturen und wirkt sich somit unter physiologischen Bedingungen auf die Lamellipodienausbildung aus. Kommt es zu einer reduzierten SASH1-Expression, ist Rac1 möglicherweise verstärkt in der Lage, in den Zellkern zu wandern, und dort bei einer Überaktivierung des Wnt-Signalwegs zur Tumorprogression beizutragen.

Neben der Rac1-Aktivierung führt auch eine EGF (epidermal growth factor)-Stimulierung zur Aktivierung von Cortactin und einer Induktion von Aktin-Netzwerken (Chan et al., 1998). Es wurden deshalb die Auswirkungen einer EGF-Stimulierung auf SASH1-transfizierte Zellen untersucht (nicht gezeigt). Die Zellen wiesen allerdings keine Veränderungen bezüglich der Kinetik der Phosphorylierungsstärke des EGF-Rezeptors oder in der Liganden-vermittelten Herunterregulation des EGF-Rezeptors auf. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die Lamellipodien-induktion durch eine SASH1-vermittelte EGFR-Aktivierung ausgelöst wird.

Ein interessanter Ansatz zur Untersuchung der SASH1-abhängigen Rac1-Aktivierung und deren Auswirkung bei der Tumorgenese wäre ein wie bei Espina et al. beschriebenes Xenograft-Modell (Espina et al., 2008). Hierbei wurden Zellen in die Blinddarmwand von athymischen Nacktmäusen injiziert, welche Rac1-überexprimieren, bzw. in welchen Rac1 herunterreguliert wurde. Die

Transplantation von z.B. SASH1-produzierenden bzw. SASH1-defizienten Zelllinien, die mit Rac1^{N17/V12}-ko-transfiziert wurden, könnte das klinische Verhalten von kolorektalen Adenokarzinomen im Menschen widerspiegeln.

6.2.4 Interaktionspartner von SASH1

Neben der direkten Interaktion mit dem Onkoprotein Cortactin wurde in Expressionsanalysen SASH1 als mögliches Zielprotein der Brutons Tyrosinkinase (Btk) beschrieben (Lindvall et al., 2005). Eine Btk-Defizienz führte in Mäusen zu einer SASH1-Expression in primären Milz-B-Zellen. Mutationen im Btk-Gen führen zur unvollständigen Reifung der B-Lymphozyten, was sich beim Menschen durch das Auftreten der sogenannten X-chromosomal vererbten Agammaglobulinämie (XLA) äußert. Es wurde eine Rolle der SASH1-Überexpression in einem Lymphozyten-spezifischen Signalweg postuliert, worauf die Beobachtungen bei Btk-defizienten B-Zellen schließen lassen können (Oakley et al., 2008).

Bei der Suche nach möglichen Zielproteinen von 14-3-3 σ , einem negativen Regulator des Zellzyklus, wurde SASH1 als direkter oder indirekter Interaktionspartner identifiziert (Benzinger et al., 2005; Dubois et al., 2009). 14-3-3 σ zählt aufgrund einer reduzierten Expression in mehreren Tumorarten vermutlich zu den Tumorsuppressorgenen. So kommt es in Mamma- und Ovarialkarzinomen, Prostata-, Haut-, Lungen- und Leberkrebs zu einer Herabregulation der 14-3-3 σ -Expression aufgrund epigenetischer CpG-Methylierung (Ferguson et al., 2000; Iwata et al., 2000; Lodygin et al., 2004; Osada et al., 2002). Interessanterweise wurde eine 14-3-3 σ -Überexpression in Kolorektalkarzinomen beschrieben, was auf eine onkogene Wirkung schließen lässt (Perathoner et al., 2005). In der Regulation der 14-3-3 σ -Expression besteht möglicherweise ein Zusammenhang zu der erniedrigten SASH1-Expression in Tumorgeweben. Liegt SASH1 physiologisch in der Zelle vor, bindet 14-3-3 σ über eine Serinphosphorylierung an SASH1. Diese Bindung führt eventuell zu einer Inaktivierung von 14-3-3 σ . Die reduzierte SASH1-Expression im Tumor wiederum könnte in einer erhöhten Konzentration an freiem zytosolischem 14-3-3 σ resultieren, welches in dieser Form als Onkoprotein wirken kann (Abb. 44).

In der hier durchgeführten Transkriptomanalyse wurde keine aberrante Expression von Cortactin, Btk oder 14-3-3 σ in Abhängigkeit von SASH1 nachgewiesen. In der im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Untersuchung von eGFP-SASH1-transfizierten HeLa-Zellen zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner wurde 14-3-3 σ dagegen als einziges der drei Proteine als Interaktionspartner identifiziert (Tab. 13). Die am häufigsten gefundenen Peptidsequenzen sind in Tab. 13 aufgeführt. Es liegen keine Übereinstimmungen der Ergebnislisten von der Transkriptomanalyse mit der MACS[®]-Analyse vor. Da es sich bei der proteomischen Analyse um die Identifikation von direkten Bindepartnern von eGFP-SASH1 handelt, ist dieses Resultat nicht überraschend. Die Transkriptomanalyse gibt im Gegensatz zur Proteom-Technologie Aufschluss über Gene, deren Transkription SASH1-abhängig ist. Es muss hierbei keine direkte Bindung mit SASH1 eingegangen werden. Während in der Transkriptomanalyse eine Vielzahl an Funktionsgruppen (Chemokine, Transkriptionsregulatoren, mRNA Spleißung,...) vertreten ist, finden sich in der Proteomanalyse auffallend viele Kernproteine als Bindepartner von SASH1 wieder. Interessanterweise wurde in der Proteomanalyse Samsn1 als Bindepartner von SASH1 identifiziert. Da SAM-Domänen bekanntlicherweise Dimere mit SAM-Domänen anderer Proteine ausbildet, ist es gut möglich, dass es zu einer Ausbildung eines Heterodimers von SASH1 mit Samsn1 kommt.

Tab. 13 Auflistung der in der MACS®-Analyse am häufigsten detektierten Peptide.

Genname	Name	Funktion
P38-2G4	cell cycle protein p38-2G4 homolog <i>Homo sapiens</i>	Transkription, Translation
SASH1	KIAA0790 protein <i>Homo sapiens</i>	
RPL13	ribosomal protein L13 <i>Homo sapiens</i>	Translation
CDC5L	cell division cycle 5-like <i>Homo sapiens</i>	Transkription, Translation
RPS8	ribosomal protein S8, isoform CRA_a <i>Homo sapiens</i>	Zellzyklus, Transkription, Translation
E2IG3	E2IG3 <i>Homo sapiens</i>	Zellproliferation
RHGu	RNA helicase Gu - human (fragment) <i>unknown organism</i>	
PBK1	PBK1 protein <i>Homo sapiens</i>	Translation, RNA-Prozessierung
SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated) <i>Homo sapiens</i>	DNA-Reparatur, Transkription
G3BP	ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein, isoform CRA_c <i>Homo sapiens</i>	Transport
RPL3	ribosomal protein L3, isoform CRA_f <i>Homo sapiens</i>	Translation
RFC	replication factor C 4 <i>Homo sapiens</i>	DNA-Replikation
NRF	NF-kappaB repressing factor, isoform CRA_a <i>Homo sapiens</i>	RNA-Bindung
	topoisomerase (DNA) I, isoform CRA_b <i>Homo sapiens</i>	DNA-Replikation, Zelltod
RPL14	ribosomal protein L14 <i>Homo sapiens</i>	RNA-Prozessierung
HSPB1	heat shock 27 kDa protein 1 <i>Homo sapiens</i>	Stressantwort
DCD	dermcidin preproprotein <i>Homo sapiens</i>	Translation
DDX	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide	ATP-Bindung
RPL10a	ribosomal protein L10a <i>Homo sapiens</i>	Translation
Samsn1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals, 1, isoform CRA_b <i>Homo sapiens</i>	Phosphotyrosin-Bindung
SRPK1	serine/threonine-protein kinase 1 (Serine/arginine-rich protein-specific kinase 1) (SR-protein specific kinase 1)(SFRS protein kinase 1) <i>unknown organism</i>	Differenzierung
PKNbeta	protein kinase Nbeta <i>Homo sapiens</i>	Signaltransduktion
HNRPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L, isoform CRA_b <i>Homo sapiens</i>	RNA-Spleißen
H1c	histone cluster 1 <i>Homo sapiens</i>	DNA-Faltung
FWP004	FWP004 <i>Homo sapiens AAQ13495.1</i>	Translation
DHX30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30, isoform CRA_a <i>Homo sapiens</i>	ATP-Bindung

Bei dieser Trennmethode wurde ein GFP-markiertes SASH1-Konstrukt in HeLa-Zellen exprimiert. Nach der Lyse der Zellen wird das Proteinlysate mit anti-GFP-Antikörpern, welche an sogenannte MACS® MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) gekoppelt sind, inkubiert. Die Elution des SASH1-Konstruktes und der daran gebundenen Proteine erfolgte mit 100 mM NaCl. Das Proteingemisch wurde im SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie von Dr. Wolfgang Faigle am Institut Curie (Paris, Frankreich) analysiert (n=3). Als Kontrolle wurden eGFP-transfizierte Zellen verwendet. Proteine, die ebenfalls in dem Kontrolllysate wiederzufinden waren, wurden von der Liste abgezogen.

Das in der Transkriptomanalyse identifizierte Transkript von Rap1A (Ras-related protein) zeigte in Abhängigkeit einer SASH1-Überexpression eine ~60-fach erhöhte Transkriptionsrate und ist somit ein vielversprechender Kandidat für ein durch SASH1 reguliertes Signalprotein. Rap1 gehört zu der Ras-Familie der kleinen GTPasen und reguliert Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix, Adhäsionsmolekülen und angrenzenden Zellen (Caron, 2003). Trotz seiner hohen Sequenzhomologie zu dem Onkoprotein Ras - die sogenannte Effektorregion ist nahezu identisch - besitzen beide, Rap1 und Ras, unterschiedliche Affinitäten zu ihren Zielproteinen (Caron, 2003). Ein Verlust der Rap1-Aktivität führt in *D.melanogaster* zum Verlust der „adherens junctions“ und der Zell-Zell-Adhäsion im Embryo und Ovar (Hariharan 1991, Knox & Brown 2002). In Säugern besitzt Rap1 eine wichtige Funktion bei der Zellausbreitung, der Adhäsion sowie der Migration (Bos et al., 2001). Analog zu den unterschiedlichen Affinitäten zu den Zielproteinen besitzen Rap1 und Ras eine differentielle Zelllokalisierung. Die GTP-gebundene Form von Ras ist hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert, während die Rap1-Aktivierung in kernnahen Regionen stattfindet (Caron, 2003). Auch in der Tumorgenese wurde für Rap1 bereits mehrfach eine Rolle nachgewiesen. So fördert eine hochregulierte Rap1A-Aktivierung die Metastasierung in Prostatakrebs. Die Herunterregulation des negativen Rap1-Regulators Rap1-GAP erhöht das

Metastasierungspotential der untersuchten Zelllinien (Bailey, CL, 2009). Integrine $\alpha 4$, $\beta 3$ und $\alpha \beta 3$ spielen ebenfalls eine Rolle bei der Rap1-geförderten Metastasierung. Sie steuern viele der für eine Metastasierung notwendigen Fähigkeiten der Zellen, wie etwa Invasion, das Überleben innerhalb der Gefäße, die Adhäsion an die Gefäßwand und die Invasion in das dahinterliegende Gewebe.

Eine mögliche funktionelle Interaktion von SASH1 und Rap1 könnte sich in Tumorgeweben wie bereits unter 6.2.3 beschrieben abspielen. Die im Zusammenhang mit einer erniedrigten SASH1-Expression stehende erhöhte Transkription von Rap1 kann über einen im Detail noch unbekanntem Mechanismus die Zellausbreitung durch die Regulation von Rac1 beeinflussen (Arthur et al., 2004) und so eventuell zu einem erhöhten Metastasierungspotential der Zelle führen. Interessanterweise wurde Rap1 auch eine Rolle in der Regulation beim Zellwachstum und der Proliferation und der Aktivierung des ERK (extracellular-signal-regulated kinase) MAP Kinase-Signalweges zugewiesen. Die Transkriptomanalyse ergab eine fünffach erhöhte MAP2K5-Transkription, resultierend aus einer SASH1-Überexpression. Eine SASH1-Reduktion führte analog zu einer MAP2K5-Reduktion. Diese Kinase zählt zu den MAP Kinase Kinasen und ist das einzige Transkript, welches sowohl bei einer reduzierten als auch bei einer erhöhten SASH1-Expression eine Modulation aufweist. MAP2K5 vermittelt die Signalweiterleitung bei der durch Wachstumsfaktoren stimulierten Zellproliferation und der Differenzierung von Muskelzellen (Kato et al., 1998; Dinev et al., 2001).

