

**Untersuchungen zur Expression von
Glutaminsynthetase und Cytochrom P450 bei der
chemisch induzierten Hepatokarzinogenese
der Maus**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Sandra Schreiber
aus Fulda

Tübingen
2010

Tag der mündlichen Qualifikation:

13.01.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Schwarz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gerd Klein

Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich einigen Personen ganz herzlich danken.

Ich danke vor allem Herrn **Prof. M. Schwarz**, der mir sein Vertrauen und seinen ganzen Optimismus für die Durchführung dieser Arbeit geschenkt hat, für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie, für die Vergabe des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Durch seine intuitive und positive Einstellung ist es mir möglich gewesen, diese Arbeit durchzuführen und zum Abschluss zu bringen.

Ein großes Anliegen ist es mir, Herrn **Dr. A. Buchmann** und Herrn **Dr. C. Köhle** für ihr allzeit offenes Ohr, ihre kompetenten und konstruktiven Vorschläge und ihre über die ganze Zeit hilfreichen Worte von Herzen zu danken. Sie haben durch ihre aufbauende und tatkräftige Unterstützung die Arbeit zum Gelingen geführt.

Ich bedanke mich bei Herrn **Dr. T. Ott**, Leiter der Serviceeinrichtung Transgene Tiere, sowie bei Herrn **T. Hennek** für die Hilfe, Unterstützung und die Durchführung der Mikroinjektionen zur Generierung einer transgenen Maus.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau **J. Mahr** nicht nur für die große Unterstützung bei der Maus-Zucht und der Genotypisierung, sondern überhaupt für ihre fachliche wie auch moralische Unterstützung im Laboralltag bedanken. Ebenso herzlich danke ich Frau **E. Zabinsky**, Frau **S. Vetter** und Frau **B. Kaltschmitt**, die mir im Labor tatkräftig zur Seite standen.

Insgesamt ist es mir ein großes Bedürfnis dem gesamten Team der Abteilung Toxikologie, in dem eine Atmosphäre der produktiven Energie geherrscht und das einen großen Anteil zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat, meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Last, but not least, möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann **Thomas**, meinen Töchtern **Lea Noëlle** und **Alina Sarah**, meiner Mutter **Gerlinde** und ihrem Mann **Thomas** bedanken, die mich in allen Lebenslagen unterstützt, ermutigt und mit ihrem Rat stets auf meinem Weg weitergebracht haben und vor allem für alle Sorgen und Freuden immer ein offenes Ohr und eine offene Tür hatten.

Inhaltsverzeichnis

1	Verwendete Abkürzungen.....	8
2	Einleitung.....	12
2.1	Die Leber.....	12
2.2	Das Mehrstufenmodell der Kanzerogenese	13
2.3	Der Wnt-Signalweg und β-Catenin	16
2.3.1	Der Wnt-Signalweg.....	17
2.3.2	β -Catenin.....	20
2.3.3	β -Catenin-Zielgene.....	22
2.3.3.1	Die Glutaminsynthetase – ein β -Catenin-Zielgen.....	24
2.3.4	Mutationen des β -Catenin-Gens in Lebertumoren der Maus.....	25
2.4	Der Fremdstoffmetabolismus.....	27
2.4.1	Cytochrom P450.....	28
2.4.2	Induktion und Regulation von Cytochrom P450-Enzymen	30
2.5	Transgene Tiere.....	32
2.6	Fragestellung.....	36
3	Material und Methoden.....	37
3.1	Material.....	37
3.1.1	Reagenzien	37
3.1.2	Sonstiges Material.....	41
3.1.3	Lösungen und Medien.....	41
3.1.4	Zelllinien	47
3.1.5	Plasmide	48
3.1.6	PCR-, Sequenzier- und Genotypisierungs-Primer	52
3.1.7	Geräte	53
3.2	Methoden.....	54
3.2.1	Immunhistochemische Färbungen	54
3.2.1.1	Entparaffinieren von Paraffinschnitten	55

3.2.1.2	Detektion von Glutaminsynthetase	55
3.2.1.3	Detektion von Cytochrom P450	57
3.2.2	Zellkultur	59
3.2.2.1	Auftauen tiefgefrorener Zellen	60
3.2.2.2	Passagierung adhärenter Zellen	60
3.2.2.3	Medienwechsel	61
3.2.2.4	Einfrieren adhärenter Zellen	62
3.2.2.5	Zellzahlbestimmung	63
3.2.3	Transiente Transfektion adhärenter Zellen	64
3.2.4	Transiente Transfektion mit GenePorter [®] 2	64
3.2.5	Transfektionsschema	66
3.2.6	Reportergenanalysen	67
3.2.6.1	Dual-Luciferase Reporter [®] Assay	68
3.2.7	<i>Western-Blot</i>	70
3.2.7.1	Proteinisolierung aus Gewebe	70
3.2.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford	71
3.2.7.3	Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	73
3.2.7.4	Proteintransfer auf eine Polyvinylfluorid-Membran (PVDF-Membran)	76
3.2.7.5	Nachweisreaktion	78
3.2.7.6	Chemilumineszenz-Nachweis (Visualisierung)	78
3.2.8	Untersuchung der mRNA-Expression	80
3.2.8.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenen Lebern (Normalgewebe und Tumorgewebe) mit Trizol	80
3.2.8.2	RNA-Quantifizierung	81
3.2.8.3	Kontrolle der isolierten Gesamt-RNA mittels Agarose- Gelelektrophorese	81
3.2.9	Reverse Transkriptase-Reaktion	82
3.2.9.1	RT-Reaktion ohne vorherigen DNase-Verdau	82
3.2.9.2	RT-Reaktion mit vorherigem DNase-Verdau	83
3.2.10	Real-Time PCR (Lightcycler-Analyse)	84
3.2.11	Plasmidtransformation und -präparation	86
3.2.11.1	Plasmidvermehrung in transformationskompetenten E.coli DH5 α und One Shot [®] TOP10 Chemically Competent E. coli	86

3.2.11.2	Plasmidisolierung	87
3.2.11.3	DNA-Quantifizierung.....	88
3.2.11.4	Kontrolle des isolierten Plasmids mittels Agarose- Gelelektrophorese	89
3.2.12	PCR	89
3.2.13	Klonierung mit dem Gateway-System (Invitrogen).....	90
3.2.13.1	Gateway® Vector Conversion System.....	91
3.2.13.2	Amplifikation des Inserts Ctnnb1-S33Y per PCR	96
3.2.13.3	Klonierung des Inserts Ctnnb1-S33Y in den Entry-Vektor	98
3.2.13.4	Site-directed Mutagenesis	103
3.2.13.5	LR-Clonase-System und Rekombination.....	107
3.2.14	Generierung einer transgenen Maus.....	108
3.2.14.1	Mikroinjektion.....	110
3.2.14.2	Maus-Zucht und Genotypisierung.....	115
3.2.14.3	Organentnahme	118
4	Ergebnisse	120
4.1	Untersuchung der GS- und Cytochrom P450-Expression in Mausleberläsionen..	120
4.1.1	Immunhistochemie	120
4.1.2	Untersuchung der Cytochrom P450- und der GS-Expression mittels Western Blot.....	130
4.2	Untersuchung der mRNA-Expression der Glutaminsynthetase und der Cytochrom P450-Isoenzyme in Lebertumoren der Maus.....	134
4.3	Transiente Transfektion von Maushepatomzellen (Zelllinie 55.1c)	137
4.4	Generierung einer transgenen Maus	142
4.4.1	Klonierung des p β -Catenin ^{S33Y} /CALNL5 -Konstrukts für die Mikroinjektion mittels Gateway System (Invitrogen)	142
4.4.1.1	Gateway Vector Conversion System.....	142
4.4.1.2	Amplifikation des Inserts Ctnnb1-S33Y	144
4.4.1.3	Klonierung des p β -Catenin ^{S33Y} /D-TOPO®-Konstrukts.....	146
4.4.1.4	Site directed Mutagenesis.....	148
4.4.1.5	Rekombination mit Hilfe des LR-Clonase-Systems	151
4.5	Mikroinjektion.....	153
4.5.1	Maus-Zucht und Genotypisierung.....	156

