

Deutsches Institut für Ernährungsforschung
Abteilung Ernährungstoxikologie

**Konstruktion und toxikologische Nutzung
von transgenen Mäusen mit den allelischen Varianten von
humanen *SULT1A*-Genen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Ernährungstoxikologie"

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Korinna Wend

Nuthetal, 2009

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4205/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-42052>
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-42052>

„Mit der Größe der Aufgaben wächst die Kraft des Geistes.“

Friedrich Schiller

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Sulfotransferasen.....	1
1.1.1	Humane Sulfotransferasen	2
1.1.2	Bioaktivierung durch SULT am Beispiel des heterozyklischen aromatischen Amins 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin	4
1.1.3	Genetische Polymorphismen der humanen Gene <i>SULT1A1</i> und <i>SULT1A2</i>	7
1.2	Modellsysteme in der Toxikologie	9
1.3	Zielstellung.....	12
2.	Material und Methoden.....	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte.....	13
2.1.2	Chemikalien	15
2.1.3	Antikörper	16
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.5	Reaktionskits	17
2.1.6	Enzyme.....	17
2.1.7	Software.....	18
2.1.8	DNA-Leitern, Random-Primer	18
2.1.9	Biologische Materialien	18
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1.1	DNA-Isolierung aus Geweben	19
2.2.1.2	DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen von Mäusen	20
2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion	20
2.2.1.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse	21
2.2.1.5	Agarosegelelektrophorese.....	22
2.2.1.6	RNA-Isolierung aus Geweben	23
2.2.1.7	Reverse Transkription	24
2.2.1.8	Real-Time-PCR	25
2.2.1.9	Künstliche Gen-Konstrukte	27

2.2.1.10	BAC-/PAC-Präparation	28
2.2.1.11	Restriktionsverdau für Mikroinjektion	28
2.2.1.12	Pulsed-Field-Gelelektrophorese	29
2.2.1.13	Isolierung der Genkonstrukte aus BAC-/PAC-DNA	30
2.2.1.14	Mikroinjektion.....	31
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.2.2.1	Cytosolherstellung aus murinen Geweben	33
2.2.2.2	Cytosolherstellung aus Bakterien	34
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.2.2.4	Western Blot	35
2.2.2.5	Immundetektion	36
2.2.2.6	Immunhistochemische Färbungen.....	37
2.2.2.7	Aktivitätsbestimmung mit <i>p</i> -Nitrophenol als Substrat.....	39
2.2.3	Bestimmung von DNA-Addukten mittels ³² P-Postlabelling.....	40
2.2.4	Versuchstiere	41
2.2.5	Statistische Datenauswertung	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Entwicklung transgener Mauslinien.....	43
3.1.1	Bearbeitung der Genkonstrukte	43
3.1.2	Mikroinjektion	46
3.1.3	Überprüfung der Integration der humanen <i>SULT1A</i> -Gene in den Foundertieren.....	46
3.1.4	Überprüfung der <i>SULT1A</i> -Genotypen der Foundertiere	48
3.1.5	Überprüfung der Weitergabe der humanen <i>SULT1A</i> -Gene an die Nachkommen	49
3.1.6	Überprüfung der <i>SULT1A</i> -Genotypen in den Nachkommen.....	50
3.1.7	Übersicht über die entwickelten transgenen Mauslinien	51
3.2	Charakterisierung der transgenen Mauslinien	53
3.2.1	Charakterisierung der in das Mausgenom insertierten humanen DNA ...	53
3.2.2	Bestimmung der Kopienzahl des Transgens	54
3.2.3	Gewebeverteilung des humanen <i>SULT1A1</i> -Proteins	56

3.2.4	Zelluläre und subzelluläre Lokalisation des humanen SULT1A1-Proteins	61
3.2.5	Sequenzanalyse des codierenden Bereiches der humanen <i>SULT1A1</i> -Allele	73
3.2.6	Sequenzanalyse der 5'-flankierenden Region des humanen <i>SULT1A1</i> -Gens.....	75
3.2.7	RNA-Expressionsanalyse der humanen SULT1A1	76
3.2.8	Enzymaktivitätsbestimmung mit <i>p</i> -Nitrophenol als Substrat	79
3.3	Vergleich der Bioaktivierung von PhIP in den transgenen und Wildtyp-Tieren.....	83
4.	Diskussion.....	86
4.1	Konstruktion transgener Mauslinien.....	86
4.2	hSULT1A1-Protein-Expressionsanalysen in den transgenen Mäusen.....	89
4.3	Sequenzanalysen	92
4.4	hSULT1A1-cDNA-Expressionsanalysen in den transgenen Mäusen.....	95
4.5	Aktivitätsnachweis für das humane SULT1A1-Protein.....	98
4.6	PhIP-DNA-Adduktbildung	99
5.	Zusammenfassung	105
6.	Summary	108
7.	Literaturverzeichnis.....	111
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	124
9.	Anhang	127
9.1	Anhang I	127
9.2	Anhang II	130
9.3	Anhang III	134
9.4	Anhang IV	139
	Publikationen	140

Lebenslauf.....	141
Erklärung zur Dissertation	142
Danksagung	143

1. Einleitung

1.1 Sulfotransferasen

Die Sulfokonjugation ist ein häufiger finaler Schritt in der Biotransformation von Substanzen und ist oftmals mit der Inaktivierung dieser assoziiert. Die Sulfonierung von höhermolekularen endogenen Strukturen mit Protein-Tyrosin-Bestandteilen (Ouyang *et al.* 1998) und Kohlenhydrat-Anteilen (Bowman *et al.* 1999) wird von membrangebundenen Sulfotransferasen katalysiert. Die Aktivitäten der membrangebundenen Sulfotransferasen im Fremdstoffmetabolismus sind bislang nicht bekannt. Die löslichen Sulfotransferasen (SULT) spielen eine bedeutende Rolle in der Biotransformation von endogenen Molekülen wie Steroiden, Katecholaminen und Thyroidhormonen und exogenen niedermolekularen Substanzen (Falany 1997; Weinshilboum *et al.* 1997; Coughtrie *et al.* 1998). Sie können in einer Gensuperfamilie zusammengefasst werden (Yamazoe *et al.* 1994; Weinshilboum *et al.* 1997). Die SULT werden nach Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen in Familien (Identität der Aminosäuren mindestens 45%) und in Subfamilien (Identität der Aminosäuren mindestens 60%) klassifiziert (Weinshilboum *et al.* 1997; Blanchard *et al.* 2004). Die orthologen Formen werden gleich benannt, wobei die humanen Sulfotransferase-Gene und Genprodukte sich grundsätzlich durch Großschreibung (z.B. SULT1A1) von den Sulfotransferase-Genen von Ratten und Mäusen (Kleinschreibung, z.B. Sult1a1) unterscheiden. Die Genprodukte der Nager werden ebenfalls groß geschrieben. Diese Nomenklatur ist entsprechend dem HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org>) und Mouse Genome Informatics (MGI, <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen>).

1.1.1 Humane Sulfotransferasen

Im humanen Genom sind 13 *SULT*-Gene und fünf Pseudogene identifiziert worden (Freimuth *et al.* 2004). Diese sind in vier humane *SULT*-Familien klassifiziert (*SULT*1, 2, 4, 6) (Weinshilboum *et al.* 1997; Blanchard *et al.* 2004). Die bekannten Gene codieren für 13 Enzyme: *SULT*1A1, 1A2, 1A3, 1A4, 1B1, 1C1, 1C2, 1C3, 1E1, 2A1, 2B1a, 2B1b und 4A1 (Fujita *et al.* 1997; Her *et al.* 1997; Weinshilboum *et al.* 1997; Her *et al.* 1998; Sakakibara *et al.* 1998; Wang *et al.* 1998; Falany *et al.* 2000). Dabei sind die *SULT*1A3 und *SULT*1A4 zwei unterschiedliche Gene, die eine identische Aminosäuresequenz codieren. Die *SULT*1A4 wird als Genduplikation der *SULT*1A3 angesehen (Hildebrandt *et al.* 2004). Beim *SULT*2B1-Gen gibt es die Isoformen 2B1a und 2B1b, die einen unterschiedlichen N-Terminus aufweisen. Bei der *SULT*6B1 konnte bislang nur die cDNA im Hoden nachgewiesen werden (Freimuth *et al.* 2004), wohingegen bei der *SULT*1C3 noch keine cDNA detektiert werden konnte.

Die Aktivitäten der *SULT* zu verschiedenen Substraten spiegeln die ausgeprägten Unterschiede in der Gewebeverteilung, Inhibitorsensitivität und thermischen Inaktivierung wieder (Glatt *et al.* 2001). Die Subfamilie 1A codiert für Enzyme, die bevorzugt phenolische Substrate metabolisieren (Yamazoe *et al.* 1994). Im Gegensatz zu allen bekannten Nichtprimatenspezies besteht die humane Subfamilie 1A aus vier Mitgliedern (*SULT*1A1, 1A2, 1A3, 1A4), welche sich durch eine hohe Sequenzübereinstimmung auszeichnen (zwischen *SULT*1A1 und *SULT*1A2 96%; zwischen *SULT*1A1 und *SULT*1A3/1A4 93% und zwischen *SULT*1A2 und *SULT*1A3/1A4 90%) (Dooley 1998). Ferner sind alle drei Gene auf dem Chromosom 16 lokalisiert (Dooley *et al.* 1994; Dooley *et al.* 1996). Die hohe Übereinstimmung der Sequenzen und die benachbarte Lage auf dem Chromosom 16 deuten auf eine Entstehung durch Duplikation eines Ursprungsgens hin. Die Gene bestehen aus multiplen 5'-nicht-codierenden Exons und sieben codierenden Exons und sind durch unterschiedliche Gengrößen gekennzeichnet (*SULT*1A1 ca. 4,4 kb; *SULT*1A2 ca. 5,1 kb; *SULT*1A3/1A4 ca. 7,3 kb) (Freimuth *et al.* 2004).

Die Expression der humanen *SULT*1A1 ist am stärksten in Leber (Falany *et al.* 1990; Ozawa *et al.* 1998), Ileum und Colon (Teubner *et al.* 2007) und ist nachweisbar in vielen anderen Geweben (Glatt *et al.* 2001). Das Expressionsniveau der *SULT*1A2 ist sehr viel geringer als das der *SULT*1A1.

Schwache Proteinexpressionen konnten in Leber, Colon, Caecum und Ileum (Meinl *et al.* 2006; Teubner *et al.* 2007) nachgewiesen werden. SULT1A-Enzyme beim Menschen zeigen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Expression, im Gegensatz zur murinen SULT1A1, wo höhere RNA-Gehalte in weiblichen Tieren in der Leber (Alnouti *et al.* 2006), Milz, Herz und Niere (Tamura *et al.* 1999) im Vergleich zu männlichen Tieren ermittelt werden konnten.

Die vier Mitglieder der humanen Subfamilie 1A sind am Metabolismus von endogenen Substanzen und Fremdstoffen beteiligt. Die humanen SULT1A1- und SULT1A2-Enzyme katalysieren spezifisch Reaktionen im Fremdstoffmetabolismus, wohingegen die SULT1A3/1A4 im endogenen Stoffwechsel die Hauptfunktionen haben. Daraus entwickelte sich ein großes Substratspektrum im Gegensatz zur orthologen murinen Form. Die SULT1A1 zeichnet sich durch eine breite Substrattoleranz aus und ist an der Ausscheidung einer Vielzahl phenolischer Substanzen und anderer Substrate beteiligt. Endogene Substrate der SULT1A1 sind Iodothyronine (Anderson *et al.* 1995) und Östrogene (Falany *et al.* 1997). Durch die breite Substrattoleranz können auch Promutagene, wie hydroxyliertes 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridin [*N*-OH-PhIP, (Muckel *et al.* 2002)] oder hydroxyliertes 1-Methylpyren [1-HMP, (Glatt 2003)] aktiviert werden. Bei der SULT1A2 sind Hydroxylamine und Hydroxamsäuren (Meinl *et al.* 2002) bevorzugte Substrate. Auch ist dieses Enzym in der Lage, verschiedene Promutagene zu aktivieren und hat die höchste Aktivierungseffizienz für *N*-Hydroxy-2-acetyl-aminofluoren, einem potenten Nager-Leberkanzerogen (Heflich *et al.* 1994; Meinl *et al.* 2002).

Durch die ausgeprägte Gewebeverteilung und die breite Substrattoleranz hat die humane SULT1A1 eine besondere Bedeutung im Metabolismus von endogenen Substanzen und Xenobiotika.

1.1.2 Bioaktivierung durch SULT am Beispiel des heterozyklischen aromatischen Amins 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin

Die biologische Funktion von SULT ist die Katalysation des Transfers der Sulfogruppe vom Ko-Faktor 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf nukleophile Akzeptorgruppen von Substraten (z.B. Hydroxyl-, Thiol- oder Aminogruppen). Durch diese Sulfokonjugation wird im Allgemeinen die Wasserlöslichkeit der Metabolite erhöht und deren Fähigkeit zur Durchdringung der Zellmembran verhindert. Während die Bildung von chemisch stabilen Sulfokonjugaten oftmals assoziiert ist mit Inaktivierung und Detoxifizierung, können auch chemisch instabile Sulfokonjugate gebildet werden. Die aus O-Sulfonierung resultierende Sulfatgruppe ist elektronenziehend und stellt eine gute Abgangsgruppe in bestimmten Positionen dar. Eine solche nicht-enzymatische heterolytische Abspaltung wird begünstigt, wenn das gebildete Kation durch Mesomerie stabilisiert werden kann. Daher sind zahlreiche Sulfokonjugate von benzyllischen und allyllischen Alkoholen sowie von aromatischen Hydroxylaminen kurzlebig und elektrophil. Gebildete Kationen können mit der DNA und anderen zellulären Nukleophilen reagieren. Dies begünstigt eine potentiell mutagene und kanzerogene Wirkung. Eine große Zahl von Promutagenen und Prokanzerogenen sind bekannt, die durch Sulfotransferasen aktiviert werden können (Glatt *et al.* 1994; Miller 1994; Glatt 1997; Glatt *et al.* 1998; Glatt 2000).

Die ersten Hinweise auf die Bildung kanzerogener Substanzen bei der Zubereitung von Fleisch brachten Experimente eines Schweden (Widmark 1939). Ein Extrakt von geröstetem Pferdefleisch auf Mäusehaut gepinselt, führte zu einem vermehrten Auftreten von Tumoren. Bakterielle Mutagenitätstests konnten zeigen, dass beim Braten von Fisch und Fleisch mutagene Substanzen entstehen, die im aufsteigenden Rauch und im Bratgut selbst zu finden sind (Nagao *et al.* 1977; Sugimura *et al.* 1977). Durch weitere Untersuchungen konnten in den folgenden Jahren etwa 20 heterozyklische aromatische Amine (HAA) identifiziert werden. Die strukturelle Verwandtschaft dieser HAA liegt im Vorhandensein eines heterozyklischen aromatischen Ringes und einer exozyklischen Aminogruppe. Die in gebratenem Fisch und Fleisch am häufigsten detektierten HAA sind

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) und 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]chinoxalin (MeIQx).

Das heterozyklische aromatische Amin PhIP wurde 1986 aus gebratenem Rindfleisch isoliert (Felton *et al.* 1986). Die Bildung wurde in Modellsystemen nachvollzogen, sie kann durch hitzebedingte Kondensation von Kreatinin und Aminosäuren in An-/Abwesenheit von Glukose erfolgen (Shioya *et al.* 1987). Für PhIP beträgt die durchschnittliche Aufnahme 100-1000 ng PhIP/Tag/Person (Layton *et al.* 1995; Butler *et al.* 2003). Während die meisten untersuchten HAA primär Leberkanzerogene generierten, wurden durch PhIP in der Regel keine Lebertumoren gebildet. Vielmehr konnten in Ratten Colon- und Mammatumoren (Ito *et al.* 1991), Prostata Tumoren (Shirai *et al.* 1997) und in Mäusen Lymphome in Milz und den Lymphknoten (Esumi *et al.* 1989), sowie in C57BL/N6-Mäusen Adenokarzinome des Dünndarms (Ochiai *et al.* 2002) nachgewiesen werden. Damit kann PhIP Tumoren in drei Geweben (Darm, Mamma, Prostata) induzieren, die zu denjenigen gehören mit den höchsten Tumorinzidenzen bei Menschen in der westlichen Welt (Sinha *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999).

Die Prinzipien des PhIP-Metabolismus sind in Mensch, Ratte und Maus ähnlich. Dabei wird PhIP, wie auch andere HAA, nach der Aufnahme im Organismus in komplexer Weise über verschiedene Stoffwechselwege metabolisiert. PhIP selbst ist nicht reaktiv, sondern wird erst nach metabolischer Aktivierung zu einem Mutagen. Die Metabolisierung und Ausscheidung der HAA erfolgt größtenteils über die Bildung stabiler Sulfo- und Glucuronsäurekonjugate an den Hydroxylgruppen der Metaboliten oder der Muttersubstanzen. Eine Ausscheidung von PhIP wird ermöglicht durch eine Konjugation an der exozyklischen Aminogruppe durch die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase (UGT) unter der Bildung des PhIP-*N*²-Glucuronids (Abbildung 1). Über den Weg der Hydroxylierung durch Cytochrom P450-Enzyme (CYP) werden 4'-OH-PhIP und *N*-OH-PhIP gebildet. Diese können in folgenden Konjugationsreaktionen durch SULT und UGT zu hydrophilen Metaboliten modifiziert und damit über Urin und Galle ausgeschieden werden. Die gebildeten Metabolite sind PhIP-4'-Sulfat, PhIP-4'-Glucuronid, *N*-OH-PhIP-*N*³-Glucuronid und *N*-OH-PhIP-*N*²-Glucuronid. Auch PhIP und 4'-OH-PhIP werden exkretiert (Malfatti *et al.* 1999; Kulp *et al.* 2000). Der primäre Schritt der Bioaktivierung zum proximalen Mutagen besteht in der *N*-Hydroxylierung der exozyklischen Aminogruppe hauptsächlich durch das

CYP1A2-Enzym. Es konnte in *mCyp1a2-knock out*-Mäusen allerdings das *N3*-Glucuronid von *N*-Hydroxy-PhIP als einer der Hauptmetaboliten nachgewiesen werden (Chen *et al.* 2007). Dies verdeutlicht, dass neben CYP1A2 weitere Enzyme, wie CYP1A1 und CYP1B1 (Wallin *et al.* 1990; Edwards *et al.* 1994; Crofts *et al.* 1997; Crofts *et al.* 1998), die *N*-Hydroxylierung von PhIP katalysieren können. Das gebildete *N*-Hydroxid kann durch *N*-Acetyltransferasen (NAT) und SULT zu Acetat- bzw. Sulfatestem umgesetzt werden, welche heterolytisch in Acetat bzw. Sulfat und ein Nitreniumion zerfallen. Das Nitreniumion ist ein starkes Elektrophil und kann an Nukleophile (z.B. DNA) binden.

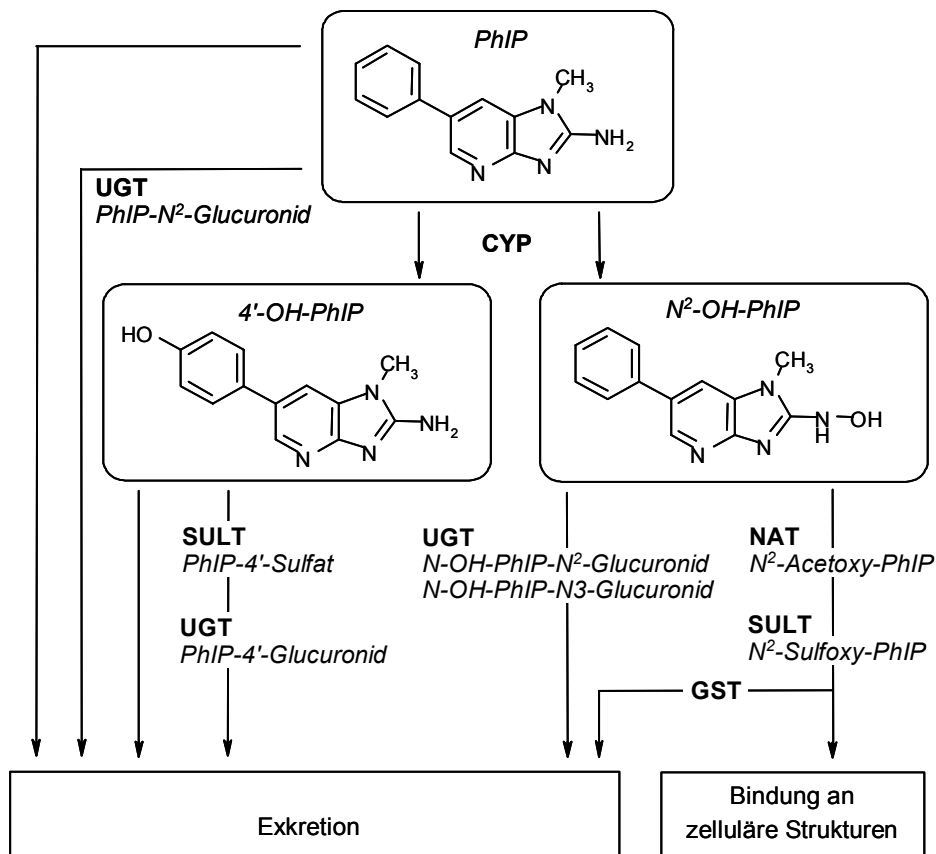


Abbildung 1: Grundzüge des PhIP-Metabolismus in Säugetieren. Dargestellt sind die Strukturen der Muttersubstanz PhIP und der Phase I-Metaboliten 4'-OH-PhIP sowie *N*-OH-PhIP. In Fettdruck sind die beteiligten Enzymfamilien abgebildet: CYP: Cytochrom P450-Enzyme, UGT: Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen, SULT: lösliche Sulfotransferasen, NAT: *N*-Acetyltransferasen. In kursiver Schrift sind die gebildeten Metabolite dargestellt.

1.1.3 Genetische Polymorphismen der humanen Gene *SULT1A1* und *SULT1A2*

Die biochemischen Untersuchungen von humanen Sulfotransferasen offenbarten interindividuelle Aktivitätsunterschiede der Enzyme in den untersuchten Populationen. Dabei lag der Fokus hauptsächlich auf den phenolischen SULT (*SULT1A1* und *SULT1A3*), wobei als Enzymquelle die Thrombocyten dienten (Weinshilboum 1988; Weinshilboum 1990; Weinshilboum *et al.* 1994). Zur Aufklärung der Fragen, was die molekulare Basis und worin die physiologischen Konsequenzen dieser Unterschiede liegen, wurden biochemische und genetische Studien durchgeführt. Zwillings- und Familien-Kohorten-Studien legten nahe, dass die Variationen der Enzymaktivität der *SULT1A1* genetischen Ursprungs sind (Price *et al.* 1989). Zusätzlich zur Variation in der Enzymaktivität wurde auch die Variation in der thermalen Stabilität einem genetischen Polymorphismus zugeschrieben (Van Loon *et al.* 1984). Die Klonierung humaner *SULT1A1*-cDNAs bewies schließlich die Existenz verschiedener Varianten in der codierenden Region des *SULT1A1*-Gens. Die zwei häufigsten allelischen Varianten sind *SULT1A1*1* und *SULT1A1*2*. Dabei führt eine Transition von G⁶³⁸ zu A zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an der Position 213 des Proteins (Raftogianis *et al.* 1997). Die Aminosäuresubstitution nach Histidin korreliert mit einer geringeren Thermostabilität in Thrombocyten (Raftogianis *et al.* 1997). Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen einer geringen Enzymaktivität und einer reduzierten Enzymmenge in Thrombocyten hergestellt werden (Jones *et al.* 1993). Wie allerdings der Einzelnukleotidaustausch zu einer geringeren Enzymaktivität, Proteinexpression und Thermostabilität führt, konnte bislang nicht endgültig bewiesen werden. Publierte Daten suggerieren einen schnelleren Abbau durch den Proteasom-Komplex (Raftogianis 2001; Nagar *et al.* 2006). Die Tatsache, dass das humane *SULT1A1*-Enzym eine wichtige Rolle sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Inaktivierung spielt und diese je nach Genotyp Krankheiten beeinflussen konnten, macht es zu einem Objekt in epidemiologischen Studien. Ergebnisse aus diesen Studien verdeutlichen eine unterschiedliche globale Verteilung der Allele. Während das *SULT1A1*2*-Allel in der kaukasischen Bevölkerung mit 30-35% das häufigste *2-Allel darstellt, wird bei

der asiatischen Bevölkerung (Chinesen, Japaner) eine deutlich höhere *SULT1A1*1*-Allelfrequenz ermittelt (Ozawa *et al.* 1998; Coughtrie *et al.* 1999; Engelke *et al.* 2000; Carlini *et al.* 2001). Afro-Amerikaner haben eine erhöhte Frequenz des *SULT1A1*3*-Allels - Substitution von Methionin zu Valin an Position 223 - in Assoziation mit einer verminderten Allelfrequenz für *SULT1A1*1*. Die Frequenz für das *SULT1A1*2*-Allel entspricht der Situation der kaukasischen Bevölkerung. Diese Unterschiede in verschiedenen ethnischen Populationen zeigen die Varianz in der Sulfonierungskapazität durch Sulfotransferasen. Neben den inter-ethnischen Variationen führen auch andere Faktoren wie Umwelt und Ernährung zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen in epidemiologischen Studien. So wurde bei Personen, die homozygot für *SULT1A1*1* sind, ein reduziertes Risiko, einen colorectalen Krebs zu entwickeln, beschrieben (Bamber *et al.* 2001). Eine andere Studie mit Brustkrebspatienten konnte zeigen, dass Patienten ein erhöhtes Krebsrisiko hatten mit dem *SULT1A1*1*-Genotyp, wenn sie gut durchgebratenes, rotes Fleisch verzehrten (Zheng *et al.* 2001). Die gleiche Studie fand auch ein allgemein erhöhtes Risiko für Brustkrebs in Assoziation mit dem *SULT1A1*2*-Allel. Eine Metaanalyse in 2008 konnte dagegen lediglich eine Assoziation mit dem *SULT1A1*2*-Allel und einem erhöhten Brustkrebsrisiko für asiatische Frauen herstellen, nicht jedoch für Frauen aus der kaukasischen Bevölkerung (Kotnis *et al.* 2008). Aus diesen multifaktoriellen Krankheiten strenge Assoziationen zum *SULT1A1*-Genotyp zu ziehen, gestaltet sich schwierig. Möglicherweise können groß angelegte Studien unter Berücksichtigung der Umweltexpositionen mehr Einblick in die Funktion von SULT und Sulfonierungsreaktionen beim Menschen geben.

Neben dem *SULT1A1*-Gen sind auch für das *SULT1A2*-Gen verschiedene allelische Varianten bekannt. Dabei besteht der häufigste Polymorphismus in der codierenden Region des ebenfalls siebten Exons. Die Substitution zweier Basen, T²⁰ zu C und A⁷⁰⁶ zu C, führen jeweils zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin⁷ zu Threonin und Asparagin²³⁵ zu Threonin (Raftogianis *et al.* 1999). Die beiden Allele *SULT1A1*Arg* und *SULT1A2*Asn* mit hoher enzymatischer Aktivität und die Allele *SULT1A1*His* und *SULT1A2*Thr* mit niedriger Aktivität sind miteinander assoziiert (Engelke *et al.* 2000).

Die widersprüchlichen Ergebnisse epidemiologischer Studien und die noch nicht vollständig geklärte Kausalität zwischen dem Polymorphismus an Position

638 im *SULT1A1*-Gen und der Entstehung von Krankheiten bedingten die Entwicklung von Tiermodellen. Damit sollen die häufigsten *SULT1A1*-Allele hinsichtlich der Krebsentstehung untersucht werden.

1.2 Modellsysteme in der Toxikologie

Zur Detektion von Mutagenen und Kanzerogenen *in vitro* sind Mutagenitätstests in Bakterien und kultivierten Säugerzellen die wichtigsten Modellsysteme in der Toxikologie. Dabei wird diesen Systemen entweder das ultimale Mutagen direkt zugeführt oder es wird aus seinen metabolischen Vorläufern durch ein externes Metabolisierungssystem generiert. Zur Untersuchung des Aktivierungspotentials spezieller Enzyme können diese in die Zielzellen eingebracht und heterolog exprimiert werden (Glatt *et al.* 1998). Im Deutschen Institut für Ernährungsforschung in der Abteilung Ernährungstoxikologie (ETOX) wurden Sulfotransferasen verschiedener Spezies (z.B. Mensch, Maus, Ratte) in Zelllinien eingebracht und exprimiert. Mit diesen sogenannten „humanisierten Testsystemen“ konnte die SULT-vermittelte Aktivierung von Mutagenen für mehr als 100 Substanzen nachgewiesen werden (Glatt *et al.* 2000).

Eine Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf *in vivo* gestaltet sich schwierig, da die Aufnahme, Verteilung und Eliminierung der Substanz und die Wirkung anderer Enzyme nicht berücksichtigt werden kann. Um eine bessere Aussagekraft zu erzielen, werden Versuche an Tieren, also im Gesamtorganismus, durchgeführt.

Bei der Wahl der Tierart spielen neben der Frage der Extrapolation auf den Menschen vorwiegend praktische Aspekte eine Rolle (Verfügbarkeit in ausreichender Zahl, Haltung unter Laborbedingungen, Kosten). Für eine Extrapolation auf den Menschen wären Primaten am besten geeignet. Die genetische Verwandtschaft und die entwicklungsbiologische, biochemische und anatomische Ähnlichkeit sprechen dafür. Jedoch haben die Primaten lange Generationszeiten, eine hohe Lebenserwartung (Beobachtung von Krankheitsverläufen sind nur über sehr lange Zeiträume möglich) und verursachen bei der Züchtung und Haltung sehr hohe Kosten. Zudem bestehen ethische Bedenken gegenüber Primaten als Tiermodelle, sodass man kleinere Labortiere

nutzt. Mäuse und Ratten gelten als geeignete Labortiere, weil sie sich durch eine hohe Reproduktionsrate (8-10 Jungtiere pro Wurf), eine geringe Lebensdauer (ca. 2 Jahre) und eine schnelle Geschlechtsreife (im Alter von 6 Wochen, Zuchtreife nach 8 Wochen) auszeichnen. Zudem ist die Handhabung einfach und die Kosten für Haltung und Zucht sind viel geringer als bei Primaten.

Ein weiterer Punkt zur Schwierigkeit der Extrapolation stellt die orthologe Enzymform dar. Ist in einem *in vitro*-Mutagenitätstest ein humanes Enzym als Aktivator einer mutagenen Substanz identifiziert worden, ist nicht zwangsläufig diese Reaktion des orthologen Enzyms im Tierversuch zu erwarten. Daher wurden Tiermodelle entwickelt, deren einzelne Organe (Tateno *et al.* 2004) oder das Genom manipuliert wurde. Für die Generierung transgener Tiere können verschiedene Methoden verwendet werden. In den folgenden Absätzen gehe ich auf die zwei häufigsten Ansätze ein.

Ein Ansatz ist die Herstellung von *knock out*-Mäusen. Mit der erfolgreichen Isolierung von pluripotenten Embryonalen Stammzellen (ES), welche aus Blastocysten gewonnen werden konnten (Evans *et al.* 1981; Martin 1981), und der Erkenntnis, dass *in vitro* durch homologe Rekombination Zellen zielgerichtet genetisch manipuliert werden können (Smithies *et al.* 1985), war der Grundstein zur Herstellung der ersten *knock out*-Maus gelegt (Doetschman *et al.* 1987; Thomas *et al.* 1987). Diese Methode erlaubt einen zielgerichteten und sequenzspezifischen Austausch von DNA (Schenkel 1995). Die Ausbeute an transgenen Jungtieren liegt bei bis zu 100%. Bei der Herstellung von *knock out*-Tieren (Inaktivierung des Zielgens) wird mittels zellulärer Rekombinationsmaschinerie ein bestimmter chromosomaler Bereich durch ein modifiziertes Genstück ausgetauscht. Eine solche Rekombination findet in einer von 10^5 bis 10^9 Zellen statt und ist damit relativ selten. Dabei beeinflusst die Länge der homologen Sequenzen von Konstrukt-DNA und Ziel-DNA erheblich die Rekombinationsfrequenz. Bei der Untersuchung fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie CYP und Glutathion-S-Transferasen (GST) in Mausmodellen fand diese Methode schon Anwendung (Pineau *et al.* 1995; Lee *et al.* 1996; Henderson *et al.* 2000). Die Technologie der homologen Rekombination kann aber auch genutzt werden, um ein endogenes Gen durch ein exogenes zu ersetzen (*knock in*). Durch herbeigeführte Exzision wichtiger Elemente des Zielgens und

Einbringen eines Transgens mitsamt regulatorischer Sequenzen würde ein *knock in/knock out*-Modell entstehen.

Der zweite Ansatz ist die Methode der Pronukleusinjektion. In den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden mittels dieser Technik die ersten transgenen Mäuse hergestellt (Palmiter *et al.* 1982). Dabei werden transgene Tiere durch Mikroinjektion von DNA in die befruchtete Eizelle im Einzellstadium (Zygote) und anschließender Reimplantation der Zygoten in scheinträchtige Ammen hergestellt. Die Integration der transgenen DNA in das Genom erfolgt bei dieser Methode zufällig, sodass unerwartete positionelle Einflüsse auf die Transkriptionsregulation des Transgens auftreten können, z.B. durch Gen-Silencing (Matzke *et al.* 1998). Bei der Mikroinjektion können eine bis zu 50 Kopien integriert werden (Schedl *et al.* 1992). Eine Expression des Transgens kann nicht immer erreicht werden. Die Ausbeute an transgenen Jungtieren liegt bei 10-30%. Die Methode ist geeignet, um eine gewebespezifische Expression des Transgens in den Mäusen zu erreichen. Dies wurde bereits durch die erfolgreiche Integration humaner fremdstoffmetabolisierender Enzyme und anhand der daraus resultierenden menschenähnlichen Expressionsmuster gezeigt (Robertson *et al.* 2003; Yu *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Operana *et al.* 2007; Dobbernack 2008). Weiterhin ist diese Methode geeignet, große DNA-Fragmente zu integrieren (Schedl *et al.* 1993; Montoliu *et al.* 1994)

1.3 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung transgener Mauslinien mit dem humanen Gen *SULT1A1*. Dabei wurde der Genbereich so gewählt, dass die allelischen Varianten des humanen *SULT1A1*-Gens (*SULT1A1*1* und *SULT1A1*2*) in verschiedenen Mauslinien etabliert werden. Eine mögliche Differenzierung dieser allelischen Varianten an der Krebsentstehung beim Menschen sollte anhand der Tiermodelle untersucht werden.

Um eine humane Transkriptionsregulation im Mausmodell zu erreichen, wurden Konstrukte mit dem humanen Gen und große flankierende Bereiche stromaufwärts und stromabwärts des Gens integriert. Dies sollte sicherstellen, dass zum einen alle regulatorischen Sequenzabschnitte, die beim Menschen die Gewebeverteilung und die Expression der SULT steuern, in diesem Konstrukt enthalten sind. Durch diese großen Konstrukte sollte auch der regulatorische Einfluss muriner Translationsfaktoren minimiert werden. Die Integration des Gens erfolgte in dieser Arbeit durch Pronukleusinjektion. In einer vorausgegangenen Doktorarbeit konnten funktionell transgene Mäuse mit ähnlichen Genbereichen entwickelt werden, die eine Gewebeverteilung der humanen Proteine wie beim Menschen aufweisen.

Mittels molekularbiologischer Methoden sollte die Weitergabe der DNA-Konstrukte an die Nachkommen und die Kopienzahl analysiert werden. Ferner sollten die *SULT1A1*-Aktivität, das Expressionsniveau auf RNA- und Protein-Ebene und die zelluläre und subzelluläre Verteilung untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob das Einbringen genomischer DNA-Konstrukte in den Mäusen eine dem Menschen entsprechende Expression und Gewebeverteilung bewirkt. Hierbei auftretende Unterschiede könnten im Zusammenhang mit dem Polymorphismus stehen.

Diese charakterisierten transgenen Mauslinien sollten in einem toxikologischen Versuch mit dem heterozyklischen aromatischen Amin PhIP eingesetzt werden. Aus *in vitro*-Mutagenitätstests war bekannt, dass PhIP von der humanen *SULT1A1* aktiviert wird. Daher sollte in den transgenen Mauslinien vergleichend zum Wildtyp das Potential der allelischen Varianten der humanen SULT untersucht werden, PhIP zu einem DNA schädigenden Metaboliten zu aktivieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

DNA-Konzentrationsbestimmung, Elektro-Transformation, PCR, Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) und Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophoreseapparatur	Biometra, Göttingen
Agagel Mini	
Mx3005P™ Quantitative PCR System	Stratagene, La Jolla, USA
Netzgerät Minicell Power Pack P20	Biometra, Göttingen
Rotaphor PFGE	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer ND-100	peqlab-Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler T Gradient und T3	Biometra, Göttingen
UV-Detektion Gel Doc EQ System	Bio-Rad, München

Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Western Blot

Elektrophoresis Power Supply EPS 600	Amersham Biosciences, Freiburg
Gießapparatur	Amersham Biosciences, Freiburg
Hybridisierungsofen OV2	Biometra, Göttingen
Luminescent Image Analyser LAS 100	Fuji, Düsseldorf
Mikrotiterplattenreader Anthos 2110	PRS Scientific LLC, Walkersville, USA
Multiphor II NovaBlot Electrophoretic Unit	Amersham Biosciences, Freiburg
SDS-PAGE-Apparatur: Hoefer SE 600	Amersham Biosciences, Freiburg
Series Gel Electrophoresis Unit	

Immunhistochemie

Entwässerungsautomat Hypercenter®XP	Shandon, Frankfurt am Main
Färbeautomat Varistain XY	Shandon, Frankfurt am Main
Mikroskop Eclipse E1000	Nikon, Düsseldorf
Paraffinausgießstation Histocentre 2	Shandon, Frankfurt am Main
Rotationsmikrotom HM 350	Microm, Heidelberg

Homogenisator, Ultraschallstab, Inkubator

Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik, Staufen
Ultraschallstab Vibra-cell™ VC50T	Sonics & Materials, Gland, Schweiz
Schüttelinkubator Certomat® BS-1	B. Braun International, Melsungen

Aktivitätsbestimmung

Automated Sample Injector	Dionex Idstein
HPLC-Pumpe	Dionex Idstein
Säulenofen	Dionex Idstein
HPLC-Säule	Waters, Eschborn
UV-Detektor	Jasco®, Groß-Umstadt
Membranfilter, Porengröße 0,22 µm	Supelco, Taufkirchen

³²P-Postlabelling

DC Kammern, 20x10x20 cm, Glas	Desaga, Heidelberg
Fujix-Bas 2000 Imaging Analyser	Fuji Photo Film, Tokio, Japan
Instant Imager	Canberra Packard, Meriden USA
Kühlfalle RVT 100 und Pumpe RS15	Brand, Wertheim
Rotationsschüttler Heidolph REAX2	Heidolph, Kehlheim
Rotationsverdampfer Speed Vac®	Savant Instruments, Holbrook, USA
Concentrator CS 110	

Zentrifugen

Biofuge Fresco	Heraeus Instrument GmbH, Berlin
Eppendorf Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge 100 VAC	Roth, Taiwan
Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Sigma Zentrifuge 4K10	Braun Biotech International, Melsungen

Waagen

Basic	Sartorius, Göttingen
Feinwaage MC1	Sartorius, Göttingen

2.1.2 Chemikalien

Falls nicht gesondert angemerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von den folgenden Firmen bezogen: Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC	
<i>p</i> -Nitrophenylsulfat	
Spermidin	
Spermin	
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 30% (w/v), rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	
Chloroform/Isoamylalkohol (24/1)	
Kanamycin	
LB Broth (Luria Bertani)	
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1/24/1)	
TEMED Fertiglösung	
Tween20	
Antikörperverdünnungsmedium	DAKO, Hamburg
DAB buffered substrate, DAKO® liquid	
DAB substrate	
DAB chromogen	
EnVision DAKO Cytomation EnVision ⁺ ® System HRP-Labeled Polymer	
10x RQ1 Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
50x dNTP Mix (12,5 µM)	Invitex, Berlin
5x Colorless GoTaq® Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
5x Green GoTaq® Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
Bromphenolblau	P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne, Gleiwitz (Gliwice), Polen
<i>p</i> -Nitrophenol	Fluka, Buchs, Schweiz

PhIP-adduktierter Heringssperma-DNA	Abteilung ETOX, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal
PhIP-HCl	Nard Chemicals, Amagasaki City, Japan
TRIZOL [®] LS Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
γ - ³² P-ATP, > 7000 μ Ci/mmol	Hartmann Analytik, Braunschweig

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper: SULT1A1-Peptid ETOX	hergestellt analog nach (Sharp <i>et al.</i> 1995)
Sekundärantikörper: anti-rabbit-IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Alle nicht gesondert erwähnten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf, Nunc und Roth bezogen.