Sowohl in der Transkriptomanalyse als auch in der Proteomanalyse fanden sich zahlreiche Transkripte bzw. Proteine, welche eine Rolle bei der Transkription, Translation, bei der Signaltransduktion und der Differenzierung spielen. Deshalb besitzt SASH1 vermutlich mehrere Funktionen. Es gilt nun, weitere SASH1-involvierende Signalwege zu identifizieren.

6.2.5 Ausblick II

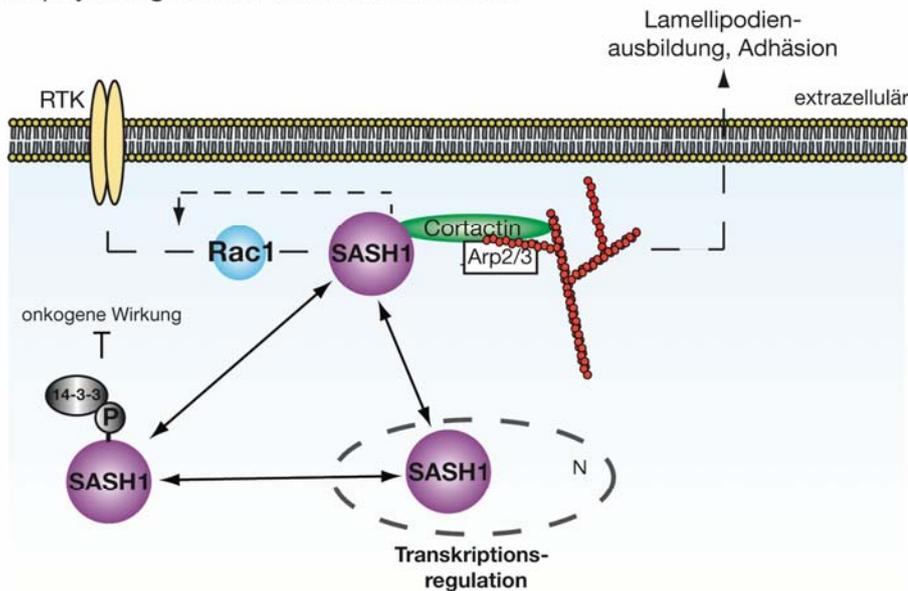
Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine detaillierte molekulare Charakterisierung des Signaladaptorproteins SASH1 vorgenommen. Die publizierten Daten beschränkten sich bisher auf Expressionsanalysen in verschiedenen Krankheitsbildern und die klinische Relevanz von SASH1. Durch die Generierung eines polyklonalen Antiserums gegen SASH1 konnte hier erstmals mit einer genaueren Charakterisierung von SASH1 begonnen werden.

Die subzelluläre Verteilung von SASH1 weist sowohl eine zytosolische als auch eine Kernlokalisierung auf. Für Modulationen des Aktivierungsstatus, der Lokalisierung oder der Expression sind des Öfteren Protein-Phosphorylierungen verantwortlich. Ein verändertes Phosphorylierungsmuster ist ein Ausgangspunkt maligner Erkrankungen und kann auch häufig in Tumorzelllinien und in unterschiedlichen Tumoren beobachtet werden. Die Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste von Aktin-bindenden Proteinen wurde im Zusammenhang mit der Regulation von Cortactin oder Ezrin, einem membran-assoziierten Protein, beschrieben. SASH1 besitzt mehrere vorhergesagte Serin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Cantin et al., 2008; Chen et al., 2009; Dephoure et al., 2008; Olsen et al., 2006; Trinidad et al., 2008; Tsai et al., 2008). Erste laboreigene Untersuchungen konnten in Hek293-Zellen eine Tyrosin-Phosphorylierung von SASH1 nach Pervanadat- und HGF-Stimulierung nachweisen (nicht gezeigt). Die für die *in vivo* SASH1-Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen, wie z.B. Kinasen der Src-Familie, und einen möglichen Regulationsmechanismus gilt es ebenfalls zu identifizieren und näher zu untersuchen.

Die Suche nach einer möglichen Interaktion von SASH1 und Rap1A soll in naher Zukunft ebenfalls intensiviert werden. Einen Ansatzpunkt bilden hierbei die Rap1A-abhängige Zelladhäsion und

-migration. Beide sind entscheidende Faktoren bei der Tumorprogression und Metastasierung durch ein verändertes Verhalten der Tumorzellen bei der Invasion, Disseminierung und der Anheftung an das Endothel und Stroma.

A Modell der physiologischen Funktion von SASH1



B Modell zur Rolle von SASH1 in der Tumorgenese

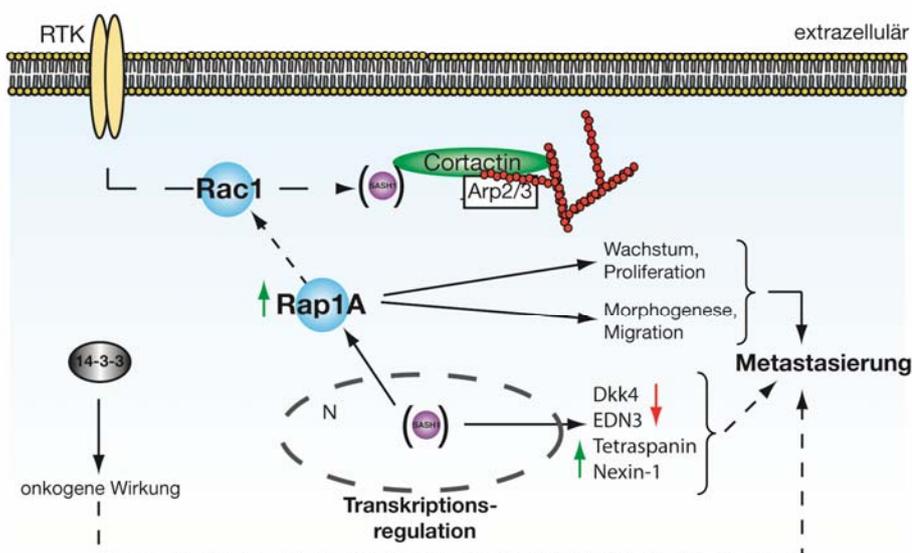


Abb. 44 Modell für die biologische und tumorrelevante Funktion von SASH1.

A Aufgrund der Rac1-abhängigen starken Morphologieänderung und aufgrund des Kernlokalisierungsnachweises wird eine biologische Funktion in der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und bei der Transkription postuliert. **B** Die im Tumorgewebe beobachtete Herunterregulation von SASH1, und die durch eine verminderte SASH1-Expression erhöhte Rap1A-Transkription resultieren in einer Rac1-abhängigen verringerten Zelladhäsion, und erhöhen Zellmotilität.

Außerdem kommt es durch die Modulierung der SASH1-Expression zur veränderten Transkription von Genen, für die bereits Funktionen in der Tumorgenese beschrieben wurden. So wird die Transkription des negativen Wnt-Regulators Dickkopf-4 (FC=0,25) und von Endothelin-3

(FC=0,23), welches eine Rolle bei der Zelldifferenzierung, der Proliferation und der Migration spielt, durch eine reduzierte SASH1-Expression ebenfalls negativ beeinflusst. Die bereits beschriebenen Herunterregulationen in Kolorektalkarzinomen und Brustkrebs (Baehs et al., 2009; Wiesmann et al., 2009) sind somit möglicherweise ebenfalls auf die Herunterregulation von SASH1 zurückzuführen.

Die erhöhten Transkriptionsraten von Tetraspanin (FC=2,4) und Nexin-1 (FC=2,6) wurden ebenfalls bei einer reduzierten SASH1-Expression beobachtet. Für beide Proteine wurde eine Überaktivierung im Zusammenhang der Tumorprogression und Metastasierung beschrieben (Fayard et al., 2009; Zoller, 2009).

Seitdem der Einfluss der Hypermethylierung auf das Tumorwachstum bekannt ist, hat man nach Wegen gesucht, um die im Entstehen begriffenen bzw. auch schon existierenden Tumore durch Demethylierung wieder der Zellzykluskontrolle zu unterwerfen (Momparker & Bovenzi, 2000). Man spricht hierbei von „Epigenetischer Therapie“. Es wurden klinische Studien veröffentlicht, in denen bei Patienten ein hemmender Effekt von Aza-Desoxy-Cytosin auf die Tumorentwicklung gezeigt werden konnte (Wijermans et al., 2005). SASH1 könnte hierbei ebenfalls als ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt wirken. Die CpG-Methylierung muss jedoch zuvor mittels Bisulfitsequenzierung und PCR-Amplifikation genauer charakterisiert werden. Weiterhin wäre es interessant, die Promotorregion von SASH1 auf ein aberrantes Methylierungsmuster in Tumorgewebeprobe hin zu untersuchen.

Das sich aus unseren Daten ergebende Modell der physiologischen und tumorrelevanten Funktion von SASH1 ist in Abb. 44 dargestellt. SASH1 liegt in der Zelle in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen sowohl im Zellkern als auch zytosolisch vor. Die Aktivierung von SASH1 durch extrazelluläre Stimuli (RTK) wirkt sich in einer stabilisierenden Wirkung auf das Aktinzytoskelett aus. Im Zellkern agiert SASH1 als Transkriptionsregulator. Da SASH1 keine typischen DNA-bindenden Domänen wie etwa eine Zink-Finger- oder Helix-Loop-Helix-Domäne besitzt, ist eine direkte Bindung von SASH1 an die DNA eher unwahrscheinlich. Möglicherweise fungiert SASH1 als Adapter- oder Transportprotein für entsprechende Transkriptionsfaktoren. Eine phosphorylierte Form von SASH1 bindet das im Kolorektalkarzinom als Onkoprotein identifizierte zytosolische 14-3-3 σ , was möglicherweise dessen Inaktivierung zur Folge hat.

Im Tumor-Modell kommt es durch die Herunterregulation von SASH1 zu einer erhöhten Konzentration an ungebundenen 14-3-3 σ im Zytosol und einer erhöhten Transkription von Rap1A. Die Überaktivierung von Rap1A resultiert somit möglicherweise in einer Metastasen-fördernden Wirkung durch Modulationen bei der Proliferation, Morphogenese und Migration. Daneben zeigen tumorfördernde Proteine in Abhängigkeit von reduziertem SASH1 eine erhöhte, und tumorhemmende Proteine eine reduzierte Transkription.

Da SASH1 zu den Adapterproteinen gehört, ist davon auszugehen, dass ihm nicht nur eine einzige Funktion in der Zelle zukommt. Adapterproteine besitzen zahlreiche Bindedomänen, mit welchen sie durch Protein-Protein-Bindungen oder eine Interaktion mit anderen Zellkomponenten Komplexe bilden, und so die Durchführung unterschiedlicher Signalwege vereinfachen. Die hier erzielten Befunde weiten das Wissen über SASH1 aus und stützen die Hypothese bezüglich der biologischen Funktion als ein neuartiger Regulator des Aktinzytoskeletts in Epithelzellen.

7 Zusammenfassung

SASH1, ein Mitglied der SLY-Adapterproteinfamilie, wurde als Tumorsuppressorgen in Mamma- und Kolorektalkarzinomen beschrieben (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003). Eine erniedrigte SASH1-Expression korrelierte mit einem reduzierten Patientenüberleben und einem verstärkten Tumorwachstum (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003). In einer multivariaten Analyse wurde die SASH1-Expression als ein unabhängiger negativer Prognosefaktor für das postoperative Überleben eingestuft (Rimkus et al., 2006). Zusätzlich zu der Herunterregulation von SASH1 wurde ein LOH des *SASH1*-Lokus in der chromosomalen Region 6q24.3 in 30 % der untersuchten primären Brusttumore festgestellt. Außerdem konnte ein LOH von SASH1 in einem murinen Kolonkarzinom-Modell (pVillin-K-Ras^{V12G}) nachgewiesen werden. Es konnte jedoch keine trunkierende oder zu Funktionsverlust führende Mutation im jeweils verbliebenen zweiten Allel nachgewiesen werden, was die Frage nach der Regulation der SASH1-Expression im Tumor aufwirft. Die physiologische Rolle von SASH1 ist ebenfalls weitgehend ungeklärt.