4.5.2	Organentnahme	158
4.5.3	Immunhistochemische Untersuchung des Lebergewebes von Tg(albCre/ β Cat ^{S33Y}) Tieren.....	160
4.5.4	Untersuchung der mRNA-Expression in Lebergewebe von Tg(albCre/ β Cat ^{S33Y})-Tieren durch real-time PCR	162
4.5.5	Untersuchung der Protein-Expression in Lebergewebe von Tg(albCre/ β Cat ^{S33Y}) Tieren.....	164
5	Diskussion	167
5.1	Untersuchung der GS- und Cytochrom P450-Expression in Mausleberläsionen..	167
5.2	Generierung einer transgenen Maus	174
6	Zusammenfassung.....	182
7	Literatur.....	185
	Publikationen.....	197
	Akademische Lehrer	199
	Lebenslauf.....	201

1 **Verwendete Abkürzungen**

AhR	Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor (<i>aryl hydrocarbon receptor</i>)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin (D[-]- α -Aminobenzylpenicillin Natriumsalz)
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
arm-repeats	Armadillo-Repeats
Arnt	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
AS	Aminosäure(n)
BCA	Bicinchoninsäure (4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin)
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAR	konstitutiv aktiver Rezeptor (<i>constitutive active receptor</i>)
cDNA	komplementäre DNA
CK	Caseinkinase
CMV	Cytomegalievirus
CYP	Cytochrom P450
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat
DEN	N-Nitrosodiethylamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHC	<i>Direct hydrophilic conjugation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOPE	Dioleyl-Phosphatidylethanolamin
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleyl)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid
DRE	Dioxin-responsives Element (<i>dioxin response element</i>)
Dx	Dexamethason
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
β-Gal	β-Galactosidase
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	Glucocorticoid-responsives Element (<i>glucocorticoid response element</i>)
GS	Glutaminsynthetase
GSK3β	Glykogen-Synthase-Kinase 3β
h	Stunde(n)
HMG	<i>High mobility group</i>
hsp	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase(n)
LAR II	<i>Luciferase Assay Reagent II</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	<i>LDL receptor-related protein</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>

MDR	<i>Multidrug resistance protein</i>
min	Minute(n)
mRNA	Messenger-RNA
MRP	<i>Multidrug resistance protein</i>
NR1/2	PBREM-Bindungsmotive für nukleäre Rezeptoren
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-Sim
PB	Phenobarbital
PBREM	Phenobarbital-responsives Enhancer-Modul (<i>phenobarbital-responsive enhancer module</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PBS/S	supplementierte PBS
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PLB	Passiver Lysispuffer (<i>passive lysis buffer</i>)
PPARα	Peroxisomen-Proliferator-responsives Element (<i>peroxisome proliferator response element</i>)
P/S	Penicillin/Streptomycin
RA	Retinsäure
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RGS	<i>Regulator of G-protein signalling</i>
RLB	Reporter-Lysispuffer (<i>reporter lysis buffer</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)

rRNA	Ribosomale RNA
RSV	<i>Rous sarcoma virus</i>
RT	Raumtemperatur (20-25°C)
RT	Reverse Transkriptase
RXR	9cRA-Rezeptor (<i>retinoid X receptor</i>)
s	Sekunde(n)
S&G	Stop&Glo [®] -Reagens
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TCF	Trypsin-EDTA-Lösung
T/E-Puffer	Tris-HCl und EDTA-enthaltender Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
v/v	<i>Volume per volume</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>Weight per volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
XRE	<i>Xenobiotic-response element</i>

2 Einleitung

2.1 Die Leber

Die Leber (griech. Hepar, lat. iecur) ist das größte Stoffwechselorgan und die größte Drüse des Körpers. Zu ihren wichtigsten Aufgaben gehören die Produktion lebenswichtiger Proteine (z. B. Gerinnungsfaktoren), die Verwertung von Nahrungsbestandteilen (z. B. Speicherung von Glukose), die Galleproduktion und damit einhergehend der Abbau und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen. Nährstoffe, die aus dem Darm ins Blut aufgenommen werden, gelangen über die Pfortader (Vena portae) zur Leber und werden dann von dieser je nach Bedarf ans Blut abgegeben oder aus dem Blut entfernt.

Die Grundeinheit des Leberparenchyms besteht aus den um das periportale Feld gruppierten Leberzellbalken und wird als Leberläppchen bezeichnet (Abb. 2.1). Dieses ist ein im Anschnitt sechseckiges Gebilde, das vorwiegend aus Leberzellen (Hepatozyten) besteht. Die Hepatozyten haben meist mehrere Zellkerne und sind in Strängen angeordnet („Leberzellbalken“). An den Eckpunkten benachbarter Leberläppchen liegen die Periportalfelder. In diesen Periportalfeldern verläuft jeweils ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang. Dies bezeichnet man als Glisson-Trias (Glissonsches Dreieck, periportale Trias). Die Leber weist eine funktionelle Heterogenität von Leberzellbezirken auf. Die periportalen Bezirke zeichnen sich durch eine höhere Aktivität des Glykogenabbaus, der Gluconeogenese, der Fettsäureoxidation, der Harnstoffbildung aus Aminosäurestickstoff sowie Gallensäure- und Billirubinausscheidung aus. In der perivenösen Zone finden dagegen Glykogensynthese, Glykolyse, Lipogenese und die Harnstoffbildung aus Ammoniak statt. Auch die Biotransformation körpereigener und körperfremder Stoffe, die eine Rolle bei der

Krebsentstehung spielen kann, ist in diesem Teil der Leber angesiedelt (Cunningham *et al.*, 2003).