F96 Microwell Platten, transparentes Polysterol	Nunc, Wiesbaden
Agarose Biozym LE GP	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Agarose SeaPlaque [®] GTG [®] Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
DAKO-Pen	DAKO, Hamburg
Filterpapier Munktell Filter Paper	Amersham Biosciences, Freiburg
Histofluid	Marienfelde GmbH, Lauda-Königshofen
Nitrocellulosemembran Hybond [™] ECL [™]	Amersham Biosciences, Freiburg
PEI-TLC-Platten Polygram CEL 300 20x20 cm Charge 01/05	Machery-Nagel, Düren
QPCR-96-well-Platten	Agilent, Weilbronn
QPCR-Deckelstreifen	Agilent, Weilbronn
Whatman Chromatographiepapier 46x47 cm	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.5 Reaktionskits

2x ImmoMix + 50x SYBR Green	Bioline GmbH, Luckenwalde
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
ECL Western Lightning™	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Chemiluminescence Reagent Plus	
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
Qiagen® Large Construct Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen® Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen, Hilden
ThermoScript™RT-PCR-System	Invitrogen, Mannheim

2.1.6 Enzyme

<i>β</i> -Agarase I	NEB, Frankfurt am Main
<i>Bam</i> HI, 10 U/μl	MBI Fermentas, St. Leon Rot
<i>Bpi</i> I, 10 U/μl	MBI Fermentas, St. Leon Rot
<i>Bsp</i> 143II, 10 U/μl	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Complete Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Fse</i> I, 2 U/μl	NEB, Frankfurt/ Main
<i>Hind</i> III, 10 U/μl	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Micrococcus-Nuklease aus <i>S. aureus</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Phosphodiesterase II aus Kalbsmilz	Calbiochem, Schwalbach
Proteinkinase K aus <i>Tritirachium album</i>	Roth, Karlsruhe
RNase A aus bovinem Pancreas	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
RNaseOUT™ Recombinant	Invitrogen, Mannheim
Ribonuklease Inhibitor	
RQ1 RNase freie DNase	Promega, Mannheim
<i>Sal</i> I, 10 U/μl	MBI Fermentas, St. Leon Rot
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA Polymerase, 5 U/μl	Roboklon, Berlin

2.1.7 Software

ADAP Software, Basic version	JNetDirect Biosciences, Herndon, USA
AIDA/ 2D Densitometry Software	Raytest GmbH, Straubenhardt
BLAST, NCBI (Pubmed)	Bethesda, USA
Echtfarbbildanalysestystem LUCIA G	Nikon, Düsseldorf
MxPro™ QPCR-Software	Agilent, Waldbronn
Quantity One 1-D Analysis Software Version	Bio-Rad, München
Vector NTI Suite 9	Invitrogen, Karlsruhe
Instant Imager Software	Canberra Packard, Meriden, USA

2.1.8 DNA-Leitern, Random-Primer

λ -DNA <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Random Hexamer Primer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9 Biologische Materialien

Humane Gewebeproben	Abteilung ETOX, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal
Sulfotransferase-Proteinstandards (Bakteriencytosole)	Abteilung ETOX, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Geweben

Das gesamte angetaute Organ wurde in einem stabilen Glasröhrchen mit 0,5 bis 1,5 ml 10 mM EDTA (pH 8,0) mit einem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert. Vom Homogenat wurden 150 µl abgenommen und mit 1 ml 10 mM EDTA (pH 8,0) nochmals homogenisiert. Nach Zugabe von 0,5 ml 10% SDS, 2 ml 10 mM EDTA (pH 8,0) und 100 µl Proteinase-K-Lösung (10 mg/ml in 10 mM EDTA pH 8,0) wurde das Homogenat für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach dem Proteinabbau folgte der RNA-Verdau, wobei das Lysat mit 500 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,4), 10 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,4) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde zur Abtrennung der Proteine und Lipide mit 0,5 Volumen Roti[®]-Phenol, 3 ml Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1/24/1, v/v/v) bzw. Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, v/v) jeweils 10 min geschüttelt, 10 min bei 10.300 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem nächsten Solvens extrahiert. Zur DNA-Fällung wurde die wässrige Lösung mit 400 µl 3 M Natriumacetat und dem dreifachen Volumen an eiskaltem 2-Ethoxyethanol versetzt und mehrmals invertiert. Anschließend erfolgte zur Sedimentation der Nukleinsäuren eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 11.200 x g. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Abschließend wurde das Sediment 10 min an der Luft getrocknet und in Natrium-Citratpuffer in einem dem Organ bzw. Gewebe entsprechendem Volumen aufgenommen

2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen von Mäusen

Zur Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen der Mäuse wurde das innuPREP DNA Mini Kit der Fa. Analytik Jena entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR) können Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Als Matrize kann dabei zirkuläre oder linearisierte DNA eingesetzt werden. Die eigentliche PCR-Reaktion gliedert sich in drei Abschnitte: Denaturierung (Trennung der doppelsträngigen DNA), Annealing (Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNA), Elongation (Verlängerung der amplifizierten Sequenzen). Um Kontaminationen der PCR-Ansätze zu vermeiden, wurde unter einer mit UV-Licht ausgestrahlten Werkbank gearbeitet und mit Filterspitzen pipettiert. Alle Primer wurden von BioTez (Berlin) synthetisiert. Im Anhang I in Tabelle 6 sind die verschiedenen Primerpaare zum Nachweis von SULT1A1- und 1A2-DNA aufgeführt.

PCR-Ansatz

5 µl	5x Green GoTaq [®] Reaktionspuffer
5 µl	5x Colorless GoTaq [®] Reaktionspuffer
1 µl	10 µM Vorwärtsprimer
1 µl	10 µM Rückwärtsprimer
0,25 µl	50x dNTP Mix (12,5 mM)
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
2 µl	DNA-Lösung (in Elutionspuffer) bzw. H ₂ O (Negativkontrolle) ad 50 µl H ₂ O

Entsprechend der Anzahl der zu amplifizierenden Proben wurde ein Mehrfachansatz pipettiert. Die vorgelegten 2 µl DNA-Lösung bzw. H₂O wurden mit jeweils 48 µl des Mehrfachansatzes gemischt.

1. Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	94°C	30 s	} x 40 Zyklen
Primer Annealing	x °C	45 s	
Elongation	72 °C	y s	
Elongation	72 °C	10 min	

Die PCR erfolgte im Thermocycler nach dem beschriebenen Programm, wobei die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit je nach verwendeten Primerpaaren variierten. Die Annealing-Temperatur ist in Tabelle 6 siehe Anhang I aufgeführt. Die Elongationszeit betrug für PCR-Produkte bis zu 500 bp 30 s, bis zu 1000 bp 60 s und größer 2000 bp 180 s. Der Erfolg der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (2.2.1.5).

2.2.1.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) werden verwendet, um DNA-Moleküle an definierten Sequenzfolgen zu schneiden. Zur Unterscheidung der allelischen Varianten *1 und *2 des humanen *SULT1A1*-Gens eignet sich die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP). Im *SULT1A1*-Gen hat der Nukleotidaustausch von G zu A an Position 638 den Verlust der Schnittstelle des Restriktionsenzym *Bsp143II* zur Folge (Ozawa *et al.* 1998; Coughtrie *et al.* 1999). Die Erkennungssequenz für *SULT1A1**1 (Arg) ist: 5'- G C **G** C -3', wohingegen die Sequenz für *SULT1A1**2 (His): 5'- G C **A** C -3' ist.

Zur Charakterisierung des Genotyps von *SULT1A2* wird *Bpil* verwendet. Der Nukleotidaustausch von C zu A an Position 704 hat den Verlust der Schnittstelle des Restriktionsenzym *Bpil* zur Folge. Die Erkennungssequenz für *SULT1A2**1

(Asn) ist: 5'- G A A G A **A** -3' und für *SULT1A2*2* (Thr) ist: 5'- G A A G A **C** -3'. Daher wird die Sequenz von *SULT1A2*1* nicht erkannt und demzufolge auch nicht geschnitten.

RFLP-Ansatz

17,5 µl PCR-Produkt
2 µl 10x Reaktionspuffer
0,5 µl Enzym

Die Proben wurden im Thermomixer bei 37°C für 1 h inkubiert. Im Anschluss daran wurden sie in der Agarosegelelektrophorese (2.2.1.5) aufgetrennt.

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer

40 mM Tris-HCl
1% (v/v) Essigsäure
1 mM EDTA

Für die Überprüfung der Produktgrößen nach Linearisierung, PCR und Restriktionsanalysen wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Bei Produktgrößen bis 300 bp wurde 4%ige (w/v) Agarose, bis 1 kb 2%ige (w/v) Agarose, bei Produkten zwischen 1 kb und 5 kb 1%ige Agarose (w/v) und bei Produkten größer als 5 kb 0,5%ige (w/v) Agarose in TAE-Puffer (0,4 µg Ethidiumbromid/ml Agaroselösung) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Probenpuffer versetzt. Als Größenstandards wurden GeneRuler™ DNA Ladder Mix und λ-DNA *EcoRI*+*HindIII* verwendet. Die Elektrophorese wurde für ca. 20 min mit 85 V (2 und 4%ige Gele) bzw. 75 V (1 und 0,5%ige Gele) durchgeführt.

Die DNA im Gel wurde durch Fluoreszenzdetektion des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids im UV-Licht (321 nm) visualisiert und mit Hilfe des Gerätes GelDoc EQ System (Bio-Rad) ausgewertet.

2.2.1.6 RNA-Isolierung aus Geweben

DEPC-Wasser

0,1% (v/v) DEPC

ÜN Inkubation bei RT, Autoklavieren

Zur Isolierung von RNA aus Geweben wurden 50-100 mg des tiefgefrorenen Gewebes in 1 ml TRIzol überführt und im Ultra-Turrax homogenisiert. Dabei werden die Zellen zerstört, die einzelnen Zellkomponenten aufgelöst und die RNA bleibt intakt. Die Proben inkubierten 5 min bei RT um eine Verteilung des TRIzols in jedes Kompartiment zu gewährleisten. Zum Abtrennen der Membrankomponenten wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 200 µl Chloroform, intensivem Vortexen für 15 s, Inkubation bei RT für 5 min und anschließendem Zentrifugieren separiert. Dabei enthält die obere wässrige Phase die Nucleinsäuren, die mittlere weiße Phase die Proteine und die untere rötliche Phase bildet die organische Phase mit TRIzol. Die Nucleinsäure-haltige obere Phase wurde abgenommen und mittels 500 µl Isopropanol gefällt. Durch Mischen der Proben und Inkubation bei RT für 10 min kam es zur Sedimentation der Nucleinsäuren. Nach Zentrifugation war ein Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen und 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet und im Heizblock bei 37°C bis zum vollständigen Entfernen des Ethanols erwärmt. Anschließend wurden die Nucleinsäuren in DEPC-Wasser auf Eis gelöst.

DNase-Verdau

10 µl	Nukleinsäure-Probe
2,5 µl	10 x RQ1-Puffer
0,5 µl	RQ1-RNase freie DNase (1 U/µl)
0,5 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl)
1,25 µl	20 mM DTT
10,25 µl	DEPC-Wasser

Der Verdau wurde im Brutschrank bei 37°C für 1,5 h durchgeführt. Anschließend wurde zu jeder Probe erneut 5 µl RQ1-RNase freie DNase (1 U/µl) zugegeben und erneut für 1 h inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Proben mit DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt und zur Phasenseparation 100 µl Phenol-Chloroform (20:1) zugegeben und zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur RNA-Präzipitation wurden 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 400 µl 100%iger Ethanol zugegeben. Nach intensiven Mischen und Inkubation bei RT für 5 min war ein Pellet nach Zentrifugation sichtbar. Das RNA-Pellet wurde in 200 µl 75%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Dann wurde es 10 min an der Luft getrocknet und im Heizblock bei 37°C bis zum vollständigen Entfernen des Ethanols erwärmt. Anschließend wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser auf Eis gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.2.1.7 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wird durch die Reverse Transkriptase in cDNA revers transkribiert und kann dann in eine PCR eingesetzt und amplifiziert werden.

Denaturierung

5 µg	RNA
0,1 µl	Random Hexamer Primer (3µg/µl)
ad 35 µl	DEPC-H ₂ O

Die Proben wurden im Heizblock für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Es wurden 10 µl von jeder Probe abgenommen und ohne reverse Transkription weiterhin mitgeführt. Diese „Minus-Reverse Transkription“-Proben wurden in einer Real-Time-PCR (2.2.1.8) eingesetzt und damit überprüft, ob Kontaminationen durch genomische DNA vorlagen.

Reverse Transkription

25 µl	Probe
10 µl	5× M-MLV-Puffer
0,625 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
2,5 µl	20 mM DTT
1,25 µl	RNase OUT (40 U/µl)
2,5 µl	dNTP-Mix (10 mM)
8,125 µl	DEPC-H ₂ O

Die Proben wurden im Heizblock für 60 min bei 42°C inkubiert und anschließend mit 50 µl DEPC-H₂O aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Bei der Verwendung von Oligo(dT)-Primern wurde das Kit von der Fa. Invitrogen verwendet und die reverse Transkription entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.8 Real-Time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Real-Time-PCR eine relative Quantifizierung von DNA (relative Kopienzahl) und RNA (relative Expression) durchgeführt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „*Housekeeping Gene*“ (HKG) bezogen. Die relative Quantifizierung kann zum einen mittels einer Standardkurve zur Quantifizierung der eingesetzten Menge an DNA unbekannter Proben durchgeführt werden. Dabei dient der Farbstoff SYBR Green zur Detektion doppelsträngiger DNA (dsDNA). Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann aber auch über die sogenannte delta-delta-Ct-Methode erfolgen.

Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct- Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$). Der Ct-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Zielgens die Fluoreszenz vom HKG signifikant übersteigt. Nach dieser Normierung wird vom ΔCt -Wert der experimentell behandelten Proben (hier die transgene Probe) der ΔCt -Wert einer Kontrolle (hier Wildtyp) abgezogen ($\Delta\Delta Ct$); man kommt zum sogenannten „*delta-delta-Ct*“ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ct-Wert:	cycle treshold, Ct-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Zielgens die Fluoreszenz vom HKG signifikant übersteigt
Zielgene:	humanes <i>SULT1A1</i> -Gen
Referenzgen:	murines <i>beta-actin</i> -Gen

Das thermische Profil enthält zwei Hauptschritte: Amplifikation und Dissoziation. Die Amplifikationsphasen entsprechen den Schritten der PCR (siehe 2.2.1.4). In der Dissoziationsphase wird die dsDNA zu einzelsträngiger DNA (ssDNA) durch schrittweise Temperaturerhöhung aufgeschmolzen. Bei jedem Temperaturschritt werden Fluoreszenzdaten gesammelt. Um Kontaminationen der PCR-Ansätze zu vermeiden, wurde unter einer mit UV-Licht ausstrahlten Werkbank gearbeitet und mit Filterspitzen pipettiert. Die für die Real-Time-PCR verwendeten Primer wurden von der Firma BioTez (Berlin) synthetisiert und sind in Tabelle 6 in Anhang I aufgeführt.

Real-Time-Ansatz

0,5 µl	10 µM Vorwärtsprimer
0,5 µl	10 µM Rückwärtsprimer
0,5 µl	50x SYBR Green
12,5 µl	2x Immo-Mix
9,0 µl	Reinstwasser
2,0 µl	Template

Amplifikationsphasen

1. Denaturierung	95°C	7 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 s	
Primer Annealing	x °C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	

Dissoziationsphasen

Denaturierung	94°C	30 s
Primer Annealing	x °C	30 s
Elongation	72°C	y s

Die Daten der Real-Time-PCR wurden mit der MxPro™ QPCR-Software von der Firma Agilent ausgewertet. Die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit variierten je nach verwendeten Primerpaaren. Die Annealing-Temperatur ist in Tabelle 6 siehe Anhang I aufgeführt. Die Elongationszeit betrug für PCR-Produkte bis zu 500 bp 30 s, bis zu 1000 bp 60 s und größer 2000 bp 180 s.

2.2.1.9 Künstliche Gen-Konstrukte

Die PAC-Klone (P1 basiertes künstliches Chromosom aus dem P1-Vektor des temperenten Bakteriophagen P1) wurden freundlicherweise vom MPI für Molekulare Genetik, Berlin zur Verfügung gestellt und von Gisela Dobbernack

modifiziert (Dobbernack 2008). Der BAC-Klon AC136948 (bakterielles künstliches Chromosom aus dem Einzel-Kopie-F-Plasmid des Bakteriums *Escherichia coli*) wurde von unserem Kooperationspartner der AG Himmelbauer vom MPI für Molekulare Genetik in Berlin bezogen.

2.2.1.10 BAC-/PAC-Präparation

100 µl Bakterienstocklösung wurden in 100 ml LB-Medium mit 34 mg/ml Chloramphenicol (BAC, *2-Allele) bzw. 40 mg/ml Kanamycin (PAC,*1-Allele) über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert und nach entsprechendem Protokoll (Fa. Qiagen) DNA isoliert.

2.2.1.11 Restriktionsverdau für Mikroinjektion

Zur Isolierung der humanen *SULT1A1/1A2*-Gensequenzen aus den künstlichen Chromosomen wurden unterschiedliche Restriktionsansätze gewählt. Zur Isolierung der *SULT1A1*1*- und *SULT1A1*2*-Gene waren zwei Restriktionsansätze nacheinander mit unterschiedlichen Enzymen erforderlich. Für die Isolierung des Genclusters *SULT1A1*2/SULT1A2*2* war nur ein Restriktionsverdau notwendig.

	Ansatz Restriktionsverdau I <i>SULT1A1*1</i>- und <i>SULT1A1*2</i>- Gen		Ansatz Restriktionsverdau <i>SULT1A1*2/SULT1A2*2</i>- Gencluster
10 µg	mid-DNA	10 µg	mid-DNA
15 µl	<i>FseI</i> (2U/µl)	10 µl	<i>SaII</i> (10 U/µl)
7 µl	10x Restriktionspuffer NEB4 (Fa. NEB)	10 µl	10x Restriktionspuffer O ⁺ (Fa. Fermentas)
7 µl	10x BSA (Fa. NEB)		
	ad 70 µl Reinstwasser		ad 100 µl Reinstwasser

Die Inkubation wurde in einem Thermocycler für 2 h bei 37°C mit anschließender Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65°C durchgeführt.

Ansatz Restriktionsverdau II
***SULT1A1*1*- und *SULT1A1*2*-**
Gen

70 µl *FseI*-Verdau
5 µl *SaI* (10 U/µl)
10 µl 10x Restriktionspuffer Y⁺/Tango
(Fa. Fermentas)
ad 100 µl Reinstwasser

Die Inkubation wurde ebenfalls in einem Thermocycler für 2 h bei 37°C durchgeführt.

2.2.1.12 Pulsed-Field-Gelelektrophorese

30 x Loenning-Puffer

363 mM Tris
304 mM NaH₂PO₄ x 1 H₂O
10 mM EDTA pH 7,5

6x Probenpuffer

0,01 M Tris/Acetat pH 8,0
50% (w/v) Glycerol
0,02% (w/v) Bromphenolblau

Gegenüber der konventionellen Agarosegelelektrophorese können mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) Fragmente von 10 kb bis 1 megab aufgetrennt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte waren 85 und 200 kb groß. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte nach Restriktion in 1% SeaPlaque[®]GTG[®] Agarose (low-melting-Agarose) in 1x Loenning-Puffer mittels PFGE [Rotations-PFGE, BAC: Intervall von 4-2 s (linear) bei 10°C, Winkel 120-110° (linear), Laufzeit 18 h und 130-90 V (logarithmisch), PAC: siehe BAC, Laufzeit 21 h]. Vor dem Auftragen (1 µg DNA/Spur) wurden die DNA-Proben mit 6x Probenpuffer versetzt. Als Größenstandards wurden GeneRuler[™] DNA Ladder Mix und λ-DNA *EcoRI*+*HindIII* verwendet.

2.2.1.13 Isolierung der Genkonstrukte aus BAC-/PAC-DNA

<u>Agaroseverdau-Puffer</u>	<u>TE-Puffer</u>
100 mM Tris-HCl pH 7,5	10 mM Tris-HCl
10 mM EDTA pH 8,0	1 mM EDTA pH 8,0
1 M NaCl	
30 mM Spermin	
70 mM Spermidin	

Aus den nach Restriktionsverdau mittels PFGE voneinander getrennten DNA-Fragmenten wurde das spezifische DNA-Fragment ausgeschnitten und aus dem Gel isoliert. Dabei sollte die zu injizierende DNA weder in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubieren noch einer UV-Strahlung ausgesetzt sein, um mögliche DNA-Schäden zu vermeiden. Zur Gewährleistung der Reinheit der spezifischen DNA wurden alle verwendeten Lösungen autoklaviert oder steril filtriert. Es wurden zudem gestopfte Pipettenspitzen verwendet und weitere Gebrauchsgegenstände mit Ethanol (70%) vor Gebrauch gereinigt.

Das Gel wurde an den äußeren Spuren links und rechts mit Größenstandards und in den benachbarten Taschen mit jeweils 1 µg DNA des restringierten PAC- oder BAC-Konstruktes in 6x Probenpuffer beladen. Die jeweils nächste Tasche nach innen wurde nicht befüllt, sodass beim verwendeten Kamm noch die 8 innenliegenden Taschen mit jeweils 1 µg des verdauten Konstruktes beladen werden konnten. Nach der PFGE wurden jeweils die beiden äußeren Spuren abgeschnitten und im Ethidiumbromidbad (1x Loening-Puffer mit 0,4 µg Ethidiumbromid/ml Pufferlösung) für 45 min inkubiert. Aus dem mit Ethidiumbromid angefärbten Gelspuren wurden die DNA-Fragmente mit den humanen Gensequenzen herausgeschnitten, um eine Markierung des Zielbereiches zu setzen. Danach wurden diese Gelspuren in Saranfolie gewickelt und seitlich neben das ungefärbte, restliche Gel gelegt. Mit Hilfe der beidseitigen Markierung konnte nun ein horizontaler Gelstreifen mit dem spezifischen DNA-Fragment aus dem ungefärbten Gel ausgeschnitten werden. Der Gelstreifen wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und für 3x30 min bei RT und leichtem Schwenken in Agaroseverdau-Puffer inkubiert. Dann wurden jeweils 500 mg Gel

in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und für 3 min bei 68°C im Thermoblock geschmolzen. Nach vorsichtigem Zentrifugieren für 30 s bei 23.000 x *g* wurde das Gel erneut geschmolzen für 5 min bei 68°C. Nach 5 min Äquilibrierung bei 42°C erfolgte eine Inkubation mit β -Agarase I (2 U/100 mg Gel) für 3-4 h bei 42°C. Dann folgten eine Inkubation für 10 min auf Eis und Zentrifugation für 15 min bei 93.000 x *g*. Anschließend wurde die DNA in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Zur DNA wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 0,6 Volumen Isopropanol gegeben und 15 min bei 4°C und 174 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und danach ebenfalls für 15 min bei 4°C und 174 x *g* zentrifugiert. Nach 5 min Trocknen der Pellets an der Luft wurde die DNA in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der isolierten DNA nach PFGE wurde mittels einer λ -DNA-Standardreihe (100, 50, 25, 10,5, 1 ng) und Agarosegelelektrophorese ermittelt (2.2.1.5).

2.2.1.14 Mikroinjektion

Mit der Technik der Mikroinjektion kann Fremd-DNA in das Mausgenom eingeschleust werden (Abbildung 2). Dabei findet die Integration des Transgens zufällig in das Mausgenom statt.

Die Generation transgener Mäuse mittels pronukleärer Mikroinjektion wurde nach Standardtechniken durchgeführt (Hogan B. 1986). Die Mikroinjektion wurde von unserem Kooperationspartner am MPI für Molekulare Genetik in Berlin/Dahlem durchgeführt.

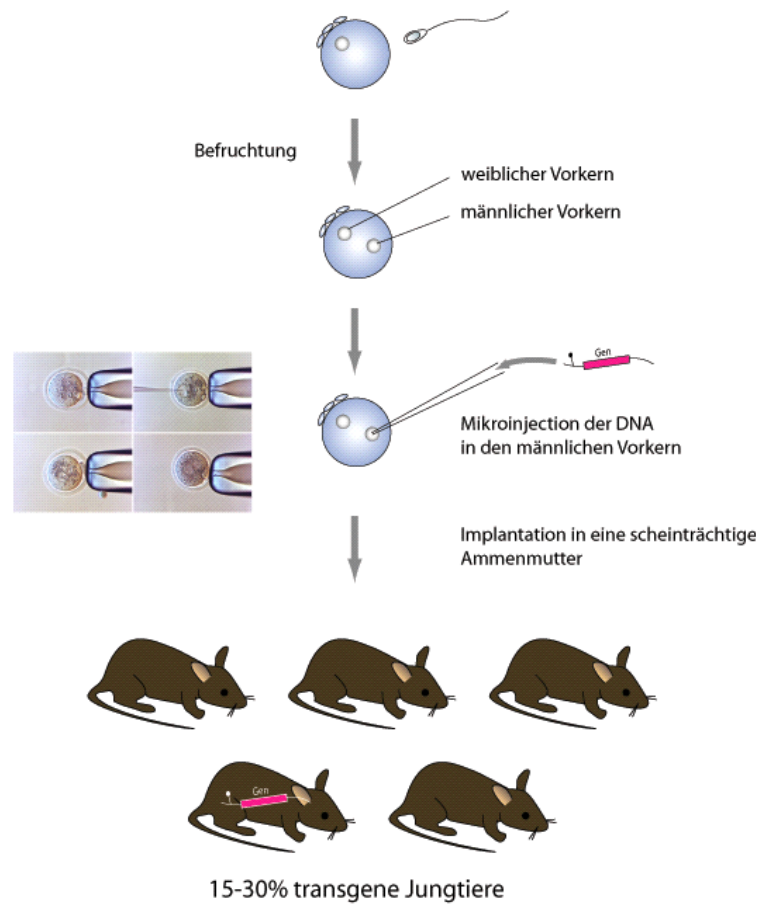


Abbildung 2: Pronukleusinjektion als Technik zur Erzeugung einer transgenen Mauslinie. Die Fremd-DNA wird in den männlichen Vorkern einer befruchteten Maus-Oocyte injiziert. Die manipulierte Oocyte wird in ein scheinträchtiges Ammentier implantiert und die resultierenden Nachkommen auf Transgenität getestet. Abbildung aus: www.jfvg.unizh.ch/pdfs/10-transgen.pdf

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Cytosolherstellung aus murinen Geweben

Die murinen Gewebe und Organe wurden nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung zur Herstellung von Cytosolen gelagert. Die gesamte Probe wurden mit sterilen Pistillen in kaltem 10 mM KCP-Puffer pH 7,4 und 1x Proteaseinhibitor homogenisiert (Mucosa in 0,3 ml und Leber in 2 ml Puffer). Anschließend wurden die Proben bei $8.300 \times g$ und 4°C für 20 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 1 h bei 4°C und $100.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (lösliche cytosolische Fraktion) und das Pellet (Mikrosomenfraktion) lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -80°C .

Die Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode (BCA-Bicinchoninsäure) im Mikrotiterplattenansatz bestimmt (Smith *et al.* 1985). Dabei werden im alkalischen Bereich Cu^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Proteinen zu Cu^{+} -Ionen reduziert (Biuret-Reaktion). Diese bilden einen stabilen violetten Komplex mit dem Reagenz BCA und können durch Absorptionsmessung bei 562 nm detektiert werden. Durch den Vergleich mit einer Eichgeraden aus einer BSA-Standardlösung kann im Photometer die Proteinmenge der Probe berechnet werden.

Nach adäquater Verdünnung der Proteinproben wurden sie mit Standards in Dreifachbestimmung (je 10 μl) auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach Zugabe von 200 μl BCA-Reagenz zu jeder Probe und Inkubation für 20 min bei 37°C wurde die Absorptionsmessung im Mikrotiterplattenreader durchgeführt und die Proteinkonzentration von dem Programm anhand der Standards berechnet (ADAP Basic Software).

2.2.2.2 Cytosolherstellung aus Bakterien

Zur Cytosolherstellung aus SULT-exprimierenden Bakterien wurden 50 µl Stocklösung eines Bakterienstammes in 50 ml LB Broth (Luria Bertani)-Medium mit einem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und für 8 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Nach Zentrifugation der Bakterien für 10 min, zweimaligem Waschen des Pellets aus 50 ml Kultur mit je 25 ml kaltem KCP-Puffer bei pH 7,4 und anschließender Resuspension in 800 µl KCP-Puffer wurden die Proben dreimal 10 s auf Eis mit 20 s Pause auf Eis sonifiziert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 4°C und 100.000 x g wurde der Überstand mit den cytosolischen Proteinen abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Proteinbestimmung wurde wie unter Abschnitt 2.2.2.1 durchgeführt.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der Methode der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis - SDS-PAGE) wurden Proteine aufgetrennt (Laemmli 1970).

<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
11% (w/v)	3% (w/v)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
375 mM Tris-HCl pH 8,8	125 mM Tris-HCl pH 6,8
0,1% (w/v) SDS	0,1% (w/v) SDS
0,03% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat	0,03% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat
0,03% (v/v) TEMED	0,1% (v/v) TEMED

Für die Proteintrennung wurden zunächst Trenngele (Größe: 11x14 cm, Stärke: 1,5 mm) gegossen. Um eine ebene Gelkante zu erhalten, ist die Zugabe von ca. 2 ml Isopropanol auf das frisch gegossene Gel erforderlich. Nach Polymerisation und Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel auf das

Trenngel gegossen und ein Probenkamm gesteckt. Die entstandenen Probentaschen (nach Polymerisation des Sammelgels) wurden mit Proben und 3x SDS-Probenpuffer (Verhältnis 2:1) beladen. Zuvor wurden die Proben 10 min im Wasserbad bei 95°C erhitzt und kurz abzentrifugiert. Um einen gleichmäßigen Gellauf zu gewährleisten, wurden Probentaschen ohne Proben mit gleichem Volumen 1x SDS-Probenpuffer beladen. Die mit 1x Laufpuffer gefüllten Probenkammern mit den Gelen wurden an die Netzgeräte für die SDS-PAGE angeschlossen und bei einer Stromstärke von 50 mA bis zum Trenngel und folgend bei 12 mA über Nacht bei 2 Gelen laufen gelassen. Die Elektrophorese galt als beendet, wenn die Lauffront (Bromphenolblau-Bande) aus dem Gel getreten war.

2.2.2.4 Western Blot

Die Überführung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde mit Hilfe des „Semi-Dry“-Verfahrens (Kyhse-Andersen 1984) durchgeführt.

<u>Anodenpuffer I</u>	<u>Anodenpuffer II</u>	<u>Kathodenpuffer</u>
300 mM Tris	25 mM Tris	40 mM ϵ -Aminocapronsäure
20% (v/v) Methanol	20% (v/v) Methanol	20% (v/v) Methanol
		0,01% (w/v) SDS

Sechs Filterpapiere, in Anodenpuffer I getränkt, wurden auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Passgenau wurden 3 Filterpapiere, in Anodenpuffer II getränkt, darüber gelegt. Anschließend wurde die ebenfalls in Anodenpuffer II getränkte Nitrocellulosemembran aufgelegt. Darauf wurde dann das Trenngel gelegt. Abschließend wurden 9 Kathodenpuffer-getränkte Filterpapiere aufgeschichtet. Um Luftblasenfreiheit zu gewährleisten, wurde nach jedem Schritt mit einem Walzenroller die Filterpapierschicht geglättet. Dann wurde die Kathode der Blotapparatur aufgelegt, die Apparatur verschlossen, an das Netzgerät für Western Blot angeschlossen und die Proben für 2 h mit 1,8 mA/cm² geblottet.

2.2.2.5 Immundetektion

Bei der Immundetektion kann man elektrophoretisch aufgetrennte, auf eine Nitrocellulosemembran transferierte Proteine mittels spezifischer Antikörper (AK) nachweisen.

<u>10x TBST</u>	<u>AK-Beseitigungs-Puffer</u>	<u>Blockierungspuffer</u>
200 mM Tris-HCl pH 9,0	62,5 mM Tris-HCl pH 6,7	1% BSA (w/v)
140 mM NaCl	100 mM 2-Mercaptoethanol	in 1x TBST
0,1% (w/v) Tween [®] 20	2% (w/v) SDS	

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran für 45 min in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde einstündig mit dem Primärantikörper (anti-SULT, verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert, ungebundene Antikörper durch Waschen mit 1x TBST (3x10 min) entfernt, sowie einstündig mit dem Sekundärantikörper (anti-Kaninchen bzw. anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat, verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert und in Folge erneut wie oben gewaschen. Zur Blotentwicklung wurde das ECL Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus verwendet. Dabei katalysiert die an den Sekundärantikörper konjugierte Peroxidase die Oxidation von Luminol und versetzt dieses in einen Zustand der Chemolumineszenz. Diese Chemolumineszenz wurde von der hochempfindlichen Videokamera des LAS-100 festgehalten und mittels der Software AIDA/2D Densitometry analysiert.

Um die Blotmembran nacheinander mit verschiedenen Primärantikörpern beladen zu können, mussten die gebundenen AK entfernt werden. Die Membran wurde vorsichtig zusammengerollt und in eine Hybridisierungsröhre gesteckt. Die Membran und 50 ml AK-Beseitigungs-Puffer inkubierten für 45 min bei 60°C im Hybridisierungsöfen. Anschließend wurde die Membran 2x10 min mit 1x TBST gewaschen. Nach diesem Membranstripping konnte die Immundetektion mit einem weiteren Primärantikörper erfolgen. Alle Inkubationen und Waschvorgänge wurden auf einem Wipptisch durchgeführt.

2.2.2.6 Immunhistochemische Färbungen

Mayers Hämalaun

0,1% (w/v) Hämalaun

0,02% (w/v) Natriumiodat

5,0% (w/v) Kaliumalaun

5,0% (w/v) Chloralhydrat

0,1% (w/v) Zitronensäure

Mittels der Immunhistochemie kann die Proteinlokalisierung im Gewebe durch spezifische Antikörper untersucht werden.

Die Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in 4%iger Formaldehydlösung nicht länger als 24 h fixiert. Anschließend wurden sie mit Leitungswasser gespült, um Niederschläge im Gewebe zu entfernen. Danach wurden die Proben im Hypercenter in einer aufsteigenden Ethanolreihe (55, 70, 96, 100%) bei 40°C für 90-150 min entwässert. Der Alkohol wurde durch ein Intermedium verdrängt (Toluol) und das Toluol anschließend durch Histoplast/Paraffin ersetzt. Aus den eingebetteten Proben wurden mit einem Rotationsmikrotom 2 µm Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden durch Trocknen bei 37°C auf Objektträgern fixiert.

An seriellen Schnitten wurden jeweils eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Die HE-Färbung wurde im Färbeautomaten durchgeführt. Begonnen wurde mit der Entparaffinierung in Toluol und der Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (100, 96, 70, 40%) und destilliertem Wasser für 80-180 s bei RT. Dem folgten Inkubationen in Hämalaun (60 s) bzw. 1%ige wässrige Eosin-Lösung (45 s). Den jeweiligen Inkubationen in den einzelnen Lösungen folgten ausgiebige Spülungen unter fließendem Wasser und destilliertem Wasser. Nach den Färbungen wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70, 96, 100%) und Toluol für 20-240 s bei RT dehydriert und mittels Histofluid (synthetisches Harz) eingeschlossen.

Zur Einengung der zur Immunfärbung verwendeten Lösungen wurde Flächen auf den Gewebeschnitten mit einem Silikonstift eingegrenzt. Der Objektträger

wurde 3 min in destilliertem Wasser gespült, zur Blockierung der endogenen Peroxidase 10 min in 1%iger H₂O₂-Lösung inkubiert, 2x3 min in destilliertem Wasser gespült und anschließend für 1 min in PBS/Tween-Puffer und 1 min in PBS-Puffer gewaschen. Die Immunfärbung wurde mit der DAKO EnVision™ Technik durchgeführt. Hier ist der Sekundärantikörper mit einem Dextranskomplex konjugiert, der wiederum Träger zahlreicher Peroxidase- oder Alkalischer Phosphatase-Moleküle ist. Die verwendeten Primärantikörper wurden adäquat verdünnt und über Nacht in einer Feuchtkammer mit den Gewebeschnitten inkubiert. Vor der 30minütigen Inkubation bei RT mit dem unverdünnten EnVision™-Polymer (Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Polymer als Sekundärantikörper) wurden sie 3x3 min mit PBS/Tween-Puffer und abschließend 3 min mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde ein Diaminobenzidin-Mix (DAB-Mix: 1 ml Substrat-Puffer + 45 µl DAB Chromogen) auf die Schnitte aufgetragen, 1 min inkubiert und mit destilliertem Wasser gespült. Nach der Immunfärbung wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70, 96, 100%) und Toluol für 20-240 s dehydriert und mittels Histofluid eingeschlossen.

Die mikroskopischen Untersuchungen und die Fotodokumentation erfolgten mit dem Mikroskop Eclipse E1000 mit differentiellm Interferenzkontrast und Videoausstattung (CCD-1300) in Kombination mit dem Echtfarbbildanalyse-System LUCIA G und dem Drucker Stylus Photo 750.

2.2.2.7 Aktivitätsbestimmung mit *p*-Nitrophenol als Substrat

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden cytosolisches Protein (5-200 µg), 5 µl PAPS-Lösung (1 mM) und Pufferlösung (0,1 M MgCl₂ und 0,5 M KP-Puffer, pH 7,4) in einem Ansatzvolumen von 95 µl für 2 min bei 37°C im Heizblock vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 5 µl *p*-Nitrophenol (4 µM Finalkonzentration, in Wasser) bei 37°C gestartet. Abgestoppt wurde die Reaktion durch eine 2minütige Inkubation bei 100°C. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 23.100 x *g* zentrifugiert und in die Vials für die HPLC pipettiert.

Die Quantifizierung wurde mittels externen Standard (*p*-Nitrophenylsulfat) durchgeführt. Zur Herstellung der Standardstammlösung wurde *p*-Nitrophenylsulfat in Methanol gelöst. Anschließend wurde die Stammlösung auf die Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 und 10 µM in Fließmittel (0,1 M KH₂PO₄, 0,1% Essigsäure, 0,75% Isopropanol) verdünnt.

Die Proben (10 µl) wurden durch den Autosampler auf eine Nova-Pak[®]C18-Säule injiziert. Die HPLC wurde mit einer Flussrate von 0,7 ml/min bei einer Fließmitteltemperatur von 40 °C durchgeführt. Das *p*-Nitrophenylsulfat wurde mittels isokratischen Bedingungen bei 280 nm detektiert. Aus den Flächen der erhaltenen Peaks wurden die Konzentrationen des *p*-Nitrophenylsulfates in den Proben berechnet. Diese wurde mit Hilfe der aus den Standards ermittelten Regressionsgeraden bestimmt.

2.2.3 Bestimmung von DNA-Addukten mittels ^{32}P -Postlabelling

Kinasepuffer

200 mM Bicine
100 mM MgCl_2
100 mM DTT
10 mM Spermidin
pH 9,0

1x Natrium-Succinat-Puffer

100 mM Na-Succinat
50 mM CaCl_2
pH 6,0

Fließmittel D1

1 M Natriumdihydrogenphosphat
pH 6,0

Fließmittel D4+

1 M Ammoniumhydroxid

Fließmittel D3

3,5 M Lithiumformiat
8,5 M Harnstoff
pH 3,5

Fließmittel D4

0,8 M Lithiumchlorid
8,5 M Harnstoff
0,5 M Tris
pH 8,0

Fließmittel NN

0,3 M Ammoniumsulfat
10 mM Natriumphosphat
pH 7,4

Die im Rotationsverdampfer eingeeengten DNA-Proben (2,5 μg) wurden in Natrium-Succinat-Puffer (pH 6,0) in einem Volumen von 9,6 μl für 4 h bei 37°C und Zugabe von Micrococcus-Nuklease (0,12 mU/ μl) und Kalbsmilz-Phosphodiesterase (4 mU/ μl) hydrolysiert. Die erzeugten 3'-Phospho-Mononukleotide wurden mit 50 μCi γ - ^{32}P -ATP (> 7000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) durch eine T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PK, 0,46 U/ μl) vermittelte Reaktion in Kinasepuffer markiert (30 min, 37°C). Die multidirektionale Dünnschichtchromatographie wurde auf Polyethylenimin-imprägnierten Celluloseplatten (PEI) mit den Fließmitteln D1, D3, D4 und D4+ durchgeführt (Gupta 1985). Die Radioaktivität in Counts per Minute (CPM) auf den Chromatographieplatten wurde mit dem Instant Imager gemessen und mit der

entsprechenden Imager-Software quantifiziert. Die Addukte wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Addukte pro } 10^8 \text{ Nukleotide} = \frac{\text{net CPM} \times 33 \times \text{AF}}{\mu\text{g DNA} \times \text{spez. Akt.}}$$

net CPM	Counts Per Minute des Adduktflusses
33	Umrechnungsfaktor von fmol Addukt/mg DNA zu Addukten/ 10^8 Nukleotide
AF	Aliquotfaktor, sofern nicht der gesamte Probenansatz auf die TLC-Platte aufgetragen wurde
$\mu\text{g DNA}$	eingesetzte DNA-Probenmenge
spez. Akt.	spezifische Aktivität der T4-Polynukleotidkinase in CPM/fmol

Die Proben wurden in einer Zweifachbestimmung analysiert. Lag der Variationskoeffizient bei der Doppelbestimmung über 40%, so wurden die Proben erneut analysiert. Bei jeder Messung wurde ein PhIP-Standard (0,25 μg mit PhIP-adduktierter Heringsperma-DNA) mitgeführt.

2.2.4 Versuchstiere

Die für die Mikroinjektion verwendeten Mäuse und die für Zucht und Probennahme benötigte Wildtypmäuse des Inzuchtstammes FVB/N wurden von der Firma Harlan Laboratories (Niederlande) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung. Dabei wurden die Mäuse unter spezifiziert-pathogenfreiem Hygienestatus (SPF) bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, $55 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 h mit Wasser und pelletiertem Futter (Fa. ssniff Spezialitäten GmbH) *ad libitum* gehalten.

Für den Fütterungsversuch mit PhIP wurden 9-10 Wochen alte männliche Mäuse verwendet, die sowohl transgen (*hSULT1A1*1-*, *hSULT1A1*2-hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Gene, hemizygot) als auch nicht-transgen (Wildtyp) waren. Die Tiere wurden vor dem Versuch über Nacht nüchtern gehalten. Die Applikation erfolgte oral (Schlundsonde) mit einer wässrigen PhIP-Lösung (90 mg PhIP pro kg KM). Während des Versuches wurden die Tiere in Einzelkäfigen mit Wasser und pelletiertem Futter (Fa. ssniff Spezialitäten GmbH) *ad libitum*

gehalten. Nach 8 h wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und ausgewählte Organe entnommen.

2.2.5 Statistische Datenauswertung

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangnummern-Tests wurde geprüft, ob sich die Ergebnisse der Versuchsgruppen statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Als signifikanter Unterschied wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen, eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ galt als hochsignifikant und von $p < 0,001$ als höchstsignifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung transgener Mauslinien

3.1.1 Bearbeitung der Genkonstrukte

Zur Entwicklung transgener Mauslinien für die humanen Allele *SULT1A1*1* und *SULT1A1*2* wurden Konstrukte verwendet, die neben den humanen Gensequenzen zusätzlich große flankierende Bereiche stromauf- und stromabwärts beinhalteten. Diese humane genspezifische Umgebung sollte bewirken, dass durch die mit eingebrachten regulatorischen DNA-Sequenzen eine dem Menschen entsprechende gewebespezifische Genexpression erreicht wird. Zusätzlich sollte die Größe der Konstrukte den Einfluss des Integrationsortes im Mausgenom auf die Expression des Transgens minimieren.

Die verwendeten Konstrukte mit den jeweiligen humanen Allelen und flankierenden Bereichen inklusive des Vektors hatten eine Größe von ca. 85 (PAC) bzw. 211 kb (BAC). Das PAC enthielt die Gensequenzen der beiden *SULT1A*-Gene mit der Aminosäure Arginin an Position 213, gekennzeichnet in dieser Arbeit als *SULT1A1*1/SULT1A2*1*. Das BAC-Konstrukt enthielt die Allelvarianten, die durch den Einzelnukleotidaustausch und der daraus resultierenden Aminosäuresubstitution zu Histidin an Position 213 charakterisiert ist. Es ist in dieser Arbeit als *SULT1A1*2/SULT1A2*2* bezeichnet. Die in Bakterien ringförmig vorliegenden Genkonstrukte sind in Abbildung 3 dargestellt.

Durch meine Kollegin Gisela Dobbernack wurde das PAC-Konstrukt (teilweise sequenziert) so modifiziert, dass es für weitere Schritte direkt verwendet werden konnte (Dobbernack 2008). Das die *2-Varianten enthaltene BAC-Konstrukt (vollständig sequenziert, GenBank Accession Nummer AC136948) wurde von unserem Kooperationspartner der AG Himmelbauer vom MPI für Molekulare Genetik in Berlin über das Humane Genomprojekt bezogen und konnte ebenfalls für weitere Arbeiten direkt verwendet werden.