Um die biologische Funktion von SASH1 im Allgemeinen und seine Rolle in der kolorektalen Karzinogenese im Besonderen zu charakterisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die im Folgenden erläuterten Hilfsmittel generiert. Durch die Generierung eines konditionalen und gewebespezifischen SASH1^{KO}-Mausstammes sollte die Rolle von SASH1 bei der Tumorgenese und bei der Metastasierung im Darmtrakt untersucht werden. Die Vektorstrategie zur Deletion der zentralen funktionalen Region von SASH1, welche die SH3- und SAM-Domänen enthält, führte nicht zu einer erfolgreichen homologen Rekombination. Es wurde daher ein zweiter Targetvektor entwickelt und kloniert, welcher auf einer Kombination des Cre/loxP- und des Flp/FRT-Systems basiert.

Durch die Herstellung eines SASH1-spezifischen polyklonalen Antiserums konnten Expression und Lokalisierung von endogenem SASH1 mit biochemischen und zellbiologischen Methoden erstmals aufgeklärt werden. Die Analyse der Expression im Mausgewebe zeigte die höchste Expression im Gehirn, die niedrigste Expression in hämatopoetischem Gewebe. Die Ko-Lokalisierung von SASH1 mit dem Onkoprotein Cortactin wurde bestätigt. Endogenes SASH1 wies neben einer Lokalisation im Zellkern eine subzelluläre Lokalisation in F-Aktin-reichen, membranannahen und dynamischen Strukturen auf. Die zeitgleiche Expression von SASH1 und einer konstitutiv aktiven Form der kleinen GTPase Rac1, einem zentralen Regulator des Aktinzytoskeletts, führte zu einer verstärkten Ausbildung von Lamellipodien und Membran-„Ruffles“. Außerdem kommt es zu einer stringenten Ko-Lokalisierung von SASH1 und konstitutiv aktivem Rac1 in den dorsalen Membran-„Ruffles“. Eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen konnte jedoch mit einem biochemischen Ansatz nicht nachgewiesen werden.

Ein verändertes Muster der Promotormethylierung, welches häufig zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgen führt, konnte für SASH1 in epithelialen Tumor-Zelllinien nachgewiesen werden. Insbesondere in SW480-Zellen führt die Promotormethylierung zu einer negativen

Regulation der SASH1-Expression. Eine Transkriptomanalyse zur Ergründung der Rolle von SASH1 ergab im Zuge einer reduzierten SASH1-Expression unter anderem eine ~60-fach erhöhte Rap1A-Expression. Rap1A, eine kleine GTPase, beeinflusst die Zellausbreitung durch die Aktivierung von Rac1 und ist somit ein vielversprechender Kandidat für eine SASH1-Interaktion (Arthur et al., 2004).

Die Lokalisierung von SASH1 im Zellkern lässt auf eine transkriptionsregulatorische Rolle von SASH1 schließen. Aufgrund der erzielten Ergebnisse bei der Interaktion von SASH1 mit Proteinen, die das Aktinzytoskelett regulieren, wird auch für SASH1 eine Zytoskelett-regulierende Funktion, z.B. über kleine GTPasen und Cortactin, und somit eine Funktion in der Adhäsion und der Migration von Tumorzellen postuliert. SASH1 besitzt eine inhibitorische Wirkung auf die Dynamik des Aktinzytoskeletts, wodurch die Herunterregulation in Kolonkarzinomen womöglich zu einem verstärkten Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen führt.

8 Summary

SASH1, a member of the SLY adapter protein family, was identified as a tumor suppressor in breast and colorectal cancer (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003). The downregulation in late tumor stages of carcinoma correlated with an increase in tumor size and poor patient survival (Rimkus et al., 2006; Zeller et al., 2003). Moreover, SASH1 expression was classified as an independent prognostic parameter for patient survival (Rimkus et al., 2006).

In accordance with the downregulation of the SASH1 expression, a loss of heterozygosity (LOH) of the SASH1 locus in the chromosomal region 6q24.3 occurred in 30 % of primary breast cancers (Zeller et al., 2003). In the murine pVillin-Kras^{V12G} model for colon cancer, we observed LOH of the SASH1 locus in intestinal lesions. However, there was no indication for a mutation which would lead to truncation or a loss of function of the residual second allele. Therefore, the question arises how SASH1 is regulated within the tumor. Furthermore, the physiological role of SASH1 remains still elusive.

To identify its biological function and, more specifically, its role in colorectal carcinogenesis, the following tools were generated. To address the question about the putative role of SASH1 in tumorigenesis and metastasis formation, the generation of a conditional and tissue-specific SASH1^{KO} mouse strain has been started. The strategy of the target vector was based on a deletion of the central functional region of SASH1, containing a SH3 and a SAM domain. However, this approach did not result in a successful homologous recombination. In the context of this thesis, an alternative approach was carried out by the development and cloning of a second target vector based on a combination of the Cre/loxP- and the Flp/FRT-system.

Due to the successful generation of a SASH1-specific polyclonal antiserum, the subcellular localization of endogenous SASH1 was characterized for the first time biochemically as well as with cell biological methods. Moreover, the distribution of SASH1 expression was analyzed in murine tissue and cell lines of human origin, showing a ubiquitous expression, highest in brain and lowest in hematopoietic tissue. The co-localization of endogenous SASH1 with the oncoprotein cortactin could be confirmed. Endogenous SASH1 is localized in the nucleus and in F-actin rich regions of the membrane cortex. The co-expression of SASH1 with a constitutively active form of the small GTPase Rac1, a major regulator of the actin cytoskeleton, leads to a high increase in lamellipodia formation and membrane ruffling. There is a close co-localization of SASH1 and Rac1 in dorsal membrane ruffles. However, there was no evidence for a direct biochemical interaction between the two proteins. Based on this data, we propose that SASH1 might play a role in the regulation of the microfilament system by regulating the actin cytoskeleton via, e.g., small GTPases or Cortactin.

The altered methylation of promoter regions is a well documented hallmark of neoplastic cells and represents an important mechanism for inactivation of a tumor suppressor gene. This epigenetic modification was found to negatively regulate the SASH1 expression in SW480 colorectal cancer

cells. Transcriptome analysis identified Rap1A as a candidate downstream target of SASH1. SW480 cells, which displayed a stable SASH1 downregulation, showed a ~60 fold induction of Rap1A expression. Rap1 is a small GTPase involved in cell spreading by modulating the activity of Rac1 (Arthur et al., 2004).

Taken together, the nuclear localization of SASH1 refers to a function of SASH1 as a transcriptional regulator. The findings about the interaction of SASH1 and regulatory proteins of the actin cytoskeleton indicate a role of SASH1 in adhesion and migration of tumor cells. Thus, SASH1 may function as a negative regulator of the actin dynamics in the cytoskeleton. Its downregulation in colorectal carcinoma may result in higher migratory and invasive properties of tumor cells. Finally, the nuclear enrichment of SASH1 may point to a yet unknown contribution to, e.g., gene transcription.

9 Literatur

- Abdollahi, A., D. Pisarcik, D. Roberts, J. Weinstein, P. Cairns, and T.C. Hamilton. 2003. LOT1 (PLAGL1/ZAC1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer. *J Biol Chem.* 278:6041-9.
- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12):3655-63.
- Acevedo, C.M., M. Henriquez, M.R. Emmert-Buck, and R.F. Chuaqui. 2002. Loss of heterozygosity on chromosome arms 3p and 6q in microdissected adenocarcinomas of the uterine cervix and adenocarcinoma in situ. *Cancer.* 94:793-802.
- Alberts, B., Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, JD. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York & London.
- Alcock, H.E., T.J. Stephenson, J.A. Royds, and D.W. Hammond. 2003. Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 37:369-80.
- Arthur, W.T., L.A. Quilliam, and J.A. Cooper. 2004. Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *J Cell Biol.* 167:111-22.
- Astoul, E., A.D. Laurence, N. Totty, S. Beer, D.R. Alexander, and D.A. Cantrell. 2003. Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 278:9267-75.
- Attoub, S., V. Noe, L. Pirola, E. Bruyneel, E. Chastre, M. Mareel, M.P. Wymann, and C. Gespach. 2000. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *Faseb J.* 14:2329-38.
- Austin, S., M. Ziese, and N. Sternberg. 1981. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell.* 25:729-36.
- Aviv, T., Z. Lin, S. Lau, L.M. Rendl, F. Sicheri, and C.A. Smibert. 2003. The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nat Struct Biol.* 10:614-21.
- Bach, S.P., A.G. Renehan, and C.S. Potten. 2000. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis.* 21:469-76.
- Baehs, S., A. Herbst, S.E. Thieme, C. Perschl, A. Behrens, S. Scheel, A. Jung, T. Brabletz, B. Goke, H. Blum, and F.T. Kolligs. 2009. Dickkopf-4 is frequently down-regulated and inhibits growth of colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 276:152-9.
- Bailey-Wilson, J.E., C.I. Amos, S.M. Pinney, G.M. Petersen, M. de Andrade, J.S. Wiest, P. Fain, A.G. Schwartz, M. You, W. Franklin, C. Klein, A. Gazdar, H. Rothschild, D. Mandal, T. Coons, J. Slusser, J. Lee, C. Gaba, E. Kupert, A. Perez, X. Zhou, D. Zeng, Q. Liu, Q. Zhang, D. Seminara, J. Minna, and M.W. Anderson. 2004. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet.* 75:460-74.
- Barghorn, A., E.J. Speel, B. Farspour, P. Saremaslani, S. Schmid, A. Perren, J. Roth, P.U. Heitz, and P. Komminoth. 2001. Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors. *Am J Pathol.* 158:1903-11.

- Barker, N., M. van de Wetering, and H. Clevers. 2008. The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22:1856-64.
- Battle, E., J.T. Henderson, H. Beghtel, M.M. van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson, and H. Clevers. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 111:251-63.
- Becker, N. 2003. [Epidemiology of colorectal cancer]. *Radiologe.* 43:98-104.
- Beer, S., T. Scheikl, B. Reis, N. Huser, K. Pfeffer, and B. Holzmann. 2005. Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice. *Mol Cell Biol.* 25:9646-60.
- Beer, S., A.B. Simins, A. Schuster, and B. Holzmann. 2001. Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells. *Biochim Biophys Acta.* 1520:89-93.
- Bell, D.W., S.C. Jhanwar, and J.R. Testa. 1997. Multiple regions of allelic loss from chromosome arm 6q in malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 57:4057-62.
- Benzinger, A., N. Muster, H.B. Koch, J.R. Yates, 3rd, and H. Hermeking. 2005. Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics.* 4:785-95.
- Bergstrom, A., P. Pisani, V. Tenet, A. Wolk, and H.O. Adami. 2001. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer.* 91:421-30.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16:6-21.
- Boeing, H., J. Wahrendorf, and N. Becker. 1999. EPIC-Germany-A source for studies into diet and risk of chronic diseases. European Investigation into Cancer and Nutrition. *Ann Nutr Metab.* 43:195-204.
- Boland, C.R., M. Koi, D.K. Chang, and J.M. Carethers. 2008. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer.* 7:41-52.
- Borm, B., R.P. Requardt, V. Herzog, and G. Kirfel. 2005. Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization. *Exp Cell Res.* 302:83-95.
- Bos, J.L., J. de Rooij, and K.A. Reedquist. 2001. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:369-77.
- Bos, J.L., E.R. Fearon, S.R. Hamilton, M. Verlaan-de Vries, J.H. van Boom, A.J. van der Eb, and B. Vogelstein. 1987. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature.* 327:293-7.
- Bradley, A., M. Evans, M.H. Kaufman, and E. Robertson. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature.* 309:255-6.
- Buccione, R., J.D. Orth, and M.A. McNiven. 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:647-57.
- Bueno-de-Mesquita, H.B., P. Ferrari, and E. Riboli. 2002. Plant foods and the risk of colorectal cancer in Europe: preliminary findings. *IARC Sci Publ.* 156:89-95.
- Buongiorno, P., V.V. Pethe, G.S. Charames, S. Esufali, and B. Bapat. 2008. Rac1 GTPase and the Rac1 exchange factor Tiam1 associate with Wnt-responsive promoters to enhance beta-catenin/TCF-dependent transcription in colorectal cancer cells. *Mol Cancer.* 7:73.
- Cantin, G.T., W. Yi, B. Lu, S.K. Park, T. Xu, J.D. Lee, and J.R. Yates, 3rd. 2008. Combining protein-based IMAC, peptide-based IMAC, and MudPIT for efficient phosphoproteomic analysis. *J Proteome Res.* 7:1346-51.
- Caron, E. 2003. Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J Cell Sci.* 116:435-40.
- Chakrabarti, S.R., R. Sood, S. Ganguly, S. Bohlander, Z. Shen, and G. Nucifora. 1999. Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7467-72.

