


---



**Herstellung und Charakterisierung von APOBEC-1  
transgenen Kaninchen mit dem leberspezifischen  
APOBEC-1 Promotor der Ratte**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**FRANK APOSTEL**  
aus Sanderbusch (Friesland)

Hamburg 2001

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1997 bis zum Dezember 2000 in der Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf unter Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Jobst Greeve angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Marquardt
2. Gutachter: Herr Priv. Doz. Dr. J. Greeve

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Summary</b> .....	4
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	5
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	6
3.1	Apo B mRNA Editing Enzym-Komplex .....	7
3.2	Struktur des APOBEC-1 Gens .....	8
3.3	Apo B enthaltende Lipoproteine .....	8
3.4	Transgene Tiermodelle.....	10
3.5	Transgene Kaninchen.....	11
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	13
4.1	Material .....	13
4.1.1	DNA- und RNA-Größenmarker .....	13
4.1.2	Datenbanken .....	14
4.1.3	Geräte und Computer.....	14
4.1.4	Computerprogramme.....	14
4.1.5	Tiere und Tierhaltung .....	15
4.2	Methoden.....	16
4.2.1	Konstruktion des Minigens pAPOBEC-1.....	16
4.2.2	Transfektion von Säugerzellen .....	16
4.2.3	Luziferase Assay.....	17
4.2.4	Reverse Transkription.....	17
4.2.5	Polymerase Kettenreaktion.....	18
4.2.6	Primer Extensions Analyse.....	18
4.2.7	Ribonuklease Protektions Assay.....	19
4.2.8	Mikroinjektion .....	20
4.2.9	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	22

---

4.2.10 Biochemische Analytik der Lipoproteine .....	23
Dichtezentrifugation .....	23
Proteinbestimmung .....	24
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
Gelfiltration.....	25
4.2.11 Bestimmung des Expressionsmusters von pAPOBEC-1.....	25
RNA-Präparation .....	25
Reverse Transkriptase-PCR.....	25
Southern Blot für die DIG-Detektion .....	26
Anreicherung von Poly (A) <sup>+</sup> RNA .....	26
Northern Blot.....	27
4.2.12 Analyse der Methylierung .....	28
Präparation der genomischen DNA.....	28
Genomischer Southern Blot (Alkali-Blot).....	28
Behandlung genomischer DNA mit Natriumbisulfit.....	29
CD-PCR ( <i>cytosine deamination</i> -PCR) .....	29
4.3 Sicherheitsvorkehrungen und Entsorgung .....	31
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
5.1 Klonierung von pAPOBEC-1 .....	32
5.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung von pAPOBEC-1 .....	33
5.3 Generierung und Identifikation von transgenen Kaninchen .....	35
5.3.1 Genotypisierung.....	35
5.3.2 Chromosomale Lokalisation von pAPOBEC-1.....	37
5.3.3 Etablierung von pAPOBEC-1 Kaninchen-Stämmen.....	39
5.3.4 Lipidspiegel in den transgenen Kaninchen.....	40
5.3.5 Charakterisierung der Expression von pAPOBEC-1.....	43
5.3.6 Apo B mRNA Editing in transgenen Kaninchen.....	46
5.3.7 Experimente zur pAPOBEC-1-Regulation in F1-Kaninchen.....	49

---

5.3.8	Methylierungsanalyse durch <i>MspI/HpaII</i> Restriktion .....	51
5.3.9	Methylierungsanalyse durch Sequenzierung von genomischer DNA .....	54
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>63</b>
6.1	Transgene Tiere und Arteriosklerose .....	63
6.2	Transgene Kaninchen und Arteriosklerose .....	65
6.3	Generierung und Charakterisierung von APOBEC-1 transgenen Kaninchen .....	68
6.4	Inaktivierung von pAPOBEC-1 durch DNA-Methylierung .....	70
6.5	Transkriptionelle Repression durch Methylierung.....	70
6.6	<i>de novo</i> Methylierung von pAPOBEC-1 .....	71
6.7	Methylierung von CpG-Inseln .....	72
6.8	Einfluss der Methylierung auf die DNA-Konformation .....	72
6.9	Veränderung der Bindungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren.....	73
6.10	DNA-Methylierung und Chromatin .....	74
6.11	Fazit und Ausblick .....	75
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>77</b>
7.1	Nukleotidsequenz von pAPOBEC-1 .....	77
7.2	Sicherheitsdaten der verwendeten Chemikalien .....	81
7.3	Abkürzungen .....	83
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>85</b>

## 1 Summary

The mRNA of apolipoprotein (apo) B can undergo a specific posttranscriptional base change from C to U at nucleotide position 6666 (Powell et al., 1987). This editing creates a premature translational stop codon UAA out of a glutamin codon 2153 and leads to the translation of the carboxyterminal truncated apo B-48. The full-length protein apoB-100 is the major structural protein of very low density lipoproteins (VLDL), which are secreted by the liver. In the circulation, VLDL are metabolized into the atherogenic low density lipoproteins (LDL), elevated concentrations of which are the main cause for atherosclerosis and coronary artery disease (Brown & Goldstein, 1986). The chylomicrons, which are secreted from the small intestine and contain apo B-48 as a consequence of apo B mRNA editing, are rapidly metabolized and do not serve as precursors for LDL formation. In contrast to humans and many other mammalian species, which edit only the intestinal apo B mRNA, some species such as horse, dog, rat and mouse can edit also the hepatic apo B mRNA leading to low plasma LDL levels (Greeve et al., 1993). The catalytic subunit APOBEC-1 (apo B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1) is the only missing component of the apo B mRNA editing enzyme in human or rabbit liver. Adenovirus-mediated gene transfer of APOBEC-1 into rabbit liver induces hepatic apo B mRNA editing and results in a drastic reduction of LDL levels (Greeve et al., 1996). However, transgene expression of APOBEC-1 in mouse and rabbit liver under the control of the strong apo E promoter can induce hepatocellular carcinoma in both species (Yamanaka et al., 1995). We set out to establish APOBEC-1 transgenic rabbits expressing APOBEC-1 in the liver under the liver-specific promoter of the rat APOBEC-1 gene (Greeve et al., 1998). To investigate how long term low level expression of APOBEC-1 in liver effects liver physiology, LDL levels and susceptibility for atherosclerosis.

We generated three independent APOBEC-1 transgenic founder NZW rabbits in which APOBEC-1 is under control of the liver-specific promoter of the rat APOBEC-1 gene. These rabbits are viable and fertile, in contrast to the previously described APOBEC-1 transgenic animals with very high level expression of APOBEC-1 in the liver mediated by the apo E promoter. Two of the transgenic founders transmit the transgene to the F1 generation and rat APOBEC-1 is expressed in low levels in liver, intestine, kidney, lung, brain and muscle. The low expression of rat APOBEC-1 in liver is not sufficient to induce editing of the hepatic apo B mRNA. The low activity of the transgenic rat APOBEC-1 promoter is due to altered methylation pattern of this promoter. In rat, the proximal promoter of APOBEC-1 is highly methylated, but the core region of the promoter with the transcriptional start site remains unmethylated. In transgenic rabbits, however, specifically this site is also methylated leading to a strong reduction of promoter activity.

## 2 Zusammenfassung

mRNA Editing, die posttranskriptionale Basenveränderung in mRNA, ist eine besondere Modifikation der Genexpression. Durch Editing der mRNA von Apolipoprotein (Apo) B an Nukleotidposition C6666 von C zu U wird ein vorzeitiges Translationsstopkodon gebildet, so dass nur eine carboxyterminal verkürzte Apo B Form, Apo B-48, translatiert wird (Powell et al., 1987). Das entscheidende Strukturprotein Apo B-100 der *Very Low Density* Lipoproteine (VLDL) wird in der Leber synthetisiert, aus denen im Blut die für die Auslösung der Koronaren Herzkrankheit und Arteriosklerose entscheidenden atherogenen *Low Density* Lipoproteine (LDL) gebildet werden (Brown & Goldstein, 1986). Beim Menschen und vielen anderen Spezies wird die Apo B mRNA nur im Dünndarm editiert, der damit Apo B-48 enthaltende, sehr rasch metabolisierende Chylomikronen bildet, welche nicht in die atherogenen LDL umgewandelt werden. Bei einer Reihe von Tierspezies (Maus, Hund, Ratte und Pferd) mit sehr niedrigen LDL-Spiegeln im Blut wird die Apo B mRNA, nicht wie beim Menschen, nur im Dünndarm, sondern auch in der Leber editiert (Greeve et al., 1993). Die katalytische Untereinheit APOBEC-1 (*apo B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1*) ist die einzige fehlende Komponente des Apo B mRNA Editing Enzyms in der Leber von Spezies wie Mensch und Kaninchen. Somatischer Gentransfer von APOBEC-1 in die Leber von Kaninchen durch rekombinante Adenoviren erzeugt Editing der hepatischen Apo B mRNA und führt zu einer drastischen Senkung der Plasma-LDL-Spiegel (Greeve et al., 1996). In APOBEC-1 transgenen Mäusen und Kaninchen, bei denen die Expression von APOBEC-1 durch den starken Apo E Promotor in der Leber induziert wird, kommt es zur Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen (Yamanaka et al., 1997). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung und molekulare Charakterisierung von APOBEC-1 transgenen Kaninchen mit dem leberspezifischen Promotor des APOBEC-1 Gens der Ratte (Greeve et al., 1998), um die Auswirkungen einer Induktion von Editing der Apo B mRNA in der Leber auf die LDL-Plasmaspiegel und die Entwicklung von Arteriosklerose *in vivo* in Langzeitverläufen zu untersuchen.

Es wurden drei APOBEC-1 NZW-*Founder*-Kaninchen hergestellt, in denen die APOBEC-1 Expression durch den leberspezifischen Promotor des Ratten APOBEC-1 Gens vermittelt wird. Diese Kaninchen sind gesund und fruchtbar, ganz im Gegensatz zu den zuvor hergestellten APOBEC-1 transgenen Kaninchen mit starker Expression unter Kontrolle des Apo E Promotors. Zwei von diesen transgenen *Founder*-Kaninchen vererben das Transgen weiter an die F1-Generation. Die transgenen Kaninchen exprimieren APOBEC-1 in Leber, Dünndarm, Niere, Lunge, Gehirn und Skelettmuskel. Allerdings ist die Expression zu gering, um Editing der Apo B mRNA zu induzieren. Der proximale leberspezifische Promotor ist schon in der Rattenleber teilweise methyliert und nur der *Core*-Bereich um den Transkriptionsstart bleibt unmethyliert. In den transgenen Kaninchen ist dieses spezifische Methylierungsmuster verloren gegangen, was zu einer starken Reduktion der Promotoraktivität führte.

### 3 Einleitung

Genetische Variabilität ist nicht nur notwendige Voraussetzung für die Evolution, sondern auch für die Vielfalt der genetischen Information bei vielen Vorgängen innerhalb eines Organismus. Die durch stochastische Schäden entstandenen Veränderungen in der DNA werden durch spezifische Mechanismen in aller Regel vollständig repariert (Lindahl, 1993; Croteau & Bohr, 1997). Zur Erzeugung von genetischer Variabilität gibt es demgegenüber spezifische Vorgänge. Bisher ist die homologe Rekombination während der Meiose zwischen zwei ähnlichen DNA-Molekülen am besten charakterisiert (Sonoda et al., 1999; Haber, 1999). Daneben ist eine zweite Form von DNA-Rekombination bekannt, die im Immunsystem die Variabilität der Antikörperbildung erzeugt (Gellert, 1997; Oettinger, 1999). Eine dritte Form, die in der DNA enthaltene Information zu verändern, ist das sogenannte mRNA Editing. Bei diesem Vorgang wird nicht die Sequenz der DNA, sondern die, der von der DNA abgeschriebenen mRNA nachträglich verändert.

Editing wurde zunächst bei der mRNA in den Mitochondrien von Pflanzen beschrieben (Benne et al., 1986; Covello & Gray, 1989; Gualberto et al., 1989). Bei dieser Form von RNA Editing entsteht durch Deaminierung von Cytosin die Base Uracil. Dadurch werden Kodons in der genomischen DNA, die vom universellen genetischen Code abweichen, editiert. Erst so ist eine funktionelle Biosynthese der Proteine in diesen Pflanzen möglich (Hiesel et al., 1994). Auch bei Trypanosomen, den Erregern der Schlafkrankheit, wird die prä-mRNA durch einen sehr komplexen Vorgang von U-Deletion/Insertion auf eine Weise editiert, dass dessen genetische Information weitergegeben werden kann (Cruz-Reyes & Sollner-Webb, 1996). Editing von viraler mRNA ist ebenfalls beschrieben. Durch Editing entsteht hier aus Uracil die Base Cytosin (Casey et al., 1992). Kürzlich wurde bei dem HI-Virus Editing von den Basen Cytosin zu Uracil und Guanin zu Adenin beschrieben (Bourara et al., 2000). Diese Modifikationen führen zu vorzeitigen Translationsstopkodons, die die Translation der viralen Proteine steuern (Bourara et al., 2000). Editing von nukleär kodierten Transkripten wird ausschließlich durch Deaminierung vermittelt (Scott, 1995; Mass et al., 1997). Zum Beispiel wird die mRNA von Glutamat- und Serotonin-Rezeptoren durch Editing von Adenosin zu Inosin verändert. Diese Rezeptoren sind Untereinheiten des AMPA-(*α*-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionacid) Rezeptors, welche einen kationspezifischen Kanal bilden. Editing dieses Kanals verändert die Ionenselektivität (Melcher et al., 1995; Melcher et al., 1996). Die Deaminierung wird von Enzymen aus der Genfamilie der ADAR (*adenosine deaminases acting on RNA*) vermittelt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass diese Deaminase ADAR1 auch eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung der Maus spielt. Bereits die heterozygoten ADAR1 +/- defizienten Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben im Mutterleib, da die Erythropoese nicht ordnungsgemäß ausreift (Wang et al., 2000; Higuchi



et al., 2000; Palladino et al., 2000). Das Editing der mRNA von Apolipoprotein (Apo) B ist eine besonders gut charakterisierte Form von mRNA Editing (Scott, 1995). In der Apo B mRNA wird sehr spezifisch das Cytidin an Nukleotidposition 6666 zu Uridin deaminiert. Diese Reaktion wird durch die RNA-abhängige Cytidineaminase APOBEC-1 (*apo B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1*) vermittelt (Navaratnam et al., 1993; Teng et al., 1993). Aus dem Glutamin-Kodon CAA entsteht an Aminosäureposition 2153 ein vorzeitiges Translationsstopkodon UAA. Ein sehr eng verwandtes Homolog von APOBEC-1, AID (*activation-induced cytidine deaminase*), wurde ebenfalls kürzlich beschrieben (Muramatsu et al., 1999). Bei AID *-/-* defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass AID eine wichtige Aufgabe bei dem sogenannten *class switching* der Immunglobulinklassen IgM zu IgG zukommt (Longacre & Storb, 2000; Muramatsu et al., 2000; Revy et al. 2000).

### 3.1 Apo B mRNA Editing Enzym-Komplex

Editing der Apo B mRNA wird durch einen Enzym-Komplex, das Apo B mRNA Editing-Enzym, vermittelt. Bisher wurden die katalytische Untereinheit APOBEC-1 und ASP (APOBEC-1 *stimulating protein*) kloniert und charakterisiert (Teng et al., 1993; Driscoll et al., 1994; Johnson et al., 1993; Mehta et al., 2000, Lellek et al., 2000). APOBEC-1 gehört zu der Familie der Cytidin-Deaminasen, deren gemeinsames Strukturmerkmal eine Deaminase-Domäne ist (Gerber & Keller, 1999; Anant et al., 1995; Navaratnam et al., 1993). Diese Domäne ist gekennzeichnet durch die spezifische Anordnung der drei Aminosäuren Histidin-Cystein-Cystein, die koordinativ ein Zinkatom binden. Im weiteren gehören dazu ein die Ammoniumgruppe des Cytidins 6666 bindendes Prolin und ein als Protonendonator fungierendes Glutamat (Gerber & Keller, 1999). APOBEC-1 enthält carboxyterminal ein cytosolisches Retentionssignal/nukleäres Exportsignal und ein neuartiges RNA Bindungsmotiv, das an eine AU-reiche Region der Apo B mRNA (Nukleotide 6678-6684) bindet (Navaratnam et al., 1995; Yang et al., 1997). Aminoterminal enthält ASP drei RNA-Bindungsdomänen, in denen das konservierte RNP1-Motiv (Ribonucleoprotein 1) enthalten ist. ASP enthält ein potentielles nukleäres Lokalisationssignal vom Typ SV40 T-Antigen, das vom Importin  $\beta$ -Rezeptor erkannt wird (Mattaj et al., 1998) und zwei putative Phosphorylierungsstellen für die Tyrosinkinase darstellt. Daneben wurde carboxyterminal eine putative Doppelstrang RNA-Bindungsdomäne (dsRBD) identifiziert. ASP ist ausreichend, um mit APOBEC-1 Editing der Apo B RNA *in vitro* zu rekonstituieren (Lellek et al., 2000).

### 3.2 Struktur des APOBEC-1 Gens

Die genomische Struktur von APOBEC-1 wurde für Ratte, Maus und Mensch analysiert. Das APOBEC-1 Gen der Maus besteht aus acht Exons (Nakamuta et al., 1995). Das Gen der Ratte (Hirano et al., 1997, Qian et al., 1997, Greeve et al. 1998) und des Menschen (Fujino et al., 1998) umfasst sechs Exons. Bei allen drei Spezies sind nur die fünf am 5'-Ende lokalisierten Exons kodierend. In diesen Bereichen liegt eine ähnliche Intron-Exon Struktur vor. Die Expression im Dünndarm wird in allen drei Spezies durch einen dünndarmspezifischen Promotor vermittelt, der in der 5'-flankierenden Region vor dem ersten kodierenden Exon lokalisiert ist. Dieser Promotor gehört zu einer erst kürzlich beschriebenen, neuartigen Klasse von TATA-losen Promotoren, die durch ein sogenanntes MED-1 Motiv gekennzeichnet sind (Ince & Scotto, 1995). Maus und Ratte verfügen über einen zweiten, zusätzlichen Promotor, der in der 5'-flankierenden Region eines zusätzlichen Exons am 5'-Ende des APOBEC-1 Gens lokalisiert ist. Dieser Promotor induziert bei Ratte und Maus die Expression von APOBEC-1 in Leber, Milz, Lunge, Herz und Skelettmuskel. Im menschlichen Gen ist keine homologe Region zu diesem zweiten Promotor, der durch eine relativ geringe Gewebsspezifität gekennzeichnet ist, gefunden worden. Das Fehlen dieses Promotors ist die molekulare Basis für die fehlende Expression von APOBEC-1 in der menschlichen Leber und für das daraus resultierende Fehlen von Apo B mRNA Editing in der menschlichen Leber (Fujino et al., 1998).

### 3.3 Apo B enthaltende Lipoproteine

Die wesentliche Bedingung für die Entstehung von Arteriosklerose ist eine Erhöhung des Cholesterins im Blut. Diese Hypercholesterinämien beruhen zumeist auf einer Erhöhung des LDL-Spiegels. Apolipoprotein B ist das entscheidende Strukturprotein aller atherogenen Lipoproteine mit Ausnahme der antiatherogenen *High Density* Lipoproteine (HDL). Apo B existiert in zwei verschiedenen Formen, dem Volle-Länge-Protein Apo B-100 und einer verkürzten Apo B-Form, dem Apo B-48. Apo B-100 ist das Strukturprotein der in der Leber gebildeten, triglyzeridreichen *Very Low Density* Lipoproteine (VLDL) (Kane, 1983). Nach Sekretion in den Blutstrom und Hydrolyse der Triglyzeride durch Lipasen wird der überwiegende Anteil der VLDL innerhalb weniger Minuten von der Leber aus dem Blut geklärt. Ein gewisser Anteil der VLDL wird jedoch durch weitere Lipolyse, insbesondere durch die hepatische Lipase, in LDL umgewandelt. LDL bestehen im wesentlichen aus Apo B-100 und Cholesterin (Brown & Goldstein, 1986). Sie zirkulieren im Blut mit einer Halbwertszeit von 20 Stunden und transportieren beim Menschen etwa 70% des gesamten Plasmacholesterins (Brown & Goldstein, 1986; Innerarity et al., 1996). Lipoprotein (a)

(Lp(a)) ist ein LDL-Partikel, in dem die carboxyterminale Hälfte von Apo B-100 über eine Disulfid-Bindung mit dem Plasminogen-Homolog Apo (a) kovalent verbunden ist (Brunner et al., 1993). LDL und Lp(a) sind die entscheidenden, atherogenen Lipoproteine (Steinberg et al., 1990). Die im Dünndarm gebildeten Chylomikronen enthalten als Strukturprotein ausschließlich das verkürzte Apo B-48, das nur aus den aminoterminalen 48% von Apo B-100 besteht. Nach Triglyzerid-Hydrolyse werden die Chylomikronen innerhalb weniger Minuten vollständig von der Leber aus dem Blut entfernt, eine Umwandlung in lang zirkulierende, atherogene Lipoproteine erfolgt hier nicht (Jäckle et al., 1992).

Die Bildung von Apo B-48 erklärt sich durch das eingangs beschriebene Editing der Apo B mRNA. Durch diese Basenveränderung von C zu U entsteht aus einem Glutamin-Kodon CAA ein vorzeitiges Translationsstopkodon UAA, so dass die Apo B mRNA nur in ihren aminoterminalen 48% in Apo B 48 translatiert werden kann (Powell et al., 1987; Chen et al., 1987).

Die Bedeutung des Editings der Apo B mRNA liegt in der Möglichkeit, durch Bildung von Apo B-48 anstelle von Apo B-100 die Synthese von lange zirkulierenden, atherogenen LDL bereits im Beginn zu verhindern. So haben Säugetierspezies wie Pferd, Hund, Ratte oder Maus, welche die Apo B mRNA auch in der Leber editieren und damit Apo B-48 enthaltende VLDL in der Leber bilden, sehr niedrige LDL-Spiegel. Denn die Apo B-48 enthaltenden VLDL können nicht in LDL umgewandelt werden (Greeve et al., 1993). Die grundlegende physiologische Bedeutung der Bildung des verkürzten Apo B-48 in der Leber auch für den Menschen wird durch das genetische Syndrom der Familiären Hypobetalipoproteinämie belegt. Die Familiäre Hypobetalipoproteinämie ist gekennzeichnet durch sehr niedrige LDL-Spiegel im Blut. Dieses Syndrom beruht auf Punktmutationen im Apo B Gen, durch die *non-sense* Kodons im Apo B Leserahmen entstehen, die eine vorzeitige Beendigung der Translation hervorrufen (Young et al., 1987). Besonders eindrucksvoll ist das Beispiel einer Frau mit homozygoter Hypobetalipoproteinämie, die aufgrund einer identischen Punktmutation in ihren beiden Apo B Allelen ausschließlich Apo B-50 bilden kann (Hardman et al., 1991). Die Bildung von Apo B-50 in der Leber und Apo B-48 im Darm führt bei ihr zu einem vollständigen Fehlen von LDL im Blut, ohne das erkennbare, unerwünschte Begleiterscheinungen auftreten. Familiäre Hypobetalipoproteinämie ist ein genetisches Syndrom, das vor Arteriosklerose und Koronarer Herzkrankheit schützen kann und vermutlich mit genetisch bedingter Langlebigkeit assoziiert ist (Linton et al., 1993).

Wie beim Menschen wird auch in der Leber des Kaninchens APOBEC-1 nicht exprimiert (Yamanaka et al., 1994). Adenoviral-vermittelter Gentransfer von APOBEC-1 in die Leber des Kaninchens erzeugt Apo B mRNA Editing und führt zu einer deutlichen Senkung der LDL-Spiegel in normalen und insbesondere in den LDL-Rezeptor defizienten, hypercholesterinämischen Watanabe-(WHHL) Kaninchen (Greeve et al., 1996; Kozarsky et al., 1996). In Mäusen, die bereits etwa 80% der hepatischen Apo B mRNA editieren und die sehr niedrige Plasma-LDL-Spiegel haben, steigert Adenovirus-vermittelte Überexpression von APOBEC-1 in der Leber das Editing der hepatischen Apo B mRNA auf 100% und führt zu einer vollständigen Eliminierung der LDL-Partikel aus dem Plasma (Hughes et al., 1996). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die deutliche Senkung eines erhöhten LDL-Spiegels das Fortschreiten von Arteriosklerose verhindern und sogar eine Rückbildung von arteriosklerotischen Läsionen ermöglichen kann (Ross et al., 1999; Shepherd et al., 1995; 4S-Study, 1994). Die Induktion von Apo B mRNA Editing in der Leber, die zu einer drastischen Abnahme der zirkulierenden LDL-Partikel im Blut führen kann, ist demzufolge ein molekularer Ansatz für die Therapie von Hypercholesterinämie und Arteriosklerose (Greeve et al., 1996).

### 3.4 Transgene Tiermodelle

In APOBEC-1 transgenen Mäusen und Kaninchen, in denen APOBEC-1 durch den Apolipoprotein E-Promotor in der Leber sehr stark überexprimiert wird, kommt es zur Entwicklung von hepatischen Dysplasien und hepatozellulären Karzinomen (Yamanaka et al., 1995). Wird APOBEC-1 überexprimiert, verliert es seine Spezifität, so dass auch andere Cytosine sowohl in der Apo B mRNA wie in anderen mRNA deaminiert werden. Dieses Phänomen wird Hyperediting genannt (Yamanaka et al., 1997). Sind davon Gene betroffen, die zelluläres Wachstum und Differenzierung regulieren, können sich Karzinome entwickeln. Die mRNA von NAT-1 (*novel apobec target no.1*), einem Translations-Suppressor, war in den oben genannten Tumoren sehr stark hypereditiert, so dass NAT-1 überwiegend nur verkürzt translatiert werden konnte. Die Tumorbildung in den APOBEC-1 transgenen Tieren könnte möglicherweise durch einen Funktionsverlust von NAT-1 erklärt werden (Yamanaka et al., 1997). Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass in natürlich entstandenen, menschlichen Karzinomen APOBEC-1 vermitteltes Editing herunterreguliert wird und keinerlei Hyperediting gefunden werden kann. In 26 untersuchten menschlichen Karzinomen (u.a. Kolon-, Magen-, Pankreas-, Leber-, Gallengangs-, Bronchial- und Schilddrüsenkarzinom) fehlten entweder APOBEC-1 oder die auxiliären Komponenten, die für APOBEC-1 vermitteltes mRNA Editing notwendig sind (Greeve et al., 1999). Nach diesen Daten ist es

nahezu ausgeschlossen, dass durch APOBEC-1 vermitteltes Hyperediting in den untersuchten menschlichen Karzinomen erfolgt und an der Karzinogenese beteiligt ist. Die Bildung von hepatozellulären Karzinomen in transgenen Kaninchen und Mäusen ist demnach Folge der artifiziellen Überexpression von APOBEC-1. Hierfür spricht außerdem, dass eine hohe Kopienanzahl des Transgens die Bildung von hepatozellulären Karzinomen begünstigt, während in transgenen Tieren mit niedriger APOBEC-1 Expression keine Karzinome entstehen (Yamanaka et al., 1995).

Die Maus ist das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Abschätzung von genetischen Faktoren. Jedoch stellt die Maus für Arteriosklerose eher ein schlechtes Tiermodell dar, denn sie hat einen relativ geringen LDL-Plasmaspiegel und bildet somit keine arteriosklerotischen Läsionen aus. LDL-Rezeptor *knock out* Mäuse besitzen deutlich niedrigere Plasma-LDL-Konzentrationen als Patienten mit homozygoter Familiärer Hypercholesterinämie oder als WHHL-Kaninchen, die ebenfalls eine homozygote Defektmutation im LDL-Rezeptor tragen (Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al. 1994). Demgegenüber ist bei der homozygot defizienten *knock out* APOBEC-1 Maus keinerlei Phänotyp zu beobachten. Hier kommt es nicht zum Anstieg der LDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma und auch nicht zur Bildung dieser Läsionen (Morrison et al., 1996; Hirano et al., 1996, Nakamuta et al. 1997). Die Einkreuzung der APOBEC-1 *knock out* Mäuse in die LDL-Rezeptor *knock out* Mäuse erzeugt eine erhebliche Steigerung der LDL-Spiegel und führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für Arteriosklerose in diesen *double knock out* Mäusen (Powell-Braxton et al., 1998).

### 3.5 Transgene Kaninchen

Kaninchen stellen aufgrund bestimmter Charakteristika ein ideales Tiermodell für das Studium des Fettstoffwechsels und dessen Anfälligkeit gegenüber Arteriosklerose dar (Brousseau & Hoeg, 1999). Die Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteine in den Kaninchen und Menschen sind in der chemischen Zusammensetzung und dem Apolipoprotein-Gehalt sehr ähnlich (Chapman et al., 1980). Im Kaninchen wird die Apo B mRNA, genau wie beim Menschen, nicht in der Leber editiert. Demzufolge enthalten die von der Leber gebildeten VLDL-Partikel ausschließlich das atherogene Apo B-100 als Strukturprotein (Greeve et al., 1993). Bei den üblicherweise verwendeten Tiermodellen, wie Maus und Ratte, wird die Apo B mRNA auch in der Leber editiert (Greeve et al., 1993). Dadurch werden die Apo B-48 enthaltenden Lipoproteine aus der VLDL-LDL-Kaskade entfernt und somit ist die Konzentration an atherogenen Lipoproteinen im Plasma sehr gering.

Kaninchen haben jedoch bei normaler Ernährung eine sehr geringe LDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma. Werden Kaninchen mit einer cholesterinreichen Nahrung gefüttert, dann steigt die Cholesterin-Konzentration im Plasma an und nach relativ kurzer Zeit entwickeln diese Tiere arteriosklerotische Läsionen der Aorta (St. Clair, 1983).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung und molekulare Charakterisierung APOBEC-1 transgener Kaninchen mit einem leberspezifischen Promotor, um die Auswirkungen von Editing der Apo B mRNA in der Leber auf die LDL-Plasmaspiegel und die Entwicklung von Arteriosklerose in einem Tiermodell *in vivo* in Langzeitverläufen zu untersuchen. Deshalb soll bei den herzustellenden transgenen Kaninchen die APOBEC-1 Expression unter Kontrolle des schwachen, leberspezifischen Promotors des Ratten APOBEC-1 Gens gestellt werden. Durch die Verwendung dieses Promotors soll eine physiologische Expression von APOBEC-1 in der Kaninchenleber erreicht werden, ohne dass es zu dem beschriebenen, unspezifischen Editing der Apo B mRNA und anderer Transkripte kommt (Greeve et al., 1998). Diese Tiere sollen den endgültigen *proof of principle* liefern, dass Editing der Apo B mRNA in der Leber ein genetischer Mechanismus ist, der eine Erhöhung von LDL-Spiegeln verhindern kann (Greeve et al., 1996).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

Alle verwendeten gängigen Laborchemikalien wie Salze, Puffersubstanzen u. ä. hatten den Reinheitsgrad *pro analysi* und stammten von den Firmen Merck, Sigma, BioRad oder Fluka. Restriktions- und andere modifizierende Enzyme wurden in der Regel von den Firmen Pharmacia, Takara, Promega, Stratagene, Invitrogen, New England Biolabs oder Ambion bezogen. Für bestimmte Verwendungszwecke wurden Substanzen höherer Reinheit benötigt. In diesen Fällen wird die Bezugsquelle gesondert aufgeführt.

#### 4.1.1 DNA- und RNA-Größenmarker

Als DNA-Standard kamen bei der Agarosegel-Elektrophorese folgende Größenmarker zum Einsatz:

- a.) Lambda-DNA geschnitten mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* (Pharmacia):  
23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 1057, 770, 612, 495, 392, 341, 297, 210, 162, 79 bp
- b.) 100bp-Leiter (Gibco):  
2072, 1500, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp
- c.) Plasmid DNA  $\Phi$ X174-pUC19 geschnitten mit dem Restriktionsenzym *HaeIII*:  
1353, 815, 587, 458, 449, 434, 298, 267, 174, 102, 80 bp
- d.) DIG markierte DNA-Fragmente (Roche):  
2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154 bp.

Als RNA-Standard kam bei den denaturierenden Agarosegelen folgender Größenmarker zum Einsatz:

- a.) Millennium-Bright-Star (Ambion):  
9000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500 bp.

### 4.1.2 Datenbanken

EMBL Nucleotide Sequence Database (Baker et al., 2000), Zugang über <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>

Eukaryotic Promoter Database (Périer et al., 2000), Zugang über <http://www.epd.isb-sib.ch>

BLAST, Basic Logic Alignment Search Tool (Altschul et al., 1990), Zugang über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

TRANSFAC, The Transcription Factor Database (Wingender et al., 2000), Zugang über <http://www.transfac.gbf.de>

TBASE, The Transgenic/Targeted Mutation Database, The Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine, Zugang über <http://tbase.jax.org>

### 4.1.3 Geräte und Computer

Scanner, AGFA Duoscan T1200, Gel-Dokumentationsanlage (Intas), Photometer GeneQuant (Pharmacia), Ultrazentrifuge (Beckman), Tischzentrifuge (Heraeus), Thermocycler (Perkin Elmer), Agarosegelelektrophoresekammer (BioRad), SDS-Gelelektrophoresekammer (Hofer), Szintillationszähler  $\beta$ -Counter (Packard), Spektralphotometer (Jasco), Mikroskop (Zeiss), Luminometer (Berthold Microlumat LB 96 P), FPLC System (Pharmacia), Hybridisierungsofen (Biometra), UV-Crosslinker (BioRad), Computer (Macintosh G4, MacOS V9.0, IBM kompatibler PC, AMD K6-2, Windows 98).

### 4.1.4 Computerprogramme

DNA-Strider™ V1.2, Program for DNA and Protein Sequences Analysis, Christian Marck, CAE France. Mit DNA-Strider wurden erhaltene Sequenzen bearbeitet und translatiert.

Oligo® V4.01 Primer Analysis Software, National Biosciences Inc., 1992. Oligo ist ein Oligonukleotid-Programm, welches eine Aussage über die Spezifität und Stabilität des gewählten Oligonukleotids gibt.

Clustal W V1.4, Sequence Alignment, EBI, 1994. Die Nukleotidsequenzen konnten mit Hilfe von Clustal W an bekannten Sequenzen aus der Genbank® (Datenbank für DNA-Sequenzen) und der EMBL-Datenbank verglichen werden. Es wurden die Standardeinstellungen verwendet.



