5 Diskussion

Tumorerkrankungen sind nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Nach Angaben des Robert Koch Instituts (2006) erkranken jedes Jahr rund 420.000 Menschen in Deutschland neu an Krebs. Heute ist es durch medizinische Fortschritte möglich etwa jeden zweiten Tumorpatienten zu heilen, hierfür ist jedoch eine frühe Erkennung des Tumors maßgeblich.

Humane maligne Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems zeigen eine besonders schlechte therapeutische Beeinflussbarkeit, so dass die Erkennung von Individuen mit einem erhöhten Risiko und eine gezielte Prävention besonders dringend erscheinen. Diese gezielten Präventionsmaßnahmen könnten auf einer spezifischen Antagonisierung von Suszeptibilitätsgenen, z.B. mittels niedermolekularer Substanzen, beruhen.

Eine Strategie zur Identifizierung von Suszeptibilitäts-/ Resistenzgenen ist die Verwendung von Tiermodellsystemen. Ein Modellsystem für die Neuro-Onkogenese bietet die Ethylnitrosoharnstoff (EtNU)-induzierte Kanzerogenese im Nervensystem von Ratten der BD Stämme. Während mehr als 85% der BDIX Ratten nach EtNU-Gabe einen malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST) entwickeln, sind Ratten des BDIV Inzuchtstammes nahezu resistent gegenüber der EtNU-induzierten Tumorigenese. Bislang konnten sieben autosomale Genloci [*Mediating schwannoma susceptibility (Mss)1-7*], die mit der Tumorresistenz bzw. -suszeptibilität assoziiert sind, identifiziert werden. Diese Loci üben allel- und geschlechtsspezifische Effekte unterschiedlicher Stärke auf die Tumorinzidenz und/ oder Latenzzeit aus, die bis zur kompletten Tumorresistenz reichen.

Der Locus *Mss2* liegt auf dem Rattenchromosom (RNO) 1 (Kernregion der Assoziation bei 170 Mb). Die dazu orthologe Region beim Menschen liegt auf Chromosom 10. Allelverluste auf dem menschlichen Chromosom 10 gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei humanen CNS Tumoren. Insbesondere Glioblastome weisen Verluste auf Chromosom 10 in bis zu 90 % der Fälle auf (Collins 2004). Durch Deletionskartierungen konnten für Glioblastome drei interessante Kandidatengenregionen auf Chromosom 10 lokalisiert werden. Bei ca. 89 Mb ist bereits *PTEN* als Tumorsuppressorgen identifiziert worden, welches in ca. 30-40 % der primären Glioblastome Mutationen aufweist (Steck, Pershouse et al. 1997; Bostrom, Cobbers et al. 1998; Collins 1999; Schmidt, Ichimura et al. 1999). Das *Pten* Gen der Ratte liegt auf dem RNO 1 (236 Mb) in der Region, die dem Locus *Mss2* entspricht. Interessanterweise liegt sein direkter Interaktionspartner, das als Proto-Onkogen geltende *Akt1* Gen, in

dem Segment von RNO 6 (137 Mb), das dem Locus *Mss4* (Kernregion der Assoziation bei 98,8 Mb) entspricht.

PTEN kodiert für eine Protein-Tyrosin Phosphatase. Eine Inaktivierung von PTEN führt zu einer konstitutiven Aktivierung des AKT-Signalweges. Aktiviertes AKT1, eine Protein-Serin-Threonin Kinase ist ein Überlebensfaktor, der die Cytochrom C Freisetzung unterdrückt sowie Forkhead Transkriptionsfaktoren inaktiviert und dadurch anti-apoptotische Signale aussendet (Osaki, Oshimura et al. 2004). Wir nahmen an, dass sowohl *Pten* als auch *Akt1* als risikomodifizierende Gene in Frage kommen könnten.

Die Basensequenz aller Exons beider Gene wurde auf genomischer Basis in beiden Rattenstämmen bestimmt. Mit Ausnahme eines Polymorphismus im Intron 4 des *Akt1* Gens zeigten alle Exons und flankierende Intronabschnitte exakt die identische Sequenz für BDIX und BDIV Ratten. Doch nicht nur Nukleotidpolymorphismen in kodierenden Sequenzen von Genen haben funktionelle Auswirkungen. Polymorphismen in nicht kodierenden regulatorischen Sequenzen führen zwar nicht zu unterschiedlichen Proteinen, können aber eine Einfluss auf das Expressionniveau haben. Regulatorische Sequenzen, sind Bereiche der DNA, die in unmittelbarer Nähe des Gens (Promoter) oder auch weiter weg liegen können (Enhancer und Silencer), die jedoch selbst nicht transkribiert werden. An diese regulatorischen Sequenzen können Transkriptionsfaktoren binden, die die Transkription aktivieren oder hemmen. Da Enhancer/ Silencer viele Megabasen vor oder hinter dem Promoter entfernt liegen können, ist die Identifizierung von Polymorphismen in diesen regulatorischen Sequenzen sehr aufwendig. Hinweise darauf, dass es überhaupt funktionelle Polymophismen in diesen Regionen geben könnten, können Expressionsanalysen auf RNA- oder Proteinebene geben.

Beispielsweise konnte trotz fehlender Polymorphismen, die sich auf die Aminosäuresequenz auswirken, das *Stk6* Gen der Maus, das über Linkage- und Haplotypenanalyse gefunden wurde, aufgrund der Expressionsdaten als Tumorsuszeptibilitätsgen identifziert werden. Man nimmt an, dass die gefundenen Expressionsunterschiede zwischen suszeptiblen und resistenten Mausstämmen über einen oder mehrere bislang unentdeckte Polymorphismen in einer regulatorischen Sequenz gesteuert wird (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003). Ein weiteres Beispiel dafür, dass auch allelische Varianten in (nicht kodierenden) regulatorischen Sequenzen Suszeptibilität bzw. Resistenz vermitteln können, sind die cis-interagierenden regulatorischen Elemente in den Loci *Mcs5a1* und *Mcs5a2* (Samuelson, Hesselson et al. 2007).

Daher konzentrierten sich weitere Untersuchungen auf die Expression des *Pten* und *Akt1* Gens in den *Nervi trigemini* beider Rattenstämme. Dabei stellte sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung eine vergleichende Messung der Expression zu Ergebnissen führen könnte, die ein Kandidatengen als potentiell relevant für die Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten PNS-Kanzerogenese erscheinen lassen könnte.

Bisher ist bekannt, dass, soweit messbar, der Initiationsprozess und die Expansion der prämalignen Zellen in beiden Inzuchtstämmen bis ca. 100 Tage nach EtNU-Exposition gleich verläuft und erst dann der BDIV rattenstammspezifische Resistenzmechanismus greift (Kindler-Rohrborn, Kind et al. 2000). Davon abgesehen könnten Gene, die die Entstehung von PNS Tumoren begünstigen oder verhindern, auch erst als Folge der Initiation der Kanzerogenese exprimiert werden und nur dann eine differentielle Expression zeigen. Diese Überlegungen führten uns dazu, die Expression von Kandidatengenen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in beiden Rattenstämmen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (Postnataltag 13, 36, 62 und 104) in EtNU-exponierten Ratten und unbehandelten Kontrolltieren zu messen. Daher wurde zu jedem dieser Zeitpunkte die vorhandene genspezifische RNA-Menge in beiden Inzuchtstämmen mit Real-Time-PCR quantifiziert. Man beobachtet, dass die Expression des *Akt1* Gens über die Entwicklung ansteigt, jedoch ist dieser Effekt weder stammspezifisch noch durch die EtNU-Behandlung beeinflussbar.

Weitere Untersuchungen zur Expression von *Pten* und *Akt1* auf Proteinebene zeigten, dass zu keinem Zeitpunkt ein das zweifache übersteigender Expressionsunterschied zwischen den Rattenstämmen mit und ohne EtNU-Behandlung nachzuweisen war. Demnach gibt es bislang keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Gene *Pten* und *Akt1* an den Mechanismen, die Resistenz und Suszeptibilität gegenüber der PNS-Kanzerogenese in der BD Ratte nach EtNU-Induktion vermitteln.

Im Folgenden konzentrierten sich meine Untersuchungen auf die starken geschlechtsspezifischen Tumorresistenz vermittelnden Effekte, die die Loci *Mss4* und *Mss7* auf die PNS-Kanzerogenese im BD-Rattenmodell ausüben. Auch bei einigen menschlichen Tumoren einschließlich der Tumoren des Nervensystems beobachtet man eine ausgeprägte Geschlechtsspezifität des Erkrankungsrisikos. Meningeome entstehen in der mittleren Altersgruppe viermal häufiger bei Frauen als bei Männern (Kindler-Rohrborn, Kind et al. 2000) , wohingegen Medulloblastome und Glioblastome bei männlichen Individuen 2,7- bzw. 1,5-fach häufiger entstehen (Giangaspero, Bigner et al. 2000; Kleihues, Burger et al. 2000). Intracranielle Schwannome treten dagegen häufiger bei Frauen auf (Woodruff, Kourea et al.

2000). Deutliche Geschlechtsspezifität bei Erkrankungen kann zum einen auf geschlechtsspezifisch unterschiedliche Verhaltensweisen, wie z.B. Tabak- und Alkoholkonsum, zurückgeführt werden. Zudem könnte aber auch die geschlechtsspezifische Expression von Genen, die die individuelle Suszeptibilität und Resistenz bestimmen, eine Rolle spielen.

Die in geschlechtsspezifischer Weise in den Loci *Mss4* und *Mss7* liegenden Tumorsuszeptibilität und -resistenz vermittelnden Gene können Hinweise auf Genfamilien oder Signalwege geben, die auch für das menschliche Risiko, Tumoren des Nervensystems auszubilden, relevant sein könnten. Die Einengung dieser Loci und die Identifizierung der beteiligten Gene schien daher besonders wichtig. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe weiterer Mikrosatellitenmarker mit varianten Allelen für beide Rattenstämme im *Mss4* und *Mss7* Locus analysiert und erkrankte Weibchen damit getestet. Da homozygote BDIV Allele im *Mss4* und *Mss7* Locus einen nahezu monogenen Effekt im Hinblick auf die Tumorresistenz der weiblichen Tiere vermitteln, sollten diese nicht in der, das (die) Resistenzgen(e) enthaltenden, Region bei erkrankten Weibchen zu finden sein. Eine Analyse der Haplotypen dieser Regionen mit Hilfe der zusätzlich analysierten Marker bei erkrankten Weibchen führte zu einer Verkürzung des für die Lokalisation des krankheitsverursachenden Gens in Frage kommenden chromosomalen Fragments. Der Locus *Mss4* konnte auf 20,25 Mb und der Locus *Mss7* auf 12,21 Mb eingeengt werden. Dies entspricht ca. 90 bzw. 220 Genen, die nach diesem positionellen Kriterium als mögliche Kandidatengene in Frage kommen. Die Anzahl der Gene, die als prädisponierende Gene in Frage kommen reduziert sich jedoch drastisch, wenn man die zudem bekannten funktionellen und geschlechtsspezifischen Kriterien heranzieht (siehe unten).

Über Haplotypenanalysen konnte bereits an Interspezies Mauskreuzungen zwischen (Mus musculus x Mus spretus) das Gen *Stk6* in der Maus als Kandidat für die Hauttumorigenese identifiziert werden. Weiterhin konnte die Relevanz dieses bei der Maus entdeckten Gens als Suszeptibilitäts-/Resistenzgen mit niedriger Penetranz für verschiedene Tumortypen beim Menschen gezeigt werden (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003; Ewart-Toland, Dai et al. 2005). Ebenso konnte über eine Analyse der rekombinanten Haplotypen von Kreuzungen zwischen gegenüber der Colonkarzinogenese suszeptiblen und resistenten Mausstämmen der Locus *Scc1* verkleinert und das *Ptprj* Gen identifiziert werden, das auch beim Menschen bei der Entstehung von Colon-, Lungen- und Brustkrebs eine entscheidende Rolle spielt (Ruivenkamp, van Wezel et al. 2002).

Das Standard-Schlüsselexperiment zur Verifizierung eines über Assoziationsanalysen gefunden Locus ist die Züchtung kongener Ratten. Es wurden drei kongene *Mss4* Rattenlinien gezüchtet, die auf dem genetischen Hintergrund der tumorssuszeptiblen BDIX Ratte unterschiedliche lange Fragmente des *Mss4* Locus der tumorresistenten BDIV Ratte tragen (siehe Abbbildung 4.14). Nach den Ergebnissen der Assoziationsanalyse sollten weibliche kongene *Mss4* Ratten nahezu resistent gegenüber der EtNU-induzierten PNS-Kanzerogenese sein, während das Tumorrisiko von männlichen kongenen *Mss4* Ratten im Vergleich zum Ausgangsstamm BDIX unverändert sein sollte. Tatsächlich ist das Tumorrisiko und die Überlebenszeit von männlichen kongenen BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten im Vergleich zum Ausgangsstamm BDIX nahezu identisch. Die Inzidenz von MPNSTs bei weiblichen kongenen Ratten der Linie BDIX.*Mss4a*(BDIV) ist zwar deutlich geringer als bei reinen BDIX Weibchen und auch die längere Überlebenszeit von BDIX.*Mss4a*(BDIV) zeigt, dass das kongenen *Mss4a* Fragment einen tumorpräventiven Effekt vermittelt, aber der Effekt ist geringer als es die Assoziationsanalyse hatte vermuten lassen. Das homozygote BDIV Fragment der BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratte entspricht nicht exakt dem durch Haplotypenanalyse eingeengten Locus *Mss4*. Die centromerisch gelegenen neun Mb des *Mss4* Locus werden nicht abgedeckt. Es ist daher durchaus denkbar, dass der Locus *Mss4* mehrere Gene enthält, die das Tumorrisiko modulierenden. Dies würde erklären, warum die starken Effekte, die homozygote BDIV Allele am Locus *Mss4* bei weiblichen F_2 Ratten ausüben, nicht im gleichen Ausmaß bei kongenen BDIX.*Mss4a*(BDIV)Weibchen gefunden wurden. Das kongene Fragment dieser Linie könnte nur eines der Resistenz vermittelnden Gene enthalten. Nahezu vollständige Resistenz könnten vielleicht nur alle im *Mss4* Locus lokalisierten Resistenzallele der BDIV Ratte gemeinsam vermitteln. Da in der kongenen BDIX.*Mss4a*(BDIV) Linie jedoch einige dieser Gene homozygote BDIX Allele haben, wäre auch der Effekt dieses kongenen Fragments schwächer.