- Chakrabarti, S.R., R. Sood, S. Nandi, and G. Nucifora. 2000. Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13281-5.
- Chan, A.Y., S. Raft, M. Bailly, J.B. Wyckoff, J.E. Segall, and J.S. Condeelis. 1998. EGF stimulates an increase in actin nucleation and filament number at the leading edge of the lamellipod in mammary adenocarcinoma cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 2):199-211.
- Charles, P.C., B.D. Alder, E.G. Hilliard, J.C. Schisler, R.E. Lineberger, J.S. Parker, S. Mapara, S.S. Wu, A. Portbury, C. Patterson, and G.A. Stouffer. 2008. Tobacco use induces anti-apoptotic, proliferative patterns of gene expression in circulating leukocytes of Caucasian males. *BMC Med Genomics.* 1:38.
- Chen, R.Q., Q.K. Yang, B.W. Lu, W. Yi, G. Cantin, Y.L. Chen, C. Fearn, J.R. Yates, 3rd, and J.D. Lee. 2009. CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells. *Cancer Res.* 69:2663-8.
- Chhabra, E.S., and H.N. Higgs. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol.* 9:1110-21.
- Choi, M.C., H.S. Jong, T.Y. Kim, S.H. Song, D.S. Lee, J.W. Lee, N.K. Kim, and Y.J. Bang. 2004. AKAP12/Gravin is inactivated by epigenetic mechanism in human gastric carcinoma and shows growth suppressor activity. *Oncogene.* 23:7095-103.
- Choi, M.Y., A.I. Romer, M. Hu, M. Lepourcelet, A. Mechoor, A. Yesilaltay, M. Krieger, P.A. Gray, and R.A. Shivdasani. 2006. A dynamic expression survey identifies transcription factors relevant in mouse digestive tract development. *Development.* 133:4119-29.
- Claudio, J.O., Y.X. Zhu, S.J. Benn, A.H. Shukla, C.J. McGlade, N. Falcioni, and A.K. Stewart. 2001. HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. *Oncogene.* 20:5373-7.
- Coffey, A.J., R.A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G.R. Howell, J.M. Bye, A.P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, R. Pavitt, J. Wilkinson, M. Leversha, E. Huckle, C.J. Shaw-Smith, A. Dunham, S. Rhodes, V. Schuster, G. Porta, L. Yin, P. Serafini, B. Sylla, M. Zollo, B. Franco, A. Bolino, M. Seri, A. Lanyi, J.R. Davis, D. Webster, A. Harris, G. Lenoir, G. de St Basile, A. Jones, B.H. Behloradsky, H. Achatz, J. Murken, R. Fassler, J. Sumegi, G. Romeo, M. Vaudin, M.T. Ross, A. Meindl, and D.R. Bentley. 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet.* 20:129-35.
- Cohen, G.B., R. Ren, and D. Baltimore. 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* 80:237-48.
- Cowieson, N.P., G. King, D. Cookson, I. Ross, T. Huber, D.A. Hume, B. Kobe, and J.L. Martin. 2008. Cortactin adopts a globular conformation and bundles actin into sheets. *J Biol Chem.* 283:16187-93.
- de Vries, J.E., W.N. Dinjens, G.K. De Bruyne, H.W. Verspaget, E.P. van der Linden, A.P. de Bruine, M.M. Mareel, F.T. Bosman, and J. ten Kate. 1995. In vivo and in vitro invasion in relation to phenotypic characteristics of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer.* 71:271-7.
- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.* 303:839-42.
- Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S.A. Beausoleil, C.E. Bakalarski, S.J. Elledge, and S.P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10762-7.
- Didier, E.S., L.B. Rogers, J.M. Orenstein, M.D. Baker, C.R. Vossbrinck, T. Van Gool, R. Hartskeerl, R. Soave, and L.M. Beaudet. 1996. Characterization of Encephalitozoon (Septata) intestinalis isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol.* 43:34-43.
- Dinev, D., B. W. Jordan, B. Neufeld, J.D. Lee, D. Lindemann, U.R. Rapp, S. Ludwig. 2001. Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO Rep* 2(9): 829-34.

- Disanza, A., A. Steffen, M. Hertzog, E. Frittoli, K. Rottner, and G. Scita. 2005. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci.* 62:955-70.
- Dubois, F., F. Vandermoere, A. Gernez, J. Murphy, R. Toth, S. Chen, K.M. Geraghty, N.A. Morrice, and C. Mackintosh. 2009. Differential 14-3-3-affinity capture reveals new downstream targets of PI 3-kinase signaling. *Mol Cell Proteomics.*
- Dustin, M.L. 2005. A dynamic view of the immunological synapse. *Semin Immunol.* 17:400-10.
- Eckhardt, F., J. Lewin, R. Cortese, V.K. Rakyan, J. Attwood, M. Burger, J. Burton, T.V. Cox, R. Davies, T.A. Down, C. Haefliger, R. Horton, K. Howe, D.K. Jackson, J. Kunde, C. Koenig, J. Liddle, D. Niblett, T. Otto, R. Pettett, S. Seemann, C. Thompson, T. West, J. Rogers, A. Olek, K. Berlin, and S. Beck. 2006. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet.* 38:1378-85.
- Egger, G., G. Liang, A. Aparicio, and P.A. Jones. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 429:457-63.
- el Marjou, F., K.P. Janssen, B.H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger, and S. Robine. 2004. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis.* 39:186-93.
- Espina, C., M.V. Cespedes, M.A. Garcia-Cabezas, M.T. Gomez del Pulgar, A. Boluda, L.G. Oroz, S.A. Benitah, P. Cejas, M. Nistal, R. Mangués, and J.C. Lacal. 2008. A critical role for Rac1 in tumor progression of human colorectal adenocarcinoma cells. *Am J Pathol.* 172:156-66.
- Esteller, M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 21:5427-40.
- Evans, M.J., and M.H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292:154-6.
- Faix, J., and K. Rottner. 2006. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol.* 18:18-25.
- Fayard, B., F. Bianchi, J. Dey, E. Moreno, S. Djaffer, N.E. Hynes, and D. Monard. 2009. The serine protease inhibitor nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. *Cancer Res.* 69:5690-8.
- Fearon, E.R., and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61:759-67.
- Ferguson, A.T., E. Evron, C.B. Umbricht, T.K. Pandita, T.A. Chan, H. Hermeking, J.R. Marks, A.R. Lambers, P.A. Futreal, M.R. Stampfer, and S. Sukumar. 2000. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6049-54.
- Fiering, S., E. Epner, K. Robinson, Y. Zhuang, A. Telling, M. Hu, D.I. Martin, T. Enver, T.J. Ley, and M. Groudine. 1995. Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev.* 9:2203-13.
- Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 58:209-14.
- Franks, L.M., and V.J. Hemmings. 1978. A cell line from an induced carcinoma of mouse rectum. *J Pathol.* 124:35-8.
- Fre, S., M. Huyghe, P. Mourikis, S. Robine, D. Louvard, and S. Artavanis-Tsakonas. 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature.* 435:964-8.
- Fre, S., S.K. Pallavi, M. Huyghe, M. Lae, K.P. Janssen, S. Robine, S. Artavanis-Tsakonas, and D. Louvard. 2009. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:6309-14.
- Fujii, H., R. Anbazhagan, D.M. Bornman, E.S. Garrett, E. Perlman, and E. Gabrielson. 2002. Mucinous cancers have fewer genomic alterations than more common classes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 76:255-60.
- Futcher, A.B. 1986. Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol.* 119:197-204.
- Gais, P. 2007. Zelltyp-spezifische Funktionen von TLR-Rezeptoren im angeborenen Immunsystem. In Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München, München. 106.

- Gardiner-Garden, M., and M. Frommer. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 196:261-82.
- Geisse, S., H. Gram, B. Kleuser, and H.P. Kocher. 1996. Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expr Purif.* 8:271-82.
- Gieni, R.S., and M.J. Hendzel. 2009. Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochem Cell Biol.* 87:283-306.
- Gill, G. 2005. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev.* 15:536-41.
- Gillingham, A.K., and S. Munro. 2003. Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta.* 1641:71-85.
- Goel, A., C.N. Arnold, D. Niedzwiecki, D.K. Chang, L. Ricciardiello, J.M. Carethers, J.M. Dowell, L. Wasserman, C. Compton, R.J. Mayer, M.M. Bertagnolli, and C.R. Boland. 2003. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 63:1608-14.
- Golub, T.R., G.F. Barker, M. Lovett, and D.G. Gilliland. 1994. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell.* 77:307-16.
- Golub, T.R., A. Goga, G.F. Barker, D.E. Afar, J. McLaughlin, S.K. Bohlander, J.D. Rowley, O.N. Witte, and D.G. Gilliland. 1996. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol.* 16:4107-16.
- Gomez del Pulgar, T., S.A. Benitah, P.F. Valeron, C. Espina, and J.C. Lacal. 2005. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays.* 27:602-13.
- Gonzalez-Zulueta, M., C.M. Bender, A.S. Yang, T. Nguyen, R.W. Beart, J.M. Van Tornout, and P.A. Jones. 1995. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 55:4531-5.
- Grady, W.M., and J.M. Carethers. 2008. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 135:1079-99.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36:59-74.
- Graham, v.d.E. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 52:456-67.
- Green, J.B., C.D. Gardner, R.P. Wharton, and A.K. Aggarwal. 2003. RNA recognition via the SAM domain of Smaug. *Mol Cell.* 11:1537-48.
- Griffin, P.M., J.M. Liff, R.S. Greenberg, and W.S. Clark. 1991. Adenocarcinomas of the colon and rectum in persons under 40 years old. A population-based study. *Gastroenterology.* 100:1033-40.
- Guo, A., J. Villen, J. Kornhauser, K.A. Lee, M.P. Stokes, K. Rikova, A. Possemato, J. Nardone, G. Innocenti, R. Wetzel, Y. Wang, J. MacNeill, J. Mitchell, S.P. Gygi, J. Rush, R.D. Polakiewicz, and M.J. Comb. 2008. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:692-7.
- Gupton, S.L., and F.B. Gertler. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE.* 2007:re5.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-14.
- Hall, A. 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 28:5-14.
- Hall, A., and C.D. Nobes. 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355:965-70.
- Hamilton, D.L., and K. Abremski. 1984. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol.* 178:481-6.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Hay, R.T. 2006. Role of ubiquitin-like proteins in transcriptional regulation. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 173-92.