SeqVu<sup>®</sup>, V1.1, Alignment Editor, Garvan Institute 1992-1996. Dieses Programm wurde zur Visualisierung der verglichenen Sequenzen verwendet.

Desweiteren kam folgende Standard-Software zum Einsatz:

CorelDrawV8LE für Macintosh, CorelDraw V9.0 für PC, Adobe Photoshop V5.5, WordPerfect V9.0, Microsoft Office 97/2000.

#### **4.1.5 Tiere und Tierhaltung**

Für alle Versuche wurden New Zealand White Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*), spezifisch pathogenfrei (Harlan) verwendet, die unter kontrollierten Bedingungen gehalten wurden: 20°C, 50% Luftfeuchtigkeit, 12/12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus, Futter und Wasser *ad libitum*.

Tierversuche wurden mit der Genehmigung der Gesundheitsbehörde Hamburg (Nr. 06/99) durchgeführt.

Zur Untersuchung der hormonellen Regulation der Expression von APOBEC-1 in den transgenen Kaninchen wurden die Tiere mit den Hormonen 3,3,5-Triiodo-L-Thyronin (T3) (Sigma) und Hydrocortison (Rotexmedica) behandelt. Eine Hyperthyreose wurde durch tägliche subkutane Injektion von 150 µg T3 pro kg Lebendgewicht induziert. Eine andere Gruppe von Tieren wurde durch tägliche subkutane Injektion von 10 mg Hydrocortison pro kg Lebendgewicht behandelt. Die Hormonspiegel wurden am 1. und 7. Tag im Blut durch das Zentral-Labor (Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Abt. Klinische Chemie) gemessen. Nach sieben Tagen wurden die Kaninchen durch intravenöse Injektion von Surital (Pharmacia & Upjohn) getötet und die Expression des transgenen APOBEC-1 in den Organen analysiert.

## 4.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden, wie DNA- und RNA-Gelelektrophorese, DNA-Restriktionsverdau, Ethanol-Fällung von DNA und RNA wurden nach Maniates (Stambrook et al., 1989) und nach den *Current Protocols in Molecular Biology* durchgeführt.

### 4.2.1 Konstruktion des Minigens pAPOBEC-1

Aus dem Plasmid pSVL-APOBEC-1 (Greeve et al., 1996) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *BamHI* die cDNA des Ratten APOBEC-1 Gens herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde gelgereinigt und anschließend in den ebenfalls mit *XbaI-BamHI* geschnittenen Vektor pT3T7 (Pharmacia) kloniert. Die virale Spleißingseite und das Polyadenylierungssignal wurden aus dem pSVK3 Vektor (Pharmacia) mit *BamHI* herausgeschnitten, gelgereinigt und in die *BamHI* Seite des Vektors pT3T7 kloniert.

Das 2,5 kb-*SalI*-Fragment des leberspezifischen Promotors des Ratten APOBEC-1 Gens (Greeve et al., 1998), welches vor dem Exon 1 lokalisiert ist, wurde in die *SalI* Seite des Vektors pT3T7 kloniert. Die Richtigkeit und die Orientierung des Minigens, im weiteren als pAPOBEC-1 bezeichnet, wurde mittels DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977) bestätigt.

### 4.2.2 Transfektion von Säugerzellen

Durch transiente Transfektion in humanen Hepatoma HuH7-Zellen wurde die Funktion von pAPOBEC-1 geprüft. Hierzu wurden  $6 \times 10^6$  Zellen in Kulturmedium (10% fötales Rinderserum (v/v) (Gibco) in DMEM (Gibco) mit 2 mmol/L L-Glutamin, 5% Penicillin/Streptomycin (v/v) (Gibco)) in Zellkulturplatten ( $\varnothing$  10 cm) (Greiner) angezüchtet. Bei einer Konfluenz von 50-60% wurden 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Plasmid-DNA mit dem Transfektionsreagenz Fugene<sup>TM</sup> 6 (Roche) transfiziert. In einem parallelen Ansatz dienten 2  $\mu\text{g}$  pCMV- $\beta$ -Gal als interne Transfektionskontrolle. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

Nach einer Inkubation von 48 Stunden bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> wurde aus diesen Zellen die RNA präpariert, um die Expression und die Funktion von pAPOBEC-1 zu überprüfen. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde ein  $\beta$ -Gal-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 4 mL Glutaraldehyd-Lösung (0,25% Glutaraldehyd (v/v) in PBS) für 15 min bei RT fixiert. Danach wurde 3x mit PBS gewaschen und mit Färbelösung (0,1% 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (w/v) (Sigma),

5 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 5 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$ , 2 mM  $MgCl_2$  in PBS) bedeckt. Die Transfektionsrate konnte anhand der Blaufärbung der Zellen nach 15 min bei 37°C im Lichtmikroskop analysiert werden.

#### 4.2.3 Luziferase Assay

Das 2,5 kb lange *SalI*-Promotorfragment des Ratten APOBEC-1 Gens wurde in die *XhoI* Seite des Vektors pGL3 (Pharmacia) kloniert. Durch Sequenzierung des Promotorkonstruktes wurde die Orientierung und die Korrektheit der Sequenz bestätigt. Durch transiente Transfektion in humanen Colon Karzinom Caco-2-Zellen (Kulturmedium: 20% fötales Rinderserum (v/v) (Gibco) in DMEM (Gibco) mit 2 mmol/L L-Glutamin), murinen Fibroblasten NIH/3T3-Zellen (Kulturmedium: 10% fötales Rinderserum (v/v) (Gibco) in DMEM (Gibco) mit 2 mmol/L L-Glutamin) und humanen Hepatoma HuH7-Zellen wurde die Luziferase-Aktivität des Promotors bestimmt. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in Zellkulturplatten ( $\varnothing$  3,5 cm) (Greiner) angezüchtet. Bei einer Konfluenz von 50-60% wurden 2  $\mu$ g/mL Plasmid-DNA und 0,1  $\mu$ g pCMV- $\beta$ -Gal mit dem Transfektionsreagenz Fugene<sup>TM</sup> 6 (Roche) kotransfiziert. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

Nach einer Inkubation von 48 Stunden bei 37°C und 5%  $CO_2$  (v/v) wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 250  $\mu$ L Reporter Lysis Puffer (Promega) lysiert. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen vollständig zu lysieren, wurde der Ansatz einem Einfrier- und Auftauzyklus unterworfen. Nach Zugabe von 50  $\mu$ L Luziferase Assay Puffer (Promega) wurde die Luziferase Aktivität in 10  $\mu$ L des löslichen Zellextrakts mit dem Luminometer gemessen. Parallel dazu wurde die  $\beta$ -Gal Aktivität luminometrisch gemessen. Es wurde der Galacto-Light Reporter Gene Assay (Tropix, BL300G) verwendet. Die Messung der Luziferase Aktivität wurde mit den Werten der  $\beta$ -Gal Aktivität normalisiert.

#### 4.2.4 Reverse Transkription

Die RNA aus den transfizierten Zellen wurde mit dem TRI-Reagent<sup>®</sup>-Reagenz (Molecular Research) präpariert (Chomczynski & Sacchi, 1987). Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Um DNA Kontaminationen zu entfernen, wurde die RNA mit 2 U DNase I (Ambion) in 1x DNasepuffer (Ambion) verdaut. Die cDNA-Synthese wurde mit jeweils 2,5  $\mu$ g Gesamt-RNA durchgeführt. In Anwesenheit von 10  $\mu$ M *antisense* Oligonukleotid ApoB 2 (CACGGATATGATAGTGCTCATCAAGAC, komplementär,

Position 6786-6760 nt der humanen ApoB cDNA) wurde die RNA für 10 min bei 70°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Dann wurde dieser Ansatz halbiert, in die eine Hälfte wurde 1 x RT-Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT), 0,25 mM dNTP's (Takara) und 5 Units (U) AMV-Reverse Transkriptase (USB) gegeben und auf ein Endvolumen von 10 µL aufgefüllt. Bei der anderen Hälfte, die als Minus-RT-Kontrolle diente, wurden ebenfalls alle oben genannten Substanzen bis auf die Reverse Transkriptase dazugegeben. Die Proben inkubierten für 1 Stunde bei 42°C.

#### 4.2.5 Polymerase Kettenreaktion

Im Anschluss wurde die synthetisierte cDNA durch eine PCR (Saiki et al., 1988) vervielfältigt. Der PCR-Ansatz enthielt 0,8 x TaqEx-Puffer (Takara), 0,2 mM dNTP, 0,4 µM *sense* Oligonukleotid ApoB 1 (CTGACTGCTCTCACAAAAAAGTATAGA, Position 6552-6578 nt der humanen ApoB cDNA), 0,4 µM ApoB 2 und 1 Units (U) TaqExPolymerase (Takara). In einem GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin Elmer) wurde mit dem folgenden Temperaturprogramm die cDNA vervielfältigt: 94°C: 2 min; 94°C: 20 s, 55°C: 20 s, 72°C: 40 s, 25-40 Zyklen; 72°C: 10 min. Im Anschluss wurden die erhaltenen PCR-Produkte mit S-300 MicroSpin-Säulen (Pharmacia) aufgereinigt.

#### 4.2.6 Primer Extensions Analyse

Es wurden 5 µM des *antisense* Oligonukleotids DD3 (AATCATGTAAATCATA-ATTATCTTTAATATACTGA, komplementär, Position 6708-6674 nt der ApoB cDNA) mit 10 U Polynukleotid Kinase (Promega) und 50 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol) in 1 x Kinasepuffer (70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM DTT) für 1 Stunde bei 37°C kinasiert. Freie Radioaktivität wurde mit einer Sephadex G-50 Säule (Pharmacia) abgetrennt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in 1 x Transkriptionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM dATP, dCTP, dTTP und ddGTP) und mit 1 x 10<sup>5</sup> cpm kinasiertem DD3 zunächst für 10 min bei 95°C denaturiert. Für 10 min bei 42°C erfolgte die Anlagerung von DD3 an die einzelsträngige DNA. Dieser Ansatz wurde nach Zugabe von 12 Units (U) AMV-Reverse Transkriptase (USB) für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt und mit 3,5 µL Sequenz-Probenpuffer (95% Formamid (v/v), 0,025% Xylencyanol FF (w/v), 0,025% Bromphenolblau (w/v), 0,5 mM EDTA, 0,025% SDS (w/v)) aufgenommen. Die Probe wurde

für 5 min bei 95°C denaturiert und auf einem denaturierenden 8% Acrylamid/8 M Harnstoff Sequenziergel (31 x 38,5 cm x 0,4 mm) aufgetragen. Bei einer Spannung von 1500 V betrug die Laufzeit 90 min. Danach wurde das Gel auf ein 3M-Whatman-Papier transferiert und mit einem Gelrockner (BioRad) bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde für 4 Stunden autoradiografiert (Driscoll et al., 1989; Greeve et al., 1991).

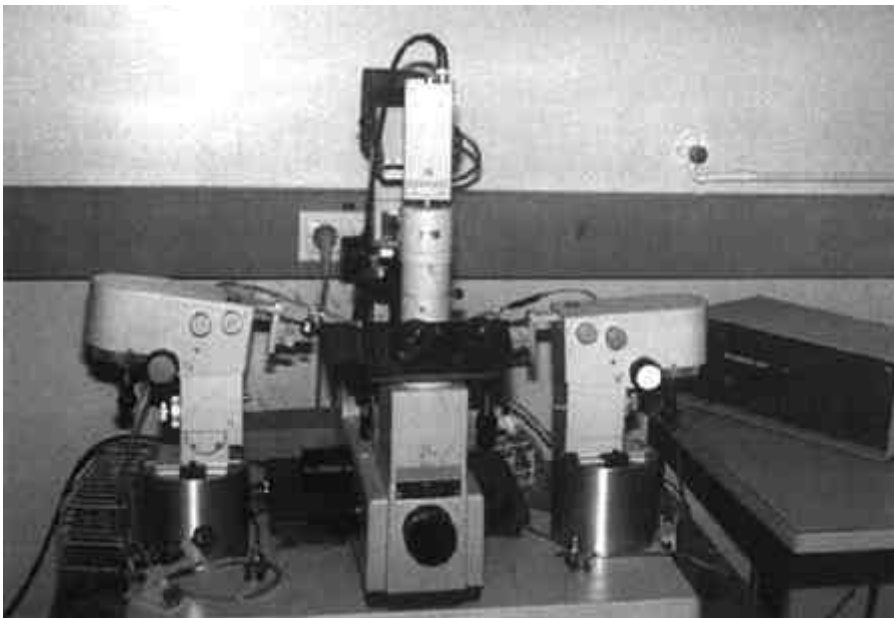
#### 4.2.7 Ribonuklease Protektions Assay

Ein mit den Oligonukleotiden REPI (GAGGAAGGAGTCCA-GAGACACAGAGAGCAAG, Nukleotidposition -31 bis -1 nt) und REPVII (GTGTGTCGCCAGATGCTGTGCCTTCC, komplementär, Position +134 bis +161 nt) erzeugtes PCR-Fragment, welches 192 bp der Ratten APOBEC-1 cDNA (GenBank<sup>®</sup> U10956) umfasste, wurde in den pGEM-T-Easy<sup>®</sup> Vektor (Promega) kloniert. Um die Orientierung des Fragmentes zu bestimmen, wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Danach wurden 500 ng der mit *SpeI* linearisierten Plasmid-DNA mit 10 Units T7 RNA Polymerase (Ambion) in Anwesenheit von 1 x Transkriptionspuffer (Ambion), 12,5 µM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (800 Ci/mmol) und je 500 µM der Nukleotide ATP, CTP und GTP für 30 min bei 37°C transkribiert. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA mit 5 U DNase I (Ambion) für 15 min bei 37°C verdaut. Die so generierte *antisense* RNA von 279 Basen wurde mit Phenol/Chlororm/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) extrahiert und mit einer MicroSpin S-300 Säule (AmershamPharmacia) aufgereinigt. Die Integrität der RNA wurde auf einem denaturierenden 5% Polyacrylamid/8 M Harnstoff-Sequenziergel überprüft.

Es wurde der Ribonuklease Protektions Assay Kit RPA II<sup>™</sup> (Ambion) verwendet. Hierzu wurden  $3 \times 10^4$  cpm der <sup>32</sup>P-markierten RNA mit 10 µg RNA (siehe 4.2.4) über Nacht bei 42°C in 20 µL Lösung A für 18 Stunden hybridisiert. Nach Zugabe von 5 U RNase A (Ambion) und 200 U RNase T1 (Ambion) in 200 µL Lösung B wurde die nicht-protektierte RNA für 30 min bei 37°C verdaut. Die unverdaute RNA wurde mit 300 µL Lösung D präzipitiert und auf einem 5% Polyacrylamid/8M Harnstoff-Sequenziergel bei einer konstanten Spannung von 1500 V aufgetrennt. Nach 2 Stunden Laufzeit wurde das gesamte Gel auf ein 3M-Whatman-Papier transferiert, für 30 min im Vakuum bei 80°C getrocknet und über Nacht autoradiografiert.

#### 4.2.8 Mikroinjektion

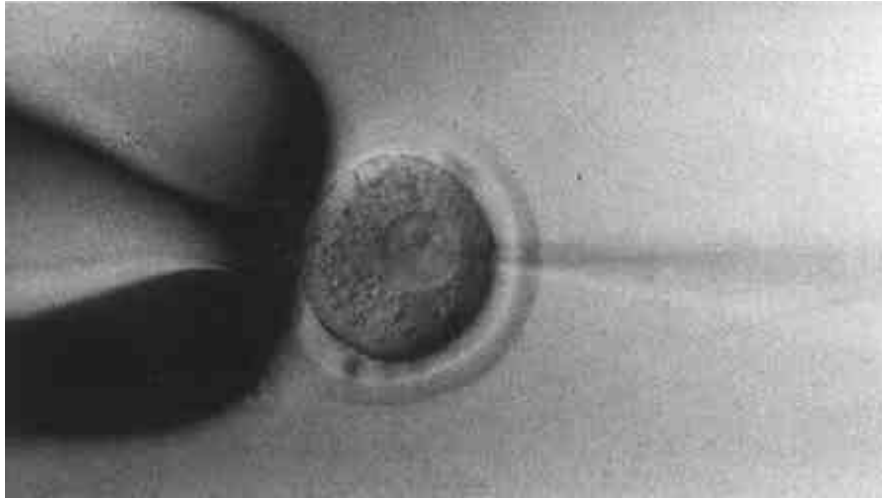
Die DNA des Minigens pAPOBEC-1 wurde mit dem QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen) präpariert. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA mit 20 U des Restriktionsenzym *ScaI* über Nacht linearisiert. Die verdaute Plasmid-DNA wurde zweimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) und Chloroform extrahiert und danach mit Ethanol präzipitiert. Die geschnittene Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und in die Vorkerne von befruchteten Eizellen injiziert (Gordon et al., 1980). Die technische Durchführung wurde in Kooperation mit der Firma RCC Biotechnology & Animal Breeding, BRL Biological Research Laboratories in der Schweiz durchgeführt. Neben einem Inversmikroskop (Zeiss) umfasste der Arbeitsplatz (Abb. 4.2) zwei Mikromanipulatoren zur Führung der Halte- und Injektionspipetten und ein Injektionsgerät.



**Abb. 4.2: Die Mikroinjektionsanlage.** In der Mitte steht das Inversmikroskop, rechts und links die Mikromanipulatoren, die mit Hebeln mechanisch betrieben werden. Mit den Mikromanipulatoren können die Kapillaren in der Injektionskammer, die in der Mitte des Mikroskops auf dem Kreuztisch liegen, bewegt werden.

Mit Hilfe des Injektionsgerätes wurde der Injektionsdruck reguliert und mittels Fußschalter freigegeben. Auf dem Mikroskop befand sich eine spezielle Petrischale, welche mit einem Mediumtropfen gefüllt war. Dieses Medium enthielt die befruchteten Eizellen der NZW-Weibchen. Zur Injektion wurde die befruchtete Eizelle durch Unterdruck an der Haltepipette fixiert, so dass die Vorkerne gut sichtbar waren. Die Injektionspipette mit einem Durchmesser von etwa 1 bis 2  $\mu\text{m}$  wurde mit pAPOBEC-1-Lösung (5 ng/L) gefüllt. Zur Injektion wurde die Pipette mit Hilfe des Mikromanipulators durch die *Zona pellucida*, die Zellmembran und die Kernmembran, in den Vorkern geschoben (Abb. 4.3).

Es wurden etwa 1 bis 2 pL pAPOBEC-1-Lösung injiziert, dies führte zu einer Vergrößerung des Kernvolumens um mehr als 50%.



**Abb. 4.3: Vorkerninjektion.** Auf dem Foto ist die befruchtete Eizelle mit Vorkernen abgebildet. Von links kommt die Haltepipette, die die Eizelle ansaugt, von rechts die Injektionskapillare.

Die injizierten Eizellen wurden in ein Empfängertier transferiert (Märki, U. & Härrig A; 1996). Bei den nach der Mikroinjektion geborenen Tieren wurde pAPOBEC-1 mittels PCR nachgewiesen. Hierzu wurde eine Ohrbiopsie ( $\varnothing$  4 mm Hautstanze, Stiefel) entnommen und aus dem Gewebe mit dem DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen) die genomische DNA isoliert. Der Nachweis der Genintegration wurde mit der PCR durchgeführt. Mit den Oligonukleotiden PromIVF (GCGGCTGGATCAGGACAACAATAACAAC, Position -152 bis -121 nt vor dem Transkriptionsstart) und FAIVR (GGACAGGAACCAGGTAATGGAGCATCTGGTG, Position +429 bis +398 nt) wurde ein 581 bp langes PCR-Produkt, welches den Promotorbereich und die cDNA von pAPOBEC-1 umfasste, amplifiziert. In einer zweiten PCR wurde mit den Oligonukleotiden FAVb (TGGGTGAGGCTGTACGTACTGGAAC, Position +682 bis +707 nt) und PolyIVR (CATTAAGGCATTCCACCACTGCTCC, Position +1349 bis +1317 nt) ein 667 bp langes PCR-Produkt, welches die cDNA und das Poly(A)-Signal von pAPOBEC-1 umspannte, amplifiziert. Als Kontrolle wurde mit den Oligonukleotiden RabEx3FI (ATTGAACCCTGGGAATTTGAAGTCTTC, Position +52 bis +79 nt) und RabEx3RIV (GCTCATAACCCGGACAGTTACGCCGCT, Position +435 bis +408 nt) ein 383 bp langes PCR-Produkt des endogenen APOBEC-1 Gens (EMBL U10695) erzeugt. Es wurden jeweils 300 ng der genomischen DNA in 1 x TaqEx-Puffer (Takara), 0,2 mM dNTP, je 0,5  $\mu$ M Oligonukleotid und 1 U TaqExPolymerase (Takara) in einem GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert: 95°C 4 min; 95°C 30 s, 55°C 20 s, 72°C 1 min, 30 Zyklen; 72°C 10 min.

#### 4.2.9 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

In ein Kulturröhrchen mit 10 mL Medium (RPMI 1640 (Gibco), 20% fötales Kälberserum (v/v), 1% Phytohämagglutinin (w/v) und 2 mmol/L L-Glutamin) wurden 300 µL heparinisiertes Venenblut gegeben und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden 200 µL Colcemid (Roche 10000 I.E.) dazugegeben und für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Blutzellen wurden sedimentiert und der Überstand verworfen. Zu dem Sediment wurde tropfenweise 7 mL, auf 37°C erwärmte, hypertone 75 mM KCl-Lösung gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Wiederum wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde tropfenweise 5 mL eiskalte Fixativ-Lösung (3:1 Methanol/Essigsäure (v/v)) zu den Zellen gegeben, vermischt und sedimentiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, bis der Überstand klar war. Nach dem letzten Waschen wurde soviel Fixativ-Lösung abgesaugt, bis das aufgeschüttelte Sediment eine leicht weißliche Trübung aufwies. Die gekühlte Zellsuspension wurde auf entfettete und mit ddH<sub>2</sub>O gespülte Objektträger getropft und für 15 min bei 95°C hitzefixiert. Die so erhaltenen Präparate wurden mindestens einen Tag bei RT gelagert (Watt & Stephan, 1985).

Die Präparate wurden für 5 min bei 20°C in 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7,0) gespült. Anschließend wurde in aufsteigender Ethanol-Konzentration (70%, 80%, 95% (v/v)) jeweils für 2 min dehydriert und getrocknet. Die Denaturierung der chromosomalen DNA auf den Objektträgern erfolgte in 70% Formamid (v/v) in 2 x SSC bei 70°C für 3 min. Im Anschluss wurden die Objektträger sofort in eiskaltes 2 x SSC überführt und in der oben beschriebenen Art und Weise dehydriert.

Für die *in situ* Hybridisierung (Lichter et al., 1988) wurde eine Biotin markierte Sonde mit dem BioNick™ Labeling System (Gibco) hergestellt. Hierzu wurden 1 µg Plasmid-DNA von pAPOBEC-1 eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers markiert. Die markierte DNA wurde in Gegenwart von Ethanol sedimentiert und in 40 µL Hybridisierungspuffer (50% Formamid (v/v), 10% Dextransulfat (w/v) und 100 µg/mL sonizierte Lachs Sperma DNA in 2 x SSC) resuspendiert. Die Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert. Es wurden 20 µL der Lösung auf einer Fläche von 10 x 10 mm pipettiert und mit einem Deckgläschen (20 x 20 mm) abgedeckt. Dabei war es wichtig Luftblasen zu vermeiden. Mit dem Fixogum-Kleber (Marabu) wurden die Ränder abgedichtet. Die Objektträger wurden über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Entfernung des Fixogum-Klebers und des Deckgläschens wurde der Objektträger kurz in 2 x SSC gewaschen. In frischem 2 x SSC wurde dieser Vorgang für 5 min wiederholt. Durch Inkubation des Objektträgers bei 43°C in 50% (v/v) Formamid in 2 x SSC für 10 min wurden unspezifisch hybridisierte DNA-Moleküle entfernt. Daran schloss sich ein



Waschgang mit 0,1% (v/v) Tween<sup>®</sup> (Sigma) in 2 x SSC für 5 min bei RT an, um die Formamidreste zu entfernen.

Für die Detektion wurden 100 µL des Avidin-FITC-Konjugat (Vektor) in einer 1:200 Verdünnung in 2 x SSC, 0,1% Tween<sup>®</sup> (v/v) und 1% BSA (w/v) pipettiert und wiederum luftblasenfrei mit einem Deckgläschen abgedeckt und in einer feuchten Kammer für ca. 30-45 min bei 37°C inkubiert. Der Objektträger wurde in 2 x SSC/0,1% Tween<sup>®</sup> (v/v) für 5 min bei 37°C gewaschen. Zur Signalverstärkung wurde mit dem Anti-Avidin-Antikörper (Ziege) (Vektor) in einer 1:200 Verdünnung in 2 x SSC, 0,1% Tween<sup>®</sup> (v/v) und 1% BSA (w/v) für ca. 30-45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde wieder für 5 min in 2 x SSC/0,1% Tween<sup>®</sup> (v/v) bei RT gewaschen. Die Inkubation mit dem Avidin-FITC-Konjugat/Anti-Avidin-Antikörper und den Waschschrritten wurde wiederholt.

Zur DNA-Gegenfärbung wurden die Objektträger in 0,01% (w/v) Propidiumiodid (Sigma) in 2 x SSC/0,1 % Tween<sup>®</sup> (v/v) für 5 min bei 20°C inkubiert und anschließend kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Objektträger wurden dann mit 10% (w/v) p-Phenylendiaminhydrochlorid (Sigma), 90% (v/v) Glycerin (Merck), pH 8,0 eingedeckt und mit einer 100-fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) analysiert.

#### **4.2.10 Biochemische Analytik der Lipoproteine**

##### **Dichtezentrifugation**

Aufgrund ihrer geringen Dichte (<1,019 g/mL) kann die Lipoproteinklasse VLDL von Proteinen abgetrennt werden (Havel et al., 1955). Die Dichtezentrifugation wird mit Plasma durchgeführt, das mit KBr auf eine Dichte von 1,025 g/mL gebracht und zentrifugiert wird. Die flotierten Lipoproteine können dann oben abgenommen und untersucht werden. Je 8,5 mL Plasma wurden zum einem mit 236 mg KBr zum anderen mit 2,5 mL KBr-Lösung der Dichte 1,025 g/mL versetzt, wonach der Ansatz die Dichte 1,025 g/mL aufwies. Die 11 mL wurden in einem *swing-out* Rotor (Beckman, SW40) bei 38.000 rpm für 16 Stunden zentrifugiert. Anschließend wurde von oben 1 mL der milchigen Schicht abgenommen. Dazu wurden 10 mL der KBr-Lösung (Dichte 1,025 g/mL) gegeben und erneut bei 38.000 rpm für 16 Stunden zentrifugiert. 600 µL der milchigen Schicht wurden abgenommen und die Konzentration an Cholesterin und Triglyzeride photometrisch mit dem Monotest<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim) bestimmt.

### **Proteinbestimmung**

Die in den Lipoproteinen enthaltenen Proteine wurden nach einer modifizierten Methode von Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951). Zunächst wurden 50 µL Probe aus der Dichtezentrifugation mit 1 mL Reagenz I (0,02% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (w/v), 0,02% Natriumkaliumtetrat (w/v), 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v) in 0,1 M NaOH geben) vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 µL Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck) dazugegeben, gut gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde mit 1 mL Chloroform gemischt und bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Schicht wurde abgenommen und bei einer Wellenlänge von 578 nm im Photometer (Jasco) gemessen. Parallel dazu wurde eine Kalibriergerade mit 1-20 µg/mL Rinder Serum Albumin (Pierce) erstellt. Nach Auftragen der Konzentration gegen die Extinktion konnte die Proteinmenge der Probe bestimmt werden.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Alle Proben, die mittels SDS-PAGE auf ihre Apolipoprotein-Zusammensetzung hin untersucht werden sollten, wurden zunächst mit einem 10-fachen Überschuß an 3:1 Ethanol/Diethylether (v/v) versetzt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Hierbei war darauf zu achten, dass der Diethylether zuvor mit einer 5% Eisen(II)-Sulfat-Lösung (w/v) ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet wurde, was nötig war, um entstandene Hydroperoxide zu entfernen. Die Präzipitate wurden in 5% SDS (w/v) aufgenommen.

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt, wobei sich die Proteine unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch nach Molekulargewicht auftrennten. Die Auftrennung erfolgte in einem 4-15% Gradientengel mit den Abmessungen 18 x 16 cm x 1,5 mm (Hofer). Im Anschluss wurde das Gel 10 min in der Coomassie<sup>®</sup>-Färbelösung (0,6% Coomassie<sup>®</sup> Brillant Blue G-250 (Serva), 25% 2-Propanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)) gefärbt und mit Entfärber I (50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)) 30 min und mit Entfärber II (5% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)) nach Sicht entfärbt (Bradford, 1976).

## Gelfiltration

Um die Lipoproteine entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde die Gelfiltration eingesetzt (Rudel et al., 1986). Dazu wurde eine FPLC<sup>®</sup>-Anlage (Pharmacia) mit einer Superose<sup>®</sup>-6-Säule verwendet, die einen für Plasma-Lipoproteine optimalen Trennbereich von 5-5000 kD besitzt. 200 µL Plasma wurden auf die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 0,5 mL/min in TBS (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl 10 mM EDTA, pH 8,0) aufgetrennt. Das Eluat wurde in 0,5-mL-Fractionen gesammelt. Da sich zeigte, dass in 100 µL der Fraktion die Konzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden zu gering waren, wurden diese durch Lyophilisierung konzentriert. Die auf das 10-fache konzentrierten Proben konnten mit dem Monotest<sup>®</sup> Kit photometrisch vermessen werden.

### 4.2.11 Bestimmung des Expressionsmusters von pAPOBEC-1

#### RNA-Präparation

Mit dem Ultraturrax (IKA) wurden ca. 300 mg Gewebe in 4 mL TRI-Reagent<sup>®</sup>-Reagenz homogenisiert. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit 0,5 mL 1-Brom-2-Chlor-Propanol (Sigma) extrahiert. Die in der wässrigen Phase enthaltene RNA wurde dann mit 2 mL 2-Propanol gefällt, mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Um das Maß an editierter Apo mRNA der Kaninchen zu bestimmen, wurde eine Primer Extensions Analyse durchgeführt. 2,5 µg der DNase-verdauten RNA wurden in Gegenwart von ApoB R2 (GTGCACGGATATGATAACGTTTCAT, Position 6789 bis 6765 nt der ApoB cDNA, EMBL M17780) revers transkribiert und anschließend mit dem Oligonukleotid ApoB R1 (CCAGTGCCAAGGAGAACTAACTA, Position 6535 bis 6559 nt) in der PCR amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie unter 4.2.6 beschrieben in den Assay eingesetzt.

#### Reverse Transkriptase-PCR

Hierzu wurden 2,5 µg RNA mit dem Oligonukleotid SV41R (AGGTTGGAATCTTAGAG, Position +1137 bis +1120 nt), welches das SV40-Intron von pAPOBEC-1 umspannte und somit transkriptspezifisch war, revers transkribiert. In der ersten PCR wurde das Transkript mit den Oligonukleotiden REP4 (GCTCATTGGCCAAGGTACCCCCATCTG, Position +655 bis 682 nt) und SV41R vervielfältigt. In der *nested* PCR wurden die Oligonukleotide FAVIF (TCTACTGCATCATTTTAGGACTTCCACCCTG; Position +707 bis +738 nt) und

PolyIIR (TCCAATTATGTCACACACCACAGAAGTAA, Position +1030 bis +1058 nt) verwendet. Als interne Kontrolle wurde mit den Oligonukleotiden 5'-18S (GACGATATACCGTCGTAGTTC, Position 1047 bis 1071 nt) und 3'-18S (GCTTATGACCCGCACTTACTGG, Position 1662 bis 1642 nt) 615 bp der 18S ribosomalen RNA (EMBL X06778) revers transkribiert und amplifiziert.

### **Southern Blot für die DIG-Detektion**

Aus dem *nested* PCR-Ansatz wurden ein zehntel der PCR-Reaktion in einem 1,5%igen Agarosegel bei einer konstanten Spannung von 100V aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 30 min unter Schütteln in Denaturisierungslösung (1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH) denaturiert, kurz in ddH<sub>2</sub>O waschen und anschließend für weitere 15 min unter Schütteln in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 und 1 mM EDTA) inkubiert. Die DNA wurde mittels des sogenannten „Kapillarblottens“ in Gegenwart von 20 x SSC über Nacht auf die Nylon Membran Hybond™-N+ (Amersham) transferiert und mit UV-Strahlung fixiert.

Mit dem 3'-End Labeling Kit (Roche) wurden an 100 pmol des Oligonukleotids FAIIF (CACGATTGCTCTTCAAAGCTGCCATTAC, Position +780 bis +807 nt) Digoxigenin-11-UTP-Moleküle angehängt. Die Membran wurde mit 0,2 mL/cm<sup>2</sup> DIG EASY HYB (Roche) für 60 min bei 60°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Das DIG markierte Oligonukleotid FAIIF wurde in 50 µL/cm<sup>2</sup> DIG EASY HYB für 3 Stunden bei 60°C hybridisiert. Die Detektion wurde mit DIG Luminescent Detection Kit (Roche) durchgeführt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

### **Anreicherung von Poly (A)<sup>+</sup> RNA**

Die Anreicherung von Poly (A)<sup>+</sup> RNA aus Gesamt-RNA wurde mit dem Micro-Poly(A)Pure™ Kit (Ambion) durchgeführt. 150 µg Gesamt-RNA in wässriger Lösung wurden mit einer 5 M NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,45 M NaCl eingestellt. Anschließend wurde zu diesem Ansatz 1 mL Bindungspuffer (Ambion) gegeben, für 10 min bei 65°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Diese Lösung wurde mit der Oligo dT-Zellulose vermischt und für 1 Stunde unter Schütteln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 3000 g pelletiert, der Überstand verworfen und mit 1 mL Bindungspuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die gebundene RNA

wurde dreimal mit 1 mL Waschpuffer (Ambion) gewaschen und bei 3000 g sedimentiert. Die pelletierte RNA wurde mit 0,4 mL Waschpuffer aufgenommen, in eine Filtersäule überführt und für 20 s bei 5000 g zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 0,5 mL Waschpuffer und Zentrifugation wurde die RNA mit 200 µL Elutionspuffer (Ambion) (65°C) für 20 s bei 5000 g eluiert. Die mRNA wurde in 0,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 5 µg Glykogen und dem dreifachen Volumen absoluten Ethanols über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das Pellet wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1% Diethylpyrocarbonat, v/v) aufgenommen. Zur Mengenabschätzung wurden 10% der Präparation auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

### Northern Blot

3 µg Poly (A)<sup>+</sup> RNA wurden mit einem denaturierenden Agarosegel (1% Agarose (w/v), 20 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA (pH 7,0), 2% Formaldehyd (v/v) und 0,5 µg/mL Ethidiumbromid) in 1 x RNA-Laufpuffer (20 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure, 5 mM Natriumacetat und 1 mM EDTA, pH 7,0) bei konstant 110 V aufgetrennt. Nach einer Laufzeit von 4 Stunden wurde die aufgetrennte RNA in Gegenwart von 10 x SSC über Nacht auf die Nylon Membran Hybond<sup>TM</sup>-N+ (Amersham) transferiert und am nächsten Tag mit UV-Strahlung fixiert.