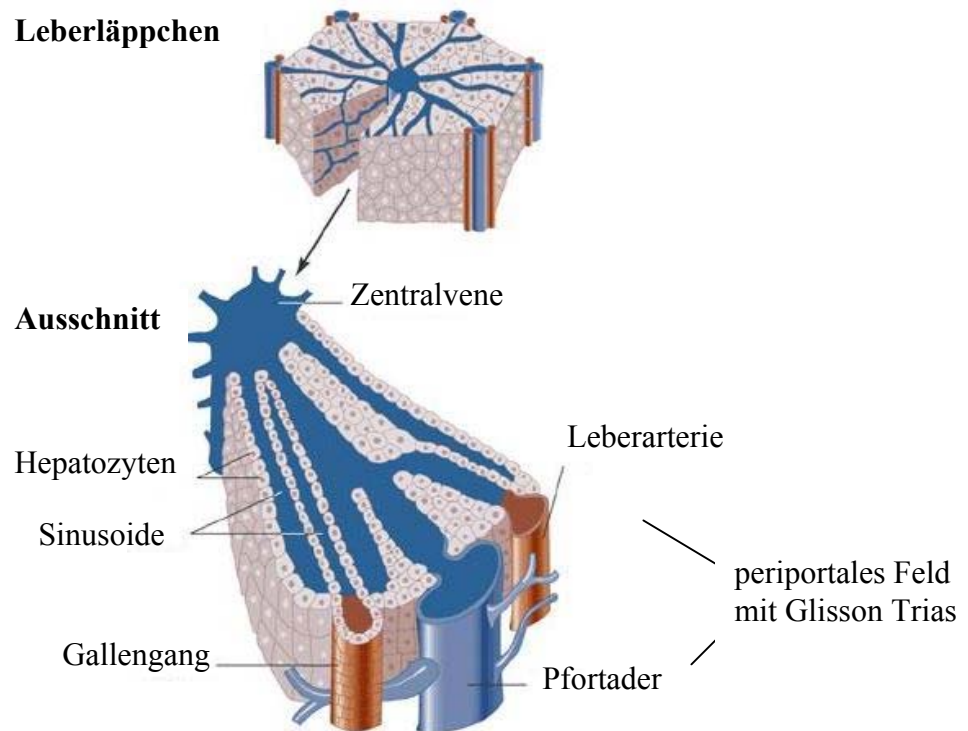


Abbildung 2.1: Aufbau des Leberläppchens (verändert nach Cunningham *et al.*, 2003).

2.2 Das Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

In den meisten Ländern ist Krebs heute nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Unter Krebs versteht man einen bösartigen Tumor (Geschwulst), dessen Wachstum autonom und überschießend ist und der gewisse pathologische Charakteristika aufweist. Hierzu gehören Zellatypien, invasives Wachstum und häufig Metastasierung. Eindeutiges Zeichen der Malignität ist die Bildung von Metastasen. Hierbei handelt es sich um vom Primärtumor getrennte Tochtergeschwulste (Marquardt und Schäfer, 1994). Im Gegensatz zum geordneten zellulären Wachstum im normalen

Organismus, das stets geregelt ist – wie z.B. die Regeneration der Leber oder die Kontaktinhibition des Wachstums isolierter Zellen in Kultur –, sind beim bösartigen Wachstum von Tumorzellen diese Wachstumskontrollen aufgehoben. Bei bösartigen Tumoren erfolgt das Wachstum invasiv und infiltrierend mit Destruktionen der Umgebung, während gutartige Tumoren aus sich heraus expansiv wachsen. Die Abstimmung von Wachstum, Teilung und Zerstörung ist bei Krebszellen im Zellverband außer Kraft gesetzt. Regulierende Signale werden nicht erkannt oder nicht ausgeführt, da meistens der dafür benötigte genetische Code defekt ist.

Die Kanzerogenese (Tumorentwicklung) ist ein komplexer Prozess, bei dem eine normale Zelle eines Organs in eine maligne Tumorzelle transformiert wird. In der Regel wandeln sich normale Körperzellen nie unmittelbar in maligne Zellen um. Sie entwickeln sich vielmehr in einem lang dauernden Prozess, der meist einen erheblichen Teil der Lebenszeit des Individuums ausmacht, schrittweise zu malignen Zellen. Obwohl die genaue Anzahl an Schritten, die zur Transformation einer normalen Körperzelle zu einer malignen Tumorzelle nötig sind, noch nicht genau bekannt ist, wird die Mehrstufen-Theorie der Krebsentwicklung vertreten (Abb. 2.2.), in der die Krebsentstehung in Initiation, Promotion und Progression untergliedert wird (Fearon und Vogelstein, 1990; Moolgavkar und Knudson, 1981; Moolgavkar, 1983).

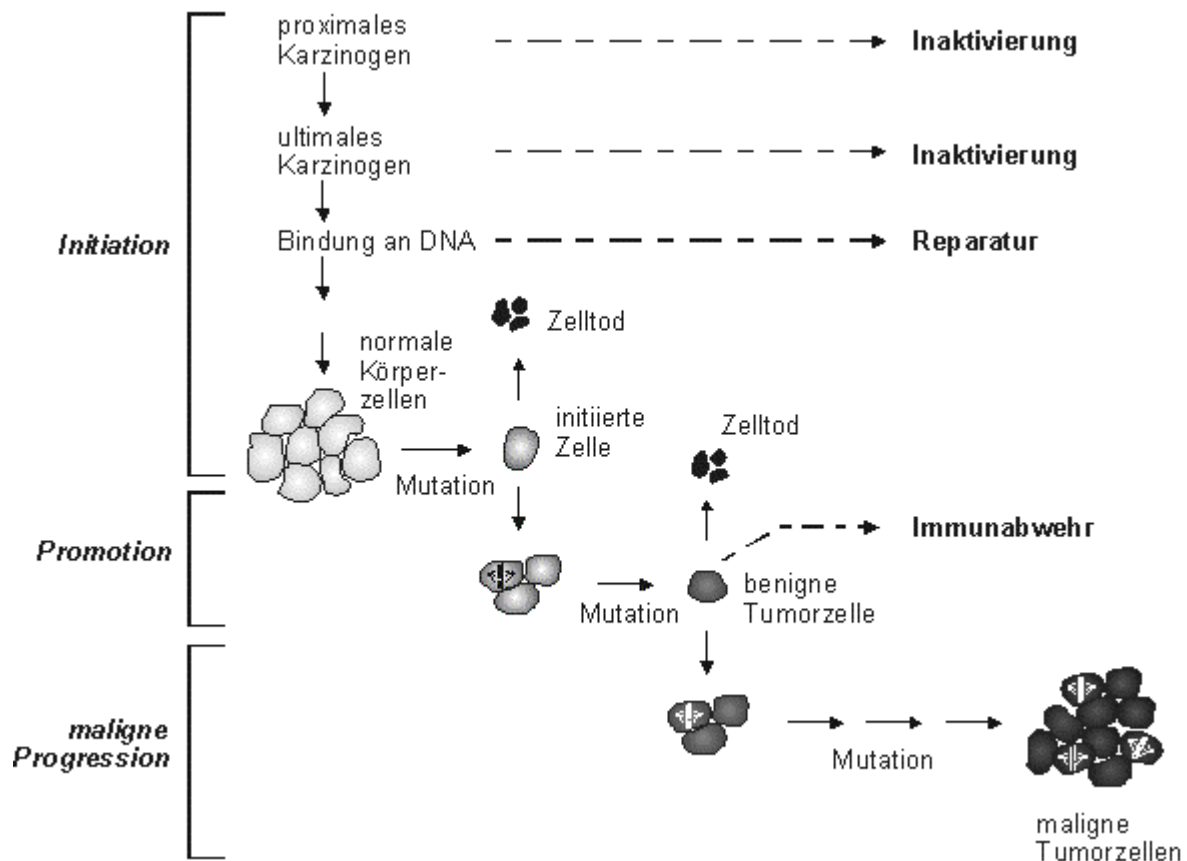


Abbildung 2.2: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese.