- He, Y., L. Hicke, and I. Radhakrishnan. 2007. Structural basis for ubiquitin recognition by SH3 domains. *J Mol Biol.* 373:190-6.
- Herman, J.G., A. Merlo, L. Mao, R.G. Lapidus, J.P. Issa, N.E. Davidson, D. Sidransky, and S.B. Baylin. 1995. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 55:4525-30.
- Higgs, H.N., and T.D. Pollard. 2001. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem.* 70:649-76.
- Hochman, L., N. Segev, N. Sternberg, and G. Cohen. 1983. Site-specific recombinational circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology.* 131:11-7.
- Holzenberger, M., P. Leneuve, G. Hamard, B. Ducos, L. Perin, M. Binoux, and Y. Le Bouc. 2000. A targeted partial invalidation of the insulin-like growth factor I receptor gene in mice causes a postnatal growth deficit. *Endocrinology.* 141:2557-66.
- Hooghe, B., P. Hulpiau, F. van Roy, and P. De Bleser. 2008. ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species. *Nucleic Acids Res.* 36:W128-32.
- Huang, C., J. Liu, C.C. Haudenschild, and X. Zhan. 1998. The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem.* 273:25770-6.
- Iwata, N., H. Yamamoto, S. Sasaki, F. Itoh, H. Suzuki, T. Kikuchi, H. Kaneto, S. Iku, I. Ozeki, Y. Karino, T. Satoh, J. Toyota, M. Satoh, T. Endo, and K. Imai. 2000. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 19:5298-302.
- Jacks, T., T.S. Shih, E.M. Schmitt, R.T. Bronson, A. Bernards, and R.A. Weinberg. 1994. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet.* 7:353-61.
- Jones, P.A., and S.B. Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3:415-28.
- Jones, P.A., and S.M. Taylor. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 20:85-93.
- Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A.P. Wolffe. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 19:187-91.
- Jumarie, C., and C. Malo. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol.* 149:24-33.
- Kaneko, T., L. Li, and S.S. Li. 2008. The SH3 domain- a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci.* 13:4938-52.
- Kanner, S.B., A.B. Reynolds, R.R. Vines, and J.T. Parsons. 1990. Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3328-32.
- Kato, Y., R. I. Tapping, S. Huang, M.H. Watson, R.J. Ulevitch, J.D. Lee. 1998. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395(6703): 713-6.
- Kawai, K., C. Viars, K. Arden, D. Tarin, V. Urquidi, and S. Goodison. 2002. Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer.* 34:1-8.
- Kawasaki, Y., R. Sato, and T. Akiyama. 2003. Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat Cell Biol.* 5:211-5.
- Kawasaki, Y., T. Senda, T. Ishidate, R. Koyama, T. Morishita, Y. Iwayama, O. Higuchi, and T. Akiyama. 2000. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science.* 289:1194-7.
- Kawase, E., H. Suemori, N. Takahashi, K. Okazaki, K. Hashimoto, and N. Nakatsuji. 1994. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol.* 38:385-90.
- Kim, C.A., M.L. Phillips, W. Kim, M. Gingery, H.H. Tran, M.A. Robinson, S. Faham, and J.U. Bowie. 2001. Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J.* 20:4173-82.

- Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 87:159-70.
- Klein, C.A. 2008. The direct molecular analysis of metastatic precursor cells in breast cancer: a chance for a better understanding of metastasis and for personalised medicine. *Eur J Cancer*. 44:2721-5.
- Klein, C.A., and D. Holzel. 2006. Systemic cancer progression and tumor dormancy: mathematical models meet single cell genomics. *Cell Cycle*. 5:1788-98.
- Knudson, A.G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68:820-3.
- Korinek, V., N. Barker, P.J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and H. Clevers. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*. 275:1784-7.
- Kowalski, J.R., C. Egile, S. Gil, S.B. Snapper, R. Li, and S.M. Thomas. 2005. Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J Cell Sci*. 118:79-87.
- Kraus, S., and N. Arber. 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol*.
- Kraynov, V.S., C. Chamberlain, G.M. Bokoch, M.A. Schwartz, S. Slabaugh, and K.M. Hahn. 2000. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*. 290:333-7.
- Kuhn, R., K. Rajewsky, and W. Muller. 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*. 254:707-10.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10:203-9.
- Lacronique, V., A. Boureux, V.D. Valle, H. Poirel, C.T. Quang, M. Mauchauffe, C. Berthou, M. Lessard, R. Berger, J. Ghysdael, and O.A. Bernard. 1997. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*. 278:1309-12.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Larson, S.M., and A.R. Davidson. 2000. The identification of conserved interactions within the SH3 domain by alignment of sequences and structures. *Protein Sci*. 9:2170-80.
- Li, S.S. 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*. 390:641-53.
- Lind, G.E., L. Thorstensen, T. Lovig, G.I. Meling, R. Hamelin, T.O. Rognum, M. Esteller, and R.A. Lothe. 2004. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer*. 3:28.
- Lindvall, J.M., K.E. Blomberg, A. Wennborg, and C.I. Smith. 2005. Differential expression and molecular characterisation of Lmo7, Myo1e, Sash1, and Mcoln2 genes in Btk-defective B-cells. *Cell Immunol*. 235:46-55.
- Lodygin, D., J. Diebold, and H. Hermeking. 2004. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression. *Oncogene*. 23:9034-41.
- Madison, B.B., L. Dunbar, X.T. Qiao, K. Braunstein, E. Braunstein, and D.L. Gumucio. 2002. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem*. 277:33275-83.
- Magdinier, F., and A.P. Wolffe. 2001. Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:4990-5.
- Mahajan, R., C. Delphin, T. Guan, L. Gerace, and F. Melchior. 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*. 88:97-107.
- Mansour, S.L., K.R. Thomas, and M.R. Capecchi. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*. 336:348-52.
- Marshman, E., C. Booth, and C.S. Potten. 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*. 24:91-8.

- Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:7634-8.
- Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:446-54.
- Mayer, B.J. 2001. SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci*. 114:1253-63.
- Mayer, B.J., M. Hamaguchi, and H. Hanafusa. 1988. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature*. 332:272-5.
- McCormick, F. 1999. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*. 9:M53-6.
- Meng, J., D. Vardar, Y. Wang, H.C. Guo, J.F. Head, and C.J. McKnight. 2005. High-resolution crystal structures of villin headpiece and mutants with reduced F-actin binding activity. *Biochemistry*. 44:11963-73.
- Merlo, A., J.G. Herman, L. Mao, D.J. Lee, E. Gabrielson, P.C. Burger, S.B. Baylin, and D. Sidransky. 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*. 1:686-92.
- Mhawech, P., V. Greloz, M. Assaly, and F. Herrmann. 2005. Immunohistochemical expression of 14-3-3 sigma protein in human urological and gynecological tumors using a multi-tumor microarray analysis. *Pathol Int*. 55:77-82.
- Mitelman, F., F. Mertens, and B. Johansson. 1997. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet*. 15 Spec No:417-74.
- Momparler, R.L., and V. Bovenzi. 2000. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol*. 183:145-54.
- Mongioli, A.M., P.R. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W.T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, and P.P. Di Fiore. 1999. A novel peptide-SH3 interaction. *Embo J*. 18:5300-9.
- Morin, P.J., A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 275:1787-90.
- Muller, U. 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*. 82:3-21.
- Mungall, A.J., S.A. Palmer, S.K. Sims, C.A. Edwards, J.L. Ashurst, L. Wilming, M.C. Jones, R. Horton, S.E. Hunt, C.E. Scott, J.G. Gilbert, M.E. Clamp, G. Bethel, S. Milne, R. Ainscough, J.P. Almeida, K.D. Ambrose, T.D. Andrews, R.I. Ashwell, A.K. Babbage, C.L. Bagguley, J. Bailey, R. Banerjee, D.J. Barker, K.F. Barlow, K. Bates, D.M. Beare, H. Beasley, O. Beasley, C.P. Bird, S. Blakey, S. Bray-Allen, J. Brook, A.J. Brown, J.Y. Brown, D.C. Burford, W. Burrill, J. Burton, C. Carder, N.P. Carter, J.C. Chapman, S.Y. Clark, G. Clark, C.M. Clee, S. Clegg, V. Cobley, R.E. Collier, J.E. Collins, L.K. Colman, N.R. Corby, G.J. Coville, K.M. Culley, P. Dhami, J. Davies, M. Dunn, M.E. Earthrowl, A.E. Ellington, K.A. Evans, L. Faulkner, M.D. Francis, A. Frankish, J. Frankland, L. French, P. Garner, J. Garnett, M.J. Ghorri, L.M. Gilby, C.J. Gillson, R.J. Glithero, D.V. Grafham, M. Grant, S. Gribble, C. Griffiths, M. Griffiths, R. Hall, K.S. Halls, S. Hammond, J.L. Harley, E.A. Hart, P.D. Heath, R. Heathcott, S.J. Holmes, P.J. Howden, K.L. Howe, G.R. Howell, E. Huckle, S.J. Humphray, M.D. Humphries, A.R. Hunt, C.M. Johnson, A.A. Joy, M. Kay, S.J. Keenan, A.M. Kimberley, A. King, G.K. Laird, C. Langford, S. Lawlor, D.A. Leongamornlert, M. Leversha, et al. 2003. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*. 425:805-11.
- Myllykangas, S., T. Bohling, and S. Knuutila. 2007. Specificity, selection and significance of gene amplifications in cancer. *Semin Cancer Biol*. 17:42-55.
- Nagy, A., C. Moens, E. Ivanyi, J. Pawling, M. Gertsenstein, A.K. Hadjantonakis, M. Pirity, and J. Rossant. 1998. Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol*. 8:661-4.
- Nakamura, T., K. Tsuchiya, and M. Watanabe. 2007. Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *J Gastroenterol*. 42:705-10.
- Nathke, I.S., L. Hinck, J.R. Swedlow, J. Papkoff, and W.J. Nelson. 1994. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*. 125:1341-52.

- Nowaczyk, M. J., M. T. Carter, M. J. Nowaczyk, M. T. Carter, J. Xu, M. Huggins, G. Raca, S. Das, C.L. Martin, S. Schwartz, R. Rosenfield, D.J. Waggoner. 2008. Paternal deletion 6q24.3: a new congenital anomaly syndrome associated with intrauterine growth failure, early developmental delay and characteristic facial appearance. *Am J Med Genet A* 146(3): 354-60.
- Oakley, M.S., T.F. McCutchan, V. Anantharaman, J.M. Ward, L. Faucette, C. Erexson, B. Mahajan, H. Zheng, V. Majam, L. Aravind, and S. Kumar. 2008. Host biomarkers and biological pathways that are associated with the expression of experimental cerebral malaria in mice. *Infect Immun.* 76:4518-29.
- Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 127:635-48.
- Olson, E.N., H.H. Arnold, P.W. Rigby, and B.J. Wold. 1996. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell.* 85:1-4.
- Osada, H., Y. Tatematsu, Y. Yatabe, T. Nakagawa, H. Konishi, T. Harano, E. Tezel, M. Takada, and T. Takahashi. 2002. Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3sigma in human lung cancers. *Oncogene.* 21:2418-24.
- Pacheco, T.R., N. Oreskovich, and P. Fain. 2004. Genetic heterogeneity in the multiple lentiginos/LEOPARD/Noonan syndromes. *Am J Med Genet A.* 127A:324-6.
- Paine, P.L., L.C. Moore, and S.B. Horowitz. 1975. Nuclear envelope permeability. *Nature.* 254:109-14.
- Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 2005. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol.* 170:793-802.
- Patel, A.S., G.L. Schechter, W.J. Wasilenko, and K.D. Somers. 1998. Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene.* 16:3227-32.
- Patterson, P.H. 1994. Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7833-5.
- Pawson, T., and P. Nash. 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science.* 300:445-52.
- Perathoner, A., D. Pirkebner, G. Brandacher, G. Spizzo, S. Stadlmann, P. Obrist, R. Margreiter, and A. Amberger. 2005. 14-3-3sigma expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 11:3274-9.
- Peterson, A.J., M. Kyba, D. Bornemann, K. Morgan, H.W. Brock, and J. Simon. 1997. A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. *Mol Cell Biol.* 17:6683-92.
- Pham, C.T., D.M. MacIvor, B.A. Hug, J.W. Heusel, and T.J. Ley. 1996. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13090-5.
- Pinto, D., A. Gregorieff, H. Begthel, and H. Clevers. 2003. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 17:1709-13.
- Pinto, D., S. Robine, F. Jaisser, F.E. El Marjou, and D. Louvard. 1999. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J Biol Chem.* 274:6476-82.
- Ponting, C.P. 1995. SAM: a novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. *Protein Sci.* 4:1928-30.
- Powell, S.M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T.M. Bryan, S.R. Hamilton, S.N. Thibodeau, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 359:235-7.
- Pysz, M.A., O.V. Leontieva, N.W. Bateman, J.M. Uronis, K.J. Curry, D.W. Threadgill, K.P. Janssen, S. Robine, A. Velcich, L.H. Augenlicht, A.R. Black, and J.D. Black. 2009. PKCalpha tumor suppression in the intestine is associated with transcriptional and translational inhibition of cyclin D1. *Exp Cell Res.* 315:1415-28.

- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 265:23-32.
- Ramesh, N., T. Morio, R. Fuleihan, M. Worm, A. Horner, E. Tsitsikov, E. Castigli, and R.S. Geha. 1995. CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGM1). *Clin Immunol Immunopathol.* 76:S208-13.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302:1704-9.
- Rimkus, C., M. Martini, J. Friederichs, R. Rosenberg, D. Doll, J.R. Siewert, B. Holzmann, and K.P. Janssen. 2006. Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer. *Br J Cancer.* 95:1419-23.
- Rodrigo, J.P., L.A. Garcia, S. Ramos, P.S. Lazo, and C. Suarez. 2000. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 6:3177-82.
- Rodriguez, C., A. Causse, E. Ursule, and C. Theillet. 2000. At least five regions of imbalance on 6q in breast tumors, combining losses and gains. *Genes Chromosomes Cancer.* 27:76-84.
- Roth, C.L., C. Mastronardi, A. Lomniczi, H. Wright, R. Cabrera, A.E. Mungenast, S. Heger, H. Jung, C. Dubay, and S.R. Ojeda. 2007. Expression of a tumor-related gene network increases in the mammalian hypothalamus at the time of female puberty. *Endocrinology.* 148:5147-61.
- Roth, S., P. Franken, W. van Veelen, L. Blonden, L. Raghoebir, B. Beverloo, E. van Drunen, E.J. Kuipers, R. Rottier, R. Fodde, and R. Smits. 2009. Generation of a tightly regulated doxycycline-inducible model for studying mouse intestinal biology. *Genesis.* 47:7-13.
- Saam, J.R., and J.I. Gordon. 1999. Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. *J Biol Chem.* 274:38071-82.
- Sadowski, P.D. 1995. The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 51:53-91.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-91.
- Salinovich, O., and R.C. Montelaro. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 156:341-7.
- Sancho, E., E. Batlle, and H. Clevers. 2003. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol.* 15:763-70.
- Sauro, H.M., and B.N. Kholodenko. 2004. Quantitative analysis of signaling networks. *Prog Biophys Mol Biol.* 86:5-43.
- Scheikl, T., B. Reis, K. Pfeffer, B. Holzmann, and S. Beer. 2009. Reduced notch activity is associated with an impaired marginal zone B cell development and function in Sly1 mutant mice. *Mol Immunol.* 46:969-77.
- Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 97:695-710.
- Schubel, K.E., W. Chen, L. Cope, S.C. Glockner, H. Suzuki, J.M. Yi, T.A. Chan, L. Van Neste, W. Van Criekinge, S. van den Bosch, M. van Engeland, A.H. Ting, K. Jair, W. Yu, M. Toyota, K. Imai, N. Ahuja, J.G. Herman, and S.B. Baylin. 2007. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet.* 3:1709-23.
- Schuuring, E., E. Verhoeven, S. Litvinov, and R.J. Michalides. 1993. The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol Cell Biol.* 13:2891-98.
- Seidl, K.J., J.P. Manis, A. Bottaro, J. Zhang, L. Davidson, A. Kisselgof, H. Oettgen, and F.W. Alt. 1999. Position-dependent inhibition of class-switch recombination by PGK-neo cassettes

- inserted into the immunoglobulin heavy chain constant region locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3000-5.
- Shridhar, V., J. Staub, B. Huntley, W. Cliby, R. Jenkins, H.I. Pass, L. Hartmann, and D.I. Smith. 1999. A novel region of deletion on chromosome 6q23.3 spanning less than 500 Kb in high grade invasive epithelial ovarian cancer. *Oncogene.* 18:3913-8.
- Shuman, S. 1991. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:10104-8.
- Shuman, S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* 269:32678-84.
- Smithies, O., R.G. Gregg, S.S. Boggs, M.A. Koralewski, and R.S. Kucherlapati. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature.* 317:230-4.
- Srikantan, V., I.A. Sesterhenn, L. Davis, G.R. Hankins, F.A. Avallone, J.R. Livezey, R. Connelly, F.K. Mostofi, D.G. McLeod, J.W. Moul, S.C. Chandrasekharappa, and S. Srivastava. 1999. Allelic loss on chromosome 6Q in primary prostate cancer. *Int J Cancer.* 84:331-5.
- Stapleton, D., I. Balan, T. Pawson, and F. Sicheri. 1999. The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat Struct Biol.* 6:44-9.
- Stein, E., D.P. Cerretti, and T.O. Daniel. 1996. Ligand activation of ELK receptor tyrosine kinase promotes its association with Grb10 and Grb2 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 271:23588-93.
- Stein, E., A.A. Lane, D.P. Cerretti, H.O. Schoecklmann, A.D. Schroff, R.L. Van Etten, and T.O. Daniel. 1998. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev.* 12:667-78.
- Sukumar, S., S. Wang, K. Hoang, C.M. Vanchiere, K. England, R. Fick, B. Pagon, and K.S. Reddy. 1999. Subtle overlapping deletions in the terminal region of chromosome 6q24.2-q26: three cases studied using FISH. *Am J Med Genet.* 87:17-22.
- Tessema, M., R. Willink, K. Do, Y.Y. Yu, W. Yu, E.O. Machida, M. Brock, L. Van Neste, C.A. Stidley, S.B. Baylin, and S.A. Belinsky. 2008. Promoter methylation of genes in and around the candidate lung cancer susceptibility locus 6q23-25. *Cancer Res.* 68:1707-14.
- Theriot, J.A. 1994. Actin filament dynamics in cell motility. *Adv Exp Med Biol.* 358:133-45.
- Thorstensen, L., G.E. Lind, T. Lovig, C.B. Diep, G.I. Meling, T.O. Rognum, and R.A. Lothe. 2005. Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia.* 7:99-108.
- Timpson, P., D.K. Lynch, D. Schramek, F. Walker, and R.J. Daly. 2005. Cortactin overexpression inhibits ligand-induced down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65:3273-80.
- Tjio, J.H., and T.T. Puck. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med.* 108:259-68.
- Tong, A.H., B. Drees, G. Nardelli, G.D. Bader, B. Brannetti, L. Castagnoli, M. Evangelista, S. Ferracuti, B. Nelson, S. Paoluzi, M. Quondam, A. Zucconi, C.W. Hogue, S. Fields, C. Boone, and G. Cesareni. 2002. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science.* 295:321-4.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4.
- Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J.G. Herman, S.B. Baylin, and J.P. Issa. 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:8681-6.
- Toyota, M., M. Ohe-Toyota, N. Ahuja, and J.P. Issa. 2000. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:710-5.
- Trainer, D.L., T. Kline, F.L. McCabe, L.F. Faucette, J. Feild, M. Chaikin, M. Anzano, D. Rieman, S. Hoffstein, D.J. Li, and et al. 1988. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 41:287-96.

- Trinidad, J.C., A. Thalhammer, C.G. Specht, A.J. Lynn, P.R. Baker, R. Schoepfer, and A.L. Burlingame. 2008. Quantitative analysis of synaptic phosphorylation and protein expression. *Mol Cell Proteomics*. 7:684-96.
- Tsai, C.F., Y.T. Wang, Y.R. Chen, C.Y. Lai, P.Y. Lin, K.T. Pan, J.Y. Chen, K.H. Khoo, and Y.J. Chen. 2008. Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics. *J Proteome Res*. 7:4058-69.
- Tsoi, K.K., C.Y. Pau, W.K. Wu, F.K. Chan, S. Griffiths, and J.J. Sung. 2009. Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 7:682-688 e1-5.
- Uchida, T., A. Nakao, N. Nakano, A. Kuramasu, H. Saito, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2001. Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 288:137-41.
- Vainio, H., R. Kaaks, and F. Bianchini. 2002. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev*. 11 Suppl 2:S94-100.
- van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Battle, D. Coudreuse, A.P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, and H. Clevers. 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 111:241-50.
- van Duijnhoven, F.J., H.B. Bueno-De-Mesquita, P. Ferrari, M. Jenab, H.C. Boshuizen, M.M. Ros, C. Casagrande, A. Tjonneland, A. Olsen, K. Overvad, O. Thorlacius-Ussing, F. Clavel-Chapelon, M.C. Boutron-Ruault, S. Morois, R. Kaaks, J. Linseisen, H. Boeing, U. Nothlings, A. Trichopoulou, D. Trichopoulos, G. Misirli, D. Palli, S. Sieri, S. Panico, R. Tumino, P. Vineis, P.H. Peeters, C.H. van Gils, M.C. Ocke, E. Lund, D. Engeset, G. Skeie, L.R. Suarez, C.A. Gonzalez, M.J. Sanchez, M. Dorronsoro, C. Navarro, A. Barricarte, G. Berglund, J. Manjer, G. Hallmans, R. Palmqvist, S.A. Bingham, K.T. Khaw, T.J. Key, N.E. Allen, P. Boffetta, N. Slimani, S. Rinaldi, V. Gallo, T. Norat, and E. Riboli. 2009. Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*. 89:1441-52.
- van Es, J.H., M.E. van Gijn, O. Riccio, M. van den Born, M. Vooijs, H. Begthel, M. Cozijnsen, S. Robine, D.J. Winton, F. Radtke, and H. Clevers. 2005. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*. 435:959-63.
- Verger, A., J. Perdomo, and M. Crossley. 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep*. 4:137-42.
- Vogelstein, B., and K.W. Kinzler. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 9:138-41.
- von Holleben, M. 2008. Functional characterisation of SLy2 as a novel regulator of the actin cytoskeleton. In Institut für Genetik, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Albertus-Magnus Universität, Köln. 1-159.
- Wade, P.A., A. Geggion, P.L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry, and A.P. Wolffe. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet*. 23:62-6.
- Wallrapp, C., F. Muller-Pillasch, S. Solinas-Toldo, P. Lichter, H. Friess, M. Buchler, T. Fink, G. Adler, and T.M. Gress. 1997. Characterization of a high copy number amplification at 6q24 in pancreatic cancer identifies c-myc as a candidate oncogene. *Cancer Res*. 57:3135-9.
- Walther, A., E. Johnstone, C. Swanton, R. Midgley, I. Tomlinson, and D. Kerr. 2009. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 9:489-99.
- Weaver, A.M. 2006. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis*. 23:97-105.
- Weaver, A.M. 2008. Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett*. 265:157-66.
- Weed, S.A., Y. Du, and J.T. Parsons. 1998. Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci*. 111 (Pt 16):2433-43.

- Weed, S.A., A.V. Karginov, D.A. Schafer, A.M. Weaver, A.W. Kinley, J.A. Cooper, and J.T. Parsons. 2000. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 151:29-40.
- Weinberg, R.A. 2007. *The Biology of Cancer.* Garland Science.
- Wiesmann, F., J. Veeck, O. Galm, A. Hartmann, M. Esteller, R. Knuchel, and E. Dahl. 2009. Frequent loss of endothelin-3 (EDN3) expression due to epigenetic inactivation in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 11:R34.
- Wijermans, P.W., M. Lubbert, G. Verhoef, V. Klimek, and A. Bosly. 2005. An epigenetic approach to the treatment of advanced MDS; the experience with the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in 177 patients. *Ann Hematol.* 84 Suppl 1:9-17.
- Williams, C.L. 2003. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal.* 15:1071-80.
- Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 336:684-7.
- Williams, R.T., P.V. Senior, L. Van Stekelenburg, J.E. Layton, P.J. Smith, and M.A. Dziadek. 2002. Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1596:131-7.
- Wu, X., X. Tu, K.S. Joeng, M.J. Hilton, D.A. Williams, and F. Long. 2008. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell.* 133:340-53.
- Yu, H., M.K. Rosen, T.B. Shin, C. Seidel-Dugan, J.S. Brugge, and S.L. Schreiber. 1992. Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science.* 258:1665-8.
- Zarrinpar, A., R.P. Bhattacharyya, and W.A. Lim. 2003. The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE.* 2003:RE8.
- Zeller, C., B. Hinzmann, S. Seitz, H. Prokoph, E. Burkhard-Goettges, J. Fischer, B. Jandrig, L.E. Schwarz, A. Rosenthal, and S. Scherneck. 2003. SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene.* 22:2972-83.
- Zhang, H., G.A. Smolen, R. Palmer, A. Christoforou, S. van den Heuvel, and D.A. Haber. 2004a. SUMO modification is required for in vivo Hox gene regulation by the Caenorhabditis elegans Polycomb group protein SOP-2. *Nat Genet.* 36:507-11.
- Zhang, J., P.Z. Anastasiadis, Y. Liu, E.A. Thompson, and A.P. Fields. 2004b. Protein kinase C (PKC) beta11 induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC iota/Rac 1-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 279:22118-23.
- Zhao, J. 2007. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.* 64:3017-33.
- Zhu, Y.X., S. Benn, Z.H. Li, E. Wei, E. Masih-Khan, Y. Trieu, M. Bali, C.J. McGlade, J.O. Claudio, and A.K. Stewart. 2004. The SH3-SAM adaptor HACS1 is up-regulated in B cell activation signaling cascades. *J Exp Med.* 200:737-47.
- Zoller, M. 2009. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 9:40-55.