Außerdem muß berücksichtigt werden, dass es sich bei der Identifizierung von Loci, die mit Tumorresistenz/ -suszeptibilität assoziiert sind, über Assoziationsanalysen und der Verifizierung dieser Loci über kongene Ratten um extrem unterschiedliche Methoden handelt, die daher auch nicht exakt die gleichen Ergebnisse liefern können bzw. müssen. Ein wesentlicher Unterschied der Methoden ist, dass die Ergebnisse der Assoziationsanalysen auf den Genotypisierungsdaten von (BDIX x BDIV) F_2 Ratten beruhen, deren genetischer Hintergrund äußerst heterogen ist, während der genetische Hintergund kongener Ratten rein BDIX ist. Mögliche Interaktionen des Resistenz bzw. Suszeptibilität vermittelnden Gens oder mehrerer

solcher Gene mit Genen des genetischen Hintergrundes können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Dass in einem Locus mehrere Subloci unabhängig voneinander wirken, konnte bereits für den Locus *Mcs5*, der in der Wistar-Kyoto Ratte Resistenz gegenüber der DMAB-induzierten Mammarkarzinogenese vermittelt, gezeigt werden. Neben seiner Verifizierung konnte über die Generierung kongener Ratten der *Mcs5* Locus feinkartiert und in mindestens drei verschiedene Subloci (*Mcs5a*, *Mcs5b* und *Mcs5c*) unterteilt werden (Samuelson, Aperavich et al. 2005). Weiterhin konnten mit Hilfe kongener Stämme im Locus *Mcs5a* mindestens zwei nicht kodierende interagierende Elemente *Mcs5a1* und *Mcs5a2* identifiziert werden. Die dazu orthologen humanen Loci *MCS5A1* und *MCS5A2* zeigen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, ebenso einen deutlichen Einfluß auf die Mammakarzinogenese (Samuelson, Hesselson et al. 2007).

Ebenso bestätigten Untersuchungen an kongenen Ratten die regulatorischen Effekte des Locus *Cia5* auf die Entstehung von rheumatoider Arthritis und führten zu der Annahme, dass in diesem QTL mindestens zwei Resistenz- bzw. Suszeptibilitätsgene lokalisiert sind (Joe, Remmers et al. 2000). Zudem konnten in diesem Rattenmodell mit Hilfe kongener Ratten geschlechtsspezifische Effekte der Loci *Cia3-6* auf den Schweregrad der Arthritis gemessen am standardisierten Arthritis-Score ermittelt werden (Remmers, Joe et al. 2002).

Geschlechtsspezifische Effekte sind auch bei anderen Tumormodellen zu beobachten. Bei Lebertumoren konnte ein Geschlechtsdimorphismus bei resistenten Brown Norway (BN) Ratten gefunden werden. Homozygote BN Allele am Locus *Hcs4* in Fischer 344 (F344) Ratten haben bei männlichen kongenen F344.BN-*Hcs4* Ratten keinen Effekt auf deren Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung von Lebertumoren, die mit der der männlichen F344 Ratten vergleichbar ist. Dagegen verleihen homozygote BN Allele an diesem Locus bei weiblichen kongenen F344.BN-*Hcs4* Ratten Resistenz gegenüber der Hepatokarzinogenese. Sie sind ähnlich resistent wie BN Weibchen (De Miglio, Virdis et al. 2006). Ebenso konnten im Mausmodell zwei Loci (*Hcf1* und *Hcf2*) identifiziert werden, die ausschließlich bei weiblichen Tieren Tumorresistenz gegenüber Lebertumoren im Mausstamm C57BR/cdJ Maus vermitteln (Poole and Drinkwater 1996). Interessanterweise kommen Lebertumoren nicht nur bei den oben genannten Ratten- und Mausmodellen häufiger beim männlichen Geschlecht vor, sondern auch beim Menschen.

Die konsequente Einengung der Loci durch die Züchtung kongener Linien führen letztlich zum Auffinden und der Überprüfung der Suszeptibilität und Resistenz vermittelnden Gene bzw. ihrer allelischen Varianten. Die Auswahl von Kandidatengenen in den Loci *Mss4* und *Mss7* orientierte sich an folgenden Kriterien:

1) Positionelles Kriterium: Gene, die im *Mss4* Locus auf Chromosom 6 sowie im *Mss7* Locus auf Chromosom 10 liegen.

2) Funktionelles Kriterium: Von allen Genen, die in den entsprechenden Regionen liegen, werden diejenigen ausgesucht, deren Funktion darauf hindeutet, dass sie an den von unserer Arbeitsgruppe bisher partiell charakterisierten Effektormechanismen für Suszeptibilität und Resistenz beteiligt sein könnten.

3) Kriterium der Geschlechtsspezifität: Die beiden Loci *Mss4* und *Mss7* zeigen nur beim weiblichen Geschlecht eine Wirkung auf die Inzidenz maligner Tumoren des Nervensystems bzw. die Überlebenszeit der Tiere. Daher sollen entweder geschlechtsspezifisch regulierte Gene ausgesucht werden oder Gene, die eine regulierende Aktivität in geschlechtsspezifischer Form ausüben.

Ad 2) Bei einem systematischen funktionellen Screening der sich in der Kernregion der Assoziation des Locus *Mss4* (20,25 Mb) befindenden 90 Gene in entsprechenden Datenbanken schienen besonders das *Tgfb 3* („*Transforming growth factor beta 3*“) und das *Ltbp 2* („*Latent transforming growth factor beta binding protein 2*“) Gen interessant.

Der Wirkung des Tgf beta Proteins während verschiedener Phasen der Tumorigenese ist unterschiedlich. Normalerweise fungiert es als Tumorsuppressor. In späteren Phasen der Kanzerogenese kommt es jedoch häufig zur Überexpression des *Tgf beta* Gens, die das Tumorwachstum fördert (Akhurst and Derynck 2001). In Untersuchungen an syngen transplantierten malignen Schwannomzellen der BDIX Ratte konnte gezeigt werden, dass diese Zellen Tgfb1, Tgfb2 und Tgfb3 Proteine sekretieren. Die Tgf beta Proteine wirken immunsupressiv und schützen so die Schwannomzellen vor ihrer Eliminierung durch zytotoxische T Lymphozyten (Altenschmidt, Kahl et al. 1997).

Ltbp scheint die Aktivität von Tgfb Proteinen zu kontrollieren, indem es die Sekretion und den zielgerichteten Transport von Tgfb Proteinen beeinflußt (Oklu and Hesketh 2000).

Die Sequenzanalyse aller Introns und Exons des *Tgfb3* Gens in den BD Rateninzuchtstämmen zeigte jedoch, dass die Basenabfolge zwischen dem BDIV und BDIX Stamm identisch ist. Die Sequenzierung des *Ltbp2* Gens war aufgrund methodischer Schwierigkeiten

(GC-reiche Sequenzabschnitte, Vielzahl der Exons) unvollständig. Spätere Affymetrix-Chipanalysen (B. Kölsch unveröffentlichte Ergebnisse) der RNA aus den *Nervi trigemini* weiblicher BDIX und BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten zeigten, dass die Expression von *Tfgb3* bzw. *Ltbp2* in BDIX Weibchen die Expression in BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten um ein 1,5- bzw. 4-faches übersteigt. Daher sollte sich eine systematische Expressionsanalyse dieser Gene anschließen.

Ad 3) Interessante Hinweise darauf, dass der geschlechtsspezifische Effekt bei der PNS-Kanzerogenese durch Östrogen vermittelt wird, gibt eine Untersuchung an Wistar Furth x Long Evans Hybriden (Aoyama, Naito et al. 1989). (Wistar Furth x Long Evans) Hybride zeigten schon damals Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Inzidenz von Tumoren des *Nervus trigeminus* nach EtNU-Exposition. Die Tumorinzidenz war bei männlichen Ratten mit 79% deutlich höher als bei weiblichen Ratten (48%). Dieser Geschlechtsunterschied verschwand nach Ovariektomie. 74% der ovariektomierten Ratten entwickelten Tumoren des *Nervus trigeminus*. Ovariektomie mit anschließender Östrogengabe hatte dagegen einen hemmenden Effekt auf die Karzinogenese.

Demnach waren Gene, die durch Östrogen in ihrer Expression/ Aktivität beeinflusst werden bzw. Gene, die eine östrogenabhängige Regulation vermitteln, mögliche Kandidatengene, die für die ausschließlich bei weiblichen Tieren gezeigte Tumorresistenz von Bedeutung sein könnten.

Östrogene regulieren eine Reihe physiologischer Prozesse wie Zellproliferation, Entwicklung sowie gewebespezifische Genregulation in den Organen des Reproduktionstrakts, des Nervensystems, des Skelettsystems sowie des hämopoetischen und des Immunsystems. Die biologischen Effekte von Östrogen werden hauptsächlich durch die Bindung an einen oder beide spezifische Östrogenrezeptoren, ER alpha oder ER beta vermittelt, die zur Superfamilie der Kernrezeptoren gehören (Matthews and Gustafsson 2003). Die Östrogenrezeptoren regulieren die Genexpression als Rezeptor-Dimere, indem sie an spezifische Elemente (ERE, „Estrogen response elements") im Promotor des entsprechenden Gens binden und durch Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren. ER alpha und ER beta bilden bevorzugt Heterodimere, können jedoch auch als Homodimer wirksam werden. Die Wirkung von Östrogen ist je nach Zell-/ Gewebetyp unterschiedlich, da ER alpha und ER beta nicht in allen Geweben gleichermaßen exprimiert werden, sondern sich zell- und gewebespezifische Expressionsmuster ergeben und ER alpha und ER beta abhängig vom Signalweg sowohl synergistisch als auch antagonistisch wirken können, wobei dem ER alpha

eher eine proliferationsfördernde und dem ER beta eine proliferiationshemmende Wirkung zugeschrieben wird.

Bei der östrogenabhängigen Progression maligner Tumoren in Brust, Ovar und Prostata wird in nahezu allen Untersuchungen eine verminderte Expression des *ER beta* Gens bzw. eine erhöhtes Verhältnis von ER alpha/ ER beta in den Tumoren beobachtet (Bardin, Boulle et al. 2004). In einer großangelegten Studie an 512 Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass der Verlust bzw. die Verminderung der *ER beta* Expression ein wichtiges Kennzeichen der Mammakarzinogenese ist (Skliris, Munot et al. 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass Frauen mit einer postmenopausalen Östrogensubstitutionstherapie ein signifikant erniedrigtes Colontumor-Risiko haben. Auch in diesen Tumoren findet man bei Frauen eine erniedrigte Expression des *ER beta* (Foley, Jazaeri et al. 2000). Sowohl in Mamma- als auch in Ovarial- bzw. Prostatakarzinomen und Colontumoren wurden allelische Verluste in der entsprechenden Region auf Chromosom 14 gefunden. Diese Beobachtungen legen den Verdacht nahe, dass der ER beta als tumorpräventives Gen bei verschiedenen Tumortypen agieren könnte.

Die Gene für den *Östrogenrezeptor beta (Er beta)* und den *Östrogen-verwandten Rezeptor beta (Esrrb)* sind im *Mss4* Locus auf Chromosom 6 lokalisiert worden. Das *Er beta* Gen liegt nahe an dem Mikrosatellitenmarker *D6Mit1* (98,8 Mb), während das Gen für *Esrrb* nahe an dem Marker *Ngb* (111,2 Mb) liegt (siehe Abbildung 4.22).

Da beide Marker eine starke Assoziation mit der Entstehung von MPNSTs bei weiblichen Tieren zeigen, könnte ein Polymorphismus in regulatorischen oder kodierenden Regionen dieser Gene zwischen den beiden Inzuchtstämmen zu einem Unterschied in der Resistenz gegenüber der Entwicklung von MPNSTs in weiblichen Tieren führen.

Weder in der kodierenden Region des *Esrrb* noch im Promotor konnten Sequenzunterschiede zwischen beiden Rattenstämmen festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu wurden in der kodierenden und nicht kodierenden Sequenz des *Er beta* zwischen BDIV und BDIX Ratten insgesamt sechs Basenaustausche gefunden, von denen drei Polymorphismen funktionell bedeutsam sein könnten.

Bei der Translation des *Er beta* können drei verschiedene ATGs benutzt werden. Ein Polymorphismus liegt zwischen diesen Startkodons. Diese Mutation könnte funktionell bedeutsam sein, da für den ER alpha bereits gezeigt werden konnte, dass mRNA Varianten mit verschiedenen 5'-untranslatierten Bereichs (5'UTRs) eine wichtige Rolle bei der Regulation der ER alpha Expression spielen (Kos, Denger et al. 2002).

Außerdem zeigte die Bestimmung der Basensequenz, dass sich die BD Rattenin-zuchtstämme an zwei weiteren Positionen im 5'UTR unterscheiden. Für das *Er beta* Gen der Ratte sind drei unterschiedliche Promotoren publiziert (Iwamoto, Hirata et al. 2003). Die gefunden Polymorphismen betrafen sowohl den OH- als auch den ON-Promotor. Die Analyse der Promotoraktivität im *Nervus trigeminus* der Ratte zeigte, dass hier ausschließlich der ON-Promotor benutzt zu werden scheint. Der dortige Basenaustausch betrifft ein die E-Box (CANNTG) flankierendes Nukleotid in der Kernpromotorregion. Transkriptionsfaktoren, die zur „Basic helix-loop-helix" (bHLH)-Familie gehören, binden als Homo-/ Heterodimere an die E-Box-Sequenz und fungieren als zentrale Regulatoren der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Massari and Murre 2000). Die bHLH Proteine konkurieren um die Bindung am E-Box-Motiv. Dabei hat man schon vor längerer Zeit herausgefunden, dass die Bindungseffektivität verschiedener Transkriptionsfaktoren unter anderem über die flankierenden Nukleotide beeinflußt wird (Swanson and Yang 1999). Der gefundene Austausch von G zu A (BDIX: G, BDIV: A) an dem die E-Box flankierenden Nukleotid erhöht die Wahrscheinlichkeit der Bindung von Arnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) (Swanson and Yang 1999), Sharp 2 (Rat enhancer of split- and hairy-related protein 2) (St-Pierre, Flock et al. 2002) und von Usf (Upstream stimulatory factor).

Die Auswirkungen dieser Polymorphismen können vielfältig sein und sind schwer abzuschätzen. Zum einen ist die Funktion von Arnt, Sharp 2 und Usf nicht einheitlich. Arnt gilt als Aktivator der Transkription, Stra 13 (Sharp 2) als Repressor und Usf ist sowohl als Repressor (Samoylenko, Roth et al. 2001) als auch Aktivator beschrieben worden. Komplizierter wird die Situation noch dadurch, dass bHLH Proteine sowohl Homo- als auch Heterodimer bilden und dass sich Heterodimere aus Aktivatoren und Repressoren bilden. Für Heterodimere aus Stra 13 (Sharp 2) und Usf beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Usf die durch Stra 13 vermittelte Repression des Zielgens aufheben kann und umgekehrt Stra 13 die durch Usf vermittelte Expression inhibieren kann (Dhar and Taneja 2001). Zudem müßte geklärt werden, welche(r) dieser Transkriptionsfaktoren im *Nervus trigeminus* der BD Ratte exprimiert wird/ werden.