In der Initiation ist die bei einigen Karzinogenen notwendige metabolische Aktivierung der an sich unwirksamen Ausgangssubstanz (proximales Karzinogen) zum eigentlich wirksamen Agens (ultimales Karzinogen) aufgeführt. Neben der Apoptose (programmierter Zelltod) sind ferner die metabolische Inaktivierung, DNA-Reparatur und Immunabwehr als weitere Mechanismen zur Tumorabwehr integriert (nach Schwarz und Bock, 1998)

In der ersten Phase der Kanzerogenese, der Initiation, wird in einem Gen in einer Zelle durch ein Karzinogen eine Mutation ausgelöst. Wenn diese nicht durch DNA-Reparatur beseitigt oder die Zelle nicht durch Apoptose ausgeschaltet wird, manifestiert sich die Mutation und wird irreversibel. Wichtig hierbei ist, dass die Mutation in einem für die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellteilung zuständigen Gen, z.B. einem Tumorsuppressorgen, vorliegt. Veränderte Tumorsuppressorgene, die ihre Funktion nicht mehr ausführen können, werden als

Onkogene bezeichnet. Diese Gene fördern das Wachstum und die Proliferation der Zelle. Die Initiation wird als irreversibler Prozess angesehen, da die Einwirkung eines Promotors auch nach längerer Zeit noch die Tumorbildung fördert. Nur der Tumorinitiator wirkt mutagen. Ein Tumorpromotor dagegen wirkt proliferationsfördernd, ohne selbst Mutationen zu verursachen. Initiatoren, die auch ohne nachfolgende Gabe eines Promotors Tumoren erzeugen können, werden als komplette Kanzerogene bezeichnet. In der darauffolgenden Promotionsphase erfolgt die Beschleunigung der Tumorentstehung durch präferentielle Vermehrung initiiertes Zellen. Initiierte Zellen reagieren auf einen Tumorpromotor in deutlich stärkerem Maße mit Vermehrung als normale Zellen des gleichen Gewebes. Weitere Mutationen in Tumoren führen zu einer Zunahme der Wachstumsautonomie, des destruierenden Potentials und der Metastasierungsfähigkeit des Tumorgewebes. Dieses Stadium, in dem die Malignität des Tumors zunimmt, wird als Progression bezeichnet.

2.3 Der Wnt-Signalweg und β -Catenin

Wnt-Proteine – 19 Gene sind bisher in Mensch und Maus bekannt - sind Glykoproteine, die Zellwachstum, Beweglichkeit und Differenzierung während der Embryonalentwicklung regulieren (Lustig und Behrens, 2003) und können parakrin durch Aktivierung diverser Signalkaskaden innerhalb der Zielzellen über *frizzled*-Rezeptoren wirken (Cadigan and Nusse, 1997). Einige Komponenten des Wnt-Signalwegs spielen eine große Rolle bei der Tumorentstehung. Der Wnt-Signalweg ist somit einer der wichtigsten Signalwege, die bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen.

Man unterscheidet zwischen dem kanonischen und den nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen, wobei bei letzteren zwischen dem planaren Zellpolaritäts-Signalweg und dem Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg unterschieden wird. Der planare Zellpolaritäts-Signalweg reguliert die zytoskeletale Neuordnung, während der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg, der durch Wnt5a und Wnt11

aktiviert wird, unter anderem für einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Menge und eine Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver Signalkomponenten sorgt. Der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert Zielgene durch Stabilisierung von zytosolischem β -Catenin, das anschließend in den Zellkern transloziert und als Protoonkogen fungieren kann (Lustig und Behrens, 2003). Als Protoonkogene werden normale Gene der Zelle bezeichnet, die durch eine Mutation im Regulationsbereich zu Onkogenen mutieren können.

2.3.1 Der Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg kontrolliert das Zellverhalten durch Steuerung der transkriptionellen Eigenschaften DNA-bindender Proteine der T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor-1 (TCF/LEF-1)-Familie. Im Zentrum des Wnt-Signalwegs steht die Stabilisierung von β -Catenin, das Wnt-Zielgene durch Bindung an TCF/LEF-1-Proteine aktiviert, im Nukleus (Abb. 2.3.). Wenn kein Wnt-Signal vorliegt, assoziieren diese Proteine mit Corepressoren, um die Expression von Wnt-Zielgenen zu blockieren.

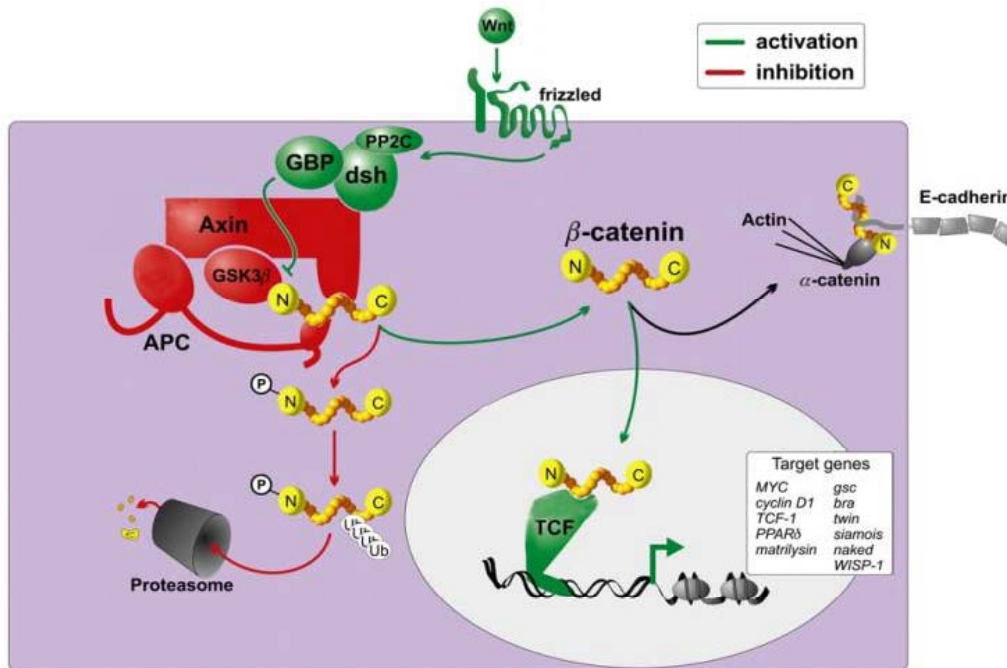


Abbildung 2.3: Wnt-Signalweg (modifiziert nach Huelsen und Behrens, 2002).

Ohne Wnt-Signal wird β -Catenin durch Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK3 β) phosphoryliert, anschließend ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Wenn allerdings Wnt-Proteine an den *frizzled* Rezeptor binden, kommt es zur Blockierung des β -Cateninabbaus. Das so stabilisierte β -Catenin kann dann in den Zellkern gelangen und dort mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren assoziieren, was zur vermehrten Transkription von Zielgenen, wie z.B. *c-myc*, führt.