10 Anhang

10.1 Sequenzen und Alignments

10.1.1 SH3-Domänen Sequenz von SASH1

gssgssgFCGRARVHTDFTPSPYDSDLKLLKKGDIIDIISKPPMGTWMGLLNKVGTFKFIYVDVLSsgps
sg

10.1.2 SAM-Domänen Sequenz von SASH1

gssgssgGGLTEICRKVPSPGCISSVSDWLISIGLPMYAGTLSTAGFSTLSQVPSLSHTCLQEAGITEER
HIRKLLSAARLFKLPPGPEAMsgpssg

10.1.3 Sequenz-Analyse des ES-Zellklons EPVIIF4

```

E15loxP for (1) -----
E16 rev (1) -----GGGTGATCATGCATATAACTTCGATAAA--TGTATGCTATACGAAG
mSASH1 (4466) CTCTTGTCCTTCCTGTGTCCCTGTTCGCTTGTTCCTCTCTCTAAACTGGATGGGTGATCATG
                                     NsiI
                                     loxP3

```

```

                                     KA →
E15loxP for (1) -----ACCCACTAAGGTTACGAGTATTTCAGTAAAAACGGTTACCAGTAT
E16 rev (45) TTATCTCG-AGGTGTGACCCACTAAGGTTACGAGTATTTCAGTAAAAACGGTTACCAGTAT
mSASH1 (4526) TCACCTTGCAGGTGTGACCCACTAAGGTTACGAGTATTTCAGTAAAAACGGTTACCAGTAT

```

```

E15loxP for (45) TCTAACGTTACCCTTGCCCTTCACTAAGGGCAATAGCGCAGCGTAAGCCCTAGATCCGAG
E16 rev (104) TCTAACGTTACCCTTGCCCTTCACTAAGGGCAATAGCGCAGCGTAAGCCCTAGATCCGAG
mSASH1 (4586) TCTAACGTTACCCTTGCCCTTCACTAAGGGCAATAGCGCAGCGTAAGCCCTAGATCCGAG

```

```

E15loxP for (105) TTTGCTTTTTTGGAGGGCTCTGAACAACCCAAAGTGTTCCTGCTCACAGCCAGCTCCAGGG
E16 rev (164) TTTGCTTTTTTGGAGGGCTCTGAACAACCCAAAGTGTTCCTGCTCACAGCCAGCTCCAGGG
mSASH1 (4646) TTTGCTTTTTTGGAGGGCTCTGAACAACCCAAAGTGTTCCTGCTCACAGCCAGCTCCAGGG

```

```

E15loxP for (165) GACCATGAGGCACCATGAGGACCATGAGGCCTTCTCAGCTCTCCCTGGCCATGACTCCCG
E16 rev (224) GACCATGAGGCACCATGAGGACCATGAGGCCTTCTCAGCTCTCCCTGGCCATGACTCCCG
mSASH1 (4706) GACCATGAGGCACCATGAGGACCATGAGGCCTTCTCAGCTCTCCCTGGCCATGACTCCCG

```

```

E15loxP for (225) GCATCTTCTAAAGGCGTACGGCTACCATGGTAGATTCTAGTTTTTCAACTTGTAAAACATC
E16 rev (284) GCATCTTCTAAAGGCGTACGGCTACCATGGTAGATTCTAGTTTTTCAACTTGTAAAACATC
mSASH1 (4766) GCATCTTCTAAAGGCGTACGGCTACCATGGTAGATTCTAGTTTTTCAACTTGTAAAACATC

```

```

E15loxP for (285) TTGGTCCTGAGAAAATTCACAGGGTTTGCTAAGTTGAATTTTAATAAGTCTCCCCACTCG
E16 rev (344) TTGGTCCTGAGAAAATTCACAGGGTTTGCTAAGTTGAATTTTAATAAGTCTCCCCACTCG
mSASH1 (4826) TTGGTCCTGAGAAAATTCACAGGGTTTGCTAAGTTGAATTTTAATAAGTCTCCCCACTCG

```

```

E15loxP for (345) AATGTTAAGGGGAAGCTTCTCACTACAGGCCAAGTGGTGATGAAGGAATTAGTTCCTTCT
E16 rev (404) AATGTTAAGGGGAAGCTTCTCACTACAGGCCAAGTGGTGATGAAGGAATTAGTTCCTTCT
mSASH1 (4886) AATGTTAAGGGGAAGCTTCTCACTACAGGCCAAGTGGTGATGAAGGAATTAGTTCCTTCT

```

← KA

```

E15loxP for(405) TAAGCCATTAGTGAGTGAGCCTATACACCCCCATCTGCCTGCTAAGCTGGCAGACAGGGA
E16 rev (464) TAAGCCATTAGTGAGTGAGCCTATACACCCCCATCTGCCTGCTAAGCTGGCAGACAGGGA
mSASH1 (4946) TAAGCCATTAGTGAGTGAGCCTATACACCCCCATCTGCCTGCTAAGCTGGCAGACAGGGA

E15loxP for(465) GGCCAGAATATATTATACATGATACTCATCTCTTGATGAGCATAAGGACTATGGGAAA
E16 rev (524) GGCCAGAATATATTATACATGATACTCATCTCTTGATGAGCATAAGGACTATGGGAAA
mSASH1 (5006) GGCCAGAATATATTATACATGATACTCATCTCTTGATGAGCATAAGGACTATGGGAAA

E15loxP for(525) AGTCTGAAGGGTCTGAGGCTGGCTGTGTGACATGGGTCCCATGGCTGGGCCACAGACTCA
E16 rev (584) AGTCTGAAGGGTCTGAGGCTGGCTGTGTGACATGGGTCCCATGGCTGGGCCACAGACTCA
mSASH1 (5066) AGTCTGAAGGGTCTGAGGCTGGCTGTGTGACATGGGTCCCATGGCTGGGCCACAGACTCA

E15loxP for(585) CGTTGATCTTCTTGCTCTGCCTCCCAGGAACACATGCCACCTTCCTGTTCAATGGCTAT
E16 rev (690) CGTTGATCTTCTTGCTCTGCCTCCCAGGAACACATGCCACCTTCCT-----
mSASH1 (5126) CGTTGATCTTCTTGCTCTGCCTCCCAGGAACACATGCCACCTTCCTGTTCAATGGCTAT

E15loxP for(645) GAAGACCTGGACACCTTCAAACCTCTGGAGG-----
E16 rev (684) -----
mSASH1 (5186) GAAGACCTGGACACCTTCAAACCTCTGGAGGAAGAAGACTTAGATGAATTAATATCAGG
  
```

10.1.4 Homologien von Proteinsequenzen der SLY-Adapter-Proteinfamilie

```

mSLy1 (1) -----
mSAMSN1 (1) -----
mSASH1 (1) MEEDAGAASPAPEPEPEVDPARELEPEAGVSESI SRLWTDVMGILDGSLGNIDDLAQQYA

mSLy1 (1) -----
mSAMSN1 (1) -----
mSASH1 (61) DYYNTCFSDVCERMEELRKRVSQDL DVEKPDASPTSLQLRSQIEESLGFCSAVST PEVE

mSLy1 (1) -----
mSAMSN1 (1) -----
mSASH1 (121) RKYPLHKSNSEDGCVGKGDWKKKNKYFWQNF RKNQKGI MRQTSKGEDVGYVASEITMSDE

mSLy1 (1) -----
mSAMSN1 (1) -----
mSASH1 (181) ERIQLMMMVKEKMITIEEALARLKEYEAQHRQSSTLDPADWPDGSYPTLDGSST CNSREQ

mSLy1 (1) -----
mSAMSN1 (1) -----
mSASH1 (241) SDDETEDSVKFKRLHKL VNSTRRVRKLLIRVEEMKKPSTEGGEEHVFENSPVQDERSALY

mSLy1 (1) -----
mSAMSN1 (1) -----
mSASH1 (301) SGVHKKPFFYDGSPEKPPEDDADSLTPSPSSSLDTWGAGRKLVKTF SKGESRGLIKPKK

mSLy1 (1) -----MLRRKPSNASDK EPTQKKKLSLQRSSSFKDF AKSKPSPV VSEKEFNLD
mSAMSN1 (1) -----MLKRKPSNASDK EKHKQPK --RSSSFGNDFRNN S--VSKSDDSI
mSASH1 (361) KMGTFFSYP EEEKAQKVSRLTEGEMKKGLGSLSHGRTCSHGGFDLTNRSLHVGSNNSDP

mSLy1 (51) NIPEDDSGVLTPEDSGKSGK-KLGKWRRAVTSRTMNRKMKMMVKALSEEMGDTLEFGSA
mSAMSN1 (45) HDRELTNGSEEQSKTSSSGG-SLGKVVRA-ISWTMKKKVGKIKALSEEKEEESGEAL
mSASH1 (421) AGKEGDFVYKEVIKSPAPRISLGKVVRS-VKETMRKRMSKYSPPVSEQDSGLDCMPS

mSLy1 (110) SPTSPDCSLDSPGPEKMA----LAFTEQEEREPPSLSRQTS TGSEL CSPGPGSGS FLEES
mSAMSN1 (103) PYRNSDPMI---GTHTEK----ISLKASDSMSLYSGQSSSGITSCSDGTSNRDSFRLD
mSASH1 (477) PASGKPDSEHVDPKPKLKAAGSVE SLRSSLSGSSMSGQTVSTTDSSTSNRE SVKSEDGDD

mSLy1 (166) PAPQYTGPFGRARVHTDFTPSPYDHD SLKLOKGDVIQIVKEKPPVGTWLGLLNGLG SFK
mSAMSN1 (156) DDSPYSGPFCGRAKVHTDFTPSPYD TDSLKIKKGDII DILCKTIPMGMWTGMLNNAVGNFK
mSASH1 (537) EEPYRGPFCGRARVHTDFTPSPYD TDSLKLOKGDII DILSKPEMGTWMLNNAVGNFK

mSLy1 (226) FIYVDVLP EEA VGPVRRSRQSKGKRPKPKTLHEL LERIGEEHTSILLINGYOTLEDFK
mSAMSN1 (216) FIYVDVILEEEAAPKKIKVPRSR--RRENHOTIQEFLERIHLOEYFSTILLINGYETLDDLK
mSASH1 (597) FIYVDVLEEEEEKRPTRRRKRGRPSQPKSVEILLDRINLKEHMPITFLFNGYEDLDTFK

mSLy1 (286) ELRETHL NELNIMDPQHRAKLITAAELILLYDTGSEEAEEGAESSQEPVAHTVSEPKVDI
mSAMSN1 (275) DIKESHLELNIA DPEDRARLLSAAESLLEETTVEHEKESVPLSSNPDILSASQLE-DC
mSASH1 (657) LLEEDLDELNIRDPEHRAVRLTAVELLQEYD SNSDQSG-----SQEKL LVDNQGLSGRS

mSLy1 (346) PRDSGCF---EGSESGRDEAELAGTEEQLOGLSLSGAP-----
mSAMSN1 (334) PRDSGCYI SSENSDNGKEDLES ENLSDMVQKIAITESSD-----
  