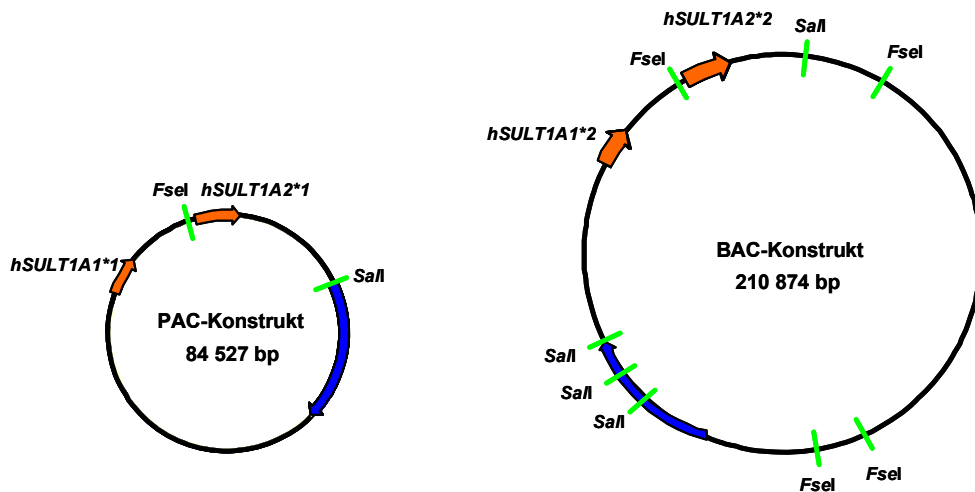


Abbildung 3: Darstellung der PAC- und BAC-Konstrukte. Die Abbildung zeigt die verwendeten Konstrukte mit den entsprechenden Gensequenzen und Restriktionsschnittstellen. Links ist das PAC-Konstrukt und rechts das BAC-Konstrukt abgebildet. In orangenen Pfeilen sind die *SULT1A*-Gene dargestellt und die grünen Linien bilden die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *SaII* und *FseI*. In den Konstrukten ist das Rückgrat (Plasmid-Replicolon) als blauer Pfeil dargestellt.

Für die Herstellung der transgenen Mäuse sollten Konstrukte vorbereitet werden, welche die Humansequenzen mit den Genen *SULT1A1*1*, *SULT1A1*2* und *SULT1A1*2/SULT1A2*2* und flankierende Bereiche enthielten (Tabelle 1). Dabei war es das Ziel, aus den beiden Ausgangskonstrukten ein Genkonstrukt mit nahezu identischer Größe in das Mausgenom einzubringen. Dadurch sollte unter anderem eine direkte Vergleichbarkeit der beiden transgenen Mauslinien gewährleistet werden.

Tabelle 1: Aufzählung der verwendeten Gen-Konstrukte für die Herstellung transgener Mäuse.

Gen-Konstrukt	Konstrukt-Quelle	Restriktionsenzyme	Größe
<i>hSULT1A1*1</i>	PAC	<i>SaII</i> , <i>FseI</i>	66 kb
<i>hSULT1A1*2</i>	BAC	<i>SaII</i> , <i>FseI</i>	57 kb
<i>hSULT1A1*1/ hSULT1A2*1</i>	PAC	<i>SaII</i>	85 kb ^a
<i>hSULT1A1*2/ hSULT1A2*2</i>	BAC	<i>SaII</i>	75 kb

^a siehe Dissertation Gisela Dobbernack (Dobbernack 2008)

Diese Konstrukte mit den humanen Genen wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) separiert, beispielhaft für ein Konstrukt in Abbildung 4 dargestellt. Zur reproduzierbaren Separation großer DNA-Fragmente wird die PFGE in Agarosegelen bevorzugt verwendet (Schwartz *et al.* 1984). Das Fragment mit dem entsprechenden Gen/Genen wurde ohne DNA-Färbung mit Ethidiumbromid aus dem Gel ausgeschnitten. Die Anfärbung mit Ethidiumbromid als interkalierender DNA-Farbstoff und damit eine Schädigung der DNA musste vermieden werden, weil die isolierte DNA direkt für die Mikroinjektion verwendet wurde. Anschließend wurden die DNA beinhaltenden Gelstücke enzymatisch verdaut und die freigesetzte DNA mittels Fällung konzentriert und für die Mikroinjektion verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1.13).

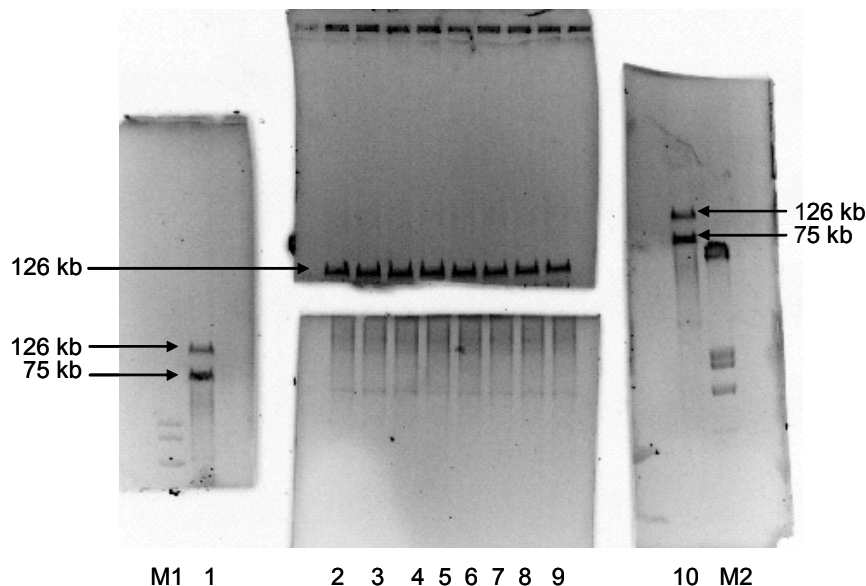


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der Restriktionsanalyse der BAC-DNA (AC136948) mit den *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Genen. Zur Isolierung der *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Gene wurde das BAC-Konstrukt mit dem Restriktionsenzym *SalI* verdaut und mittels PFGE in 4 Fragmente separiert. Dabei enthalten die 75 kb-Fragmente die *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Gene mit den flankierenden Sequenzen. Die restlichen 3 Fragmente (2,0; 6,4 und 126 kb) bestehen aus Vektor und weiteren humanen Sequenzen, die nicht mit in die Maus überführt werden sollten. Abgebildet sind 126 und 75 kb-Fragmente nach Verdau der BAC-DNA (Spur 1-10), Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (M1), Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* -Marker (M2). Die beiden äußeren Gelstreifen mit Marker und je einer Probenspur wurden mit Ethidiumbromid zur Visualisierung der Fragmente angefärbt und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Anschließend wurden die Gelstücke in Saranfolie seitlich an das ungefärbte Gel gelegt und ein Gelstreifen mit den 75 kb-Fragmenten horizontal zu den markierten Gelstücken ohne Ethidiumbromidfärbung ausgeschnitten und für die Mikroinjektion vorbereitet. Zum Abschluss wurden die beiden Teile des mittleren Gelstückes mit Ethidiumbromid angefärbt, um zu überprüfen, ob die 75 kb-Fragmente korrekt aus dem ungefärbten Gel ausgeschnitten wurden. Die seitlich abgeschnittenen Gelstücke liegen in der Abbildung nicht an ihrer ursprünglichen Stelle, sondern sind nach unten (links) bzw. oben (rechts) verschoben.

3.1.2 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde von unserem Kooperationspartner am MPI für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt. Die aus dem Gel extrahierte und in einem entsprechenden Puffer gelöste DNA wurde in den männlichen Vorkern befruchteter Maus-Oocyten des Inzuchtstammes FVB/N injiziert. Die manipulierten Oocyten wurden scheinträchtigen Ammen implantiert. Pro Genkonstrukt wurden 5 bis 10 Mikroinjektionen zur Gewinnung von Foundertieren durchgeführt.

3.1.3 Überprüfung der Integration der humanen *SULT1A*-Gene in den Foundertieren

In DNA aus Schwanzspitzen der potentiellen Founder wurde molekularbiologisch untersucht, ob die Tiere die Transgensequenzen in ihre DNA integriert hatten. Das Schema der humanen Gene (Exon- und Intronlängen sind nicht exakt dargestellt) und der resultierenden PCR-Produkte ist in Abbildung 5 und die Analyse der PCR-Produkte in Agarosegelen in Abbildung 6 dargestellt. Dabei konnten zu den Fragmenten, die nur das *SULT1A1*1*-Allel enthielten die Foundertiere #30 und #31, dem Fragment mit dem *SULT1A1*2*-Allel der Founder #14 und dem Fragment, das sowohl das *SULT1A1*2*- als auch *SULT1A2*2*-Allel enthielt Founder #28 identifiziert werden. Bei diesen Tieren konnte eine Integration der humanen Gensequenzen in das Genom nachgewiesen werden.

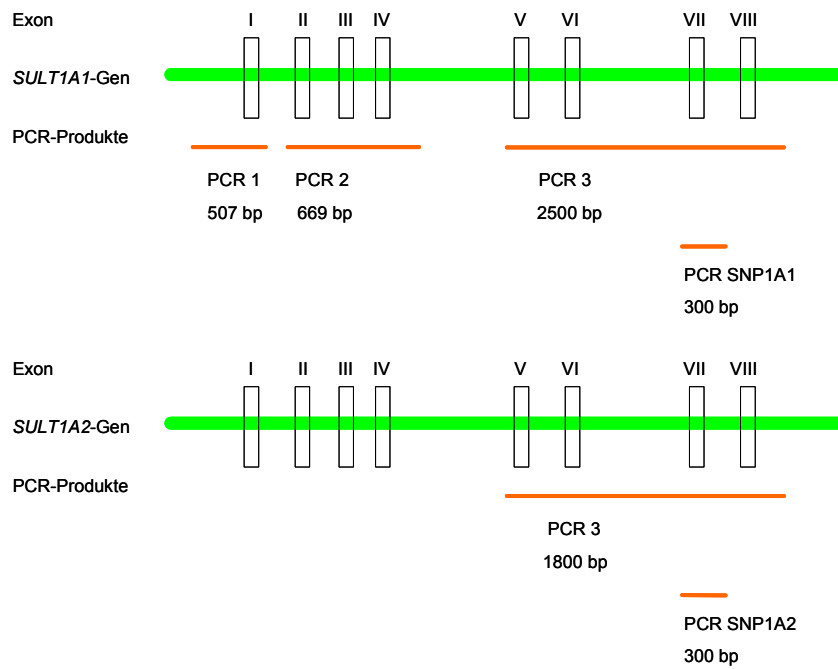


Abbildung 5: Schematische Darstellung der humanen *SULT1A1*- und *SULT1A2*-Gene. Abgebildet sind das humane *SULT1A1*-Gen (oben) und *SULT1A2*-Gen (unten) und die amplifizierten Bereiche mittels PCR zur Untersuchung der Integration des humanen Gens in das Mausgenom.

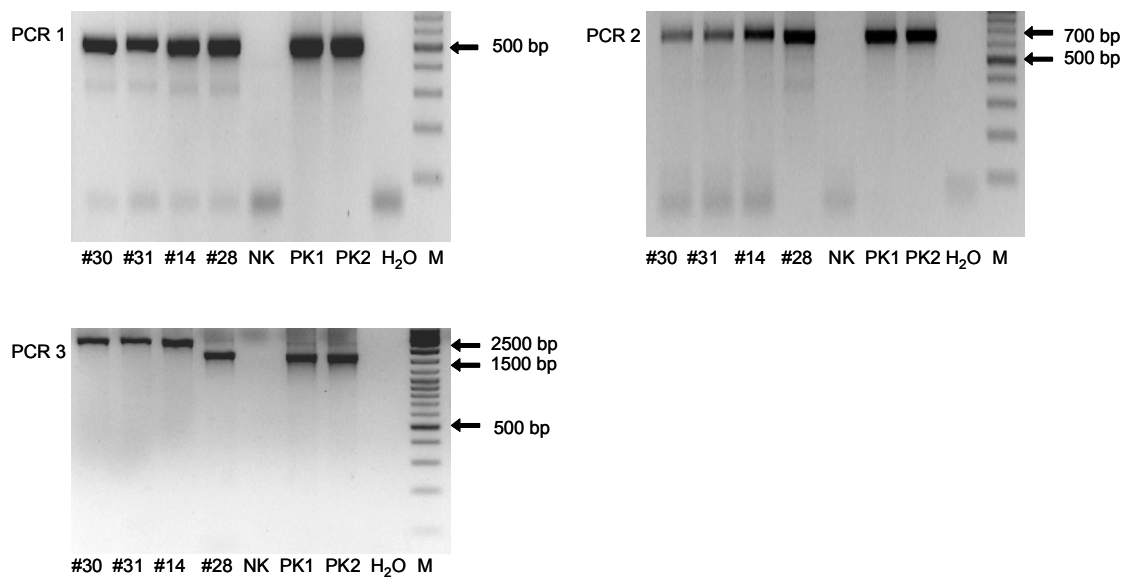


Abbildung 6: Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung der Integration der humanen Gensequenzen in das Mausgenom. #30, #31, #14 und #28 entsprechen den Foundertieren, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle, PK1 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Genen (PAC-DNA), PK2 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Genen (BAC-DNA), H₂O als Wasserkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die amplifizierten Bereiche der PCR-Produkte sind 507 bp (PCR 1), 669 bp (PCR 2), 2500 bp bei *hSULT1A1*-Gen allein und 1800 bp bei *hSULT1A1*- und *hSULT1A2*-Genen (PCR 3). Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide in Tabelle 6 aufgeführt.

3.1.4 Überprüfung der *SULT1A*-Genotypen der Foundertiere

Mittels PCR und anschließender Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) wurden die Genotypen der Foundertiere überprüft. Es wurde eine im Labor etablierte und publizierte Methode verwendet (Engelke *et al.* 2000), die auch in humanen Studien für Polymorphismusanalysen angewandt wurde. Die *SULT1A1*-PCR-Produkte hatten eine Größe von 268 bp und die *SULT1A2*-PCR-Produkte hatten eine Größe von 295 bp, wurden mit zwei Restriktionsenzymen inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. *Bsp143II* schneidet die Sequenz für *SULT1A1*1* in zwei Fragmente von 164 und 104 bp, wegen des Einzelnukleotidaustausches (SNP) schneidet es nicht das *SULT1A1*2*-PCR-Produkt. Das Enzym *BpiI* schneidet die Sequenz von *SULT1A2*2* in zwei Fragmente von 230 und 65 bp, nicht aber die Sequenz von *SULT1A2*1*. Nach der Restriktion wurden die Fragmentlängen im Agarosegel (Abbildung 7) bestimmt. Dabei konnte in den Foundern #30 und #31 das *SULT1A1*1*-Allel, in Founder #14 das *SULT1A1*2*-Allel und im Foundertier #28 die Allele *SULT1A1*2/SULT1A2*2* nachgewiesen werden.

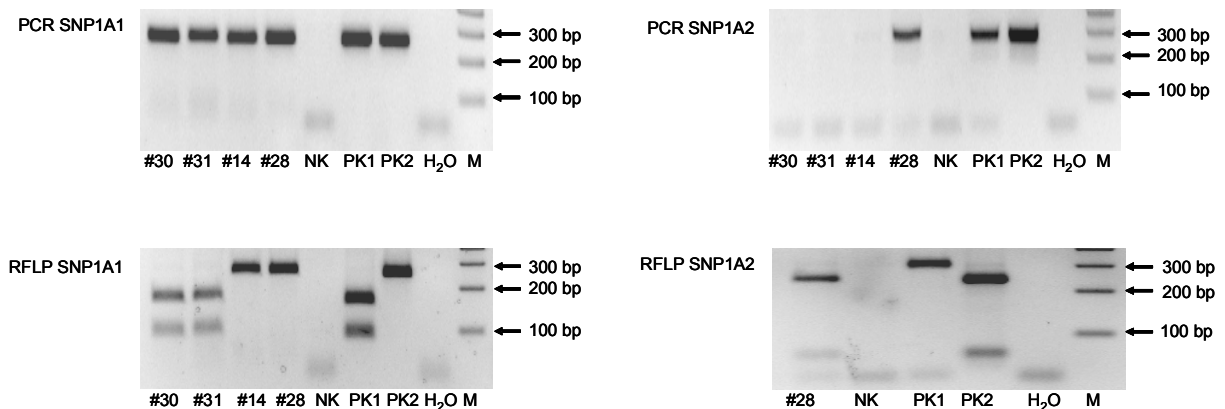


Abbildung 7: Darstellung der PCR-Produkte und anschließender RFLP-Analyse zur Genotypisierung der Foundertiere.

Abgebildet sind im oberen Teil die *hSULT1A1*-PCR-Produkte (links: PCR SNP1A1, 268 bp) und die *hSULT1A2*-PCR-Produkte (rechts: PCR SNP1A2, 295 bp) und im unteren Teil die RFLP-Analysen nach Restriktionsverdau mit *Bsp143II* (links: RFLP SNP1A1) und *BpiI* (rechts: RFLP SNP1A2). #30, #31, #14 und #28 entsprechen den Foundertieren, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle, PK1 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Genen (PAC-DNA), PK2 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Genen (BAC-DNA), H₂O als Wasserkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die Founder #30, #31 enthalten den Genotyp *SULT1A1*1*, der Founder #14 den Genotyp *SULT1A1*2* und das Foundertier #28 den Genotyp *SULT1A1*2/SULT1A2*2*. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide in Tabelle 6 aufgeführt.

3.1.5 Überprüfung der Weitergabe der humanen *SULT1A*-Gene an die Nachkommen

Zur Züchtung stabiler, transgener Mauslinien wurden die Foundertiere mit FVB/N-Tieren verpaart. Auch die Nachkommen dieser Verpaarung (F1) wurden mit Wildtyp-Tieren des Inzuchtstammes FVB/N verpaart. Alle Nachkommen eines Founders, bei denen das Transgen in alle Teilen in einheitlicher Form vorliegt, bildeten eine transgene Mauslinie. Diese Linien wurden nach dem jeweiligen Foundertier benannt.

Bei den Linien 30 (*SULT1A1*1*-Genkonstrukt) und 14 (*SULT1A1*2*-Genkonstrukt) konnten nach der F1-Generation jedoch keine weiteren Nachkommen gezüchtet werden. Die Nachkommen der Linien 31 (*SULT1A1*1*-Genkonstrukt) und 28 (*SULT1A1*2/SULT1A2*2*-Genkonstrukt) wurden hinsichtlich der vollständigen Weitergabe der humanen Gensequenzen, wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben, untersucht. In den Tieren der Linie 31 wurden die gleichen

PCR-Produkte wie beim Foundertier nachgewiesen. Bei der Linie 28 zeigten die Tiere in der F1-Generation eine andere Größe des Transgens, was sich im PCR-Produkt 3 verdeutlicht (Abbildung 8), während die PCR-Produkte 1 und 2 der Nachkommen aus Linie 28 die gleiche Größe des Founders hatten. Das PCR-Produkt 3 hatte die gleiche Größe wie das in Linie 31, was darauf hindeutete, dass mindestens der 3'-Bereich des *SULT1A2*-Gens nicht an die Nachkommen weitergegeben worden war. Dies wurde in 3.1.6 genauer untersucht.

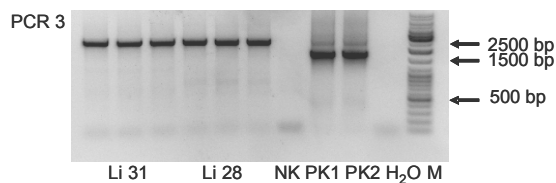


Abbildung 8: Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung der Integration der humanen Gensequenzen in das Mausgenom. Li 31 und Li 28 entsprechen jeweils drei Tieren der Nachkommen des Founders, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle, PK1 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Genen (PAC-DNA), PK2 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Genen (BAC-DNA), H₂O als Wasserkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die amplifizierten Bereiche der PCR-Produkte sind 2500 bp, wenn nur das *hSULT1A1*-Gen vorhanden ist und 1800 bp, wenn auch das *hSULT1A2*-Gen vorhanden ist (PCR 3). Die Nachkommen der Founder #31 und #28 haben das *hSULT1A1*-Gen als Transgen integriert. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide in Tabelle 6 aufgeführt.

3.1.6 Überprüfung der *SULT1A*-Genotypen in den Nachkommen

Da die Nachkommen des Founders #28 eine andere Größe des PCR-Produktes 3 aufwiesen, wurden die Genotypen der Nachkommen von Founder #31 und #28 mit PCR und RFLP, wie für die Founder unter 3.1.4. beschrieben, nochmals überprüft.

Dabei konnte nachgewiesen werden, dass deren *SULT1A1*-Genotyp dem Genotyp des jeweiligen Founders entsprach (Abbildung 9). Die Nachkommen der Linie 31 haben den Genotyp *hSULT1A1*1* und die Nachkommen der Linie 28 den Genotyp *hSULT1A1*2*. Weder bei Linie 31 noch bei Linie 28 konnte ein PCR-Produkt für die Genotypisierung von *SULT1A2* erhalten werden (Abbildung 9). Bei Linie 31 war dies zu erwarten, nicht jedoch bei den Nachkommen von Founder

#28. Auch dieses Ergebnis zeigte, dass das *SULT1A2*-Gen nicht oder nur zum Teil weitergegeben worden war.

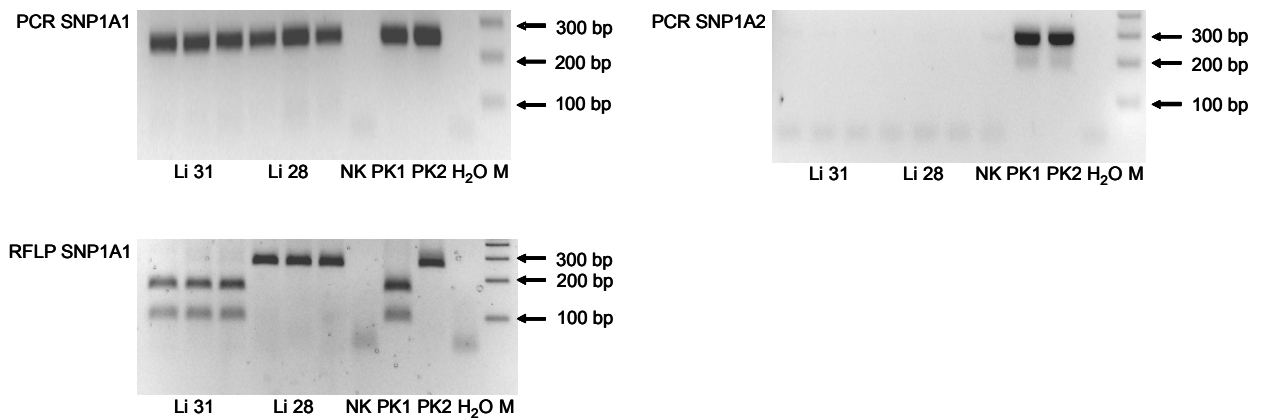


Abbildung 9: Darstellung der RFLP-Analyse zur Genotypisierung der Nachkommen der Foundertiere. Abgebildet sind im oberen Teil die *hSULT1A1*-PCR-Produkte (links: PCR SNP1A1, 268 bp) und die *hSULT1A2*-PCR-Produkte (rechts: PCR SNP1A2, 295 bp) und im unteren Teil die RFLP-Analyse nach Restriktionsverdau mit *Bsp143II* (RFLP SNP1A1). Li 31 und Li 28 entsprechen jeweils drei Nachkommen der Founder, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle, PK1 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Genen (PAC-DNA), PK2 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Genen (BAC-DNA), H₂O als Wasserkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die Nachkommen der Li 31 enthalten den Genotyp *SULT1A1*1*, Nachkommen der Li 28 den Genotyp *SULT1A1*2*. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide (Tabelle 6) aufgeführt.

3.1.7 Übersicht über die entwickelten transgenen Mauslinien

Zusammenfassend sind in Tabelle 2 die in dieser Arbeit nach der Mikroinjektion generierten Foundertiere und die durch Verpaarung mit FVB/N-Wildtypen erzielten transgenen Mauslinien aufgeführt. Die transgenen Linien 25 und 27 (*hSULT1A1*2/hSULT1A2*2*) wurden in dieser Arbeit nicht ausführlich analysiert. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Charakterisierung der transgenen Mäuse der Linie 31 mit dem *hSULT1A1*1*-Allel und der Linie 28 mit dem *hSULT1A1*2*-Allel aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht der in dieser Arbeit generierten Founder und transgenen Mauslinien.

Gen-Konstrukt	Foundertier	transgene Mauslinie	Transgen
<i>hSULT1A1*1</i>	#30	-	-
<i>hSULT1A1*1</i>	#31	Linie 31	<i>hSULT1A1*1</i>
<i>hSULT1A2*2</i>	#14	-	-
<i>hSULT1A1*2/</i> <i>hSULT1A2*2</i>	#28	Linie 28	<i>hSULT1A1*2</i>
<i>hSULT1A1*2/</i> <i>hSULT1A2*2</i>	#25	Linie 25	<i>hSULT1A1*2/</i> <i>hSULT1A2*2</i>
<i>hSULT1A1*2/</i> <i>hSULT1A2*2</i>	#27	Linie 27	<i>hSULT1A1*2/</i> <i>hSULT1A2*2</i>

- mit den Foundertieren konnte keine transgene Mauslinie etabliert werden

3.2 Charakterisierung der transgenen Mauslinien

3.2.1 Charakterisierung der in das Mausgenom insertierten humanen DNA

Die Konstrukte, die nach Mikroinjektion in das Mausgenom integriert wurden, enthielten neben den *SULT1A*-Genen flankierende Bereiche stromaufwärts und stromabwärts. Das Schema des für die Mikroinjektion verwendeten Genkonstruktes und die für die Integrationsanalyse ausgewählten Primerpaare sind in Abbildung 10 dargestellt.



Abbildung 10: Schematische Darstellung des humanen Gen-Clusters für die Mikroinjektion des humanen *SULT1A1*-Gens in das Mausgenom (66 kb für das PAC-Konstrukt und 57 kb für das BAC-Konstrukt). Abgebildet sind die humanen Gene *hSULT1A1* und *hSULT1A2*, die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *FseI* zur Restriktion des humanen *SULT1A1*-Gens und flankierender Bereiche aus den PAC- bzw. BAC-Konstrukten und die beispielhaften amplifizierten Abschnitte mittels PCR zur Untersuchung der Integration des Transgens in das Mausgenom.

Zur Analyse des *SULT1A1*1*-Gen-Konstruktes aus dem PAC wurden 17 Primerpaare und 16 Primerpaare für das *SULT1A1*2*-Gen-Konstrukt aus dem BAC verwendet. Dabei ergaben die PCR-Analysen, dass das *SULT1A1*1*-Gen-Konstrukt von den Restriktionsschnittstellen *SalI* und *FseI* mit zusätzlichen 1,0 kb stromabwärts der *FseI*-Restriktionsschnittstelle vollständig integriert war. Das *SULT1A1*2*-Gen-Konstrukt war, wie nach den vorherigen Ergebnissen erwartet, nicht wie ursprünglich beabsichtigt integriert. Es besteht aus 8,8 kb stromaufwärts des *SULT1A1*-Gens mit zusätzlich 1,0 kb stromabwärts nach der *FseI*-Restriktionsschnittstelle. In der folgenden Abbildung 11 sind ausgewählte PCR-Produkte dargestellt, die die Gen-Konstrukte der beiden transgenen Mauslinien exemplarisch wiedergeben sollen.

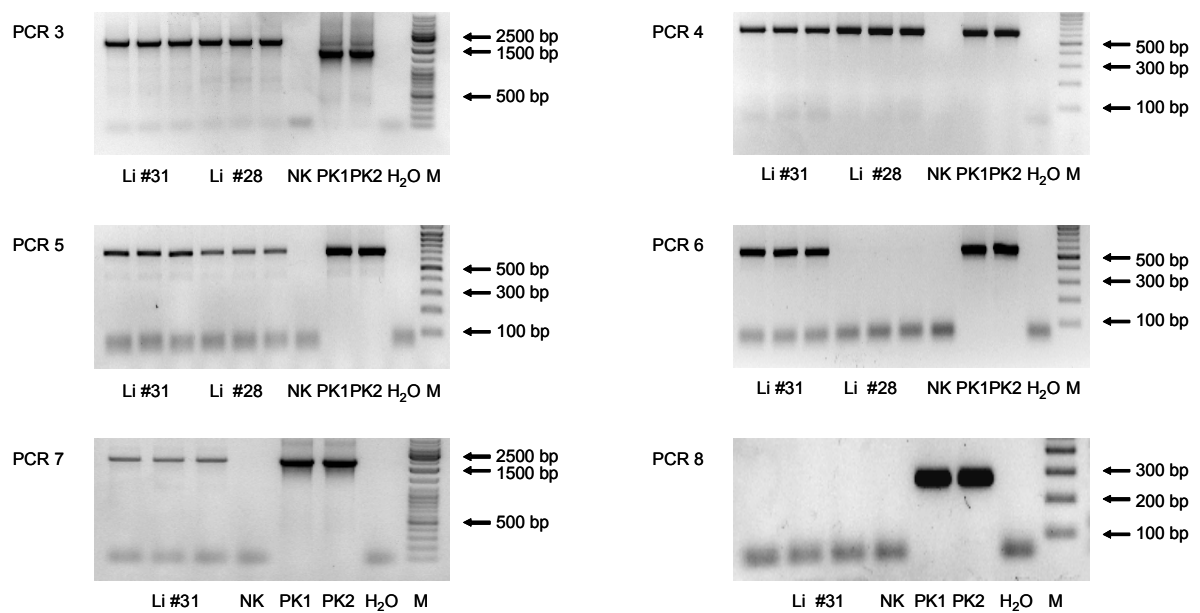


Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung der PCR-Produkte zur Analyse des integrierten Bereiches der injizierten Konstrukte für *SULT1A1*1* in Linie 31 und *SULT1A1*2* in Linie 28. Abgebildet sind im oberen Teil die PCR-Produkte der PCR 3 (2500 bp beim Nachweis des *hSULT1A1*-Gens und 1800 bp bei den *hSULT1A1*- und *hSULT1A2*-Genen) und PCR 4 (638 bp), wobei die PCR 4 das Ende des Gen-Konstruktes stromabwärts des *SULT1A1*-Gens beider transgener Mauslinien darstellt. Mittig sind die PCR-Produkte stromaufwärts des *SULT1A1*-Gens mit den PCR-Produkten der PCR 5 (712 bp) und PCR 6 (585 bp) abgebildet. Dabei stellt die PCR 5 das Ende des Gen-Konstruktes der Linie 28 dar. Im unteren Bereich sind die PCR-Produkte der PCR 7 (2404 bp) und PCR 8 (278 bp) dargestellt. Dabei bildet die PCR 7 das Ende des Gen-Konstruktes der Linie 31. Li 31 und Li 28 entsprechen jeweils drei Tieren der transgenen Mauslinien, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle, PK1 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Genen (PAC-DNA), PK2 der Positivkontrolle mit den *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Genen (BAC-DNA), H₂O als Wasserkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide in Tabelle 6 aufgeführt.

3.2.2 Bestimmung der Kopienzahl des Transgens

Ziel dieser Arbeit war es, transgene Mauslinien mit den allelischen Genvarianten in identischer Kopienzahl zu generieren. Die Foundertiere und die Nachkommen in den Folgegenerationen wurden mit Wildtypen des FVB/N-Inzuchtstammes verpaart. Nur die Tiere mit der geringsten Kopienzahl wurden für weitere Verpaarungen verwendet. Wurden keine Änderungen in der Kopienzahl detektiert, erfolgte die Zucht zur Homozygotie. Zur Analyse dieser transgenen (hemizygoten) Nachkommen wurde eine Real-Time-PCR-Methode etabliert. Unter Einbeziehung einer Standardkurve zur Quantifizierung der eingesetzten Menge an DNA

unbekannter DNA-Proben (Quotient aus relativer Kopienzahl des Transgens/relativer Kopienzahl des Referenzgens) konnte die relative Kopienzahl der transgenen Tiere bestimmt werden. Die Primer für das Transgen (Kopienzahl_F/Kopienzahl_R) bestehen aus Sequenzen des Promotorbereiches des humanen *SULT1A1*-Gens, die Primer für das Referenzgen aus Sequenzen des murinen *Globulin*-Gens (Kopienzahl_Referenz_F/Kopienzahl_Referenz_R). Die Primersequenzen und die Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 6 im Anhang I aufgeführt.

Die transgenen Mauslinien mit den allelischen Varianten *SULT1A1**1 und *SULT1A1**2 haben eine identische Kopienzahl (Abbildung 12). Das Tier #1 wurde dabei auf eine Kopie gesetzt. Aus vergleichenden Analysen mit bereits etablierten transgenen Mauslinien aus dieser Arbeitsgruppe wird die Kopienzahl dieser *SULT1A1*-transgenen Mauslinien auf eine bis zwei Kopien geschätzt.

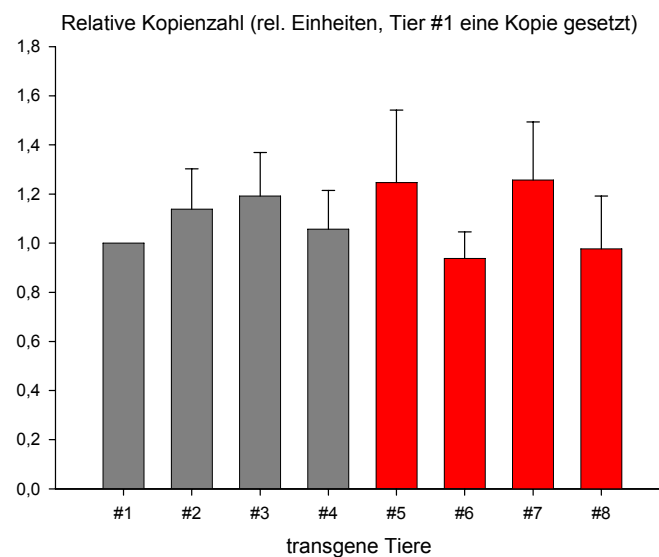


Abbildung 12: Darstellung der relativen Kopienzahl der transgenen Mäuse aus den Linien mit den Genvarianten *SULT1A1**1 und *SULT1A1**2 mittels Real-Time-PCR. In den grauen Blöcken sind beispielhaft vier transgene, hemizygoten Tiere aus der Linie 31 mit dem *SULT1A1**1-Allel dargestellt, in den roten Blöcken sind vier transgene, hemizygoten Tiere aus der Linie 28 mit dem *SULT1A1**2-Allel abgebildet. Dargestellt sind je Tier Mittelwert und Standardabweichung einer Dreifachbestimmung. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide tabellarisch aufgeführt (Tabelle 6).

3.2.3 Gewebeverteilung des humanen SULT1A1-Proteins

Die Expression des humanen SULT1A1-Proteins in den transgenen Mauslinien (männlich, 9 Wochen alt, hemizygot) wurde in Immunblots nachgewiesen. Dazu wurden cytosolische Fraktionen verschiedener Gewebe der Mäuse mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einem spezifischem Antiserum inkubiert (Primärantikörper gegen die humane SULT1A1, in einer BSA-Lösung 1:2.000 verdünnt). Die Expression der humanen SULT1A1 wurde mit einem an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (anti-rabbit, in einer BSA-Lösung 1:5.000 verdünnt) detektiert. In *Salmonella typhimurium* TA1538 exprimierte humane und murine SULT-Formen wurden als Standards mitgeführt. Die Unterschiede in den Intensitäten der Standards beruhen auf verschiedenen Belichtungszeiten der Blotmembranen.

Für beide transgenen Mauslinien konnte eine cytosolische Expression der humanen SULT1A1 in Leber, Colon und Caecum nachgewiesen werden (Abbildung 13). In Niere, Lunge, Milz und der Mucosa von Duodenum, Jejunum und Ileum konnte nur in der Linie 28 eine Expression nachgewiesen werden (Abbildung 13, Abbildung 14). In Gehirn, Herz, Magen, Pancreas, Harnblase, Hoden und Haut konnte in keiner der beiden transgenen Linien eine cytosolische Expression der humanen SULT1A1 mittels dieser Methode detektiert werden.

Durch Immunoblots mit Titrationsreihen konnte die Proteinmenge ermittelt werden, bei deren Verwendung sich die Bandenstärken der Gewebecytosole der transgenen Linien und der Standards so ähnlich waren, dass der auftretende Fehler bei der Blotentwicklung und Exposition als gering eingestuft werden konnte. So wurde für verschiedene Gewebe und Organe hemizygoter Mäuse der transgenen Linien 31 und 28 der Anteil der hSULT1A1 an der Gesamtmenge des cytosolischen Proteins gemessen. Der Anteil der hSULT1A1 im Cytosol des Standards lag bei ca. 1% (Meinl *et al.* 2006). Die aufgetragene Gesamtproteinmenge und der Anteil des spezifischen humanen SULT1A1-Proteins ist in Tabelle 3 aufgeführt. Die Expression in der Linie 28 ist um den Faktor 5 in Leber und Colon und um den Faktor 11 im Caecum im Vergleich zur Linie 31 erhöht.

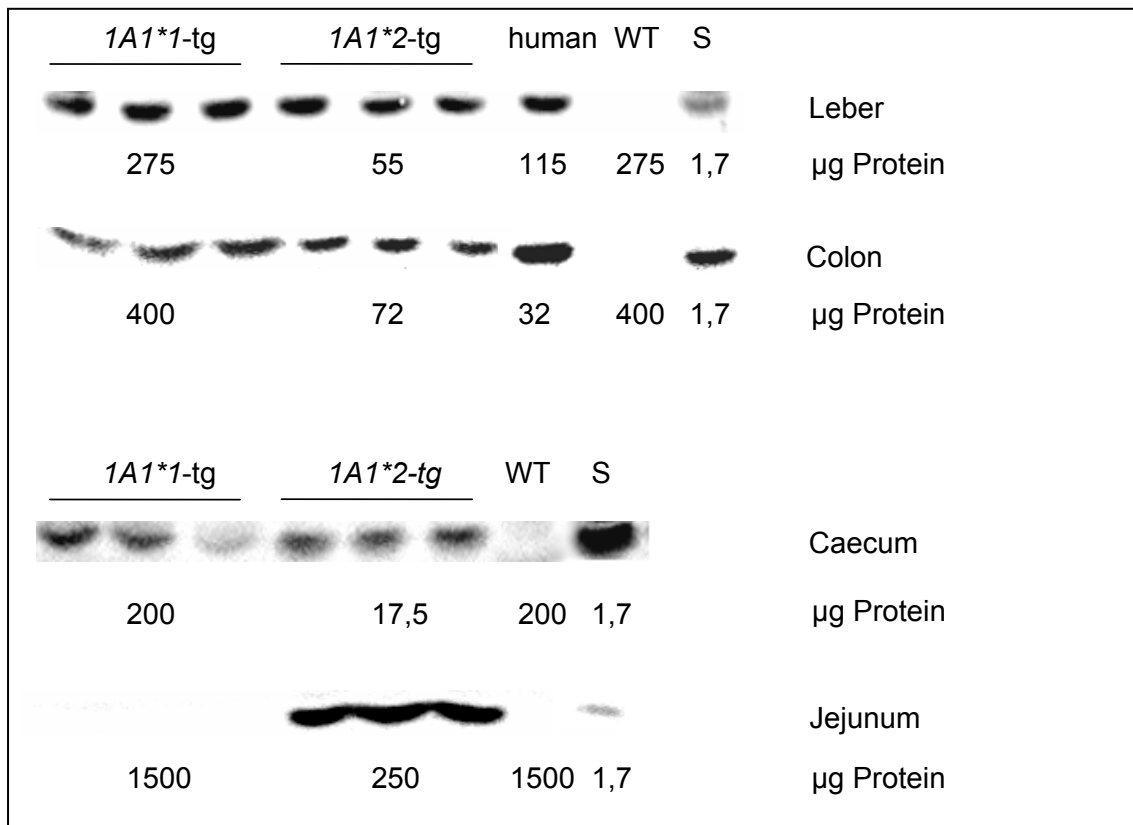


Abbildung 13: Immundetektion von hSULT1A1 in Cytosolen transgener Mäuse der Linien 31 (*1A1*1-tg*) und 28 (*1A1*2-tg*). Detektion von hSULT1A1 mit dem Antiserum gegen die humane SULT1A1 (1:2.000) in den cytosolischen Fraktionen verschiedener Organe und Gewebe von hemizygoten, transgenen Mäusen sowie einer Wildtyp-Maus des Inzuchtstammes FVB/N. Alle Tiere waren männlich und 9 Wochen alt. *1A1*1-tg*: Cytosol drei transgener Mäuse der Linie 31 mit *hSULT1A1*1*, *1A1*2-tg*: Cytosol drei transgener Mäuse der Linie 28 mit *hSULT1A1*2*, human: Cytosol einer humanen Probe, WT: Cytosol einer Wildtyp-Maus, S: Standard, Cytosol aus *Salmonella typhimurium* TA1538 mit exprimiertem humanen SULT1A1-Protein.

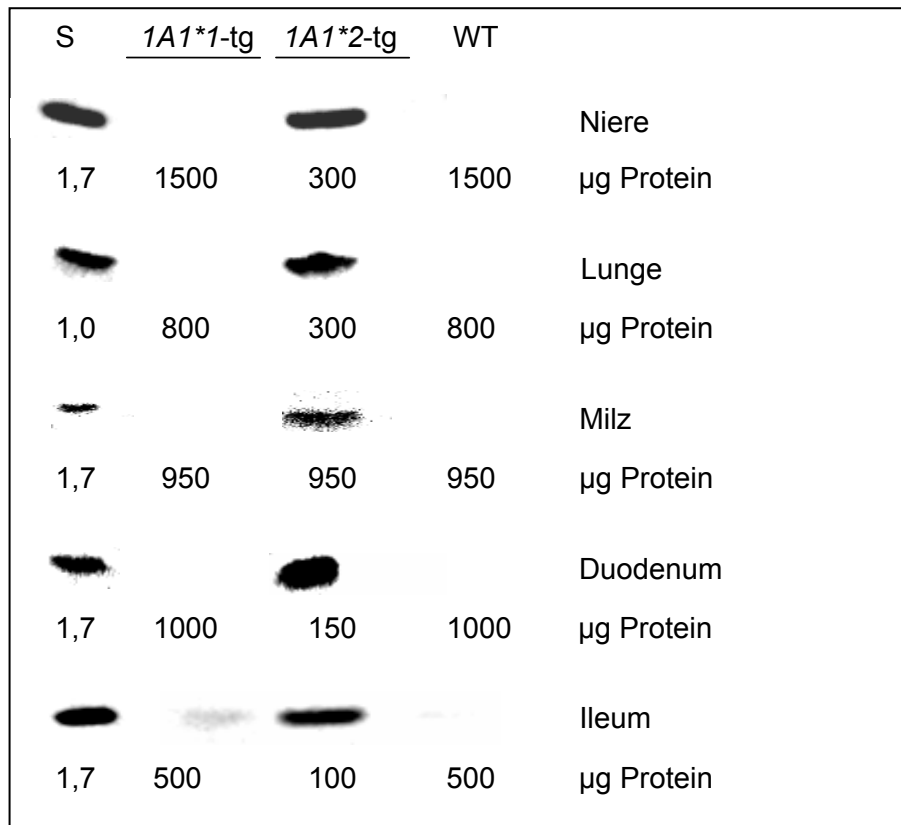


Abbildung 14: Immundetektion von hSULT1A1 in Cytosolen transgener Mäuse der Linien 31 (*1A1*1-tg*) und 28 (*1A1*2-tg*). Detektion von hSULT1A1 mit dem Antiserum gegen die humane SULT1A1 (1:2.000) in den cytosolischen Fraktionen verschiedener Organe und Gewebe von hemizygoten, transgenen Mäusen sowie einer Wildtyp-Maus des Inzuchtstammes FVB/N. Alle Tiere waren männlich und 9 Wochen alt. *1A1*1-tg*: Cytosol einer transgenen Maus der Linie 31 mit *hSULT1A1*1*, *1A1*2-tg*: Cytosol einer transgenen Maus der Linie 28 mit *hSULT1A1*2*, WT: Cytosol einer Wildtyp-Maus, S: Standard, Cytosol aus *Salmonella typhimurium* TA1538 mit exprimiertem humanen SULT1A1-Protein.