Das erste Wnt-Protein, das in Säugetieren gefunden wurde, wurde ursprünglich als *Int-1* bezeichnet. „Wnt“ setzt sich zusammen aus *Wg* für *wingless* und *int-1*. Die Bezeichnung *wingless*-type stammt aus Beobachtungen mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, in der Mutationen im *wingless*-Gen zu einer flügellosen Variante der Fliegen führen. Das *int1*-Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn seine Expression durch die Integration des mouse mammary tumor Virus (MMTV) in der Nähe des *int1* (heute *Wnt-1*) aktiviert wird (Rijsewijk *et al.*, 1987).

Nicht alle bekannten Wnt-Proteine aktivieren den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Die am besten untersuchten Wnt-Proteine sind hierbei Wnt-1, Wnt-3a und Wnt-8. Es wird

vermutet, dass die Amino-terminale Region der Wnt-Proteine die Interaktion mit Wnt-Rezeptoren vermittelt, während der Carboxy-Terminus den jeweiligen Rezeptor aktiviert (Lustig und Behrens, 2003).

Wnt-Proteine binden an *frizzled*-Rezeptoren, die sieben Transmembran-Domänen aufweisen. Sie besitzen eine extrazelluläre, aminoternale cystein-reiche Domäne (CRD), die mit Wnt-Proteinen und anderen Wnt-Rezeptoren interagiert. Der intrazelluläre C-Terminus vermittelt die Bindung und Aktivierung von Dishevelled (Dsh) (Abb. 1.3). Bisher konnten zehn verschiedene *frizzled*-Rezeptoren beim Menschen nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass *frizzled*-Proteine heterotrimere G-Proteine nutzen, um Wnt Signale zu übertragen (Liu *et al.*, 2001; Malbon *et al.*, 2001).

LRP (LDL-receptor related Protein) 5 und 6 fungieren als Co-Rezeptoren der Wnt-Liganden, indem sie an diese binden und einen ternären Komplex mit Wnt und *frizzled* bilden. Diese Interaktion kann durch Dickkopf (Dkk) inhibiert werden (Lustig und Behrens, 2003). Bisher sind vier Isoformen des Dkk-Proteins bekannt. Dkk-3 beeinflusst den Wnt-Signalweg nicht, wohingegen Dkk-1 und Dkk-2 diesen in *Xenopus* inhibieren. In der Maus führt die Ablation des Dkk-1-Gens zu einem Fehlen der Kopfstrukturen, sowie zu Duplikationen und Fusionen von Gliedmaßen (Mukhopadhyay *et al.*, 2001).

Im klassischen kanonischen Wnt-Signalweg werden Zielgene durch Stabilisierung von zytosolischem β -Catenin, das daraufhin in den Zellkern translozieren kann, aktiviert. Normalerweise wird der β -Catenin-Gehalt in der Zelle negativ reguliert. Wenn kein Wnt-Signal vorliegt, werden APC und Axin durch Glykogensynthasekinase 3β (GSK3 β) phosphoryliert. Dadurch wird deren Bindungsaffinität zu β -Catenin erhöht, welches auch durch GSK3 β phosphoryliert wird (Lustig und Behrens, 2003).

β -Catenin wird durch Caseinkinase (CK) 1α und/oder 1ϵ an Serin 45 phosphoryliert. Dies führt dazu, dass GSK3 β die Serin/Threonin-Reste 33, 37 und 41 phosphorylieren kann. Die

Phosphorylierung der beiden erstgenannten Aminosäuren löst die Ubiquitinylierung des β -Catenins durch die Ubiquitinligase Beta-transducing repeat-containing protein (β -TrCP) aus. Im letzten Schritt wird β -Catenin dann im Proteasom abgebaut. Des Weiteren assoziieren TCF Proteine mit Corepressoren und verhindern dadurch die Expression von Wnt-Zielgenen (Lustig und Behrens, 2003).

Wird allerdings der *frizzled*-Rezeptor durch Wnt-Proteine aktiviert, führt dies zur Blockierung des β -Catenin-Abbaus durch das *dishevelled*-Protein. Dies führt zur Stabilisierung des zytosolischen β -Catenins, das in Folge dessen in den Zellkern transloziert und dort mit Transkriptionsfaktoren, wie TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*), die zu einer aus mindestens vier Mitgliedern bestehenden Familie gehören, interagiert (Behrens *et al.*, 1996). Dies führt zur Expression der entsprechenden Wnt-Zielgene. Weitere Gründe für die Stabilisierung des zytosolischen β -Catenins können Mutationen im APC- oder β -Catenin-Gen (*Ctmb1*) sein, wodurch keine Phosphorylierung und damit letztlich kein proteasomaler Abbau des β -Catenins erfolgen kann.

2.3.2 β -Catenin

β -Catenin spielt sowohl im Wnt-Signalweg, als auch bei der Kontrolle von Zell-Zell-Adhäsionen eine Rolle. Es wurde ursprünglich als Bindungspartner von E-Cadherin und α -Catenin identifiziert und ist indirekt an der Bindung von Cadherin-Zelladhäsionsmolekülen an das Actin-Zytoskelett beteiligt (McCrea *et al.*, 1991; Huelsken and Behrens, 2002; Weis and Nelson, 2006; Stepniak *et al.*, 2009). β -Catenin besitzt eine *core*-Domäne aus zwölf sogenannten *arm-repeats*, die zuerst im Drosophila-Homolog *armadillo* entdeckt wurden, sowie amino- und carboxy-terminal flankierende Domänen (Peifer *et al.*, 1994). Die *arm-repeat* Domänen binden an verschiedene Partner, wie z.B. Cadherine, TCFs, APC und

Axin/Conductin (Lustig *et al.*, 2003; von Kries *et al.*, 2000). Die amino-terminale Domäne enthält Serin- und Threonin-Reste, die für den Abbau von β -Catenin eine wichtige Rolle spielen.

Der β -Catenin-Gehalt der Zelle wird normalerweise negativ reguliert. In Abwesenheit eines Wnt-Signals kann β -Catenin sowohl durch die Caseinkinasen CK I α und I ϵ am Serin-Rest 45, als auch durch GSK3 β an den Serin/Threonin-Resten 33, 37 und 41 phosphoryliert werden. Im Anschluss daran erfolgt die Ubiquitinylierung des Proteins und schließlich der Abbau im Proteasom.

Durch Bindung von Wnt an den *frizzled*-Rezeptor und seinen Korezeptor LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) wird mit Hilfe des zytosolischen *dishevelled*-Proteins (Dvl) der *Destruction Complex* destabilisiert und inaktiviert, wodurch β -Catenin nicht mehr phosphoryliert wird. Eine Deregulation der β -Catenin-Stabilisierung kann des Weiteren auch durch Mutationen einer oder mehrerer Serin- und Threonin-Reste des β -Catenins hervorgerufen werden. Diese Mutationen wurden u.a. in einer Vielzahl humaner Tumoren gefunden (Polakis, 1999) und führen dazu, dass β -Catenin nicht mehr phosphoryliert und in Folge dessen nicht mehr abgebaut werden kann. Nicht phosphoryliertes β -Catenin transloziert in den Zellkern, wo es an Elemente der TCF/LEF-Familie bindet. Diese enthalten eine hochkonservierte *high mobility group* (HMG) Box, die aus ca. 80 Aminosäuren besteht und als Monomer an die DNA bindet. Neben der Vermittlung der DNA-Anlagerung induziert die HMG Box einen Knick in der DNA, so dass weitere Transkriptionsfaktoren gebunden werden können. β -Catenin bindet mittels seiner *armadillo repeats* an eine konservierte N-terminale Region in TCF (Behrens *et al.*, 1996; Molenaar *et al.*, 1996), wodurch ein Transkriptionsfaktor-Komplex entsteht. Nach der Bindung an DNA aktiviert β -Catenin die Transkription der Zielgene. TCF/LEF-Elemente können nur mit Hilfe von Co-Aktivatoren die Transkription von Zielgenen aktivieren.