Die Membran wurde für 1 Stunde bei 68°C in ExpressHyb Lösung (Clontech) prähybridisiert. Ein mit den Oligonukleotiden PromVF (CAGAACCACTGTGCCCATGAGAGTTG, Position +47 bis +63 nt von pAPOBEC-1) und PolyIIIR (GCCTCATCATCACTAGATGGCATTCTTCTGAGC, komplementär zu Position +1227 bis +1194 nt) erzeugtes PCR-Produkt wurde mit 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Hierfür wurde das Rediprime<sup>TM</sup> II Kit (AmershamPharmacia) verwendet. Es wurden 2 x 10<sup>6</sup> cpm/mL der Sonde mit der Membran bei 68°C über Nacht hybridisiert. Die Membran wurde 5 x mit Waschlösung 1 (2 x SSC und 0,05 % SDS (w/v)) jeweils 10 min bei RT, anschließend 2 x mit Waschlösung 2 (0,1 x SSC und 0,1% SDS (w/v)) jeweils für 20 min bei 50°C gewaschen. Abschließend wurde die Membran autoradiografiert. Um weitere Transkripte zu detektieren, wurde die hybridisierte Sonde bei 90°C für 10 min in 0,5% SDS (w/v) entfernt. Als Kontrolle wurde die Membran zuerst mit einer Sonde der cDNA des endogenen APOBEC-1 des Kaninchens, welche mit den Oligonukleotiden RabVIF (GGATTACACGTTGAGGAG-AAGA, Position +20 bis +43 nt) und RabVIIR (komplementär zu Position +715 bis +693 nt) erzeugt wurde, hybridisiert und autoradiografiert. Nach Entfernen dieser Sonde wurde die Membran mit einer Sonde der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-cDNA (GAPDH) hybridisiert und autoradiografiert.

#### 4.2.12 Analyse der Methylierung

##### Präparation der genomischen DNA

Es wurden 300 mg des Kaninchengewebes kleingeschnitten und in 3 mL Lysispuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,2% (w/v) SDS, 0,2 M NaCl und 5 mM EDTA) aufgenommen. Das zerkleinerte Gewebe wurde in Gegenwart von Proteinase K (0,15 mg/mL) (Ambion) bei 55°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Nach Sedimentation bei 12000 g wurde der geklärte Überstand einmal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) und einmal mit Chloroform extrahiert. Die DNA wurde dann mit 1 mL 2-Propanol gefällt. Mit einer Pipettenspitze wurde die genomische DNA aufgewickelt, in 70% Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA) aufgenommen.

##### Genomischer Southern Blot (Alkali-Blot)

10 µg genomische DNA wurden mit 100 U *MspI* oder 50 U *HpaII* über Nacht bei 37°C geschnitten, präzipitiert und in einem 1,25%igen Agarosegel in 0,5 x TBE (44 mM Tris-HCl, 44 mM Borsäure und 1 mM EDTA, pH 8,3) bei einer konstanten Spannung von 110 V aufgetrennt. Nach einer Laufzeit von 2 Stunden wurde das Gel für 10 min in 0,5 µg/mL Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und für 5 min in ddH<sub>2</sub>O entfärbt. Das Gel wurde kurz in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend für 15 min in 0,25 M HCl unter Schütteln denaturiert. Danach wurde es wiederum kurz in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt. In Gegenwart von 0,4 M NaOH wurde die genomische DNA über Nacht auf die Hybond-N<sup>®</sup> Membran transferiert. Die transferierte DNA wurde mit dem UV Stratalinker<sup>®</sup> (Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde dann kurz in 2 x SSC geschwenkt und für 3 Stunden bei 65°C in Hybridisierungslösung (0,25 M Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3, 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS und 1% (w/v) BSA) inkubiert. Es wurden 40 ng des mit den Oligonukleotiden MS1 (CACAAGCTTCCTGACCAGAGAAAGCTGAGG, komplementär zu Position +33 bis +6 nt) und MS2 (GAAGTCGACTTCCATTTTGATAGAGGTCAG, Position -930 bis -901 nt) erzeugten PCR-Fragmentes, welches 963 bp des leberspezifischen Promotors des Ratten APOBEC-1 Gens (EMBL AJ006695) umspannte, mit 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol) markiert. Dafür wurde das Rediprime<sup>™</sup> II Kit (AmershamPharmacia) verwendet. Die markierte Sonde wurde für 14 Stunden bei 65°C mit der prähybridisierten Membran inkubiert. Die Membran wurde 2 x mit Waschpuffer 1 (0,25 M Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3, 1 mM EDTA, 7% SDS (w/v) und 1% (w/v) BSA) (65°C) jeweils 15 min und anschließend 2 x mit Waschpuffer 2 (20 mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3, 1 mM EDTA und 1% (w/v) SDS) (65°C) ebenfalls für jeweils 15 min bei RT gewaschen. Abschließend wurde die Membran für

6 Stunden autoradiografiert und mit dem Phosphorimager (Molecular Dynamics) quantifiziert.

### **Behandlung genomischer DNA mit Natriumbisulfit**

Der Methylierungsstatus des Promotors wurde mittels des *bisulphite genomic sequencing* durchgeführt (Clark et al., 1994). Hierzu wurden ca. 10 µg genomische DNA mit 10 U des Restriktionsenzym *EcoRI* über Nacht bei 37°C verdaut, wodurch die Viskosität der DNA-Lösung herabgesetzt wurde. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die für die Bisulfit-Reaktion benötigten Lösungen wurden frisch hergestellt. 2 µg der geschnittenen genomischen DNA wurden in 0,3 M NaOH für 15 min bei 37°C denaturiert. Im nächsten Schritt wurden die Cytosine in Anwesenheit von 3,12 M Natriumbisulfit (Sigma) und 5 mM Hydrochinon (Sigma) in einem Thermocycler für 16 Stunden bei 55°C deaminiert. Besonders bei der Bisulfit-Lösung war darauf zu achten, dass während des Lösens des Salzes keine Luftblasen entstanden. Mit dem Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up System (Promega) wurde die DNA entsalzt und in 0,3 M NaOH für 15 min bei 37°C inkubiert. Die gereinigte DNA wurde präzipitiert und in TE-Puffer aufgenommen.

### **CD-PCR (*cytosine deamination-PCR*)**

Es wurden drei Bereiche des Promotors auf Methylierung untersucht. Um deaminierte DNA in einer PCR zu amplifizieren, mussten degenerierte Oligonukleotide hergestellt werden. Es war darauf zu achten, dass nach Behandlung mit Natriumbisulfit alle Cytosin-Reste zur Base Uracil deaminiert und somit nach PCR-Amplifikation als Thymin in der Sequenz erschienen. Das *sense* Oligonukleotid wurde so synthetisiert, dass alle Cytosin-Reste durch Thymin-Basen ersetzt wurden. Für das *antisense* Oligonukleotid galt, dass alle Guanin-Reste durch Adenin-Reste ersetzt wurden. Desweiteren musste das Auftreten eines 5'-Cytosin-Guanin-3' Dinukleotids (CpG) in der Sequenz vermieden werden.

Der Bereich um die Konsensus Sequenz für das *Liver Activator Protein* (LAP) (Descombes et al., 1990) wurde mit den Oligonukleotiden UBS 158 (TTTAAAAGTAGGAGGAGAA-GAAGAAA, Position -1032 bis -1006 nt vor dem Transkriptionsstart) und LBS 344 (AAAAAATTTACCTAACAATCATATCTCAAC, Position -816 bis -851 nt) amplifiziert. Um die Methylierung der *MspI/HpaII*-Schnittstelle zu bestätigen, wurden für diesen Abschnitt die Oligonukleotide UBS 251 (GTTAGAGGTGGATAGGAGATGTTTTG,

Position -385 bis -358 nt), LBS 480 (TTTACCCCCTAAAAATCCTTAAAATAAT, Position -156 bis -184 nt) und intern UBS 289 (GTTTTTATTGAGGGGATATTTGGTTT, Position -347 bis -318 nt) und LBS 450 (CATACTAAACCAAAAAATAACAACC, Position -189 bis -216 nt) synthetisiert. Zur Analyse des Teilstücks direkt vor dem Transkriptionsstart wurden die Oligonukleotide UBS 108 (ATTATTTTAAGGATTTTTAGGGGGTAAA, Position -184 bis -156 nt), LBS 355 (CCTTTCTACCTTCAAAATCCAACCTCTC, Position +92 bis +65 nt) und als *nested* Paar UBS 170 (AAAATAGATAAATTGGTTGATA-TTGAGTTT, Position -124 bis -94 nt) und LBS 299 (AACACAACTTCCTAACCAA-AAAAAAC, Position +36 bis +9 nt) hergestellt.

100 ng Bisulfit-behandelte DNA wurden in 1 x TaqEx-Puffer (Takara), 0,2 mM dNTP, je 0,5 µM Oligonukleotid und 1 U TaqExPolymerase (Takara) gegeben und in einem GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert: 95°C: 5 min; 95°C: 30 s, 55°C: 30 s, 72°C: 1 min, 35 Zyklen; 72°C: 10 min. Im Anschluss wurde eine *semi-nested* PCR durchgeführt. Dabei wurde 1/50 des Volumens aus der ersten PCR entnommen und mit je 0,5 µM Oligonukleotid und internem Oligonukleotid erneut 25 Zyklen mit dem oben genannten Bedingungen inkubiert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Um das Ausmaß der Methylierung zu bestimmen, wurden 20 ng des gereinigten Produkts mit dem jeweiligem Oligonukleotid aus der PCR direktsequenziert. Anschließend wurden die nicht eingebauten, fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide mit dem DyeEx™ Spin Kit (Qiagen) entfernt. Parallel dazu wurden 0,2 pmol des PCR-Produkts und 0,03 pmol pGEM-T-Easy® Vektors (Promega) ligiert und in *E. coli* (Stamm: XL1-Blue®) transformiert. Eine Einzelkolonie wurde zunächst in 3 mL antibiotikahaltigem (Ampicillin 100 µg/mL) LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln angezchtet. Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAfilter™ Plasmid Mini Kit (Qiagen) isoliert und mit M13 Sequenzieroligonukleotiden sequenziert.

Es wurde mit dem ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (PE Applied Biosystems) gearbeitet. Die Sequenzierungen wurden von den Service-Labors des Instituts für Biologie am Beckman Research Center in Duarte, USA und der Abteilung für molekulare Neurobiologie (Universität Hamburg) mit dem Gerät ABI 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) durchgeführt.



### **4.3 Sicherheitsvorkehrungen und Entsorgung**

Bei allen Chemikalien wurden die R- und S-Sätze beachtet. Organische Lösemittel wurden, getrennt nach halogenhaltig und -frei, in die entsprechenden Sammelbehälter entsorgt. Mit Ethidiumbromid kontaminierte Lösungen, Gele und Verbrauchsmaterialien wurden gesondert entsorgt.

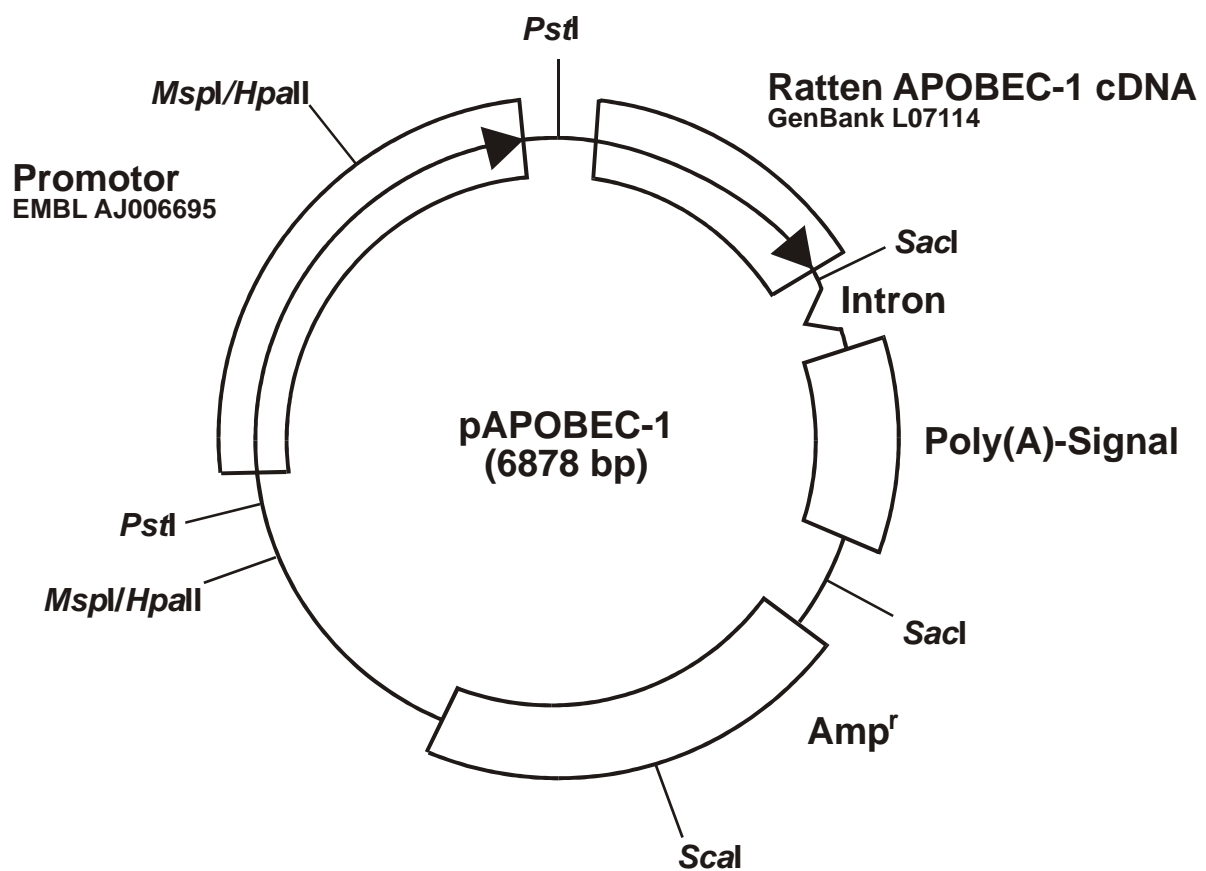
Biologisches Material (Bakterienkulturen etc.) und die mit diesem kontaminierten Gebrauchsartikel (Pipettenspitzen, Agarplatten etc.) wurden autoklaviert und anschließend entsorgt.

Bei dem Umgang mit Radioaktivität wurden die Sicherheitsauflagen (Strahlenschutzverordnung) eingehalten. Anfallende kontaminierte Verbrauchsmaterialien wurden in den entsprechenden Abfalltonnen gesammelt und von der Firma Amersham entsorgt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Klonierung von pAPOBEC-1

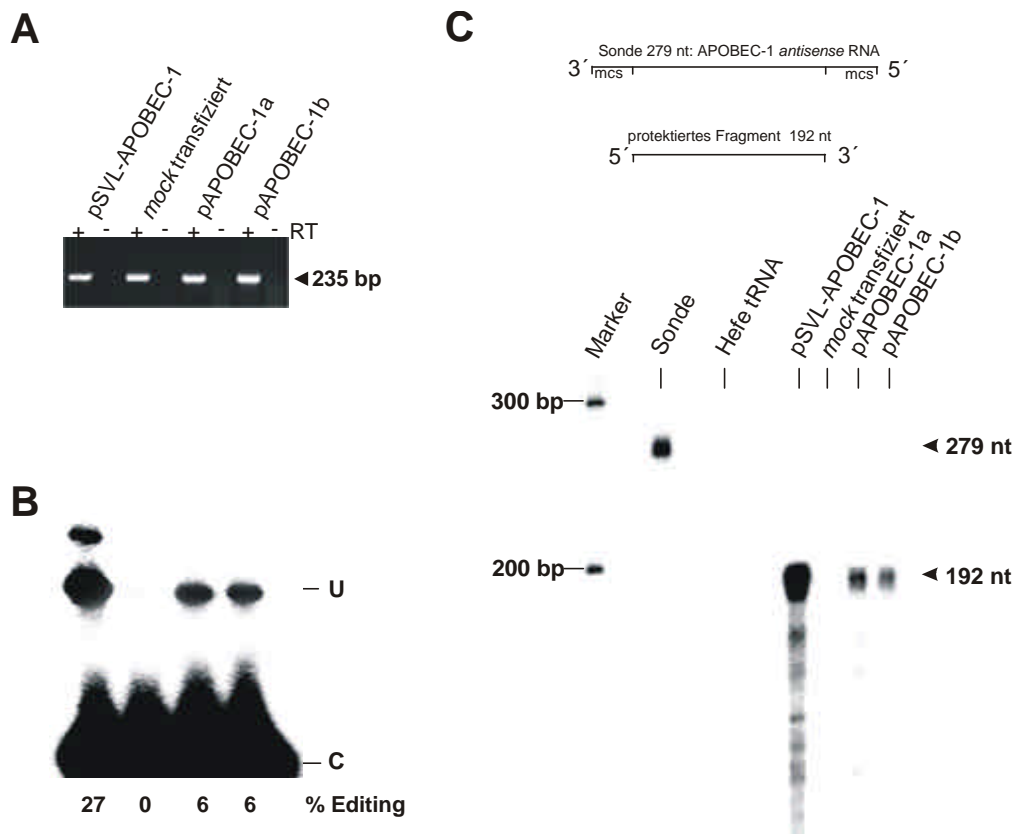
Das Minigen pAPOBEC-1 wurde aus dem leberspezifischen Promotor des Ratten APOBEC-1 Gens, dem offenen Leserahmen des Ratten APOBEC-1 Gens, der SV40 *small T antigen splice site* und dem SV40 Polyadenylierungssignal zusammengesetzt. Dieses Konstrukt, das eine Größe von 6,9 kb hat, ist in Abb. 5.1 schematisch dargestellt. Seine exakte Nukleotidsequenz ist im Anhang angegeben.



**Abb. 5.1: Konstrukt zur Expression von APOBEC-1 in humanen Hepatoma HuH7-Zellen.** Promotor: leberspezifischer Promotor des Ratten APOBEC-1 Gens; Ratten APOBEC-1 cDNA: cDNA des APOBEC-1 Gens der Ratte; Intron: 65 bp Intron; Poly(A)-Signal: SV40 Polyadenylierungssignal, Amp<sup>r</sup>: Gen für die Ampicillinresistenz.

## 5.2 *In vitro* Charakterisierung von pAPOBEC-1

Das Plasmid pAPOBEC-1 wurde transient in humane Hepatoma HuH-7 Zellen transfiziert, um die von pAPOBEC-1 induzierte Expression zu überprüfen. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pSVL-APOBEC-1 verwendet, von dem durch den SV40 Promotor eine sehr hohe Expression von APOBEC-1 induziert wird. Als Negativkontrolle diente das Plasmid pCMV- $\beta$ -Gal (*mock*), das durch den CMV-Promotor eine starke Expression von  $\beta$ -Galaktosidase erzeugt. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurde aus zellulärer Gesamt-RNA die Apo B mRNA durch RT-PCR selektiv amplifiziert (Abb. 5.2 A) und anschließend durch Primer Extensions Analyse auf Editing von Cytidin (C) zu Uridin (U) an der Nukleotidposition 6666 untersucht. In den mit pSVL-APOBEC-1 transfizierten HuH-7 Zellen waren etwa 27% der Apo B mRNA an dieser Position von C zu U editiert (Abb. 5.2 B).



**Abb. 5.2: Rekonstitution von Editing durch Transfektion von pAPOBEC-1 in humane Hepatoma HuH7-Zellen.**

**A:** Amplifikation der humanen Apo B mRNA mittels RT-PCR. Für jeden Ansatz wurde eine Kontroll-PCR (-) ohne Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,3%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. **B:** Die gereinigten Produkte wurden in die Primer Extensions Analyse eingesetzt. Die Extensions Produkte der Apo B mRNA, nicht editiert (C) und editiert (U), wurden in einem 8% Polyacrylamid Sequenziergel aufgetrennt. **C:** Zum Nachweis der APOBEC-1 mRNA wurde ein Ribonuklease Protektions Assay durchgeführt. In der Spur, die als Sonde bezeichnet wird, wurde die unverdaute *antisense* Sonde aufgetragen. Die RNA wurde in einem 5% Polyacrylamid Sequenziergel aufgetrennt. Desweiteren ist schematisch die RNA *antisense* Sonde und das protektierte Fragment illustriert.

In den mit pAPOBEC-1 transfizierten HuH-7 Zellen waren etwa 6% der Apo B mRNA an dieser Stelle editiert (Abb. 5.2 B). Apo B mRNA Editing konnte in untransfizierten HuH-7 Zellen (Daten nicht gezeigt) und in mit pCMV- $\beta$ -Gal transfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb.5.2 B).

Die Expression der APOBEC-1 mRNA in den transfizierten Zellen wurde durch Ribonuklease Protektions Assay bestimmt. Hierzu wurde  $^{32}\text{P}$  markierte APOBEC-1 *antisense* RNA (279 nt inklusive *Polylinker*) mit zellulärer Gesamt-RNA hybridisiert, nach Verdau mit Nukleasen in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiografie sichtbar gemacht. Durch Anlagerung von APOBEC-1 mRNA wird die *antisense* RNA vor Nuklease-Verdau geschützt und kann so auf dem Autoradiogramm mit einer Länge von 192 nt nachgewiesen werden. Die Struktur der APOBEC-1 *antisense* RNA und die Größe des durch Hybridisierung mit APOBEC-1 mRNA protektierten Fragments ist in Abb. 5.2 C schematisch dargestellt. Hybridisierung mit tRNA aus Hefe als Negativkontrolle führte nicht zur Protektion der *antisense* RNA, so dass auf dem Autoradiogramm keine Bande dargestellt werden konnte (Abb. 5.2 C). Nach Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus mit pSVL-APOBEC-1 als auch mit pAPOBEC-1 transfizierten Zellen konnte das erwartete protektierte Fragment der APOBEC-1 *antisense* RNA von 192 nt nachgewiesen werden (Abb. 5.2 C). Die Intensität dieser Bande war allerdings in den mit pSVL-APOBEC-1 transfizierten Zellen etwa 25-fach stärker als in den mit pAPOBEC-1 transfizierten Zellen. Die Gesamt-RNA der mit dem Kontroll-Konstrukt pCMV- $\beta$ -Gal transfizierten HuH-7 Zellen erzeugte hingegen, wie die tRNA-Kontrolle, keine Protektion der APOBEC-1 *antisense* RNA (Abb. 5.2 C).

### 5.3 Generierung und Identifikation von transgenen Kaninchen

Linearisiertes, gelgereinigtes pAPOBEC-1 (Abb. 5.3) wurde in 50 befruchtete Eizellen von New Zealand White (NZW)-Kaninchen mikroinjiziert. Nach Mikroinjektion wurden die Eizellen in ein Empfängertier transferiert. Insgesamt wurden nach Mikroinjektion in drei Würfen 14 lebende NZW-Kaninchen geboren.

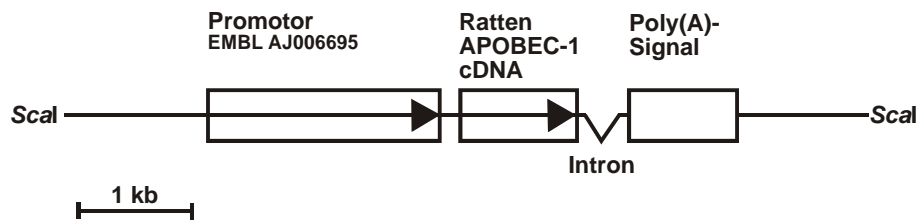
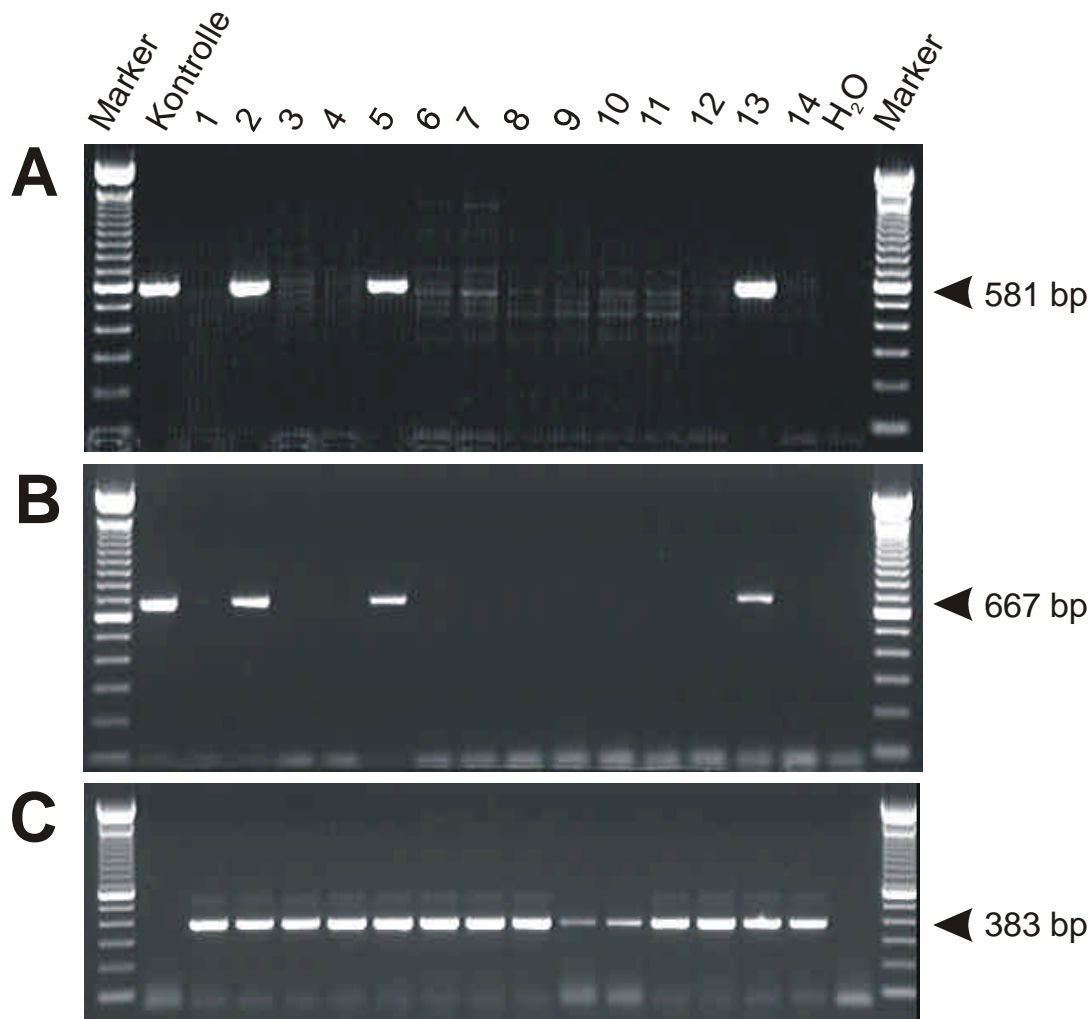


Abb. 5.3: Struktur des Minigens pAPOBEC-1. Linearisiert mit dem Restriktionsenzym *ScalI*

#### 5.3.1 Genotypisierung

Nach zwei Monaten wurden von diesen 14 Kaninchen Ohr-Biopsien entnommen und daraus DNA isoliert. Durch PCR wurde untersucht, ob pAPOBEC-1 in die genomische DNA integriert war. Es wurden pro Tier zwei voneinander unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt, eine in der Promotor-Region und die zweite am 3'-Ende von pAPOBEC-1. Für jedes Kaninchen wurde außerdem eine Kontroll-PCR durchgeführt, in der Exon 3 des endogenen Kaninchen APOBEC-1 Gens amplifiziert wurde, um die Qualität der DNA zu überprüfen (Abb. 5.4 C). Als Positivkontrolle für das Transgen wurde Plasmid-DNA von pAPOBEC-1 verwendet (Abb. 5.4).

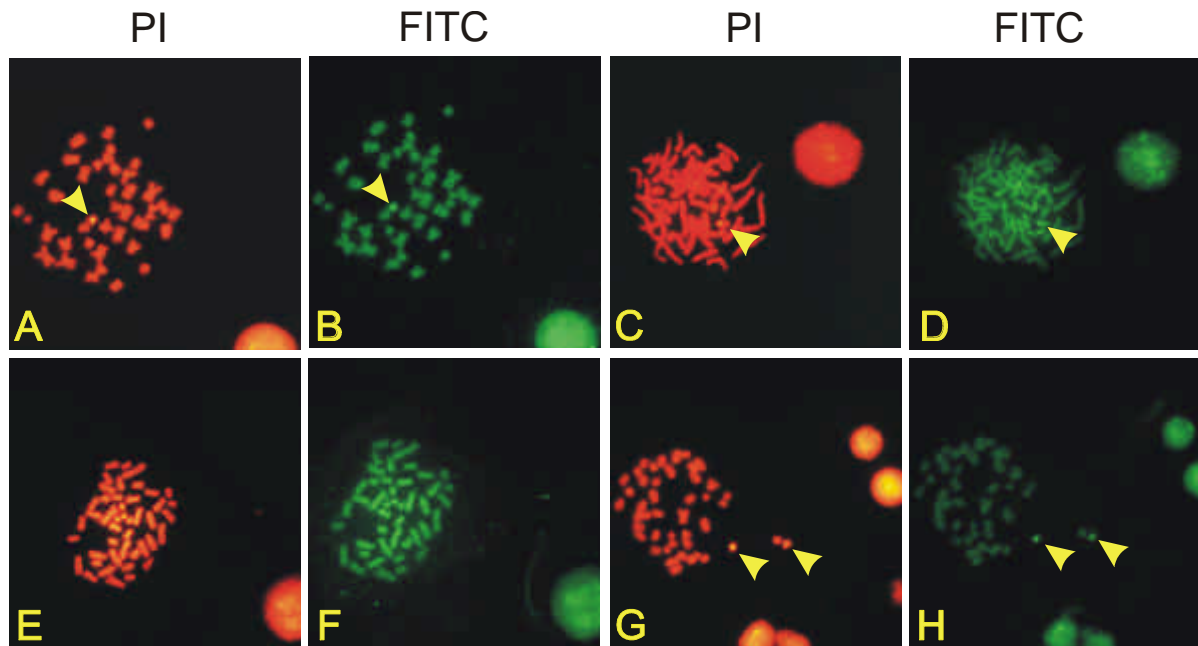
Aus der genomischen DNA der Kaninchen #2, #5 und #13 konnte sowohl der Promotor als auch das 3'-Ende von pAPOBEC-1 amplifiziert werden (Abb. 5.4 A und B). In allen anderen Kaninchen entstanden in den zwei pAPOBEC-1 spezifischen PCR-Reaktionen keine Produkte (Abb. 5.4. A und B). Exon 3 des endogenen APOBEC-1 Gens wurde in der genomischen DNA aller 14 Kaninchen amplifiziert (Abb. 5.4 C). Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Bestimmungen mit DNA aus zwei unterschiedlichen Biopsien bestätigt.



**Abb. 5.4: Identifikation von pAPOBEC-1 in den Kaninchen Nr. 1 bis 14 mittels PCR.** Marker: 100bp-Leiter; Kontrolle: 1 pg Plasmid-DNA als Positivkontrolle für pAPOBEC-1. Die PCR wurde mit je 300 ng genomischer DNA durchgeführt. **A:** Amplifikation eines 581 bp langen PCR-Produkts, welches die 5'-UTR und die cDNA des Transgens umspannte. **B:** Amplifikation eines 667 bp langen PCR-Produkts, welches die cDNA und die 3'-UTR umspannte. **C:** Als weitere Positivkontrolle wurden 383 bp von Exon 3 des endogenen APOBEC-1 Gens amplifiziert. Die Produkte wurden in einem 1,4%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

### 5.3.2 Chromosomale Lokalisation von pAPOBEC-1

Die chromosomale Lokalisation von pAPOBEC-1 in den transgenen Kaninchen wurde durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bestimmt. Die Chromosomen wurden aus den peripheren Lymphozyten der Kaninchen #2, #5 und #13 präpariert.



**Abb. 5.5:** Darstellung der chromosomalen Integration von pAPOBEC-1 in transgenen Kaninchen mittels FISH. Die Fluoreszenzsignale, dargestellt durch die Pfeile, zeigen den Ort der Integration von pAPOBEC-1 an. Von einer repräsentativen Metaphase wurde jeweils eine Aufnahme mit der Propidiumiodid-Färbung (PI) und mit dem Fluoreszin-Filter (FITC) angefertigt. **A** und **B**: Metaphase des *Founder*-Kaninchens #2 (Linie A) mit zwei Signalen in unmittelbarer Nachbarschaft auf einem Chromosom. **C** und **D**: Metaphase des *Founder*-Kaninchens #13 (Linie B) mit einem Signal. **E** und **F**: Bei der Metaphase des *Founder*-Kaninchens #5 (Linie C) konnte kein Signal generiert werden. **G** und **H**: Metaphase des homozygoten F2-Kaninchens der Linie A.