```


5-Aza	5-Aza-2'-deoxycytidin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Ethylaminsulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CC	coiled coil
cDNA	complementary DNA
Chr.	chromosomal/Chromosom
Ci	Curie
CIN	chromosomale Instabilität
cre	causes recombination
d	day
d.h.	das heisst
ddH ₂ O	didestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP(s)	Deoxy-Nucleotide-Triphosphates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
ds	doppelsträngig
DTC	disseminated tumor cell
E	Exon
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	embryonaler Fibroblast
EGF/EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor/-Rezeptor
Eph	Ephrin
ES	embryonale Stammzelle
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FC	fold change
FCS	Fetal Calf Serum (Fötale Kälberserum)
FL	full-length
Flp	Flippase
FRT	Flippase Recognition Target
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour
h	human
hc	high concentrated

HGF	hepatozytischer Wachstumsfaktor
HRP	horseradish peroxidase
HSV-tk	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Int	Internes Stück
IP	Immunpräzipitation
KA	kurzer Arm
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KO	knock out
LA	langer Arm
LB	lysogeny broth
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LK	Ladekontrolle
LOH	loss of heterozygosity
loxP	locus X-ing over P1 phage
M	Mol
m	murin
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minute
MIN	Mikrosatelliten-Instabilität
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
n	Anzahl
neo	Neomycin Phosphotransferase
ng	Nanogramm
NLS	nuclear localization sequence
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	pondus Hydrogenii
PKC	Proteinkinase C
PPP	prolinreiche Sequenz
qRT	quantitative real time
R	Resistenz
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium
RT	Raumtemperatur
SAM	sterile alpha motif
VI	

Samsn1	SAM domain, SH3 domain and NLS1
SASH1	SAM and SH3 domain containing protein 1
SDS	sodium-dodecylsulfate
sec	Sekunde
Ser	Serin
SH3	src homology 3
SLy1	SH3 protein expressed in lymphocytes
SOC	Super Optimal with Catabolite Repression
SSC	Sodiumchlorid-sodiumcitrate
β-ME	β-Mercaptoethanol
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSA	Trichostatin A
Tub	Tubulin
U	Unit
ü/N	über Nacht
UICC	Union internationale contre le cancer
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra Violett
V	Volt
v/v	volume per volume
VD	Verdünnung
w/v	weight per volume
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
Z	Zellen
z.B.	zum Beispiel

10.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Aufbau des Dünndarms.	2
Abb. 2	Die häufigsten Krebstodesursachen innerhalb Deutschlands.	4
Abb. 3	Genetisches Modell zur Tumorentstehung am Beispiel des Kolonkarzinoms.	5
Abb. 4	Schematische Darstellung der Familie der murinen SLY-Adapter-Proteine.	9
Abb. 5	Struktur der humanen SH3- und SAM-Domäne von SASH1.	11
Abb. 6	Ko-Lokalisierung von V5-markiertem SASH1 und Cortactin in Lamellipodien und Membran-„Ruffles“.	12
Abb. 7	LOH des <i>SASH1</i> -Lokus in murinen Läsionen des Darms.	14
Abb. 8	<i>SASH1</i> -Expression in Kolonkarzinomen.	15
Abb. 9	Überexpression von V5-markiertem SASH1 erhöht den F-Aktin Gehalt in der Zelle.	15
Abb. 10	Schema über die drei Klassen der Filamente.	16
Abb. 11	Die zwei Hauptmechanismen zur Bildung von Aktinfilamenten.	17
Abb. 12	Die Zellmigration hängt von unterschiedlichen Aktinfilament-Strukturen ab.	18
Abb. 13	Schematische Darstellung von Cortactin.	20
Abb. 14	Immunisierungsprotokoll für die Generierung des polyklonalen anti-SASH1-Antiserums.	37
Abb. 15	Chemischer Aufbau der SulfoLink Koppelung.	38

Abb. 16	Schematischer Aufbau eines Kapillar-Blots. _____	41
Abb. 17	Schematische Darstellung des Topo ^o TA-Systems. _____	45
Abb. 18	Schematische Darstellung der Generierung chimärer Mäuse. _____	60
Abb. 19	Vergleich der affinitätsgereinigten Antiseren in Proteinlysaten aus murinem Gewebe. _____	65
Abb. 20	Vergleich der Antiseren nach erfolgter Affinitätsaufreinigung. _____	66
Abb. 21	Aufhebung der Proteinbanden-Erkennung nach Peptidblockade des Antiserums 1540. _____	67
Abb. 22	Immunfluoreszenz der Peptidblockade an humanen Gewebeschnitten. _____	68
Abb. 23	Murine SASH1-Expression auf mRNA- und Proteinebene. _____	70
Abb. 24	SASH1-Expression in humanen Zelllinien. _____	71
Abb. 25	Starke Expression des SASH1-Transkripts in Hirnregionen und im Darmtrakt. _____	73
Abb. 26	Rekombinantes SASH1 weist eine vorwiegend zytosolische Lokalisierung auf. _____	74
Abb. 27	Lokalisation von endogenem SASH1. _____	74
Abb. 28	Immunhistochemische Färbung humaner Kolorektalkarzinom-Schnitte. _____	75
Abb. 29	SASH1-Nachweis in Kern- und Membranfraktionen. _____	76
Abb. 30	Verstärkte Expression von p16 ^{INK4a} und SASH1 aufgrund von DNA-Demethylierung. _____	77
Abb. 31	Drastische Morphologieänderungen durch Ko-Transfektion von SASH1 und aktivem Rac1. _____	79
Abb. 32	Quantifizierung der Rac1-Aktivität zeigt keine Abhängigkeit von SASH1. _____	80
Abb. 33	Expression von SASH1 in SW480-Zellen. _____	81
Abb. 34	Schema der Klonierungsstrategien. _____	85
Abb. 35	Die Strategie der homologen Rekombination beider Targetvektoren. _____	86
Abb. 36	Positive PCR-Analyse durch homologe Rekombination. _____	87
Abb. 37	Mögliche Formen der durch die Cre-Rekombinase durchgeführten loxP-Deletion. _____	88
Abb. 38	PCR-Analysen der Mausschwanz-DNA. _____	89
Abb. 39	Strategie der Southern Blot Analyse. _____	90
Abb. 40	Southern Blot Analyse der Agouti-Nachkommen der SASH1 ^{3loxP} -Chimären. _____	91
Abb. 41	Quantifizierung der SASH1-Expression in heterozygoten neo ^R -positiven SASH1 ^{3loxP} -Mäusen. _____	93
Abb. 42	Durch GTPasen der Rho-Familie induzierte Strukturveränderungen des F-Aktin-Zytoskeletts. _____	107
Abb. 43	Vier Stadien der Rac1-abhängigen Zellmorphologie und Zellmotilität. _____	108
Abb. 44	Modell für die biologische und tumorrelevante Funktion von SASH1. _____	113

10.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Vergleich der SLY-Adapter-Proteine. _____	9
Tab. 2	Homologievergleich der kodierenden Aminosäure-Sequenzen der SLY-Adapter-Proteine. _____	10
Tab. 3	PCR-Programme für Genotypisierungen ¹ , ES-Screening ² und DNA-Methylierung ³ . _____	49
Tab. 4	Primerspezifische Annealingtemperaturen der qRT-PCR. _____	50
Tab. 5	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele. _____	54
Tab. 6	Pipettierschema der Lipofektamin-Transfektion. _____	58
Tab. 7	Pipettierschema der Kalzium-Phosphat-Transfektion. _____	59
Tab. 8	Überblick der Expressionsanalyse. _____	81
Tab. 9	Gene mit differentiell erhöhter Genexpression aufgrund einer Herunterregulation von SASH1. _____	82
Tab. 10	Gene mit differentiell verminderter Genexpression aufgrund einer Herunterregulation von SASH1. _____	83
Tab. 11	Gene mit differentiell erhöhter Genexpression aufgrund einer SASH1-Überexpression. _____	83
Tab. 12	Auflistung der Genotypen aus Verpaarungen der neo ^R -positiven Chimären-Nachkommen. _____	93
Tab. 13	Auflistung der in der MACS ^o -Analyse am häufigsten detektierten Peptide. _____	111

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während der vergangenen Jahre großartig unterstützt haben.

Meinen wirklich, wirklich ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Klaus-Peter Janssen (dem „Klaus-Jürgen“) aussprechen. In erster Linie möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe „Molekulare Tumorbilogie“ eine interessante und vielseitige Doktorarbeit durchzuführen. Bedanken möchte ich mich aber vor allem für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, die Offenheit gegenüber allen Fragen und Problemen und die Aufrechterhaltung der Moral bei dem nicht immer ganz einfachen Thema.

Herrn Prof. Dr. Dirk Haller danke ich, dass er die Betreuung der Arbeit von Seiten der Fakultät Weihenstephan übernommen hat. Eine große Hilfe waren ebenfalls Herr Prof. Dr. Bernhard Holzmann und Dr. Melanie Laschinger, deren Denkanstöße immer zur rechten Zeit kamen und neue Impulse setzten.

SASH1 brachte einen kleinen, aber feinen Kreis an Mitstreitern mit sich, denen ich an dieser Stelle ebenfalls für den regen Informationsaustausch danken möchte. Gemeinsam mit Christoph Klein (Universität Regensburg), Teresa Pacheco (USA) und Sandra Beer (Universität Düsseldorf) werden wir als Pioniere der SLY-Adapterproteinfamilien-Forschung in die Geschichte eingehen.

Dr. Markus Gerhard und Dr. Markus Moser möchte ich für die Hilfe bei der *in situ*-Hybridisierung bzw. bei der Immunisierung der Kaninchen danken.

Die Zeit wird mir dank meiner Kolleginnen immer positiv in Erinnerung bleiben. Alex, Widya und Larissa aus dem Janssen-Labor und Patricia, Karin, Gabriela, Felicitas und Julia, ich danke euch allen für die, trotz hohem Östrogen-Anteil, tolle Stimmung im Labor und die immer sehr unterhaltenden Mittagspausen in unserer Küche und „unserem“ Garten. Hier möchte ich Alex erwähnen, die als einzige die volle Zeit meiner Doktorarbeit mit mir im Janssen-Labor verbrachte und mit mir die Freuden und das Leid der SASH1-Charakterisierung teilte. Ihrer großzügigen Zeitschriften-Freigabe ist es zu verdanken, dass ich nun auf dem Laufenden bezüglich sämtlicher Königshäuser, Stars und Sternchen bin (Die habens echt auch nicht leicht...!) Und auch Karin möchte ich erwähnen, da dank ihr die Abende im Labor nicht ganz so einsam waren.

Innerhalb dieser Jahre gab es einen großen Wechsel an Kollegen, der nicht immer schwangerschaftsbedingt sein musste. Ich möchte deshalb auch zwei Ehemalige in meiner Danksagung erwähnen. Fr. nunmehr Dr. Petra Gais danke ich, dass ich nicht alleine durch das freudlose Tal der ES-Zellkultur und Elektroporation schreiten musste. Und auch Dani Mayr möchte ich für die Klonierung des ersten Targetvektors danken.

Zuletzt geht mein Dank an meine Familie, die mich die langen Jahre meines Studiums und meiner Dissertation unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben. Es ist gut zu wissen, dass es euch gibt.

Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Melanie Martini
Geburtsdatum 23. März 1977 in Bad Cannstatt
Staatsangehörigkeit deutsch
Institutsadresse Klinikum rechts der Isar
Chirurgie
Klinische Forschergruppe „Molekulare Tumorbologie“
Ismaninger Str. 22
81675 München
Germany
Phone: (0049-) 089-4140 4016
Fax: (0049-) 089-4140 6031

Bildungsweg

2005 - Dissertation an der **Technischen Universität München** am **Klinikum rechts der Isar, München, Germany**.
Fakultät: Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Thema: „**Charakterisierung der physiologischen Funktion des neuartigen Tumorsuppressors SASH1 und seiner Rolle in der Tumorgenese**“

2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ökotoxikologie der **Universität Konstanz**, Prof. Dr. D.R. Dietrich
Titel: „**Production of monoclonal antibodies against ochratoxin A.**“

1997 - 2003 Studium der Biologie (Diplom) an der **Universität Konstanz**

1987 - 1996 **Herzog-Christoph-Gymnasium Beilstein**
Abschluss: Abitur

Publikationen

Rimkus C, Martini M, Friederichs J, Rosenberg R, Doll D, Siewert JR, Holzmann B, Janssen KP. Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer. *Br J Cancer*. 2006 Nov 20;95(10):1419-23.