Cttnb1-Mutationen wurden hauptsächlich in Codons detektiert, die für funktionell wichtige Reste codieren, die in den β -Catenin-Abbau involviert sind. Bei einem Großteil der Mutationen in *Cttnb1* handelt es sich um aktivierende Mutationen, die vorwiegend in Exon 3 in einer der vier Phosphorylierungsstellen auftreten (Polakis, 2000). Mit Hilfe des Cre-loxP-Systems konnte die Deletion von Exon 3, das die Phosphorylierungsstellen von β -Catenin enthält, erreicht werden. Dieses führte zu intestinaler Tumorigenese (Harada *et al.*, 1999).

Die ersten Tumoren, in denen eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin nachgewiesen werden konnte, waren kolorektale Tumoren (Inomata *et al.*, 1996). Des Weiteren wurden aktivierende Mutationen in *Cttnb1* häufig in Hepatoblastomen gefunden (bis zu 70%) (Taniguchi *et al.*, 2002). Dies ist eine Tumorart, die vor allem in früher Kindheit auftritt. Auch hepatozelluläre Karzinome (HCC) wiesen in geringerem Maße *Cttnb1*-Mutationen auf (ca. 25 %) (de La Coste *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001; Taniguchi *et al.*, 2002). Eine größere Zahl von *Cttnb1*-Mutationen konnte dagegen in HCC gefunden werden, die mit einer Hepatitis C-Virusinfektion einher gingen (Huang *et al.*, 1999).

2.3.3 β -Catenin-Zielgene

Viele β -Catenin-Zielgene spielen durch die Regulation von Zellproliferation und Tumorprogression eine Rolle in Entwicklung und Tumorigenese. Die meisten sind direkte Zielgene, deren Promotoren TCF-Bindungsstellen enthalten, d.h. die Expression dieser Gene wird durch TCF- β -Catenin-Komplexe hochreguliert.

Zu den ersten Zielgenen, die identifiziert werden konnten, gehören das Protoonkogen *c-myc*, das durch Bindung an den p21^{CIP}-Promotor einen Zellzyklusarrest aufheben kann (He *et al.*, 1998), und Cyclin D1, ein Aktivator Cyclin-abhängiger Kinasen (He *et al.*, 1998; Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu and McCormick, 1999). Auch der *vascular endothelial growth factor*

(VEGF), dessen Expression in kolorektalen Karzinomen auf Grund von TCF-Bindungsstellen im Promotor gesteigert werden kann, gehört zu den Zielgenen des Wnt-Signalwegs. Dies erfordert allerdings das gleichzeitige Auftreten von Mutationen im ras-Onkogen (Zhang *et al.*, 2001).

β -Catenin reguliert auch Gene, die in der Tumorinvasion und –metastasierung eine Rolle spielen. Ein solches Zielgen ist z.B. Matrilysin/MMP7 (Brabletz *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 2001). Die Matrix Metalloproteinase Matrilysin beeinflusst die Krebsentwicklung, da das Fehlen von Matrilysin in sogenannten Min (multiple intestinal neoplasia)-Mäusen zu einer Abnahme der Gesamtzahl und Größe von Tumoren führte (Crawford *et al.*, 1999).

Das *multi drug resistance* (mdr)-Gen weist ebenfalls TCF4-responsive Elemente in seinem Promotor auf. Es stellt somit ein weiteres β -Catenin-Zielgen dar (Yamada *et al.*, 2000). Auch der Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) und Cyclooxygenase 2 (COX-2) gehören zu den Zielgenen des Wnt-Signalwegs und sind von besonderem Interesse, da sie in der Entwicklung kolorektaler Karzinome eine Rolle spielen und durch chemopräventive, non-steroidale, anti-inflammatorische Medikamente, wie z.B. Sulindac und Acetylsalicylsäure, inhibiert werden können (Wang *et al.*, 2004). COX-2 wird über die Induktion von stabilisiertem β -Catenin durch Wnt-1 in Maus-Brust-Zelllinien hochreguliert (Howe *et al.*, 1999). Dabei scheint β -Catenin COX-2 indirekt durch Hochregulation von Transkriptionsfaktoren aus der PEA3-Familie (Polyomavirus enhancer activator 3), die zur Ets Transkriptionsfaktor-Familie gehört, zu stimulieren (Howe *et al.*, 1999).

Als weiteres β -Catenin-Zielgen konnte die Glutaminsynthetase (GS) in der Leber identifiziert werden (Cadoret *et al.*, 2001; Loeppen *et al.*, 2002). Dieses Enzym ist ein wichtiger Bestandteil des Stickstoff-Stoffwechsels und katalysiert die Bildung von Glutamin, welches als Speicherform des Ammoniaks und als Aminogruppendonor, z.B. in der Purin- und Pyrimidin-Biosynthese, dient.

2.3.3.1 Die Glutaminsynthetase – ein β -Catenin-Zielgen

Die Glutaminsynthetase ermöglicht die Bildung von Glutamin aus Glutaminsäure und Ammoniumionen. Diese Reaktion ist endergon, sie kann daher nur unter Verbrauch von ATP ablaufen. Glutamin stellt die Transport- und Speicherform des Ammoniaks im Organismus dar. Es besitzt von allen Aminosäuren die höchste Konzentration im Blutplasma. Da Ammoniak für die Zelle giftig ist, darf er nicht in freier Form im Organismus vorliegen. In den verschiedenen Geweben wird daher NH_4^+ an Glutamat gebunden und das entstandene Glutamin über die Blutbahn zur Leber und zur Niere transportiert. In der Leber wird Glutamin dann hydrolytisch gespalten und es entstehen Glutamat und Ammoniumionen. Diese Ammoniumionen können über den Harnstoffzyklus zum ungiftigen Harnstoff umgewandelt werden, der dann über die Niere ausgeschieden werden kann. Auch in der Niere kann Glutamin gespalten werden, wobei das entstehende NH_4^+ als Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) ausgeschieden wird. Dieser Prozess dient vor allem zur pH-Regulation in der Niere. Glutamin ist des Weiteren die Stickstoffquelle zur Synthese von Aminosäuren und Nucleobasen.

Das Enzym Glutaminsynthetase (GS) wird in der Leber nur in wenigen Zellen exprimiert, die als GS-positive Hepatozyten bezeichnet werden und in ein bis drei Zellreihen um die terminalen hepatischen Venolen lokalisiert sind (Gebhardt *et al.*, 1983). Bemerkenswerterweise wird das Enzym in den GS-positiven Hepatozyten in sehr hohem Ausmaß gebildet. Untersuchungen zur spezifischen Expression der GS in isolierten Hepatozyten zeigten, dass ein bislang unbekannter Transkriptionsfaktor für die hohe Expression des Enzyms verantwortlich ist (Gebhardt *et al.*, 1989). Die Überexpression der GS in verschiedenen menschlichen Lebertumoren deutet auf eine wichtige Rolle des Enzyms bei der Progression von Lebertumoren hin.