Die erhaltenen 22 Chromosomenpaare wurden mit dem Standard-Karyotyp des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) abgeglichen. Für die *in situ* Hybridisierung wurde die gesamte Plasmid-DNA von pAPOBEC-1 mit Biotin markiert. Nach Hybridisierung mit den Chromosomen wurden die Fluoreszenzsignale durch die Verwendung eines FITC-Filters im Lichtmikroskop detektiert. Bei Kaninchen #2 konnten zwei dicht beieinander liegende Integrationsorte von pAPOBEC-1 centromernah auf einem Chromosom sichtbar gemacht werden (Abb. 5.5 A und B). In den Chromosomen von Kaninchen #13 wurde nur eine einzige Integration von pAPOBEC-1 nachgewiesen. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bei Kaninchen #13 war so präzise, dass pAPOBEC-1 auf beiden Schwester-Chromatiden dieses Chromosoms nachgewiesen werden konnte. (Abb. 5.5 C und D). Überraschenderweise ergab

die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung der Chromosomen von Kaninchen #5, bei dem in der Genotypisierung durch PCR sowohl das 5'-Ende als auch das 3'-Ende von pAPOBEC-1 nachgewiesen werden konnte, keinerlei Signal (Abb. 5.5. E und F).

Allerdings konnte die chromosomale Lokalisation des Kaninchens #5 durch *in situ* Hybridisierung nicht bestimmt werden. Auch die Weitergabe des Transgens in die nächste Generation wurde nicht beobachtet, was den Schluss zulässt, dass es sich bei Kaninchen #5 um ein Mosaik handelt. Das bedeutet, dass das Transgen nicht in allen somatischen Zellen genomisch integriert ist und in diesem Fall auch nicht in der Keimbahn vorhanden war, so dass keine Weitergabe in die F1-Generation erfolgen kann. Bei der Herstellung von transgenen Tieren durch Mikroinjektion in befruchtete Oozyten ist die Entstehung von Mosaiken ein bekanntes Phänomen, das darauf beruht, dass das Transgen ungleichmäßig während der ersten Zellteilungen verteilt wird und nur in ausgewählten Zellen dieses frühen Entwicklungsstadiums dauerhaft verankert wird.



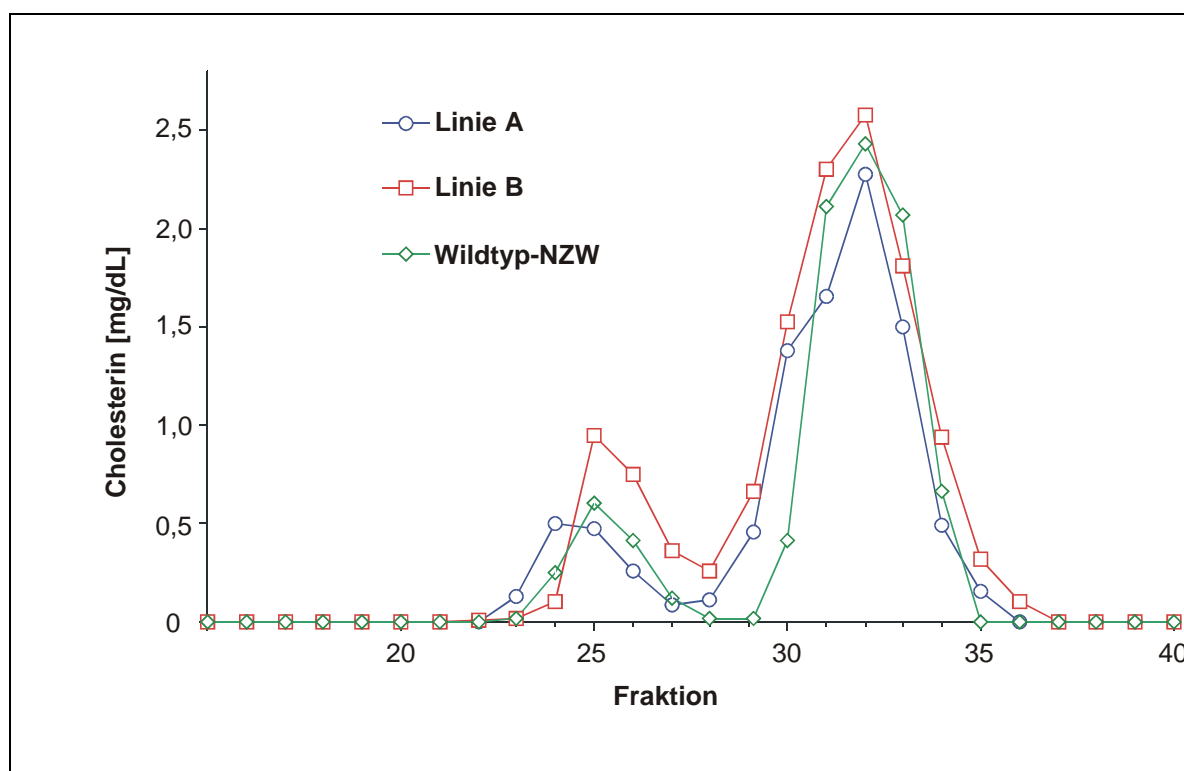
### 5.3.3 Etablierung von pAPOBEC-1 Kaninchen-Stämmen

Die Kaninchen #2 (*male*), #5 (*female*) und #13 (*female*) wurden mit Wildtyp-NZW Kaninchen verpaart. Von *Founder*-Kaninchen #2 wurden 38 F1-Kaninchen durch PCR genotypisiert. Von diesen 38 F1-Kaninchen waren 17 Kaninchen transgen für pAPOBEC-1, so dass PCR-Produkte für das 5'-Ende und das 3'-Ende von pAPOBEC-1 nachgewiesen werden konnten. Aus der Verpaarung von Kaninchen #13 wurden 28 F1-Kaninchen durch PCR genotypisiert. Von diesen 28 F1-Kaninchen waren 17 F1-Kaninchen transgen. Damit ergab sich bei der Zucht dieser beiden *Founder*-Kaninchen eine Weitergabe des Transgens bei etwa 50% der Nachkommen. Dieses entsprach damit dem Mendelschen Vererbungsgang. Von Kaninchen #5 wurden 26 F1-Nachkommen genotypisiert, aber bei keinem dieser Kaninchen konnte pAPOBEC-1 durch PCR nachgewiesen werden. Bei Kaninchen #5 konnte durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Blutlymphozyten keine Integration von pAPOBEC-1 in das Genom nachgewiesen werden und somit erfolgte keine Weitergabe von pAPOBEC-1 in die F1-Generation. Gleichwohl konnte in mehreren PCR-Analysen aus Ohr-Biopsien dieses Kaninchens zweifelsfrei pAPOBEC-1 durch PCR nachgewiesen werden.

Durch die Weiterzucht der *Founder*-Kaninchen #2 und #13 wurden zwei transgene Linien etabliert, die im folgenden als Linie A (*Founder*-Kaninchen #2) und Linie B (*Founder*-Kaninchen #13) bezeichnet werden. Von der Linie A wurden außerdem homozygote Kaninchen etabliert, die für das Transgen pAPOBEC-1 reinerbig sind. Die Homozygotie für pAPOBEC-1 wurde durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. Die FISH Analyse dieser Kaninchen zeigte die Integration von pAPOBEC-1 in den beiden allelen Chromosomen (Abb. 5.5 G und H). Die Homozygotie dieser Kaninchen für pAPOBEC-1 wurde darüber hinaus durch Verpaarung mit Wildtyp-Kaninchen bewiesen, da alle F1-Kaninchen jetzt transgen waren.

### 5.3.4 Lipidspiegel in den transgenen Kaninchen

Da Editing der Apo B mRNA in der Leber eine entscheidende Determinante der Lipoproteinverteilung im Blut ist, wurden die Lipoproteinkonzentrationen der transgenen Kaninchen bestimmt. Die Cholesterin-Konzentrationen der Kaninchen der Linie A betragen im Mittel  $68,9 \pm 17,6$  mg/dL, die der Linie B  $82,3 \pm 18,7$  mg/dL und die der homozygot transgenen Kaninchen der Linie A  $73,9 \pm 16,1$  mg/dL. Diese Werte unterschieden sich damit nicht wesentlich von den Cholesterin-Konzentrationen der Wildtyp-Kaninchen von im Mittel  $79,4 \pm 15,4$  mg/dL. Auch bei den Triglyzerid-Konzentrationen fanden sich bei den transgenen und Wildtyp-Kaninchen keine wesentlichen Unterschiede (Linie A:  $55,5 \pm 12,8$  mg/dL, Linie B:  $63,1 \pm 9,8$  mg/dL, homozygot Linie A:  $61,9 \pm 13,6$  mg/dL und Wildtyp:  $59,4 \pm 16,2$  mg/dL).



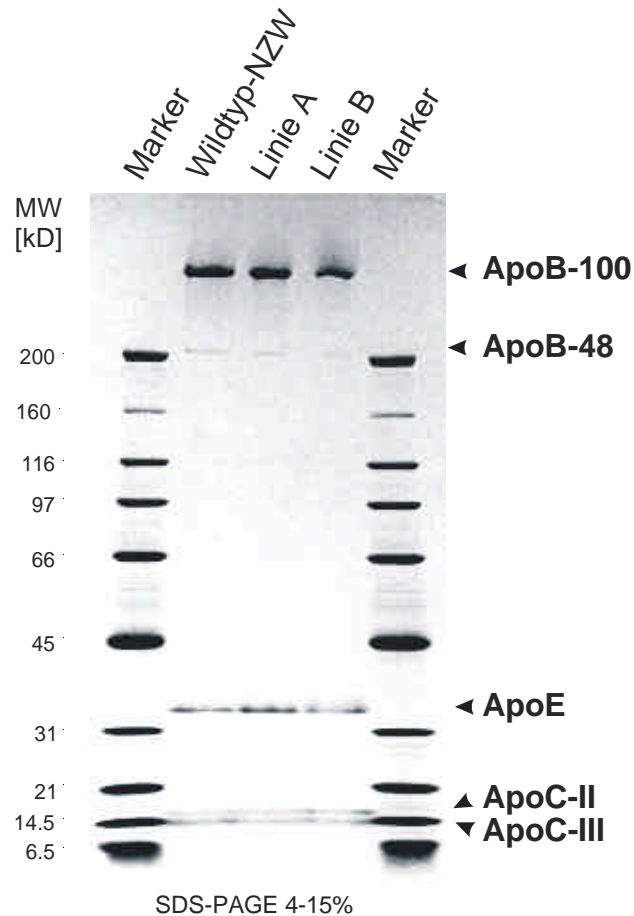
**Abb. 5.6: Darstellung der Verteilung von Cholesterin im Plasma bei transgenen und Wildtyp-Kaninchen.** 200  $\mu$ L Plasma wurden an einer Superose<sup>®</sup>-6 FPLC<sup>®</sup> in Anwesenheit von TBS aufgetrennt. Die erhaltenen 0,5-mL-Fraktionen wurden durch Lyophilisation auf das 10-fache konzentriert. Mit dem Monotest<sup>®</sup> (siehe 4.2.10) wurde der Gehalt an Cholesterin in den einzelnen Fraktionen photometrisch bestimmt. Das Profil setzt sich aus den Fraktionen Nr. 23-28 für LDL und Nr. 29-34 für HDL zusammen.

Als nächstes wurden deshalb die Konzentrationen der Lipoprotein-Subklassen bestimmt. *Low Density* Lipoproteine (LDL) und *High Density* Lipoproteine (HDL) wurden durch Gelfiltration an Superose<sup>®</sup>-6 FPLC<sup>®</sup> getrennt und über ihren Gehalt an Cholesterin quantifiziert. Ein typisches Elutionsprofil der Lipoproteine von Superose<sup>®</sup>-6 FPLC<sup>®</sup> ist in Abb. 5.6 dargestellt.

Die Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteine LDL eluieren in den Fraktionen 23-28, während die HDL, die als entscheidende Apoproteine Apo A-I und Apo A-II enthalten, in den Fraktionen 30-34 eluieren. Die Cholesterin-Konzentrationen der transgenen Kaninchen der Linie A betragen für LDL  $23,2 \pm 8,5$  mg/mL und für HDL  $36,5 \pm 9,8$  mg/mL, die der Linie B für LDL  $35,3 \pm 14,5$  mg/mL und für HDL  $48,2 \pm 13,4$  mg/mL. Diese Werte unterschieden sich damit nicht wesentlich von den Cholesterin-Konzentrationen der Wildtyp-Kaninchen von im Mittel  $28,4 \pm 12,1$  mg/mL für LDL und  $34,4 \pm 13,4$  mg/mL für HDL.

Die Apolipoproteine, der durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aus dem Kaninchen-Plasma isolierten VLDL wurden durch SDS-PAGE analysiert. In VLDL sind typischerweise Apo B-100, Apo E und C-Apoproteine enthalten. Nach Induktion von Editing der Apo B mRNA in der Leber können vom Kaninchen auch Apo B-48 enthaltende VLDL gebildet werden, die in der VLDL-Fraktion über den Gehalt von Apo B-48 identifiziert werden können (Greeve et al. 1996, Hughes et al. 1996). In den VLDL von normalen NZW-Kaninchen sind nur sehr geringe Mengen von Apo B-48 nachweisbar, die aus den, in der VLDL-Fraktion auch enthaltenen Chylomikronen, stammen (Greeve et al. 1993).

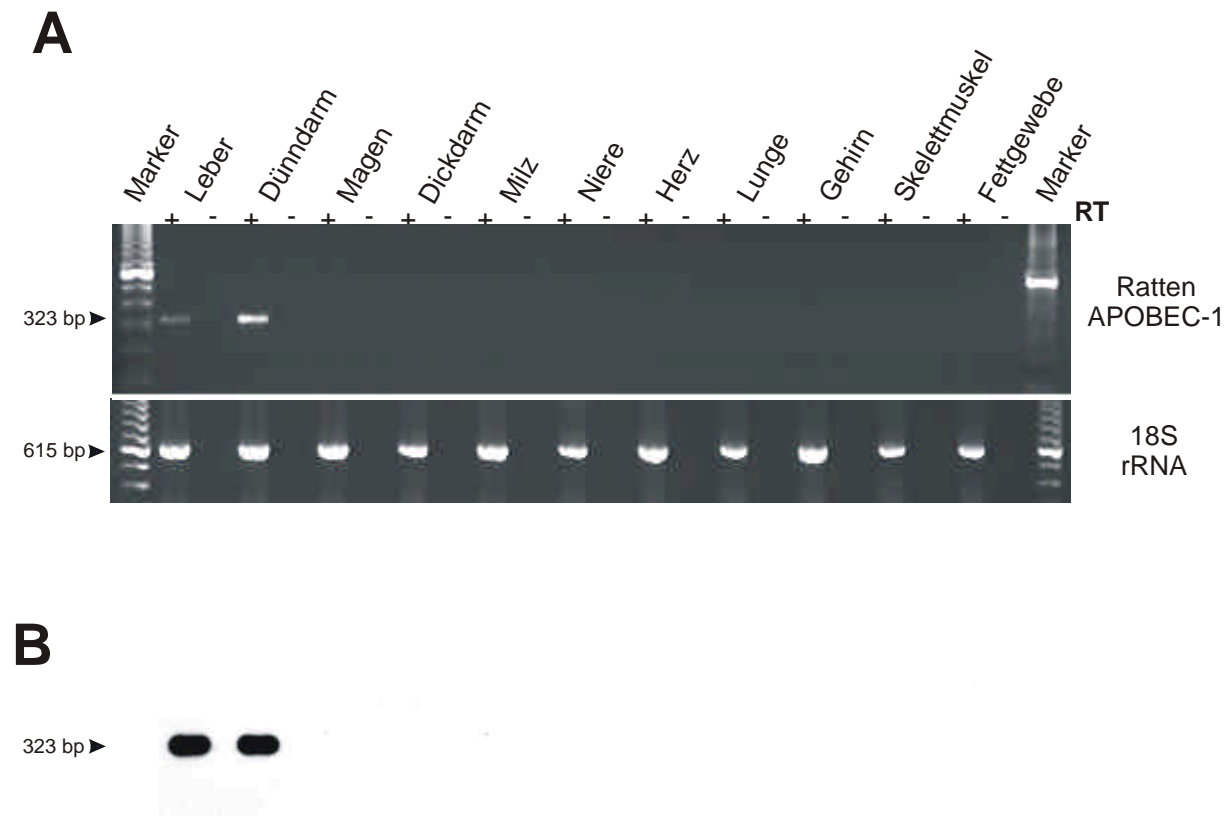
Bei den APOBEC-1 transgenen Kaninchen der Linie A und auch der Linie B war Apo B-100 die weit überwiegende Apo B-Form (Abb. 5.7). Apo B-48 wurde in den VLDL der transgenen Kaninchen nur zu einem sehr geringen Anteil gefunden, wie es auch in den VLDL von Wildtyp-Kaninchen nachgewiesen wurde (Abb. 5.7) Auch der Gehalt an Apo E und den C-Apoproteinen unterschied sich nicht bei den Wildtyp und den APOBEC-1 transgenen Kaninchen (Abb. 5.7).



**Abb. 5.7: Auftrennung der Lipoproteine nach Dichtezentrifugation.** Je 10  $\mu$ g der Lipoproteine wurden in einem 4-15% SDS-PAGE-Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie<sup>®</sup>-Blue angefärbt.

### 5.3.5 Charakterisierung der Expression von pAPOBEC-1

Die Expression der APOBEC-1 mRNA in den transgenen Kaninchen wurde durch RT-PCR bestimmt. Aus elf Geweben wurde die transgene APOBEC-1 mRNA der Kaninchen von Linie A und B mit einer sehr sensitiven und spezifischen RT-PCR analysiert. Für jedes Gewebe wurde eine Kontroll RT-PCR mit ribosomaler 18S RNA durchgeführt, um die Qualität der RNA zu überprüfen (Abb. 5.8).

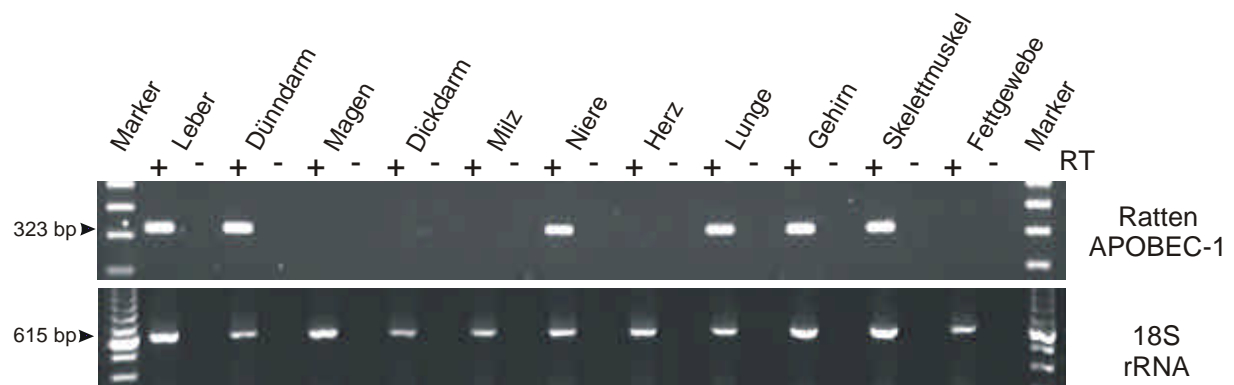


**Abb. 5.8: Expressionsprofil der Rattens APOBEC-1 mRNA in heterozygoten Kaninchen.** A: Zum Nachweis der APOBEC-1 mRNA wurde aus 11 verschiedenen Geweben eine RT-PCR durchgeführt. Darunter dargestellt ist die Kontroll-RT-PCR, in der jeweils ein 615 bp langes Produkt der 18S rRNA amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,6%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. B: Hybridisierung mit dem DIG markierten Oligonukleotid FAIIF und Detektion der Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm. Für jeden Ansatz wurde eine Kontroll-RT-PCR ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt.

Bei den heterozygoten (Hh) Kaninchen konnten in mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen nur in Leber und Dünndarm RT-PCR Produkte für die transgene APOBEC-1 mRNA nachgewiesen werden (Abb. 5.8 A). Diese RT-PCR Produkte aus Leber und

Dünndarm hybridisierten mit DIG markierten Oligonukleotiden, die hochspezifisch für die Ratten APOBEC-1 cDNA waren (Abb. 5.8 B). In keinem der anderen neun Gewebe konnte durch diese Hybridisierung ein weiteres RT-PCR Produkt sichtbar gemacht werden (Abb. 5.8 B). Die RNA aller Gewebe war jedoch von annähernd gleich guter Qualität, so dass aus jedem Gewebe die 18 S RNA ohne Probleme amplifiziert werden konnte (Abb. 5.8 A). Die RT-PCR Produkte aus Leber und Dünndarm wurden isoliert und kloniert. Die DNA-Sequenzierung bewies dann eindeutig, dass diese RT-Produkte von transgenen Ratten-APOBEC-1 mRNA Transkripten generiert wurden.

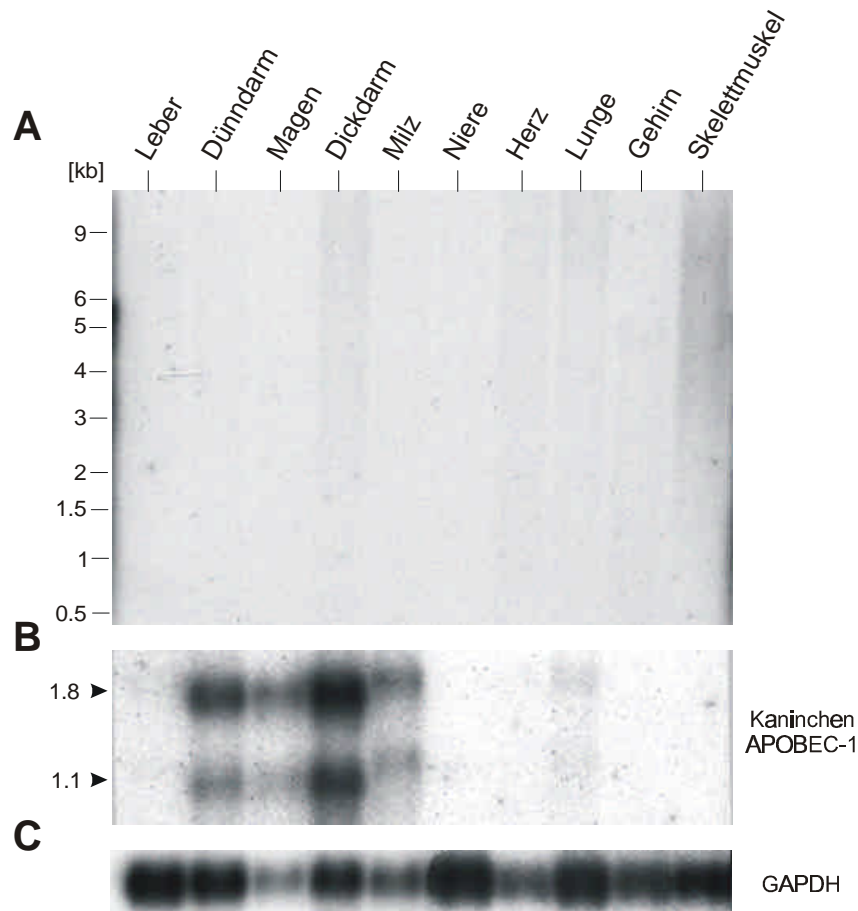
Bei den homozygoten (HH) transgenen Kaninchen der Linie A konnten durch RT-PCR außer in Leber und Dünndarm weitere RT-PCR Produkte in Niere, Lunge, Gehirn und Skelettmuskel nachgewiesen werden (Abb. 5.9). Als Kontrolle diente auch hier die ribosomale 18S RNA des Kaninchens (Abb. 5.9). Auch diese RT-PCR Produkte wurden kloniert. Die Sequenzierung der RT-PCR Produkte aus den homozygot transgenen Kaninchen bewies, dass diese RT-PCR Produkte von transgener Ratten APOBEC-1 mRNA stammten.



**Abb. 5.9: Expressionsprofil der Ratten APOBEC-1 mRNA in homozygoten Kaninchen.** Zum Nachweis der APOBEC-1 mRNA wurde aus 11 verschiedenen Geweben die RNA präpariert und revers transkribiert. Durch RT-PCR konnte in den homozygot transgenen Kaninchen ein Transkript von 323 bp nachgewiesen werden. Darunter dargestellt ist die Kontroll-RT-PCR in der jeweils ein 615 bp langes Produkt der 18S rRNA amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,6%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Für jeden Ansatz wurde ebenfalls eine Kontroll-RT-PCR ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt.

Die transgene APOBEC-1 mRNA wurde durch Northern Blot Experimente quantifiziert. Hierzu wurde aus 10 Geweben die mRNA isoliert, in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Durch Hybridisierung mit der  $^{32}\text{P}$  markierten cDNA der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde gezeigt, dass annähernd gleiche Mengen von mRNA aus jedem Gewebe analysiert wurden

(Abb. 5.10 C). Bei den homozygoten Kaninchen der Linie A konnte nach Hybridisierung mit einer Ratten-APOBEC-1 spezifischen Sonde auch nach einer längeren Expositionszeit kein Signal nachgewiesen werden (Abb. 5.10 A). Nach Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für die endogenen APOBEC-1 mRNA wurden zwei Banden mit Transkriptgrößen von 1.1 kb und 1.8 kb in Dünndarm, Magen, Dickdarm, Milz und Lunge sichtbar (Abb. 5.10 B). Nach längerer Expositionszeit konnten diese Transkripte auch im Skelettmuskel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Identische Resultate ergaben sich bei den Northern Blot Experimenten mit mRNA von heterozygoten Kaninchen der Linie A (Daten nicht gezeigt).



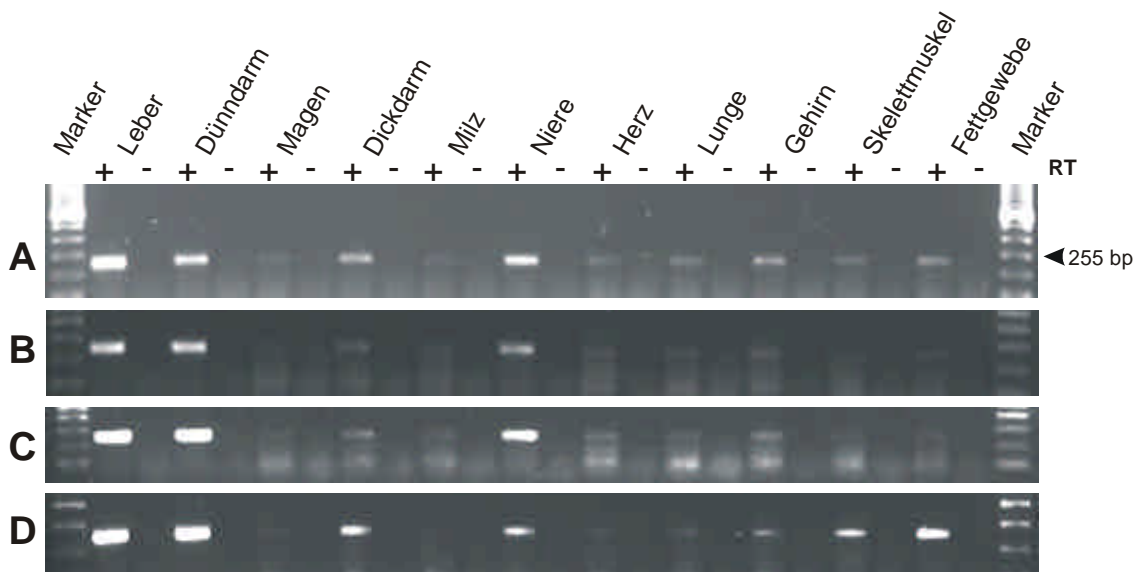
**Abb. 5.10: Northern Blot Analyse der transgenen APOBEC-1 Expression.** 3µg Poly-A-RNA von zehn verschiedenen Geweben der homozygot transgenen APOBEC-1 Kaninchen wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit den  $^{32}\text{P}$  markierten cDNA-Sonden für **A:** Ratten APOBEC-1, **B:** endogenes APOBEC-1 und **C:** als Ladungskontrolle mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert.

Ein Ribonuklease Protektions Assay wurde verwendet, um mit einem sehr sensitiven Verfahren die transgene APOBEC-1 mRNA zu quantifizieren. Hybridisierung der mRNA aus den 10 oben angegebenen Geweben der homozygot transgenen Kaninchen führte nicht zur Protektion von radioaktiv markierter Ratten APOBEC-1 *antisense* RNA und auf den Autoradiogrammen konnten keine RNA-Banden nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach Hybridisierung der *antisense* RNA mit Gesamt-RNA von mit pAPOBEC-1 transient

transfizierten HuH-7 Zellen konnte das protektierte Fragment von 192 Nukleotiden eindeutig identifiziert werden (Abb. 5.2 C). Die transgene Ratten-APOBEC-1 mRNA in der Leber der transgenen Kaninchen lag also unterhalb der Nachweisgrenze des zum quantitativen Nachweis von APOBEC-1 eingesetzten Ribonuklease Protektions Assays.

### 5.3.6 Apo B mRNA Editing in transgenen Kaninchen

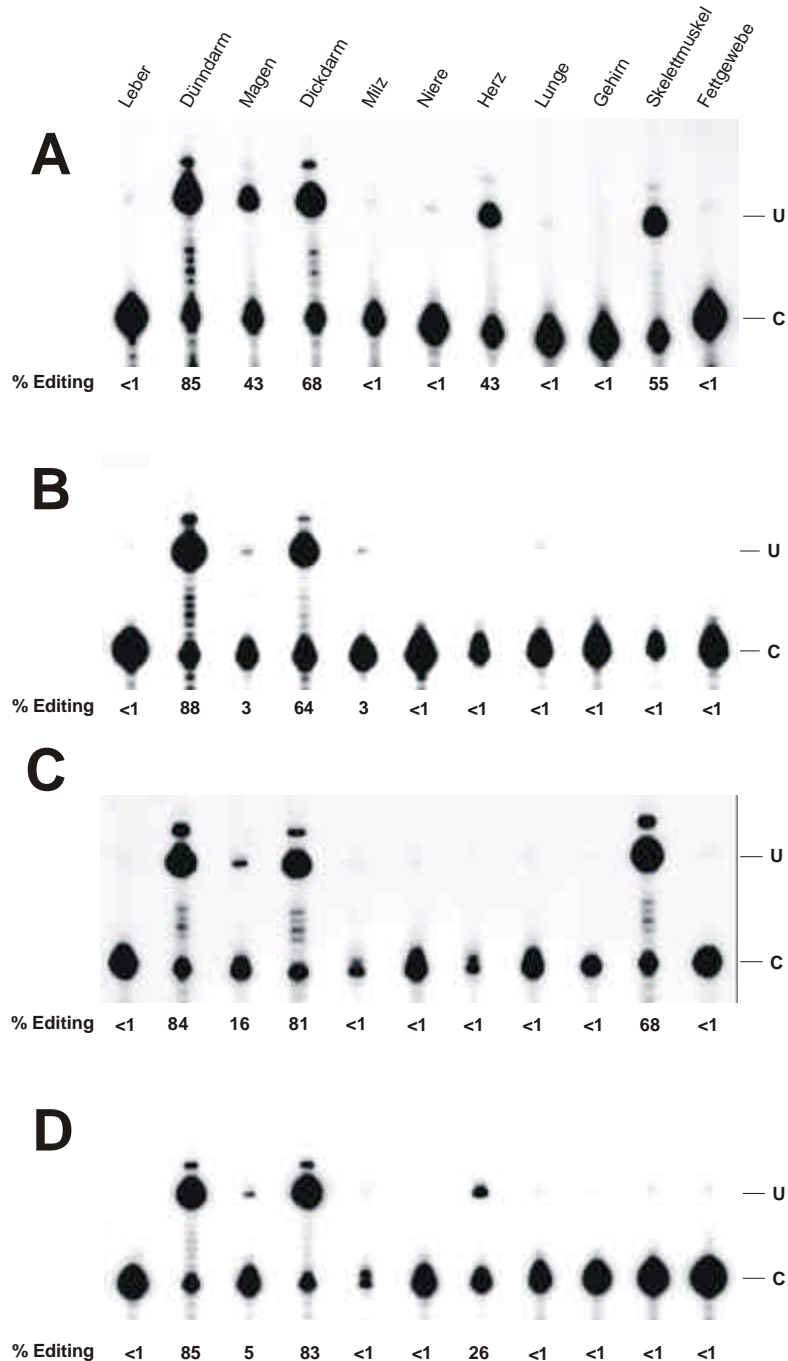
Die Apo B mRNA wurde durch RT-PCR aus den verschiedenen Geweben von homozygot und heterozygot transgenen Kaninchen und von Wildtyp-Kaninchen amplifiziert und anschließend durch Primer Extensions Analyse auf Editing an Nukleotidposition C6666 untersucht. Die Apo B RT-PCR ergab starke Banden in Leber, Dünndarm und Niere, in denen die Apo B mRNA hoch exprimiert wird (Abb. 5.11). In den übrigen Organen (Magen, Dickdarm, Milz, Herz, Lunge, Gehirn, Skelettmuskel und Fettgewebe) wurden durch die Apo B RT-PCR nur vergleichsweise schwache Banden mit wechselnder Stärke erzeugt (Abb. 5.11). Nach Aufreinigung und Konzentrierung konnte aber aus allen Geweben genügend Apo B cDNA für die Primer Extensions Analyse hergestellt werden.



**Abb. 5.11: Expression der Apo B mRNA in transgenen und Wildtyp-Kaninchen.** Aus 11 Geweben wurde die RNA präpariert, mit dem Oligonukleotid ApoB R2 revers transkribiert und in einer PCR ein 255 bp langes Produkt amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,6%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. RT-PCR des Kaninchens **A**: homozygot der Linie A, **B**: heterozygot der Linie A, **C**: heterozygot der Linie B, **D**: Wildtyp. Für jeden Ansatz wurde eine Kontroll-RT-PCR ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt.



Bei den homozygoten Kaninchen der Linie A wurde die Apo B mRNA in Dünndarm (85%), Magen (43%), Dickdarm (68%), Herz (43%) und Skelettmuskel (55%) editiert (Abb. 5.12 A). Apo B mRNA Editing konnte in Leber, Milz, Niere, Lunge, Gehirn und Fettgewebe nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.12 A).