Tabelle 3: Aufgetragene Gesamtproteinmenge in Immunblots und Anteil des spezifischen hSULT1A1-Proteins vom Gesamtprotein.

Organ	Gesamtprotein in µg (Anteil des spezifischen Proteins an Gesamtprotein in %)			
	Li 31 mit <i>hSULT1A1*1</i>	Li 28 mit <i>hSULT1A1*2</i>	Wildtyp	humane Probe
Leber	275 (0,06)	55 (0,3)	275 ^b	115
Colon	400 (0,003)	72 (0,016)	400 ^b	32
Caecum	200 (0,002)	17,5 (0,026)	200 ^b	keine Probe
Jejunum	1500 ^b	250 (0,068)	1500 ^b	keine Probe
Niere	1500 ^b	300 (0,006)	1500 ^b	keine Probe
Lunge	800 ^b	300 (0,002)	800 ^b	keine Probe
Milz	950 ^b	950 (0,005)	950 ^b	keine Probe
Duodenum	1000 ^b	150 (0,041)	1000 ^b	keine Probe
Ileum	500 ^b	100 (0,009)	500 ^b	keine Probe
Gehirn	1000 ^b	1000 ^b	1000 ^b	keine Probe
Herz	750 ^b	750 ^b	750 ^b	keine Probe
Magen	800 ^b	800 ^b	800 ^b	keine Probe
Pancreas	800 ^b	800 ^b	800 ^b	keine Probe
Harnblase	128 ^b	128 ^b	128 ^b	keine Probe
Hoden	650 ^b	650 ^b	650 ^b	keine Probe
Haut	650 ^b	650 ^b	650 ^b	keine Probe

^b keine Detektion der cytosolischen Expression des humanen SULT1A1-Proteins in Immunblots bei maximal gefüllten Probenaschen in der SDS-Gelelektrophorese

Die unterschiedliche Proteinexpression zwischen der *SULT1A1*1*- und *SULT1A1*2*-transgenen Mauslinie wurde mit weiteren, in dieser Arbeit und in dieser Abteilung etablierten, transgenen Mäusen verglichen (Abbildung 15). Hierfür wurde Lebercytosol von einem Tier der Linie 714 (*SULT1A1*1/SULT1A2*1*) und Linie 25 (*SULT1A1*2/SULT1A2*2*) hinzugezogen. Diese haben, wie die Tiere in den Linien 31 und 28, ebenfalls eine identische Kopienzahl (ca. 8 Kopien). Zusätzlich wurde die hSULT1A-überexprimierende transgene Mauslinie 7 (*SULT1A1*1/SULT1A2*1*, ca. 23 Kopien) in diesem Immunblot mitgeführt (Abbildung 15). Zwischen den *1- und den *2-Genkonstrukten, bei identischer Kopienzahl, war die Proteinexpression im Lebercytosol in den *2-transgenen Linien um etwa den Faktor 4 erhöht. Auch der Anteil des spezifischen Proteins in der Leber war in den *2-Genkonstrukt-Mäusen verglichen mit den *1-Konstrukt-Mäusen erhöht (in Linie 714 bei 0,4%, in Linie 25 bei 2,2% und bei Linie 7 bei ca. 6%).

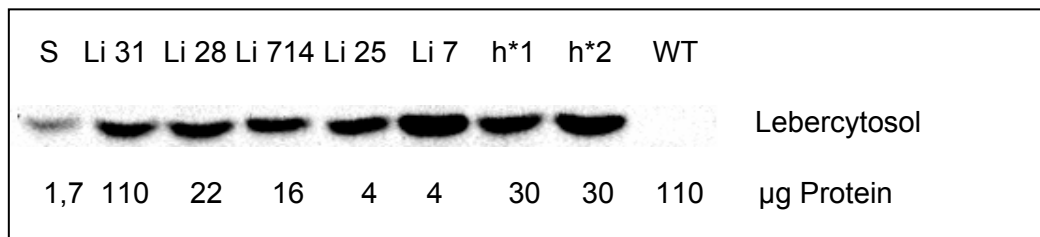


Abbildung 15: Immundetektion von hSULT1A1 in Cytosolen transgener Mäuse. Detektion von hSULT1A1 mit dem Antiserum gegen die humane SULT1A1 (1:2.000) in den cytosolischen Fraktionen der Leber von hemizygoten, transgenen Mäusen sowie einer Wildtyp-Maus des Inzuchtstammes FVB/N und humanen Proben (beide homozygot). Alle Tiere waren männlich und 9 Wochen alt. Li 31: Cytosol einer transgenen Maus der Linie 31 mit *hSULT1A1*1*-Allel, ca. 1-2 Kopien; Li 28: Cytosol einer transgenen Maus der Linie 28 mit *hSULT1A1*2*-Allel, ca. 1-2 Kopien; Li 714: Cytosol einer transgenen Maus der Linie 714 Sublinie 144 mit *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Allelen, ca. 8 Kopien; Li 25: Cytosol einer transgenen Maus der Linie 25 mit *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*-Allelen, ca. 8 Kopien; Li 7: Cytosol einer transgenen Maus der Linie 7 mit *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Allelen, ca. 23 Kopien; h*1: Cytosol einer humanen Leberprobe mit homozygot für *SULT1A1*1*; h*2: Cytosol einer humanen Leberprobe mit homozygot für *SULT1A1*2*; WT: Cytosol einer Wildtyp-Maus; S: Standard, Cytosol aus *Salmonella typhimurium* TA1538 mit exprimiertem humanen SULT1A1-Protein.

3.2.4 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation des humanen SULT1A1-Proteins

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Gewebe von jeweils drei hemizygoten, männlichen Tieren der beiden transgenen Mauslinien 31 und 28, sowie ein nicht-transgenes Tier (alle Tiere neun Wochen alt) immunhistochemisch analysiert, um die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der humanen SULT1A1 zu untersuchen. Die Konzentration des hSULT1A1/SULT1A3-spezifischen Primär-Antikörpers (AK) wurde für das zu untersuchende Gewebe optimiert. Die sauberste spezifische Immunreaktion wurde mit einer Verdünnung des Primär-AK von 1:7.000 und der EnVision-Methode für den Sekundär-AK erzielt. An seriellen Schnitten wurde jeweils eine Hämatoxylin-Eosin (HE)- bzw. hSULT1A1/SULT1A3-Immunfärbung durchgeführt. Es wurden Gehirn, Herz, Ösophagus, Trachea, Lunge, Niere, Pancreas, Leber, Magen, Milz, Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum), Colon (proximal, medial, distal), Caecum, Hoden und Harnblase analysiert. Immunreaktionen gegen das humane SULT1A1-Protein wurden cytosolisch und kernständig nachgewiesen. In Ösophagus, Herz, Milz, Magen, Pancreas, Harnblase und Hoden konnte keine spezifische Immunreaktion detektiert werden.

In den Leberschnitten der transgenen Mauslinie 28 war die Immunfärbung der Hepatocyten in benachbarten Zellen gleich (Abbildung 16-3B und 3C). Die Reaktivität der Immunreaktion war stärker perizentral (cytosolisch und kernständig) ausgeprägt als periportal (überwiegend Zellkerne). In Gewebeschnitten der Linie 31 konnte keine homogene Immunfärbung in den Hepatocyten detektiert werden (Abbildung 16-2B und 2C). Die Unterschiede in der perizentralen und periportalen Immunreaktion waren weniger stark ausgeprägt.

Im Cortex der Niere wurde die hSULT1A1 in der *SULT1A1*2*-transgenen Mauslinie in den Tubuli, nicht jedoch in den Glomeruli detektiert (Abbildung 17-3B und 3C). Im Gegensatz dazu wurde in der *SULT1A1*1*-transgenen Linie die humane SULT in den Glomeruli angefärbt (Abbildung 17-2C). In den Tubuli waren focal Einzelzellen schwach immunreaktiv. Immunreaktionen in den Tubuli des äußeren Marks waren in Linie 28 (Abbildung 18-3B und 3C) stärker ausgeprägt als in Linie 31 (Abbildung 18-2B und 2C).

In der Trachea (Abbildung 19) lagen eine cytosolische und eine kernständige Reaktivität in den Zellen des respiratorischen Epithels vor. Die Immunfärbung war stärker in der Linie 28 als in Linie 31. In Linie 31 wurden Einzelzellen angefärbt.

In der Lunge (Abbildung 20) war die Expression der hSULT1A1 in den Zellen des respiratorischen Epithels der Bronchiolen in der Linie 28 stärker ausgeprägt als in Linie 31. Eine hauptsächlich kernständige Färbung konnte in den Pneumocyten Typ II-Zellen nur in Linie 28 detektiert werden (Abbildung 20-3C).

In Gewebeschnitten des Gehirns (Abbildung 21) konnte eine Immunreaktivität im Plexus choroideus in beiden transgenen Mauslinien nachgewiesen werden, wobei die Reaktivität in Linie 28 stärker war als in Linie 31.

In den Dünndarmabschnitten Duodenum, Jejunum und Ileum lagen Immunreaktivitäten in den Epithelzellen der Zotten vor. In Gewebeschnitten der transgenen Mauslinie 28 war die Immunfärbung in den Epithelzellen homogen, wohingegen in Linie 31 nur Einzelzellen reaktiv waren. Exemplarisch für den Dünndarm sind die Immunfärbungen im Jejunum abgebildet (Abbildung 22).

Im Colon (proximal, medial und distal) konnten Immunfärbungen in den Epithelzellen der Krypten detektiert werden. Die Reaktivität der Immunfärbung nahm von proximal (Abbildung 23) nach distal (Abbildung 24) stark ab. Im proximalen Bereich war eine homogene Färbung der luminalen Epithelzellen nachweisbar, distal waren diese nur noch vereinzelt schwach reaktiv. Insgesamt waren die Immunreaktionen in Schnitten der Linie 28 im Colon stärker ausgeprägt als in Linie 31.

Im Caecum wurden Immunreaktivitäten in den Epithelzellen beider transgener Mauslinien detektiert (Abbildung 25). Es wurden stärkere Immunreaktionen in den luminal gelegenen Epithelzellen der Krypten nachgewiesen. Die Immunreaktivität der Epithelzellen war focal unterschiedlich und insgesamt stärker in Linie 28 als in Linie 31.

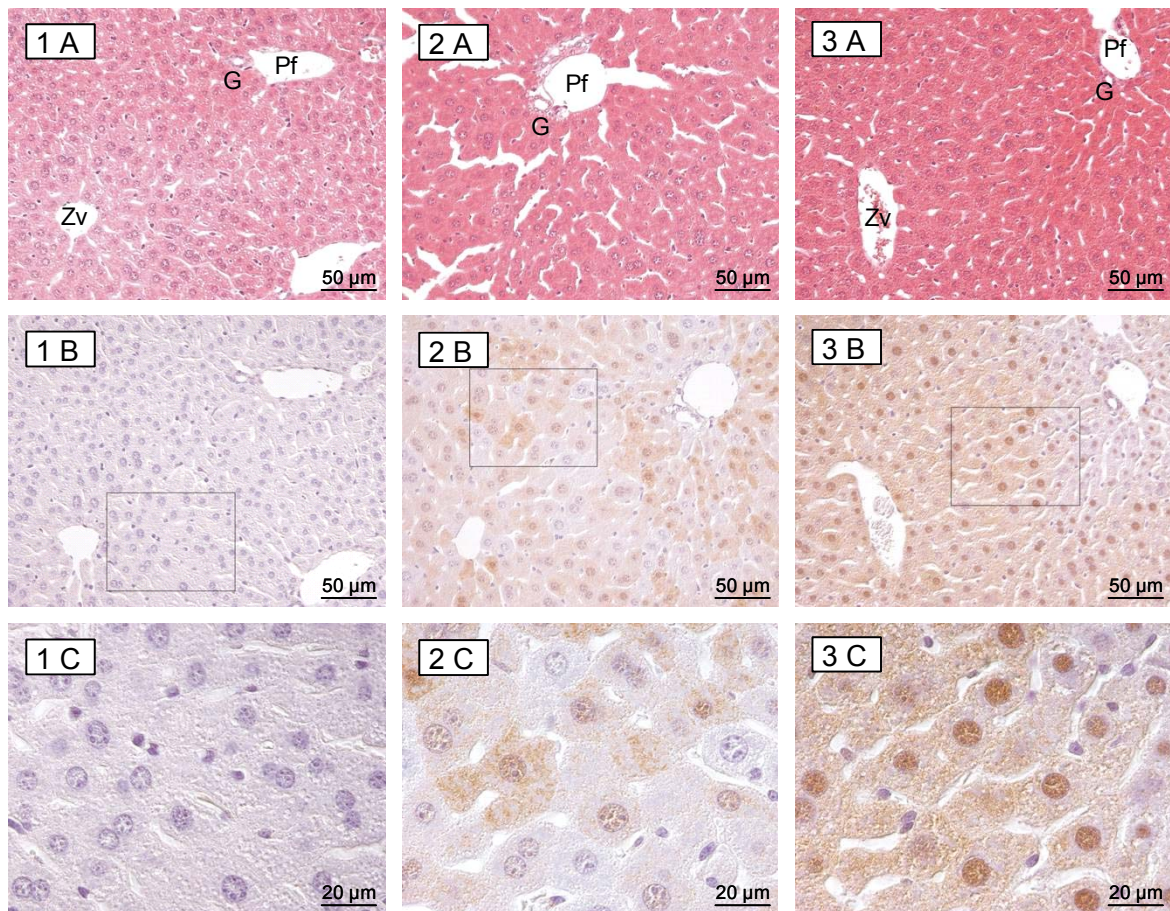


Abbildung 16: Nachweis der hSULT1A1 in der Leber einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. G: Gallengang; Pf: Portalfeld; Zv: Zentralvene.

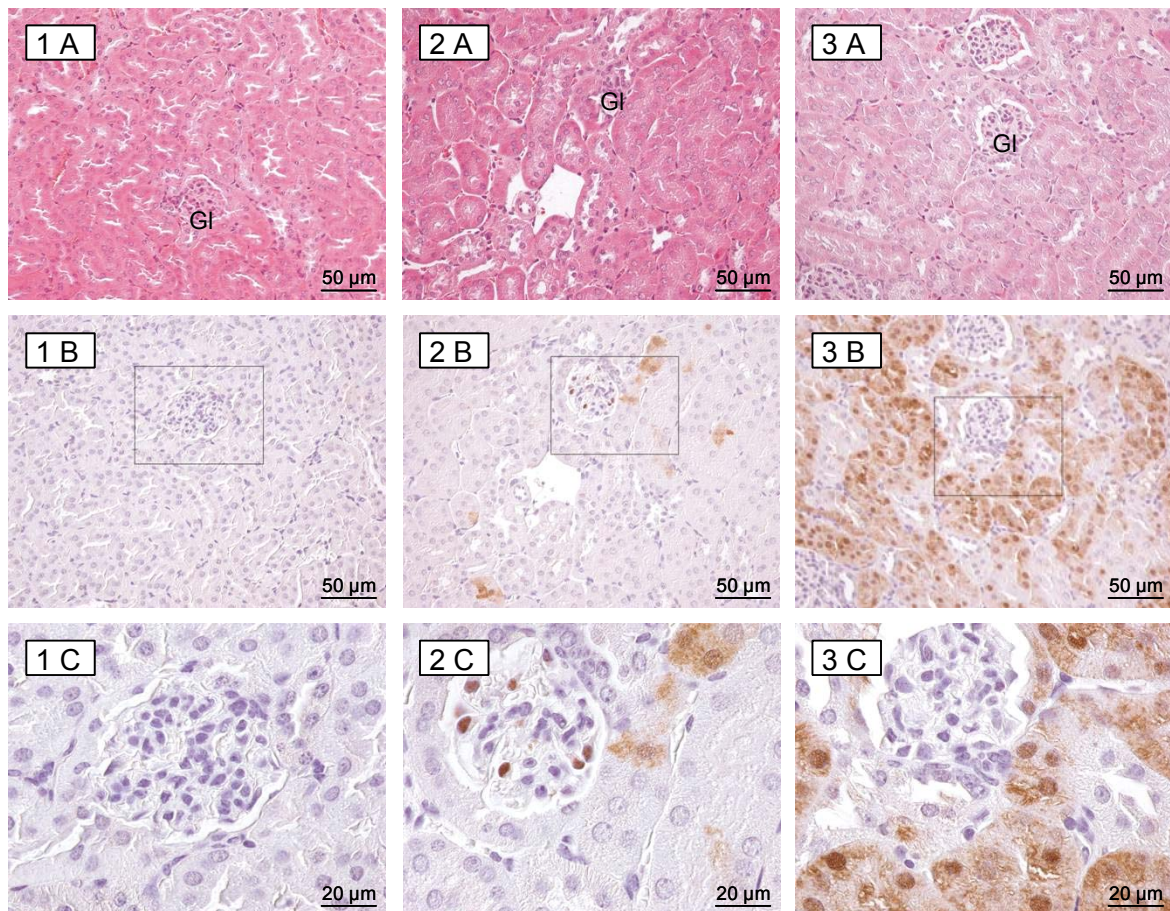


Abbildung 17: Nachweis der hSULT1A1 im Cortex der Niere einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. Gl: Glomerulus.

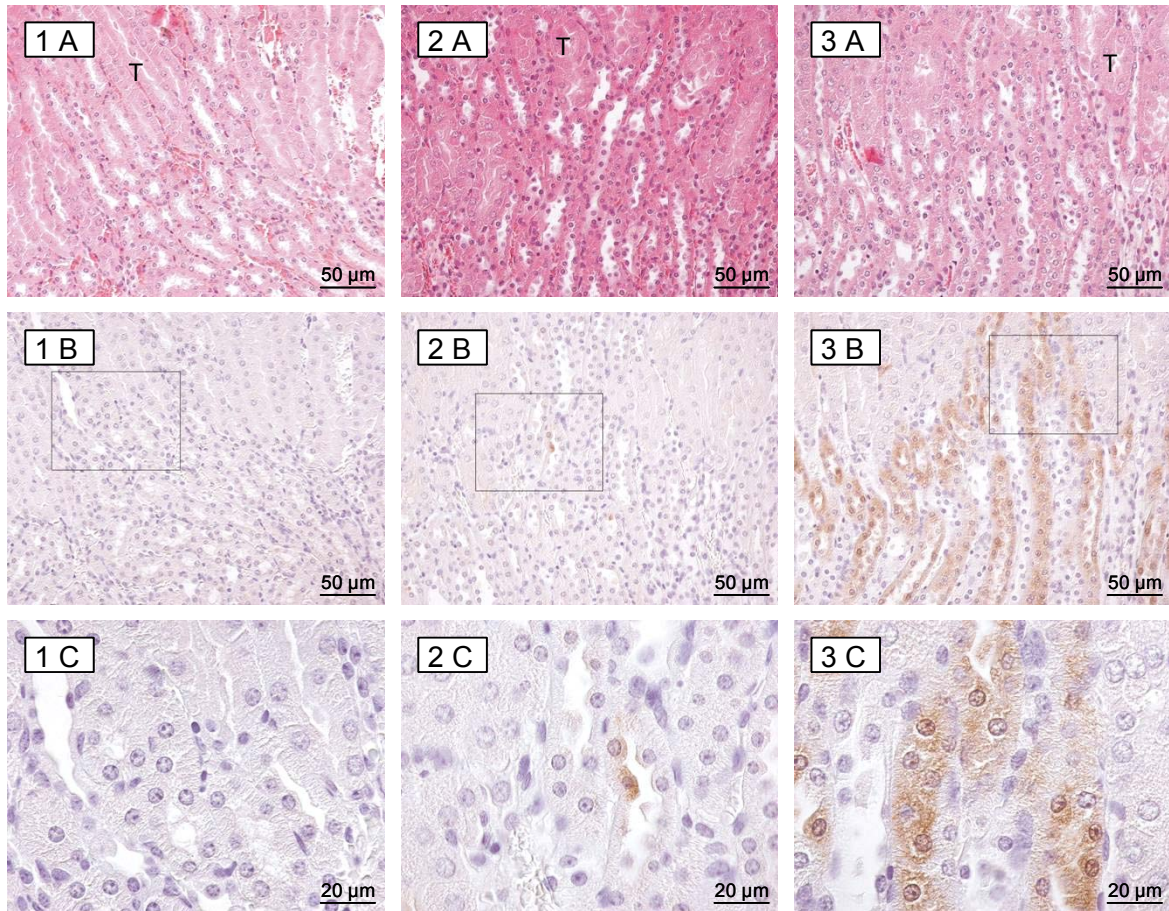


Abbildung 18: Nachweis der hSULT1A1 im äußeren Mark der Niere einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. T: Tubulus.

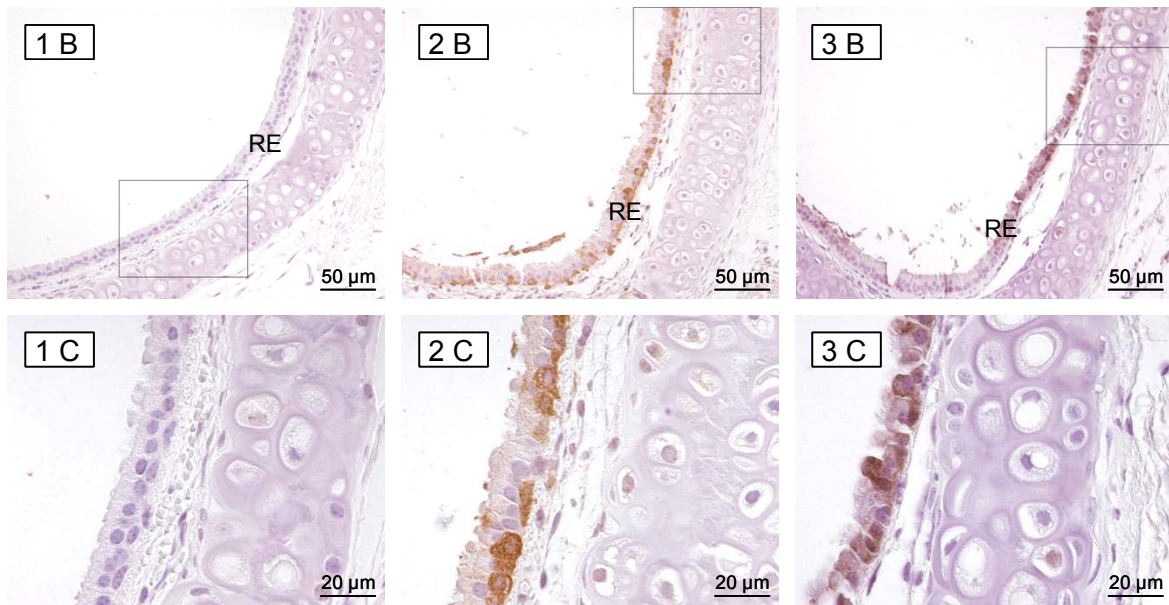


Abbildung 19: Nachweis der hSULT1A1 in der Trachea einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. RE: respiratorisches Epithel.

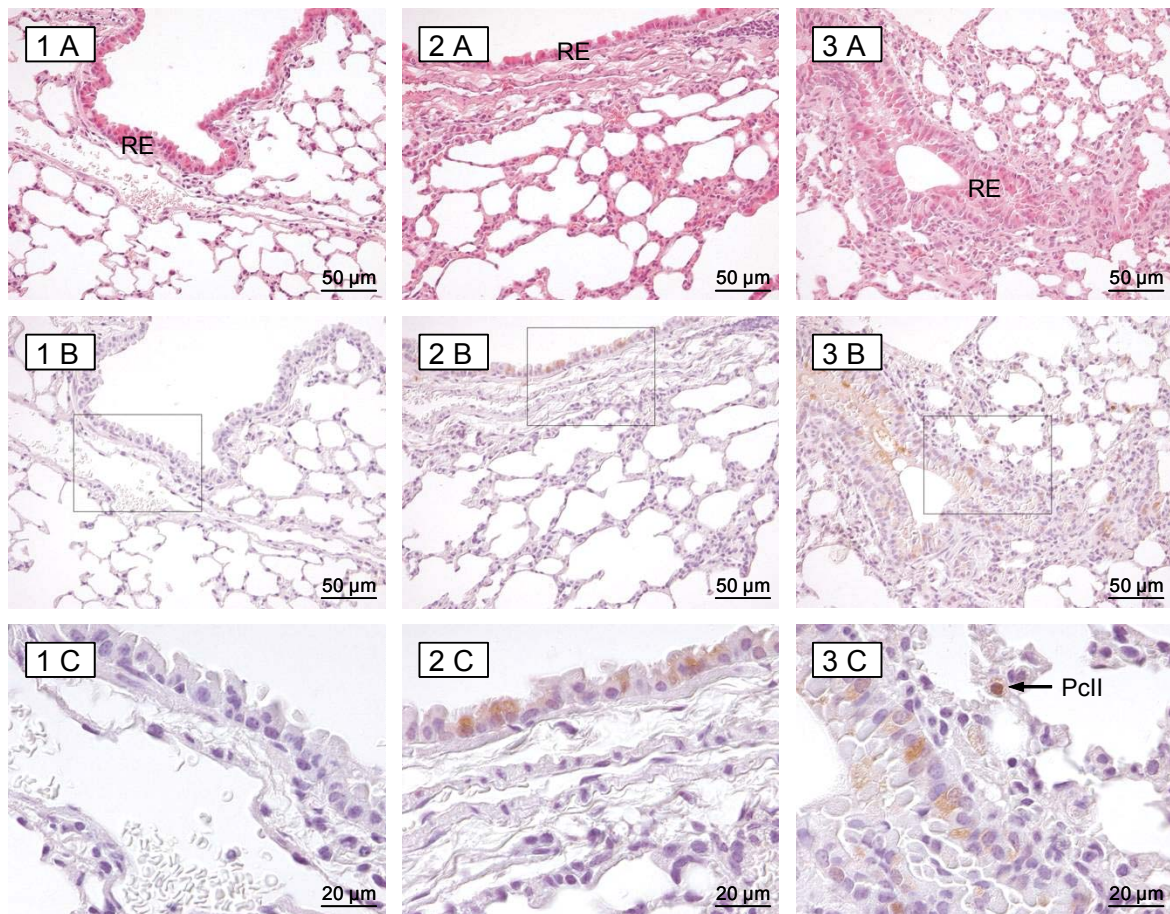


Abbildung 20: Nachweis der hSULT1A1 in den Bronchiolen der Lunge einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. RE: respiratorisches Epithel; PcII: Pneumocyt Typ II.

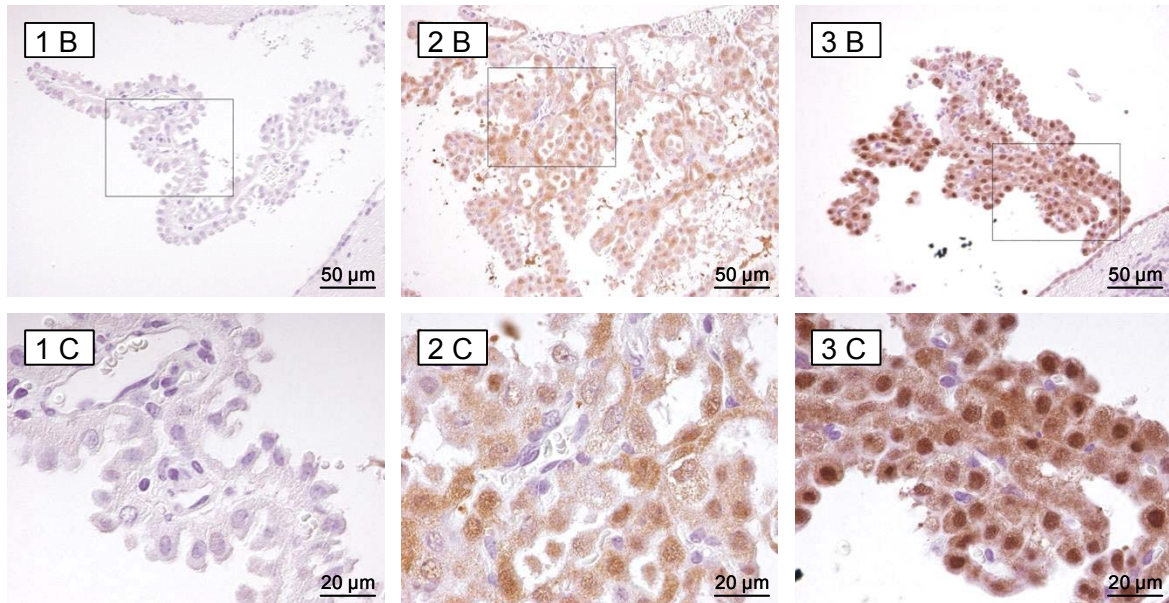


Abbildung 21: Nachweis der hSULT1A1 im Plexus choroideus des Gehirns einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B.

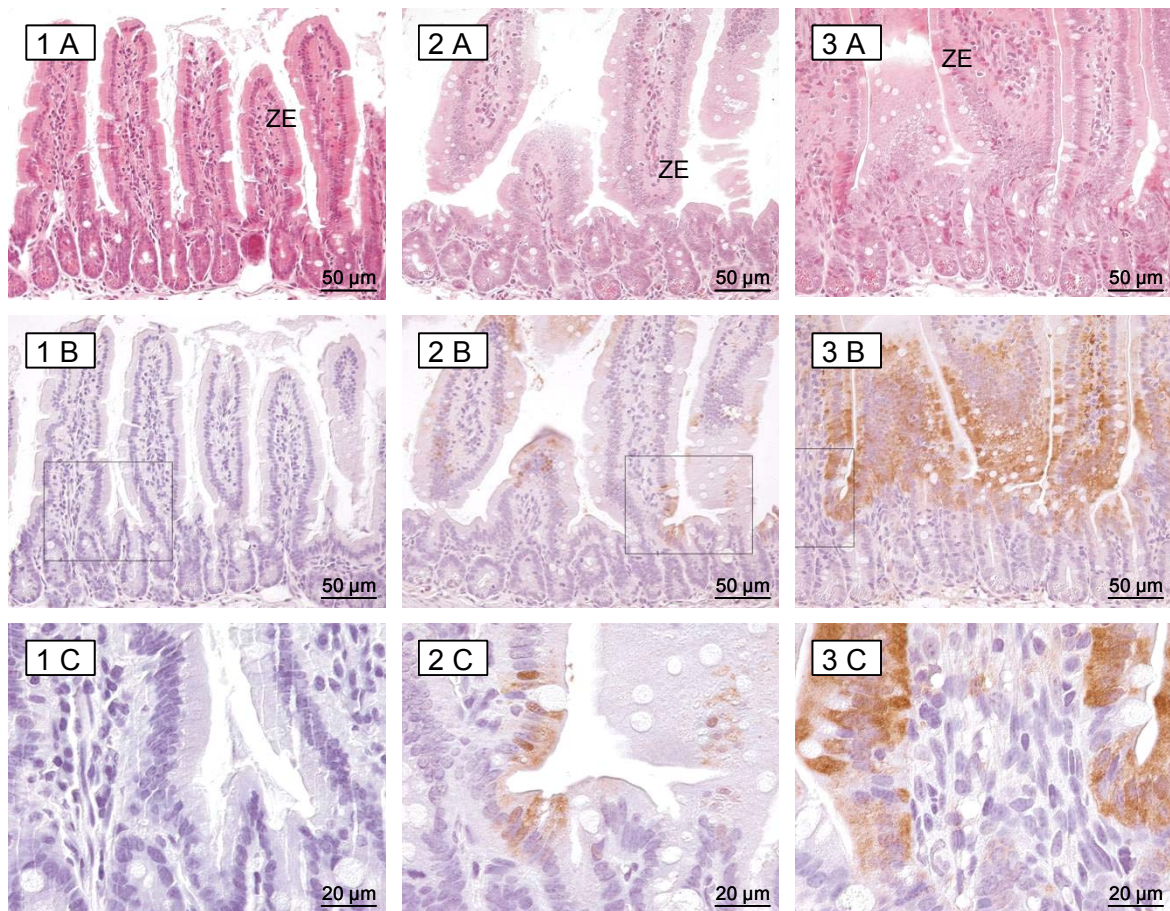


Abbildung 22: Nachweis der hSULT1A1 im Jejunum einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. ZE: Zottenepithel.

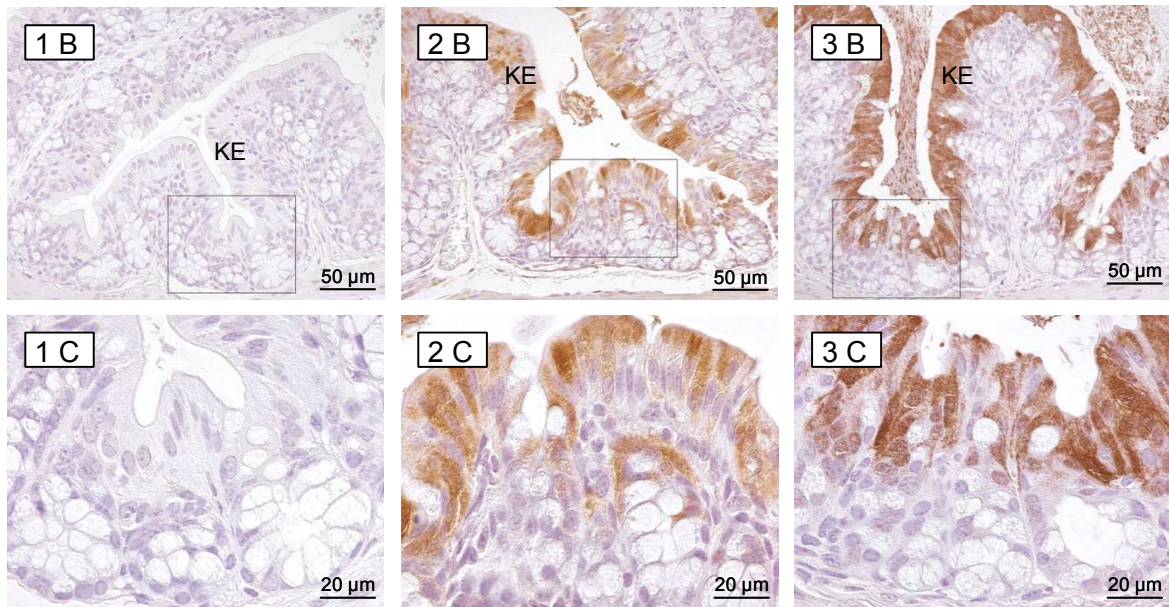


Abbildung 23: Nachweis der hSULT1A1 im proximalen Colon einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. KE: Kryptenepithel.

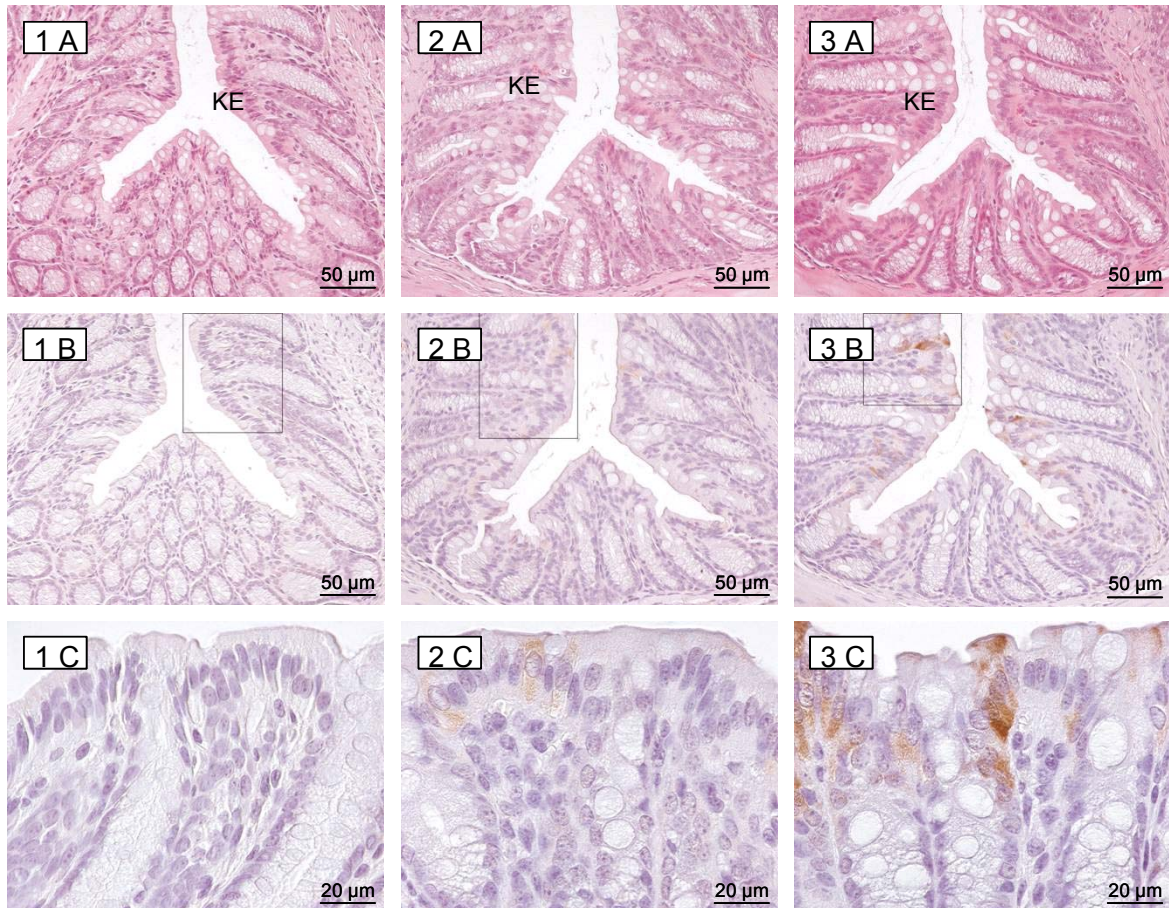


Abbildung 24: Nachweis der hSULT1A1 im distalen Colon einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. A ist eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Serienschnittes von B. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. KE: Kryptenepithel.

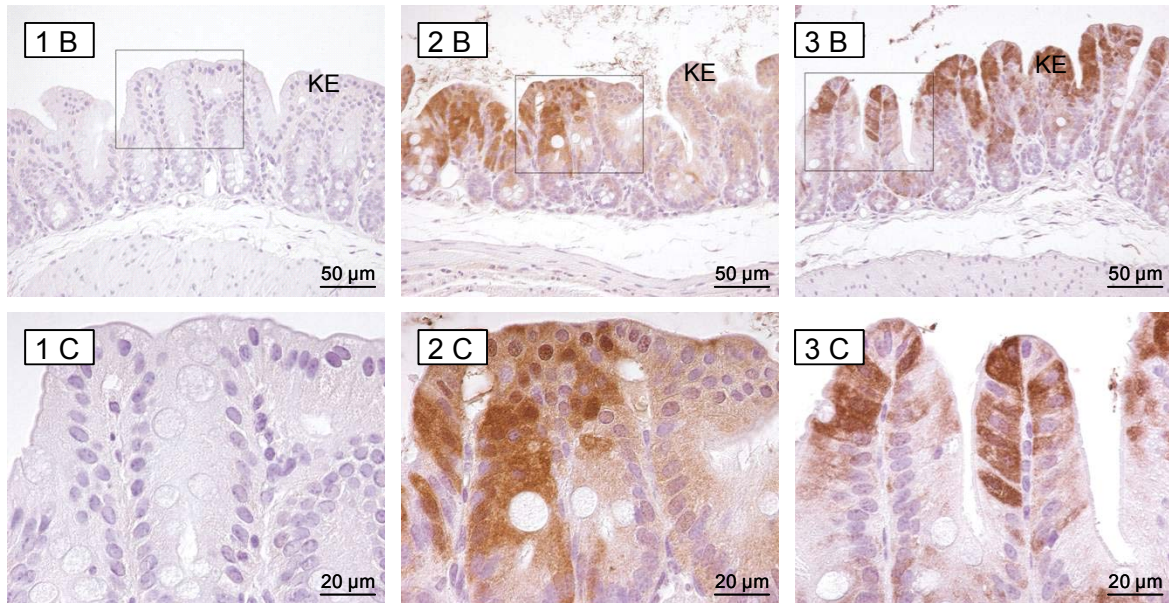


Abbildung 25: Nachweis der hSULT1A1 im Caecum einer Wildtyp-Maus (Serie 1), einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*1*-Allel (Serie 2, Linie 31) und einer transgenen Maus mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Serie 3, Linie 28). Die Gewebeschnitte stammen von männlichen, 9 Wochen alten hemizygoten bzw. Wildtyp-Mäusen des Inzuchtstammes FVB/N. In B wurde das Antiserum gegen hSULT1A1/SULT1A3 1:7.000 verwendet. C ist eine Vergrößerung von B. KE: Kryptenepithel.

3.2.5 Sequenzanalyse des codierenden Bereiches der humanen *SULT1A1*-Allele

Mittels Sequenzierung sollte überprüft werden, ob die codierenden Bereiche der eingebrachten *SULT1A1*-Allele den humanen cDNA-Referenzsequenzen entsprechen. Zur reversen Transkription wurden von jeder Probe 5 µg RNA eingesetzt und oligo(dT)-Primer verwendet. Dabei wurden PCR-Produkte der cDNA der jeweiligen transgenen Mauslinien hergestellt und beide Stränge von der Fa. AGOWA, Berlin sequenziert. Das Schema des codierenden Bereiches von Exon II bis Exon VIII des *SULT1A1*-Gens und die zur Sequenzierung gewählten Primerpaare sind in Abbildung 26 dargestellt. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass sie sich stromaufwärts des Startcodons und stromabwärts des Stoppcodons befinden. Die transgenen Sequenzen wurden mit den Referenzsequenzen X78283 (*SULT1A1**1, Linie 31) und U09031 (*SULT1A1**2, Linie 28) mittels des Programms Vector.NTI verglichen. Die Primersequenzen sind im Anhang I (Tabelle 6) und die Sequenzierungsergebnisse im Anhang II unter Sequenzdaten aufgeführt.