Neben Genen wie *c-myc* und *Cyclin D1* gehört auch das Glutaminsynthetase-Gen zu den Zielgenen des β -Catenin/TCF-Transkriptionskomplexes (Cadoret *et al.*, 2001). Dies konnte mit Hilfe transgener Mäuse, die eine onkogene Form des β -Catenins in der Leber exprimieren, gezeigt werden. Diese Mäuse entwickeln eine signifikante Hepatomegalie und zeigen stark erhöhte hepatozelluläre Proliferation. In diesen hyperplastischen Lebern sind weder das *c-myc*- noch das *Cyclin D1*-Gen induziert, im Gegensatz zum Glutaminsynthetase-Gen sowie den Genen für Ornithin-Aminotransferase und Glutamin-Transporter 1 (GLT1), die somit weitere Targetgene des β -Catenins darstellen (Cadoret *et al.*, 2001).

Zunächst nahm man an, dass Glutaminsynthetase in der Leber in allen parenchymalen Zellen gleichermaßen exprimiert wird. Eine ebenso gleichmäßige Verteilung wurde für neoplastische Gewebe angenommen, obwohl einzelne Tumoren oder Hepatomzelllinien sich stark unterschieden. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen konnte gezeigt werden, dass nur 7-8 % der Parenchymzellen in Rattenlebern Glutaminsynthetase exprimieren. Diese Zellen bilden 1-3 kontinuierliche Zellreihen um die Zentralvenen der Leber aus (Gebhardt *et al.*, 1983; Brosnan *et al.*, 2009). Untersuchungen von Lebergewebe anderer Säuger, einschließlich humanem Lebergewebe, ergaben eine ähnliche Heterogenität. Diese heterogene Verteilung der Glutaminsynthetase-Expression wird auf prätranslationaler Ebene kontrolliert (Gaunitz *et al.*, 1997). Die Größe dieser GS-positiven Bereiche kann durch die Gabe initiierender Karzinogene, wie z.B. Diethylnitrosamin (DEN), reduziert werden. Man nimmt an, dass diese Reduktion der GS-positiven Bereiche eher durch den Verlust GS-positiver Hepatozyten als durch negative Regulation zustande kommt.

2.3.4 Mutationen des β -Catenin-Gens in Lebertumoren der Maus

Für die Untersuchung der chemisch induzierten oder der spontanen Kanzerogenese hat sich die Nagerleber als geeignetes Modell erwiesen. Durch einmalige oder chronische Gabe eines

chemischen Leberkanzerogens, wie z.B. N-Nitrosodiethylamin (DEN), können in der Leber präneoplastisch veränderte Herde monoklonalen Ursprungs, sogenannte Foci, und Tumoren induziert werden. Diese Foci weisen unter anderem eine veränderte Expression und Aktivität von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus auf (Buchmann *et al.*, 1985). Des Weiteren zeigen Lebertumoren, die durch DEN-Gabe induziert wurden, aktivierende Mutationen im Ha-ras-Protoonkogen (Buchmann *et al.*, 1991; Maronpot *et al.*, 1995). Dadurch besitzen diese Lebertumorzellen gegenüber Tumorzellen ohne Mutationen im Ha-ras-Protoonkogen einen selektiven Wachstumsvorteil, was zu einer klonalen Expansion dieser Zellen führt. Durch die Gabe von Tumorpromotoren, wie Phenobarbital oder 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (2,3,7,8-TCDD), kann die hepatozelluläre Kanzerogenese beschleunigt werden. Wird Nagern im Anschluss an die DEN-Gabe Phenobarbital gegeben, so entwickeln diese Tiere Lebertumoren, die zu 80 % Mutationen in *Ctnnb1* aufweisen (Aydinlik *et al.*, 2001). Betroffen sind hier die Codons 32, 33, 37 und 41. Alle diese Mutationen betreffen die GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung des Proteins. Dabei sind weder die zelluläre Konzentration des β -Catenins, noch die Konzentration des Zielgens *c-myc* deutlich erhöht. Die Konzentration von Cyclin D1 ist zwar in Tumoren erhöht, zeigt aber keine deutlichen Unterschiede zwischen Tumoren mit wildtyp- und mutiertem *Ctnnb1*. Dies weist darauf hin, dass die promovierende Wirkung von Phenobarbital nicht mit einer Wechselwirkung mit der β -Catenin/TCF-abhängigen Transkription zusammenhängt.

Mauslebertumoren unterscheiden sich genetisch von humanen hepatozellulären Karzinomen (HCC). Mauslebertumoren weisen im Gegensatz zu HCCs hohe ras-Mutationsraten bei gleichzeitig fehlenden p53-Mutationen auf (Schwarz *et al.*, 1991; Maronpot *et al.*, 1995). Dagegen treten Mutationen im β -Catenin-Gen sowohl in Lebertumoren der Maus als auch in HCCs des Menschen auf (de La Coste *et al.*, 1998; Renard *et al.*, 2000; Aydinlik *et al.*, 2001; Calvisi *et al.*, 2001).

2.4 Der Fremdstoffmetabolismus

Unpolare, d.h. lipophile Fremdstoffe können aufgrund ihrer Fettlöslichkeit im Gastrointestinaltrakt sehr gut resorbiert werden. Sie können allerdings in unveränderter Form biliär oder aber nur sehr langsam renal ausgeschieden werden, da die Exkretion über die Niere eine hohe Wasserlöslichkeit voraussetzt. Ohne chemische Veränderung würden sie also im Organismus kumulieren und diesen so schädigen. Aus diesem Grund müssen die aufgenommenen Fremdstoffe mit Hilfe spezieller Enzymsysteme durch Biotransformation in weniger toxische Stoffwechselprodukte umgewandelt werden, um dann schneller ausgeschieden werden zu können (Marquardt und Schäfer, 1994). Diese Enzyme besitzen eine breite Substratspezifität. Sie sind daher in der Lage, Arzneistoffe und eine große Zahl synthetischer chemischer Verbindungen abzubauen und werden als fremdstoffmetabolisierende Enzyme bezeichnet. Diese finden sich bei Wirbeltieren vor allem in der Leber. Die Reaktionen laufen in den Hepatozyten am glatten endoplasmatischen Retikulum ab. Hierbei werden Oxidationsreaktionen von Cytochrom P450-Systemen katalysiert (Marquardt und Schäfer, 1994).

Bei den durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme katalysierten Biotransformationen unterscheidet man zwischen Phase I- und Phase II-Reaktionen, wobei es sich in Phase I um Funktionalisierungs- bzw. Umwandlungsreaktionen und in Phase II um Konjugationsreaktionen handelt. In Phase I werden funktionelle Gruppen in das unpolare Molekül eingeführt oder vorhandene funktionelle Gruppen umgewandelt. Diese Gruppen können an der zu konjugierenden Stelle elektrophil (elektronenarm) oder nukleophil (elektronenreich) sein. Elektrophile Stoffe können zum Beispiel elektrophile Kohlenwasserstoffe, wie Epoxide oder Halogenide, oder elektrophile Heteroatome, wie Peroxide und Disulfide, sein. Die Reaktionen des Typs I haben in der Regel eine Erhöhung der Polarität und eine Verringerung der biologischen Aktivität oder Giftigkeit zur Folge. Zu

Phase I-Reaktionen gehören Oxidation, Reduktion, Hydrolyse und Hydratisierung (Marquardt und Schäfer, 1994).