Trotz der aufgezeigten vielfältigen Möglichkeiten der Transkriptionsregulation des *Er beta* Gens über die bHLH Proteine, die an die E-Box binden, ist aufgrund der nach EtNU-Exposition geringeren Expression des *Er beta* Gens in Schwann Zellen von BDIX Weibchen im Vergleich zu BDIV Weibchen zu vermuten, dass durch den Polymorphismus in dem die E-Box flankierenden Nukleotid die Expression des *Er beta* Gens in der BDIX Ratte reprimiert

wird. Auf die unterschiedliche *Er beta* Genexpression wird sogleich noch näher einzugehen sein.

Interessant scheint weiterhin der Sequenzpolymorphismus zwischen BDIV und BDIX Ratten DNA, der sich in dem Intron befindet, das vor dem alternativ gespleißten Exon 5 liegt. RT-PCR Untersuchungen ergaben, dass im PNS zwei Splice Varianten der mRNA vorkamen, deren Unterschied im Einfügen eines alternativen Exons in die Östrogenbindungsdomäne bestand (Hanstein, Liu et al. 1999). Die Insertion dieses alternativen Exons 5 führt zu einer drastisch verminderten Bindungsaffinität gegenüber den Liganden. Die RT-PCR Produkte dieser Region von BDIV und BDIX Ratten enthielten sowohl Transkripte, die das alternative Exon 5 umfaßten, als auch solche ohne das Zusatzexon 5. Der Polymorphismus in diesem Intron könnte prinzipiell zu einem Anstieg des alternativen Splicings führen, wie für das *KLF6* Tumorsuppressorgen in Prostatatumorgewebe gezeigt werden konnte (Narla, Difeo et al. 2005). Dies könnte bedeuten, dass bei BDIX Tieren im Vergleich zu BDIV Tieren der Anteil an Splice Varianten mit niedrigerer Affinität zu Liganden größer ist. Eine solche Situation könnte die gleichen Effekte wie eine erniedrigte *Er beta* Expression haben.

Untersuchungen zur Expression zeigten, dass der *Er beta* in den *Nervi trigemini* von unbehandelten und mit EtNU-behandelten Tieren exprimiert ist. In EtNU-induzierten MPNSTs von BDIX, F_1 und F_2 Ratten konnte der Er beta in sehr geringen Mengen im Proteinlysat nachgewiesen werden. Ein wie bei Colontumoren gezeigter Verlust der *ER beta* Expression (Foley, Jazaeri et al. 2000) konnte in den MPNSTs möglicherweise deshalb nicht nachgewiesen werden, da der Er beta in Stromazellen (z.B. in Immunzellen, Bindegewebszellen, kleinen Blutgefäßen), die ebenso wie die Tumorzellen im Proteinlysat des *Nervus trigeminus* enthalten sind, exprimiert ist. Insbesondere für Immunzellen konnte gezeigt werden, dass diese in großer Anzahl in die MPNSTs einwandern und *Er beta* exprimieren (siehe unten).

Denkbar wäre auch, dass die östrogenabhängige Progression der MPNSTs durch die verminderte Expression des *Er beta* Gens oder durch das veränderte Verhältnis von Er alpha zu Er beta im Laufe der Kanzerogenese bedingt ist. Selbst wenn die Menge an Er beta konstant ist, so kann der östrogenabhängige Effekt auch über die Menge an bzw. das Verhältnis von Er beta Protein mit dem alternative Exon 5 zu Er beta Protein ohne dieses Exon vermittelt werden.

Da die Beteiligung des Immunsystems bei der Resistenz bzw. Suszeptibilität im BD Rattenmodell gezeigt werden konnte (Gering, Marx et al. 2006; Marx, Röhrborn et al. 2007

zur Veröffentlichung eingereicht), können Resistenz vermittelnde Gene in den prägmalignen Schwann Zellen oder in den einwandernden Immunzellen oder in beiden Geweben/ Zelltypen exprimiert sein und dort ihre Resistenz vermittelnde Funktion ausüben. Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass der *Er beta* sowohl im Zellkern vieler Schwann Zellen, als auch in den meisten Immunzellen exprimiert wird.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen an 100 Tage alten BDIV und BDIX Tieren beiden Geschlechts mit und ohne EtNU-Behandlung zeigte, dass die Anzahl an *Er beta* exprimierenden Schwann Zellen im *Nervus trigeminus* EtNU-behandelter BDIX Weibchen tendenziell im Vergleich zu behandelten BDIV Weibchen abnimmt. Dies muss in einer systematischen Analyse (verschiedene Entwicklungszeitpunkte einer größeren Anzahl von EtNU-behandelten BDIV und BDIX Ratten sowie Kontrollen beiderlei Geschlechts) weiter verfolgt werden. Wenn sich dabei bestätigen sollte, dass die Anzahl an *Er beta* exprimierenden Schwann Zellen in den *Nervi trigemini* EtNU-induzierter BDIX Weibchen abnimmt, während die Anzahl dieser Zellen in EtNU-behandelten BDIV Weibchen auf dem gleichen Niveau bleibt, so wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, dass das *Er beta* Gen an dem Resistenzmechanismus, der ausschließlich bei weiblichen BDIV Ratten zu wirken scheint, beteiligt ist.

Um die von der Abwesenheit der *Er beta* Expression betroffenen Signalwege zu identifizieren wurden mit Hilfe von entsprechenden Microarrays Expression-Profiling-Experimente mit in cDNA umgeschriebener mRNA aus den *Nervi trigemini* von Er beta Knockout- und Wildtyp-Mäusen durchgeführt (Zusammenarbeit mit PD Dr. Ludger Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie, Universität Essen-Duisburg). Diese funktionelle Analyse der für die Neuro-Onkogenese relevanten Parameter im peripheren Nervensystem von Er beta Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ergab, dass in den Wildtyp-Mäusen ca. 20 Gene um mindestens den Faktor zwei höher exprimiert sind (B. Kölsch unveröffentlichte Ergebnisse). Lediglich die Expression des *Neurotensin* (*Nts*) Gens ist in Wildtyp-Mäusen auf weniger als die Hälfte reduziert. Die Expression des *Er beta* Gens im *Nervus trigeminus* der Maus führt demnach tendenziell zu einer Aktivierung der Transkription verschiedener Gene. Weitere Arbeiten werden sich auf die Übertragbarkeit der in der Er beta Knockout-Maus beobachteten Effekte auf die Ratte bzw. auf die nachgeschalten Signalwege in der Ratte konzentrieren. Hierbei muss ferner geklärt werden, ob die Expressionsunterschiede, die man auf RNA-Ebene beobachtet, auch auf Proteinebene detektierbar sind.

Die Loci *Mss4* und *Mss7* üben Haupteffekte bezüglich der Resistenz weiblicher BDIV Ratten gegenüber der EtNU-induzierten PNS-Kanzerogenese aus und dies unabhängig voneinander und unabhängig von anderen Loci. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Resistenz vermittelnden Gene in den beiden Loci denselben Wirkmechanismus betreffen bzw. an den gleichen Signalwegen beteiligt sind und lediglich auf verschiedenen Ebenen wirken. Sobald im Locus *Mss4* die das Risiko modulierenden Gene entdeckt sind, kann auf dieser Grundlage die Selektion von Kandidatengenen im *Mss7* erfolgen.

Bisher konnte der Kreis der Kandidatengene in dem auf etwa 220 Gene physikalisch eingeengte *Mss7* Locus [Kernregion der Assoziation von *D10Rat51* bis *D10Rat43* (12,21 Mb)] durch eine Auswahl der geschlechtsspezifisch regulierten Gene stark eingegrenzt werden. Genomweite Studien (Tang, Tan et al. 2004) haben gezeigt das schätzungsweise weniger als 1000 Gene in ihrem Promotoren Elemente besitzen die durch Östrogen aktivierbar sein könnten. Für ca. die Hälfte dieser Gene konnte dies auch bereits experimentell gezeigt werden. Zu diesen Genen gehört auch das *ADCY9* Gen (Adenylatcyclase), das den intrazellulären cAMP-Spiegel reguliert (Riemer, Wu et al. 1988). Desweiteren ist Östrogen ein potenter Modulator der cAMP-Konzentration. In dieser Hinsicht ist besonders interessant, dass in Zellkultur cAMP das einzige Mitogen ist, das das Überleben der prämalignen BD Ratten-Schwannomzellen ermöglicht (B. Kölsch, persönliche Mitteilung).

6 Zusammenfassung

Das individuelle menschliche Tumorrisiko hängt sowohl von der Exposition gegenüber exogenen krebsauslösenden Faktoren ab als auch in hohem Maße von der individuellen genetischen Prädisposition bzw. Resistenz.

Die Identifizierung der Gene, die individuelle Suszeptibilität bzw. Resistenz gegenüber der Ausbildung von Tumoren vermitteln, wird einen wesentlichen Beitrag für die Abschätzung des individuellen Tumorrisikos, die Prävention von Tumorerkrankungen sowie für die Diagnostik leisten. Dies ist besonders bei den Tumorerkrankungen wichtig, die eine überwiegend schlechte therapeutische Beeinflussbarkeit zeigen, wie die Tumoren des Nervensystems.

Der experimentelle Zugang zur Genidentifizierung sowie die spätere Manipulation dieser Gene gelingt leichter mit Hilfe von Tiermodellen. Die chemisch induzierte Kanzerogenese im Nervensystem neonataler BD Ratten stellt ein solches Modellsystem dar. Während ca. 85% der Ratten des BDIX Stamms nach neonataler Applikation der alkylierenden Substanz Ethylnitrosoharnstoff (EtNU) Tumoren des peripheren Nervensystems („Malignant peripheral nerve sheath tumors"; MPNSTs) entwickeln, die hauptsächlich in den *Nervi trigemini* entstehen, sind die Tiere des BDIV Stamms fast vollständig resistent.

Bereits vor Beginn der Arbeiten für meine Dissertation waren unter Verwendung von (BDIX x BDIV) x (BDIX x BDIV) F_2 Hybriden sieben Genorte (*Mss1-7*) kartiert worden, die allelspezifisch die Tumorinzidenz und/ oder Überlebenszeit beeinflussen. Interessanterweise üben die meisten dieser Loci geschlechtsspezifische Effekte unterschiedlicher Stärke aus. In der vorliegenden Dissertation konnte für zwei dieser Loci (*Mss4* und *Mss7*) gezeigt werden, dass diese unabhängig voneinander nahezu vollständige Tumorresistenz bei weiblichen Tieren vermitteln, wenn sie homozygote BDIV Allele aufweisen. Da homozygote BDIV Allele an diesen Loci bei weiblichen Ratten einen nahezu monogenen Effekt auf die Tumorresistenz haben, konnte über eine Analyse der Haplotypen der erkrankten F_2 Weibchen der Locus *Mss4* auf Chromosom 6 von 34,8 Mb auf 20 Mb und der Locus *Mss7* auf Chromosom 10 von 24,8 Mb auf 12,2 Mb eingeengt werden.

Zur Verifizierung der *Mss* Loci wurden verschiedene kongene Rattenstämme gezüchtet, die auf dem genetischen Hintergrund der suszeptiblen BDIX Ratte jeweils ein chromosomales Fragment der resistenten BDIV Ratte tragen, das einem der Loci entspricht. Für den Locus *Mss4* wurden drei kongene BDIX.*Mss4a-c*(BDIV) Sublinien, die unterschiedlich große homozygote Fragmente der BDIV Ratte tragen, generiert. Um den Effekt des *Mss4* Locus auf die

Inzidenz von MPNSTs und auf die Überlebenszeit zu testen, wurden in diesem Dissertationsprojekt 12 männliche und 16 weibliche BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten am ersten Postnataltag mit EtNU behandelt. Während männliche kongene BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten in gleichem Ausmaß MPNSTs entwickelten und gleichlang überleben wie BDIX Männchen, hatte das kongene Fragment bei BDIX.*Mss4a*(BDIV) Weibchen einen stark tumorprotektiven Effekt, so dass das in der Assoziationsanalyse erhaltene Ergebnis hierdurch funktionell bestätigt wurde. Gleichzeitig wurden nach funktionellen und geschlechtsspezifischen Kriterien Kandidatengene in den Loci *Mss4* und *Mss7* ausgewählt. Im *Mss4* Locus schienen in dieser Hinsicht besonders das „*Transforming growth factor beta 3*“ (*Tgfb 3*) Gen, das „*Latent Tgf beta binding protein 2“ (Ltbp 2)* Gen, das „*Estrogen related receptor beta*“ (*Esrrb*) Gen und das „*Estrogen receptor beta*“ (*Er beta*) Gen interessant. Die Sequenzanalyse dieser Gene ergab, dass lediglich im *Er beta* Gen zwischen BDIV und BDIX DNA funktionell bedeutsame Polymorphismen zu finden sind. Sowohl der Polymorphismus in dem die E-Box flankierenden Nukleotid als auch der Polymorphismus im 5’-untranslatierten Bereich zwischen den alternativen Startkodons lassen auf eine niedrigere Expression des *Er beta* Gens in tumorsuszeptiblen BDIX Ratten schließen. Der Polymorphismus, der sich in dem Intron befindet, das vor dem alternativ gespleißten Exon 5 liegt, könnte dazu führen, dass vermehrt Splice Varianten mit einer niedrigeren Affinität zu den Liganden entstehen.

Meine Ergebnisse zeigen, dass das *Er beta* Gen sowohl in den Schwann Zellen als auch in den in den *Nervus trigeminus* eingewanderten Immunzellen der BD Ratte exprimiert ist. Dabei scheint die Anzahl an *Er beta* exprimierenden Schwann Zellen von EtNU-behandelten BDIX Weibchen im Vergleich zu BDIV Weibchen abzunehmen. Zusammen mit der schwachen Expression in MPNSTs lässt dies den *Östrogenrezeptor beta* als vielversprechendes Kandidatengen für die Tumorresistenz bei weiblichen BDIV Ratten erscheinen.

Besonders interessant sind diese Ergebnisse, da auch bei einigen humanen neuralen Tumoren eine ausgeprägte Geschlechtsspezifität des Erkrankungsrisikos besteht. Gene, die die geschlechtsspezifische Prädisposition gegenüber der EtNU-induzierten PNS-Kanzerogenese in BD Ratten vermitteln, könnten auch für das menschliche Risiko, Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems zu entwickeln, relevant sein.