**Abb. 5.12: Primer Extensions Analyse des Apo B mRNA Editing in den Geweben von transgenen und Wildtyp-Kaninchen.** Die RT-PCR Produkte wurden über S-300 MicroSpin gereinigt und in die Primer Extensions Analyse eingesetzt. Die Extensions Produkte, nicht editiert (C) und editiert (U), wurden in einem 8% Polyacrylamid Sequenziergel aufgetrennt und autoradiografiert. Es wurden jeweils 11 Gewebe von folgenden Tieren analysiert: **A:** homozygot der Linie A, **B:** heterozygot der Linie A, **C:** heterozygot der Linie B und **D:** Wildtyp-Kaninchen.

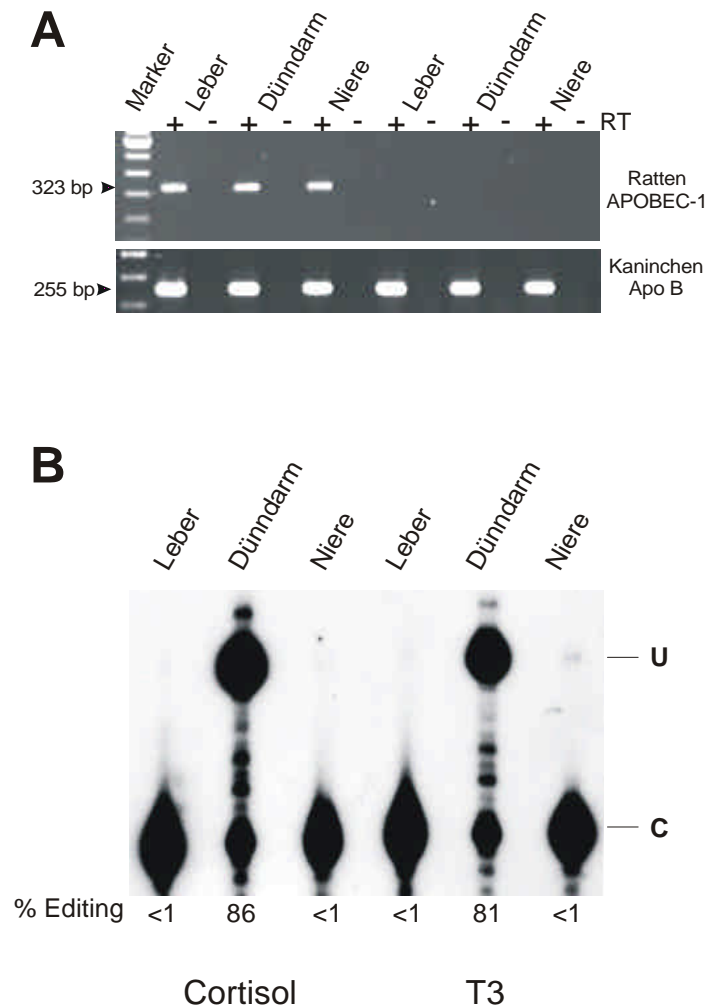
Bei den heterozygoten Kaninchen der Linie A wurde die Apo B mRNA ebenfalls in Dünndarm (88%), Magen (3%), Dickdarm (64%) und Milz (3%) editiert (Abb. 5.12 B). Wiederum wurde Editing der Apo B mRNA in Leber, Niere, Herz, Lunge, Gehirn, Skelettmuskel und Fettgewebe nicht beobachtet (Abb. 5.12 B). In den transgenen Kaninchen der Linie B konnte Editing der Apo B mRNA in Dünndarm (84%), Magen (16%), Dickdarm (83%) und Skelettmuskel (68%) nachgewiesen werden (Abb. 5.12 C).

Die Apo B mRNA wurde auch hier in Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge, Gehirn und Fettgewebe nicht editiert (Abb. 5.12 C). Die Analyse der Wildtyp-Kaninchen ergab, dass die Apo B mRNA in Dünndarm (85%), Magen (5%), Dickdarm (83%) und Herz (26%) editiert wurde (Abb. 5.12 D). Apo B mRNA Editing konnte in Leber, Milz, Niere, Lunge, Gehirn, Skelettmuskel und Fettgewebe nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.12 D).

Überraschenderweise war Apo B mRNA Editing im Skelettmuskel der homozygoten Tiere der Linie A (55%) und der heterozygoten Tiere der Linie B (68%) nachgewiesen worden. (Abb. 5.12 A und C). Dieses Phänomen wurde in fünf Wildtyp-Kaninchen überprüft. Es zeigte sich, dass die Apo B mRNA hier im Skelettmuskel ebenfalls zu  $44 \pm 9,5\%$  editiert war.

### 5.3.7 Experimente zur pAPOBEC-1-Regulation in F1-Kaninchen

Da die Expression von APOBEC-1 mRNA in der Rattenleber durch Hormone reguliert ist, wurden Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, ob dies auch in APOBEC-1 transgenen Kaninchen der Fall ist. Hierzu wurden die heterozygot transgenen Kaninchen der Linie A mit dem Schilddrüsenhormon (T3) oder mit Hydrocortison über einen Zeitraum von sieben Tagen behandelt.

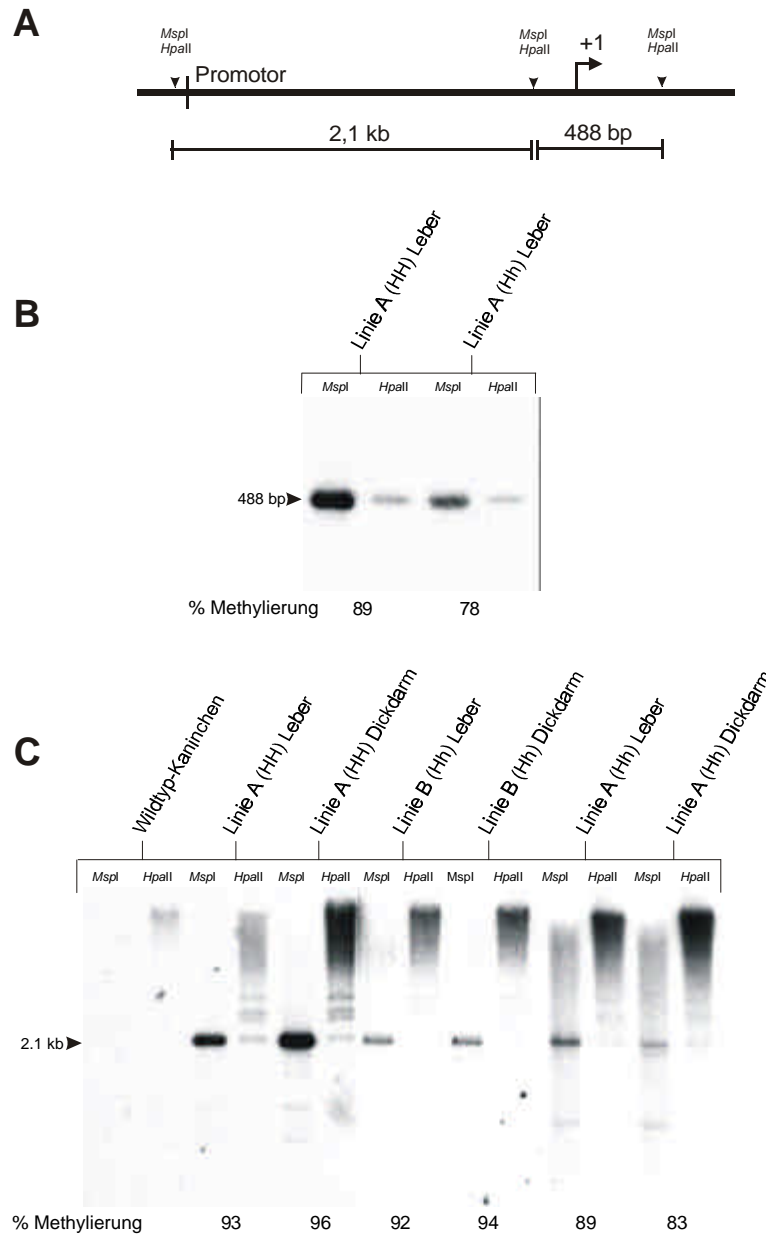


**Abb. 5.13: Expression der Ratten APOBEC-1 mRNA in hormonbehandelten Kaninchen.** **A:** Zum Nachweis der APOBEC-1 mRNA wurde aus 3 verschiedenen Geweben eine RT-PCR durchgeführt. In den Spuren 1 bis 6 sind die Produkte des mit Cortisol behandelten Kaninchens aufgetragen. Daneben sind in den Spuren 7 bis 12 die Amplifikate des mit T3 behandelten Kaninchens aufgetragen. Darunter dargestellt ist die Kontroll-RT-PCR, in der jeweils ein 255 bp langes Produkt der Apo B mRNA amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,6%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Für jeden Ansatz wurde eine Kontroll-RT-PCR ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt. **B:** Es wurde die Apo B mRNA aus Leber, Dünndarm und Niere durch RT-PCR amplifiziert und anschließend in der Primer Extensions Analyse untersucht. Die Extensions Produkte, nicht editiert (C) und editiert (U), wurden in einem 8% Polyacrylamid Sequenziergel aufgetrennt und autoradiografiert.

Das Gewicht und der Hormonstatus der Tiere wurde zu Beginn und am siebten Tag der Behandlung bestimmt. Nach siebentägiger Gabe von Hydrocortison stieg die Cortisol-Konzentration im Plasma auf etwa den 10-fachen Wert an. Die T3-Konzentration und das Gewicht der transgenen Kaninchen änderte sich nach Gabe von Hydrocortison nicht. Nach Gabe von T3 für 7 Tage fanden sich im Blut etwa 20-fach erhöhte T3-Spiegel, die mit einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*) gemessen wurden. Bei Gabe von T3 stiegen auch die Cortisol-Konzentrationen im Blut an, die etwa um den Faktor 100 erhöht waren. Das Körpergewicht des Kaninchens fiel innerhalb dieser Tage um etwa 10%. Bei dem mit T3 behandelten Kaninchen lag damit eine artifiziell erzeugte Hyperthyreose vor. Nach 7 Tagen wurden beide Kaninchen getötet und aus Leber, Dünndarm und Niere Gesamt-RNA präpariert. In dem mit Hydrocortison behandelten Tier konnte nicht nur aus Leber und Dünndarm, sondern auch aus der Niere durch RT-PCR die mRNA des transgenen Ratten APOBEC-1 amplifiziert werden (Abb. 5.13 A). In den heterozygoten Kaninchen der Linie A konnte unter physiologischen Bedingungen transgene APOBEC-1 mRNA nur in Leber und Dünndarm nachgewiesen werden. In dem mit T3 behandeltem Kaninchen konnte in keinem der drei Organe mit der identischen, sehr sensitiven RT-PCR transgene APOBEC-1 mRNA amplifiziert werden (Abb. 5.13 A). Apo B mRNA konnte ohne Probleme aus allen drei Organen dieser beiden Kaninchen durch RT-PCR amplifiziert werden (Abb. 5.13 A). Diese Apo B RT-PCR bewies damit, dass die RNA aus allen Organen in vergleichbarer Qualität isoliert worden war. In dem hyperthyreoten Kaninchen kam es offensichtlich zu einem vollständigen Verlust der transgenen Expression von APOBEC-1 in Leber und Dünndarm. Die Apo B cDNA aus den drei Geweben dieser beiden Kaninchen wurde durch Primer Extensions Analyse auf Editing untersucht (Abb. 5.13 B). Wie in unbehandelten Wildtyp-Kaninchen konnte Editing der Apo B mRNA nur im Dünndarm, nicht aber in Leber oder Niere gefunden werden, auch nicht bei dem mit Cortisol behandelten Kaninchen, bei dem die Hochregulation des Transgens in der Niere beobachtet worden war (Abb 5.13B).

### 5.3.8 Methylierungsanalyse durch *MspI/HpaII* Restriktion

Mit den Restriktionsendonukleasen *HpaII* (schneidet CCGG, jedoch nicht C<sup>m</sup>CGG) und *MspI* (schneidet beide Sequenzen) kann der Grad und das Muster der Methylierung von 5'-CpG-3'-Dinukleotiden (CpG) in genomischer DNA orientierend bestimmt werden.



**Abb. 5.14: Methylierungsanalyse der *MspI/HpaII* Schnittstelle des Promotors von pAPOBEC-1.**

**A:** Schematische Darstellung der Lage der <sup>32</sup>P markierten Sonden zum Promotor. 10 µg genomische DNA wurden mit dem Restriktionsenzym *MspI* oder *HpaII* geschnitten und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch Southern-Transfer und Hybridisierung mit Promotor spezifischen <sup>32</sup>P markierten Sonden wurden diese Fragmente detektiert und quantifiziert. Durch Vergleich der Intensität der *MspI* Spur mit der *HpaII* Spur wurde der Grad der Methylierung dieser Schnittstelle bestimmt. **B:** Analyse der Schnittstellen an Position -240 und +244 nt. **C:** Analyse der Schnittstellen an der Klonierungsstelle und an Position -240 nt vor dem Transkriptionsstart.

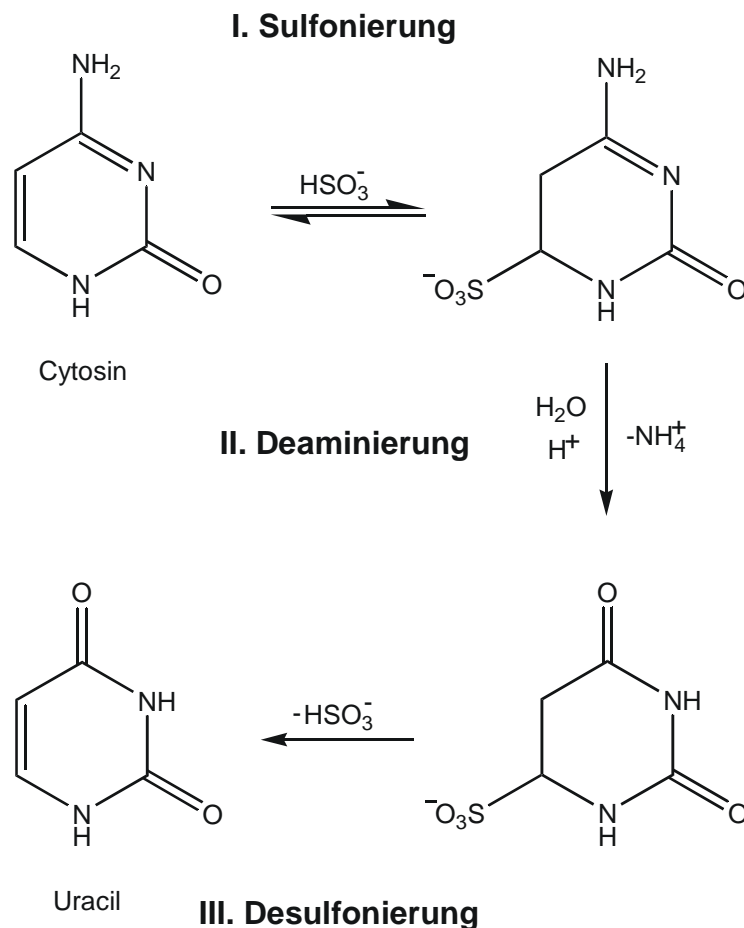
In der Promotor-Sequenz von pAPOBEC-1 befindet sich eine *MspI/HpaII* Schnittstelle an Position -240 nt vor der Transkriptionsstartstelle (Abb. 5.14 A). Eine zweite *MspI/HpaII* Schnittstelle befindet sich in der cDNA-Sequenz von pAPOBEC-1 an Nukleotidposition +244 nt und eine dritte unmittelbar an der Klonierungsstelle des Promotor-Fragments in der Vektorsequenz, die im Transgen noch enthalten ist (Abb. 5.14 A).

Genomische DNA der transgenen Kaninchen wurde deshalb mit *HpaII* oder *MspI* verdaut, anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde, spezifisch für das distale *MspI/HpaII* Restriktions-Fragment, konnte dann untersucht werden, ob pAPOBEC-1 in der genomischen DNA an den beiden distalen *MspI/HpaII* Restriktionsschnittstellen von *MspI* beziehungsweise *HpaII* geschnitten werden kann. Eine Bande von 488 Basenpaaren hybridisierte nur dann mit der Sonde, wenn pAPOBEC-1 an beiden Schnittstellen vom jeweiligen Restriktions-Enzym geschnitten worden war. Durch Vergleich der Intensität dieser Bande in mit *MspI* verdauter DNA (schneidet methylierte und unmethyliertes CCGG) mit der Bande in mit *HpaII* verdauter DNA (schneidet nur unmethylierte DNA) kann das Ausmaß der DNA Methylierung an diesen beiden distalen *MspI/HpaII* Restriktionsschnittstellen gemessen werden. In der DNA aus der Leber eines homozygot und eines heterozygot transgenen Kaninchens der Linie A hybridisierte die erwartete 488 bp Bande nach Verdau mit *MspI* sehr stark mit dem radioaktiv markierten Promotorfragment, war aber nach Verdau mit *HpaII* nur vergleichsweise schwach sichtbar (Abb. 5.14 B). Die Quantifizierung der Signalintensität dieser beiden Banden ergab, dass bei dem homozygot transgenen Kaninchen in der Leber die beiden distalen *MspI/HpaII* Schnittstellen in 89% der genomisch integrierten pAPOBEC-1 Minigene methyliert waren (Abb. 5.14 B). In der Leber des heterozygot transgenen Kaninchens waren in 78% der pAPOBEC-1 Integrationen diese beiden distalen *MspI/HpaII* Restriktions-Schnittstellen methyliert (Abb. 5.15 B). Das durch *MspI* generierte Fragment ist in dem homozygot transgenen Kaninchen deutlich stärker als in dem heterozygot transgenen Kaninchen, obwohl identische Mengen von genomischer DNA verdaut wurden und der Verdau komplett war, da die genomische DNA im Agarosegel nach Färbung mit Ethidiumbromid komplett fragmentiert war (Daten nicht gezeigt). Die Stärke der Intensität der Bande korreliert damit zu der doppelten Kopie-Zahl von pAPOBEC-1 in den homozygot transgenen Kaninchen verglichen mit den einfach heterozygot transgenen Tieren. In einer zweiten Serie wurde dann untersucht, ob die beiden proximalen *MspI/HpaII* Restriktions-Schnittstellen in vergleichbarer Weise methyliert sind. Genomische DNA aus der Leber von Wildtyp-Kaninchen, aus Leber und Dickdarm von homozygot und heterozygot transgenen Kaninchen der Linie A und von heterozygot transgenen Kaninchen der Linie B wurden mit *MspI* oder *HpaII* verdaut und nach Southern-Transfer mit einer Sonde spezifisch für das

Restriktions-Fragment von 2.1 kb zwischen den beiden proximalen Schnittstellen hybridisiert. Wiederum war diese 2.1 kb Bande in der Leber und auch im Dickdarm in den homozygot und den heterozygot transgenen Kaninchen wesentlich stärker in der mit *MspI* verdauten DNA (Abb. 5.14 C). Die Quantifizierung der Intensität dieser beiden Banden ergab, dass in Leber und Dickdarm der transgenen Kaninchen >90% der pAPOBEC-1 Integrationen an beiden proximalen *MspI/HpaII* Schnittstellen methyliert waren (Abb. 5.14 C). Als Negativkontrolle wurde genomische DNA von Wildtyp-Kaninchen verwendet, um die Spezifität der Analyse zu beweisen. Deutlich zu sehen ist wiederum die generell stärkere Intensität dieser 2.1 kb Bande in dem homozygot transgenen Kaninchen verglichen zu den heterozygoten Tieren. Auch bei diesem Experiment wurden exakt identische Mengen von genomischer DNA mit dem jeweiligen Restriktionsenzym komplett verdaut, wie durch Ethidiumbromid-Färbung der Agarosegele gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.9 Methylierungsanalyse durch Sequenzierung von genomischer DNA

Die Methylierung von CpGs im Promotor von pAPOBEC-1 wurde durch Sequenzierung von mit Bisulfit behandelter DNA weiter untersucht. Durch Natriumbisulfit wird in der genomischen DNA Cytosin zu Uracil deaminiert. 5-Methylcytosin ist vor dieser chemischen Reaktion geschützt und wird nicht zu Uracil deaminiert (Abb. 5.15).

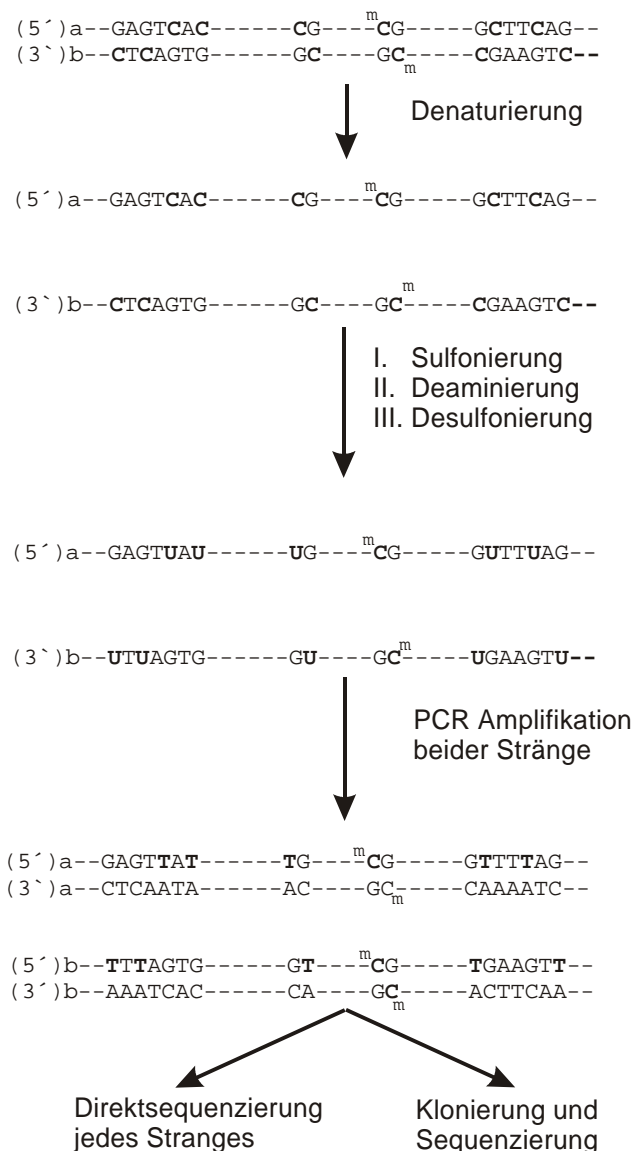


**Abb. 5.15: Darstellung des Reaktionsweges der Bisulfit-Reaktion.** Die Konversion von Cytosin zu Uracil gliedert sich in drei Reaktionsschritte: I. Sulfonierung, II. Deaminierung und III. Desulfonierung (Shapiro et al., 1974).

Nach Behandlung mit Natriumbisulfit wird die DNA gereinigt. Die auf das Vorhandensein von 5-Methylcytosin zu analysierenden DNA-Abschnitte werden durch PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die an den C-Positionen degeneriert sind und statt C hier T enthalten, amplifiziert. Die PCR-Produkte werden gereinigt und für die PCR-Sequenzierung eingesetzt. Durch Verwendung von *sense* Oligonukleotiden in der PCR-Sequenzierung wird jedes unmethylierte Cytosin als Thymin sequenziert. Die 5-Methylcytosine, die durch das Bisulfit nicht verändert worden sind, werden hingegen weiterhin als Cytosin sequenziert. Bei

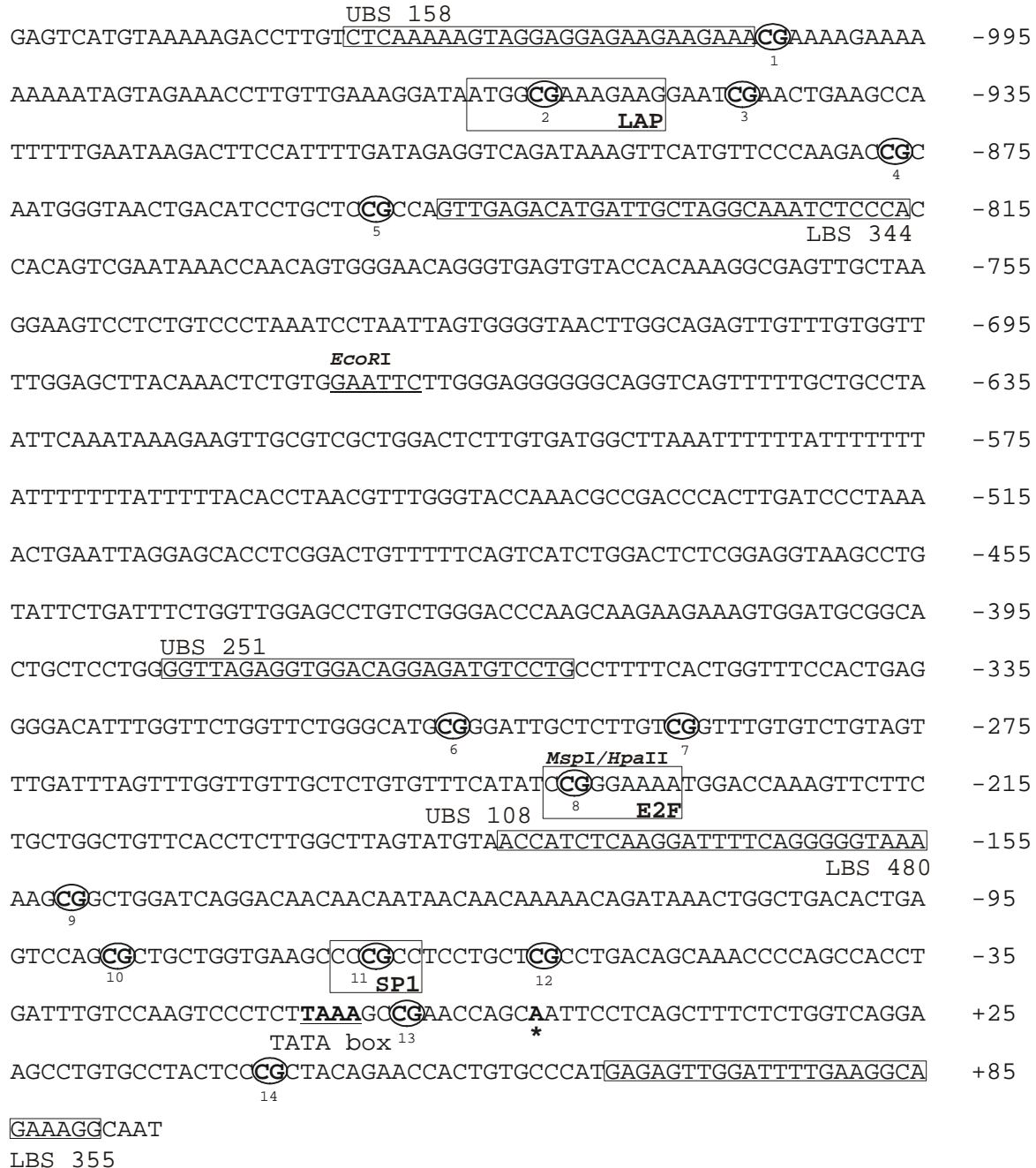


Verwendung von für den Gegenstrang spezifischen Oligonukleotiden (*antisense* Oligonukleotide) werden alle Guanine, die komplementär zu unmethyliertem Cytosin (d.h. Uracil in Bisulfit-behandelter DNA) eingebaut werden, als Adenin sequenziert, während die Guanine, die komplementär zu Methylcytosinen eingebaut werden, weiterhin als Guanin sequenziert werden. Durch dieses Verfahren können damit alle 5-Methylcytosine in einer gegebenen DNA-Sequenz direkt bestimmt werden. Das Verfahren ist semiquantitativ und kann anteilmäßig Methylcytosine an einer gegebenen Cytosin-Position bis zu einem Prozentsatz von etwa 10% erfassen. Das Prinzip der Bestimmung von Methylcytosinen in genomischer DNA durch PCR-Sequenzierung von mit Bisulfit-behandelter DNA ist in Abbildung 5.16 schematisch dargestellt.



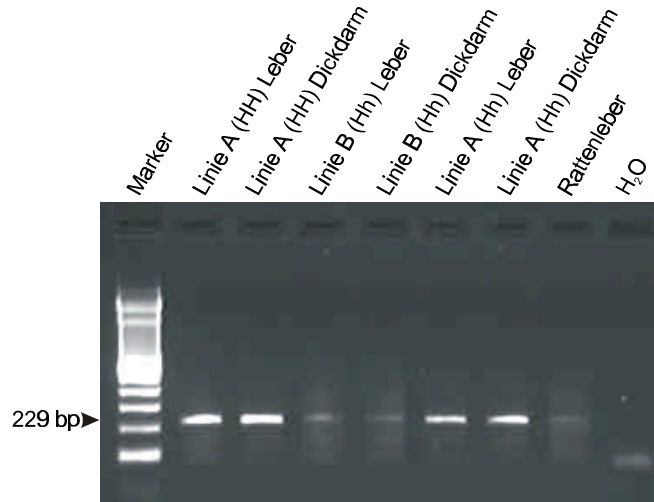
**Abb. 5.16: Sequenzierung Bisulfit behandelte genomischer DNA.** Die beiden Stränge der genomischen DNA sind als (a) und (b) bezeichnet. Die sich ändernde Base Cytosin und die daraus resultierenden Basen Uracil und Thymin sind fett dargestellt. Durch die Bisulfit-Reaktion wurden zwei voneinander unabhängige DNA Stränge (a) und (b) erhalten, die so amplifiziert und sequenziert wurden.

Zunächst wurde der Bereich von Nukleotidposition -385 bis -156 nt vor dem Transkriptionsstart des Promotors amplifiziert, um die Ergebnisse aus der *MspI/HpaII* Restriktion zu bestätigen (Abb. 5.17).

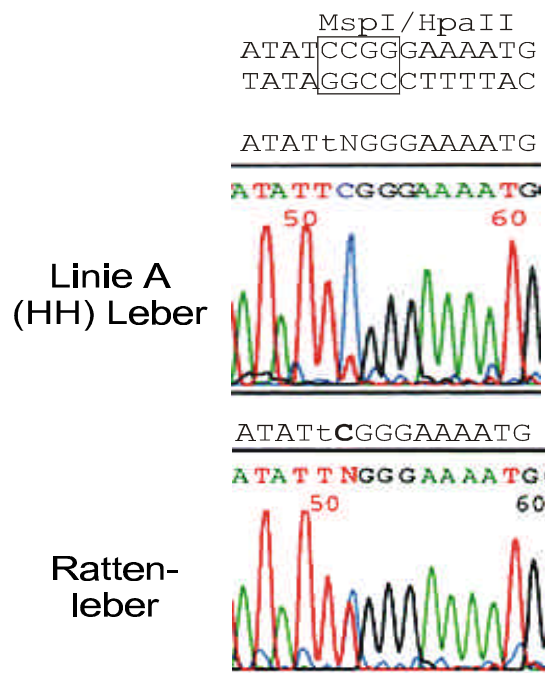


**Abb. 5.17: Nukleotidsequenz des APOBEC-1 Rattenpromotors.** Die Lage der degenerierten Oligonukleotide für die CD-PCR sind umrahmt dargestellt. Die putativen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren LAP, E2F und Sp1 sind durch Kästen illustriert. Die analysierten CpG-Dinukleotide sind fortlaufend nummeriert und umkreist. Die TATA-Box ist unterstrichen und fett gedruckt. Die Transkriptionsstartstelle ist mit einem (\*) gekennzeichnet.

Die PCR-Amplifikation der Promotor-Regionen von pAPOBEC-1 war wesentlich effektiver bei Verwendung von genomischer DNA der homozygot transgenen Kaninchen verglichen mit den heterozygot transgenen Kaninchen, wie durch Färbung der PCR-Produkte mit Ethidiumbromid gezeigt wurde (Abb. 5.18).



**Abb. 5.18: Amplifikation des Bereiches um die *MspI/HpaII* Schnittstelle mittels CD-PCR.** Es wurden 100 ng der genomischen DNA eingesetzt, und ein 229 bp langes Produkt amplifiziert. Die Produkte wurden in einem 1,4%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt.



**Abb. 5.19: Methylierungsanalyse der *MspI/HpaII* Schnittstelle.** Die Sequenzen der Bisulfit-behandelten DNA aus dem Gewebe der Leber von pAPOBEC-1 homozygot transgenen Kaninchen und der Rattenleber sind dargestellt. Die Erkennungssequenz der Schnittstelle ist durch einen Rahmen illustriert. Die nicht methylierten Cytosin-Reste sind nach Bisulfit-Konversion als klein t dargestellt und methylierte erscheinen als C oberhalb der Sequenz.

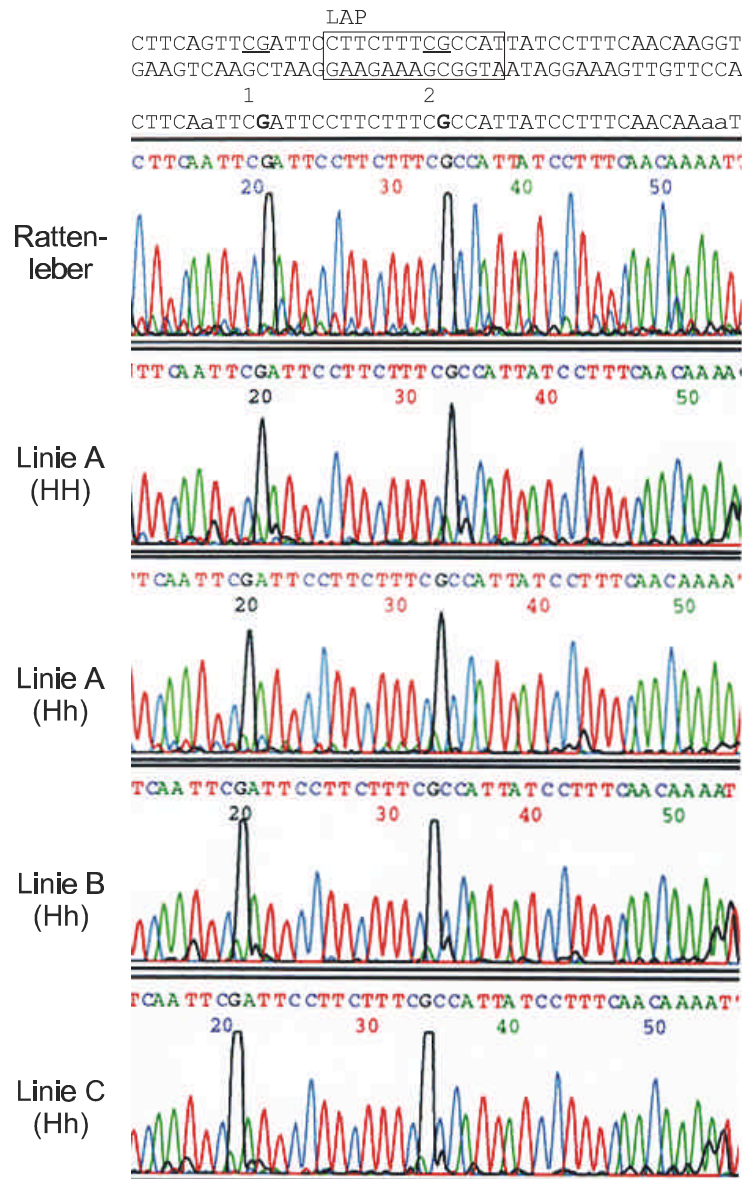
Anschließend wurden diese PCR-Produkte mit einem *sense* Oligonukleotid durch PCR sequenziert. Die Sequenzanalyse der *MspI/HpaII* Schnittstelle (Nukleotidposition -239 nt) ist in Abbildung 5.19 dargestellt.