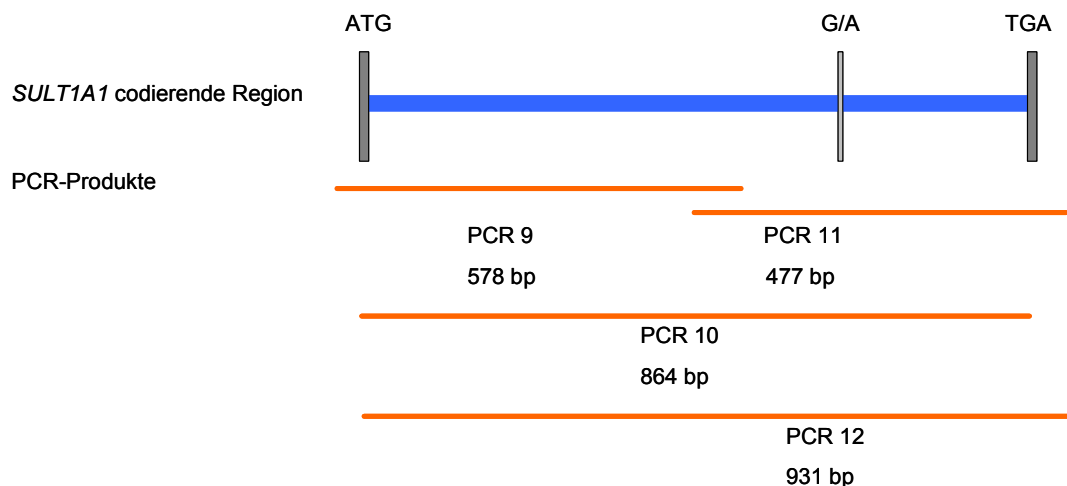


Abbildung 26: Schematische Darstellung des humanen *SULT1A1*-Gens mit dem codierenden Bereich. Abgebildet ist die codierende Region des humanen *SULT1A1*-Gens (Exon II bis Exon VIII, in blau dargestellt) mit dem Startcodon „ATG“, dem Stoppcodon „TGA“, dem Einzelnukleotid-Polymorphismus an Position 638 „G/A“ und die amplifizierten Bereiche mittels PCR zur Sequenzanalyse der codierenden Region (PCR 9-12). Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide tabellarisch (Tabelle 6) aufgeführt.

Zur cDNA-Sequenzanalyse wurden bei der Mauslinie 31 (*SULT1A1*1*-transgene Linie) überlappende Amplifikate sequenziert. Für den ersten Teilbereich der codierenden Sequenz wurde die Sequenz 36 bp stromaufwärts von Exon II (Beginn Vorwärtsprimer) bis Exon VI analysiert (Abbildung 26, PCR 9, 1. Teil). Dabei konnte das Startcodon für das *SULT1A1*-Gen „ATG“ (Position 1-3 im Sequenzausdruck, siehe Anhang II Sequenzdaten) nachgewiesen werden. Der mittlere Bereich der codierenden Region von Exon II bis Exon VIII wurde mittels PCR 10 (2. Teil) und der letzte Teilbereich der codierenden Sequenz von Exon V bis stromabwärts Exon VIII (Beginn Rückwärtsprimer) mittels PCR 11 (3. Teil) analysiert. Es wurde an Position 638 ein „G“ (Position 638 im Sequenzausdruck, siehe Anhang II Sequenzdaten) und das Stoppcodon in Exon VIII „TGA“ (Position 889-891 im Sequenzausdruck, siehe Anhang II Sequenzdaten) nachgewiesen. Die Sequenzdaten wurden mit der Referenzsequenz GenBank Accession Nummer X78283 (cDNA von *hSULT1A1*1*, aus Pubmed) verglichen. Dabei war die Sequenz des codierenden Bereiches der RNA von Linie 31 identisch mit der Referenzsequenz.

Zur Sequenzierung des codierenden Bereiches in der *SULT1A1*2*-transgenen Mauslinie (Linie 28) wurden zwei PCR-Produkte amplifiziert. Für den ersten Teilbereich der codierenden Sequenz wurde ebenfalls das Primerpaar für PCR 9 (1. Teil) verwendet. Auch hier konnte das Startcodon (Position 1-3 im Sequenzausdruck, siehe Anhang II Sequenzdaten) nachgewiesen werden. Für den Mittelteil 8 bp stromaufwärts von Exon II (Beginn Vorwärtsprimer) und den letzte Teilbereich der codierenden Sequenz stromabwärts des Stoppcodons in Exon VIII (Beginn Rückwärtsprimer) konnte mittels der PCR 12 (2.+3. Teil) die Sequenz analysiert werden (Abbildung 26). Es wurde an Position 638 ein „A“ (Position 638 im Sequenzausdruck, siehe Anhang II Sequenzdaten) und das Stoppcodon in Exon VIII „TGA“ (Position 886-888 im Sequenzausdruck, siehe Anhang II Sequenzdaten) nachgewiesen. Die Sequenzdaten wurden mit der Referenzsequenz GenBank Accession Nummer U09031 (cDNA von *hSULT1A1*2*, aus Pubmed) verglichen. Auch hier war der codierende Bereich der cDNA von Linie 28 identisch mit der Referenzsequenz.

3.2.6 Sequenzanalyse der 5'-flankierenden Region des humanen *SULT1A1*-Gens

Die Proteinexpressionen in den in dieser Arbeit entwickelten transgenen Mauslinien differierten, wobei die Expressionen in der *1-transgenen Linie unerwartet schwächer waren als in der *2-transgenen Mauslinie. In humanen Thrombocyten konnte beispielsweise bei Personen mit dem *SULT1A1**1-Allel eine höhere Enzymexpression detektiert werden (Jones *et al.* 1993). Somit könnten in diesen transgenen Mauslinien andere Polymorphismen die Expression beeinflussen. In der 5'-flankierenden Region des humanen *SULT1A1*-Gens sind zwei funktionelle Polymorphismen (an Positionen -624 und -396) bekannt mit 4 möglichen Haplotypen: CG, GG, CA und GA. Diese Einzelnukleotidaustausche führen zu einer unterschiedlichen Aktivität des Luciferase-Reportergens. Dabei zeigt Haplotyp (-624, -396)CG die höchste Aktivität und der Haplotyp (-624, -396)GA die niedrigste, siehe Abbildung 27 (Hebbring *et al.* 2007).

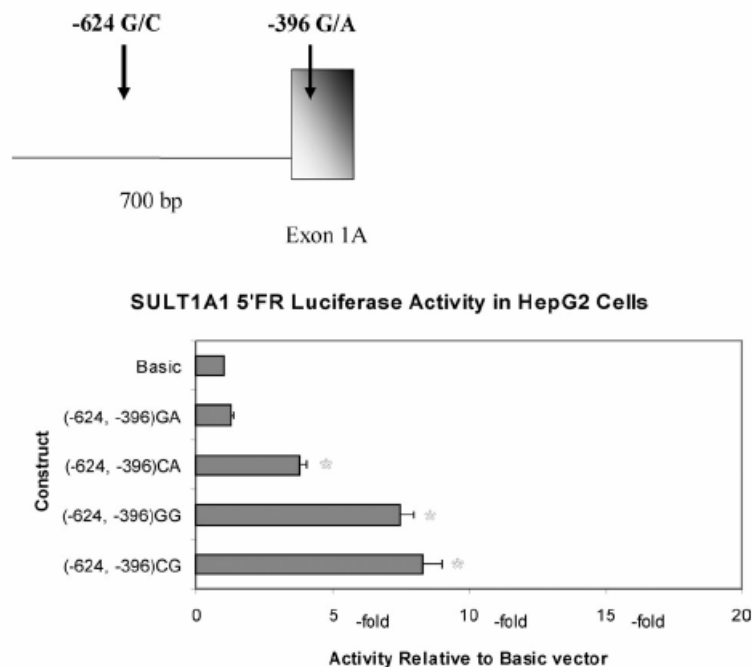


Abbildung 27: Reporter-gen-Studie. *SULT1A1* 5'-flankierende Region (5'FR)-Sequenzen mit den SNP an Positionen G(-624)C und G(-396)A. Luciferaseaktivität von 700 bp-Konstrukten mit beiden SNP und allen 4 möglichen Haplotypen im pGL3-Basic Vektor, transfiziert in HepG2-Zellen. Als Kontrolle (Basic) wurde der pGL3-Basic Vektor ohne Insert in die Zellen transfiziert. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung (n = 6-9). Die Studie wurde in Triplikaten der Zelllinie durchgeführt und dreimal wiederholt. Sterne bezeichnen signifikante Unterschiede in der Aktivität verglichen mit dem Kontrollvektor Basic ($p < 0,0001$). Abbildung aus Hebbring *et al.*, 2007.

Mittels Sequenzanalysen konnte in der transgenen Linie mit *SULT1A1*1* der (-624, -396)CG-Haplotyp und in der transgenen Linie mit *SULT1A1*2* der (-624, -396)GA-Haplotyp in der Leber ermittelt werden, wobei die Positionen denen im Sequenzausdruck entsprechen (siehe Anhang II Sequenzdaten). Die Sequenzen der verwendeten Primer (PCR 1) sind im Anhang I aufgeführt (Tabelle 6).

Außer diesen beiden SNP wurden noch weitere in der 5'-flankierenden Region des *SULT1A1*-Gens an den Positionen -358, -341 und -294 beschrieben. Auch für diese SNP sind unterschiedliche Haplotypen bekannt: A(-358)C, C(-341)G und T(-294)C. In Enzymaktivitäts-Assays mit humanen Thrombocyten wurde der Einfluss dieser Haplotypen auf die *SULT1A1*-Aktivität untersucht (Ning *et al.* 2005). Dabei wurden auch die SNP an den Positionen (-624) und (-396) einbezogen. Aus den Analysen ging hervor, dass der (-624, -396, -358, -341, -294)GAACT-Haplotyp mit einer geringen Enzymaktivität assoziiert ist.

Mit Hilfe von Sequenzanalysen wurden die SNP in beiden transgenen Mauslinien an den Positionen (-358, -341 und -294) bestimmt. Hierbei sind die Nukleotide an den betroffenen Positionen bei beiden Mauslinien in Leberproben identisch und es wurde der (-358, -341 und -294)ACT-Haplotyp ermittelt. Auch hier entsprechen die Positionen der SNP denen im Sequenzausdruck (siehe Anhang II Sequenzdaten).

3.2.7 RNA-Expressionsanalyse der humanen *SULT1A1*

Mittels RNA-Expressions-Analyse sollte überprüft werden, ob die Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den Linien 31 und 28 aus unterschiedlich starker Transkription resultieren. Es wurde die DNA aus Leber, Lunge, Niere und Colon-Mucosa von je drei Tieren der beiden transgenen Mauslinien und vom Wildtyp extrahiert, revers transkribiert und mittels Real-Time-PCR die relative RNA-Expression ermittelt. Bei der reversen Transkription wurden von jeder Probe 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt und zusätzlich die cDNA des murinen *beta-actin* als Referenz (RNA_Referenz_F/RNA_Referenz_R) amplifiziert. Die reverse Transkription wurde mit oligo(dT)-Primern durchgeführt und die Daten nach der Delta-Delta-Ct-Methode ausgewertet.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der RNA-Expressionsanalyse als Quotient der relativen RNA-Expression von *SULT1A1*2*-transgener Linie (Linie 28) zu *SULT1A1*1*-transgener Linie (Linie 31) dargestellt. Für die Expressionsanalysen im codierenden Bereich wurde das Primerpaar RNA_cds_F/RNA_cds_R verwendet. Die Sequenz des PCR-Produktes befindet sich in der codierenden Region des *hSULT1A1*-Gens (Teile von Exon VII bis Exon VIII). Die Real-Time-PCR-Produkte wurden nach Abschluss der PCR mittels Agarosegelelektrophorese (Abbildung 35 im Anhang III) visualisiert. Die Einzelwerte der Real-Time-PCR sind in Tabelle 7 im Anhang III aufgeführt. In der transgenen Linie mit dem *SULT1A1*2*-Allel (Linie 28) konnte in den untersuchten Organen eine höhere RNA-Expression als in der anderen transgenen Linie ermittelt werden. Dabei war die RNA-Expression in der Colon-Mucosa um den Faktor 60, in der Lunge um den Faktor 20, in der Leber um den Faktor 700 und in der Niere 200fach erhöht (Tabelle 4).

Tabelle 4: Relativen RNA-Expression der transgenen Mauslinien 31 und 28 (Quotient aus relative RNA-Expression Linie 28/Linie 31).

Bereich im <i>SULT1A1</i> -Gen	Organ	Quotient relative RNA-Expression
codierende Region	Colon-Mucosa	60
	Lunge	20
	Leber	700
	Niere	200
Exon 1B nicht-codierende Region	Colon-Mucosa	2
	Lunge	0,7
	Leber	24
	Niere	4

Wie in der Proteinexpressions-Analyse (siehe 3.2.3) konnte auch bei der RNA-Expressionsanalyse in der codierenden Region in der transgenen Linie 28 eine höhere *hSULT1A1*-Expression nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den gemeinsamen Exons wurden auch alternative Exons im nicht-codierenden Bereich untersucht. Die humane Sulfotransferase hat neben

den codierenden Exons (Exon II bis VIII) das Exon I in der nicht-codierenden Region mit zwei alternativen Formen, das Exon 1B und das Exon 1A.

Zur Analyse der RNA-Expression im nicht-codierenden Bereich um Exon 1B wurden für das PCR-Produkt der Sequenzbereich von Exon 1B bis Exon III der *SULT1A1*-cDNA verwendet (Primer: RNA_1A1Exon1B_F/RNA_1A1Exon1B_R, Sequenzen siehe Tabelle 6 im Anhang I). Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die Real-Time-PCR-Produkte (Abbildung 36 im Anhang III) dargestellt. Die Einzelwerte der Real-Time-PCR sind in Tabelle 8 im Anhang III aufgeführt. In den RNA-Expressionsanalysen aus den verschiedenen Geweben beider transgener Mauslinien konnte das Exon 1B in der nicht-codierenden Region stromaufwärts des Startcodons in beiden transgenen Mauslinien nachgewiesen werden. In der transgenen Linie mit dem *SULT1A1*2*-Allel konnte in der Colon-Mucosa (Faktor 2), Leber (Faktor 24) und Niere (Faktor 4) eine höhere RNA-Expression als in der anderen transgenen Linie ermittelt werden (Tabelle 4). In der Lunge war die relative RNA-Expression in beiden Linien nahezu identisch (Tabelle 4). Die Daten aus der RNA-Expressionsanalyse um Exon 1B waren unerwartet, weil außer in der Leber nur geringe Expressionsunterschiede zwischen den beiden Linien detektiert wurden. Ein Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der codierenden Region ist nicht zu erkennen. Möglicherweise stehen sie aber in Zusammenhang mit dem anderen alternativen Exon.

Das resultierende PCR-Produkt zur Analyse von Exon 1A im nicht-codierenden Bereich stromaufwärts des *hSULT1A1*-Gens beinhaltet Sequenzen von Exon 1A bis Exon III des *hSULT1A1*-Gens. Die für die Analyse des Exons 1A verwendeten Primer (RNA_1A1Exon1A_F/RNA_1A1Exon1A_R) und deren Sequenzen sind in Tabelle 6 im Anhang aufgeführt. Das Exon 1A in der nicht-codierenden Region konnte mittels PCR-Analyse als 294 bp-PCR-Produkt in allen untersuchten Organen der Linie 28 mit dem *SULT1A1*2*-Allel und nur in der Lunge der Linie 31 mit dem *SULT1A1*1*-Allel nachgewiesen werden (Abbildung 28). Die Entstehung von PCR-Produkten ohne reverse Transkription lässt auf einen unvollständigen DNase-Verdau schließen, dies würde der oberen Bande in den PCR-Produkten (597 bp) der Tiere aus Linie 31 entsprechen (Abbildung 28, Abbildung 37). Die weiteren PCR-Produkte in Linie 31 zwischen 350 und 500 bp, und die PCR-Produkte bei ca. 450 und 500 bp in der Linie 28 konnten nicht spezifiziert werden.

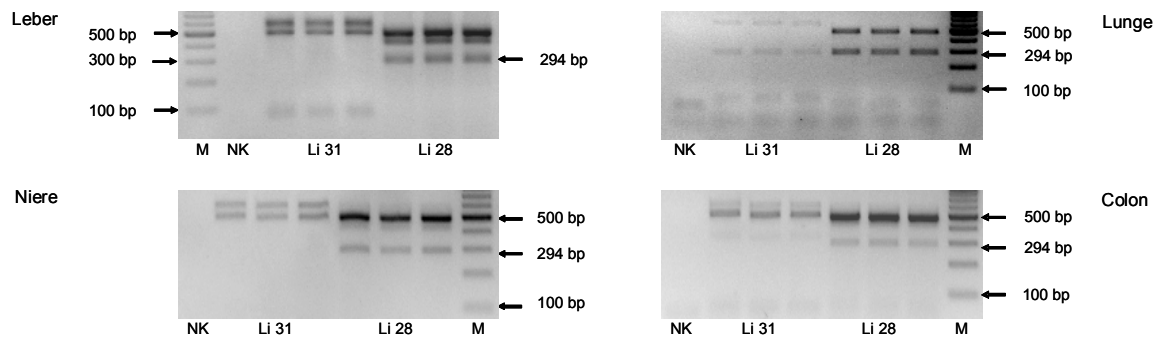


Abbildung 28: Darstellung der PCR-Analyse zum Nachweis des Exon 1A in der nicht-codierenden Region stromaufwärts des *SULT1A1*-Gens. Abgebildet sind die PCR-Produkte mit den Primern aus Sequenzen des Exon 1A mit cDNA aus Leber (links oben), Lunge (rechts oben), Niere (links unten) und Colon (rechts unten). Nachweis des Exon 1A als PCR-Produkt mit 294 bp. PCR-Produkte aus unvollständigem DNase-Verdau mit 597 bp. PCR-Produkte zwischen 300 und 500 bp konnten nicht spezifiziert werden. Li 31 und Li 28 entsprechen jeweils drei Tieren der transgenen Mauslinien, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide tabellarisch aufgeführt (Tabelle 6).

3.2.8 Enzymaktivitätsbestimmung mit *p*-Nitrophenol als Substrat

In den *hSULT1A1*-transgenen Mäusen (Linie 31 und 28) wurde die *hSULT1A1*-Aktivität mittels eines typischen Substrates (*p*-Nitrophenol, 4 μ M Finalkonzentration) ermittelt. Dazu wurde in einem Assay cytosolisches Protein aus Leber und Colon von transgenen Mäusen (hemizygot) sowie Wildtyp-Mäusen eingesetzt. Die Tiere waren männlich und 8 Wochen alt.

Die Enzymaktivität in den Leber- und Colonomogenaten wurde in Abhängigkeit von Protein und Zeit bestimmt. Damit sollte der lineare Bereich der Produktbildung (spezifische Aktivität) ermittelt werden. Die Produktbildung im Colon ist in Abhängigkeit vom cytosolischen Protein (Abbildung 29) und der Reaktionszeit (Abbildung 30) dargestellt. Für die Leber ist die Produktbildung in Abhängigkeit vom cytosolischen Protein (Abbildung 31) und der Reaktionszeit (Abbildung 32) ebenfalls abgebildet.

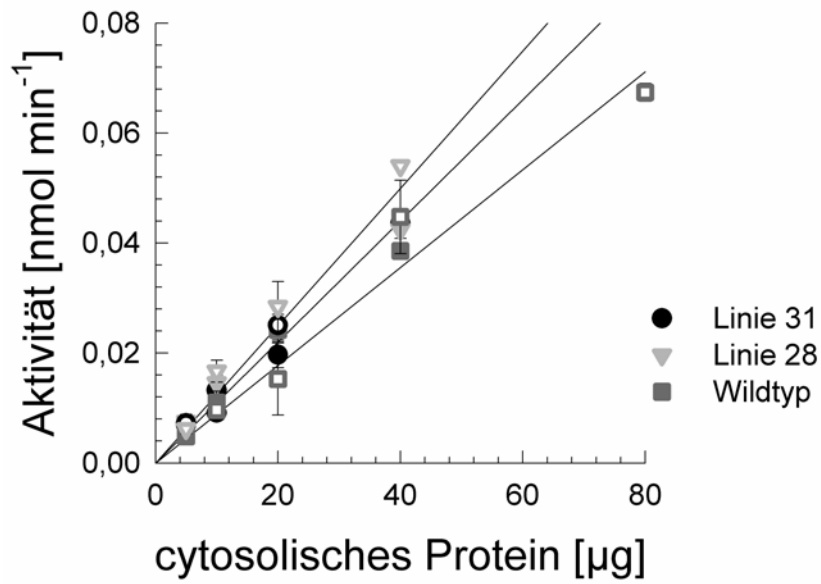


Abbildung 29: Enzymaktivität in Colonhomogenaten in Abhängigkeit vom cytosolischen Protein. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung mit unterschiedlichen Proteingehalten bei gleicher Inkubationszeit (5 min) von je 2 Tieren der transgenen, hemizygoten Mauslinien und dem Wildtyp (alle Tiere männlich, 8 Wochen alt).

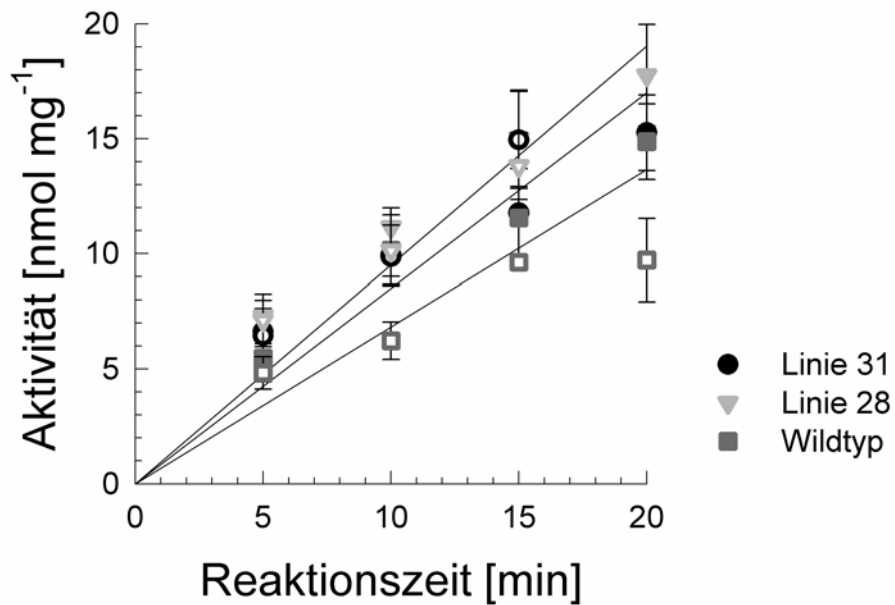


Abbildung 30: Enzymaktivität in Colonhomogenaten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung zu unterschiedlichen Reaktionszeiten bei gleichem Proteingehalt (10 µg) von je 2 Tieren der transgenen, hemizygoten Mauslinien und dem Wildtyp (alle Tiere männlich, 8 Wochen alt).

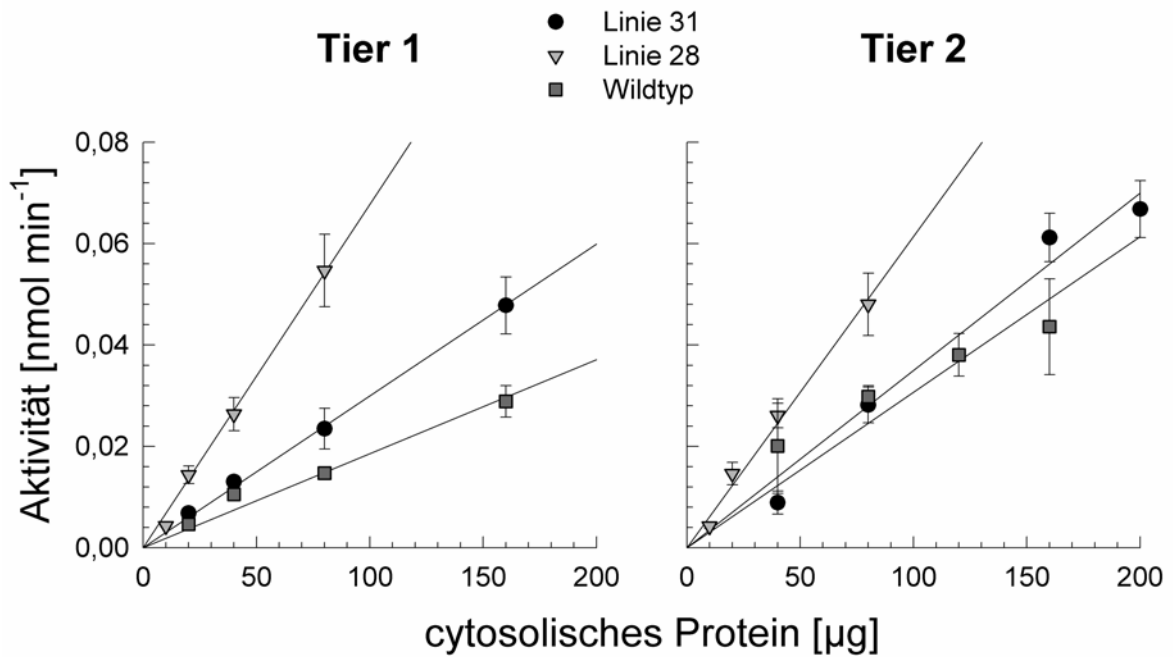


Abbildung 31: Enzymaktivität in Leberhomogenaten in Abhängigkeit vom cytosolischen Protein. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung mit unterschiedlichen Proteingehalten bei gleicher Inkubationszeit (5 min) von je 2 Tieren der transgenen, hemizygoten Mauslinien und dem Wildtyp (alle Tiere männlich, 8 Wochen alt).

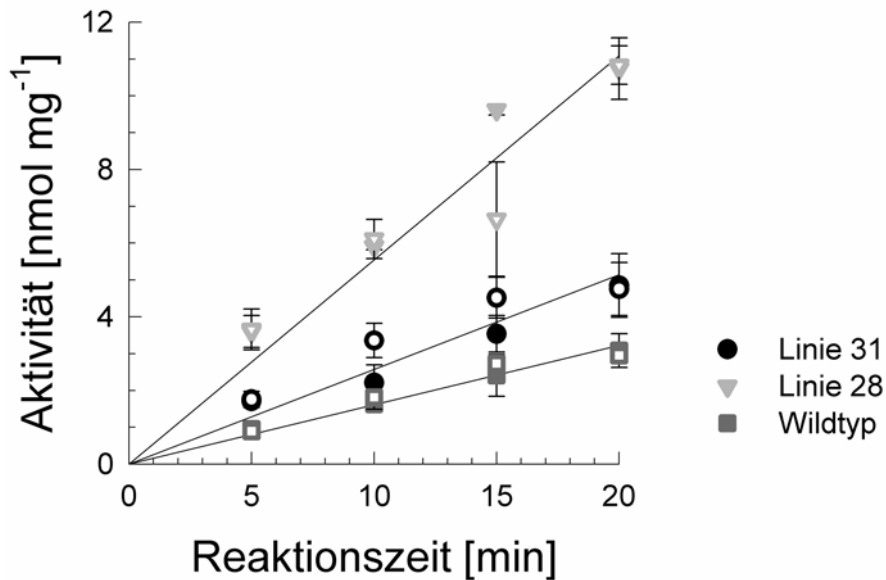


Abbildung 32: Enzymaktivität in Leberhomogenaten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung zu unterschiedlichen Reaktionszeiten bei gleichem Proteingehalt (20 μg) von je 2 Tieren der transgenen, hemizygoten Mauslinien und dem Wildtyp (alle Tiere männlich, 8 Wochen alt).

Anhand der Daten konnte eine lineare Produktbildung mit dem Protein und der Zeit in den transgenen Mauslinien und im Wildtyp ermittelt und die spezifische Aktivität berechnet werden. In den Homogenaten von der Leber und dem Colon wurden in den transgenen Proben tendenziell höhere SULT1A1-Enzymaktivitäten als in den Proben der Wildtypen gemessen (Tabelle 5). Dabei waren die gemessenen Aktivitäten in der *SULT1A1*2*-transgenen Mauslinie (Linie 28) tendenziell höher als in der *SULT1A1*1*-transgenen Mauslinie (Linie 31).

Tabelle 5: Spezifische SULT1A1-Aktivität in Leber- und Colocytozol gemessen in einem HPLC-Assay mit *p*-Nitrophenol als Substrat (4 μ M Finalkonzentration). Angegeben sind der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) aus 4 verschiedenen Messungen in Dreifachbestimmung eines Tieres (8 Wochen alt, männlich, hemizygot transgene Mäuse).

Organ	Mauslinie	Tier	spezifische Aktivität in	
			nmol/min/mg	
			MW \pm STABW	
Leber	Linie 31	1	0,31 \pm 0,03	
		2	0,32 \pm 0,04	
	Linie 28	1	0,62 \pm 0,07	
		2	0,60 \pm 0,07	
	Wildtyp	1	0,21 \pm 0,02	
		2	0,37 \pm 0,09	
	Colon	Linie 31	1	1,20 \pm 0,06
			2	1,25 \pm 0,18
Linie 28		1	1,32 \pm 0,07	
		2	1,42 \pm 0,16	
Wildtyp		1	1,06 \pm 0,19	
		2	0,92 \pm 0,13	

3.3 Vergleich der Bioaktivierung von PhIP in den transgenen und Wildtyp-Tieren

Das heterozyklische aromatische Amin 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) ist eine der wenigen bekannten Substanzen, die im Colon von Nagern Tumoren induziert. Die metabolische Aktivierung dieser Substanz im menschlichen Organismus steht möglicherweise mit der hohen Inzidenz von Darmkrebs in der westlichen Zivilisation in Zusammenhang (Sinha *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999). Als Modellsystem zur Untersuchung dieses hypothetischen Zusammenhangs und hinsichtlich des Polymorphismus im *SULT1A1*-Gen sollen die transgenen Mäuse zum Einsatz kommen.

In dieser Arbeit wurden transgene Mäusen mit den humanen Genen *SULT1A1*1*, *SULT1A1*2* und dem humane Gen-Cluster *SULT1A1*1/SULT1A2*1* mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Dazu wurde den Tieren eine einmalige Dosis von 90 mg PhIP pro kg Körpermasse in wässriger Lösung oral verabreicht. Die Dosis entsprach einer Hochdosis innerhalb eines linearen Dosis-Wirkungsbereiches und wurde in einer vorausgegangenen Dissertation an nicht-transgenen Ratten ermittelt (Hollnagel 2004). Die Tiere wurden 8 h nach Applikation durch zervikale Dislokation getötet. Der Versuchszeitraum wurde in einer vorherigen Arbeit bestimmt (Dobbernack 2008). Leber, Lunge, Niere und Colon-Mucosa wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Ermittlung des Einflusses der zusätzlichen Expression der humanen *SULT1A*-Gene auf das genotoxische Potential von PhIP wurde die DNA aus den Gewebeproben isoliert und die DNA-Addukte mittels ³²P-Postlabelling bestimmt. Als Standard diente jeweils 0,25 µg mit PhIP-adduktierter Heringsperma-DNA. Die gebildeten DNA-Addukte wurden mit dem Instant Imager visualisiert und mit der Instant Imager Software relativ zum Standard ausgewertet.

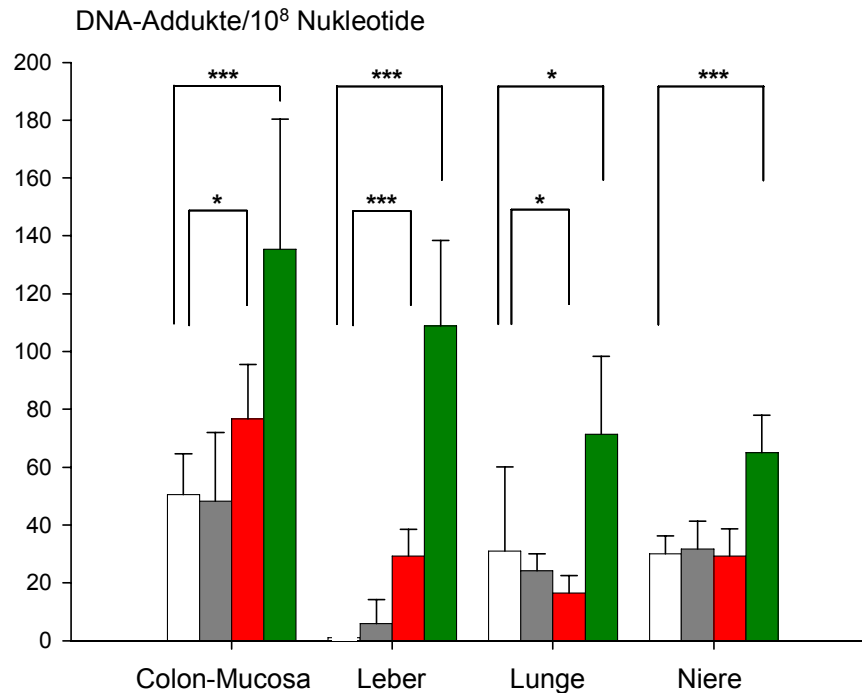


Abbildung 33: PhIP-DNA-Adduktgehalte in Colon-Mucosa, Leber, Lunge und Niere männlicher, hemizygoter *hSULT1A1*1*-Mäuse (graue Balken, Linie 31, 1-2 Kopien des *hSULT1A1*-Gens mit dem *1-Allel), *hSULT1A1*2*-Mäuse (rote Balken, Linie 28, 1-2 Kopien des *hSULT1A1*-Gens mit dem *2-Allel), *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*-Mäuse (grüne Balken, Linie 7, ca. 23 Kopien der *hSULT1A1/hSULT1A2*-Gene mit dem *1-Allel) und männlicher Wildtyp-Mäuse (weiße Balken). Alle Tiere waren 9-10 Wochen alt. Die Tiere wurden 8 h nach oraler Applikation von 90 mg PhIP/kg Körpermasse getötet. Pro Gruppe wurden 8 Tiere mit PhIP-Lösung und ein Tier mit wässriger HCl-Lösung behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte der DNA-Addukte pro 10⁸ Nucleotide der Tiere/Gruppe (ohne unbehandeltes Tier) und die Standardabweichung. In der Leber der Wildtyp-Mäuse konnten keine DNA-Addukte detektiert werden, weil bei allen Tieren die Detektionsgrenze nicht erreicht wurde (Detektionslimit 5 DNA-Addukte pro 10⁸ Nucleotide). Sterne bezeichnen Gruppen transgener Tiere, die sich statistisch signifikant von der jeweiligen Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse unterscheiden (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Mann-Whitney-Rangnummern-Test).

In der transgenen Linie 7 mit ca. 23 Kopien der humanen *SULT1A1/SULT1A2*-Gene konnten die höchsten DNA-Addukte in den untersuchten Organen im Vergleich zu den anderen Tieren detektiert werden (Abbildung 33). Dabei war das gebildete Adduktniveau in der Colon-Mucosa am höchsten (135 Addukten pro 10⁸ Nucleotide), gefolgt von den gebildeten DNA-Addukten in der Leber (108 Addukten pro 10⁸ Nucleotide), der Lunge (72 Addukten pro 10⁸ Nucleotide) und der Niere (65 Addukten pro 10⁸ Nucleotide).

In den transgenen Mauslinien 31 und 28 mit 1-2 Kopien des humanen *SULT1A1*-Gens konnten nur in der Linie 28 signifikante Unterschiede in der DNA-Adduktbildung verglichen mit dem Wildtyp in Colon, Leber und Lunge detektiert werden (Abbildung 33). Das Adduktniveau in der Linie 28 war in Colon (77

Addukten pro 10^8 Nukleotide) und Leber (30 Addukten pro 10^8 Nukleotide) erhöht, in der Lunge um den Faktor 2, verglichen zum Wildtyp, erniedrigt (16 Addukten pro 10^8 Nukleotide).

Die in der Niere von den Tieren der Linie 28 gebildeten DNA-Addukte (29 Addukten pro 10^8 Nukleotide) und alle in der Linie 31 detektierten Adduktniveaus (Colon: 48 Addukten pro 10^8 Nukleotide, Leber: 6 Addukten pro 10^8 Nukleotide, Lunge: 24 Addukten pro 10^8 Nukleotide, Niere: 32 Addukten pro 10^8 Nukleotide) waren nicht statistisch verschieden von den gebildeten Addukten in den Wildtyp-Mäusen (Colon: 50 Addukten pro 10^8 Nukleotide, Leber: Addukte unterhalb der Detektionsgrenze von 5 Addukten pro 10^8 Nukleotide, Lunge: 31 Addukten pro 10^8 Nukleotide, Niere: 30 Addukten pro 10^8 Nukleotide), siehe Abbildung 33. Alle Einzelwerte der DNA-Addukte sind im Anhang IV (Tabelle 9) aufgeführt.

4. Diskussion

4.1 Konstruktion transgener Mauslinien

Für die Untersuchung humaner Polymorphismen zur Aufklärung toxikologisch relevanter Fragestellungen wären transgene Mäuse ein sehr wichtiges und geeignetes Modellsystem. In einem Mausmodell, welches die humane *SULT* exprimiert, könnte der mögliche Kausalzusammenhang zwischen Genotyp und Krankheit vor dem Hintergrund eines ansonst genetisch uniformen Inzuchtstammes untersucht werden. Die standardisierten Haltungsbedingungen für Labornager eliminieren außerdem weitere Einflussfaktoren, wie Umweltbedingungen und Ernährung.

Zur Generierung der transgenen Mauslinien wurde die Methode der Mikroinjektion gewählt. Die humanen Gene wurden in ihrer eigenen genomischen Umgebung in das Mausgenom integriert. Damit sollten die erforderlichen *cis*-agierenden regulatorischen DNA-Sequenzen gemeinsam mit dem zu exprimierenden Gen in das Mausgenom überführt werden. Außerdem sollte der potentielle Einfluss der genomischen Umgebung am Integrationsort auf die Expression des Transgens reduziert werden. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die erforderlichen Transkriptionsfaktoren bei der Maus nicht vorhanden sind oder nicht in den entsprechenden Geweben exprimiert werden. Es kann sein, dass die humanen *cis*-agierenden Sequenzen so von den entsprechenden murinen abweichen, dass orthologe murine Transkriptionsfaktoren die humanen Sequenzen nicht erkennen.

Die nach der Mikroinjektion geborenen Jungtiere wurden auf Transgenität untersucht. Nach der Identifizierung der transgenen Foundertiere (#30, #31, #14, #28) wurde die Integrität der Transgene in den folgenden Generationen überprüft. In den Folgegenerationen der Founder #30 und #14 konnten nach der F1-Generation keine weiteren Tiere gezüchtet werden. Möglich wäre, dass der Nachkommensausfall dieser transgenen Linien durch den Integrationsort des Transgens begründet wird. Dieser Positionseffekt nach Integration des Transgens in ein mauseigenes Gen könnte zu einem unerwünschten „*knock out*“ dieses Gens

und damit zur Unfruchtbarkeit führen. Die Folgegenerationen des Founders #31 mit dem *hSULT1A1*1*-Allel trugen Sequenzabschnitte vom Anfang und Ende des Genkonstruktes, sowie mehrere Fragmente im gewählten Bereich, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Damit wurde von einer korrekten Integration des humanen DNA-Abschnitts in das Mausgenom ausgegangen. Beim Founder #28 konnte das *SULT1A1*2/SULT1A2*2*-Gen-Konstrukt mittels PCR und anschließender RFLP-Analyse nachgewiesen werden. In den Nachkommen dieser Linie fehlten Sequenzabschnitte des *SULT1A2*-Gens. Die Tiere wurden als *SULT1A1*2*-transgene Mauslinie weitergeführt, weil die Gensequenz des *SULT1A1*-Gens vom Anfang und Ende (sowie mehrere Fragmente im gewählten Bereich) integriert war und das Transgen in den Folgegenerationen stabil weitergegeben wurde. Möglicherweise ist in diesem Fall das Genkonstrukt aufgrund eines Einzelstrangbruchs der linearisierten BAC-DNA gespalten worden. Große Genkonstrukte aus Vektoren sind anfällig für Brüche vor der Integration und DNA-Moleküle können nach dem Einbringen in die Zelle zufällig brechen (Bishop *et al.* 1989). Dieser Strangbruch könnte in der frühen Ontogenese erfolgt sein. Dadurch ist der Genotyp des Founders mosaik. Hierbei wird das Doppelgenkonstrukt in die Körperzellen und nur der später nachgewiesene Bereich mit dem *SULT1A1*2*-Allel in die Keimbahn integriert. Dadurch würde nur das *SULT1A1*-Gen über die Keimbahn an die Nachkommen weitergegeben werden.

Neben der Mikroinjektion hätten die transgenen Mäuse auch mittels homologer Rekombination generiert werden können. Diese Technik erfordert die Definition von Homologiearmen (ca. 50-70 bp), die das Gen-Konstrukt flankieren. Diese flankierenden Sequenzen müssen identisch mit der Sequenz im Zielgenom sein, um eine zielgerichtete Rekombination zu erreichen. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit der *SULT1A1*-Gene in Mensch und Maus sind die Unterschiede in den nicht-codierenden flankierenden Bereichen zu groß, um eine homologe Rekombination der humanen DNA und flankierender Bereiche ins Mausgenom zu bewirken.

Die Notwendigkeit, eine humanrelevante Genregulation in den Mäusen zu erreichen, sprach ebenfalls gegen eine Verwendung dieser Technologie. Für die humanen *SULT1A*-Gene konnten verschiedene 5'-nicht-translatierte Regionen im ersten Exon mit Promotor-Aktivität nachgewiesen werden (Hempel *et al.* 2005). Jedoch ist bislang unbekannt, welche Faktoren die zellspezifische Expression

bzw. Expressionsstärke regulieren. Daher wäre es erforderlich, neben dem humanen Gen noch zusätzlich im 5'-Bereich flankierende Sequenzen ins Mausgenom zu integrieren. Durch die flankierenden Sequenzen wird zudem das humane Gen mit der eigenen genomischen Umgebung integriert, damit weitere, noch nicht identifizierte, transkriptionsregulatorische Elemente überführt werden.

Um eine dem Menschen entsprechende SULT1A1-Protein-Expression im transgenen Mausmodell sicherzustellen, wurden flankierende Genbereiche ca. 50 kb stromaufwärts und ca. 10 kb stromabwärts gewählt. Dieser Genabschnitt wurde auch schon bei anderen SULT-Modellen verwendet und war hinsichtlich des Expressionsniveaus erfolgreich (Dobbernack 2008). Für die *knock in/knock out*-Methode transgener Mauslinien mit dem häufigsten Polymorphismus im *SULT1A1*-Gen wäre die fehlerfreie Amplifikation großer DNA-Moleküle erforderlich. Die in der PCR standardmäßig verwendete Taq-DNA-Polymerase hat eine sehr geringe Fehlerrate beim Nukleotideinbau von ca. einem Fehler pro 10-50.000 Basen (Eckert *et al.* 1991). Allerdings erhöht sich die Fehlerhäufigkeit ab einer Produktlänge von 10 kb, was durch eine zusätzliche Polymerase mit 3'-Exonukleaseaktivität bis 35 kb bzw. bis zu 40 kb kompensiert werden kann (Barnes 1994; Cheng *et al.* 1994).