7 Ausblick

Untersuchungen aus unserem Labor zeigten, dass das rattenstammspezifische Risiko nach Behandlung mit EtNU Tumoren des Nervensystems auszubilden durch mehrere Genorte beeinflusst wird. Auf der Basis der von mir gezüchteten kongenen Rattenstämme wird es möglich sein, analog zu meinen Pilot-Untersuchungen für den *Mss4* Locus auch die Effekte der übrigen Loci (*Mss1, Mss2, Mss5, Mss7)* auf das Tumorrisiko nach EtNU-Induktion zu bestimmen, sobald die kongenen Zuchtlinien, die sich in der sechsten bzw. siebten Rückkreuzungsgeneration befinden, genomweit genotypisiert und als homozygote kongene Stämme reingezüchtet sind. Über Rückkreuzungen der heterozygoten kongenen Stämme mit BDIX Ratten kann zudem die Verkürzung des jeweils vorhandenen BDIV Fragments erfolgen.

Damit wird es möglich durch Bestimmung des Einflusses des verkürzten Fragments auf das Tumorrisiko eine Feinkartierung des Locus vorzunehmen, die eine Grundvoraussetzung zur Identifizierung der beteiligten Gene darstellt.

Darüber hinaus können die verschiedenen kongenen Zuchtlinien mit unterschiedlichen Inserts aus dem BDIV Genom untereinander gekreuzt werden. Additive und epistatische Wechselwirkungen der Loci im Hinblick auf Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten Entstehung von MPNSTs können so *in vivo* nachvollzogen werden.

Im Hinblick auf die beobachteten geschlechtsspezfischen Effekte des Locus *Mss4* konnte das Gen für den *Östrogenrezeptor beta* (*Er beta*), für das mehrere „Single nukleotide polymorphismen“ (SNPs) zwischen BDIV und BDIX Ratten gefunden wurden, als vielversprechendes Kandidatengen selektiert werden. Zwei dieser SNPs könnten zu einer niedrigeren Expression des *Er beta* Gens, was sich in meinen Expressionsexperimenten auf Proteinebene bereits andeutete, bzw. zu einer Verschiebung zu Splice Varianten mit einer niedrigeren Affinität zu den Liganden in den *Nervi trigemini* führen. Die systematische Fortführung meiner Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen den Er beta und zelltypspezifische Proteine (d. h. die Untersuchung von *Nervi trigemini* aus BDIV und BDIX Ratten beider Geschlechter zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten mit und ohne EtNU-Behandlung) wird weitere Auskünfte darüber geben, ob der *Er beta* im *Nervus trigeminus* der BD Ratten als Tumorresistenzgen agiert und in welchen Zellen seine Expression für das Tumorrisiko kritisch ist.

Das entscheidende Experiment, um den *Er beta* als Kandidatengen zu verifizieren, wird darin bestehen, aus der bereits von mir etablierten kongenen BDIX.*Mss4a*(BDIV) Linie eine subkongene Linie mit einem wenig kürzeren BDIV Fragment zu züchten, das das *Er beta* Gen nicht mehr enthält. Sollte der tumorprotektive Effekt in dieser Linie nicht mehr beobachtet werden, ist der *Er beta* ein sehr wahrscheinlicher Kandidat.

Um die Konsequenzen einer niedrigen *Er beta* Expression in ihrem Extrem zu untersuchen, erscheinen *Er beta* Knockout-Tiere ideal. Da die Herstellung von Knockout-Ratten in Ermangelung von embryonalen Stammzellen der Ratte durch nukleären Transfer bzw. EtNU-Mutagenese noch immer aufwendig ist, werden die Effekte einer *Er beta* Knockout-Situation auf das periphere Nervensystem in der Maus untersucht werden. Dies wird in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.-A. Gustafsson, Department of Medical Nutrition, Karolinska Institute Stockholm, die *Er beta* Knockout-Mäuse hergestellt hat und die funktionellen Konsequenzen der Abwesenheit einer *Er beta* Expression bereits an verschiedenen anderen Organen wie Gehirn, Prostata, Brustdrüse und Immunsystem untersucht hat, geschehen. Mit immunhistochemischen Methoden sollen die Effekte auf Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Schwann Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung von *Er beta* Knockout-Mäusen beiderlei Geschlechts im Vergleich mit dem Wildtyp untersucht werden.

Sollte das *Er beta* Gen als Tumorresistenzgen verifiziert werden, könnten sich Testreihen mit selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) wiederum im BDIV/ BDIX Suszeptibilitätsmodell anschließen, um die Funktion des Er beta Proteins zu unterstützen bzw. zu antagonisieren.

Es könnte also in absehbarer Zeit möglich sein, tumorpräventive Maßnahmen an BDIX Ratten mit Suszeptibilitätsallelen für das Auftreten EtNU-induzierter neuraler Tumoren durchzuführen, wie dies bereits bei Hochrisikopatienten für colorektale Tumoren durch Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Hemmer möglich ist. Bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP), die aufgrund eines erblichen Defekts im *APC*-Tumorsuppressorgen ein besonders hohes Colonkarzinom-Risiko aufweisen, konnte mit dem COX-2-Hemmer Celecobix die Zahl der Adenome um 28% reduziert werden (Steinbach, Lynch et al. 2000).

8 Literaturverzeichnis

Aitman, T. J., A. M. Glazier, et al. (1999). "Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats." Nat Genet 21(1): 76-83.

Akhurst, R. J. and R. Derynck (2001). "TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword." Trends Cell Biol 11(11): S44-51.

Altenschmidt, U., R. Kahl, et al. (1997). "Schwannoma cells induce a tumor-cell-specific cytotoxic-T-cell response upon transplantation into syngeneic rats but escape elimination through the secretion of immunosuppressive factors." Int J Cancer 70(5): 542-50.

An, J., N. Beauchemin, et al. (1997). "Use of a rat cDNA probe specific for the Y chromosome to detect male-derived cells." J Androl 18(3): 289-93.

Aoyama, H., M. Naito, et al. (1989). "Effects of sex difference, gonadectomy and estradiol on N-ethyl-N-nitrosourea-induced trigeminal nerve tumors in rats." Carcinogenesis 10(8): 1505-9.

Balmain, A. (2002). "Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models." Cell 108(2): 145-52.

Balmain, A. and H. Nagase (1998). "Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers." Trends Genet 14(4): 139-44.

Bardin, A., N. Boulle, et al. (2004). "Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression." Endocr Relat Cancer 11(3): 537-51.

Blankenhorn, E. P., C. Descipio, et al. (2007). "Refinement of the Iddm4 diabetes susceptibility locus reveals TCRVbeta4 as a candidate gene." Ann N Y Acad Sci 1103: 128-31.

Bostrom, J., J. M. Cobbers, et al. (1998). "Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q." Cancer Res 58(1): 29-33.

Cichowski, K., T. S. Shih, et al. (1999). "Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1." Science 286(5447): 2172-6.

Claus, E. B., N. Risch, et al. (1994). "Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction." Cancer 73(3): 643-51.

Collins, V. P. (1999). "Progression as exemplified by human astrocytic tumors." Semin Cancer Biol 9(4): 267-76.

Collins, V. P. (2004). "Brain tumours: classification and genes." J Neurol Neurosurg Psychiatry 75 Suppl 2: ii2-11.

Cormier, R. T., A. Bilger, et al. (2000). "The Mom1AKR intestinal tumor resistance region consists of Pla2g2a and a locus distal to D4Mit64." Oncogene 19(28): 3182-92.

De Miglio, M. R., R. M. Pascale, et al. (2002). "Chromosome mapping of multiple loci affecting the genetic predisposition to rat liver carcinogenesis." Cancer Res 62(15): 4459-63.

De Miglio, M. R., P. Virdis, et al. (2006). "Mapping a sex hormone-sensitive gene determining female resistance to liver carcinogenesis in a congenic F344.BN-Hcs4 rat." Cancer Res 66(21): 10384-90.

Dhar, M. and R. Taneja (2001). "Cross-regulatory interaction between Stra13 and USF results in functional antagonism." Oncogene 20(34): 4750-6.

Dragani, T. A., G. Manenti, et al. (1995). "Genetics of liver tumor susceptibility in mice." Toxicol Lett 82-83: 613-9.

Druckrey, H., B. Schagen, et al. (1970). "[Induction of neurogenic malignancies by one single dose of ethyl-nitrosourea (ENU) given to newborn and juvenile BD IX-strain rats]." Z Krebsforsch 74(2): 141-61.

Druckrey, H. (1971). "Genotypes and phenotypes of ten inbred strains of BD-rats." Arzneimittelforschung 21(8): 1274-8.

Easton, D. F., K. A. Pooley, et al. (2007). "Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci." Nature 447(7148): 1087-93.

Ewart-Toland, A., P. Briassouli, et al. (2003). "Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human." Nat Genet 34(4): 403-12.

Ewart-Toland, A., Q. Dai, et al. (2005). "Aurora-A/STK15 T+91A is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types." Carcinogenesis 26(8): 1368-73.

Fink, L., W. Seeger, et al. (1998). "Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking." Nat Med 4(11): 1329-33.

Foley, E. F., A. A. Jazaeri, et al. (2000). "Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon." Cancer Res 60(2): 245-8.

Gariboldi, M., G. Manenti, et al. (1993a). "Chromosome mapping of murine susceptibility loci to liver carcinogenesis." Cancer Res 53(2): 209-11.

Gariboldi, M., G. Manenti, et al. (1993b). "A major susceptibility locus to murine lung carcinogenesis maps on chromosome 6." Nat Genet 3(2): 132-6.

Gering, K. M., J. A. Marx, et al. (2006). "The interaction mode of premalignant Schwann and immune effector cells during chemically induced carcinogenesis in the rat peripheral nervous system is strongly influenced by genetic background." Cancer Res 66(9): 4708-14.

Giangaspero, F., S. H. Bigner, et al. (2000). Medulloblastoma. Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. P. Kleihues and W. K. Cavenee. Lyon, IARCPress: 129-137.

Gibbs, R. A., G. M. Weinstock, et al. (2004). "Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution." Nature 428(6982): 493-521.

Graham, D., M. W. McBride, et al. (2007). "Candidate genes that determine response to salt in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat: congenic analysis." Hypertension 50(6): 1134-41.

Gudmundsson, J., P. Sulem, et al. (2007). "Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes." Nat Genet 39(8): 977-83.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.

Hanstein, B., H. Liu, et al. (1999). "Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform." Mol Endocrinol 13(1): 129-37.

Hunter, D. J., P. Kraft, et al. (2007). "A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer." Nat Genet 39(7): 870-4.

Ivankovic, S., H. Druckrey, et al. (1966). "[Production of neurogenic tumors in descendants following a single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats]." Naturwissenschaften 53(16): 410.

Iwamoto, H., S. Hirata, et al. (2003). "The novel 5'-untranslated first exon, exon 0H, of the rat estrogen receptor beta gene." Endocr Res 29(2): 157-68.

Joe, B., E. F. Remmers, et al. (2000). "Genetic dissection of collagen-induced arthritis in Chromosome 10 quantitative trait locus speed congenic rats: evidence for more than one regulatory locus and sex influences." Immunogenetics 51(11): 930-44.

Kindler-Rohrborn, A., B. U. Kolsch, et al. (1999). "Ethylnitrosourea-induced development of malignant schwannomas in the rat: two distinct loci on chromosome of 10 involved in tumor susceptibility and oncogenesis." Cancer Res 59(5): 1109-14.

Kindler-Rohrborn, A., A. B. Kind, et al. (2000). "Suppression of ethylnitrosourea-induced schwannoma development involves elimination of neu/erbB-2 mutant premalignant cells in the resistant BDIV rat strain." Cancer Res 60(17): 4756-60.

Kleihues, P., P. C. Burger, et al. (2000). Glioblastoma. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. P. Kleihues and W. K. Cavenee, IARCPress: 29-39.

Kluver, H. and E. Barrera (1953). "A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system." J Neuropathol Exp Neurol 12(4): 400-3.

Koelsch, B. U., C. Fischer, et al. (2005). "Gender-specific polygenic control of ethylnitrosourea-induced oncogenesis in the rat peripheral nervous system." Int J Cancer.

Korkola, J. E. and M. C. Archer (1999). "Resistance to mammary tumorigenesis in Copenhagen rats is associated with the loss of preneoplastic lesions." Carcinogenesis 20(2): 221-7.

Kos, M., S. Denger, et al. (2002). "Upstream open reading frames regulate the translation of the multiple mRNA variants of the estrogen receptor alpha." J Biol Chem 277(40): 37131-8.

Kreutz, R. and N. Hubner (2002). "Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension." Semin Nephrol 22(2): 135-47.

Laerum, O. D., M. F. Rajewsky, et al. (1982). "Malignant transformation of rat neural cells in culture." Ann N Y Acad Sci 381: 264-73.

Laerum, O. D., M. F. Rajewsky, et al. (1977). "Phenotypic properties of neoplastic cell lines developed from fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea in vivo." Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol 89(3): 273-95.

Lichtenstein, P., N. V. Holm, et al. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med 343(2): 78-85.

Liu, P., Y. Wang, et al. (2006). "Candidate lung tumor susceptibility genes identified through whole-genome association analyses in inbred mice." Nat Genet 38(8): 888-95.

Louis, D. N., B. W. S. B.W., et al. (2000). Meningioma. Pathology and Genetics of Nervous System Tumors. P. Kleihues and W. K. Cavenee. Lyon, IARCPress: 176-184.

Marx. J.A.M., Röhrborn, A.J., (2007, zur Veröffentlichung eingereicht) “Ablation of T cell immunity modulates rat strain-specific risk of developing chemically induced malignant nerve sheath tumors”

Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol 20(2): 429-40.

Matthews, J. and J. A. Gustafsson (2003). "Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta." Mol Interv 3(5): 281-92.

Mock, B. A., M. M. Krall, et al. (1993). "Genetic mapping of tumor susceptibility genes involved in mouse plasmacytomagenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 90(20): 9499-503.

Monaco, S., J. Gehrmann, et al. (1992). "MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system." J Neurocytol 21(9): 623-34.

Mullins, J. J., J. Peters, et al. (1990). "Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene." Nature 344(6266): 541-4.

Narla, G., A. Difeo, et al. (2005). "A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk." Cancer Res 65(4): 1213-22.

Ogawa, S., S. Inoue, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor ofestrogen action in human." Nucleic Acids Res 26(15): 3505-12.

Oklu, R. and R. Hesketh (2000). "The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family." Biochem J 352 Pt 3: 601-10.

Olofsson, P., J. Holmberg, et al. (2003). "Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats." Nat Genet 33(1): 25-32.