Das zweite Cytosin der *MspI/HpaII* Schnittstelle (CCGG) wurde auch in der Bisulfit-behandelten DNA vorwiegend als Cytosin sequenziert (Abb. 5.19). Neben dem Cytosin-Peak an dieser Position findet sich ein zweiter, wesentlich kleinerer Peak für Thymin. Die Abschätzung der Größe der beiden Peaks für Cytosin (blau) und Thymin (rot) an dieser Stelle ergibt, dass etwa 90% der CpGs an der *MspI/HpaII* Restriktionsschnittstelle (CCGG) in den transgenen Kaninchen methyliert sind. Die Sequenzierung des proximalen Promotors des Ratten-APOBEC-1 Gens nach Bisulfit-Behandlung der DNA ergab zwei etwa gleich große Peaks für Cytosin (blau) und Thymin (rot) an dieser Position (Abb. 5.19).

Das Auswerte-Programm kann an dieser Position keine Base bestimmen und gibt daher ein N aus (Abb. 5.19). Im proximalen Promotor des APOBEC-1 Gens sind in der Ratte also 50% der CpGs an dieser Position methyliert und 50% bleiben unmethyliert (Abb. 5.19). Auch die zwei anderen CpGs in diesem durch PCR amplifizierten Bereich des Promotors von pAPOBEC-1 waren in den homozygot transgenen Kaninchen, in den heterozygot transgenen Kaninchen der Linie A und der Linie B und auch im *Founder*-Kaninchen #5, das zuvor als Mosaik identifiziert worden war (Abb. 5.5 E und F), nahezu vollständig methyliert (Daten nicht gezeigt). In der Ratte hingegen waren auch diese beiden CpGs im proximalen APOBEC-1-Promotor nur etwa zur Hälfte methyliert (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden die CpGs im Bereich -1032 bis -816 nt im Promotor von pAPOBEC-1 mit diesem Verfahren auf Methylierung untersucht. In diesem Abschnitt findet sich eine putative Bindungsstelle für das *Liver Activator Protein* (LAP). In der Konsensus-Sequenz für die Bindungsstelle von LAP befindet sich unmittelbar ein CpG. Für die Sequenzierung dieses Bereiches wurde ein *antisense* Oligonukleotid verwendet. Die unmethylierten Cytidine im *sense* Strang werden damit als Adenine sequenziert, die methylierten Cytidine hingegen unverändert als Guanine.

In Abb. 5.20 ist ein Ausschnitt der komplementären DNA-Sequenz dargestellt. Die beiden in diesem Ausschnitt lokalisierten CpGs wurden sowohl in der DNA aus der Rattenleber als auch in der DNA der transgenen Kaninchen als CG sequenziert (Abb. 5.20).

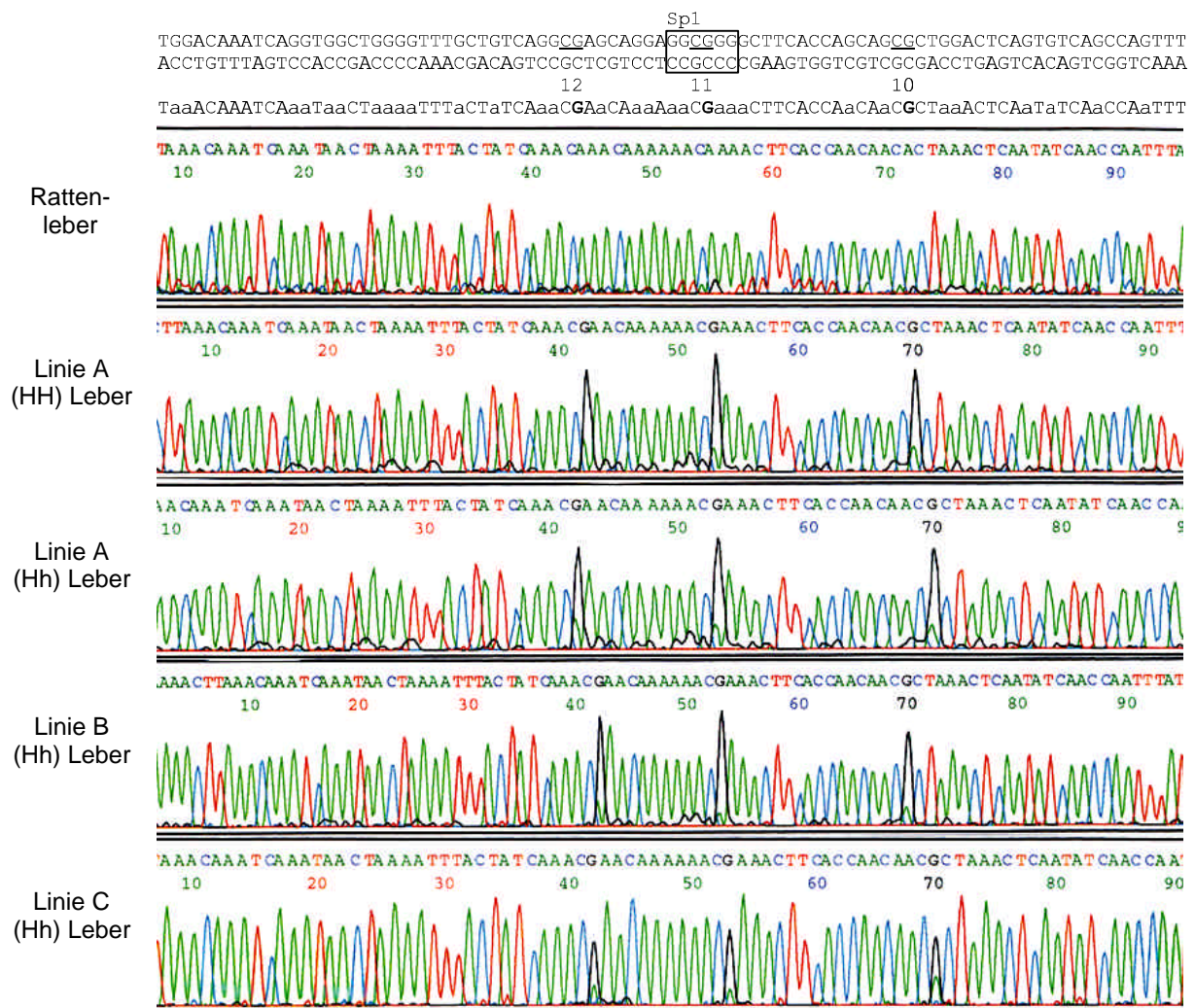


**Abb. 5.20: Methylierungsanalyse der putativen LAP Bindungsstelle.** Sequenz der PCR-Produkte der Bisulfit-behandelten DNA der transgenen Kaninchen und des Lebergewebes aus der Ratte. Die methylierten Cytosin-Reste erscheinen als Guanin-Reste des komplementären Stranges. Die CpGs in der Sequenz oberhalb des Sequenzausdrucks sind unterstrichen und nummeriert. Die Konsensus-Sequenz für den Transkriptionsfaktor LAP ist mit einem Rahmen dargestellt.

In der DNA aus der Rattenleber wurde an der C-Position in den beiden CpGs ausschließlich ein Peak für Cytosin gefunden (Abb. 5.20). In der DNA aus der Leber der transgenen Kaninchen befand sich an den C-Positionen dieser beiden CpGs noch ein sehr kleiner, zweiter Peak für Adenin (grün). (Abb. 5.20). Während offensichtlich die CpGs an dieser Position in

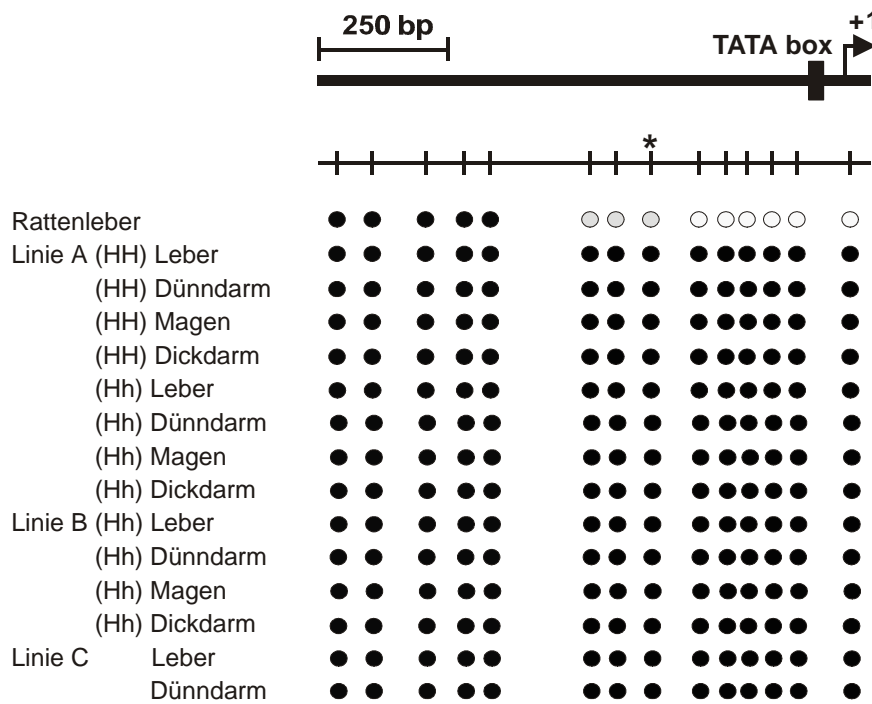
der Ratten-DNA zu 100% methyliert sind, werden in der DNA der transgenen Kaninchen an dieser Position etwa 90% der CpGs methyliert (Abb. 5.20).

Als dritter Bereich wurde die Region unmittelbar um den Transkriptionsstart von Nukleotidposition –184 bis +92 nt aus Bisulfit-behandelter DNA von Ratte und transgenen Kaninchen amplifiziert, um die hier lokalisierten sechs CpG-Dinukleotide auf Methylierung zu untersuchen. In diesem Bereich befinden sich die putative Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 und die TATA-Box.



**Abb. 5.21: Methylierungsanalyse der putativen Sp1 Bindungsstelle.** Dargestellt ist die Sequenzierung der PCR-Produkte der mit Bisulfit behandelten genomischen DNA. Die Direkt-Sequenzierung wurde mit dem *antisense* Oligonukleotid LBS355 durchgeführt. Somit erscheinen die methylierten Cytosine in der Sequenz als G. Die CpGs in der Sequenz oberhalb der Ausdrücke sind unterstrichen und nummeriert. Die Konsensus-Sequenz für Sp1 ist mit einem Rahmen dargestellt. Die Transkriptionsstartstelle ist mit einem (\*) gekennzeichnet.

In Abb. 5.21 ist die Sequenzierung des komplementären Stranges eines Teils der Promotor-Region dargestellt. In diesem Bereich befinden sich drei CpGs, wobei eines direkt in der Konsensus-Sequenz für die Bindungsstelle von Sp1 liegt. Diese drei CpGs wurden bei der untersuchten DNA der transgenen Kaninchen ausschließlich als CpG sequenziert (Abb. 5.21). Neben dem Haupt-Peak für C (blau) findet sich in der DNA der transgenen Kaninchen an diesen drei Positionen ein vergleichsweise kleiner Peak für Adenin (grün) (Abb. 5.21). In der genomischen DNA der Ratte werden diese drei CpGs, die nahe am Transkriptionsstart liegen, als CpA Dinukleotid sequenziert (Abb. 5.21). Die CpGs in diesem Bereich des proximalen APOBEC-1 Promotors sind also in den transgenen Kaninchen zu mehr als 85% methyliert, während diese in der genomischen DNA der Ratte nicht methyliert sind (Abb. 5.21).



**Abb. 5.22: Zusammenfassung der Daten aus der Methylierungsanalyse.** Die Lage der 14 analysierten CpG-Dinukleotide sind unterhalb der schematischen Darstellung der Promotor-Sequenz von APOBEC-1 als Kreise abgebildet. Die schwarzen (●) und weißen (○) Kreise repräsentieren methylierte und nicht methylierte CpGs. Graue Kreise (◐) stellen partiell methylierte CpGs dar. Die Nummerierung stimmt mit der in Abb. 5.18 überein. Der (\*) illustriert die Position der *MspI/HpaII* Schnittstelle.

In Abbildung 5.22 sind die Ergebnisse der Analyse von 14 CpGs im proximalen APOBEC-1 Promotor in der DNA aus Rattenleber und in der DNA aus Leber, Dünndarm, Magen und Dickdarm der homozygot und heterozygot transgenen Kaninchen dargestellt. Außerdem sind die Ergebnisse der Sequenzierungen von Bisulfit-behandelter DNA aus Dünndarm und Leber des dritten, als Mosaik identifizierten *Founder*-Kaninchens #5, dargestellt. Die CpGs 1-5 liegen im Bereich der PCR-Amplifikation der Bindungsstelle von LAP, die CpGs 6-8 liegen im PCR-Amplifikat um die *MspI/HpaII* Schnittstelle und die CpGs 9-14 befinden sich im Bereich um den Transkriptionsstart. In der Ratte sind die CpGs in der 5'-Region des proximalen APOBEC-1 Promotors zu mehr als 90% methyliert. Die CpGs in der *MspI/HpaII* Schnittstelle und Umgebung sind bei der Ratte nur zu 50% methyliert. Die CpGs um den Transkriptionsstart des proximalen APOBEC-1 Promotors sind in der Ratte hingegen nicht methyliert (Methylierungsgrad <5%). In der DNA aus Leber, Dünndarm, Magen und Dickdarm der transgenen Kaninchen sind demgegenüber alle CpGs in diesen Promotorabschnitten zu mehr als 90% methyliert.



## 6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung und molekulare Charakterisierung von APOBEC-1 transgenen Kaninchen mit dem leberspezifischen Promotor des APOBEC-1 Gens der Ratte, um die Auswirkungen einer Induktion von Editing der Apo B mRNA in der Leber auf die LDL-Plasmaspiegel und die Entwicklung von Arteriosklerose *in vivo* in Langzeitverläufen zu untersuchen. Hierzu wurde ein Minigen konstruiert, in dem die Expression von APOBEC-1 durch den proximalen Promotor des Ratten-APOBEC-1 Gens, der für die physiologische Expression von APOBEC-1 in der Rattenleber verantwortlich ist, vermittelt wird. Die für dieses APOBEC-1 Minigen transgenen Kaninchen exprimieren das transgene Ratten-APOBEC-1 in Leber und Dünndarm. Allerdings ist die Expression nur sehr gering, so dass die Apo B mRNA in der Leber uneditiert bleibt. In der genomischen DNA der Ratte werden die CpG-Dinukleotide dieses Promotors ab etwa -500 Basen vom Transkriptionsstart methyliert, im Bereich der Transkriptionsstartstelle ist der Promotor jedoch nicht methyliert. In den transgenen Kaninchen kommt es zu einem Verlust des spezifischen Methylierungsmusters. Die CpG-Dinukleotide sind in allen untersuchten Promotorabschnitten zu mehr als 90% methyliert. Da diese Promotormethylierung in mehreren transgenen Kaninchen-Stämmen mit jeweils unterschiedlichen Integrationsorten des Transgens gefunden wurde, ist ein Effekt des Integrationsortes auf die Methylierung des verwendeten Promotors unwahrscheinlich. Nach den erhobenen Daten ist der proximale Promotor des Ratten-APOBEC-1 Gens offensichtlich ein sehr schwacher Promotor, der in einem transgenen Kontext nicht mehr ausreichend stark als Promotorelement erkannt werden kann.

### 6.1 Transgene Tiere und Arteriosklerose

Durch die Integration zusätzlicher Gene in einen lebenden Organismus können wichtige Erkenntnisse über molekulare Ursachen von Krankheiten und ihre Therapie gewonnen werden. Die Maus ist das am häufigsten verwendete transgene Tiermodell. Zum Studium der Arteriosklerose ist die Maus jedoch eher ein schlechtes Modell, da Mäuse aufgrund verschiedener genetischer Bedingungen für die Entwicklung von Hypercholesterinämie und Arteriosklerose relativ unempfindlich sind (Breslow, 1996). Homozygot Apo E defiziente Mäuse entwickeln zwar eine Hypercholesterinämie, aber die arteriosklerotischen Läsionen sind, verglichen mit Menschen mit Mutationen von Apo E, deutlich geringer ausgeprägt (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992; Nakashima et al., 1994). Auch die Physiologie von Apo B und Apo B enthaltenden Lipoproteine unterscheidet sich ganz erheblich zwischen

Mensch und Maus. So haben homozygot LDL-Rezeptor defiziente Mäuse zwar, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, erhöhte Plasma-LDL-Konzentrationen, aber ihre LDL-Spiegel sind mit etwa 150-200 mg/dL (Powell-Braxton et al., 1998) wesentlich geringer als bei Patienten mit homozygoter Familiärer Hypercholesterinämie, die LDL-Spiegel >1000 mg/dL besitzen (Goldstein et al., 1995), oder auch als bei den homozygot LDL-Rezeptor defizienten Watanabe-Kaninchen, die LDL-Spiegel um 800 mg/dL aufweisen (Tanzawa et al., 1980, Watanabe 1990). Auch die Anfälligkeit für Arteriosklerose ist bei den homozygot LDL-Rezeptor defizienten Mäusen wesentlich geringer als bei Patienten mit homozygoter Familiärer Hypercholesterinämie (FH) oder bei Watanabe-Kaninchen (Ishibashi et al., 1993; Ishibashi et al., 1994).

Eine zentrale Bedeutung für die Regulation der LDL-Plasma-Konzentrationen bei Mäusen kommt dem Editing der Apo B mRNA in der Leber zu. Im Gegensatz zum Menschen und vielen anderen Spezies, die die Apo B mRNA nur im Dünndarm, nicht aber in der Leber editieren, kann die Maus die Apo B mRNA auch in der Leber editieren, die damit Apo B-48 enthaltende VLDL bildet (Greeve et al., 1993). Editing der Apo B mRNA findet man neben der Maus auch noch bei Pferd, Hund und Ratte (Greeve et al., 1993). Alle diese Tierspezies mit Editing der hepatischen Apo B mRNA zeichnen sich durch sehr niedrige LDL-Spiegel aus (Greeve et al., 1993). Editing der Apo B mRNA in der Leber ist also offensichtlich ein natürlicher genetischer Mechanismus, der die LDL-Plasmakonzentrationen begrenzen kann (Greeve et al., 1993). Dieses Konzept konnte durch Etablierung von homozygot APOBEC-1 defizienten Mäusen experimentell weiter bestätigt werden. Die APOBEC-1 *knock out* Mäuse können aufgrund des Fehlens von APOBEC-1 die Apo B mRNA weder im Dünndarm noch in der Leber editieren (Morrison et al., 1996; Hirano et al., 1996; Nakamuta et al., 1997). Davon abgesehen sind diese APOBEC-1 *knock out* Mäuse aber vollständig gesund und fertil, ein offensichtlicher Phänotyp ist nicht zu beobachten (Morrison et al., 1996; Hirano et al., 1996, Nakamuta et al., 1997). Jedoch scheinen die APOBEC-1 *knock out* Mäuse auf cholesterinreiche Fütterung mit einem stärkeren Anstieg der LDL-Werte im Blut zu reagieren als Wildtyp-Mäuse (Nakamuta et al., 1997). Die durch Kreuzung von LDL-Rezeptor *knock out* und APOBEC-1 *knock out* Mäusen gezüchtete LDL-R *-/-*, APOBEC-1 *-/-* *double knock out* Mäuse haben eine wesentlich stärkere Erhöhung der LDL-Spiegel im Plasma als die einfach LDL-R *-/-* Mäusen. Diese *double knock out* Mäuse entwickeln sehr rasch eine ausgeprägte Arteriosklerose (Powell-Braxton et al., 1998). Editing der Apo B mRNA in der Leber schützt also die LDL-R *-/-* Maus vor der Entwicklung von Hypercholesterinämie und Arteriosklerose, und ist damit eines der genetischen Merkmale, die eine genetische Defizienz des LDL-Rezeptors auszugleichen vermögen (Powell-Braxton et al., 1998). Erst nach Ausschalten des Editings in der Leber manifestiert sich in den LDL-R *-/-*, APOBEC-1 *-/-* Mäusen deshalb die

durch den LDL-Rezeptor-Defekt verursachte Hypercholesterinämie in einer Form, wie sie bei Mensch oder Kaninchen auftritt.

## 6.2 Transgene Kaninchen und Arteriosklerose

Kaninchen sind in Hinblick auf das Studium von Arteriosklerose ein besser geeignetes Tiermodell, da sie in vielen Schlüsselgenen eine höhere genetische Ähnlichkeit mit dem Menschen aufweisen (Brousseau & Hoeg, 1999). Die Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteine in den Kaninchen und Menschen sind in der chemischen Zusammensetzung und dem Apolipoprotein-Gehalt sehr ähnlich (Chapman et al., 1980). Im Kaninchen wird die Apo B mRNA, genau wie beim Mensch, nicht in der Leber editiert (Greeve et al., 1993). Demzufolge enthalten die von der Leber gebildeten VLDL-Partikel ausschließlich das atherogene Apo B-100 als Strukturprotein (Greeve et al., 1993). Werden Kaninchen mit einer cholesterinreichen Nahrung gefüttert, so steigt die Cholesterin-Konzentration im Plasma stark an und die Tiere entwickeln relativ rasch eine ausgeprägte Arteriosklerose der Bauchaorta (Clair, 1983). Bei den Kaninchen gibt es eine natürlich entstandene Mutation des LDL-Rezeptors und damit stellen sie ein natürliches Tiermodell für die Familiäre Hypercholesterinämie dar (Tanzawa et al., 1980; Watanabe 1990). Bei den *Watanabe Heritable Hyperlipidemic*-(WHHL) Kaninchen wird der LDL-Rezeptor aufgrund einer Deletion von 4 Aminosäuren im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und nicht ordnungsgemäß an die Zelloberfläche transportiert (Yamamoto, 1986). Hieraus resultiert ein schwerer LDL-Rezeptor-Defekt, und die WHHL-Kaninchen haben sehr stark erhöhte LDL-Spiegel und entwickeln eine starke, vorzeitige Arteriosklerose der Aorta und der Herzkranzgefäße (Tanzawa et al., 1980, Watanabe, 1990). Die Zucht der WHHL-Kaninchen ist vergleichsweise schwierig, da diese Kaninchen sehr krankheitsanfällig sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, ein Tiermodell zu etablieren, in dem die physiologischen Auswirkungen einer Induktion von Editing der hepatischen Apo B mRNA auf die LDL-Spiegel und die Entwicklung von Arteriosklerose in Langzeitverläufen untersucht werden kann. Das offensichtlich am besten geeignete Tiermodell für diese Untersuchungen ist zweifellos das WHHL-Kaninchen, das aufgrund des LDL-Rezeptor-Defektes eine ausgeprägte Hypercholesterinämie hat und zugleich wie der Mensch die Apo B mRNA in der Leber nicht editiert. Die Expression von APOBEC-1 in der Kaninchenleber ist ausreichend, um in der Kaninchenleber Editing der Apo B mRNA zu rekonstituieren; APOBEC-1 ist also die einzige fehlende Komponente des Apo B mRNA Editing Enzym-

Komplexes in der Leber vom Kaninchen und auch vom Menschen (Yamanaka et al., 1994). Dieses konnte durch Adenovirus-vermittelten Gentransfer von APOBEC-1 in die Leber von Kaninchen *in vivo* gezeigt werden (Greeve et al., 1996; Hughes et al., 1996). Nach Injektion von APOBEC-1 rekombinanten Adenoviren kommt es zur Expression von APOBEC-1 in der Leber und dadurch zu Editing von bis zu 50% der hepatischen Apo B mRNA (Greeve et al., 1996; Hughes et al., 1996). Hieraus resultiert ein starker Abfall der LDL-Spiegel in Wildtyp-Kaninchen und insbesondere auch in WHHL-Kaninchen, bei denen eine Reduktion der LDL-Spiegel bis zu 75% beobachtet wurde. Dieser Effekt ist jedoch nur vorübergehend, nach etwa 14 Tagen erlischt die APOBEC-1 Expression in den mit dem APOBEC-1 rekombinanten Adenovirus transduzierten Kaninchenlebern und die LDL-Spiegel steigen wieder auf ihren Ausgangswert an (Greeve et al., 1996; Hughes et al., 1996; Kozarsky et al., 1996). Mit einem transienten Gentransfer von APOBEC-1 ist deshalb die Auswirkung von Editing der hepatischen Apo B mRNA auf die Entwicklung von Arteriosklerose nicht zu untersuchen. Dieses sollte aber in WHHL-Kaninchen, die APOBEC-1 transgen in der Leber exprimieren und damit Zeit ihres Lebens die hepatische Apo B mRNA editieren, möglich sein. Dieses Tiermodell würde damit direkt zeigen, dass Editing in der Leber erhöhte LDL-Spiegel zu senken vermag. Dieses transgene Kaninchenmodell wäre damit die Umkehrung der LDL-Rezeptor *-/-*, APOBEC-1 *-/-* *double knock out* Maus, durch die gezeigt werden konnte, dass ein Ausschalten des Editings der Apo B mRNA in der Leber zu einem Anstieg der LDL-Plasma-Konzentrationen und zu einer stark erhöhten Anfälligkeit für Arteriosklerose führt.

Die transgene Expression von APOBEC-1 ist jedoch nicht unproblematisch. Bereits 1995 wurde von Yamanaka über die Herstellung von APOBEC-1 transgenen Mäusen und Kaninchen berichtet (Yamanaka et al., 1995). In diesen transgenen Tieren wurde die Expression des transgenen APOBEC-1 durch den Promotor von Apo E vermittelt, der zu einer starken Expression von APOBEC-1 in der Leber führte (Yamanaka et al., 1995). Es zeigte sich zwar erwartungsgemäß ein deutlicher Abfall der LDL-Konzentrationen im Blut, unerwarteterweise entwickelten aber fast alle Tiere in verschiedenen transgenen Linien ausgeprägte hepatozelluläre Dysplasien und auch Karzinome (Yamanaka et al., 1995). Unter diesen transgenen Bedingungen kann also APOBEC-1 als dominantes Onkogen wirken (Yamanaka et al., 1995). Die onkogene Wirkung von APOBEC-1 wird offensichtlich durch sogenanntes aberrantes Hyperediting von Cytosinen in anderen Transkripten als Apo B vermittelt (Yamanaka et al., 1995, Yamanaka et al., 1997). Durch dieses Hyperediting, so wird vermutet, werden putative Tumorsuppressor-Gene inaktiviert, so dass es zur Initiierung von Tumorwachstum kommt (Yamanaka et al., 1995; Yamanaka et al., 1997). Durch ein differentielles *Screening* konnte von Yamanaka ein derartiges putatives Tumorsuppressor-Gen identifiziert werden, das durch Hyperediting inaktiviert wird (Yamanaka et al., 1997). Es

handelt sich hierbei um NAT 1, einen Repressor der Translations-Initiierung, der durch Hyperediting sehr stark trunkiert und dadurch vermutlich inaktiviert wird (Yamanaka et al., 1997). Der Ansatz, durch eine transgene Expression von APOBEC-1 in der Leber von Kaninchen Editing zu induzieren, um die Physiologie einer Synthese von Apo B-48 enthaltenden VLDL zu untersuchen, birgt damit ein erhebliches Risiko.

In unserer Arbeitsgruppe wurde deshalb zunächst untersucht, in welcher Weise die natürliche Expression von APOBEC-1 in der Leber vermittelt wird. Als Modellsystem wurde hierzu die Ratte untersucht, bei der wie bei Pferd, Hund oder Maus APOBEC-1 natürlicherweise in der Leber exprimiert wird (Greeve et al., 1993). Das APOBEC-1 Gen der Ratte hat zwei unterschiedliche Promotoren, einen vor Exon 1 und einen zweiten von Exon 2 (Greeve et al., 1998). Der Translationsstart liegt in Exon 2, so dass von beiden Promotoren das identische Genprodukt gebildet wird (Greeve et al., 1998). Die von diesen beiden Promotoren gebildeten Transkripte unterscheiden sich damit allein in der 5'-untranslatierten Region (Nakamuta et al., 1995; Qian et al., 1997; Hirano et al., 1997; Greeve et al., 1998). Der Promotor vor Exon 2 führt zu sehr starker Expression von APOBEC-1 ausschließlich im Dünndarm. Dieser Promotor ist also dünndarmspezifisch; er gehört zu einer neuartigen Klasse von TATA-losen Promotoren mit einem sogenannten MED-1 Motiv (Ince & Scotto, 1995; Qian et al., 1997; Greeve et al., 1998). Der Promotor vor Exon 1 ist demgegenüber ein eher schwacher Promotor, der APOBEC-1 Expression in Leber, Milz, Lunge, Niere, Herz- und Skelettmuskel vermittelt (Greeve et al., 1998). Die Organisation des APOBEC-1 Gens der Maus ist hoch homolog zu der Organisation des APOBEC-1 Gens der Ratte (Greeve et al., 1998). Beim Menschen hingegen fehlt der zweite Promotor vor Exon 1 und das APOBEC-1 Gen des Menschen hat damit nur 5 Exons, verglichen mit 6 Exons bei Maus und Ratte (Fujino et al., 1998). Der Promotor des menschlichen APOBEC-1 Gens ist homolog zu dem Promotor vor Exon 2 bei Maus und Ratte (Nakamuta et al., 1995). Das Fehlen des zweiten, proximalen, leberspezifischen Promotors im APOBEC-1 Gen des Menschen ist damit die molekulare Ursache für die fehlende Expression von APOBEC-1 in der menschlichen Leber, und daher die Ursache für das Fehlen des Editings der Apo B mRNA in der Leber und die damit verbundene Anfälligkeit für Hypercholesterinämie und Arteriosklerose beim Menschen (Fujino et al., 1998).

### 6.3 Generierung und Charakterisierung von APOBEC-1 transgenen Kaninchen

Das Konzept der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Expression von APOBEC-1 in der Leber des Kaninchens durch den proximalen, leberspezifischen Promotor des APOBEC-1 Gens der Ratte zu vermitteln. Dieser Promotor sollte im Prinzip eine relativ geringfügige Expression von APOBEC-1 in der Leber bewirken, die aber ausreichend sein sollte, um Editing der Apo B mRNA zu induzieren. Da dieser Promotor auf physiologischer Basis die Expression von APOBEC-1 in der Rattenleber bewirkt, sollten von diesem Promotor keine onkogenen Wirkungen ausgehen. Für diesen Zweck wurde ein APOBEC-1 Minigen hergestellt, das aus 2,5 kb des proximalen APOBEC-1 Promotors, der cDNA von APOBEC-1 der Ratte, einem SV40 *splice*-Donor und *splice*-Akzeptor mit einem dazwischenliegenden Intron und aus einem SV40 Polyadenylierungssignal besteht. Die Funktion dieses Minigens pAPOBEC-1 wurde ausführlich in menschlichen Hepatoma HuH-7 Zellen *in vitro* getestet. pAPOBEC-1 vermittelt eine geringe Expression von APOBEC-1 nach transienter Transfektion in HuH-7 Zellen, die ausreicht, um Editing der Apo B mRNA zu induzieren.

Deshalb wurden durch Mikroinjektion des Minigens pAPOBEC-1 in befruchtete Kaninchen-Oozyten transgene Kaninchen hergestellt. Ziel dieser Experimente war die Herstellung von pAPOBEC-1 transgenen WHHL-Kaninchen. Da die Zucht der sehr anfälligen WHHL-Kaninchen sehr schwierig ist, wurden für die Injektionen befruchtete Oozyten von Wildtyp New Zealand White-(NZW) Kaninchen verwendet. Es war geplant, nach Herstellung der transgenen NZW-Kaninchen das Transgen in die WHHL-Kaninchen einzukreuzen. Nach Mikroinjektion konnte nur bei zwei von drei transgenen APOBEC-1 *Founder*-Kaninchen die chromosomale Integration festgestellt werden. Kaninchen #5 hingegen war ein Mosaik. Die Erzeugung von Mosaiken ist bei der Herstellung von transgenen Tieren durch Mikroinjektion nicht selten. Die Mosaiken entstehen durch Mikroinjektion in schon in Teilung befindlichen, fertilisierten Oozyten, und somit wird die transgene DNA nur in einigen Zellen der Blastozyste integriert.

Die durch Weiterzucht erhaltenen F1-Generationen exprimieren die transgene APOBEC-1 mRNA in Leber und Dünndarm. Die transgene APOBEC-1 mRNA in Leber und Dünndarm wurde korrekt prozessiert, wie durch überlappende RT-PCR über die gesamte Länge des transgenen Transkriptes gezeigt werden konnte. Diese Daten belegen, dass das im Genom der Kaninchen integrierte transgene APOBEC-1 Minigen transkriptionell aktiv ist. In den homozygot transgenen Kaninchen konnte die transgene APOBEC-1 mRNA zusätzlich zu Leber und Dünndarm auch noch in Niere, Lunge, Gehirn und Skelettmuskel nachgewiesen werden. Diese Gewebeverteilung entspricht damit im wesentlichen der Gewebespezifität des

APOBEC-1 Promotors in der Ratte (Greeve et al., 1998). Der proximale, leberspezifische Promotor APOBEC-1 der Ratte vermittelt die APOBEC-1 Expression in Leber, Milz, Niere, Skelettmuskel und Fettgewebe (Qian et al., 1997; Hirano et al., 1997; Greeve et al., 1998). Offenbar bleibt also die Gewebespezifität des verwendeten APOBEC-1 Promotors der Ratte im Kaninchen erhalten. Außerdem zeigen diese Experimente einen offensichtlichen Gen-Dosis-Effekt, da die homozygot transgenen Kaninchen mehr transgene Transkripte exprimierten als die heterozygot transgenen Kaninchen.