In der *hSULT1A1*2*-transgenen Mauslinie wurden ca. 9 kb große Bereiche stromaufwärts des Gens integriert und auch damit eine dem Menschen entsprechende Expression und Gewebeverteilung erzielt. Dies lässt vermuten, dass die Bereiche 9 kb stromaufwärts ausreichend sind, um einen human-ähnlichen Genloкус im Mausgenom zu erreichen, was die Verwendung der *knock in/knock out*-Methode ermöglichen könnte. Allerdings ist die Generierung der transgenen Linien mit den *SULT1A1*-Allelen als ein Teilprojekt bei der Etablierung transgener Mäuse in der ETOX anzusehen. Die bereits etablierten transgenen Mauslinien wurden ebenso mittels Mikroinjektion generiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der transgenen *hSULT1A*-Mäuse (*hSULT1A1*1*, *hSULT1A1*2*, *hSULT1A1*1/SULT1A2*1*, *hSULT1A1*2/SULT1A2*2*) mit *ko-mSult1*-Mäusen (*ko-mSult1a1*, *ko-mSult1d1*) sowie mit humanisierten *hSULT1A/ko-mSult1*-Mäusen wurde für alle Linien die gleiche Generierungsmethode angewendet.

4.2 hSULT1A1-Protein-Expressionsanalysen in den transgenen Mäusen

Die Überprüfung der Expression des humanen SULT1A1-Proteins in beiden transgenen Mauslinien gab Aufschluss über die Gewebe, in denen es exprimiert wird und gleichzeitig quantitative Angaben zur Expressionsstärke. Wenn möglich, wurden die Gewebeproben mit Humanproben verglichen.

In beiden transgenen Linien konnte die cytosolische Expression des humanen SULT1A1-Proteins in Leber, Colon-Mucosa und Caecum nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in der *SULT1A1*2*-transgenen Linie in Niere, Lunge, Milz und in den drei Dünndarmabschnitten (Mucosa von Duodenum, Jejunum, Ileum) das exprimierte humane Protein in cytosolischen Fraktionen detektiert werden. Dies entspricht der humanen Gewebeverteilung (Teubner *et al.* 2007; Riches *et al.* 2009) Die Lokalisation der hSULT1A1 in der Milz wurde bislang allerdings noch nicht untersucht und beschrieben. Das cytosolische hSULT1A1-Protein konnte in beiden transgenen Mauslinien im Western Blot nicht in Gehirn, Haut, Herz, Magen, Pancreas, Harnblase und Testis der transgenen Mäuse nachgewiesen werden. Dagegen wurden laut einiger Studien das humane Protein in bestimmten Regionen des Gehirns (Young *et al.* 1984; Salman *et al.* 2009) und im Magen (Teubner *et al.* 2007) detektiert.

Eine Quantifizierung der humanen SULT1A1-Proteine in Leber, Lunge, Niere und Colon-Mucosa aus beiden transgenen Mauslinien ergab für die *SULT1A1*2*-transgene Linie eine nahezu identische Expression zu humanen Organen. Der Anteil des humanen Proteins in der transgenen Mauslinie (in Klammern sind die Werte aus Humanproben angegeben) lag in Leber bei 0,3% [0,07-0,3%, (Meinl *et al.* 2006)], in der Niere bei 0,006% [0,003-0,013%, (Meinl *et al.* 2006)], der Lunge bei 0,002% [0,016%, (Schade 2008)] und in der Colon-Mucosa bei 0,016% [0,02%, (Teubner *et al.* 2007)]. In der *SULT1A1*1*-transgenen Mauslinie konnte in der Leber eine humanähnliche Expressionsstärke der SULT1A1 (0,06%) ermittelt werden.

Zum Nachweis der zellulären und subzellulären Lokalisation des humanen Proteins in den transgenen Mäusen wurde ein spezifisches Antiserum gegen die humanen SULT1A1/SULT1A3-Proteine verwendet. Die nachgewiesenen Immunreaktivitäten resultieren aus der Bindung des Antiserums an die humane

SULT1A1, da die humane SULT1A3 nicht in die Mäuse integriert wurde. Zur Überprüfung möglicher falsch-positiver Immunreaktionen wurde immer eine Wildtyp-Kontrolle mitgeführt. Eine homogene Expressionsverteilung der SULT1A1 über den Acinus in humanen Lebern (Windmill *et al.* 1998) konnte in den transgenen Linien nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurden unterschiedlich stark ausgeprägte Immunreaktivitäten (Zunahme von periportal nach perizentral) detektiert, die auch von anderen fremdstoffmetabolisierenden Enzymen bekannt sind. Auch CYP-Enzyme werden dominierend im perizentralen Feld exprimiert (Lindros 1997). Damit ist eine direkte Konjugation der Substanzen (und meistens Detoxifikation) nach Funktionalisierung durch CYP gewährleistet.

Die cytosolische und kernständige Immunreaktion in den Tubulizellen im äußeren Mark der Niere entspricht der Verteilung in humanen Proben (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Die in der Linie 31 detektierte hSULT1A1-Expression im Glomerulus wurde beim Menschen bislang noch nicht beschrieben.

Für die Lunge bestand zwischen Mensch und beiden transgenen Mausmodellen Übereinstimmung hinsichtlich der Expressionslokalisierung der humanen SULT1A1 in den Epithelzellen des respiratorischen Epithels (Windmill *et al.* 1998). Auch entsprach die hauptsächlich kernständige Lokalisation des SULT1A1-Proteins in den Pneumocyten Typ II in Tieren der Linie 28 der humanen Situation (ETOX, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Immunreaktion im respiratorischen Epithel der Trachea der beiden transgenen Mauslinien wurde bislang beim Menschen nicht beschrieben. Eine Expression des humanen Enzyms in diesen Zellen ist naheliegend, da die Trachea der Lunge vorgelagert ist und dadurch Kontakte zu Fremdstoffen bestehen, womit die Notwendigkeit der Metabolisierung gegeben ist.

Auch die detektierten Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt entsprechen der Humansituation. Die für das humane Ileum beschriebene Immunreaktion gegen Antiseren mit humanen SULT1A-Formen in reifen Enterocyten am Übergang von Krypte zur Zotte und in den Zotten selbst konnte auch in den transgenen Mauslinien nachgewiesen werden. In den luminal gelegenen Epithelzellen der Krypten des Colons und des Caecums in den transgenen Mäusen konnten Immunreaktionen wie in Humanproben nachgewiesen werden (Windmill *et al.* 1998; Teubner *et al.* 2007).

Der Nachweis der humanen SULT1A1 in den transgenen Mäusen im Plexus choroideus des Gehirns wurde erstmals erbracht. Der Plexus choroideus (P.ch.) ist ein zottenreiches Adergeflecht im Hohlraumssystem (Ventrikel) des Gehirns, wo speziell differenzierte Epithelzellen des P.ch. die Liquorflüssigkeit bilden. Die Rolle der SULT1A1 in diesen Zellen des P.ch. könnte in der Detoxifizierung von Fremdstoffen liegen, die die Blut-Liquor-Schranke überwunden haben. Vermutlich wegen des prozentual geringen Anteils der Epithelzellen des P.ch. an Zellen im gesamten Gehirn konnte diese Immunreaktion mittels der Western Blot-Methode nicht erfasst werden.

Durch den Nachweis der Expression des humanen Proteins in (luminalen) Epithelzellen wird deutlich, dass Fremdstoffe nach Erstkontakt zum Gewebe sofort metabolisiert werden können. Die Rolle der hSULT1A1 im Zellkern konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden. Die Expression und katalytische Aktivität einer anderen humanen SULT, der SULT2B1b, konnte in Zellkernen von humanen Plazentazellen nachgewiesen werden (He *et al.* 2004; He *et al.* 2005), während dieselbe SULT-Form in humanen Prostatazellen und in Zellen des humanen Bronchialepithels ausschließlich cytosolisch lokalisiert wurde. Die Funktion der nukleären Lokalisierung der SULT wurde als die Verhinderung der Bindung und selektiven Aktivierung von Steroidrezeptoren beschrieben. Unter den SULT-Formen trägt die SULT2B1b als einzige eine prolin- und serinreiche Aminosäuresequenz am carboxylischen Ende, die unter anderem einer Translokation des Proteins in den Zellkern zu dienen scheint (He *et al.* 2006). Eine kernständige Lokalisation der hSULT1A1 wurde in den Enterocyten des Colons beschrieben (Teubner *et al.* 2007), die in dieser Arbeit und in einer weiteren Doktorarbeit (Dobbernack 2008) bestätigt werden konnte. Unveröffentlichte Ergebnisse der Abteilung ETOX zeigen weiterhin eine SULT1A1-Lokalisation in den Zellkernen humaner Hepatocyten, in Pneumocyten des Typs II und in Tubulizellen der Niere. Auch diese Daten konnten mit den in dieser Arbeit generierten Mäusen bestätigt werden. Kenntnisse über die Translokation der SULT1A1 in den Zellkern liegen bisher nicht vor. Auch sind physiologische Funktionen dieses Enzyms im Zellkern bekannt.

Auf Protein-Ebene wurden in der Mauslinie mit dem *hSULT1A1*2*-Allel (Linie 28) eine höhere Expressionen der humanen SULT1A1 als in der anderen Mauslinie (Linie 31) ermittelt. Die Proteinsynthese in der Linie 31 könnte

vermutlich durch Komplexbildung eines 20-Nukleotide-*cis*-Elements an der hSULT1A1-3'-UTR inhibiert sein, wie es bei anderen Enzymen mit gleichem Resultat beschrieben wurde (Duquette *et al.* 2002). Welche weiteren Möglichkeiten für die Unterschiede verantwortlich sein könnten, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.3 Sequenzanalysen

Analysen der integrierten Transgensequenz wurden durchgeführt, weil nicht erwartete Expressionsmuster des humanen Proteins in den transgenen Mauslinien auftraten. Die Sequenzanalyse der cDNA in den *SULT1A1*1*- und *SULT1A1*2*-transgenen Mauslinien ergab eine identische Sequenz verglichen mit den Referenzsequenzen X78283 (GenBank Accession Nummer der cDNA von *SULT1A1*1*) bzw. U09031 (GenBank Accession Nummer der cDNA von *SULT1A1*2*). Damit konnten transgene Mausmodelle mittels Mikroinjektion entwickelt werden, die den gesamten codierenden Bereich des humanen *SULT1A1*-Gens enthalten und keine Sequenzabweichungen aufweisen. Auch der SNP (engl.: single nucleotide polymorphism; Einzelnukleotidaustausch) an Position 638 (Positionen 638 im Sequenzausdruck) mit einer Basensubstitution von G nach A konnte in den transgenen Mauslinien nachgewiesen werden. Somit erklären diese Sequenzanalysen nicht die erwähnten unerwarteten Expressionsmuster.

Möglicherweise könnten Polymorphismen in der 5'-flankierenden Region die Proteinexpression beeinflussen. Bekannte Polymorphismen stromaufwärts des *SULT1A1*-Gens befinden sich an den Positionen -624 und -396. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Sequenzanalysen für die *SULT1A1*1*-transgene Mauslinie ein (-624/-396)CG-Haplotyp und für die *SULT1A1*2*-transgene Mauslinie ein (-624/-396)GA-Haplotyp ermittelt. In der Literatur wurde für den (-624/-396)CG-Haplotyp eine 8fache Erhöhung und für den (-624/-396)GA-Haplotyp keine Erhöhung der Luciferase-Aktivität in einem Assay beschrieben (Hebbring *et al.* 2007). Diese erhöhte Promotoraktivität durch den (-624/-396)CG-Haplotyp führt in diesen Mausmodellen nicht zu einer gesteigerten

Proteinexpression. In der *SULT1A1**2-transgenen Mauslinie mit dem (-624/-396)GA-Haplotyp konnten in Leber, Lunge, Niere und weiteren Organen, wie denen des Gastrointestinaltraktes, deutlich höhere Proteingehalte als in der anderen transgenen Linie mit dem (-624/-396)CG-Haplotyp ermittelt werden. Dies könnte bedeuten, dass die SNPs an -624 und -396 keinen Einfluss auf die Expressionsstärke in den genannten Organen haben.

Neben den eben erwähnten SNPs befinden sich noch weitere in der 5'-flankierenden Region des *SULT1A1*-Gens. Somit stellt dieser Bereich einen „Mutations-Hotspot“ dar. Dieser „Hotspot“ beinhaltet 5 SNPs zwischen -630 und -290. Die SNPs sind, neben den SNPs an -624 und -396, A(-358)C, C(-341)G sowie T(-294)C. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Promotorsequenzen in -358, -314 und -294 in beiden transgenen Mauslinien identisch sind (-358A, -314C, -294T). Demnach könnten die SNPs zwischen -630 und -290 keinen Einfluss auf die Expressionsstärke in den genannten Organen haben.

Die Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) könnte eine weitere mögliche Ursache für die ermittelten Unterschiede im Proteingehalt der *SULT1A1* sein. Der Bereich zwischen -630 und -350 enthält mutmaßliche Bindungsstellen für den TF Sp1 (Ning *et al.* 2005). Diesem hochaktiven Promotor fehlen die Adenin- und Thymidin-reichen Bindungssequenzen für TF (TATA-Box). Allerdings enthält diese Sequenz G/C-reiche Regionen, was eine Interaktion mit dem TF Sp1 ermöglicht. Die Sequenz -GGA- dient als Hauptkontaktpunkt für ETS-TF (ETS = E26 transformations-spezifisch). Daher sind die ubiquitären ETS-TF Elf und GABP in der Lage zu binden und die Transkription des *SULT1A1*-Gens zu induzieren. Eine synergistische Erhöhung der Promotoraktivität konnte bei der Bindung vom Elf:GABP-Hetereodimer und gleichzeitiger Präsenz von Sp1 festgestellt werden (Hempel *et al.* 2004). Bindungsstellen für ETS und Sp1 konnten an den Sequenzbereichen um (-396)G und (-358)A ermittelt werden (Ning *et al.* 2005). Der (-396)G-Haplotyp wurde in der *SULT1A1**1-transgenen Linie mit der geringeren Proteinexpression ermittelt und der (-358)A-Haplotyp in beiden Linien. Folglich kann dieser Unterschied nicht zu den detektierten Expressionsmustern führen.

In dieser Literatur wurde aber auch beschrieben, dass Änderungen der einzelnen Nukleotide in jedem Allel zu potentiellen Änderungen der *cis*-Element-

Bindungsaffinität des entsprechenden TF führen können. Möglicherweise bestehen zwischen dem murinen und dem humanen polymorphen *SULT1A1*-Gen Sequenzähnlichkeiten, was eine Bindung muriner TF ermöglicht. Dabei könnte der (-624/-396)GA-Haplotyp der *SULT1A1*2*-Linie bevorzugt von murinen Elementen gebunden werden, was sich in einer gesteigerten Expression widerspiegelt. Die Existenz zusätzlicher SNPs in den Bindungsstellen von TF könnte eine weitere funktionelle Konsequenz eines Basenaustausches bedeuten.

Möglicherweise können die Sequenzanalysen des Transgens in der 5'-flankierenen Region die nicht erwarteten Aktivitätsmuster des humanen Proteins in den transgenen Mauslinien klären. Bei 381 Kaukasiern wurde der *SULT1A1*-Promotor-Haplotyp mit der SULT-Aktivität in Blutplättchen verglichen (Ning *et al.* 2005). Varianzanalysen ergaben für GAACT (-624, -396, -358, -341, -294) eine verminderte Aktivität der *SULT1A1* in Blutplättchen. In der *SULT1A1*2*-transgenen Mauslinie wurde der GAACT-Haplotyp ermittelt. Es wurde in den untersuchten Organen eine tendenziell höhere Enzymaktivität (Abschnitt 3.2.8) in dieser Linie als in der *SULT1A1*1*-transgenen Mauslinie detektiert. Somit könnte sich der Einfluss dieses *SULT1A1*-Promotor-Haplotypen auf die SULT-Aktivität in Blutplättchen beschränken. Verglich man aber nur den G(-396)A-Haplotyp mit der SULT-Aktivität in Blutplättchen, war das A-Allel mit einer höheren Enzymaktivität in Kaukasiern assoziiert. Dieses Resultat würde den ermittelten Daten aus Leber- und Colonproben der transgenen Mäuse entsprechen. Somit konnte für die Leber bestätigt werden, dass keine Assoziation des *SULT1A1*2*-Genotyps mit einer geringen Enzymaktivität vorliegt (Raftogianis *et al.* 1999). Erstmals wurde in diesen Modellen im Colon nachgewiesen, dass auch in diesem Organ keine Assoziation vorliegt.

Die Assoziation des A-Allels mit einer höheren Enzymaktivität wurde jedoch nicht bei Afro-Amerikanern ermittelt (Ning *et al.* 2005). Der Unterschied zwischen den Populationen lässt vermuten, dass dieser Polymorphismus nicht allein direkt verantwortlich für Unterschiede in der Transkription ist. Denkbar wäre, dass dieser SNP mit noch nicht identifizierten Polymorphismen gekoppelt ist und einen stärkeren Effekt auf die Regulation der Genexpression hat.

4.4 hSULT1A1-cDNA-Expressionsanalysen in den transgenen Mäusen

Die Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den Linien 31 und 28 könnten aus unterschiedlich starker Transkription resultieren. Daher wurden RNA-Expressionsanalysen mittels Real-Time-PCR durchgeführt. Untersuchungen der RNA-Expression im codierenden Bereich des humanen Gens offenbarten Unterschiede in der Expression. So wurde in der *SULT1A1*2*-transgenen Linie ein erhöhter RNA-Expressionsgehalt (Faktor 20/60/200/700) in Lunge, Colon-Mucosa, Niere und Leber gegenüber der *SULT1A1*1*-transgenen Mauslinie ermittelt. Damit sind die Unterschiede größer als auf Protein-Ebene, wo ein fünffacher Unterschied in Leber und Colon-Mucosa ermittelt wurde. In der Lunge und der Niere konnte in der *SULT1A1*1*-transgenen Linie keine cytosolische Expression der humanen SULT1A1 detektiert und demzufolge auch kein Faktor bestimmt werden. Eine Erklärung für die geringeren Expressionsunterschiede auf Protein-Ebene könnten die kürzere Halbwertszeit des SULT1A1*2-Proteins sowie die umfangreichere Ubiquitinierung und vermehrte Degradierung über den Proteasomen-Pathway sein (Raftogianis 2001; Nagar *et al.* 2006).

Eine weitere Erklärung für die Expressionsunterschiede könnte in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) zu finden sein. Das *SULT1A1*-Gen ist in 8 Exons gegliedert, wovon Exon II bis Exon VIII in der codierenden Region des Gens liegen. Das Exon I und Regionen stromaufwärts des Startcodons in Exon II befinden sich im nicht-codierenden Bereich des Gens. Frühere Klonierungsstudien mit humaner SULT1A1-cDNA wiesen das Vorhandensein unterschiedlicher mRNA-Spezies nach, die nur in der 5'-UTR variierten. In Abbildung 34 ist schematisch die 5'-Region des *SULT1A1*-Gens dargestellt [aus (Hempel *et al.* 2004)]. In der Literatur wird die Position von drei 5'-UTRs angegeben: ein 5'-UTR unmittelbar stromaufwärts vom ATG des Startcodons [Exon I in der Abbildung 34, (Zhu *et al.* 1993)], ein proximales 5'-UTR [5'-UTR A = Exon 1A in der Abbildung 34, (Raftogianis *et al.* 1996)] und ein distales 5'-UTR [5'-UTR B = Exon 1B in der Abbildung 34, (Wilborn *et al.* 1993; Zhu *et al.* 1993)].

In dieser Arbeit wurde die RNA-Expression im proximalen 5'-UTR (Exon 1A) in der cDNA der Leber, Lunge, Niere und Colon in beiden transgenen Mäusen untersucht. Dabei konnte in der *SULT1A1*2*-transgenen Linie in allen

untersuchten Organen ein spezifisches PCR-Produkt (294 bp) für diese Exon 1A ermittelt werden. In der anderen transgenen Mauslinie wurde das Exon 1A als spezifisches PCR-Produkt in der Lunge nachgewiesen. Aus Literaturdaten entnommen, produzierte die Sequenz des Exon 1A kein signifikantes Luciferase-Signal verglichen mit dem leeren pGL3-Basic Vektor (Abbildung 34). Demnach könnte das Fehlen dieses Exons in Leber, Niere und Colon und die schwache Expression in der Lunge der *SULT1A1*1*-transgenen Linie nicht für die geringere Proteinexpression (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4) verantwortlich sein.

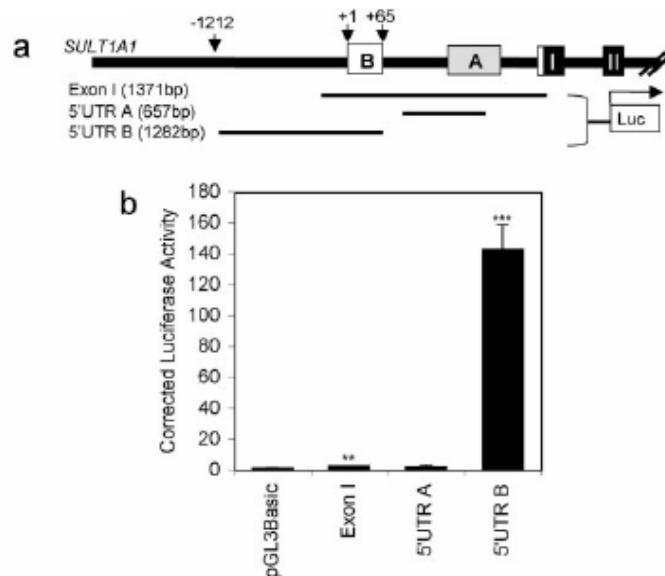


Abbildung 34: a, Schematische Abbildung der 5'-Region des humanen *SULT1A1*-Gens. Offene Boxen stellen die Lokalisation der alternativen 5'-UTRs der *SULT1A1*-cDNA dar. Proximales 5'-UTR entspricht A und distales 5'-UTR entspricht B. Geschlossene Boxen stellen das erste und zweite Exon des *SULT1A1*-Gens dar. Der Transkriptionsstart, identifiziert mit 5'-RACE, ist mit +1 gekennzeichnet. Die schwarzen Linien zeigen Promotorkonstrukte, welche in pGL3-Basic Luciferase Vektoren kloniert wurden. b, Promotoraktivitäten in HepG2-Zellen. Aktivitäten der Sequenzen, die die alternativen 5'-UTRs des *SULT1A1*-Gens flankieren. Alle Promotoren wurden in den pGL3-Basic Vektor kloniert, in HepG2-Zellen transfiziert und in einem Assay zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität eingesetzt. Die Resultate geben die Erhöhung der Luciferase-Aktivität relativ zum leeren pGL3-Basic Vektor an und sind als Mittelwert mit Standardabweichung von 3 Transfektionen angegeben. Die Sterne bezeichnen signifikante Unterschiede der Aktivität zum leeren pGL3-Basic Vektor, ermittelt mit Student's T-Test: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Abbildung aus Hempel *et al.* 2004.

Hempel und Mitarbeiter fanden jedoch in der Sequenz des 5'-UTR B (Exon 1B) ein 140fach höheres Signal zum leeren pGL3-Basic Vektor (Abbildung 34). Möglicherweise ist dieser Bereich für die Proteinexpression entscheidend. Denkbar wäre, dass die RNA instabil und daher in geringem Umfang translatiert wird. In dieser Arbeit wurde die RNA-Expression im Exon 1B in der cDNA der Leber und weiteren Organen (Colon-Mucosa, Lunge und Niere) mittels Real-Time-PCR analysiert. Dabei wurden in den untersuchten Organen nur geringe Unterschiede in den Expressionen zwischen beiden transgenen Mauslinien

ermittelt. Diese geringen Unterschiede in der Expression im Exon 1B verglichen mit den hohen Unterschieden im codierenden Bereich des humanen Gens deuten nicht auf eine Instabilität der RNA hin. Demzufolge müssen andere Faktoren ursächlich für die Unterschiede im SULT1A1-Proteingehalt sein.

Die Transkription der SULT1A1 könnte möglicherweise durch unterschiedliche Spleißvarianten beeinflusst werden. In der Literatur wurden für die SULT1A1-cDNA der Leber unterschiedliche Spleißvarianten beschrieben (Raftogianis *et al.* 1996). In den in dieser Arbeit untersuchten Organen wurden in Linie 28 noch zusätzliche PCR-Produkte (450, 500 bp) detektiert. In Linie 31 konnten ebenfalls zusätzliche PCR-Produkte von 350 und 500 bp in Leber, Niere und Colon ermittelt werden. Das 500 bp-PCR-Produkt konnte in beiden Linien ermittelt werden, wobei die Bandenstärke in der *SULT1A1*2*-transgenen Linie ausgeprägter war. Dass diese Produkte aus unvollständigem DNase-Verdau resultieren, kann ausgeschlossen werden, da bei genomischer DNA ein PCR-Produkt von 597 bp zu erwarten wäre. Möglicherweise könnten diese Produkte verlängerte mRNAs und ursächlich für die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den beiden transgenen Linien sein.

Auch dem 3'-UTR wird eine wesentliche Rolle in der Regulation zugeschrieben. Dieser Bereich kann von miRNA-Elementen gebunden werden und die Genexpression von Enzymen beeinflussen. Bislang wurde dies bei CYP1B1 beschrieben (Tsuchiya *et al.* 2006).

Demnach könnten die Unterschiede in der Aktivität und Expression des humanen SULT1A1-Proteins zwischen den beiden Mauslinien im 5'-UTR, im 3'-UTR und in unterschiedlichen Spleißvarianten der mRNA begründet sein. Hierfür wären weitere Charakterisierungen der transgenen Mauslinien erforderlich. Denkbar für diese Bereiche wären RACE-PCR-Sequenzanalysen (RACE-PCR: rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction).

4.5 Aktivitätsnachweis für das humane SULT1A1-Protein

In den transgenen Mauslinien wurde neben der Proteinexpression auch die hSULT1A1-Enzymaktivität in cytosolischen Fraktionen der Leber und des Colons untersucht. Dafür wurde 4-Nitrophenol als Substrat verwendet, weil es das Standardsubstrat für die hSULT1A1 ist wegen der substantiell höheren Affinität für dieses Enzym als für andere SULT-Formen (Glatt *et al.* 2004). Mit diesen Messungen sollte der Einfluss des *hSULT1A1*-Genotyps auf die Enzymaktivität untersucht werden. In humanen Thrombocyten konnte ein Einfluss nachgewiesen werden (Raftogianis *et al.* 1997).

Aus den Ergebnissen der Aktivitätsanalysen lässt sich eine tendenziell höhere Aktivität in den transgenen Tieren als in den Wildtyp-Mäusen ableiten. In den Leberfraktionen waren tendenziell höhere Aktivitäten bei der *SULT1A1*2*-transgenen Linie (Linie 28) als bei der *SULT1A1*1*-transgenen Linie (Linie 31) gemessen worden. Dies wäre durch die höhere hSULT1A1-Proteinexpression in Linie 28 erklärbar. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse würden Literaturdaten entsprechen, bei denen in der Leber keine Assoziation des *SULT1A1*2*-Genotyps mit einer geringen Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (Raftogianis *et al.* 1999). Eine Erklärung dafür könnte eine gewebespezifische Modulation des hSULT1A1-Proteingehalts durch den Genotyp sein.

In den cytosolischen Fraktionen des Colons waren die Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen den transgenen Mauslinien und den Wildtypen geringer. Möglicherweise ist der Beitrag anderer, endogener SULT-Formen zur untersuchten Aktivität nicht zu vernachlässigen. Im Darm der Maus wird die Expression der SULT1A1 und SULT1D1 beschrieben (Alnouti *et al.* 2006). Beide murinen SULT-Enzyme können ebenfalls 4-Nitrophenol metabolisieren (Alnouti *et al.* 2006). Um den Einfluß endogener Enzyme auf die hSULT1A1-Aktivität in diesen niedrig-exprimierenden Mäusen zu minimieren, wäre die Verpaarung mit den entsprechenden *knock out*-Mäusen (*mSult1a1-ko*-Maus, *mSult1d1-ko*-Maus) sinnvoll.

4.6 PhIP-DNA-Adduktbildung

In dieser Arbeit wurde die genotoxische Wirkung des heterozyklischen aromatischenamins 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridin (PhIP) in *hSULT1A1*1*-, *hSULT1A1*2*-, *hSULT1A1*1/hSULT1A2*1*- transgenen Mäusen vergleichend mit dem Wildtyp untersucht. Mittels ³²P-Postlabelling sollte der Einfluss der zusätzlichen Expression der humanen *SULT*-Gene auf die PhIP-DNA-Adduktbildung analysiert werden. PhIP-DNA-Addukte wurden in der Leber, der Lunge, der Niere und dem Colon von Mäusen des FVB/N-Inzuchtstammes nach oraler Applikation einer einmaligen Dosis von 90 mg PhIP/kg KM in wässriger Lösung nach 8 h gemessen.

DNA-Addukte entstehen durch kovalente Bindungen von Chemikalien oder deren Metabolite an Nukleotide der DNA. Der Nachweis von DNA-Addukten *in vivo* gibt Aufschluss über das mögliche toxikologische Potential der Substanz (Mutationen, Kanzerogenität), sowie über die biologisch effektive Dosis der DNA-reaktiven Substanz und erlaubt Aussagen zur Gewebeverteilung der reaktiven Metabolite.

Im PhIP-Metabolismus folgen der Hydroxylierung unterschiedliche Konjugationsreaktionen. Die Konjugate können entweder ausgeschieden werden oder führen zu instabilen Metaboliten, welche mit zellulären Nukleophilen wie DNA reagieren und somit genotoxisch wirken können (Abbildung 1). Die DNA-Adduktbildung und die Zielorgane werden daher maßgeblich von der Enzymausstattung der einzelnen Organe bestimmt.

In den Lebern der Wildtyp-Mäuse des Inzuchtstammes FVB/N konnten keine DNA-Addukte nachgewiesen werden. Dieses Resultat ist vergleichbar mit anderen Studien an Nagern. In Studien mit Tieren des Mausstammes C57BL/6 (Turteltaub *et al.* 1993) und weiblichen und männlichen Ratten (Friesen *et al.* 1996; He *et al.* 2000; Schut *et al.* 2000) waren die Addukte in der Leber ebenfalls im Niedrigbereich angesiedelt. Eine mögliche Erklärung könnte in der metabolischen Aktivität der Leber liegen. Die hohe metabolische Aktivität in der Leber und eine im Vergleich zu anderen Geweben stärkere Gefährdung durch weitere gebildete reaktive Metabolite sind gleichzeitig mit einer Spezialisierung auf die Detoxifizierung reaktiver Spezies verbunden. Es wurde in Ratten und Menschen

beschrieben, dass nach Exposition von PhIP hepatische GST und GSH die DNA-Bindung von *N*-Acetoxy-PhIP inhibieren (Lin *et al.* 1994; Kaderlik *et al.* 1994a; Kaderlik *et al.* 1994b; Coles *et al.* 2001). PhIP-Metabolite können aber auch über die Generierung von Glucuronidkonjugaten detoxifiziert werden (Felton *et al.* 2002). Interessanterweise konnten DNA-Addukte in der Leber der transgenen Mäusen nachgewiesen werden. Demnach ist die humane *SULT1A1* in diesen transgenen Linien in der Lage, PhIP *in vivo* zu einem ultimalen Kanzerogen zu metabolisieren. Die signifikanten Erhöhungen der DNA-Addukte in den transgenen Linien mit *hSULT1A1*1/SULT1A2*1* und *hSULT1A1*2* verglichen mit dem Wildtyp ließen sich durch das hohe Expressionsniveau der *hSULT1A1* (siehe Abschnitt 3.2.3) erklären. Dabei wurde in der transgenen Mauslinie mit einer höheren Expression der *hSULT1A1* auch eine höhere Adduktbildung nachgewiesen. Warum Detoxifizierungsreaktionen durch UGT in diesem Organ vermutlich nur in geringem Umfang stattfinden, bleibt spekulativ. Während sich *SULT* oft durch eine hohe Affinität und eine geringere Umsatzkapazität ihrer Substrate auszeichnen (Kim *et al.* 1995), weisen die UGT eine niedrigere Substrataffinität und höhere Umsatzkapazität auf (Court *et al.* 2001). Bei hohen Substratkonzentrationen sollte daher die UGT-vermittelte Konjugation mit Glucuronsäuren dominieren. Möglicherweise hat die *hSULT1A1* eine hohe Substrat-Affinität gegenüber *N*-OH-PhIP. Die hohe Enzymexpression der humanen *SULT* und die hohe Substrat-Affinität könnten eine hohe Umsatzkapazität bewirken. Folglich stünde den UGT eine geringere Zahl an Substraten zur Verfügung. Die geringere *hSULT1A1*-Expression in der *SULT1A1*1*-transgenen Mauslinie wird vermutlich von einer UGT-vermittelten Detoxifizierung dominiert, was sich in der geringen Zahl gebildeter DNA-Addukte widerspiegelt.

In der Colon-Mucosa konnten in allen transgenen Mauslinien sowie in den Wildtyp-Mäusen DNA-Addukte gemessen werden. Eine Möglichkeit ist, dass Colonepithelzellen über den enterohepatischen Kreislauf oder den Blutweg mit *N*-OH-PhIP in Kontakt kommen. Der Einfluss von Darmbakterien hinsichtlich der DNA-Adduktbildung im Colon wurde in keimfreien und rekonventionalisierten Ratten untersucht (Hollnagel 2004). Dabei wies die keimfreie Gruppe ein um 40% erniedrigtes Adduktniveau im Colon auf als die rekonventionalisierte Gruppe. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass im Darmlumen befindliche *N*-OH-PhIP-Glucuronide in konventionellen Tieren durch bakterielle

β -Glucuronidasen gespalten und *N*-OH-PhIP freigesetzt wird. Das hydroxylierte PhIP würde dann von den Enterocyten resorbiert und zum ultimalen Kanzerogen aktiviert werden. Die signifikanten Erhöhungen der DNA-Addukte in der Colon-Mucosa in den transgenen Linien mit *hSULT1A1/SULT1A2* und *hSULT1A1*2* verglichen mit dem Wildtyp ließen sich durch das hohe Expressionsniveau der *hSULT1A1* im Colon erklären (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Es wurde in der transgenen Mauslinie mit der höheren Expression der *hSULT1A1* auch eine höhere Adduktbildung nachgewiesen. Die niedrige Expression des humanen *SULT1A1*-Proteins in der *SULT1A1*1*-transgenen Mauslinie könnte auch im Colon ursächlich dafür sein, dass keine signifikanten Unterschiede in der Adduktbildung im Vergleich zum Wildtyp gemessen wurden.

In der Niere konnten in allen Mauslinien (transgen und Wildtyp) DNA-Addukte gemessen werden. Eine CYP1A1- bzw. CYP1A2-vermittelte *N*-Hydroxylierung von PhIP in der Niere der Maus spielt vermutlich keine Rolle, weil diese Enzyme nicht konstitutiv exprimiert werden (Dey *et al.* 1999). Eine Erklärung zur Bildung von hydroxyliertem PhIP in der Niere wäre eine CYP1-unabhängige Funktionalisierung. Demnach können auch Enzyme der CYP2-Familie PhIP in der Niere hydroxylieren (Tsao *et al.* 2001; Chen *et al.* 2007). Die hohe Expression der *mSULT1D1* und die Expression der *hSULT1A1* in der Niere ermöglichen die Bioaktivierung des *N*-OH-PhIP. Unterschiede in der DNA-Adduktbildung zwischen transgenen und nicht-transgenen Mäusen konnten nur in der *hSULT1A1*-überexprimierenden Mauslinie ermittelt werden. Demnach hat die *hSULT1A1* in der Niere nur bei einer starken Expression einen Effekt. Bei moderater *hSULT1A1*-Expression wie in den Linien mit den einzelnen *hSULT1A1*-Allelen, dominieren endogene, mauseigene Enzyme. Um die Rolle der humanen *SULT1A1* in der Niere dieser niedrig exprimierenden transgenen Linien zu klären, wäre eine Verpaarung der *hSULT1A1*-Mäuse mit den *mSult1d1-knock out*-Mäusen (ebenfalls FVB/N-Hintergrund) abzuwarten und das Experiment zu wiederholen.

Auch in der Lunge konnten DNA-Addukte in allen Mäusen nachgewiesen werden. Die Aktivierung von PhIP in der Lunge könnte durch *mCYP1A1* und *CYP1B1* vermittelt worden sein, weil diese Enzyme im Gegensatz zu *mCYP1A2* exprimiert werden (Choudhary *et al.* 2005). Ein erhöhtes Adduktniveau gegenüber dem Wildtyp konnte in der *hSULT1A1/SULT1A2*-transgenen Mauslinie ermittelt

werden. Diese Erhöhung ließe sich durch die hohe Expression der hSULT1A1 in der Lunge der transgenen Mäuse erklären. Die Expression des Transgens wirkt sich jedoch weniger stark aus als in der Leber, obwohl die Überexpression im Vergleich zum humanen Gewebe stark war (Schade 2008). Möglicherweise wurde in der Leber schon ein größerer Anteil an *N*-OH-PhIP sulfatiert und weiter prozessiert (z.B. durch Adduktbildung in der Leber, durch Detoxifizierung und Exkretion in die Galle oder durch Abgabe der detoxifizierten Metaboliten an das System für die renale Eliminierung), sodass es nicht mehr in diesem Umfang systemisch zur Verfügung stand. Der Nachweis der DNA-Addukte in den Wildtyp-Mäusen könnte durch die Expression der murinen SULT1D1 und der damit einhergehenden Bioaktivierung von *N*-OH-PhIP ermöglicht worden sein. Aufgrund der geringen Expression der hSULT1A1 in den Mauslinien mit den allelischen *hSULT1A1*-Varianten wäre durch Dominanz der mSULT1D1 ein ähnliches Adduktniveau wie im Wildtyp zu erwarten. Interessanterweise konnte in diesen Mauslinien jedoch eine Reduktion der Addukte, verglichen mit dem Wildtyp, gemessen werden, wobei in der *SULT1A1*2*-transgenen Linie die Abnahme der DNA-Adduktbildung stärker ausgeprägt war als in der *SULT1A1*1*-transgenen Linie. Denkbar wäre, dass die systemische Verfügbarkeit des *N*-OH-PhIP in den Wildtyp-Mäusen höher ist als in den transgenen Linien und damit auch eine erhöhte Adduktbildung in der Lunge folgt. Diese Hypothese kann durch die nicht detektierten PhIP-DNA-Addukte in der Leber der Wildtyp-Mäuse gestützt werden. Eine Verpaarung der transgenen *hSULT1A1*-Mäuse mit *knock out-mSult1d1*-Mäusen und die Wiederholung dieses Experimentes mit Blutserum-Analysen könnte Aufschluss darüber geben, welche Rolle der mSULT1D1 und der hSULT1A1 in den humanisierten Mäusen für die systemische Verteilung des hydroxylierten PhIP in extrahepatischen Gewebe zukommt.

In dieser Arbeit wurde sich auf die Analyse der DNA-Addukte nach Sulfokonjugation beschränkt. Das gebildete *N*-Hydroxid kann aber auch durch *N*-Acetyltransferasen (NAT) zu Acetatestern umgesetzt werden, welche heterolytisch in Acetat und ein Nitreniumion zerfallen. Zahlreiche Untersuchungen wurden durchgeführt, um herauszufinden, welche Konjugationsreaktion in erster Linie beim Menschen eine Rolle spielt. Ein direkter Nachweis des reaktiven *N*-Sulfoxy-PhIP gelang bislang nicht, vermutlich wegen der extrem kurzen Halbwertszeit der reaktiven Verbindung. In Ames-Tests konnte allerdings gezeigt werden, dass nach

Zugabe von PAPS (Kofaktor der SULT) zu mit Cytosol angereicherten Mikrosomenpräparationen aus Mäuselebern, ein Anstieg der Mutagenität von PhIP gemessen werden konnte, im Gegensatz zur Zugabe von Acetyl-CoA (Kofaktor NAT) (Buonarati *et al.* 1990). Die Expression der humanen Enzyme NAT1, NAT2 und SULT1A1 in *Salmonella*-Stämmen und deren Verwendung in Ames-Tests brachte den Nachweis, dass *N*-Hydroxy-PhIP nicht durch die humane NAT, sondern durch die humane SULT1A1 zu einem Mutagen umgesetzt wird (Muckel *et al.* 2002). Demnach scheint beim Menschen in erster Linie die SULT-vermittelte Umsetzung von *N*-OH-PhIP der Metabolismusweg zu sein, der aus PhIP das ultimale Mutagen generiert. *In vitro*-Tests zeigten zudem Speziesunterschiede in der Sulfonierung des *N*-OH-PhIP. Während die humane SULT1A1 die hydroxylierte Verbindung zu einem Mutagen aktiviert, konnte für die murine SULT1A1 dieser Nachweis nicht erbracht werden. In geringerem Umfang als beim Menschen wurde *N*-OH-PhIP durch die mSULT1D1 aktiviert (unveröffentlichte Daten ETOX).

Die Extrapolation der Daten aus Tierversuchen auf den Menschen ist oft mit Fragen verbunden. Es könnte die Frage aufkommen, ob die detektierten DNA-Addukte in den Tieren aufgrund einer applizierten Hochdosis gebildet worden sind und damit nicht geklärt ist, ob PhIP in ernährungsrelevanten Konzentrationen überhaupt DNA-Addukte verursacht. Die Mehrzahl der Studien wurde mit oralen Dosen zwischen 23 und 135 mg PhIP/kg KM durchgeführt. In dieser Arbeit wurden 90 mg PhIP/kg KM oral appliziert. Vergleicht man dies mit der geschätzten täglichen Aufnahme von etwa 1 µg PhIP durch Menschen mit westlicher Diät (für einen Menschen mit 70 kg entsprechend 14 ng/kg KM), sind die im Tierversuch verwendeten Dosen bis zu 1×10^7 fach höher, wodurch Rückschlüsse auf die humane Situation erschwert werden. Dennoch stellt die DNA-Adduktbildung keinen Hochdosiseffekt dar. In Versuchen konnten nach Applikation einer niedrigen Dosis von 1012,5 ng [^3H]PhIP/kg KM in männlichen Ratten 9-14 Addukte pro 10^{12} Nukleotide nachgewiesen werden (Dingley *et al.* 1998). Der genotoxische Nachweis nach ernährungsgrelevanter PhIP-Exposition im Menschen wurde zum Beispiel durch die Detektion von PhIP-DNA-Addukten in Colon, Mamma und Lymphocyten in humanen Biopsieproben erbracht (Dingley *et al.* 1999; Lightfoot *et al.* 2000).