Osaki, M., M. Oshimura, et al. (2004). "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer." Apoptosis 9(6): 667-76.

Poole, T. M. and N. R. Drinkwater (1996). "Two genes abrogate the inhibition of murine hepatocarcinogenesis by ovarian hormones." Proc Natl Acad Sci U S A 93(12): 5848-53.

Reilly, K. M., D. A. Loisel, et al. (2000). "Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects." Nat Genet 26(1): 109-13.

Remmers, E. F., B. Joe, et al. (2002). "Modulation of multiple experimental arthritis models by collagen-induced arthritis quantitative trait loci isolated in congenic rat lines: different effects of non-major histocompatibility complex quantitative trait loci in males and females." Arthritis Rheum 46(8): 2225-34.

Riemer, R. K., Y. Y. Wu, et al. (1988). "Estrogen reduces beta-adrenoceptor-mediated cAMP production and the concentration of the guanyl nucleotide-regulatory protein, Gs, in rabbit myometrium." Mol Pharmacol 33(4): 389-95.

Ruivenkamp, C. A., T. van Wezel, et al. (2002). "Ptprj is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Scc1 and is frequently deleted in human cancers." Nat Genet 31(3): 295-300.

Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science 230(4732): 1350-4.

Samoylenko, A., U. Roth, et al. (2001). "The upstream stimulatory factor-2a inhibits plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by binding to a promoter element adjacent to the hypoxia-inducible factor-1 binding site." Blood 97(9): 2657-66.

Samuelson, D. J., B. A. Aperavich, et al. (2005). "Fine mapping reveals multiple loci and a possible epistatic interaction within the mammary carcinoma susceptibility quantitative trait locus, Mcs5." Cancer Res 65(21): 9637-42.

Samuelson, D. J., S. E. Hesselson, et al. (2007). "Rat Mcs5a is a compound quantitative trait locus with orthologous human loci that associate with breast cancer risk." Proc Natl Acad Sci U S A 104(15): 6299-304.

Schmidt, E. E., K. Ichimura, et al. (1999). "Mutational profile of the PTEN gene in primary human astrocytic tumors and cultivated xenografts." J Neuropathol Exp Neurol 58(11): 1170-83.

Schuster-Bockler, B., J. Schultz, et al. (2004). "HMM Logos for visualization of protein families." BMC Bioinformatics 5: 7.

Shepel, L. A., H. Lan, et al. (1998). "Genetic identification of multiple loci that control breast cancer susceptibility in the rat." Genetics 149(1): 289-99.

Skliris, G. P., K. Munot, et al. (2003). "Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model." J Pathol 201(2): 213-20.

Snell, G.D. (1948) "Methods for the study of histocompatibility genes". J. Genet. 49: 87–108.

St-Pierre, B., G. Flock, et al. (2002). "Stra13 homodimers repress transcription through class B E-box elements." J Biol Chem 277(48): 46544-51.

Stacey, S. N., A. Manolescu, et al. (2007). "Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer." Nat Genet 39(7): 865-9.

Steck, P. A., M. A. Pershouse, et al. (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." Nat Genet 15(4): 356-62.

Steinbach, G., P. M. Lynch, et al. (2000). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." N Engl J Med 342(26): 1946-52.

Storch, V., Welsch, U., (1996) "Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum." 22. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: Seite 403.

Swanson, H. I. and J. H. Yang (1999). "Specificity of DNA binding of the c-Myc/Max and ARNT/ARNT dimers at the CACGTG recognition site." Nucleic Acids Res 27(15): 3205-12.

Tang, S., S. L. Tan, et al. (2004). "Computational method for discovery of estrogen responsive genes." Nucleic Acids Res 32(21): 6212-7.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4.

Wakeland, E., L. Morel, et al. (1997). "Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking)." Immunol Today 18(10): 472-7.

Woodruff, J. M., H. P. Kourea, et al. (2000). Schwannoma. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. P. Kleihues and W. K. Cavenee. Lyon, IARCPress: 164-166.

Yeager, M., N. Orr, et al. (2007). "Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24." Nat Genet 39(5): 645-9.

Yokoi, N., K. Komeda, et al. (2002). "Cblb is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus." Nat Genet 31(4): 391-4.

Youngren, K. K., D. Coveney, et al. (2005). "The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours." Nature 435(7040): 360-4.

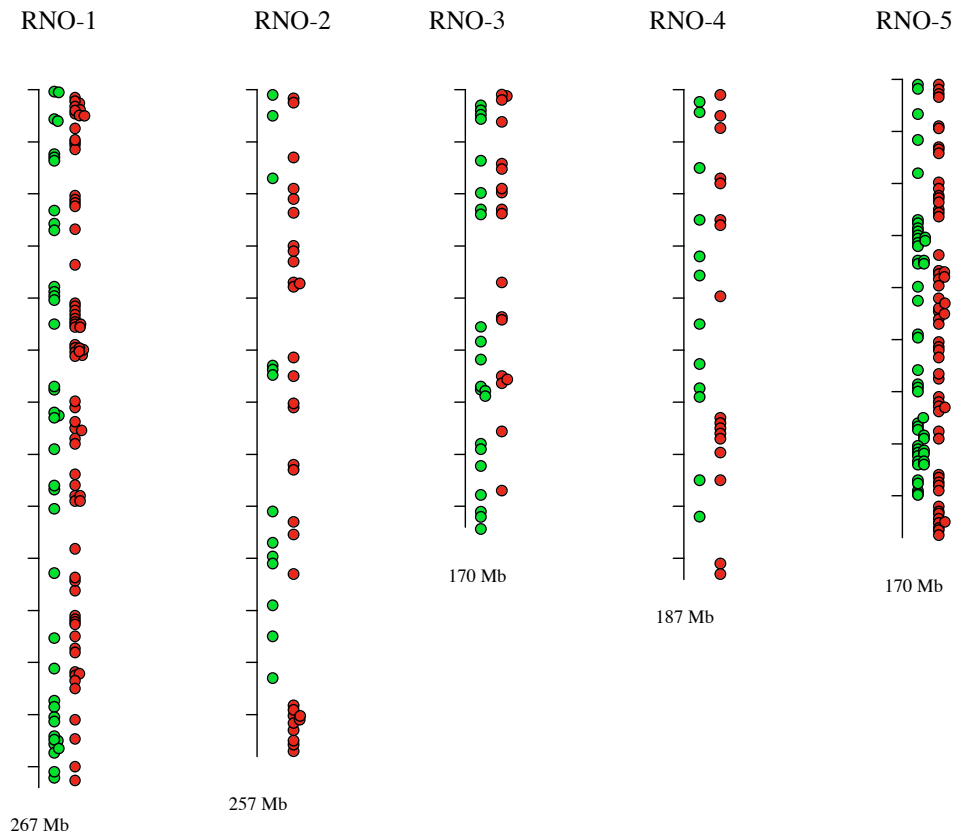
Zan, Y., J. D. Haag, et al. (2003). "Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay." Nat Biotechnol 21(6): 645-51.

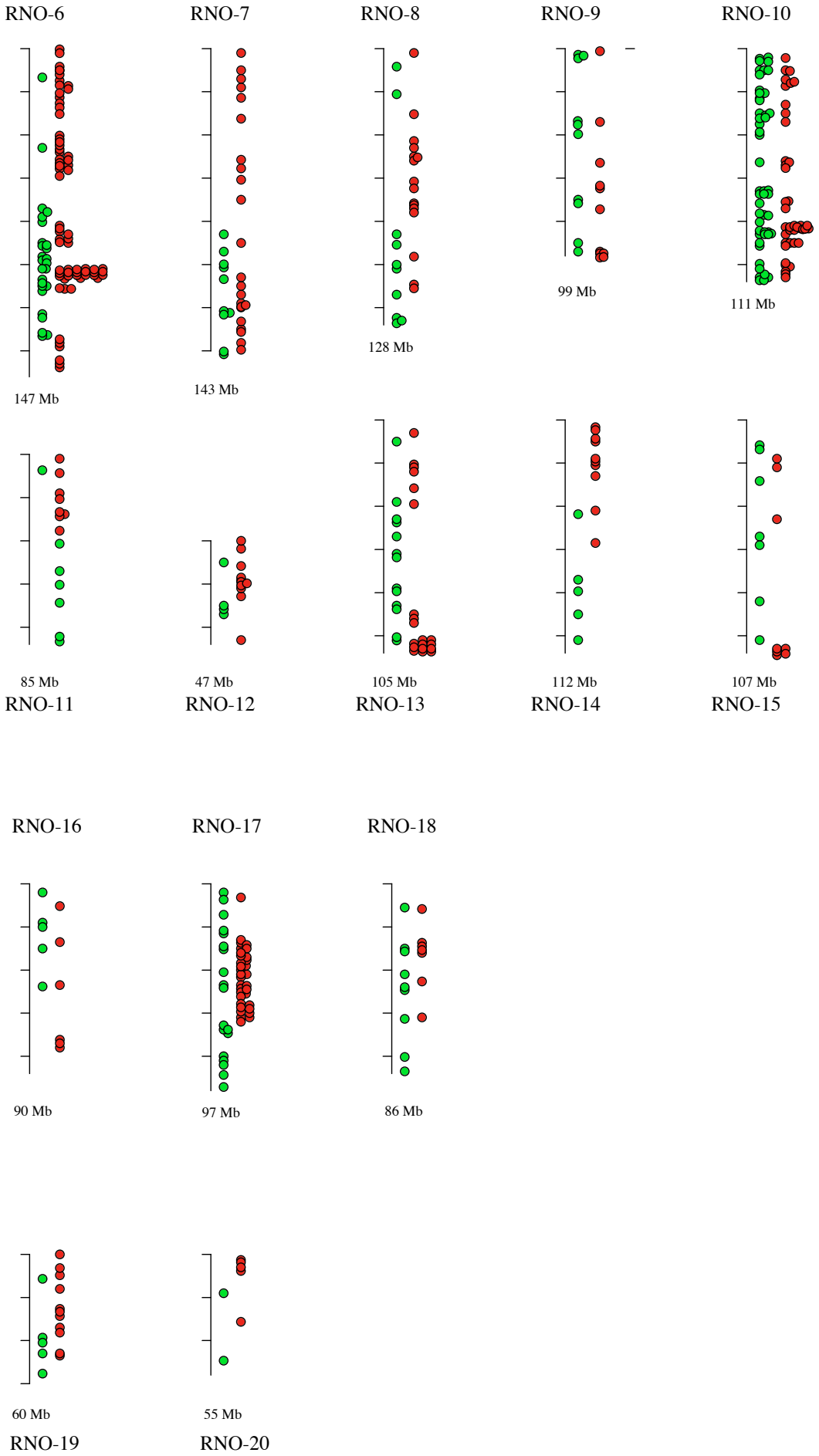
Zhou, Q., J. P. Renard, et al. (2003). "Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation." Science 302(5648): 1179.

Zimdahl, H., G. Nyakatura, et al. (2004). "A SNP map of the rat genome generated from cDNA sequences." Science 303(5659): 807.

Anhang 1

In Bezug auf die Rattenstämme BDIV und BDIX polymorphe und nicht polymorphe Mikrosatellitenmarker auf den Autosomen (grün: polymorph, rot: nicht polymorph). Die Autosomen der Ratte sind entsprechend ihrer physikalischen Länge in Mb dargestellt (eine Einheit entspricht 20 MB). Die getesteten Mikrosatellitenmarker sind gemäß ihrer Position in Mb auf Chromosom 1 bis 20 dargestellt.




RNO-6
147 Mb
RNO-7
143 Mb
RNO-8
128 Mb
RNO-9
99 Mb
RNO-10
111 Mb
RNO-11
85 Mb
RNO-12
47 Mb
RNO-13
105 Mb
RNO-14
112 Mb
RNO-15
107 Mb
RNO-16
90 Mb
RNO-17
97 Mb
RNO-18
86 Mb
RNO-19
60 Mb
RNO-20
55 Mb

Anhang 2

Mikrosatellitenmarker mit ihrer Position in Mb auf dem jeweiligen Chromosom

Mikrosatelliten für den „Genome scan“ in der N2

Chromosom 1

D1Rat21	53,93
D1Rat33	116,23
D1Mit4	160
D1Rat83	252,39
D1Mgh13	252,6

Chromosom 2

D2Rat1	9,59
D2Mgh5	106,46
D2Mit19	174,7
D2Mgh12	210,59
D2Rat67	243,48

Chromosom 3

D3Mgh8	11,96
D3Rat48	25,67
D3Mgh11	105,74
D3Mit3	136,3
D3Rat1	169,92

Chromosom 4

D4Rat2	5,43
D4Rat71	29,9
D4Mit2	55,62
D4Mit15	115,48
D4Mit14	165,41

Chromosom 5

D5Rat126	24,79
D5Rat8	60,91
D5Wox3	99,08
D5Mgh20	140,93
D5Rat33	143,55
D5MCO1	154,28

Chromosom 6

D6Mit3	75,05
D6Mgh5	76,38
D6Rat12	114,03
D6Mgh2	133,08

Chromosom 7

D7Mgh1	unbekannt
D7Mgh6	96,68
D7Mgh10	142,2
D7Rat94	142,89

Chromosom 8

D8Mit6	9,58
D8Rat52	20,96
D8Mgh4	86,64
D8Mit1	92,99
D8Mgh3	103,7
D8Rat71	127,92

Chromosom 9

D9Rat45	3,81
D9Rat26	37,31
D9Rat100	93,64
D9Rat3	100

Chromosom 10

D10Rat2	5,82
D10Rat96	6,17
D10Mgh14	65,39
D10NGFR	84,3
D10Rat19	87,29
D10GH	unbekannt

Chromosom 11

D11Mgh5	43,21
D11Mgh4	61,56
D11Mgh3	68,29
D11Rat43	85,08

Chromosom 12

D12Rat17	*unbekannt*
D12Rat18	*35,77*

Chromosom 13

D13Mgh2	9,26
D13Mgh5	63,31
D13Rat191	88,15

Chromosom 14

D14Rat40	74,97
D14Rat22	102,52
D14Mgh4	138,23

Chromosom 15

D15Rat42	unbekannt
D15Mgh4	83,36

Chromosom 16

D16Mgh2	17,57
D16Rat13	77,96

Chromosom 17

D17Rat1	5,58
D17Rat11	30,93
D17Mit4	71,22
D17Rat51	96,59

Chromosom 18

D18Mit1	12,43
D18Mgh3	48,46
D18Mit9	80,44

Chromosom 19

D19Mit2	12,76
D19Mit8	45,69

Chromosom 20

D20Rat20	18,42
D20Mit1	48,2

X-Chromosom

DXRat25	Unbekannt
DXRat100	9,1
DXRat4	23,54
DXRat40	45,56
DXMgh9	88,58
DXRat96	122,14