Die Primer Extensions Analyse ergab, dass die hepatische Apo B mRNA in den transgenen Kaninchen uneditiert blieb. Auch in den anderen Geweben konnte keine Veränderung des Editings der Apo B mRNA im Vergleich mit Wildtyp-Kaninchen beobachtet werden. Offensichtlich war also das transgene APOBEC-1 Minigen in den Kaninchen, obwohl hier transgene Transkripte erzeugt wurden, funktionell nicht aktiv. Um die transgenen Transkripte zu quantifizieren, wurden Northern Blots und Ribonuklease Protektions Analysen durchgeführt. Mit beiden Methoden konnten die transgenen Transkripte nicht zweifelsfrei dargestellt werden und waren demzufolge wesentlich seltener als die endogenen APOBEC-1 Transkripte, die in Dünndarm, Magen, Dickdarm, Milz und Lunge mit diesen beiden Methoden nachweisbar waren. Die Expression von pAPOBEC-1 ist also sehr gering und nicht ausreichend, um Editing der Apo B mRNA in der Leber zu erzeugen.

Da die Expression von APOBEC-1 in der Rattenleber durch Schilddrüsenhormon (T3) und Hydrocortison stimuliert wird (Davidson et al., 1988; Lorentz et al., 1996), wurde in einer Serie von Experimenten untersucht, ob das Minigen pAPOBEC-1 in den transgenen Kaninchen reguliert wird. Nach Gabe von Cortisol wurde bei den heterozygot transgenen Kaninchen die Expression des transgenen APOBEC-1 auch in der Niere nachweisbar. Überraschenderweise war nach Gabe von Schilddrüsenhormon die Expression des transgenen pAPOBEC-1 weder in Leber, noch Dünndarm oder Niere der transgenen Kaninchen nachweisbar. Das transgene APOBEC-1 Minigen wird also in den Kaninchen durch Hormone beeinflusst. Der Anstieg beziehungsweise der Abfall der transgenen Expression sind ein weiteres Indiz für die Funktionalität des Minigens und des proximalen Rattenpromotors des APOBEC-1 Gens in den transgenen Kaninchen.

#### 6.4 Inaktivierung von pAPOBEC-1 durch DNA-Methylierung

Die Expression des transgenen Minigens wird also offensichtlich auf der Ebene der Transkription begrenzt. Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden ist ein Mechanismus, um Promotoraktivitäten zu verringern. Deshalb wurde die Methylierung von CpG-Dinukleotiden des verwendeten Promotors bei der Ratte und den transgenen Kaninchen vergleichend untersucht. In der Rattenleber wird dieser Promotor bis ungefähr 500 bp vor der Transkriptionsstartstelle zu fast 100% methyliert. Allerdings waren die CpG-Dinukleotide im *Core*-Bereich des Promotors um den Transkriptionsstart vollkommen unmethyliert. In den Organen der transgenen Kaninchen waren die CpG-Dinukleotide dieser *Core*-Region mit der Transkriptionsstartstelle demgegenüber zu mehr als 90% methyliert. Das gleiche Ausmaß der Methylierung (>90%) fand sich auch in den weiter proximal liegenden CpGs. Die Methylierung des Promotors in den transgenen Kaninchen korreliert also mit der geringen Expression von APOBEC-1. Die Restaktivität dieses Promotors in den transgenen Tieren ist vermutlich Folge einer nicht vollständigen Methylierung. Sowohl in den Sequenzierungen der mit Bisulfit behandelten DNA als auch in den Restriktionsanalysen mit *MspI/HpaII* konnte sehr gut reproduzierbar gezeigt werden, dass etwa 5-10% der CpG-Dinukleotide des Promotors in den transgenen Kaninchen unmethyliert bleiben. Offenbar führt demnach der Verlust des sehr spezifischen Methylierungsmusters des Ratten-Promotors zu einer nicht mehr ausreichenden Genexpression von APOBEC-1, so dass in der Leber der transgenen Kaninchen die Apo B mRNA uneditiert bleibt.

#### 6.5 Transkriptionelle Repression durch Methylierung

Die am häufigsten diskutierte kovalente Modifikation von DNA, die Methylierung von Position 5 des Cytosins, steht offensichtlich in einem engen Zusammenhang mit der Regulation der Genexpression (Kass et al., 1997). Es gibt eine Vielzahl von Beispielen, bei denen durch DNA-Methylierung Gene reguliert beziehungsweise komplette Chromosomen inaktiviert worden sind. Zu nennen sind hier das sogenannte *Imprinting* (Lalande et al., 1996; Efstratiadis et al., 1994; Singer-Sam & Riggs, 1993), die X-Chromosom-Inaktivierung (Wutz et al., 1997; Beard et al., 1995; Mohandas et al., 1981), die Karcinogenese (Baylin & Herman, 2000, Chuang et al., 1997; Laird, 1997; Ramchandani et al., 1997), die Suppression der ektopischen Genexpression (Challita et al., 1995; Shinar et al., 1989) und die differentielle Expression von Genen (Razin & Riggs, 1980; Eden & Cedar, 1994; Nan et al., 1997; Siegfried & Cedar, 1997, Dammann et al., 2000). 60-90% der Cytosine der CpG-Dinukleotide in dem Genom von Vertebraten werden von der DNA-Methyltransferase methyliert (Yoder et al., 1997). Diese hohe Dichte von Methyl-CpG, der fünften Base, in dem Genom hat offenbar



eine biologische Relevanz in Bezug auf Expression und Regulation von Genen (Colot & Rossignol, 1999).

## 6.6 *de novo* Methylierung von pAPOBEC-1

Erst durch die sich stark entwickelnde transgene Technologie entstand ein verstärktes Interesse für den Mechanismus und die Regulation der *de novo* Methylierung von Fremd-DNA in etablierten Tiermodellen. Als Folge der Integration von Fremd-DNA kann es zur *de novo* Methylierung kommen. Insbesondere können die Integrationsstelle, die Nukleotidsequenz der Fremd-DNA, bestimmte spezifische Motive der transgenen DNA, das *Timing* des Insertionsprozesses in Bezug auf den Zellzyklus und die Stärke des Promotors und/ oder *Enhancer*-Elemente der injizierten Fremd-DNA Einfluss auf die *de novo* Methylierung nehmen.

Nach den erhaltenen Daten der ausführlichen Methylierungsanalyse aus allen drei transgenen Kaninchen-Stämmen mit unterschiedlichen Integrationsorten und Integrationshäufigkeit scheint ein Positionseffekt für die *de novo* Methylierung relativ unwahrscheinlich. Dagegen spricht auch die Vorstellung, dass die injizierte DNA in aufgelockerte, aktive Bereiche des Chromatins und nicht in komprimierte, inaktive Bereiche des Chromatins integriert wird. Offenbar stellt Methylierung auch einen Mechanismus zum Schutz des Genoms gegen Fremd-DNA dar (Scrabble & Stambrook, 1999). Deshalb kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass die verbliebenen bakteriellen und viralen Sequenzen des Transgens als fremd erkannt und deshalb durch Methylierung inaktiviert werden.

In höheren Eukaryonten werden die Aktivitäten vieler Promotoren durch sogenannte *Enhancer*-Sequenzen verstärkt. *Enhancer* besitzen keine eigene Promotoraktivität, können aber ihre stimulierende Wirkung über Entfernungen bis zu mehreren tausend Basenpaaren ausüben (Khoury & Gruss, 1983). Wird zum Beispiel der SV40 *Early* Promotor mit dem SV40 *Enhancer*, eine 72 Basenpaare lange Sequenz, in embryonische Stammzellen (ES) transfiziert, so bleibt der Promotor unmethyliert. Beim Fehlen dieses *Enhancers* wird demgegenüber eine *de novo* Methylierung des verwendeten Promotors beobachtet. Somit ist dieser *Enhancer* notwendig, um die Promotor-Methylierung zu inhibieren (Hertz et al., 1999). Bei dem verwendeten Promotorfragment des Ratten-APOBEC-1 Gens ist nicht bekannt, ob nicht möglicherweise derartige *Enhancer* in größerer Entfernung, die in pAPOBEC-1 fehlen, einen wesentlichen Einfluss auf die Promotoraktivität *in vivo* haben können. Die *in vitro*

Charakterisierung dieses Promotorfragmentes in HuH-7 Zellen ergab keine Hinweise, dass das verwendete 2,5 kb Promotorfragment wesentliche Elemente nicht enthält. Die Relevanz dieser *in vitro* Untersuchungen für die *in vivo* Bedingungen ist allerdings beschränkt. Es ist demnach denkbar, dass ein anderes Fragment dieses Promotors, größer oder auch kleiner, in der transgenen Situation deutlich aktiver sein könnte.

## 6.7 Methylierung von CpG-Inseln

Der Promotor des Ratten-APOBEC-1 Gens enthält keine sogenannten CpG-Inseln. Dies sind bestimmte Regionen von ungefähr 200 bp mit einem G/C-Gehalt von 50-60%. Dennoch scheinen wenige CpG-Dinukleotide auszureichen, um nach Methylierung die Expression des Transgens nahezu auszuschalten. Offenbar unterliegt dieser Promotor einer sehr feinen und sensitiven Regulation. Der Mechanismus, der für die Inaktivierung der Promotoraktivität verantwortlich ist, hängt offensichtlich von wenigen methylierten CpG-Dinukleotiden ab. Ein sehr eindrucksvolles Beispiel für den Einfluss der Promotor-Methylierung und der Transkription wurden in Arbeiten mit einem episomalen System, basierend auf dem Epstein Barr Virus (EBV), gezeigt. Hier ist die Methylierung eines einzigen bestimmten CpG-Dinukleotids für die Inaktivierung des Promotors verantwortlich (Robertson et al., 1995). Wenn 7% der CpG-Dinukleotide des Promotors methyliert sind, kommt es im EBV ebenfalls zu einer transkriptionellen Repression (Hsieh, 1994). Auch die Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide der Thymidin-Kinase beim Herpes Simplex Virus-1 (HSV) führt zur Herunterregulation der Promotoraktivität *in vivo* (Ben-Hattar & Jiricny, 1988).

## 6.8 Einfluss der Methylierung auf die DNA-Konformation

Die Methylierung begünstigt auch den Übergang von B-DNA zu Z-DNA. Der größte DNA-Anteil in dem Eukaryontengenom liegt in der B-DNA-Form von Watson und Crick vor. Die B-DNA ist wie die A-DNA eine rechtsgängige Doppelhelix aus antiparallelen Strängen, die durch Watson-Crick-Basenpaarung zusammengehalten wird. Ein dritter Typ einer DNA-Helix ist die Z-DNA, hier ist die Helix im Gegensatz zu den A- und B-Helices linksgängig. Innerhalb der B-Form kann es durch Methylierung an Position 5 im Cytosin zu einer Umwandlung in die Z-Form kommen. Dadurch ändert sich die Konformation von Zuckerrest und Base und dies führt zu einer Annäherung der einzelnen Gruppen von 1,2 nm auf 0,8 nm. Dabei kommt es zu einer Erhöhung der Verwindungszahl der DNA bei gleichzeitiger Verdichtung (Rich et al., 1984). Weiterhin entstehen bei der Z-DNA keine großen und kleinen

Furchen, die bei der B-DNA eine wichtige strukturelle Eigenschaft für verschiedene potentielle Akzeptoren und Donatoren von Wasserstoffbrücken darstellen. Die Tatsache, dass sich die Z-Form von der A- und B-Form deutlich in der Konformation unterscheidet, belegt die flexible und dynamische Struktur der DNA. Diese Veränderungen der DNA können demnach Einfluss auf die Chromatinstruktur und somit auf die dort stattfindende Transkription ausüben (Herbert & Rich, 1999).

## **6.9 Veränderung der Bindungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren**

Methylierung von CpG-Dinukleotiden kann Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Transkriptionsapparates an der Doppelhelix und die Bindungseigenschaften der Proteine, welche die Chromatinstruktur beeinflussen, nehmen (Nan et al., 1997; Kass et al., 1997). 5-Methylcytosine haben zwar keinen Einfluss auf die Basenpaarung, aber beeinträchtigen die Protein-DNA Interaktion, weil sie in die große Furche der Doppelhelix ragen, was möglicherweise die Bindung eines die Transkription stimulierenden Faktors beeinträchtigt (Razin & Riggs, 1980). Dadurch wird die Transkription nicht optimal durchgeführt und infolgedessen wird auch die Genexpression herunter reguliert. Es gibt einige Promotoren die für die Transkription ganz bestimmte Faktoren benötigen, wie beispielsweise E2F, CREB und USF, die an methylierte CpG-Dinukleotide nicht gut binden und dadurch die Transkription inhibieren (Kovesdi et al., 1987; Watt & Molloy, 1988, Faisst & Meyer, 1992; Nevins, 1992; Campanaro et al., 2000). Andererseits gibt es wiederum Faktoren, wie beispielsweise Sp1, CTF und TCR-ATF, bei denen die Bindung durch Methylierung nicht beeinflusst wird (Harrington et al., 1988; Holler et al., 1988; Ben-Hattar et al., 1989). Offenbar spielt die schwächere Bindung der Faktoren an den methylierten Promotor nur eine untergeordnete Rolle und kann nicht ausschließlich für das Ausbleiben einer ausreichenden Transkription verantwortlich gemacht werden (Iguchi-Arigo & Schaffner, 1989, Weih et al., 1991). Dies wird durch Beispiele belegt, bei denen der Promotor ohne das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren ausreichend transkribiert wird (Kass et al., 1997; Tate & Bird, 1993).

## 6.10 DNA-Methylierung und Chromatin

Bei dem verwendeten Promotor aus der Ratte handelt es sich um einen schwachen Promotor mit einer nicht sehr stark ausgeprägten Gewebespezifität (Greeve et al., 1998). Der Bereich der maximalen Promotoraktivität im proximalen, leberspezifischen APOBEC-1 Promotor aus der Ratte konnte durch transiente Transfektion von Promotorkonstrukten und anschließenden Luziferase-Assay um die Transkriptionsstartstelle lokalisiert werden (Greeve et al., 1998). Genau dieser Promotorabschnitt bleibt in der genomischen DNA aus Rattenleber unmethyliert. Die Methylierung dieses Bereiches führt wahrscheinlich zu einer Veränderung der Chromatinstruktur und somit zur transkriptionellen Repression von APOBEC-1 in den transgenen Kaninchen. Demnach spielt dieser Bereich um die Transkriptionsstartstelle eine entscheidende Rolle bei der physiologischen APOBEC-1 Expression. Bei der transkriptionellen Repression kommt es durch einen Sequenz unabhängigen Prozess zu einer Änderung der Chromatinstruktur und des Acetylierungsgrades der Histone (Kass et al., 1997; Bestor 1998). Der Promotor rekrutiert offenbar nicht genügend Transkriptionsfaktoren und folglich können an das aufgelockerte Heterochromatin Methyl-Cytosin-bindende Proteine unter Rekrutierung eines Ko-Repressor-Komplexes, der auch Histonacetylasen enthält, gebunden werden (Wade et al., 1999; Ng et al., 1999; Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). Nach Deacetylierung der Histone kommt es zu einer Verdichtung des Heterochromatins und deshalb zum fast vollständigen Erliegen der Transkriptionsaktivität dieses Bereiches (Jones & Laird, 1999). Bei den Methyl-Cytosin-bindenden Proteinen handelt es sich um eine völlig neue Klasse von Proteinen, die eine entscheidende Rolle zwischen Methylierung und dem sogenannten transkriptionellen *Silencing* spielen. MeCP2 wurde als erstes Mitglied dieser neuen Genfamilie kloniert und charakterisiert (Henderich & Bird, 1998). Bestehend aus einer Polypeptidkette enthält MeCP2 eine Methyl-bindende-Domäne (MBD) und eine Transkriptions-Repressor-Domäne (TRD) (Nan et al., 1997). Durch Immunpräzipitation wurde die direkte Interaktion dieser TRD mit dem Ko-Repressor Sin3A und den Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 gezeigt (Nan et al., 1998; Knoepfler & Eisenman, 1999). In transienten Transfektionsexperimenten wird die Repressoraktivität durch Trichostatin A, einen Histondeacetylase-Hemmer, aufgehoben. Die stabile Repression von methylierten Sequenzen wird demnach durch die Erzeugung einer deacetylierten, inaktiven Chromatinstruktur bewirkt (Nan et al., 1998). Diese wichtigen Experimente beweisen die Verbindung zwischen MeCP2-induzierter Repression und Histon Deacetylase Aktivität. Der direkte Beweis jedoch, dass Methylgruppen am 5'-Ende eines Gens zur Änderung der Histonacetylierung und dies zur transkriptionellen Repression der Genaktivität führt, blieb aus (Razin, 1998). Der direkte Zusammenhang konnte erst durch Injektion methylierter und nicht methylierter Konstrukte, unter Kontrolle des hsp70 Promotors, in *Xenopus laevis* Oozyten gezeigt werden. Bei der methylierten DNA konnte eine vollständige Inaktivierung des Gens

beobachtet werden. Interessanterweise führte die Injektion des nicht-methylierten Konstruktes nicht zur transkriptionellen Repression (Kass et al., 1997). Nach diesen Experimenten wurde eindeutig der kausale Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von Genen durch Methylierung und Modifikation der Chromatinstruktur nachgewiesen (Jones et al., 1998). Bei sogenannten *housekeeping*-Genen, die ständig transkribiert werden, findet häufig keine Methylierung der CpG-Dinukleotide in der Promotorsequenz statt (Bird, 1986; Gardiner-Garden & Frommer, 1987; Larsen et al., 1992).

### 6.11 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der verwendete proximale, leberspezifische Promotor des Ratten-APOBEC-1 Gens in den transgenen Kaninchen nicht ausreichend aktiv ist, um die hepatische Apo B mRNA zu editieren. Schon in der Ratte ist der Promotor hoch methyliert und nur die *Core*-Region um den Transkriptionsstart bleibt unmethyliert. Bei Verwendung des Ratten Promotors in transgenen Kaninchen kommt es auch zur Methylierung dieser Region und damit zur Inaktivierung des Transgens. Dieser Bereich scheint demnach eine besonders wichtige Funktion für die Aktivität des Promotors zu haben. Offensichtlich ist der proximale, leberspezifische Promotor des APOBEC-1 Gens der Ratte ein Spezies-spezifischer Promotor, der nicht universell in transgenen Tieren einsetzbar ist. Für das Konzept, durch regulierte Expression von APOBEC-1 in der menschlichen Leber die LDL-Spiegel im Blut zu begrenzen, ist demnach dieser Promotor nicht geeignet. Für dieses Ziel müssen in der Zukunft andere Ansätze gewählt werden. Denkbar wäre zum Beispiel der Einsatz von menschlichen leberspezifischen Promotoren, die allerdings nur eine geringe Expression aufweisen dürfen. In neuen transgenen Experimenten wäre dann zu prüfen, ob eine so induzierte Expression von APOBEC-1 unschädlich ist und trotzdem ausreicht, um durch Editing der Apo B mRNA erhöhte LDL-Spiegel zu senken. Möglich wäre hier der Einsatz von flankierenden MAR-Elementen, um die transgene Expression zu verstärken (Nayler et al., 1998). Auch der Einsatz eines genomischen P1-Klons des APOBEC-1 Gens von Maus oder Ratte als Transgen wäre vorstellbar. Allerdings gelten hier, wie auch schon ausführlich diskutiert, die gleichen Risiken in Bezug auf Insertionsmutagenese, Positionseffekte und *de novo* Methylierung bezüglich des Transgens. Eine gezielte Integration eines Transgens durch Blastocysteninjektion könnte die Risiken einer Mikroinjektion in die Vorkerne minimieren. Durch dieses Verfahren könnte möglicherweise mittels homologer Rekombination das APOBEC-1 Gen des Kaninchens durch das Ratten-APOBEC-1 Gen ausgetauscht werden. Momentan ist dieses Verfahren nur bei bestimmten Mausstämmen

möglich. Es bleibt abzuwarten, ob diese Technik in näherer Zukunft auch bei embryonalen Stammzellen von Kaninchen anwendbar sein wird.

Derzeit wird untersucht, ob das spezifische Methylierungsmuster des proximalen, leberspezifischen Ratten-APOBEC-1 Promotors für die Gewebsspezifität verantwortlich ist. Die vorliegenden Daten legen diese Annahme nahe. Durch weitere Methylierungsanalysen der genomischen DNA aus Geweben der Ratte, die APOBEC-1 nicht exprimieren (Greeve et al., 1998), soll nachgewiesen werden, ob in diesen Organen der Ratte die *Core*-Region des Promotors wie in den transgenen Kaninchen methyliert ist.

## 7 Anhang

### 7.1 Nukleotidsequenz von pAPOBEC-1

TCGCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	GAGACGGTCA	60
CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCG	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG	120
TTGGCGGGTG	TCGGGGCTGG	CTTAACTATG	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	180
ACCATATGCG	GTGTGAAATA	CCGCACAGAT	GCGTAAGGAG	AAAATACCGC	ATCAGGCGCC	240
ATTGCCATT	CAGGCTGCGC	AACTGTTGGG	AAGGGCGATC	GGTGCGGGCC	TCTTCGCTAT	300
TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA	ACGCCAGGGT	360
TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGCCAA	GCTTGCATGC	CTGCAGGTCG	420
ACGGCCCGGG	CTGGTAAATA	GATATTGGAT	TATGTGTACA	TGTGTTTGAT	ACTTTCCAAT	480
TTTTTCAAAA	AAATAATTTA	TATACAGAAA	TATATTTATT	ATAGAATTAT	ATATAGAAAT	540
CATTCTTTTT	TATGTACATG	GGTGTTTGGA	CTGTATATAT	GTCCGTACAA	AGGTGTCAGA	600
TCCCGTGGAA	CAGGAGTTAC	AGACAATTAT	GAGCTGCCAT	GTGGGTGCTG	GGAATGGAAC	660
CTGGGAGAGC	AGTCATTGCT	CTTAGCCACT	GAGCCATCAT	CTCTCCAGCC	CAGTGCTATC	720
CTCTCCTAAT	TAGCTAGAGC	TGTCAGCCTA	CCACAGCCCC	GAGTCATTAT	CTCAGGGAGT	780
CTCAATGGGG	AATTGCCTTG	GTCAGACTGG	CCTTCGGGTT	CTGTCTGTGA	GACATTTTAT	840
TGATGATTGA	TTGATGTGGG	AGGGCCCAGC	CCACTCTGGG	CAGTGCTACC	CCTGGGCAGG	900
TAGCAGGCTG	AGGGGCTGGA	GGGATAACTC	AGTGGTTCAG	AGCCTGTGCC	GCTCTTGCAg	960
AAAACCAGAG	TTGAGTTCCC	AGCACCCACG	TCAGGCAGCT	GTGTGCTCCA	GTGAATCGCA	1020
CACGCACACC	CCTAAAAATA	AAGTAAACTA	GGGAAGAAAA	GAAAAGAAAAG	CAGGTTGAGC	1080
AAGCCATGAG	GAGCAAGCCA	GTGTTTCAGG	TTTCTCCATG	GTTTCCCCTT	TAATTTCTGC	1140
ATCCTGTTCC	TCTTTTAAGC	TCCTGTTGTG	ACTTCTCTCA	GTGATGAGTT	GTTCTCTAGA	1200
ACTGTAGGAT	GAAACAAATC	CTTTCTTCCC	CAGGTTGTTT	TTGGTGGTGT	TTGTCATAGC	1260
AACAGTAAAG	CGAAGTAGGA	CCTTTCCATG	CAGGGAGGCT	GGAGAGCAGG	CTCAGCAGGT	1320
AAGAGTAACT	GTGGCTAAAT	CCTGGGCAGC	ACTGGAGCTC	TGATCTCAGC	ACCCATGTAA	1380
CAAGCCTGGT	GCCCTGCAAA	CAACTCCTAA	AGTCACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	1440
ACACACACAC	ACACACACAG	AGGGAAACTG	GGTTTTTGCT	TATGTGAAAC	AGGGCTTCTT	1500
CTGTGTAGTC	CTGGCTGTCC	TGCAATTCTC	TCAGCAGGCT	ATGCTGGTCT	TTAACTCAGA	1560
GGTCCAGTCA	CTTCTGCCTC	CCATGTGCCA	GGATTCAATG	TGTGTGCCAC	TACCTCCTGG	1620
TTCCAAAAAA	AATCAGTCTT	TTTACACATC	TATAATCCCA	ACACCTGGGA	GGCAGAGATA	1680
GGTGGATCTC	TGAGTTGGGG	CTAGCCTGGT	CTATAGAGAG	CGTTATAGAT	AGCCAGAGTC	1740
ATGTAAAAAG	ACCTTGTCTC	AAAAAGTAGG	AGGAGAAGAA	GAAACGAAAA	GAAAAAAAAA	1800

TAGTAGAAAC	CTTGTTGAAA	GGATAATGGC	GAAAGAAGGA	ATCGAACTGA	AGCCATTTTT	1860
GAATAAGACT	TCCATTTTGA	TAGAGGTCAG	ATAAAGTTCA	TGTTCCCAAG	ACCGCAATGG	1920
GTAAGTACAC	TCCTGCTCCG	CCAGTTGAGA	CATGATTGCT	AGGCAAATCT	CCCACCACAG	1980
TCGAATAAAC	CAACAGTGGG	AACAGGGTGA	GTGTACCACA	AAGGCGAGTT	GCTAAGGAAG	2040
TCCTCTGTCC	CTAAATCCTA	ATTAGTGGGG	TAAGTTGGCA	GAGTTGTTTG	TGGTTTTGGA	2100
GCTTACAAAC	TCTGTGGAAT	TCTTGGGAGG	GGGGCAGGTC	AGTTTTTGCT	GCCTAATTCA	2160
AATAAAGAAG	TTGCGTCGCT	GGACTCTTGT	GATGGCTTAA	ATTTTTTATT	TTTTTATTTT	2220
TTTTATTTTA	CACCTAACGT	TTGGGTACCA	AACGCCGACC	CACTTGATCC	CTAAAACTGA	2280
ATTAGGAGCA	CCTCGGACTG	TTTTTCAGTC	ATCTGGACTC	TCGGAGGTAA	GCCTGTATTC	2340
TGATTTCTGG	TTGGAGCCTG	TCTGGGACCC	AAGCAAGAAG	AAAGTGGATG	CGGCACTGCT	2400
CCTGGGGTTA	GAGGTGGACA	GGAGATGTCC	TGCCTTTTCA	CTGGTTTCCA	CTGAGGGGAC	2460
ATTTGGTTCT	GGTTCTGGGC	ATGCGGGATT	GCTCTTGTCT	GTTTGTGTCT	GTAGTTTGAT	2520
TTAGTTTGGT	TGTTGCTCTG	TGTTTCATAT	CCGGGAAAAT	GGACCAAAGT	TCTTCTGCTG	2580
GCTGTTCACC	TCTTGGCTTA	GTATGTAACC	ATCTCAAGGA	TTTTCAGGGG	GTAAAAAGCG	2640
GCTGGATCAG	GACAACAACA	ATAACAACAA	AAACAGATAA	ACTGGCTGAC	ACTGAGTCCA	2700
GCGCTGCTGG	TGAAGCCCCG	CCTCCTGCTC	GCCTGACAGC	AAACCCAGC	CACCTGATTT	2760
GTCCAAGTCC	CTCTTAAAGC	CGAACCAGCA	ATTCTCAGC	TTTCTCTGGT	CAGGAAGCCT	2820
GTGCCTACTC	CCGCTACAGA	ACCACTGTGC	CCATGAGAGT	TGGATTTTGA	AGGCAGAAAAG	2880
GCAATCACTA	GTGCGGCCGC	CTGCAGGTCG	ACTCTAGACC	CGAGGAAGGA	GTCCAGAGAC	2940
ACAGAGAGCA	AGATGAGTTC	CGAGACAGGC	CCTGTAGCTG	TTGATCCAC	TCTGAGGAGA	3000
AGAATTGAGC	CCCACGAGTT	TGAAGTCTTC	TTTGACCCCC	GGGAACTTCG	GAAAGAGACC	3060
TGTCTGCTGT	ATGAGATCAA	CTGGGGAGGA	AGGCACAGCA	TCTGGCGACA	CACGAGCCAA	3120
AACACCAACA	AACACGTTGA	AGTCAATTTT	ATAGAAAAAT	TTACTACAGA	AAGATACTTT	3180
TGTCCAAACA	CCAGATGCTC	CATTACCTGG	TTCTGTCTCT	GGAGTCCCTG	TGGGGAGTGC	3240
TCCAGGGCCA	TTACAGAATT	TTTGAGCCGA	TACCCCATG	TAAGTCTGTT	TATTTATATA	3300
GCACGGCTTT	ATCACCACGC	AGATCCTCGA	AATCGGCAAG	GACTCAGGGA	CCTTATTAGC	3360
AGCGGTGTTA	CTATCCAGAT	CATGACGGAG	CAAGAGTCTG	GCTACTGCTG	GAGGAATTTT	3420
GTCAACTACT	CCCCTTCGAA	TGAAGCTCAT	TGGCCAAGGT	ACCCCATCT	GTGGGTGAGG	3480
CTGTACGTAC	TGGAAGTCTA	CTGCATCATT	TTAGGACTTC	CACCCTGTTT	AAATATTTTA	3540
AGAAGAAAAC	AACCTCAACT	CACGTTTTTT	ACGATTGCTC	TTCAAAGCTG	CCATTACCAA	3600
AGGCTACCAC	CCCACATCCT	GTGGGCCACA	TGGTTGAAAT	GACTGGGGGG	AGCTCGACTG	3660
CGATGAGTGG	CAGGGCGGGG	CGTAATTTTT	TTAAGGCAGT	TATTGGTGCC	CTTAAACGCC	3720
TGGTGTCTACG	CCTGAATAAG	TGATAATAAG	CGGATGAATG	GCAGAAATTC	GCCGGATCTT	3780



TGTGAAGGAA	CCTTACTTCT	GTGGTGTGAC	ATAATTGGAC	AAACTACCTA	CAGAGATTTA	3840
AAGCTCTAAG	GTAAATATAA	AATTTTTTAAG	TGTATAATGT	GTAAACTAC	TGATTCTAAT	3900
TGTTTGTGTA	TTTTAGATTC	CAACCTATGG	AACTGATGAA	TGGGAGCAGT	GGTGAATGC	3960
CTTTAATGAG	GAAAACCTGT	TTTGCTCAGA	AGAAATGCCA	TCTAGTGATG	ATGAGGCTAC	4020
TGCTGACTCT	CAACATTCTA	CTCCTCCAAA	AAAGAAGAGA	AAGGTAGAAG	ACCCCAAGGA	4080
CTTTCCTTCA	GAATTGCTAA	GTTTTTTGAG	TCATGCTGTG	TTTAGTAATA	GAACTCTTGC	4140
TTGCTTTGCT	ATTTACACCA	CAAAGGAAAA	AGCTGCACTG	CTATACAAGA	AAATTATGGA	4200
AAAATATTCT	GTAACCTTTA	TAAGTAGGCA	TAACAGTTAT	AATCATAACA	TACTGTTTTT	4260
TCTTACTCCA	CACAGGCATA	GAGTGTCTGC	TATTAATAAC	TATGCTCAAA	AATTGTGTAC	4320
CTTTAGCTTT	TTAATTTGTA	AAGGGGTAA	TAAGGAATAT	TTGATGTATA	GTGCCCTTGAC	4380
TAGAGATCAT	AATCAGCCAT	ACCACATTTG	TAGAGGTTTT	ACTTGCTTTA	AAAAACCTCC	4440
CACACCTCCC	CCTGAACCTG	AAACATAAAA	TGAATGCAAT	TGTTGTTGTT	AACTTGTTTA	4500
TTGCAGCTTA	TAATGGTTAC	AAATAAAGCA	ATAGCATCAC	AAATTTCACA	AATAAAGCAT	4560
TTTTTTCACT	GCATTCTAGT	TGTGGTTTGT	CCAAACTCAT	CAATGTATCT	TATCATGTCT	4620
GGATCCCCGG	GTACCGAGCT	CGAATTCGTA	ATCATGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGTGTGAAA	4680
TTGTTATCCG	CTCACAATTC	CACACAACAT	ACGAGCCGGA	AGCATAAAGT	GTAAAGCCTG	4740
GGGTGCCTAA	TGAGTGAGCT	AACTCACATT	AATTCGTTG	CGCTCACTGC	CCGCTTTCCA	4800
GTCGGGAAAC	CTGTGCTGCC	AGCTGCATTA	ATGAATCGGC	CAACGCGCGG	GGAGAGGCGG	4860
TTTGCGTATT	GGGCGCTCTT	CCGCTTCCTC	GCTCACTGAC	TCGCTGCGCT	CGGTCGTTCCG	4920
GCTGCGGCGA	GCGGTATCAG	CTCACTCAAA	GGCGGTAATA	CGGTTATCCA	CAGAATCAGG	4980
GGATAACGCA	GGAAAGAACA	TGTGAGCAAA	AGGCCAGCAA	AAGGCCAGGA	ACCGTAAAAA	5040
GGCCGCGTTG	CTGGCGTTTT	TCCATAGGCT	CCGCCCCCT	GACGAGCATC	ACAAAAATCG	5100
ACGCTCAAGT	CAGAGGTGGC	GAAACCCGAC	AGGACTATAA	AGATACCAGG	CGTTTCCCCC	5160
TGGAAGCTCC	CTCGTGCGCT	CTCCTGTTCC	GACCCTGCCG	CTTACCGGAT	ACCTGTCCGC	5220
CTTTCTCCCT	TCGGGAAGCG	TGGCGCTTTC	TCAAAGCTCA	CGCTGTAGGT	ATCTCAGTTC	5280
GGTGTAGGTC	GTTGCTCCA	AGCTGGGCTG	TGTGCACGAA	CCCCCGTTC	AGCCCGACCG	5340
CTGCGCCTTA	TCCGGTAACT	ATCGTCTTGA	GTCCAACCCG	GTAAGACACG	ACTTATCGCC	5400
ACTGGCAGCA	GCCACTGGTA	ACAGGATTAG	CAGAGCGAGG	TATGTAGGCG	GTGCTACAGA	5460
GTTCTTGAAG	TGGTGGCCTA	ACTACGGCTA	CACTAGAAGA	ACAGTATTTG	GTATCTGCGC	5520
TCTGCTGAAG	CCAGTTACCT	TCGGAAAAAG	AGTTGGTAGC	TCTTGATCCG	GCAAAACAAAC	5580
CACCGCTGGT	AGCGGTGGTT	TTTTTTGTTT	CAAGCAGCAG	ATTACGCGCA	GAAAAAAAGG	5640
ATCTCAAGAA	GATCCTTTGA	TCTTTTCTAC	GGGGTCTGAC	GCTCAGTGGA	ACGAAAACTC	5700
ACGTTAAGGG	ATTTTGGTCA	TGAGATTATC	AAAAAGGATC	TTCACCTAGA	TCCTTTTAAA	5760