Bei der Tumorentstehung werden den miRNAs eine wesentliche Rolle zugeschrieben. Frühzeitige Änderungen im Expressionsgehalt der miRNAs haben biologische Konsequenzen. So wurde die Reduktion der miRNA-126 mit einer erhöhten CYP2A3-Expression assoziiert, was sich in einer erhöhten Lungentumorenbildung in Ratten manifestierte (Kalscheuer *et al.* 2008). Möglicherweise könnte die DNA-Adduktbildung bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren ebenfalls durch unterschiedliche miRNA-Gehalte und damit veränderte hSULT1A1-Proteinmengen beeinflusst worden sein. Mittels miRNA-Chip-Analysen und weiteren Versuchen mit PhIP könnte dieser Aspekt untersucht werden.

Das in dieser Arbeit durchgeführte Fütterungsexperiment mit 90 mg PhIP/kg KM an FVB/N-Mäusen zeigte Unterschiede in der PhIP-DNA-Adduktbildung zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen auf. Demnach ist die humane SULT1A1 in der Lage, PhIP *in vivo* zu einem ultimalen Kanzerogen zu metabolisieren. Dabei ist die Enzymmenge ausschlaggebend für die Anzahl gebildeter DNA-Addukte. Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass *in vivo* ein höherer hSULT1A1-Proteingehalt zu einem größeren gentoxischen Schaden führt. Auch beim Menschen sind Unterschiede im Proteingehalt bei gleicher Kopienzahl bekannt. Folglich ließe sich ein erhöhtes Risiko für die DNA-Adduktbildung nach PhIP-Exposition bei Personen mit einem höheren hSULT1A1-Proteingehalt ableiten.

5. Zusammenfassung

Die Sulfokonjugation erleichtert die Ausscheidung vieler Fremdstoffe, kann jedoch auch zur Bildung elektrophil reaktiver Metabolite beitragen. In Mutagenitätstests wurde eine Vielzahl von Verbindungen durch Sulfotransferasen (SULT) aktiviert. In der Aktivierung der Substanzen zeigten sich Unterschiede in der Substratspezifität zwischen orthologen SULT-Formen verschiedener Spezies. Auch in der Gewebeverteilung der SULT liegen Interspezies-Unterschiede vor. Bei Nagern ist die Leber das Organ mit der höchsten SULT-Expression, wohingegen beim Menschen auch in vielen extrahepatischen Geweben mehrere SULT-Formen exprimiert werden. Folglich könnten sich die Zielgewebe einer SULT-induzierten Krebsentstehung bei Mensch und Nager unterscheiden.

Eine besondere Rolle im Fremdstoffmetabolismus hat die SULT1A1 beim Menschen aufgrund der hohen Expression und breiten Gewebeverteilung. Während die humane SULT1A1 in sehr vielen Geweben exprimiert wird, wurde die murine SULT1A1 vor allem in der Leber, Lunge und Colon gefunden. Neben der Gewebeverteilung spielt auch der Polymorphismus im humanen *SULT1A1*-Gen eine bedeutende Rolle. Der häufigste Polymorphismus in diesem Gen führt zu einer Aminosäuresubstitution von Arginin zu Histidin an Position 213. Die Genvariante mit Histidin (auch als *SULT1A1*2* bezeichnet) codiert für ein Protein mit einer geringen Thermostabilität, einer geringen Enzymaktivität und einer reduzierten Enzymmenge in Thrombocyten. Über den Einfluss dieser allelischen Varianten in anderen Geweben ist bislang wenig bekannt. In vorausgegangenen epidemiologischen Studien wurden mögliche Korrelationen zwischen den Genvarianten und der Krebsentstehung in verschiedenen Geweben untersucht. Diese Daten liefern jedoch widersprüchliche Ergebnisse zum Krebsrisiko. Aufgrund der strittigen epidemiologischen Daten sollten Tiermodelle generiert werden, um die häufigsten *SULT1A1*-Allele hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Nahrungs- und Umweltkanzerogenen zu untersuchen.

Transgene Mauslinien wurden in Anlehnung an in dieser Abteilung bereits etablierte transgene Mäuse erzeugt. Dabei wurden mittels Mikroinjektion mit dem codierenden Genbereich große flankierende Humansequenzen stromaufwärts und stromabwärts in das Mausgenom integriert. Damit sollte eine der Humansituation

entsprechende Gewebeverteilung der Expression erreicht und der Einfluss der umgebenden Genomsequenz der Maus auf die Expression des Transgens vermindert werden. Es wurden mehrere Mauslinien hergestellt. Zwei davon, die Mauslinie 31 mit dem *SULT1A1*1*-Allel und die Mauslinie 28 mit dem *SULT1A1*2*-Allel, wurden eingehend analysiert. In beiden Linien wurde eine identische Kopienzahl des Transgens ermittelt. Proteinbiochemische Charakterisierungen zeigten eine weitgehend dem Menschen entsprechende Gewebeverteilung und zelluläre und subzelluläre Lokalisation der humanen SULT1A1 in der Linie 28. In der Mauslinie 31 wurden Unterschiede zu Linie 28 sowohl in der Gewebeverteilung als auch in der zellulären Lokalisation des exprimierten humanen Proteins ermittelt. Dabei war die Expression auf Proteinebene in der *SULT1A1*2*-transgenen Linie generell stärker als in der *SULT1A1*1*-Linie. Dieses Ergebnis war überraschend, denn in humanen Thrombocyten führt das *SULT1A1*1*-Allel zu einem höheren Gehalt an SULT1A1-Protein als das *SULT1A1*2*-Allel. Zur Analyse der unterschiedlichen Proteinexpressionen in den transgenen Mauslinien wurde die cDNA und der 5'-flankierende Bereich des *SULT1A1*-Gens sequenziert. In beiden transgenen Linien entsprach die Sequenz der cDNA der Referenzsequenz aus der Gendatenbank (Pubmed). In der 5'-flankierenden Region wurden bekannte Polymorphismen analysiert und unterschiedliche Haplotypen in den transgenen Linien an den Positionen -624 und -396 ermittelt. Dabei wurde in der Linie 31 der (-624, -396)CG-Haplotyp und in der Linie 28 der (-624, -396)GA-Haplotyp detektiert. In Literaturangaben ist der (-624, -396)CG-Haplotyp mit einer höheren SULT1A1-Enzymaktivität assoziiert. Der mögliche Zusammenhang zwischen Transkriptionsrate und Proteinexpression wurde in RNA-Expressionsanalysen im codierenden und 5'-nicht codierenden Bereich (mit den alternativen Exons 1B und 1A) untersucht. Im codierenden Bereich und im Exon 1B konnte in den untersuchten Organen eine höhere RNA-Expression in der Linie 28 im Vergleich zur Linie 31 ermittelt werden. Außer in der Lunge wurde für Exon 1B eine identische RNA-Expression detektiert. RNA, die Exon 1A enthielt, wurde in allen untersuchten Organen der Linie 28, aber nur in der Lunge bei der Linie 31 gefunden. In beiden transgenen Linien konnten mit den Exon 1A-Primern jedoch auch größere PCR-Produkte ermittelt werden. Dieser Unterschied im Exon 1A und mögliche Spleißvarianten könnten damit für die unterschiedliche Proteinexpression des humanen SULT1A1-Proteins in den

beiden transgenen Mauslinien sein. Zur Aufklärung der ermittelten Unterschiede wären Sequenzanalysen im 5'-nicht codierenden Bereich denkbar. Ob diese Unterschiede in den transgenen Mäusen auf die Modelle beschränkt sind oder auch beim Menschen auftreten, ist noch nicht geklärt. Zum einen ist in vielen humanen Geweben die Proteinexpression nicht bekannt. Zum anderen könnte durch den Einfluss der miRNA die posttranskriptionale Genexpression verschieden reguliert sein. miRNA-Chip-Analysen könnten diesen Punkt möglicherweise beantworten.

Die in dieser Arbeit generierten und charakterisierten transgenen Mausmodelle wurden in einer toxikologischen Untersuchung eingesetzt. Es wurde das heterozyklische aromatische Amin 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridin (PhIP) verwendet. PhIP wird beim Erhitzen und Braten von Fleisch und Fisch gebildet und könnte mit der erhöhten Krebsentstehung im Colon in der westlichen Welt im Zusammenhang stehen. Mittels ³²P-Postlabelling sollte der Einfluss der zusätzlichen Expression der humanen SULT-Proteine auf die PhIP-DNA-Adduktbildung analysiert werden. Dabei wurden mehr DNA-Addukte in den transgenen Tieren als in den Wildtyp-Mäusen ermittelt. Die Konzentration der gebildeten DNA-Addukte korrelierte mit der Expressionsstärke des humanen SULT1A1-Proteins in den transgenen Mäusen.

An den in dieser Arbeit generierten transgenen Mauslinien mit den häufigsten allelischen Varianten des *SULT1A1*-Gens konnten Unterschiede auf RNA- und Protein-Ebene ermittelt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression der humanen SULT1A1 eine Auswirkung sowohl auf die Stärke als auch das Zielgewebe der DNA-Adduktbildung *in vivo* hat.

6. Summary

Sulfo conjugation often facilitates the excretion of various xenobiotics. Yet, sulfation additionally bears a high risk for the formation of reactive metabolites. In standard *in vitro* test systems, cytosolic sulfotransferases (SULT) can activate a large amount of compounds to mutagens, whereas *in vivo*, orthologous forms of SULT show a pronounced substrate specificity. In addition, tissue-specific distribution of SULT can vary among the species. For instance, in rodents, the liver is the organ with highest SULT expression whereas in humans SULT is expressed in many extrahepatic tissues as well. It can be therefore expected that the target tissues of SULT-induced carcinogenesis differ across species accordingly.

In humans, SULT1A1 and its polymorphic variants play an important role in xenobiotic metabolism and display a broad tissue distribution and high expression level. This enzyme is expressed in almost every human organ whereas in mice SULT1A1 can only be detected in liver, lung and colon. The most common polymorphism of this gene leads to an amino acid substitution from arginine to histidine at the position 213. In platelets, the allele encoding histidine (also designated as *SULT1A1*2*) is associated with both low activity and low thermal stability of the SULT protein. However, so far only little is known about the significance of these allelic variants in the other tissues with hSULT1A1 expression. Previous epidemiological studies have made attempts to correlate SULT1A1 allelic variants and cancer development, their data, however, have been contradictory for an appropriate cancer risk assessment. In this thesis, we addressed the effect of the *hSULT1A1* genetic variability on the susceptibility to nutritional and environmental carcinogens using transgenic mouse models.

We generated transgenic mice carrying the most common allelic variants of the human *SULT1A1* gene using well established protocols and methods of the toxicology department. The coding region and large flanking human sequences upstream and downstream of the *hSULT1A1* gene were integrated randomly into the mouse genome by microinjection. The co-transferred flanking regions should enable a tissue distribution and protein expression as in humans, as well as minimize the impact of the neighboring murine genome on the transgene. Several transgenic mouse lines were generated. Two of them, line 31 with the *SULT1A1*1*

allele and line 28 with the *SULT1A1*2* allele, were analysed in detail. At first, an identical transgene copy number was detected in both lines. Furthermore, biochemical characterization of transgenic line 28 showed that the tissue distribution, the cellular and subcellular localisation of the protein were very similar to those in humans. In contrast, transgenic line 31 exhibited differences in tissue distribution and cellular localisation of the human protein compared to line 28. The protein expression level in the transgenic line with *SULT1A1*2* (line 28) was generally higher than in *SULT1A1*1* (line 31) mice. Moreover, enzyme activity assays with a hSULT1A1 typical substrate revealed by trend a higher protein activity in *SULT1A1*2* than in *SULT1A1*1* mice. These results were surprising since the *SULT1A1*1* allele in human platelets usually leads to a higher amount of SULT1A1 protein and a higher enzyme activity compared to the *SULT1A1*2* allele. To investigate these differences, we sequenced the cDNA and 5'-flanking region of the *SULT1A1* gene. In both transgenic mouse lines, the cDNA sequence was identical to the reference sequence from the gene databank (Pubmed). We subsequently analysed the common polymorphisms of the 5'-flanking region, and determined different haplotypes at position -624 and -396: in line 31 the (-624, -396)CG haplotype and in line 28 the (-624, -396)GA haplotype were detected. According to the literature, the (-624, -396)CG haplotype is associated with a higher SULT1A1 enzyme activity. We analyzed the possible correlation between gene transcription and protein expression by measuring RNA expression levels of the coding and the non-coding region (with alternative exons 1B and 1A). We detected a higher RNA expression level of the coding region and exon 1B in line 28 compared to line 31, whereas RNA for exon 1A was only found in line 28 in all investigated tissues, but only in lung in line 31. Furthermore we detected with exon 1A-primers larger RNA in both lines. These differences in exon 1A expression accompanied by potential splicing variants could be responsible for the different expression and activity of the human SULT1A1 protein in both transgenic mouse lines. However, additional sequencing analysis of the 5'-non coding region is required to gain more insight into mechanisms that could explain the detected differences. It remains further unclear whether the differences detected in the transgenic mouse lines would have a significant impact on the human organism. On the one hand hSULT1A1 protein expression has not yet been determined for numerous human tissues. On the other hand the impact of miRNA in

posttranscriptional regulation of *SULT1A1* expression has also not been analyzed and could allow additional modulation. The latter could be investigated in more detail in the future using miRNA chip analysis.

In order to validate our generated and characterized transgenic mouse models as toxicological *in vivo* models, we used them for the evaluation of the heterocyclic aromatic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine (PhIP). PhIP is typically generated during heating and roasting of meat and fish and is suggested to be associated with an increased colon cancer incidence in the western world. We measured the impact of the additionally expressed human *SULT* proteins on the PhIP-DNA adduct level by ³²P-postlabelling. We detected significantly higher DNA adduct levels in transgenic compared to wildtype mice, which correlated positively with the expression pattern of the human *SULT1A1* protein in the transgenic mice.

In conclusion, in this thesis, we have successfully generated and validated the transgenic mouse lines carrying the most common allelic variants of the human *SULT1A1* gene. Interestingly, these lines exhibited differences in both the *SULT1A1* RNA and protein levels. Using these transgenic mouse models as *in vivo* toxicological tools we have shown that the expression of human *SULT1A1* in mice has a decisive impact on the strength and the target tissue of DNA adducts.

7. Literaturverzeichnis

Alnouti, Y. and Klaassen, C. D. (2006). "Tissue distribution and ontogeny of sulfotransferase enzymes in mice." *Toxicol Sci* **93**(2): 242-55.

Anderson, R. J., Babbitt, L. L. and Liebentritt, D. K. (1995). "Human liver triiodothyronine sulfotransferase: copurification with phenol sulfotransferases." *Thyroid* **5**(1): 61-6.

Bamber, D. E., Fryer, A. A., Strange, R. C., Elder, J. B., Deakin, M., Rajagopal, R., Fawole, A., Gilissen, R. A., Campbell, F. C. and Coughtrie, M. W. (2001). "Phenol sulphotransferase SULT1A1*1 genotype is associated with reduced risk of colorectal cancer." *Pharmacogenetics* **11**(8): 679-85.

Barnes, W. M. (1994). "PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(6): 2216-20.

Bishop, J. O. and Smith, P. (1989). "Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA." *Mol Biol Med* **6**(4): 283-98.

Blanchard, R. L., Freimuth, R. R., Buck, J., Weinshilboum, R. M. and Coughtrie, M. W. (2004). "A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily." *Pharmacogenetics* **14**(3): 199-211.

Bowman, K. G. and Bertozzi, C. R. (1999). "Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication." *Chem Biol* **6**(1): R9-R22.

Buonarati, M. H. and Felton, J. S. (1990). "Activation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) to mutagenic metabolites." *Carcinogenesis* **11**(7): 1133-8.

Butler, L. M., Sinha, R., Millikan, R. C., Martin, C. F., Newman, B., Gammon, M. D., Ammerman, A. S. and Sandler, R. S. (2003). "Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study." *Am J Epidemiol* **157**(5): 434-45.

Carlini, E. J., Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Jin, F., Zheng, W., Rebbeck, T. R. and Weinshilboum, R. M. (2001). "Sulfation pharmacogenetics: SULT1A1 and SULT1A2 allele frequencies in Caucasian, Chinese and African-American subjects." *Pharmacogenetics* **11**(1): 57-68.

Chen, S., Beaton, D., Nguyen, N., Senekeo-Effenberger, K., Brace-Sinnokrak, E., Argikar, U., Rimmel, R. P., Trottier, J., Barbier, O., Ritter, J. K. and Tukey, R. H. (2005). "Tissue-specific, inducible, and hormonal control of the human UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) locus." *J Biol Chem* **280**(45): 37547-57.

Chen, C., Ma, X., Malfatti, M. A., Krausz, K. W., Kimura, S., Felton, J. S., Idle, J. R. and Gonzalez, F. J. (2007). "A comprehensive investigation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) metabolism in the mouse using a multivariate data analysis approach." *Chem Res Toxicol* **20**(3): 531-42.

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M. and Higuchi, R. (1994). "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12): 5695-9.

Choudhary, D., Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M. and Schenkman, J. B. (2005). "Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues." *Arch Biochem Biophys* **436**(1): 50-61.

Coles, B., Nowell, S. A., MacLeod, S. L., Sweeney, C., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F. (2001). "The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk." *Mutat Res* **482** (1-2): 3-10.

Coughtrie, M. W., Sharp, S., Maxwell, K. and Innes, N. P. (1998). "Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 3-27.

Coughtrie, M. W., Gilissen, R. A., Shek, B., Strange, R. C., Fryer, A. A., Jones, P. W. and Bamber, D. E. (1999). "Phenol sulphotransferase SULT1A1 polymorphism: molecular diagnosis and allele frequencies in Caucasian and African populations." *Biochem J* **337** (Pt 1): 45-9.

Court, M. H., Duan, S. X., von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., Patten, C. J., Miners, J. O. and Mackenzie, P. I. (2001). "Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(3): 998-1006.

Crofts, F. G., Strickland, P. T., Hayes, C. L. and Sutter, T. R. (1997). "Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by human cytochrome P4501B1." *Carcinogenesis* **18**(9): 1793-8.

Crofts, F. G., Sutter, T. R. and Strickland, P. T. (1998). "Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1." *Carcinogenesis* **19**(11): 1969-73.

Dey, A., Jones, J. E. and Nebert, D. W. (1999). "Tissue- and cell type-specific expression of cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 1A2 mRNA in the mouse localized in situ hybridization." *Biochem Pharmacol* **58**(3): 525-37.

- Dingley, K. H., Roberts, M. L., Velsko, C. A. and Turteltaub, K. W. (1998). "Attomole detection of ^3H in biological samples using accelerator mass spectrometry: application in low-dose, dual-isotope tracer studies in conjunction with ^{14}C accelerator mass spectrometry." *Chem Res Toxicol* **11**(10): 1217-22.
- Dingley, K. H., Curtis, K. D., Nowell, S., Felton, J. S., Lang, N. P. and Turteltaub, K. W. (1999). "DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**(6): 507-12.
- Dobbernack, G. (2008). Konstruktion und Charakterisierung transgener Mauslinien für humane Sulfotransferasen als Modellsysteme für eine SULT-vermittelte metabolische Aktivierung, Promotionsarbeit, Universität Potsdam.
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S. and Smithies, O. (1987). "Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells." *Nature* **330**(6148): 576-8.
- Dooley, T. P., Mitchison, H. M., Munroe, P. B., Probst, P., Neal, M., Siciliano, M. J., Deng, Z., Doggett, N. A., Callen, D. F., Gardiner, R. M. and et al. (1994). "Mapping of two phenol sulphotransferase genes, STP and STM, to 16p: candidate genes for Batten disease." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(1): 482-9.
- Dooley, T. P. and Huang, Z. (1996). "Genomic organization and DNA sequences of two human phenol sulfotransferase genes (STP1 and STP2) on the short arm of chromosome 16." *Biochem Biophys Res Commun* **228**(1): 134-40.
- Dooley, T. P. (1998). "Cloning of the human phenol sulfotransferase gene family: three genes implicated in the metabolism of catecholamines, thyroid hormones and drugs." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 29-41.
- Duquette, M. and Laneuville, O. (2002). "Translational regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 mRNA in megakaryocytic MEG-01 cells. Specific protein binding to a conserved 20-nucleotide CIS element in the 3'-untranslated region." *J Biol Chem* **277**(47): 44631-7.
- Eckert, K. A. and Kunkel, T. A. (1991). "DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction." *PCR Methods Appl* **1**(1): 17-24.
- Edwards, R. J., Murray, B. P., Murray, S., Schulz, T., Neubert, D., Gant, T. W., Thorgeirsson, S. S., Boobis, A. R. and Davies, D. S. (1994). "Contribution of CYP1A1 and CYP1A2 to the activation of heterocyclic amines in monkeys and human." *Carcinogenesis* **15**(5): 829-36.
- Engelke, C. E., Meini, W., Boeing, H. and Glatt, H. (2000). "Association between functional genetic polymorphisms of human sulfotransferases 1A1 and 1A2." *Pharmacogenetics* **10**(2): 163-9.

Esumi, H., Ohgaki, H., Kohzen, E., Takayama, S. and Sugimura, T. (1989). "Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine." *Jpn J Cancer Res* **80**(12): 1176-8.

Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* **292**(5819): 154-6.

Falany, C. N. (1997). "Sulfation and sulfotransferases. Introduction: changing view of sulfation and the cytosolic sulfotransferases." *Faseb J* **11**(1): 1-2.

Falany, C. N., Vazquez, M. E., Heroux, J. A. and Roth, J. A. (1990). "Purification and characterization of human liver phenol-sulfating phenol sulfotransferase." *Arch Biochem Biophys* **278**(2): 312-8.

Falany, J. L. and Falany, C. N. (1997). "Regulation of estrogen activity by sulfation in human MCF-7 breast cancer cells." *Oncol Res* **9**(11-12): 589-96.

Falany, C. N., Xie, X., Wang, J., Ferrer, J. and Falany, J. L. (2000). "Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain." *Biochem J* **346 Pt 3**: 857-64.

Felton, J. S., Knize, M. G., Shen, N. H., Lewis, P. R., Andresen, B. D., Happe, J. and Hatch, F. T. (1986). "The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)." *Carcinogenesis* **7**(7): 1081-6.

Felton, J. S., Knize, M. G., Salmon, C. P., Malfatti, M. A. and Kulp, K. S. (2002). "Human exposure to heterocyclic amine food mutagens/carcinogens: relevance to breast cancer." *Environ Mol Mutagen* **39**(2-3): 112-8.

Freimuth, R. R., Wiepert, M., Chute, C. G., Wieben, E. D. and Weinshilboum, R. M. (2004). "Human cytosolic sulfotransferase database mining: identification of seven novel genes and pseudogenes." *Pharmacogenomics J* **4**(1): 54-65.

Friesen, M. D., Cummings, D. A., Garren, L., Butler, R., Bartsch, H. and Schut, H. A. (1996). "Validation in rats of two biomarkers of exposure to the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): PhIP-DNA adducts and urinary PhIP." *Carcinogenesis* **17**(1): 67-72.

Fujita, K., Nagata, K., Ozawa, S., Sasano, H. and Yamazoe, Y. (1997). "Molecular cloning and characterization of rat ST1B1 and human ST1B2 cDNAs, encoding thyroid hormone sulfotransferases." *J Biochem* **122**(5): 1052-61.

Glatt, H. (1997). "Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation." *Faseb J* **11**(5): 314-21.

Glatt, H. (2000). "Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics." *Chem Biol Interact* **129**(1-2): 141-70.

Glatt, H., Pauly, K., Piee-Staffa, A., Seidel, A., Hornhardt, S. and Czich, A. (1994). "Activation of promutagens by endogenous and heterologous sulfotransferases expressed in continuous cell cultures." *Toxicol Lett* **72**(1-3): 13-21.

Glatt, H., Bartsch, I., Christoph, S., Coughtrie, M. W., Falany, C. N., Hagen, M., Landsiedel, R., Pabel, U., Phillips, D. H., Seidel, A. and Yamazoe, Y. (1998). "Sulfotransferase-mediated activation of mutagens studied using heterologous expression systems." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 195-219.

Glatt, H., Engelke, C. E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A. L., Coughtrie, M. W., Andrae, U., Falany, C. N. and Meinel, W. (2000). "Sulfotransferases: genetics and role in toxicology." *Toxicol Lett* **112-113**: 341-8.

Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C. E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W. and Meinel, W. (2001). "Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects." *Mutat Res* **482**(1-2): 27-40.

Glatt, H., Meinel, W., Kuhlow, A., Ma L. (2003). "Metabolic formation, distribution, and toxicological effects of reactive sulfuric acid esters." *Nova Acta Leopoldina* **87**(329): 151-161.

Glatt, H. and Meinel, W. (2004). "Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs)." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**(1): 55-68.

Gupta, R. C. (1985). "Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen:DNA adducts." *Cancer Res* **45**(11 Pt 2): 5656-62.

He, D., Meloche, C. A., Dumas, N. A., Frost, A. R. and Falany, C. N. (2004). "Different subcellular localization of sulphotransferase 2B1b in human placenta and prostate." *Biochem J* **379**(Pt 3): 533-40.

He, D., Frost, A. R. and Falany, C. N. (2005). "Identification and immunohistochemical localization of sulfotransferase 2B1b (SULT2B1b) in human lung." *Biochim Biophys Acta* **1724**(1-2): 119-26.

He, D. and Falany, C. N. (2006). "Characterization of proline-serine-rich carboxyl terminus in human sulfotransferase 2B1b: immunogenicity, subcellular localization, kinetic properties, and phosphorylation." *Drug Metab Dispos* **34**(10): 1749-55.

He, Y. H., Friesen, M. D., Ruch, R. J. and Schüt, H. A. (2000). "Indole-3-carbinol as a chemopreventive agent in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) carcinogenesis: inhibition of PhIP-DNA adduct formation, acceleration of PhIP metabolism, and induction of cytochrome P450 in female F344 rats." *Food Chem Toxicol* **38**(1): 15-23.

- Hebbring, S. J., Adjei, A. A., Baer, J. L., Jenkins, G. D., Zhang, J., Cunningham, J. M., Schaid, D. J., Weinshilboum, R. M. and Thibodeau, S. N. (2007). "Human SULT1A1 gene: copy number differences and functional implications." *Hum Mol Genet* **16**(5): 463-70.
- Heflich, R. H. and Neft, R. E. (1994). "Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some of their metabolites and model metabolites." *Mutat Res* **318**(2): 73-114.
- Hempel, N., Wang, H., LeCluyse, E. L., McManus, M. E. and Negishi, M. (2004). "The human sulfotransferase SULT1A1 gene is regulated in a synergistic manner by Sp1 and GA binding protein." *Mol Pharmacol* **66**(6): 1690-701.
- Hempel, N., Negishi, M. and McManus, M. E. (2005). "Human SULT1A genes: cloning and activity assays of the SULT1A promoters." *Methods Enzymol* **400**: 147-65.
- Henderson, C. J., Wolf, C. R., Kitteringham, N., Powell, H., Otto, D. and Park, B. K. (2000). "Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12741-5.
- Her, C., Kaur, G. P., Athwal, R. S. and Weinshilboum, R. M. (1997). "Human sulfotransferase SULT1C1: cDNA cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization." *Genomics* **41**(3): 467-70.
- Her, C., Wood, T. C., Eichler, E. E., Mohrenweiser, H. W., Ramagli, L. S., Siciliano, M. J. and Weinshilboum, R. M. (1998). "Human hydroxysteroid sulfotransferase SULT2B1: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene." *Genomics* **53**(3): 284-95.
- Hildebrandt, M. A., Salavaggione, O. E., Martin, Y. N., Flynn, H. C., Jalal, S., Wieben, E. D. and Weinshilboum, R. M. (2004). "Human SULT1A3 pharmacogenetics: gene duplication and functional genomic studies." *Biochem Biophys Res Commun* **321**(4): 870-8.
- Hogan B., C. F., Lacy E. (1986). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual., *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Hollnagel, H. M. (2004). 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin: Bioaktivierung und DNA-Adduktbildung in V79-Zelllinien und verschiedenen Rattengeweben, Promotionsarbeit, Universität Potsdam.
- Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S. and Sugimura, T. (1991). "A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)." *Carcinogenesis* **12**(8): 1503-6.

Jones, A. L., Roberts, R. C. and Coughtrie, M. W. (1993). "The human phenolsulphotransferase polymorphism is determined by the level of expression of the enzyme protein." *Biochem J* **296**(Pt 2): 287-90.

Kaderlik, K. R., Mulder, G. J., Shaddock, J. G., Casciano, D. A., Teitel, C. H. and Kadlubar, F. F. (1994a). "Effect of glutathione depletion and inhibition of glucuronidation and sulfation on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) metabolism, PhIP-DNA adduct formation and unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocytes." *Carcinogenesis* **15**(8): 1711-6.

Kaderlik, K. R., Minchin, R. F., Mulder, G. J., Ilett, K. F., Daugaard-Jenson, M., Teitel, C. H. and Kadlubar, F. F. (1994b). "Metabolic activation pathway for the formation of DNA adducts of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in rat extrahepatic tissues." *Carcinogenesis* **15**(8): 1703-9.

Kalscheuer, S., Zhang, X., Zeng, Y. and Upadhyaya, P. (2008). "Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone." *Carcinogenesis* **29**(12): 2394-9.

Kim, H. J., Cho, J. H. and Klaassen, C. D. (1995). "Depletion of hepatic 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) and sulfate in rats by xenobiotics that are sulfated." *J Pharmacol Exp Ther* **275**(2): 654-8.

Kotnis, A., Kannan, S., Sarin, R. and Mulherkar, R. (2008). "Case-control study and meta-analysis of SULT1A1 Arg213His polymorphism for gene, ethnicity and environment interaction for cancer risk." *Br J Cancer* **99**(8): 1340-7.

Kulp, K. S., Knize, M. G., Malfatti, M. A., Salmon, C. P. and Felton, J. S. (2000). "Identification of urine metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans." *Carcinogenesis* **21**(11): 2065-72.

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**(3-4): 203-9.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.

Layton, D. W., Bogen, K. T., Knize, M. G., Hatch, F. T., Johnson, V. M. and Felton, J. S. (1995). "Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research." *Carcinogenesis* **16**(1): 39-52.

Lee, S. S., Buters, J. T., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P. and Gonzalez, F. J. (1996). "Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen." *J Biol Chem* **271**(20): 12063-7.

Lightfoot, T. J., Coxhead, J. M., Cupid, B. C., Nicholson, S. and Garner, R. C. (2000). "Analysis of DNA adducts by accelerator mass spectrometry in human breast tissue after administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and benzo[*a*]pyrene." *Mutat Res* **472**(1-2): 119-27.

Lin, D., Meyer, D. J., Ketterer, B., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F. (1994). "Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis." *Cancer Res* **54**(18): 4920-6.

Lindros, K. O. (1997). "Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver." *Gen Pharmacol* **28**(2): 191-6.

Malfatti, M. A., Kulp, K. S., Knize, M. G., Davis, C., Massengill, J. P., Williams, S., Nowell, S., MacLeod, S., Dingley, K. H., Turteltaub, K. W., Lang, N. P. and Felton, J. S. (1999). "The identification of [2-¹⁴C]2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine metabolites in humans." *Carcinogenesis* **20**(4): 705-13.

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**(12): 7634-8.

Matzke, M. A. and Matzke, A. J. (1998). "Gene silencing in plants: relevance for genome evolution and the acquisition of genomic methylation patterns." *Novartis Found Symp* **214**: 168-80; discussion 181-6.

Meinl, W., Meerman, J. H. and Glatt, H. (2002). "Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*." *Pharmacogenetics* **12**(9): 677-89.

Meinl, W., Pabel, U., Osterloh-Quiroz, M., Hengstler, J. G. and Glatt, H. (2006). "Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue." *Int J Cancer* **118**(5): 1090-7.

Miller, J. A., Surh, Y.-J. (1994). Sulfonation in chemical carcinogenesis. Handbook in Pharmacology. F. C. Kauffmann, *Springer Berlin*. **112**: 429-458.

Montoliu, L., Schedl, A., Kelsey, G., Zentgraf, H., Lichter, P. and Schutz, G. (1994). "Germ line transmission of yeast artificial chromosomes in transgenic mice." *Reprod Fertil Dev* **6**(5): 577-84.

Muckel, E., Frandsen, H. and Glatt, H. R. (2002). "Heterologous expression of human N-acetyltransferases 1 and 2 and sulfotransferase 1A1 in *Salmonella typhimurium* for mutagenicity testing of heterocyclic amines." *Food Chem Toxicol* **40**(8): 1063-8.

Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. and Sugimura, T. (1977). "Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat." *Cancer Lett* **2**(4-5): 221-6.

Nagar, S., Walther, S. and Blanchard, R. L. (2006). "Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphic variants *1, *2, and *3 are associated with altered enzymatic activity, cellular phenotype, and protein degradation." *Mol Pharmacol* **69**(6): 2084-92.

Ning, B., Nowell, S., Sweeney, C., Ambrosone, C. B., Williams, S., Miao, X., Liang, G., Lin, D., Stone, A., Ratnasinghe, D. L., Manjanatha, M., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F. (2005). "Common genetic polymorphisms in the 5'-flanking region of the SULT1A1 gene: haplotypes and their association with platelet enzymatic activity." *Pharmacogenet Genomics* **15**(7): 465-73.

Ochiai, M., Imai, H., Sugimura, T., Nagao, M. and Nakagama, H. (2002). "Induction of intestinal tumors and lymphomas in C57BL/6N mice by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine." *Jpn J Cancer Res* **93**(5): 478-83.

Operana, T. N., Nguyen, N., Chen, S., Beaton, D. and Tukey, R. H. (2007). "Human CYP1A1GFP expression in transgenic mice serves as a biomarker for environmental toxicant exposure." *Toxicol Sci* **95**(1): 98-107.

Ouyang, Y., Lane, W. S. and Moore, K. L. (1998). "Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 2896-901.

Ozawa, S., Tang, Y. M., Yamazoe, Y., Kato, R., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F. (1998). "Genetic polymorphisms in human liver phenol sulfotransferases involved in the bioactivation of *N*-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines and heterocyclic amines." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 237-48.

Palmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C. and Evans, R. M. (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." *Nature* **300**(5893): 611-5.

Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Lee, S. S., McPhail, T., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J. (1995). "Neonatal lethality associated with respiratory distress in mice lacking cytochrome P450 1A2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 5134-8.

Price, R. A., Spielman, R. S., Lucena, A. L., Van Loon, J. A., Maidak, B. L. and Weinshilboum, R. M. (1989). "Genetic polymorphism for human platelet thermostable phenol sulfotransferase (TS PST) activity." *Genetics* **122**(4): 905-14.

Raftogianis, R. (2001). "Human sulfotransferases and cellular response to estrogens and antiestrogens." *Drug Metab Rev* **33**(10).

- Raftogianis, R. B., Her, C. and Weinshilboum, R. M. (1996). "Human phenol sulfotransferase pharmacogenetics: STP1 gene cloning and structural characterization." *Pharmacogenetics* **6**(6): 473-87.
- Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Otterness, D. M., Van Loon, J. A. and Weinshilboum, R. M. (1997). "Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype." *Biochem Biophys Res Commun* **239**(1): 298-304.
- Raftogianis, R. B., Wood, T. C. and Weinshilboum, R. M. (1999). "Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations." *Biochem Pharmacol* **58**(4): 605-16.
- Riches, Z., Stanley, E. L., Bloomer, J. C. and Coughtrie, M. W. (2009). "Quantitative Evaluation of the Expression and Activity of Five Major Sulfotransferases in Human Tissues - the Sult "Pie"." *Drug Metab Dispos*.
- Robertson, G. R., Field, J., Goodwin, B., Bierach, S., Tran, M., Lehnert, A. and Liddle, C. (2003). "Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation." *Mol Pharmacol* **64**(1): 42-50.
- Sakakibara, Y., Yanagisawa, K., Katafuchi, J., Ringer, D. P., Takami, Y., Nakayama, T., Suiko, M. and Liu, M. C. (1998). "Molecular cloning, expression, and characterization of novel human SULT1C sulfotransferases that catalyze the sulfonation of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene." *J Biol Chem* **273**(51): 33929-35.
- Salman, E. D., Kadlubar, S. A. and Falany, C. N. (2009). "Expression and localization of cytosolic sulfotransferase (SULT) 1A1 and SULT1A3 in normal human brain." *Drug Metab Dispos* **37**(4): 706-9.
- Schade, N. (2008). Transgene Mäuse für humane SULT1A1/1A2: Expression der humanen Proteine und DNA-Adduktbildung durch das heterozyklische aromatische Amin PhIP in verschiedenen Geweben., Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- Schedl, A., Beermann, F., Thies, E., Montoliu, L., Kelsey, G. and Schutz, G. (1992). "Transgenic mice generated by pronuclear injection of a yeast artificial chromosome." *Nucleic Acids Res* **20**(12): 3073-7.
- Schedl, A., Larin, Z., Montoliu, L., Thies, E., Kelsey, G., Lehrach, H. and Schutz, G. (1993). "A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection." *Nucleic Acids Res* **21**(20): 4783-7.
- Schenkel, J. (1995). Transgene Tiere. Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag*.

Schut, H. A. and Yao, R. (2000). "Tea as a potential chemopreventive agent in PhIP carcinogenesis: effects of green tea and black tea on PhIP-DNA adduct formation in female F-344 rats." *Nutr Cancer* **36**(1): 52-8.

Schwartz, D. C. and Cantor, C. R. (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." *Cell* **37**(1): 67-75.

Sharp, S., Coughtrie, M. W. H., Forbes, K. J. and Hume, R. (1995). "Preparation and characterization of anti-peptide antibodies directed against human phenol and hydroxysteroid sulphotransferases." *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **34**(2): 89-95.

Shioya, M., Wakabayashi, K., Sato, S., Nagao, M. and Sugimura, T. (1987). "Formation of a mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]-pyridine (PhIP) in cooked beef, by heating a mixture containing creatinine, phenylalanine and glucose." *Mutat Res* **191**(3-4): 133-8.

Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T. and Ito, N. (1997). "The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) derived from cooked foods." *Cancer Res* **57**(2): 195-8.

Sinha, R., Chow, W. H., Kulldorff, M., Denobile, J., Butler, J., Garcia-Closas, M., Weil, R., Hoover, R. N. and Rothman, N. (1999). "Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas." *Cancer Res* **59**(17): 4320-4.

Sinha, R. and Rothman, N. (1999). "Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer." *Cancer Lett* **143**(2): 189-94.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.

Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. and Kucherlapati, R. S. (1985). "Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination." *Nature* **317**(6034): 230-4.

Sugimura, T., Nagao, M., Kawachi, T., Honda, M., Yahagi, T., Seino, Y., Sato, S., Matsukura, N., Matsushima, T., Shirai, T., Sawamura, M. and Matsumoto, K. (1977). Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. Origins of human cancer. H. H. Hiatt, *Cold Spring Harbor*: 1561-77.

Tamura, H., Miyawaki, A., Yoneshima, H., Mikoshiba, K. and Matsui, M. (1999). "Molecular cloning, expression and characterization of a phenol sulfotransferase cDNA from mouse intestine." *Biol Pharm Bull* **22**(3): 234-9.

Tateno, C., Yoshizane, Y., Saito, N., Kataoka, M., Utoh, R., Yamasaki, C., Tachibana, A., Soeno, Y., Asahina, K., Hino, H., Asahara, T., Yokoi, T., Furukawa, T. and Yoshizato, K. (2004). "Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs." *Am J Pathol* **165**(3): 901-12.

Teubner, W., Meini, W., Florian, S., Kretschmar, M. and Glatt, H. (2007). "Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract." *Biochem J* **404**(2): 207-15.

Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." *Cell* **51**(3): 503-12.

Tsao, C. C., Coulter, S. J., Chien, A., Luo, G., Clayton, N. P., Maronpot, R., Goldstein, J. A. and Zeldin, D. C. (2001). "Identification and localization of five CYP2Cs in murine extrahepatic tissues and their metabolism of arachidonic acid to regio- and stereoselective products." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(1): 39-47.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Taniya, T. and Yokoi, T. (2006). "MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1." *Cancer Res* **66**(18): 9090-8.

Turteltaub, K. W., Frantz, C. E., Creek, M. R., Vogel, J. S., Shen, N. and Fultz, E. (1993). "DNA adducts in model systems and humans." *J Cell Biochem Suppl* **17F**: 138-48.

Van Loon, J. and Weinshilboum, R. M. (1984). "Human platelet phenol sulfotransferase: familial variation in thermal stability of the TS form." *Biochem Genet* **22**(11-12): 997-1014.

Wallin, H., Mikalsen, A., Guengerich, F. P., Ingelman-Sundberg, M., Solberg, K. E., Rosslund, O. J. and Alexander, J. (1990). "Differential rates of metabolic activation and detoxication of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by different cytochrome P450 enzymes." *Carcinogenesis* **11**(3): 489-92.

Wang, J., Falany, J. L. and Falany, C. N. (1998). "Expression and characterization of a novel thyroid hormone-sulfating form of cytosolic sulfotransferase from human liver." *Mol Pharmacol* **53**(2): 274-82.

Weinshilboum, R. (1988). "Phenol sulfotransferase inheritance." *Cell Mol Neurobiol* **8**(1): 27-34.

Weinshilboum, R. (1990). "Sulfotransferase pharmacogenetics." *Pharmacol Ther* **45**(1): 93-107.

Weinshilboum, R. and Aksoy, I. (1994). "Sulfation pharmacogenetics in humans." *Chem Biol Interact* **92**(1-3): 233-46.

Weinshilboum, R. M., Otterness, D. M., Aksoy, I. A., Wood, T. C., Her, C. and Raftogianis, R. B. (1997). "Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes." *Faseb J* **11**(1): 3-14.

Widmark, e. M. P. (1939). "Presence of cancer-producing substances in roasted food." *Nature* **143**: 984.

Wilborn, T. W., Comer, K. A., Dooley, T. P., Reardon, I. M., Henrikson, R. L. and Falany, C. N. (1993). "Sequence analysis and expression of the cDNA for the phenol-sulfating form of human liver phenol sulfotransferase." *Mol Pharmacol* **43**(1): 70-7.

Windmill, K. F., Christiansen, A., Teusner, J. T., Bhasker, C. R., Birkett, D. J., Zhu, X. and McManus, M. E. (1998). "Localisation of aryl sulfotransferase expression in human tissues using hybridisation histochemistry and immunohistochemistry." *Chem Biol Interact* **109**(1-3): 341-6.

Yamazoe, Y., Nagata, K., Ozawa, S. and Kato, R. (1994). "Structural similarity and diversity of sulfotransferases." *Chem Biol Interact* **92**(1-3): 107-17.

Young, W. F., Jr., Okazaki, H., Laws, E. R., Jr. and Weinshilboum, R. M. (1984). "Human brain phenol sulfotransferase: biochemical properties and regional localization." *J Neurochem* **43**(3): 706-15.

Yu, A. M., Idle, J. R. and Gonzalez, F. J. (2004). "Polymorphic cytochrome P450 2D6: humanized mouse model and endogenous substrates." *Drug Metab Rev* **36**(2): 243-77.