Mikrosatelliten für den „Genome scan“ in der N3
(zusätzliche Mikrosatellitenmarker gegenüber dem „Genome scan“ in der N2)

Chromosom 1

D1Rat21	53,93
D1Mit4	160
D1MT1Pa	185,6
D1Rat83	252,39
D1Mit8	257,62

Chromosom 3

D3Mgh8	11,96
D3Wox9	47,7
D3Mgh11	105,74
D3Mgh2	157,94

Chromosom 4

D4Rat2	5,43

Chromosom 5

D5Wox3	99,08
D5Mgh20	140,93
D5Rat33	143,55
D5MCO1	154,28

Chromosom 6

D6Mit3	75,05
D6Mgh5	76,38
D6Rat12	114,03
D6Mgh2	133,08

Chromosom 8

D8Mgh3	103,7
D8Rat71	127,92

Chromosom 10

D10Rat2	5,82
D10Rat96	6,17
D10Mgh14	65,39
D10NGFR	84,3
D10Rat19	87,29
D10GH	unbekannt

Chromosom 11

D11Rat43	85,08

Chromosom 12

D12Rat17	unbekannt

Chromosom 13

D13Mgh2	9,26
D13Mgh5	63,31
D13Rat191	88,15

Chromosom 14

D14CSNA	21,88
D14Mit4	44,92
D14Rat40	74,97

Chromosom 15

D15Rat42	3,00
D15Mit2	16,36
D15Mgh2	56,09

Chromosom 16

D16Mit5	unbekannt
D16Mgh2	17,57

Chromosom 18

D18Mit1	12,43
D18Mgh3	48,46
D18Mit9	80,44

Chromosom 19

D19Mit2	12,76
D19Mit6	41,61

X-Chromosom

DXRat4	23,54
DXRat40	45,56

Mikrosatellitenmarker für den „Whole genome scan“

Chromosom 1

D1Rat182	0,61
D1Rat4	11,86
D1Rat192	23,63
D1Rat26	79,36
D1Rat28	88,93
D1Rat34	115,23
D1Rat217	124,38
D1Mgh18	138,73
D1Rat44	153,83
D1Wox19	185,84
D1Wox23	212,27
D1Rat123	223,89
D1Rat75	235,26
D1Mgh12	247,43
D1Mit8	257,62

Chromosom 2

D2Rat1	9,59
D2Mgh1	34,83
D2Mit17	109,5
D2Rat39	162,88
D2Mit19	174,7
D2Mit13	182,83
D2Mgh11	197,5
D2Rat61	227,13
D2Rat67	243,48

Chromosom 3

D3Mgh8	11,96
D3Wox3	27,4
D3Wox10	47
D3Mgh11	105,74
D3Mgh14	118,76
D3Rat10	135,3
D3Mit2	143,12
D3Mgh2	157,94
D3Rat1	169,92

Chromosom 4

D4Mgh22	4,41
D4Rat71	29,9
D4Mit2	55,62
D4Mit5	72,43
D4Mit11	91,57
D4Mit14	165,41

Chromosom 5

D5Rat109	1,93
D5Mgh17	14,73
D5Rat12	70,67
D5Rat24	106,16
D5Wox12	135,88

Chromosom 7

D7Mit5	85,11
D7Mgh6	96,68
D7Rat94	142,89

Chromosom 8

D8Mit6	9,58
D8Rat52	20,96
D8Mgh4	86,64
D8Mit1	92,99
D8Mgh3	103,7
D8Mgh1	116,82
D8Rat71	127,92

Chromosom 9

D9Mgh5	2,17
D9Rat76	33,49
D9Mit4	39,33
D9Mgh1	72,87
D9Rat100	93,64
D9Rat3	100

Chromosom 10

D10Mit15	4,75
D10Rat45	20,23
D10Rat39	30,31
D10Mit3	41,35
D10Mgh24	54,65
D10Mit2	64,87
D10Rat24	79,24
D10Mgh21	92,79
D10Mgh16	107,27

Chromosom 11

D11Mgh5	43,21
D11Rat5	56,46
D11Mgh4	61,56
D11Mgh3	68,29
D11Mgh1	84,6
D11Rat32	unbekannt

Chromosom 12

D12Mit5(6)	12,8
D12Mgh4	27,71
D12Rat18	35,77
D12Mit4	39,18
D12Rat22	45,9
D12Rat17	unbekannt

Chromosom 13

D13Mgh2	9,26
D13Mgh4	38,503
D13Rat26	56,84
D13Mgh5	63,31
D13Mit5	78,08
D13Rat191	88,15

Chromosom 14

D14Mit4	44,92
D14Mgh2	79,08
D14Rat51	89,32
D14Rat22	102,52
D6(14)Mgh4	138,23

Chromosom 15

D15Rat74	58,15
D15Mgh4	83,36

Chromosom 16

D16Rat51	3,47
D16Mgh4	18,12
D16Mit4	30,56
D16Mit3	47,43
D16Rat13	77,96

Chromosom 17

D17Rat3	8,87
D17Mgh2	21,28
D17Rat11	30,93
D17Rat31	65,48
D17Mit5	82,13
D17Rat51	96,59

Chromosom 18

D18Mit13	2,4
D18Mit1	12,43
D18Rat71	31,19
D18Rat53	42,04
D18MGH3	48,46
D18Mit9	80,44
D18Rat1	86,93

Chromosom 19

D19Mit2	12,76
D19Rat2	55,46
D19Mit3	unbekannt

Chromosom 20

D20Rat5	18,45
D20Mgh1	51,15
D20Mgh2 liegt auf Chr8	82,54

X-Chromosom

DXRat69	11,95
DXRat4	23,54
DXMgh5	39,88
DXRat106	47,41
DXRat56	81,45
DXRat50	99,84
DXRat58	114,107
DXRat127	124,66

Mikrosatellitenmarker für kongene Fragmente

Mss1

D10Mit3	41,35
D10Rat244	50,6
D10Mgh6	65,0
D10Mgh14	65,39
D10NGFR	84,3
D10Mgh5	86,33
D10Rat99	89,29
D10Wox19	89,43
D10Mgh21	92,79
D10Rat7	105,9
D10Mgh16	107,27

Mss2

D1Rat33	116,2
D1Mit4	160
D1MT1PA	185,6
D1Wox23	212,23
D1Rat123	223,89

***Mss2* (nach statistischer Analyse, Verschiebung des Loci)**

D1Rat75	235,26
D1Rat83	252,39

Mss4

D6Rat132	52,75
D6Mgh5	76,38
D6Rat98	79,92
D6Rat19	81,68
D6Rat218	90,95
D6Rat18	93,37
D6Rat17	95,06
D6Mit1	98,84
D6Rat229	99,75
D6Rat88	100,19
D6Wox4	102,45
D6Ngb	111,2
D6Rat66	112,27
D6CPG1a	123,2
D6Mgh3	127,68
D6Mgh2	133,08
D6Rat110	134,09

Mss5

D13Mgh2	9,29
D13Rat25	46,53
D13Rat26	56,84
D13Mgh5	63,31
D13Mit5	78,08
D13Rat191	88,15

Mss7

D10Mgh25	5,09
D10Rat95	6,3
D10Got1	8,7
D10GFER	13,9
D10Mgh12	19,1
D10Rat45	20,2

Anhang 3

Primersequenzen für die Sequenzierung der Kandidatengene

Akt1 **Sequenz (5' →3')**		**Annealing-temperatur**	
CGGGACCCTGCCTCACATGCTTTC	AKT-1F	65°C	genomisch
CCTGCTGGGCCAGTACACACCCTC	AKT-1R	65°C	genomisch
AGTACAGTGTGCCTGGGTCCTCAC	AKT-2F	65°C	genomisch
GAGGCTCTCCGTAGTTTCTCAGTG	AKT-2R	65°C	genomisch
ATATGGTCTGTCTGGTAAGGACTG	AKT-3F	56°C	genomisch
ACTCAGCAGAGGCTTGCAAACATG	AKT-3R	56°C	genomisch
TTACCTGCAGCGTCAGGACCAGGC	AKT-4F	67°C	genomisch
CCAACTCAGTCAGGTCAAGAGGAG	AKT-4R	67°C	genomisch
ACTCTGGACACTATCAAGCCGAAG	AKT-5F	65°C	genomisch
CTCAGTAAGCGTGTGGGCAACCTC	AKT-5R!	65°C	genomisch
GAGCCCCAGCGCCCGTAGTCAGTC	AKT-6R mit -5F	62°C	genomisch
AGGTGATACCTATCTCAAAGACAC	AKT-7F	59°C	genomisch
CAGAGAGGCGCCCAAGGCTCTCAG	AKT-7R	59°C	genomisch
TCTTACTACTGCTGAGTCGGAGTC	AKT-8F	62°C	genomisch
CTTGTCCAGCATGAGGTTCTCCAG	AKT-8R	62°C	genomisch
CACTCCGAGAAGAACGTGGTGTAC	AKT-9F	65°C	genomisch
GCCATAGTCGTTGTCCTCCAGCAC	AKT-9R	65°C	genomisch
TTCTGCGGGACACCCGAGTACCTG	AKT-10F	61°C	genomisch
ATGATCTCCTTGGCGTCCTCGGAG	AKT-10R	61°C	genomisch
CTCAGCCTCTGGACAGTACTGCTG	AKT-11F	62°C	genomisch
CGAGATCCAGAGCTGGGCACGGTG	AKT-11R	62°C	genomisch
TAGAGCTGTGCCTTAGTGCTAATC	AKT-12F	65°C	genomisch
AGAAAAGGCTTCATACTGAGGCAC	AKT-12R	65°C	genomisch
CTATCCTCCATGGTGTCAGGTCAG	AKT-13F	65°C	genomisch
ACATGTCTGGCCTCAAATCGGATG	AKT-13R	65°C	genomisch

Pten **Sequenz (5' →3')**		**Annealing-temperatur**	
GCCAAGTCCAGAGCCATTTCCATC	PTEN-S1F	56°C	genomisch
ACGTTATAGTCACCCCAACTACAG	PTEN-S1R	56°C	genomisch
ATAGCTAATGTTTCCAAATGTATG	PTEN-S2F	56°C	genomisch
ATACTGTTCTGTGTGTTAAGAATC	PTEN-S2R	56°C	genomisch
GTTATTAATACTATTTGAGATTAG	PTEN-S3F	56°C	genomisch
CTTCAACTGCTCTGAGGAATCCAG	PTEN-S3R	56°C	genomisch
TAAATGTTGGTGATATTGATACTC	PTEN-S4F	56°C	genomisch
CAGATTTTCATCTCAATAATCTTG	PTEN-S4R	56°C	genomisch
TAAAATTCCCTGAGCACCAGTAAG	PTEN-S5F	56°C	genomisch
ACAACTATGTAACCACAATGTAAC	PTEN-S5R	56°C	genomisch
TAACCCAGTTATAGCAATGTTGTG	PTEN-S6F	56°C	genomisch
CTAAATTTTTATGTACACATTTAG	PTEN-S6R	56°C	genomisch
GAATTTTGTGTATATTTCTGATAC	PTEN-S7F	56°C	genomisch
AATCTCCTAACCAAAGGCACTAAG	PTEN-S7R	56°C	genomisch
TGTTTGCCTTCATTTTAGAATATG	PTEN-S8F	56°C	genomisch

ACGCTCTATACTACAAATGCTATC	PTEN-E8R-NEU	56°C	genomisch
GCATAACCTCTCGGGAGTACACAC	PTEN-S8R	56°C	genomisch
GAAAAGCAGTGCCCTTCAGAATTC	PTEN-S9F	56°C	genomisch
GCAATCTGACACAATGTCCTATTG	PTEN-S9R	56°C	genomisch

Transforming growth factor beta3 **Sequenz (5' →3')**		**Annealing-temperatur**	
GGGGTCTCCTCCTTGCCAGGCCTC	TGFB3-F1	63°C	cDNA
CTGATTTCCAGACCCAAGTTGGAC	TGFB3-R1	63°C	cDNA
ACGAGAGGCACCGCAGAGTGGCTG	TGFB3-F2	60°C	cDNA
TTGGTTTTCCAAGGAGCAGCAGTC	TGFB3-R2	60°C	cDNA
CAGGATCGCGGCCGAGCCCGGTTC	TGFB3-P-F1	60°C	genomisch
TTCCTCCGCAAGGCCCTTCCCGTG	TGFB3-P-R1	60°C	genomisch
AATTCCTAAAGAGAAGCAAGGGAC	TGFB3-P-F2	60°C	genomisch
AAAAAAATCACCAGTGGGTATGTG	TGFB3-P-R2	60°C	genomisch

Latent Tgf beta binding protein 2 **Sequenz (5' →3')**		**Annealing-temperatur**	
GTGGGCACCATACTACCTATACAG	LTBP2-F10	59°C	cDNA
CCTTAAGTCCCCAGCCTATGGCTG	LTBP2-R10	59°C	cDNA

Estrogen related receptor beta **Sequenz (5' →3')**		**Annealing-temperatur**	
TGCCCACCTTCTCACCTCGCTTAG	ESRRB-F1	60°C	genomisch
CAACAAGACCTGTAGACCAATGTC	ESRRB-R1	60°C	genomisch
GTGGCCTCCTGCGAGGCTTGCAAG	ESRRB-F2	60°C	cDNA
TGCTTGGCCCAGCTAATGAGGAAC	ESRRB-R2	60°C	cDNA
AGGGGATATCAAGGCCCTGACCAC	ESRRB-F3	60°C	cDNA
GGTGGCCGTGGAAGTCTCCACGTG	ESRRB-R3	60°C	cDNA

Estrogen receptor beta **Sequenz (5' →3')**		**Annealing-temperatur**	
TGCAAAATAGAGAATGTTTACCTG	ESR2-F1	60°C	cDNA
GGCTGGACAGATATAATCATTATG	ESR2-R1	60°C	cDNA
TGGGTATCATTACGGCGTTTGGTC	ESR2-F2	60°C	cDNA
CCCTTCTACGCACTTCCCCTCATC	ESR2-R2	60°C	cDNA
TCCATCGACCACCCCGGCAAGCTC	ESR2-F3	60°C	cDNA
GTACATGTTCCACTTTTGACCATC	ESR2-R3	60°C	cDNA
CTGGAATATCCAACAACAGCCAAG	ZE5a-F	60°C	genomisch
AGGACGGTGCCTGGCACATACCAG	ZE5a-R	60°C	genomisch
CGTTATTACTGCTTATTTCGGTGC	ON-PRO-F	60°C	genomisch
CAAATTCAATTAAGCCTCACAATGAG	ON-PRO-R	60°C	genomisch
ACACTCCTCTGTTAGCAACATGTG	OH-PRO-F	60°C	genomisch
TCAACAGAGAAAAGGAAATTGCCTC	OH-PRO-R	60°C	genomisch
AGGATAATCACCCTTCTTACCGTC	OH-RT-F	60°C	cDNA
CTTGATTATATGGAAGCCCCATTG	P3-F	60°C	genomisch
GCCAGGCCTGAGGCGGACAGAC	3-UTR-F	60°C	genomisch
CACTGACATAGCTTCAAGGAAGCC	3-UTR-R	60°C	genomisch