---

TTAAAAATGA	AGTTTTAAAT	CAATCTAAAG	TATATATGAG	TAAACTTGGT	CTGACAGTTA	5820
CCAATGCTTA	ATCAGTGAGG	CACCTATCTC	AGCGATCTGT	CTATTTTCGTT	CATCCATAGT	5880
TGCCTGACTC	CCCGTCTGT	AGATAACTAC	GATACGGGAG	GGCTTACCAT	CTGGCCCCAG	5940
TGCTGCAATG	ATACCGCGAG	ACCCACGCTC	ACCGGCTCCA	GATTTATCAG	CAATAAACCA	6000
GCCAGCCGGA	AGGGCCGAGC	GCAGAAGTGG	TCCTGCAACT	TTATCCGCCT	CCATCCAGTC	6060
TATTAATTGT	TGCCGGGAAG	CTAGAGTAAG	TAGTTCGCCA	GTTAATAGTT	TGCGCAACGT	6120
TGTTGCCATT	GCTACAGGCA	TCGTGGTGTC	ACGCTCGTCG	TTTGGTATGG	CTTCATTCAG	6180
CTCCGGTTCC	CAACGATCAA	GGCGAGTTAC	ATGATCCCCC	ATGTTGTGCA	AAAAAGCGGT	6240
TAGCTCCTTC	GGTCCTCCGA	TCGTTGTCAG	AAGTAAGTTG	GCCGAGTGT	TATCACTCAT	6300
GGTTATGGCA	GCACTGCATA	ATTCTCTTAC	TGTCATGCCA	TCCGTAAGAT	GCTTTTCTGT	6360
GACTGGTGAG	TACTCAACCA	AGTCATTCTG	AGAATAGTGT	ATGCGGCGAC	CGAGTTGCTC	6420
TTGCCCGGCG	TCAATACGGG	ATAATACCGC	GCCACATAGC	AGAACTTTAA	AAGTGCTCAT	6480
CATTGGAAAA	CGTTCTTCGG	GGCGAAAAC	CTCAAGGATC	TTACCGCTGT	TGAGATCCAG	6540
TTCGATGTAA	CCCCTCGTG	CACCCAAC	ATCTTCAGCA	TCTTTTACTT	TCACCAGCGT	6600
TTCTGGGTGA	GCAAAAACAG	GAAGGCAAAA	TGCCGCAAAA	AAGGGAATAA	GGGCGACACG	6660
GAAATGTTGA	ATACTCATA	TCTTCCTTTT	TCAATATTAT	TGAAGCATTT	ATCAGGGTTA	6720
TTGTCTCATG	AGCGGATACA	TATTTGAATG	TATTTAGAAA	AATAAACAAA	TAGGGGTTCC	6780
GCGCACATTT	CCCCGAAAAG	TGCCACCTGA	CGTCTAAGAA	ACCATTATTA	TCATGACATT	6840
AACCTATAAA	AATAGGCGTA	TCACGAGGCC	CTTTCGTC			

## 7.2 Sicherheitsdaten der verwendeten Chemikalien

### Acrylamid

R-Sätze: 45, 46, E24/25, E48/23/24/25

S-Sätze: 53, 45

### Formamid

R-Sätze: 61

S-Sätze: 53, 24/25, 37, 45

### 1-Brom-3-Chlorpropan

R-Sätze: 22, 36/37/38,

S-Sätze: 26, 36

### Glutaraldehydlösung

R-Sätze: 22, 23, 34, 42/43, 50

S-Sätze: 26, 36/37/39, 45, 61

### Chloroform

R-Sätze: 47, 20/22, 38, 40, 48

S-Sätze: 53, 36/37

### Hydrochinon

R-Sätze: 22, 40, 41, 43, 50

S-Sätze: 26, 36/37/39, 61

### Diethylether

R-Sätze: 12, 19

S-Sätze: 9, 16, 29, 33

### Kaliumhexacyanoferrat(II)

R-Sätze: 52/53

S-Sätze: 50.1, 61

### Diethylpyrocarbonat

R-Sätze: 23/24/25, 36/37/38

S-Sätze: 45, 26, 36/37/39

### Kupfersulfat(II)

R-Sätze: 22, 36/38, 50, 53

S-Sätze: 22, 60, 61

### Essigsäure

R-Sätze: 10, 35

S-Sätze: 23.2, 26, 36/37/39, 45

### Methanol

R-Sätze: 11, 23/25

S-Sätze: 2, 7, 16, 24

### Ethanol

R-Sätze: 11

S-Sätze: 7, 16

### Natriumbisulfit

R-Sätze: 22, 36/37/38

S-Sätze: ---

**Ethidiumbromid**

R-Sätze: 22, 26, 36/37/38, 40

S-Sätze: 26, 28.2, 36/37, 45

**Formaldehyd**

R-Sätze: 23/24/25, 34, 39/23/24/25, 40, 43

S-Sätze: 26, 36, /37/39, 45, 51

**2-Propanol**

R-Sätze: 11, 36, 67

S-Sätze: 7, 16, 24/25, 26

**Salzsäure**

R-Sätze: 34, 37

S-Sätze: 2, 26

**3,3',5-Triiodo-L-Thyronin**

R-Sätze: 20/21/22

S-Sätze: 36

**Natriumhydroxid**

R-Sätze: 34

S-Sätze: 26, 28.2, 36/37, 45

**Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol**

R-Sätze: 45, 46, 23/24/25, 34

S-Sätze: 45, 26, 27, 36/37/39

**Tris(hydroxymethyl)aminomethan**

R-Sätze: 36/37/38

S-Sätze: 26, 36

**TRI Reagent®**

R-Sätze: 24/25, 34

S-Sätze: 28, 45

### 7.3 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozente pro Volumen
A	Adenin
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionicacid</i>
Apo B	Apolipoprotein B
APOBEC-1	<i>apo B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1</i>
ASP	<i>APOBEC-1 stimulating protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
CD-PCR	<i>cytosine deamination-PCR</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> <sup>®</sup>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung/ Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>

---

hsp	<i>heat shock promoter</i>
HSV	Herpes Simplex Virus-1
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAR	<i>matrix attachment region</i>
mcs	<i>multiple cloning site</i>
MED-1	<i>multiple start site element downstream-1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nt	Nukleotide
NZW	New Zealand White
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SV	<i>simian virus</i>
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
T	Thymin
T3	3, 5, 3'-Triiod-L-thyronin
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethylethylendiamin
tRNA	<i>transfer RNA</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## 8 Literaturverzeichnis

- 4S-Study. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with Coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). (1994) *Lancet* **19**, 1383-1383.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipmann, D.J. (1990) Basic logic alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Anant, S., MacGinnitie, A.J. & Davidson, N.O. (1995) APOBEC-1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme, is a novel RNA-binding protein. *J Biol Chem* **270**, 14762-14767.
- Baker, W., van den Broek, A., Camon, E., Hingamp, P., Sterk, P., Stoesser, G. & Tuli, M.A. (2000) The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucl Acids Res* **28**, 19-23.
- Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis. *Trends Genet* **16**, 169-174.
- Beard, C., Li, E. & Jaenisch, R. (1995) Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* **9**, 2325-2334.
- Ben-Hattar, J., Beard, P. & Jiricny J. (1989) Cytosine methylation in CTF and Sp1 recognition sites of an HSV tk promoter: effects on transcription in vivo and on factor binding in vitro. *Nucleic Acids Res* **25**, 10179-10190.
- Ben-Hattar, J. & Jiricny J. (1988) Methylation of single CpGs within the second distal promoter element of the HSV-1 tk gene downregulates its transcription in vivo. *Gene* **65**, 219-227.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H. & Tromp, M.C. (1986) Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**, 819-826.

- Berg, J.M. (1992) Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 11109-11110.
- Bestor, T.H. (1998) Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* **393**, 311-312.
- Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213.
- Bird, A.P. & Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-454.
- Bourara, K., Litvak, S. & Araya, A. (2000) Generation of G-to-A and C-to-U changes in HIV-1 transcripts by RNA editing. *Science* **289**, 1564-1566.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of Protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Breslow, J.L. (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science* **272**, 685-688.
- Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinis R.E & Palmiter, R.D. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 836-840.
- Brousseau, M.E. & Hoeg, J.M. (1999) Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res* **40**, 365-375.
- Brown, M.S & Goldstein, J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47.



- Brunner, C., Kraft, H.G., Utermann, G. & Müller, H.J. (1993) Cysteine 4057 of apolipoprotein(a) is essential for lipoprotein(a) assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11643-47.
- Campanaro, M.R., Armstrong, M.A. & Flemington E.K. (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6481-6486.
- Casey, J.L., Bergmann, K.F., Brown, T.L. & Gerin, J.L. (1992) Structural requirements for RNA editing in hepatitis delta virus: evidence for a uridine-to-cytidine editing mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 7149-7153.
- Challita, P.M., Skelton, D., el-Khoueiry, A., Yu, X.J., Weinberg, K. & Kohn, D.B. (1995) Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. *J Virol* **69**, 748-755.
- Chapman, M.J. (1980) Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res* **21**, 789-853.
- Chen, S.H., Habib, G., Yang, C.Y., Gu, Z.W., Lee, B.R., Weng, S.A., Silbermann, S.R., Cai, S.J., Deslypere, J.P., Rosseneu, M., Gotto, M., Li, W.H. & Chan, L. (1987) Apo B48 is the product from a messenger RNA with an organ-specific in-frame translational stop codon. *Science* **238**, 363-366.
- Choi, T., Huang, M., Gorman, C. & Jaenisch, R.A. (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **11**, 3070-3074.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **163**, 156-159.
- Clark, S.J., Harrison, J. & Frommer, M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acid Res* **22**, 2990-2997.

- Colot, V. & Rossignol, J.L. (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* **21**, 402-411.
- Committee for Standardized Karyotype of *Oryctolagus cuniculus*: Standard karyotype of the laboratory rabbit. *Oryctolagus cuniculus* (1981). *Cytogenet Cell Genet* **31**, 240-248.
- Covello, P.S. & Gray, M.W. (1993) On the evolution of RNA editing. *Trends Genet* **9**, 265-268.
- Croteau, D.L. & Bohr, V.A. (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* **272**, 25409-24412.
- Cruz-Reyes, J. & Sollner-Webb, B., (1996) Typanosome U-deletional RNA editing involves guide RNA-directed endonuclease cleavage, terminal U exonuclease, and RNA ligase activities. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8901-8906.
- Current Protocols in Molecular Biology* Vol. I (1987) edit. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Morre, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S. & Pfeifer, G.P. (2000) Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* **25**, 315-319.
- Davidson, N.O., Carlos, R.C., Drewek, M.J. & Parmer, T.G. (1988) Apolipoprotein gene expression in the rat is regulated in a tissue-specific manner by thyroid hormone. *J Lipid Res* **29**, 1511-1522.
- Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E. & Schibler, U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* **4**, 1541-1551.

- Driscoll, D.M. & Zhang, Q. (1994) Expression and characterization of p27, the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme. *J Biol Chem* **269**, 19843-19847.
- Driscoll, D.M. Wynne J.k. & Scott, J. (1989) An in vitro system for the editing of apolipoprotein B mRNA. *Cell* **58**, 519-525.
- Eden, S. & Cedar, H. (1994) Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 255-259.
- Efstratiadis, A. (1994) Parental imprinting of autosomal mammalian genes. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 265-280.
- Faisst, S. & Meyer, S. (1992) Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res* **20**, 3-26.
- Fujino, T., Navaratnam, N. & Scott, J. (1998) Human apolipoprotein B RNA editing deaminase gene (APOBEC-1). *Genomics* **47**, 266-275.
- Hendrich, B. & Bird, A.P. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**, 6538-6547.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**, 261-282.
- Gellert, M. (1997) Recent advances in understanding V(D)J recombination. *Adv Immunol* **64**, 39-64.
- Gerber, A.P. & Keller, W. (1999) An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science* **286**, 1146-1149.

- Goldstein, J.L., Hobbs, H. & Brown M.S. (1995) Familial hypercholesterolemia. In *The Metabolic and molecular bases of inherited disease*. C.R. Scriver et al., editors. McGraw-Hill. New York, NY. 1981-2030
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. & Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 7380-7384.
- Greeve, J., Navaratnam, N. & Scott, J. (1991) Characterization of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme: no similarity to the proposed mechanism of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Nucleic Acids Res* **19**, 3569-3576.
- Greeve, J., Altkemper, I., Dieterich, J.-H., Greten, H. & Windler, E. (1993) Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* **34**, 1367-1383.
- Greeve, J., Jona, V.K., Roy Chowdhury, N., Horwitz, M.S. & Roy Chowdhury, J. (1996) Hepatic gene transfer of the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme results in a reduction of plasma LDL levels in normal and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Lipid Res* **37**, 2001-2017.
- Greeve, J., Axelos, D., Welker, S., Schipper, M. & Greten, H. (1998) Distinct Promoters Induce APOBEC-1 Expression in Rat Liver and Intestine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1079-1092.
- Greeve, J., Lellek, H., Apostel, F., Hundoegger, K., Barialai, A., Kirsten, R., Welker, S., Greten, H. (1999) Absence of APOBEC-1 mediated mRNA editing in human carcinomas. *Oncogene* **18**, 6357-6366.
- Gualberto, J.M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J.H. & Grienenberger, J.M. (1989) RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* **341**, 660-662.

- Haber, J.E. (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* **24**, 271-275.
- Hardman, D.A., Pullinger, C.R., Hamilton, R.L., Kane, J.P. & Malloy M.J. (1991) Molecular and metabolic basis for the metabolic disorder normotriglyceridemic abetalipoproteinemia. *J Clin Invest* **88**, 1722-1729.
- Harrington, M.A., Jones, P.A., Imagawa M. & Karin, M. (1988) Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2066-2070.
- Havel, R.J., Eder, H.A. & Bragton, J.H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**, 1345-1353.
- Herber, A. & Rich, A. (1999) Left-handed Z-DNA: Structure and function. *Genetics* **106**, 37-47.
- Hiesel, R., von Haeseler, A. & Brennicke A. (1994) Plant mitochondrial nucleic acid sequences as a tool for phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 634-638.
- Higuchi, M., Maas, S., Single, F.N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R. & Seeburg, P.H. (2000) Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* **406**, 78-81.
- Hirano, K., Young, S.G., Farese, Jr., R.V., Ng, J., Sande, E., Warburton, C., Powell-Braxton, L.M. & Davidson, N.O. (1996) Targeted Disruption of the Mouse *apobec-1* Gene Abolishes Apolipoprotein B mRNA Editing and Eliminates Apolipoprotein B-48. *J Biol Chem* **271**, 9887-9890.
- Hirano, K.I., Min, J., Funahashi, T. & Davidson, N.O. (1997) Cloning and characterization of the rat APOBEC-1 gene: a comparative analysis of gene structure and promoter usage in rat and mouse. *J Lipid Res* **38**, 1103-1118.

- Hogan, B., Costantini, F. & Lacy, E. (1994) *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Holler, M., Westin, G., Jiricny, J. & Schaffner W. (1998) Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* **2**, 1127-1135.
- Hsieh, C.-L. (1994) Dependence of Transcriptional Repression of CpG Methylation Density. *Mol Cell Biol* **14**, 5487-5494.
- Hughes, S.D., Rouy, D., Navaratnam, N., Scott, J. & Rubin, E.M. (1996) Gene transfer of cytidine deaminase Apobec-1 lowers lipoprotein(a) in transgenic mice and induces apolipoprotein B editing in rabbits. *Hum Gene Ther* **7**, 39-49.
- Iguchi-Ariga, S.M. & Schaffner, W. (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* **3**, 612-619.
- Ince, T. & Scotto, K. (1995) A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters. *J Biol Chem* **270**, 30249-30525.
- Innerarity, T.L., Boren, J., Yamanaka, S. & Olofson, S.-O. (1996) Biosynthesis of apo B48-containing lipoproteins. *J Biol Chem* **271**, 2353-2356.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E. & Herz, J. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* **92**, 883-893.
- Ishibashi, S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. Herz, J. & Burns, D.K. (1994) Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* **93**, 1885-1893.

- Jäckle, S., Rinninger, F., Greeve, J., Greten, H. & Windler, E. (1992) Regulation of hepatic removal of chylomicron remnants and VLDL proteins in the rat. *J Lipid Res* **33**, 419-429.
- Johnson, D.F., Poksay, S. & Innerarity, T.L. (1993) The mechanism for apo B mRNA editing is deamination. *Biochem Biophys Res Com* **195**, 1204-1210.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**, 187-191.
- Jones, P.A. & Laird, P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* **21**, 163-167.
- Kane, J.P. (1983) Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu Rev Physiol* **45**, 637-650.
- Kass, S.U., Landsberger, N. & Wolffe, A.P. (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* **7**, 157-165.
- Kass, S.U., Pruss, D. & Wolffe, A.P. (1997) How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* **13**, 444-449.
- Khoury, G. & Grass, P. (1983) Enhancer Elements. *Cell* **33**, 313-315.
- Knoepfler, P.S. & Eisenman, R.N. (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**, 447-450.
- Kozarsky, K.F., Bonen, D.K., Giannoni, F., Funahashi, T., Wilson, J.M. & Davidson, N.O. (1996) Hepatic expression of the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme (apobec-1) ameliorates hypercholesterolemia in LDL receptor-deficient rabbits. *Hum Gene Ther* **7**, 943-57.

- Lalande, M. (1996) Parental imprinting and human disease. *Annu Rev Genet* **30**, 173-195.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R. & Prydz, H. (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13**, 1095-1107.
- Law, M.F., Byrne, J.C. & Howly, P.M. (1983) A stable bovine papillomavirus hybrid that expresses a dominant selective trait. *Mol Cell Biol* **3**, 2110-2115.
- Lellek, H., Kirsten, R., Diehl, I., Apostel, F., Buck, F. & Greeve, J. (2000) Purification and Molecular Cloning of a Novel Essential Component of the Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme-Complex. *J Biol Chem* **275**, 19848-19856.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L. & Ward, D.C. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* **80**, 224-234.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Linton, M.F., Farese, R.V. & Young S.G. (1993) Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* **34**, 521-541.
- Longacre, A. & Storb, U. (2000) A novel cytidine deaminase affects antibody diversity. *Cell* **102**, 541-544.
- Lorentz, A., Plonné, D., Schulze, H.-P. & Dargel, R. (1996) Dexamethasone enhanced by insulin, but not by thyroid hormones stimulates apolipoprotein B mRNA editing in cultured rat hepatocytes depending on the developmental stage. *FEBS Lett* **391**, 57-60.



- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randell, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 165-175.
- Märki, U. & Härrilä A. (1996) Transgenic technology: principles. *Int J Exp Path* **77**, 247-250.
- Maas, S., Melcher, T. & Seeburg, P.H. (1997) Mammalian RNA-dependent deaminases and edited mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 343-349.
- Mattaj, I.W. & Engelmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**, 265-306.
- Melcher, T., Maas, S., Higuchi, M., Keller, W. & Seeburg, P.H. (1995) Editing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion. *J Biol Chem* **270**, 8566-8570.
- Melcher, T., Maas, S., Herb, A., Sprengel, R., Seeburg, P.H. & Higuchi, M. (1996) A mammalian RNA editing enzyme. *Nature* **379**, 460-463.
- Mehta, A. Kinter, M.T., Sherman, N.E. & Driscoll, D.M. (2000) Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA-binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol* **20**, 1846-1854.
- Morrison, J.R., Pászty, C., Stevens, M.E., Hughes, S.D., Forte, T., Scott, J. & Rubin, E.M. (1996) Apolipoprotein B RNA editing enzyme-deficient mice are viable despite alterations in lipoprotein metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7154-7159.
- Mohandas, T., Sparkes, R.S. & Shapiro, L.J. (1981) Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* **211**, 393-396.

- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O. & Honjo, T. (1999) Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* **274**, 18470-18476.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. & Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563.
- Nakamuta, M., Oka, K., Krushkal, J., Kobayashi, K., Yamamoto, M., Li, W.-H. & Chan, L. (1995) Alternative mRNA splicing and differential promoter utilization determine tissue-specific expression of the apolipoprotein B mRNA editing protein (APOBEC-1) gene in mice. *J Biol Chem* **270**, 13042-13056.
- Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L. & Ross, R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions in all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscle Thromb* **14**, 133-140.
- Nan, X., Campoy, F.J. & Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**, 471-481.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. & Bird, A.P. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.
- Navaratnam, N., Morrison, J.R., Battacharya, S., Patel, D., Funahashi, T., Giannoni, F., Teng, B.B., Davidson, N.O. & Scott, J. (1993) The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. *J Biol Chem* **268**, 20709-20712.
- Navaratnam, N., Battacharya, S., Fufino, T., Patel, D., Jaumuz, A.L. & Scott, J. (1995) Evolutionary origins of apo B mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell* **81**, 187-195.

- Nayler, O., Strätling, W., Bourquin, J.-P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A.M., Fackelmayer, F.O, Ulrich, A. & Stamm, S. (1998) SAF-B couples transcription and pre-mRNA splicing components to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res* **26**, 3542-3549.
- Nevins, J.R. (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**, 424-429.
- Ng, H.-H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H. Tempst, P., Reinberg, D. & Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* **23**, 58-61.
- Oettinger, M.A. (1999) V(D)J recombination: on the cutting edge. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 325-329.
- Palladino, M.J., Keegan, L.P., O'Connell, M.A. & Reenan, R.A. (2000) A-to-I pre-mRNA editing in Drosophila is primarily involved in adult nervous system function and integrity. *Cell* **102**, 437-449.
- Périer, R.C., Praz, V., Junier, T., Bonnard, C. & Bucher, P. (2000) The Eukaryotic Promoter Database (EPD). *Nucl Acids Res* **28**, 302-303.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E.M. & Breslow, J.L. (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **71**, 343-353.
- Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R.J., Edwards, Y.H., Knott, T.J. & Scott, J. (1987) A novel form of tissue-specific RNA-processing produces apo B-48 in the intestine. *Cell* **50**, 831-840.

- Powell-Braxton, L., Véniant, M., Latvala, R.D., Hirano, K.-I., Won, W.B., Ross, J., Dybal, N., Zlot, C.H., Young, S.G. & Davidson N.O. (1998) A mouse model of human familial hypercholesterolemia: Markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nature Med* **4**, 934-938.
- Qian, X., Balestra, M.E. & Innerarity, T.L. (1997) Two distinct TATA-less promoters direct tissue-specific expression of the rat apo-B editing catalytic polypeptide 1 gene. *J Biol Chem* **272**, 18060-18070.
- Razin, A. & Riggs, A.D. (1980) DNA methylation and gene function. *Science* **210**, 604-610.
- Razin, A. (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing -a three way connection. *EMBO J* **17**, 4905-4908.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. & Durandy, A. (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome. *Cell* **102**, 565-575.
- Rich, A., Hordheim, A. & Wang, A.H.-J. (1984) The Chemistry and Biology of Left-Handed Z-DNA. *Ann Rev Biochem* **53**, 791-846.
- Robertson, K.D, Hayward, S.D, Ling, P.D., Samid, D. & Ambinder, R.F. (1995) Transcriptional Activation of the Epstein-Barr Virus Latency C Promoter after 5-Azacytidine Treatment: Evidence that Demethylation at a Single CpG Site Is Crucial. *Mol Cell Biol* **15**, 6150-6159.
- Ross, S.D., Allen, I.E., Connelly J.E., Korenblat B.M., Smith M.E. & Luo, D. (1999) Clinical outcome in statin treatment trials: a meta-analysis. *Arch Intern Med* **159**, 1793-1802.

- Rudel L.L., Marzetta, C.A. & Johnson, F.L. (1986) Separation and analysis of lipoproteins by gel filtration. *Methods Enzymol* **129**, 45-57.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H, Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniates, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- Sanger, F., Niklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Scott, J. (1995) A place in the world for RNA editing. *Cell* **81**, 833-836.
- Scrable, H. & Stambrook, P.J., 1999, A genetic program for deletion DNA from the mammalian genome. *Mut Res* **429**, 225-237.
- Shapiro, R., DiFate, V. & Welcher, M. (1974) Deamination of Cytosine Derivatives by Bisulfite. Mechanism of the Reaction. *J Amer Chem Soc* **96**, 906-912.
- Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., MacFarlane, P.W., McKillop, J.H. & Packard, C.J. (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* **16**, 1301-1307.
- Shinar, D., Yoffe, O., Shani, M. & Yaffe, D. (1989) Regulated expression of muscle-specific genes introduced into mouse embryonal stem cells: inverse correlation with DNA methylation. *Differentiation* **41**, 116-126.
- Siegfried, Z. & Cedar, H. (1997) DNA methylation: a molecular lock. *Curr Biol* **7**, R305-307.

- Singer-Sam, J. & Riggs, A.D. (1993) X chromosome inactivation and DNA methylation. *EXS* **64**, 358-384.
- Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. & Takeda, S. (1999) Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* **19**, 5166-5169.
- St. Clair, R.W. (1983) Atherosclerosis regression in animal models: current concepts of cellular and biochemical mechanisms. *Prog Cardiovasc Dis* **26**, 109-132.
- Steinberg, D. & Witztum, J.L. (1990) Lipoproteins and atherosclerosis. Current concepts. *JAMA* **64**, 3047-3052.
- Tanzawa, K.Y., Shimada, M., Kuroda, Y., Tsujita, Arai, M. & Watanabe, Y. (1980) A low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia, *FEBS Lett* **18**, 81-84.
- Tate, P.H. & Bird, A.P. (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 226-231.
- Teng, B.B., Burand, C.F. & Davidson, N.O. (1993) Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* **260**, 1816-1819.
- Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F. & Wolffe, A.P. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* **23**, 62-66.
- Wang, Q., Khillan, J., Gadue, P. & Nishikura, K. (2000) Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science* **290**, 1765-1768.

- Watanabe, Y. (1990) Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit): incidence and development of atherosclerosis and xanthoma. *Atherosclerosis* **36**, 261-268.
- Watt, F. & Molloy, P.L. (1998) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* **2**, 1136-1143.
- Watt, S.L. & Stephan, G.S. (1985) *Lymphocyte culture for chromosome analysis*. in Rooney D.E. Czepulkowski, B.H. (eds) *Human Cytogenetics: A Practical Approach*. 35-55, IRL Press.
- Weih, F., Nitsch, D., Reik, A., Schutz, G. & Becker, P.B. (1991) Analysis of CpG methylation and genomic footprinting at the tyrosine aminotransferase gene: DNA methylation alone is not sufficient to prevent protein binding in vivo. *EMBO J* **10**, 2559-2567.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüß, M., Reuter, I. & Schacherer, F. (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucl Acids Res* **28**, 316-319.
- Wutz, A., Smrzka, O.W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E.F. & Barlow, D.P. (1997) Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* **389**, 745-749.
- Yamamoto, T., Bishop, R.W., Brown, M.S., Goldstein, J.L. & Russell, D.W. (1986) Deletion of cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science* **232**, 1230-1237.
- Yamanaka, S., Poksay, K.S., Balestra, M.E., Zheng, G.Q. & Innerarity, T.L. (1994) Cloning and mutagenesis of the rabbit apo B mRNA editing protein. *J Biol Chem* **269**, 21725-21734.

- Yamanaka, S., Balestra, M.E., Ferrell, L.D., Fan, J., Arnold, K.S., Taylor, S., Taylor, J.M. & Innerarity, T.L. (1995) Apolipoprotein B mRNA editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 8483-8487.
- Yamanaka, S., Poksay, K.S, Arnold, K.S. & Innerarity, T.L., (1997) A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev* **11**, 321-333.
- Yang, Y., Yang, Y., Kovalsky, K. & Smith, H.C. (1997) Partial characterization of the auxiliary factors involved in apolipoprotein B mRNA editing through APOBEC-1 affinity chromatography. *J Biol Chem* **272**, 27700-27706.
- Yee, A.S., Reichel, R., Kovetski, I., Nevins, J.R. (1987) Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J* **6**, 2061-2068.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P. & Bestor, T.H. (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* **13**, 335-340.
- Young, S.G., Bertics, S.J., Curtiss, L.K. & Witztum J.L. (1987) Characterisation of an abnormal species of apolipoprotein B, apo B-37, associated with familial hypobetalipoproteinemia. *J Clin Invest* **79**, 1831-1851.
- Zhang, S., Reddick, R., Piedrahita, J. & Maeda, N. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258**, 468-471.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Frank Apostel

geboren am 30.12.1968 in Sanderbusch (Friesland)

verheiratet, ein Kind

## Akademische Ausbildung

- Sep. 97 - Nov. 00      Promotion im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 545 in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. J. Greeve, Universität Hamburg,
- Mai 00 - Jun. 00      Studienaufenthalt in den USA, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Pfeifer, Beckman Research Institute, City of Hope Medical Center, Duarte
- Aug. 96 - Mai 97      Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Betzel am DESY, Universität Hamburg
- Okt. 90 - Mai 97      Studium der Fachrichtung Chemie, Universität Hamburg

## Wehrdienst / Schule

- Jul. 88 - Jun. 90      Wehrdienst als Feldjäger, Dienstgrad: Leutnant der Reserve
- Aug. 75 - Mai 88      Schulausbildung, Abschluss: allgemeine Hochschulreife

## Erwerbstätigkeiten

- seit Nov. 00      Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Post-Doc) an der Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Universität Hamburg
- Sep. 97 - Nov. 00      Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik des Universitäts-krankenhauses Eppendorf, Universität Hamburg,
- Mai 94 - Jul. 97      Studentische Hilfskraft im Institut für Chemie und Umweltschutz der Abteilung Umweltschutz des TÜV Nord e.V.

## Originalarbeiten

Apostel, F., Dammann, R., Pfeifer, G.P. & Greeve, J. (2001) Silencing of the proximal rat APOBEC-1 promoter in transgenic rabbits by loss of a specific methylation pattern, in Vorbereitung.

Lellek, H., Kirsten, R., Diehl, I., Apostel, F., Buck, F. & Greeve, J. (2000) Purification and Molecular Cloning of a Novel essential Component of the Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme-Complex. *J Biol Chem* **275**, 19848-19856.

Greeve, J., Lellek, H., Apostel, F., Hundoegger, K., Berialai, A., Kirsten, R., Welker, S. & Greten, H. (1999) Absence of APOBEC-1 mediated mRNA editing in human carcinomas. *Oncogene* **18**, 6357-6366.

Mensenkamp, A.R., van Luyn, M.J., van Goor, H., Bloks, V., Apostel, F., Greeve, J., Hofker, M.H., Jong, M.C., van Vlijmen, B.J., Havekes, L.M. & Kuipers, F. (2000) Hepatic lipid accumulation, altered very low density lipoprotein formation and apolipoprotein E deposition in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Hepatol*, **33**, 189-198.

## Poster

Apostel, F. & Greeve, J. (1999) Generation of APOBEC-1 transgenic rabbits. *Biol Chem* **380**, Spec. Suppl. S133. Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Hamburg.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, alle in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse selbstständig erworben und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen zum Verfassen dieser Arbeit genutzt zu haben.

Diese Arbeit ist nicht zuvor in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Hamburg, den 07.03.2001

## **Danksagung**

Herrn Priv. Doz. Dr. Jobst Greeve danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die großzügig gewährte Freiheit bei der Durchführung, die stete Diskussionsbereitschaft und die hilfsbereite Betreuung während dieser Zeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans Marquardt bedanke ich mich für die Betreuung von seiten des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg.

Bei der Durchführung der Methylierungsanalyse waren mir Herr Prof. Dr. Gerd Pfeifer und Herr Dr. Reinhard Dammann, Beckman Research Center, Duarte/USA, eine wertvolle Hilfe. Besonders möchte ich mich für die Bereitstellung des Laborplatzes und für die hervorragende Betreuung während meines Aufenthaltes bedanken.

Herrn Marcel Schenk, BRL, Animal Breeding & Biotechnology/Schweiz, danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Mikroinjektion und den ersten Zuchtversuchen der Kaninchen.

Mein Dank gilt auch der Zentralen Tierhaltung des UKE unter Leitung von Herrn Dr. Jens Dimigen. Insbesondere bedanke ich mich bei den Tierpflegern Herrn Adam Morankic, Herrn Walter Conrad und Frau Susanne Conrad für die Zucht und Pflege der Kaninchen.

Für die wertvolle Hilfe bei der Gewebepreparation möchte ich Hanke Mollnau danken. Daneben danke ich Barbara Schröder für die Unterstützung bei der Durchführung der FISH-Analyse. Steffi Koch danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit an der FPLC-Anlage.

Besonders möchte ich mich bei den folgenden Personen für die zahlreichen geselligen Donnerstagabende bedanken: Ines Diehl, Walter Tauscher, Oliver Zschenker, Dennis Mewawala, Tino Schnitgerhans, Bettina Schultz, Martin Purschke und Dino Magnani.

Die vielen anregenden Diskussionen und die ständige Hilfsbereitschaft der Mitarbeiter des RNA-Labors (Romy Kirsten, Sybille Welker und Heinrich Lellek) sowie den anderen Laboratorien der Medizinischen Klinik (Britta Schwarzloh, Martina Schultz, Edda George und Thomas Grewal) waren Grund für eine sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Besonders möchte ich mich bei Maren für die moralische Unterstützung und den großen Rückhalt bedanken.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern und vieler Freunde wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen allen sei an dieser Stelle von ganzem Herzen gedankt.