Zheng, W., Xie, D., Cerhan, J. R., Sellers, T. A., Wen, W. and Folsom, A. R. (2001). "Sulfotransferase 1A1 polymorphism, endogenous estrogen exposure, well-done meat intake, and breast cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**(2): 89-94.

Zhu, X., Veronese, M. E., Bernard, C. C., Sansom, L. N. and McManus, M. E. (1993). "Identification of two human brain aryl sulfotransferase cDNAs." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(1): 120-7.

Zhu, X., Veronese, M. E., Sansom, L. N. and McManus, M. E. (1993). "Molecular characterisation of a human aryl sulfotransferase cDNA." *Biochem Biophys Res Commun* **192**(2): 671-6.

8. Abkürzungsverzeichnis

AG	- Arbeitsgruppe
AK	- Antikörper
APS	- Ammoniumpersulfat
Arg	- Arginin
Asn	- Asparagin
BAC	- Bacterial artificial chromosome
BCA	- bicinchoninic acid/ Bicinchoninsäure
BLAST	- Basic Local Alignment Search Tool
bp	- Basenpaare
BSA	- Bovines Serumalbumin
cDNA	- codierende DNA
Ci	- Curie
CPM	- Counts per minute
Ct	- Cycle treshold
CYP	- Cytochrom P450-Enzyme
Da	- Dalton
DAB	- Diamonobenzidin
DC	- Dünnschichtchromatographie
DEPC	- Diethylpyrocarbonat
DIfE	- Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	- double strand DNA/doppelsträngige DNA
DTT	- Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
Elf	- Transkriptionsfaktor zur ETS-Familie gehörend
ES	- Embryonale Stammzellen
ETOX	- Ernährungstoxikologie (Abteilung im DIfE)
ETS	- E26 transformations-spezifisch, Bezeichnung einer Familie von Transkriptionsfaktoren

FVB/N	- seit 1970 geführter Inzuchtstamm der Maus aus dem National Institute of Health mit dem Allel Fv-1 ^b für F riend v irus B -type Suszeptibilität
GABP	- GA binding protein, Transkriptionsfaktor zur ETS-Familie gehörend
GST	- Glutathion-S-Transferasen
HE-Färbung	- Hämatoxylin-Eosin-Färbung
His	- Histidin
HKG	- <i>House Keeping Gene</i> /Referenzgen
HPLC	- high performance liquid chromatography/ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	- horseradish peroxidase/Meerrettich-Peroxidase
HUGO	- Human Genome Organisation
kb	- Kilobasen
KCP-Puffer	- Kalium-Chlorid-Phosphat-Puffer
KM	- Körpermasse
Li	- Linie, Bezeichnung für transgene Mauslinie
megab	- Megabasen
MelQx	- 2-Amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinoxalin
MGI	- Mouse Genome Informatics
miRNA	- microRNA
M-MLV	- Moloney Murine Leukemia Virus/Moloney Maus-Leukämie-Virus
MPI	- Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin Dahlem
MW	- Mittelwert
NAT	- <i>N</i> -Acetyltransferasen
NCBI	- National Center for Biotechnology Information
PAC	- Bacteriophage P1-derived artificial chromosome
PAPS	- 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	- phosphate buffered saline/ phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	- Polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion
PEI	- Polyethylenimin
PFGE	- Pulsed-Field-gel electrophoresis/Pulsfeldgelelektrophorese
PhIP	- 2-Amino-1- methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin

Pubmed	- englischsprachige textbasierte Meta-Datenbank der nationalen medizinischen Bibliothek der USA
QPCR	- Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RACE	- rapid amplification of cDNA ends/schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden
RNA	- Ribonukleinsäure
RT	- Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
SDS-PAGE	- Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gelelectrophoresis / Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	- single nucleotide polymorphism/Einzelnukleotidaustausch
Sp1	- spezifischer Transkriptionsfaktor mit charakteristischer DNA-Bindungsdomäne
SPF	- Spezifiziert pathogenfrei
ssDNA	- single strand DNA/einzelsträngige DNA
STABW	- Standardabweichung
SULT	- cytosolische Sulfotransferasen
TE-Puffer	- Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TF	- Transkriptionsfaktor
tg bzw. TG	- Transgen
Thr	- Threonin
TLC	- Thinlayer chromatography/Dünnschichtchromatography
UGT	- Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
UTR	- untranslated region /nicht-translatierte Region
v/v	- volume per volume
V	- Volt
w/v	- weight per volume
wt bzw. WT	- Wildtyp (genetisch unveränderte Maus des Inzuchtstammes FVB/N)

9. Anhang

9.1 Anhang I

Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez, Berlin synthetisiert und sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Aufführung der verwendeten Primer zur Analyse der transgenen Mäuse der Linien 31 und 28.

Bezeichnung	Primername	Annealing-Temperatur	Primersequenz	Anwendung Primerpaare
PCR 1	1A1promF	59°C	5'-ATCATCCTGCCTGGTTAATG-3'	siehe Abschnitt 3.1.3
PCR 1	1A1promR		5'-AAAGCACCCCTCGTCGGGCAA-3'	
PCR 2	1A1poIF	56°C	5'-GCTCTGCAGGGTCTCTAGGA-3'	
PCR 2	HAST23R		5'-ACTCTCTCTAGAGTGACCCACAGGAGC-3'	
PCR 3	1A1/2In4F	68°C	5'-CCAATCCAAGAGATGAGCTGGCCTGGGGCA-3'	
PCR 3	1A2spez2R		5'-AGGGTTTCTCTTGGCTTGGAAATAGAGACTC-3'	

Bezeichnung	Primername	Annealing- Temperatur	Primersequenz	Anwendung Primerpaare	
PCR 4	AC_GW_9F	62°C	5'-AGTTGCTCAATGGGCTGTTTGTCC-3'	siehe Abschnitt 3.2.1	
PCR 4	1A2mut3R		5'-AAAGTACTTGATGAGCAGGACCCCTTCAC-3'		
PCR 5	AC_7,7kb_1A1_F	61°C	5'-AAGAGGCTGAGTCAGGAGAAATTGTGG-3'		
PCR 5	AC_GW_1R		5'-TCGGGCTGGCTGTTATTTATTGG-3'		
PCR 6	AC_10kb_1A1_F2	57°C	5'-GAGTCTCGCTTATCATCCTGGC-3'		
PCR 6	AC_10kb_1A1_R		5'-GCCACTGCACCTCCATTCTG-3'		
PCR 7	AC_30kb_1A1_F	62°C	5'-ATGGAGGTTATTCGTGCAGCC-3'		
PCR 7	AC_30kb_1A1_R		5'-AATGGCACAACTTTGGCTCACT-3'		
PCR 8	AC_0,5kb_SaII_F	58°C	5'-TTAATCAACTGCCAACCTCTCGCC-3'		
PCR 8	AC_0,5kb_SaII_R		5'-CATCTTATTGCCTCATTGCCCTGG-3'		
PCR 9	1A1In1F	66°C	5'-TAAGGGAACGGGCCCTGGCTC-3'		siehe Abschnitt 3.2.5
PCR 9	1A1Ex6R		5'-CACCACTCCTGCACGTGCTG-3'		
PCR 10	HASTNcoS	64°C	5'-GAGCTCAGGACCCATGGAGCTGATC-3'		
PCR 10	1A1Ex8R		5'-CATCTTCTCCGCATAGTCCGCATCG-3'		
PCR 11	1A1Ex5F	60°C	5'-TCCTGGAGAAGTTCATGGTC-3'		
PCR 11	HAST23R		5'-ACTCTCTCTAGAGTGACCCCGAGGAGC-3'		
PCR 12	HASTNcoS	60°C	5'-GAGCTCAGGACCCATGGAGCTGATC-3'		
PCR 12	HAST23R		5'-ACTCTCTCTAGAGTGACCCCGAGGAGC-3'		

Bezeichnung	Primernamenname	Annealing-Temperatur	Primersequenz	Anwendung Primerpaare
SNP1A1	1A1polIF	56°C	5'-GCTCTGCAGGGTCTCTAGGA-3'	siehe Abschnitt 3.1.4
SNP1A1	L21		5'-ACGGTGGTGTAGTTGGTCATA-3'	
SNP1A2	1A2F	56°C	5'-GCTCTATGGGTTTTGAAGTG-3'	
SNP1A2	1A2R		5'-CCTCATGAAGGGGGAGATGC-3'	
KopienzahI_F	RT_2F	58°C	5'-GACTACAGGCCCTCATCATCC- 3'	siehe Abschnitt 3.2.2
KopienzahI_R	RT_3R		5'-CCCATTGAGGAAGCTGCTGCTAC- 3'	
KopienzahI_Referenz_F	mhBGlob fwll	58°C	5'- AAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATC- 3'	
KopienzahI_Referenz_R	mhBGlob revll		5'- CCTTGAGGCTGTCCAAGTGATTACGGCCATC- 3'	
RNA_cds_F	1A1Ex7F	58°C	5'- CTACACCACCGTCCCCCAGGAGTTC- 3'	siehe Abschnitt 3.2.7
RNA_cds_R	HAST23R		5'- ACTCTCTCTAGAGTGACCCACCCAGGAGGC- 3'	
RNA_Referenz_F	m-beta-actin_F	58°C	5'- TCGTGCGTGACATCAAAGAGAAAGC- 3'	
RNA_Referenz_R	m-beta-actin_R		5'- ATGGATGCCACACAGGATTCATACC- 3'	
RNA_1A1Exon1B_F	1A1Ex1B_F	58°C	5'- GGAGGGCACGAGGCCAGGTTTC- 3'	
RNA_1A1Exon1B_R	1A1Ex3R		5'- AGCTCGGTGACACTTCTCCAGGTCA- 3'	
RNA_1A1Exon1A_F	1A1Ex1A_F2	64°C	5'- AGGGTGCTTTCACCTGGTCTGC- 3'	
RNA_1A1Exon1A_R	1A1Ex3R		5'- AGCTCGGTGACACTTCTCCAGGTCA- 3'	

9.2 Anhang II

Sequenzdaten

Sequenzdaten aus Analyse der cDNA transgener Mäuse mit dem *SULT1A1**1-Allel (Linie 31)

Die Farben kennzeichnen die Übereinstimmung der Sequenzen: blau markiert Übereinstimmung von 3 Sequenzen und gelb von 4 Sequenzen. X78283 ist die Referenz mit der *SULT1A1**1-cDNA-Sequenz (aus Pubmed).

X78283	(1)	1	ATG GAGCTGATCCAGGACACACC TCCCGGCC ---	100
1. Teil	(1)		ATG GAGCTGATCCAGGACACACC TCCCGGCC ---	
2. Teil	(1)		----- CCAT TCCC TCC GT	
3. Teil	(1)		-----	
X78283	(101)	101	CTTCCAGG CCGGCCTGATGACCTGCTCATCAGCACCTACCCCAAGTCGGC ACTACCT GGGTAAGCCAGAT TCTGG ACATGATCTACAGGGTGGT GAC	200
1. Teil	(101)		CTTCCAGG CCGGCCTGATGACCTGCTCATCAGCACCTACCCCAAGTCGGC ACTACCT GGGTAAGCCAGAT TCTGG ACATGATCTACAGGGTGGT GAC	
2. Teil	(84)		CTTCCAGG CCGGCCTGATGACCTGCTCATCAGCACCTACCCCAAGTCGGC ACTACCT GGGTAAGCCAGAT TCTGG ACATGATCTACAGGGTGGT GAC	
3. Teil	(1)		-----	
X78283	(201)	201	CTGGAGA AGTGTACCGAGTCCCATCTTCATGCGGGTGCCCTTCCCTTGAGTTCAAAGGCCCCAGGGAT TCCCTC AGGGATGGAGACT TGAA AGACACAC	300
1. Teil	(201)		CTGGAGA AGTGTACCGAGTCCCATCTTCATGCGGGTGCCCTTCCCTTGAGTTCAAAGGCCCCAGGGAT TCCCTC AGGGATGGAGACT TGAA AGACACAC	
2. Teil	(184)		CTGGAGA AGTGTACCGAGTCCCATCTTCATGCGGGTGCCCTTCCCTTGAGTTCAAAGGCCCCAGGGAT TCCCTC AGGGATGGAGACT TGAA AGACACAC	
3. Teil	(1)		-----	
X78283	(301)	301	CGGCCCC ACGACTCCCTGAAGACACACACCTGCCCCCTGGCTCTGCTCCCCAGACTCTGT TGGATCAGAA GGTCAAGGTGGTCTATGT TGCC CGCAACGGCAA	400
1. Teil	(301)		CGGCCCC ACGACTCCCTGAAGACACACACCTGCCCCCTGGCTCTGCTCCCCAGACTCTGT TGGATCAGAA GGTCAAGGTGGTCTATGT TGCC CGCAACGGCAA	
2. Teil	(284)		CGGCCCC ACGACTCCCTGAAGACACACACCTGCCCCCTGGCTCTGCTCCCCAGACTCTGT TGGATCAGAA GGTCAAGGTGGTCTATGT TGCC CGCAACGGCAA	
3. Teil	(1)		-----	
X78283	(401)	401	GGATGTG GCAGTTCCTACTACCACCTTCACCACATGGCCAAAGTGCCCTGAGCC TGGG ACCTGGACAGCTTCC TGG AGAAGTT CATGGT CGGAGAA	500
1. Teil	(401)		GGATGTG GCAGTTCCTACTACCACCTTCACCACATGGCCAAAGTGCCCTGAGCC TGGG ACCTGGACAGCTTCC TGG AGAAGTT CATGGT CGGAGAA	
2. Teil	(384)		GGATGTG GCAGTTCCTACTACCACCTTCACCACATGGCCAAAGTGCCCTGAGCC TGGG ACCTGGACAGCTTCC TGG AGAAGTT CATGGT CGGAGAA	
3. Teil	(1)		-----	

				501
X78283	(501)	GTG-TCCCTACCGGATCCCTGGTACCAGCACGTCGAGGAGTGGTGGGAGCTGAGCCCGCACCCCTGTTCTCTACCTCTTCTATGAAGACATGAAGGAGAAC		600
1. Teil	(501)	GGACTACCTGTGA-----		
2. Teil	(484)	GTG-TCCCTACCGGATCCCTGGTACCAGCACGTCGAGGAGTGGTGGGAGCTGAGCCCGCACCCCTGTTCTCTACCTCTTCTATGAAGACATGAAGGAGAAC		
3. Teil	(1)	-----TCCGGATCCCTGGTACCAGCACGTCGAGGAGTGGTGGGAGCTGAGCCCGCACCCCTGTTCTCTACCTCTTCTATGAAGACATGAAGGAGAAC		700
			638	
X78283	(601)	CCGAAAAGGGAGATTCAAAAAGATCCTGGAGTTTGTGGGGCGCTCCCTGCCAGAGGAGACCGTGGACTTCATGGTTCAGCACACGTCGTTCAAGGAGATGA		
1. Teil	(512)	-----		
2. Teil	(584)	CCGAAAAGGGAGATTCAAAAAGATCCTGGAGTTTGTGGGGCGCTCCCTGCCAGAGGAGACCGTGGACTTCATGGTTCAGCACACGTCGTTCAAGGAGATGA		
3. Teil	(94)	CCGAAAAGGGAGATTCAAAAAGATCCTGGAGTTTGTGGGGCGCTCCCTGCCAGAGGAGACCGTGGACTTCATGGTTCAGCACACGTCGTTCAAGGAGATGA		800
			701	
X78283	(701)	AGAAGAACCCTATGACCAACTACACCACCGTCCCGCCAGGAGTTCATGGACCACAGCATCTCCCGCTTCATGAGGAAAAGGCATGGCTGGGGACTGGAAAGAC		
1. Teil	(512)	-----		
2. Teil	(684)	AGAAGAACCCTATGACCAACTACACCACCGTCCCGCCAGGAGTTCATGGACCACAGCATCTCCCGCTTCATGAGGAAAAGGCATGGCTGGGGACTGGAAAGAC		
3. Teil	(194)	AGAAGAACCCTATGACCAACTACACCACCGTCCCGCCAGGAGTTCATGGACCACAGCATCTCCCGCTTCATGAGGAAAAGGCATGGCTGGGGACTGGAAAGAC		891
			801	
X78283	(801)	CACCTTCACCGTGGCGCAGAAATGAGCGCTTCGATGGGACTATGGGAGAAAGATGGCAGGCTGCAGCCTCAGCTTCCGCTCTGAGCTCTGA		
1. Teil	(512)	-----		
2. Teil	(784)	CACCTTCACCGTGGCGCAGAAATGAGCGCTTCGATGGGACTATGGGAGAAAGATGGCAGGCTGCAGCCTCAGCTTCCGCTCTGAGCTCTGA		
3. Teil	(294)	CACCTTCACCGTGGCGCAGAAATGAGCGCTTCGATGGGACTATGGGAGAAAGATGGCAGGCTGCAGCCTCAGCTTCCGCTCTGAGCTCTGA		

Sequenzdaten aus Analyse der cDNA transgenerer Mäuse mit dem *SULT1A1*2*-Allel (Linie 28)

Die Farben kennzeichnen die Übereinstimmung der Sequenzen: blau markiert Übereinstimmung von 2 Sequenzen, gelb von 3 Sequenzen. U09031 ist die Referenz mit der *SULT1A1*2*-cDNA-Sequenz (aus Pubmed).

U09031	(1)	1	ATG	100
1. Teil	(1)		ACTGGAGTACGTGAAGGGGTCCC	
2.+3. Teil	(1)	101	ACTGGAGTACGTGAAGGGGTCCC	
U09031	(101)		TCCAGGCCGGCCCTGATGACCTG	200
1. Teil	(101)		TCCAGGCCGGCCCTGATGACCTG	
2.+3. Teil	(69)		TCCAGGCCGGCCCTGATGACCTG	
U09031	(201)		GGAGAA	300
1. Teil	(201)		GGAGAA	
2.+3. Teil	(169)		GGAGAA	
U09031	(301)		GCCCCAGACTCCTGAAGACACA	400
1. Teil	(301)		GCCCCAGACTCCTGAAGACACA	
2.+3. Teil	(269)		GCCCCAGACTCCTGAAGACACA	
U09031	(401)		ATGTGGCAGTTTCCCTACTACC	500
1. Teil	(401)		ATGTGGCAGTTTCCCTACTACC	
2.+3. Teil	(369)		ATGTGGCAGTTTCCCTACTACC	
U09031	(501)		GTCCTACGGATCCTGGTACCAG	600
1. Teil	(499)		GTCCTACGGATCCTGGTACCAG	
2.+3. Teil	(469)		GTCCTACGGATCCTGGTACCAG	
U09031	(601)		AAAAGGGAGATTCAAAAGATC	700
1. Teil	(499)		AAAAGGGAGATTCAAAAGATC	
2.+3. Teil	(569)		AAAAGGGAGATTCAAAAGATC	
U09031	(701)		AGAACCCATAGACCAACTACA	800
1. Teil	(499)		AGAACCCATAGACCAACTACA	
2.+3. Teil	(669)		AGAACCCATAGACCAACTACA	
U09031	(801)		CTTCACCGTGGCGCAGAA	888
1. Teil	(499)		CTTCACCGTGGCGCAGAA	
2.+3. Teil	(769)		CTTCACCGTGGCGCAGAA	

Sequenzdaten aus Analyse der DNA transgener Mäuse zur Ermittlung der Einzelnukleotidaustausche (SNP) im

5'-flankierenden Bereich

Die Farben kennzeichnen die Übereinstimmung der Sequenzen und SNP: grün und weiß markieren Übereinstimmungen von 2 Nukleotiden, blau von 2 Sequenzen und gelb von 4 Sequenzen. 1A1*1 entspricht der Sequenz der Linie 31 mit dem *hSUL71A1*1*-Allel, 1A1*2 entspricht der Sequenz der Linie 28 mit dem *hSUL71A1*2*-Allel

```

-650          -624          -551
1A1*1, Prom F (-650) AAGTGGGAGCCACCCTGCC TAGGCCCTCTGCTTTTGGTGAGTCATCAGAGTTTGTTCATTCCCACAGCAGCTCTGGCCCCCTAGTAGCAGCTCAGTTCCCTC
1A1*1, Prom R (-650) AAGTGGGAGCCACCCTGCC TAGGCCCTCTGCTTTTGGTGAGTCATCAGAGTTTGTTCATTCCCACAGCAGCTCTGGCCCCCTAGTAGCAGCTCAGTTCCCTC
1A1*2, Prom F (-650) AAGTGGGAGCCACCCTGCC TAGGCCCTCTGCTTTTGGTGAGTCATCAGAGTTTGTTCATTCCCACAGCAGCTCTGGCCCCCTAGTAGCAGCTCAGTTCCCTC
1A1*2, Prom R (-650) AAGTGGGAGCCACCCTGCC TAGGCCCTCTGCTTTTGGTGAGTCATCAGAGTTTGTTCATTCCCACAGCAGCTCTGGCCCCCTAGTAGCAGCTCAGTTCCCTC
-451
1A1*1, Prom F (-550) AATGGCCCGTGTGTTGTCCTGGAGCCACAGATGGACTGTGGCCAGGCAAGTGGATCACAGGCCCTGGCTGGCCCTGGCCGGTTTCCACATGTAGGGGCTGAGG
1A1*1, Prom R (-550) AATGGCCCGTGTGTTGTCCTGGAGCCACAGATGGACTGTGGCCAGGCAAGTGGATCACAGGCCCTGGCTGGCCCTGGCCGGTTTCCACATGTAGGGGCTGAGG
1A1*2, Prom F (-550) AATGGCCCGTGTGTTGTCCTGGAGCCACAGATGGACTGTGGCCAGGCAAGTGGATCACAGGCCCTGGCTGGCCCTGGCCGGTTTCCACATGTAGGGGCTGAGG
1A1*2, Prom R (-550) AATGGCCCGTGTGTTGTCCTGGAGCCACAGATGGACTGTGGCCAGGCAAGTGGATCACAGGCCCTGGCTGGCCCTGGCCGGTTTCCACATGTAGGGGCTGAGG
-396          -358 -351
1A1*1, Prom F (-450) GGCTCAAGGAGGGGAGCATCTCCACTGGGTGGAGGC TGGGGTCCCAGCAGGAATGTGGTGAGACAAAGGGCCGCTGGCTGGCAGGGAGACAGCAAGGAAG
1A1*1, Prom R (-450) GGCTCAAGGAGGGGAGCATCTCCACTGGGTGGAGGC TGGGGTCCCAGCAGGAATGTGGTGAGACAAAGGGCCGCTGGCTGGCAGGGAGACAGCAAGGAAG
1A1*2, Prom F (-450) GGCTCAAGGAGGGGAGCATCTCCACTGGGTGGAGGC TGGGGTCCCAGCAGGAATGTGGTGAGACAAAGGGCCGCTGGCTGGCAGGGAGACAGCAAGGAAG
1A1*2, Prom R (-450) GGCTCAAGGAGGGGAGCATCTCCACTGGGTGGAGGC TGGGGTCCCAGCAGGAATGTGGTGAGACAAAGGGCCGCTGGCTGGCAGGGAGACAGCAAGGAAG
-350          -341          -294          -281
1A1*1, Prom F (-350) GTCCTAGAGCTTCCCTCAGTGCAGCTGGACTCTCCTGGAGACCTTCACACACCCCTGATATCTGGGCCCTTGC
1A1*1, Prom R (-350) GTCCTAGAGCTTCCCTCAGTGCAGCTGGACTCTC-----
1A1*2, Prom F (-350) GTCCTAGAGCTTCCCTCAGTGCAGCTGGACTCTCCTGGAGACCTTCACACACCCCTGATATCTGGGCCCTTGC
1A1*2, Prom R (-350) GTCCTAGAGCTTCCCTCAGTGCAGCTGGACTCTC-----

```

9.3 Anhang III

Abbildungen der RNA-Expression im codierenden Bereich des *SULT1A1*-Gens mittels Agarosegelelektrophorese

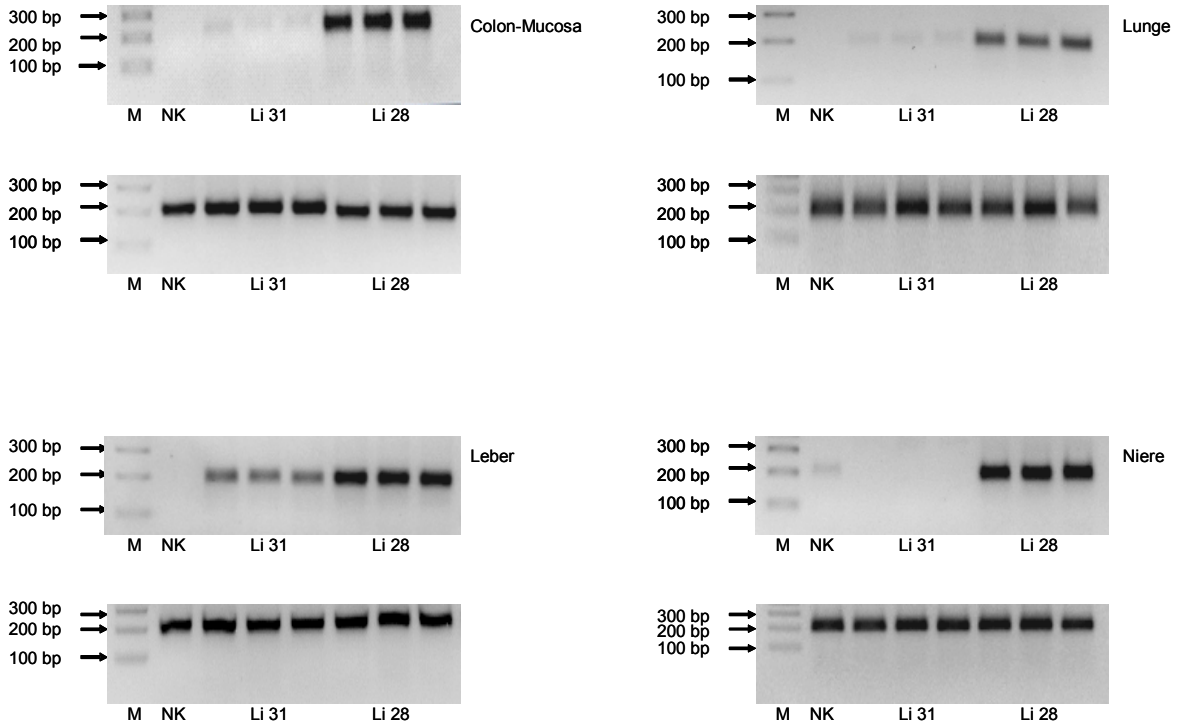


Abbildung 35: Darstellung der PCR-Produkte aus Real-Time-PCR zur Analyse der relativen RNA-Expression im codierenden Bereich der Transgene *SULT1A1*1* in Linie 31 und *SULT1A1*2* in Linie 28. Abgebildet sind die PCR-Produkte mit cDNA der untersuchten Organe Colon-Mucosa (links oben), Leber (links unten), Lunge (rechts oben) und Niere (rechts unten). Dabei entsprechen die oberen Abbildungen des Organs den PCR-Produkten des Transgens (203 bp) und die unteren Abbildungen den PCR-Produkten des Referenzgens (203 bp). Li 31 und Li 28 entsprechen jeweils drei Tieren der transgenen Mauslinien, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide tabellarisch aufgeführt (Tabelle 6).

Einzelwerte der RNA-Expression im codierenden Bereich des *SULT1A1*-Gens

Tabelle 7: Aufführung der ermittelten Werte der relativen RNA-Expression im codierenden Bereich des *SULT1A1*-Gens mittels Real-Time-PCR. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und die Daten nach der Delta-Delta-Ct-Methode berechnet (angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung). Dabei entsprechen FVB/N dem Wildtyp, Li 31 den *hSULT1A1*1*-transgenen Mäusen und Li 28 den *hSULT1A1*2*-transgenen Mäusen.

Organ	Tier	rel. RNA-Expression	STABW
Leber	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	347	79
	Li 31 #2	284	101
	Li 31 #3	336	74
	Li 28 #1	253000	59800
	Li 28 #2	157000	21000
	Li 28 #3	218000	24500
Colon-Mucosa	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	22	2
	Li 31 #2	20	7
	Li 31 #3	22	4
	Li 28 #1	1160	95
	Li 28 #2	1360	312
	Li 28 #3	1180	231
Niere	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	1	0
	Li 31 #2	1	0
	Li 31 #3	1	0
	Li 28 #1	187	18
	Li 28 #2	218	30
	Li 28 #3	144	17
Lunge	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	388	67
	Li 31 #2	300	1
	Li 31 #3	331	8
	Li 28 #1	9160	1482
	Li 28 #2	6430	426
	Li 28 #3	6040	477

Abbildungen der RNA-Expression in Exon 1B im nicht-codierenden Bereich des *SULT1A1*-Gens mittels Agarosegelelektrophorese

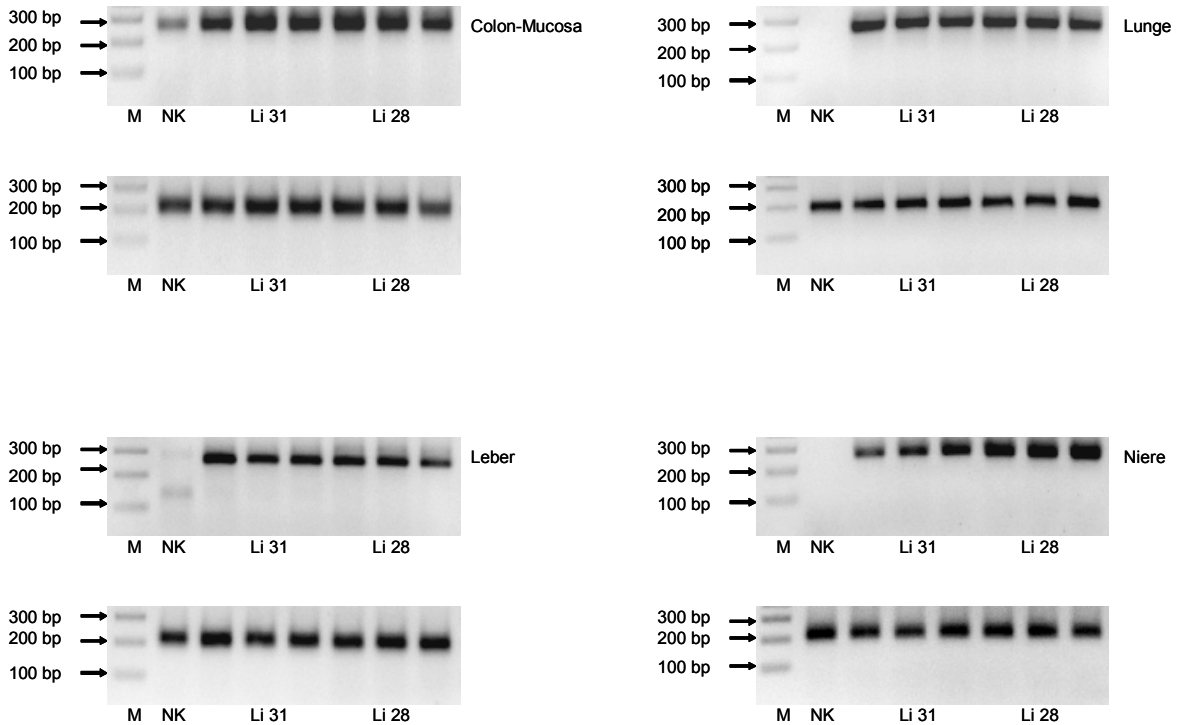


Abbildung 36: Darstellung der PCR-Produkte aus Real-Time-PCR zur Analyse der relativen RNA-Expression in Exon 1B im nicht-codierenden Bereich der Transgene *SULT1A1*1* in Linie 31 und *SULT1A1*2* in Linie 28. Abgebildet sind die PCR-Produkte der cDNA der untersuchten Organe Colon-Mucosa (links oben), Leber (links unten), Lunge (rechts oben) und Niere (rechts unten). Dabei entsprechen die oberen Abbildungen des Organs den PCR-Produkten des Transgens (257 bp) und die unteren Abbildungen den PCR-Produkten des Referenzgens (203 bp). Li 31 und Li 28 entsprechen jeweils drei Tieren der transgenen Mauslinien, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide tabellarisch aufgeführt (Tabelle 6).

Einzelwerte der RNA-Expression in Exon 1B im nicht-codierenden Bereich des *SULT1A1*-Gens

Tabelle 8: Aufführung der ermittelten Werte der relativen RNA-Expression in Exon 1B im nicht-codierenden Bereich des *SULT1A1*-Gens mittels Real-Time-PCR. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und die Daten nach der Delta-Delta-Ct-Methode berechnet (angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Dabei entsprechen FVB/N dem Wildtyp, Li 31 den *hSULT1A1*1*-transgenen Mäusen und Li 28 den *hSULT1A1*2*-transgenen Mäusen.

Organ	Tier	rel. RNA-Expression	STABW
Leber	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	1230	605
	Li 31 #2	801	145
	Li 31 #3	694	102
	Li 28 #1	15500	4990
	Li 28 #2	20000	7340
	Li 28 #3	19000	4870
Colon-Mucosa	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	169	24
	Li 31 #2	159	22
	Li 31 #3	197	18
	Li 28 #1	388	81
	Li 28 #2	217	92
	Li 28 #3	263	36
Niere	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	6840	2410
	Li 31 #2	8710	2980
	Li 31 #3	5020	2630
	Li 28 #1	21300	6080
	Li 28 #2	24700	5020
	Li 28 #3	28400	4570
Lunge	FVB/N #1	1	0
	FVB/N #2	1	0
	Li 31 #1	272	34
	Li 31 #2	246	59
	Li 31 #3	315	36
	Li 28 #1	160	70
	Li 28 #2	104	88
	Li 28 #3	126	66

Abbildungen der RNA-Expression in Exon 1A im nicht-codierenden Bereich des *SULT1A1*-Gens in der Leber mittels Agarosegelelektrophorese

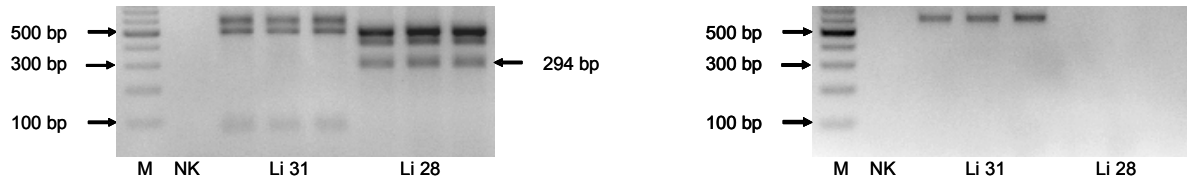


Abbildung 37: Darstellung der PCR-Analyse zum Nachweis des Exon 1A in der nicht-codierenden Region stromaufwärts des *SULT1A1*-Gens. Abgebildet sind die PCR-Produkte mit den Primern aus Sequenzen des Exon 1A mit cDNA aus Leber. Links sind die PCR-Produkte mit cDNA nach reverser Transkription und rechts die PCR-Produkte ohne reverse Transkription als Minus-Probe abgebildet. Nachweis des Exon 1A als PCR-Produkt mit 294 bp. PCR-Produkte aus unvollständigem DNase-Verdau mit 597 bp. PCR-Produkte zwischen 300 und 500 bp konnten nicht spezifiziert werden. Li 31 und Li 28 entsprechen jeweils drei Tieren der transgenen Mauslinien, NK entspricht einer nicht-transgenen Maus als Negativkontrolle und M dem Marker Gene Ruler™ DNA Ladder Mix. Die Primersequenzen sind im Anhang unter Oligonukleotide tabellarisch aufgeführt (Tabelle 6).

9.4 Anhang IV

Tabelle 9: PhIP-DNA-Addukte in Colon-Mucosa, Leber, Lunge und Niere. Die Addukte wurden mittels ^{32}P -Postlabelling von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen (Li 31 mit *SULT1A1*1*, Li 28 mit *SULT1A1*1*, Li 28 mit *SULT1A1*2*, Li 7 mit *SULT1A1*1/SULT1A2*1*) bestimmt. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten von Doppelbestimmungen eines Tieres und sind am Tabellengrund als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (STABW) der jeweiligen behandelten Tiergruppe (90 mg PhIP/kg KM) angegeben.

Wildtyp	Colon-Mucosa	Leber	Lunge	Niere	Li 31	Colon-Mucosa	Leber	Lunge	Niere
Tier 2	43	0	18	29	Tier 11	51	0	20	30
Tier 3	41	0	21	26	Tier 12	52	0	22	37
Tier 4	47	0	22	25	Tier 13	31	16	34	22
Tier 5	82	0	17	34	Tier 14	30	0	25	27
Tier 6	39	0	25	43	Tier 15	97	12	24	43
Tier 7	51	0	21	32	Tier 16	63	19	18	21
Tier 8	58	0	21	25	Tier 17	36	0	31	26
Tier 9	42	0	103	28	Tier 18	26	0	19	47
MW	50	0	31	30	MW	48	6	24	32
STABW	14	0	29	6	STABW	24	8	6	10

Li 28	Colon-Mucosa	Leber	Lunge	Niere	Li 7	Colon-Mucosa	Leber	Lunge	Niere
Tier 29	116	38	26	48	Tier 20	180	137	18	78
Tier 30	83	31	14	30	Tier 21	189	102	91	69
Tier 31	73	31	16	16	Tier 22	192	86	104	78
Tier 32	69	26	14	21	Tier 23	85	82	74	54
Tier 33	72	38	17	33	Tier 24	103	85	87	65
Tier 34	74	26	15	24	Tier 25	133	129	73	77
Tier 35	79	36	22	34	Tier 26	94	91	51	44
Tier 36	48	10	6	27	Tier 27	107	153	75	54
MW	77	30	16	29	MW	135	108	72	65
STABW	19	9	6	10	STABW	45	28	27	13

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

Korinna Wend, Gisela Dobbernack, Walter Meinel, Heinz Himmelbauer and Hansruedi Glatt. Transgenic mice for human sulfotransferases with polymorphic *SULT1A* genes. Manuskript.

Tagungsbeiträge

Korinna Wend, Gisela Dobbernack, Walter Meinel, Heinz Himmelbauer and Hansruedi Glatt „Transgenic mice for human sulfotransferases with polymorphic *SULT1A* genes”,

46th Congress of the European Societies of Toxicology, Dresden, 2009;

10th International Conference on Environmental Mutagens, Florenz, Italien, 2009;

32nd Annual Meeting of United Kingdom Environmental Society, Leeds, Großbritannien, 2009

5th Annual Meeting of The European Nutrigenomics Organisation, Potsdam, 2008

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name Korinna Wend, geb. Schulz
Geburtsdatum 13.09.1978
Geburtsort Forst/Lausitz (Brandenburg)

Ausbildung

2005-2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) Potsdam-Rehbrücke in der Abteilung Ernährungstoxikologie bei Prof. Hansruedi Glatt

2004-2005 Wissenschaftliche Hilfskraft am DIfE in der Abteilung Ernährungstoxikologie

2004-2005 Diplomarbeit am DIfE in der Abteilung Ernährungstoxikologie bei Prof. Hansruedi Glatt, Thema: „Sulfotransferasen in der Nasenmuschel des Menschen: Identifizierung der exprimierten Formen und interindividuelle Variation“

2003 Auslandsaufenthalt an der Universität von Alberta, Kanada (University of Alberta, Alberta)

1999-2005 Studium der Ernährungswissenschaft an der Universität Potsdam und dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke

1998-1999 Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Potsdam

1991-1998 Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe „Lausitzer Sportschule“ in Cottbus

1985-1991 Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“ in Briesnig

Erklärung zur Dissertation

Diese Arbeit entstand am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke in der Abteilung Ernährungstoxikologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hansruedi Glatt und Herrn Dr. Walter Meinel.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich mit den aufgeführten Mitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Berlin

Korinna Wend

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die zur Entstehung dieser Arbeit im Großen oder im Kleinen beigetragen haben, herzlich danken.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Hansruedi Glatt. Er ermöglichte die Bearbeitung des interessanten Projektes und förderte meine toxikologische Weiterbildung. Auch für die Gelegenheit, die Ergebnisse vielerorts zu präsentieren, bin ich dankbar.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Walter Meinl. Durch seine Betreuung, Ratschläge und wissenschaftlichen Diskussionen gab er mir die Kenntnisse und Erfahrungen, die für wissenschaftliches Arbeiten erforderlich sind.

Mein herzlicher Dank gilt Gila Dobbernack. Mit ihr als Kollegin hatte ich das große Glück, eine liebe und sehr hilfsbereite „Mäusegenossin“ an meiner Seite zu haben. Und ich bin dankbar, dass ich von ihrem Wissen viel erfahren und mir aneignen konnte.

Besonders möchte ich mich bei meinen (ehemaligen) Mitstreitern Dr. Gila Dobbernack, Dr. Nadiya Bakhiya, Dr. Mandy Osterloh-Quiroz, Dr. Claudia Donath, Dr. Monika Battke, Dr. Simone Florian, Carolin Müller und Chimgee Baasanjav-Gerber bedanken. Die wertvollen Diskussionen, Hinweise, Ratschläge für alle Lebenslagen und Freundschaften bereichern mein Leben.

Mein besonderer Dank gilt Elke Thom, Swetlana König und Astrid Wagner-Hopf. Sie unterstützten mich bei den Tierversuchen und Tierpräparationen und pflegten die transgenen Mäuse außerordentlich sorgfältig und kompetent. Auch ein Dankeschön an alle MRL-Mitarbeiter, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Sabine Braune bedanken. Ihre fröhliche und offene Art machte die Laborarbeit angenehm. Meine Bewunderung gilt ihrem steten Optimismus und dem Glauben an den Menschen!

Weiterhin sehr herzlich möchte ich mich bei Andrea Katschak bedanken. Die stets kompetente Analyse der unzähligen Mäuseschwänze und das gewissenhafte Pipettieren der ebenfalls unzähligen Real-Time-Platten waren eine außerordentlich große Hilfe!

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Simone Florian und Elisabeth Meyer für die immunhistochemische Aufarbeitung der Proben bedanken.

Herzlich möchte ich mich auch bei Martina Scholtyssek für die Aufarbeitung der PhIP-Proben und die Hilfe bei den HPLC-Analysen, bei Christine Gumz für die Durchführung der Postlabelling-Experimente und bei Jutta Schwenk für die Hilfe bei der Lymphocytenaufarbeitung bedanken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Ernährungstoxikologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die Lebenserfahrungen, die ich sammeln durfte!

Dr. Heinz Himmelbauer und Ingo Voigt möchte ich dafür danken, dass sie die Mikroinjektionen zur Erzeugung der transgenen Mauslinien ermöglicht und durchgeführt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich umfassend unterstützt und mir diesen Weg ermöglicht hat. Und ich freue mich, ihnen den Unterschied zwischen Wald- und Wiesenmaus und meinen Labormäusen beigebracht zu haben!

Nicht zuletzt gilt der größte und herzlichste Dank meiner besseren Hälfte, Peter Wend; für die schöne gemeinsame Zeit des Studiums und der Promotion und für seine Unterstützung in diesen Lebensabschnitten.