Anhang 4

Basensequenz des *Akt1* Gens im Ratteninzuchtstamm BDIX auf genomischer Ebene (gekürzt)

```
TCCCTGGGTT  ACCCCGGTGT  GTGGGGGCCA  CGGATACCAT  GAACGACGTA  GCCATTGTGA
AGGAGGGCTG  GCTGCACAAA  CGAGgtcagt  ctgtgctctg  caggaggagc  ggagctgggc
ctgggtctgc  ccagctttta  aatgtggacc  cagggggtgg  gggtggggtg  gagggtgtgt
actggcccag  caggcagtgt  tgtagccctg---------------//------------------
----------------------------------//--------------------------------
tgtacaggca  gagccctgga  tgatgctcct  agttgtgccc  agtgccttct  gggaaggtgg
aagcatccca  ggtcccttcc  ccacctcaca  cagtacagtg  tgcctgggtc  ctcacggtag
agttcacacg  cagctcctca  tgtctctcac  gccctgcagG  GGAATATATT  AAAACCTGGC
GGCCACGCTA  CTTCCTCCTC  AAGAATGATG  GCACCTTTAT  TGGCTACAAG  GAACGGCCTC
AGGATGTGGA  GCAGCGCGAG  TCCCCACTCA  ACAACTTCTC  AGTGGCACgt  aagtgtctta
gccatgtggg  ctggatgggg  tggctaagca  ggccagcagg  gaggctgaaa  ccgcccactg
agaaactacg  gagagcctcc  tcttggtcct  aagatgctgg  gcagtgctgg  ccctgagtca
cctcccctag  gactggtgag  tgaccagctc  tggcagggcc  aggggtccgg  catgtaatga
ctggacctga--------------------------//--------------------------------
----------------------------------//--------------------------------
tctttttttc  ggagctgggg  actgaaccca  gggccttgcg  cttgctaggc  aagtgctcta
ccactgagct  aaatccccag  ccctgcaaat  acatttttta  aagtgaggat  gggaggcacc
ttcctggggc  aggattgagg  tctgggggat  atggtctgtc  tggtaaggac  tgtaaggaga
gtttcacgga  ggatcagatg  tatgcagata  gatgcttccc  tgacttcttc  ttcagAATGT
CAGCTGATGA  AGACAGAGCG  GCCGAGGCCC  AACACCTTCA  TCATCCGCTG  CCTGCAGTGG
ACCACGGTCA  TTGAGCGCAC  CTTCCATGTG  GAAACGCCTG  AGGAGCGgtg  agtgggcagg
gtgcagagag  gctgtcagga  gcagtgggct  atgccccctg  ctcagggcca  tgtttgcaag
cctctgctga  gtccattctg  gaggactaga  ctggaggact  cgtggggtga  gtggggcatg
gcgtgtccca  ggtaccttga  ggtttctgat  tattttgaat  gtggagacca  ggttctgggt
ggttacctgc  agcgtcagga  ccaggcagcc  agacaactgg  agggtgaagg  ccatggcaca
gctcctaagg  cctcacttga  ccccctgcag  GGAAGAGTGG  ACCACCGCCA  TTCAGACTGT
GGCTGATGGA  CTCAAACGGC  AGGAGGAGGA  GACGATGGAC  TTCCGGTCAG  GTTCACCCAG
TGACAACTCA  GGTGCTGAGG  AGATGGAGGT  GGCCCTGGCC  AAGCCCAAGC  ACCGTGTGgt
gagtctggcc  tccgcttctg  ctgggctacc  agggctgtgg  agggccccgg  caggtcccgg
tgttcctgcc  tggcttcctg  tgtgggtctg  ggacccctgg  ctcctcttga  cctgactgag
ttggcagagt  acttgtctag  catgcacgag  agcccagtac  ttaaggaaag  caaagtgaag
gtgtccaccg  actcccaagg  cccggtgctc  tcactgaccc  acaggccagc  agatgtgaga
gcgggcgtgg  cttgtgtcta  gctcttactg  ttggctaact  gggaggagcc  ttgttcactc
tggacactat  caagccgaag  gtggtggtgt  aggtgtttat  tgccataggc  tagttgtggt
gagcaagggc  tctccctaac  tgggctctct  ctgctaccca  caGACCATGA  ACGAGTTTGA
GTACCTGAAG  CTACTGGGCA  AGGGCACCTT  TGGGAAGGTG  ATCCTGGTGA  AGGAGAAGGC
CACAGGTCGC  TACTATGCCA  TGAAGATCCT  CAAGAAGGAG  GTCATCGTTG  CCAAGgtgca
gggggtgcag  ggttggaggg  agggtgaagg  aacgggatac  gtgggggaca  agtgctcatg
gcttctgcat  tccagGATGA  GGTTGCCCAC  ACGCTTACTG  AGAACCGTGT  CCTGCAGAAC
TCTAGGCATC  CCTTCCTTAC  Agtaagtagt  gactatcagt  ctgacccctg  tgggataggg
acgagtgtgt  ctctcccaca  gcctgcctct  gcacccacac  agacgggctt  catggactga
taggggtggt  ggggctggga  tgccggagtg  ggctggaagc  ccacccaccg  ctgtggggca
caggagggag  gcgtgagtct  ggtcttctca  ctctgctgag  gccttgagtt  gccccactct
ccgtgccctc  agtcctcaga  cccgtcttct  aggcagaccc  ctcaggtttc  ttgtgagtgc
agctcagtga  cagcagctgg  tgagttccag  ggccagcggt  ttgggcttat  tgcctttagg
cagggccgcc  tgaggtccag  gccagcctta  gctaaggtga  tacctatctc  aagacactaa
aatgtgccct  ggtacatctt  ggggtggctg  ggggcagtgc  cagtgtgcta  cttcctcagt
gcttacctag  gcttgccctg  cttccatttc  agGCCCTCAA  GTACTCATTC  CAGACCCACG
ACCGCCTCTG  CTTTGTCATG  GAGTACGCCA  ATGGGGGCga  ggtagggccg  taggtggctt
cagacctggg  catttcgtgg  gtgagcttgt  ccttctgaga  gccttgggcg  cctctctgta
gtacaggtca  cggtgctgcc  aagcctggcc  atgtgagcct  gtacctgctt  gtttggggat
gtcttactac  tgctgagtcg  gagtctcctg  ggctcttgtt  ctccttgggg  gctagtccct
aaccttccct  ctgcctcatg  ggtcacggtg  gggccctcac  gcaggccctc  actcagctct
ccaccccacA  GCTCTTCTTC  CACCTGTCTC  GTGAGCGCGT  GTTTTCAGAG  GACCGGGCCC
```

```
GCTTCTACGG  TGCGGAGATT  GTGTCCGCCC  TGGACTACTT  GCACTCCGAG  AAGAACGTGG
TGTACCGGGA  CCTCAAGgtg  tgttcatgca  ctaggggagg  tgggactggg  ggtctatcca
cactaactgt  ggcttcccac  acagCTGGAG  AACCTCATGC  TGGACAAGGA  CGGGCACATC
AAGATAACGG  ACTTCGGGCT  GTGCAAGGAG  GGTATCAAGG  ACGGTGCCAC  CATGAAGACG
TTCTGCGGGA  CACCCGAGTA  CCTGGCCCCT  GAGgtgctct  gctacttctt  gtgtgtcccc
cacaccctcc  catgccccgg  acacatgttg  atggagtccc  ccatctaGGT  GCTGGAGGAC
AACGACTATG  GCCGTGCAGT  GGACTGGTGG  GGGCTGGGCG  TGGTCATGTA  CGAGATGATG
TGCGGCCGCC  TGCCCTTCTA  CAACCAGGAC  CATGAGAAGC  TGTTCGAGCT  CATCCTAATG
GAGGAGATCC  GCTTCCCACG  CACACTCGGG  CCGGAGGCCA  AGTCCCTGCT  CTCGGGGCTG
CTCAAGAAGG  ACCCTACACA  GAGgtacggg  ccacagggct  tcaggctcag  cctctggaca
gtactgctgc  ccacggcacc  caccagtctc  agtcacatgt  caccttcatg  aagtgtctga
gccctgactg  acatgtctcc  tacccacagG  CTCGGTGGGG  GCTCCGAGGA  CGCCAAGGAG
ATCATGCAGC  ACCGCTTCTT  TGCCAACATC  GTGTGGCAAG  ATGTGTATGA  GAAGAAGgtg
tgcatccggc  caccgtgccc  agctctggat  ctcgtgtgtg  tgtgtgtgtg  tgtgtgtgtg
tgtgtgtgtg  tgtgtgtgtg  tgtgtgtgcg  cgcgcgcgcg--------//--------------
----------------------------------//--------------------------------
caaggaaaac  aactagagaa  aaaggactgc  tcccagcctg  gacatgggca  gtcgctaccc
tgtcactttg  ggcgtctctg  ggctcgctcc  cccctgccta  catgccttac  ccagttccac
ctagagctgt  gccttagtgc  taatcccacc  cctcaggagg  tcagggatgc  ctggagagaa
gctggaacac  agtaataacc  actccttctg  tcactcctca  gCTGAGCCCA  CCTTTCAAGC
CCCAGGTCAC  CTCTGAGACC  GACACCAGGT  ATTTTGATGA  GGAGTTCACA  GCTCAGATGA
TCACCATCAC  GCCGCCTGAT  CAAGgtgaga  ccaccctgct  ctaaggtgcc  tcagtatgaa
gccttttctt  tttttttttt  tttctttttt  ttctttttc  tttttttttt  ttcggagctg
gggagcttgc  tctaccactg  agctaaatcc  ccaaccctga  agccttttct  tttttgaact
ggagttacat  gagctgccat  gtagggactg  gaactgaacc  tgggtcctct  accagtgcgt
taaccactaa  gccatctctc  cagcctcaac  ctcacactga  ttaaaaaaca  ataacaaacc
cttttggagg  gtggtagcaa  ccaggcgggg  agggagtgtt  ctgagggcca  gagtcactgg
ccactcgcag  ggcctccttg  tatcctatcc  tccatggtgt  caggtcaggt  gggcagtggg
agggctcttt  ctagagactg  ggtctgagcc  ctcttgtggc  ccacagATGA  CAGCATGGAG
TGTGTGGACA  GTGAACGGAG  GCCGCACTTT  CCCCAGTTCT  CCTACTCAGC  CAGTGGCACA
GCCTGAGGCC  TGGGGTGGTG  GCTGGCAGCC  CTGCACCCCT  CTGCATTGCC  GAGTCCAGAA
GCCCCGCATG  GATCATCTGT  ACCTGATGGT  TTTGTTTCTC  GGATGTGCTG  GGGAGGAACC
TCGCCAGcct
```

Erläuterungen:

Die Primersequenzen sind unterstrichen. Die Basensequenz eines Exons ist in Großbuchstaben dargestellt. Der Nukleotidpolymorphismus zwischen BDIV und BDIX ist rot hinterlegt.

Anhang 5

Basensequenz des *Tgf beta* Gens im Ratteninzuchtstamm BDIV auf genomischer Ebene

```
tgccaggatc  gcggccgagc  ccggttccac  cctggggcct  ggagagagtg  gccggaccgc
ccggcccttc  tcccctagcg  aacctagcct  gtgtcccctg  tccgaccggg  ggcgatccgg
gacgcggggg  aggcgagagc  gcgaggcggg  gagcgtggac  tgacagctgg  ccccggcgca
gaggggccgg  ggtagcagga  gggagggggc  tcgggagtaa  ctttccagaa  aaacagccaa
cgtgtagcag  gaatgactcc  aagaggaggg  gaaaaaaaag  ttcagttacc  acgtcgaacc
agaggactca  caaagtattt  ttcaaatggg  ctcggctttt  cctgtgcctg  tttaaaacat
taaaaccgtg  cagcgagaga  ggctgtgtgc  gctggtccct  ccctccctcc  cccaccccag
gccgatacgt  catgggaggg  aggtataaaa  tttcagcaga  gagaaataga  gaaagcagtg
tgtgtgcatg  tgtgtgtgtg  agagagagag  agggagagag  aggagaggga  gaaggggaga
gagaaaggga  gggaagaaga  gggccgagtg  taggggggctg  agccacagag  aggcgagacg
cgcacgggaa  gggccttgcg  gaggaagaaa  taacgctttc  cggagtcagc  tgcggtgaat
cggcttctat  tttctttttc  ttttgatttt  tttttaatt  cctaaagaga  agcaagggac
agaagccatg  gccgagagag  aagataagct  gagatgctgg  tgaccctggg  tccaagtgga
ttatcggagc  tgtctccaag  aggcctgccc  tcccagtttg  ccagttgtat  ataatccctc
atcccagcca  atgaagagga  gaggcagcgc  gaacagagtc  atttagaaag  cccccgagga
agtgtaaaca  aaagggaaag  catgaatgga  gtgctcccga  gacaagtgtg  tcccgcactg
cccccacctt  tagctgggcc  tgccgttgcc  cagcgctgcc  tctccccaca  tacccactgg
tgatttttt   taaacatttt
```

Erläuterungen:

Die Primersequenzen sind unterstrichen. Der Nukleotidpolymorphismus zwischen BDIV und BDIX ist rot hinterlegt.

Anhang 6

Basensequenz des "*Estrogen receptor beta*" Gens im Ratteninzuchtstamm BDIV auf cDNA-Ebene (ohne alternatives Exon 5)

```
GGGGGAGCTG  GCCCAGGGGG  AGCGGCTGGT  GCTGCCACTG  GCATCCCTAG  GCACCCAGGT
CTGCAATAAA  GTCTGGCAGC  CACTGCATGG  CTGAGCGACA  ACCAGTGGCT  GGGAGTCCGG
CTCTGTGGCT  GAGGAAAGCA  CCTGTCTGCA  TTTAGAGAAT  GCAAAATAGA  GAATGTTTAC
CTGCCAGTCA  TTACATCTGA  GTCCCATGAG  TCTCTGAGAA  CATAATGTCC  ATCTGTACCT
CTTCTCACAA  GGAGTTTTCT  CAGCTGCGAC  CCTCTGAAGA  CATGGAGATC  AAAAACTCAC
CGTCGAGCCT  TAGTTCCCCT  GCTTCCTATA  ACTGTAGCCA  GTCCATCCTA  CCCCTGGAGC
ACGGCCCCAT  CTACATCCCT  TCCTCCTACG  TAGACAACCG  CCATGAGTAT  TCAGCTATGA
CATTCTACAG  TCCTGCTGTG  ATGAACTACA  GTGTTCCCGG  CAGCACCAGT  AACCTGGACG
GTGGGCCTGT  CCGAATGAGC  ACAAGCCCAA  ATGTGCTATG  GCCAACTTCT  GGGCACCTGT
CTCCTTTAGC  GACCCATTGC  CAATCATCGC  TCCTCTATGC  AGAACCTCAA  AAGAGTCCTT
GGTGTGAAGC  AAGATCACTA  GAGCACACCT  TACCTGTAAA  CAGAGAGACA  CTGAAGAGGA
AGCTTAGTGG  GAGCAGTTGT  GCCAGCCCTG  TTACTAGTCC  AAACGCAAAG  AGGGATGCTC
ACTTCTGCGC  CGTCTGCAGC  GATTATGCAT  CTGGGTATCA  TTACGGCGTT  TGGTCATGTG
AAGGATGTAA  GGCCTTTTTT  AAAAGAAGCA  TTCAAGGACA  TAATGATTAT  ATCTGTCCAG
CCACGAATCA  GTGTACCATA  GACAAGAACC  GGCGTAAAAG  CTGCCAGGCC  TGCCGACTTC
GCAAGTGTTA  TGAAGTAGGA  ATGGTCAAGT  GTGGATCCAG  GAGAGAACGG  TGTGGGTACC
GTATAGTGCG  GAGGCAGAGA  AGTTCTAGCG  AGCAGGTACA  CTGCCTGAGC  AAAGCCAAGA
GAAACGGTGG  GCATGCACCC  CGGGTGAAGG  AGCTACTGCT  GAGCACCTTG  AGTCCAGAGC
AACTGGTGCT  CACCCTCCTG  GAAGCTGAAC  CACCCAATGT  GCTGGTGAGC  CGTCCCAGCA
TGCCCTTCAC  CGAGGCCTCC  ATGATGATGT  CCCTCACTAA  GCTGGCGGAC  AAGGAACTGG
TGCACATGAT  TGGCTGGGCC  AAGAAAATCC  CTGGCTTTGT  GGAGCTCAGC  CTGTTGGACC
AAGTCCGGCT  CTTAGAAAGC  TGCTGGATGG  AGGTGCTAAT  GGTGGGACTG  ATGTGGCGCT
CCATCGACCA  CCCCGGCAAG  CTCATTTTCG  CTCCCGACCT  CGTTCTGGAC  AGGGATGAGG
GGAAGTGCGT  AGAAGGGATT  CTGGAAATCT  TTGACATGCT  CCTGGCGACG  ACGTCAAGGT
TCCGTGAGTT  AAAACTCCAG  CACAAGGAGT  ATCTCTGTGT  GAAGGCCATG  ATCCTCCTCA
ACTCCAGTAT  GTACCCCTTG  GCTTCTGCAA  ACCAGGAGGC  AGAAAGTAGC  CGGAAGCTGA
CACACCTACT  GAACGCGGTG  ACAGATGCCC  TGGTCTGGGT  GATTGCGAAG  AGTGGTATCT
CCTCCCAGCA  GCAGTCAGTC  CGACTGGCCA  ACCTCCTGAT  GCTTCTTTCT  CACGTCAGGC
ACATCAGTAA  CAAGGGCATG  GAACATCTGC  TCAGCATGAA  GTGCAAAAAT  GTGGTCCCGG
TGTATGACCT  GCTGCTGGAG  ATGCTGAATG  CTCACACGCT  TCGAGGGTAC  AAGTCCTCAA
TCTCGGGGTC  TGAGTGCAGC  TCAACAGAGG  ACAGTAAGAA  CAAAGAGAGC  TCCCAGAACC
TACAGTCTCA  GTGATGGCCA  GGCCTGAGGC  GGACAGACTA  CAGAGATGGT  CAAAAGTGGA
ACATGTACCC  TAGCATCTGG  GGGTTCCTCT  TAGGGCTGCC  TTGGTTACGC  ACCCCTTACC
CACACTGCAC  TTCCCAGGAG  TCAGGGTGGT  TGTGTGGCGG  TGTTCCTCAT  ACCAGGATGT
ACCACCGAAT  GCCAAGTTCT  AACTTGTATA  GCCTTGAAGG  CTCTCGGTGT  ACTTACTTTC
TGTCTCCTTG  CCCACTTGGA  AACATCTGAA  AGGTTCTGGA  ACTAAAGGTC  AAAGTCTGAT
TTGGAAGGAT  TGTCCTTAGT  CAGGAAAAGG  AATATGGCAT  GTGACACAGC  TATAAGAAAT
GGACTGTAGG  ACTGTGTGGC  CATAAAATCA  ACCTTTGGAT  GGCGTCTTCT  AGACCACTTG
ATTGTAGGAT  TGAAAACCAC  ATTGACAATC  AGCTCATTTC  GCATTCCTGC  CTCACGGGTC
TGTGAGGACT  CATTAATGTC  ATGGGTTATT  CTATCAAAGA  CCAGAAAGAT  AGTGCAAGCT
TAGATGTACC  TTGTTCCTCC  TCCCAGACCC  TTGGGTTACA  TCCTTAGAGC  CTGCTTATTT
GGTCTGTCTG  AATGTGGTCA  TTGTCATGGG  TTAAGATTTA  AATCTCTTTG  TAATATTGGC
TTCCTTGAAG  CTATGTCATC  TTTCTCTCTC  TCCCG
```

Erläuterungen:

Die Primersequenzen sind unterstrichen. Die Basensequenz der kodierenden Exons, des 5´-untranslatierten Bereichs (5'UTR) und des 3'-untranslatierten Bereichs (3'UTR) sind in Großbuchstaben dargestellt. Das Start- und Stop-Codon ist grau hinterlegt. Nukleotidpolymorphismen zwischen BDIV und BDIX sind rot hinterlegt.

Anhang 7

Basensequenzen der 3 Promotoren des "*Estrogen receptor beta*" Gens im Ratteninzuchtstamm BDIV auf genomischer Ebene

BDIV: genomische Sequenz des ON Promotor

```
gggatctgat  ttcattactc  cgttattact  gcttatttcg  gtgctattac  cagaacccgg
ggcctggccc  atgcttctta  aggagagttg  tcagacctaa  gcatttaatg  acacgcgcgt
gggtcaaagt  atggaaacaa  gatgaagtgt  ggtccctgga  cgcacgcagt  caagtccaga
attcctgggg  atctggtcag  aaattcccat  tcccgggctc  catctcggtt  ctccatcgtc
agtctcttgg  aagggggtg   tccctagtgg  atgactgtga  agaggctgga  ggtcgacatc
cagtggatcc  ggttgcgcgg  cgcgggagtg  cctgaaatct  ccggctccgg  gtttgtggtc
acgtgaactt  tttagctacc  ctcccacact  cttttctagg  tctttaaaag  acgcactaac
atccgttagt  cgtgggtaat  ctttgcagct  tctccagctg  ctggcctttt  tgaaacgcac
tctcaggtcc  ctgccttcag  cgaggcttct  agaatcagcc  acctcttgaa  acttcttggt
GGGGAGCTGG  CCCAGGGGGA  GCGGCTGGTG  CTGCCACTGG  CATCCCTAGG  CACCCAGGTC
TGCAATAAAG  TCTGGCAGCC  ACTGCATGGC  TGAGCGACAA  CCAGTGGCTG  GGAGTCCGGC
TCTGTGGCTG  AGGAAAGCAC  CTGTCTGCAT  TTAGAGAATG  CAAAATAGAG  AATGTTTACC
TGCCAGgtaa  gtgtcccttt  gctcattgtg  aggcttaatt  gaatttgtgg  gaggccagca
```

Erläuterungen:

Die Primersequenzen für die Primer ON-PRO-F und ON-PRO-R sind unterstrichen. Der Nukleotidpolymorphismus zwischen BDIV und BDIX ist rot hinterlegt. Die Basensequenz des 5'-untranslatierten Bereichs ist in Großbuchstaben dargestellt. Die Lage des Primers F1 (ESR2-F1), der für die kompetitive PCR zur Bestimmung der Promotoraktivität verwendet wurde, ist grau hinterlegt

BDIV: genomische Sequenz des OH Promotor

```
ttctccacta  gcacactcct  ctgttagcaa  catgtgagcg  caaatctttt  gaagcaggca
gaacatcttc  agagaagagg  gcagggcggg  acagtggcga  atctgctttt  gtgcttcctt
acagaaagta  tatctgttat  aaacaggatt  ctttacgttc  tccactgtcg  cccacgtcat
gcaccaagtt  aatctagtta  gtcatcatga  gcaccggctg  atagacaaaa  tatcctttca
ttacaaagtg  gtgcatgttc  tgggaatgca  gctccgtgac  agagcaggtg  cacaagatcg
tcaagcccca  gcctcactcc  ttagcaccaa  aaaccagcag  caaaagcaag  ctattgagcc
ggtgctgctc  atcatacgta  acacaactga  cttttaataa  ttcagtgctt  tgctcctgaa
ggtttactag  taaggacttc  aggctctgtt  atggggtact  tagggtagcg  gagacctttt
cctgtcacac  cacgtgatcg  ctttgctagg  tgccttggtg  atgagacaga  gacaagcttg
tgaccctgct  aagcatcgct  gttaccacgg  gttccagggt  gccttttggt  ccaaccattg
gcatccactg  tctcatgagt  ccctttggct  tttttttttt  tttttttttt  ttGGTCATGG
CTCAGGTGGA  CTGGAGGATA  ATCACCCTTC  TTACCGTCAT  TTAAGCAGAC  AAAGAACCCA
TTATCCTTCC  TGACGGACAG  Ggtgagtcag  aggcaatttc  cttttctctg  ttgattctct
```

Erläuterungen:

Die Primersequenzen für die Primer OH-PRO-F und OH-PRO-R sind unterstrichen. Der Nukleotidpolymorphismus zwischen BDIV und BDIX ist rot hinterlegt. Die Basensequenz des 5'-untranslatierten Bereichs ist in Großbuchstaben dargestellt. Der Beginn der 5'UTR variiert und ist durch ~~~~~~~~ gekennzeichnet. Die Lage des Primers OH-RT-F, der für die kompetitive PCR zur Bestimmung der Promotoraktivität verwendet wurde, ist grau hinterlegt.

BDIV: genomische Sequenz des Promotors P3

```
ttactaggat attcattgct acctatgagg tcagagtcca gggtcagtcc atgtatagtc
tttaggtagt ggCTTAGTCC CTGGAAGCTC TGTCCTTGTT TCTTTCTTTA CCGAGACTCC
ATCTCACTCC AAGCAGGCCT GGAACCAGAA ACCCCTCTGC CTCAGCCTCC TTGATTATAT
GGAAGCCCCA TTGCCCCTAG CTAAAATGAA TATGTCTTAG TCACTCTGGC AGCTTGAACT
AACCAGACAT CGTTTGCTTT CCTCTGCAGT CATTACATCT GAGTCCCATG AGTCTCTGAG
AACATAATGT CCATCTGTAC CTCTTCTCAC AAGGAGTTTT CTCAGCTGCG ACCCTCTGAA
GACATGGAGA TCAAAAACTC ACCGTCGAGC CTTAGTTCCC CTGCTTCCTA TAACTGTAGC
```

Erläuterungen:

Die Primersequenz des Primers P3-F ist unterstrichen. Die Basensequenz des 5'UTR und des sich daran unmittelbar anschließenden ersten kodierenden Exons ist in Großbuchstaben dargestellt.

Anhang 8

Basensequenzen des Zusatzexons 5 mit flankierenden Intronsequenzen des "*Estrogen receptor beta*" Gens im Ratteninzuchtstamm BDIV auf genomischer Ebene

```
aaagacggca  cagagcagga  actagacgtg  gatttagctg  gaatgtttat  agaagataca
ctggaatatc  caacaacagc  caagctttgc  tgtaggaaaa  ccagaaaact  tttggcggac
ctttgagtgg  ttcagaaact  gtccctggaa  aaagccccag  tgttaagtgt  tcagcacgtg
agagtgtgca  gagagcagga  ggaagcctgg  tgctatgaac  ctaacgtgcc  cgccccaact
cttgcatcgt  aaccctgtta  CCACTTCAGG  TCCTCAGAAG  ACCCTCACTG  GCACGTTGCG
CAGATGAAGA  GTGCTGCCCC  AAGgtatcag  cgtccattct  gcctgttgtt  atggatggca
ctgacaaaga  gcccactgtt  ctgagtaatg  gaggtgtttt  ggtggagcac  acaccctgtg
ggaagagcgg  aagcatggga  tgtggcttga  gcaggagcaa  gcccaggtgg  tgtggacaag
agagggaggc  tctggaaggc  cagagcagtg  gggcgggtac  cagacccttc  agtgaccctt
ggaatagcta  acttattggc  tggtatgtgc  caggcaccgt  cctcagcact  cgatgcacgt
cactgttctc  agtctcccca  gaagcccttt  tggaggagac  agcgttcaac  atcccagttc
```

Erläuterungen:

Die Primersequenzen sind unterstrichen. Der Nukleotidpolymorphismus zwischen BDIV und BDIX ist rot hinterlegt. Die Basensequenz des alternativen Exon 5 ist in Großbuchstaben dargestellt.

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich meiner Doktormutter und Erstgutachterin, Frau PD Dr. med. Andrea Kindler-Röhrborn dafür aussprechen, dass sie mich während des Promotionsprojektes in vorbildlicher Weise gefördert hat und immer gesprächsbereit war. Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. nat. Bernd Kölsch für die engagierte Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn Prof. Dr. rer. nat. Helmut Esche und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Herbert De Groot für die zügige Erstellung der Gutachten.

Ferner möchte ich all denen danken, die mich bei den Laborarbeiten begleitet, mich tatkräftig unterstützt und mir freundschaftlich zur Seite gestanden haben. Allen voran meinem Freund Dr. jur. Jan Reichert, meinen Kollegen Dr. med. vet. Judith Marx und Dipl. Biol. Markus Neibecker sowie unserer Mitarbeiterin Frau Ortrud Schmidt und auch Ulrike Milde.

Schließlich sei auch meiner Familie und meinem Freundeskreis für deren unterstützenden Zuspruch gedankt.