Phase II-Reaktionen werden durch Transferasen katalysiert. Funktionelle Gruppen werden mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt. Die so entstandenen Konjugate sind sehr polar, somit gut wasserlöslich und können daher schneller renal und biliär ausgeschieden werden. In Phase II finden Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung sowie die Konjugation mit Aminosäuren und Glutathion statt.

Besitzen Fremdstoffe bereits für die Konjugation geeignete funktionelle Gruppen, kann auch ohne vorherige Phase I-Reaktion eine direkte Konjugation stattfinden.

Der Fremdstoffmetabolismus stellt in der Regel ein Entgiftungs- und Inaktivierungssystem dar, da viele Metabolite entweder unwirksam sind oder deutlich abgeschwächt wirken. Phase I-Metabolite, die selbst pharmakologisch wirksam sind oder Metabolite, die das eigentliche Wirkprinzip darstellen, werden als *Prodrug* bezeichnet.

2.4.1 Cytochrom P450

Cytochrom P450-Isoenzyme (CYPs) sind Häm-Thiolat-Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 45 und 55 kD. Sie gehören zur Gruppe der Monooxygenasen, die als redoxaktives Coenzym ein Häm enthalten. In der reduzierten Form kann dieses Häm Kohlenmonoxid (CO) binden und zeigt dann eine charakteristische Lichtabsorption bei 450 nm, was zur Bezeichnung Cytochrom P450 für diese Enzyme geführt hat. CYP450-Isoenzyme kommen sowohl in prokaryotischen, als auch in eukaryotischen Organismen vor und können in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Myasoedova, 2008). Hierzu gehören die Leber, die Mucosa des Gastrointestinaltrakts, Niere, Lunge und Hirn. Sie spielen eine wichtige Rolle im intrazellulären Stoffwechsel, z.B. bei Hormonsynthese und -abbau, Cholesterinbiosynthese und Vitamin D-Stoffwechsel. Bisher konnten mehr als 63

menschliche Gene identifiziert werden (davon 57 Gene und 5 Pseudogene), die für verschiedene Cytochrom P450-Isoenzyme codieren.

Cytochrom P450-Enzyme sind hauptsächlich membran-assoziierte Proteine, die entweder in der inneren Membran von Mitochondrien oder in der Phospholipidmatrix des glatten endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind. CYPs metabolisieren sowohl exogene, als auch endogene Komponenten (Handschin *et al.*, 2003). Die meisten dieser Enzyme können mehrere Substrate metabolisieren. In der Leber gehören zu diesen Substraten neben Medikamenten und toxischen Substanzen auch Stoffwechselprodukte wie Bilirubin (ein Abbauprodukt des Hämoglobins). Cytochrom P450-Enzyme katalysieren Giftungs- und Entgiftungsreaktionen. Sie katalysieren den Einbau eines Atoms Sauerstoff aus O₂ in ihr Substrat und führen eine Reihe von Funktionalisierungsreaktionen durch, wie z. B. die aliphatische Hydroxylierung, Epoxidierung, N-Oxidation, Desaminierung.

Das Cytochrom P450-Enzymsystem besteht neben dem CYP450-Isoenzym aus der NADPH-abhängigen Cytochrom P450-Reduktase, einem Flavoprotein mit nur einer Form pro Spezies. Dieses Flavoprotein enthält pro Mol Apoprotein 1 Mol Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und 1 Mol Flavin-Mononucleotid (FMN) gebunden. Zusammen mit dem Cofaktor NADPH als Quelle für die Elektronen, die aus ihm über die Cytochrom P450-Reduktase zum Cytochrom P450 fließen, bilden P450-Isoenzym und CYP-Reduktase die funktionelle Einheit des Cytochrom P450-Enzymsystems (Handschin *et al.*, 2003).

Eine einzige Spezies kann verschiedene Cytochrom P450-Isoformen besitzen. Die entsprechenden Gene werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie nummeriert und in Genfamilien, z.B. CYP1, CYP2, Subfamilien, die mit einem Buchstaben gekennzeichnet werden, z.B. CYP1A, CYP2B, und innerhalb derer in Isoformen, die mit einer Nummer bezeichnet werden, z.B. CYP2D6, unterteilt. Alle Enzyme, die eine Sequenzhomologie von mehr als 40% aufweisen, werden in einer Familie zusammengefasst. Innerhalb der Genfamilie

erfolgt die Unterteilung in Subfamilien, wobei die Sequenzhomologie der Isoformen innerhalb dieser Subfamilien mehr als 55% beträgt (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

CYPs der Genfamilien 1-4 weisen eine hohe Substrat- und Produktspezifität auf. Sie metabolisieren endogene Substanzen, wie z.B. Steroide, Gallensäuren, Fettsäuren, Prostaglandine und andere Eicosanoide, sowie Retinoide (Honkakoski *et al.*, 2000). Sie weisen komplexe geschlechts-, gewebes- und entwicklungspezifische Expressionsmuster auf, die durch Hormone und Wachstumsfaktoren reguliert werden. Die für den Fremdstoffwechsel beim Menschen relevanten Isoformen gehören den Genfamilien 1, 2 und 3 an. Die übrigen CYP-Enzyme sind an Synthese und Metabolismus von Thromboxan, Prostacyclin, Cholesterin, Vitamin D3, Gallensäuren und Steroidhormonen beteiligt. Mit 30% des gesamten P450-Gehalts in der menschlichen Leber stellt CYP3A4 das am häufigsten vorkommende hämhaltige Entgiftungsenzym dar (Hashimoto *et al.*, 1993). Es ist an der Verstoffwechslung von mehr als 50% aller momentan therapeutisch verwendeten Wirkstoffe beteiligt.

2.4.2 Induktion und Regulation von Cytochrom P450-Enzymen

Der Enzymbestand einer Zelle kann durch Erhöhung oder Erniedrigung der Enzymmenge angepasst werden. Hierfür ist die Änderung der Transkriptionsrate spezifischer, für Enzyme codierender Gene nötig, wofür extra- oder intrazelluläre Signale benötigt werden. Die Erhöhung der Proteinmenge durch Steigerung der Transkriptionsrate wird als Induktion bezeichnet. Im Falle der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme handelt es sich um die Erhöhung einer fremdstoffmetabolisierenden Enzymaktivität, die nicht sofort nach Agensgabe auftritt. Sie dauert nach Absinken der Agenskonzentration noch eine gewisse Zeit an (Deinduktionszeit) und wird häufig durch eine Erhöhung der Transkriptionsrate hervorgerufen. Stoffe mit ähnlichen induzierenden Eigenschaften werden zu Gruppen zusammengefasst. Induktorprototypen sind z.B. 3-Methylcholanthren, TCDD (Dioxin), sowie

Phenobarbital und Isoniacid. Die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme tritt hauptsächlich in der Leber auf (Bühler *et al.*, 1992). Daneben können auch in anderen Organen, wie Lunge, Niere, Darm, Haut oder Plazenta Induktionsvorgänge beobachtet werden.

Bezüglich Arzneimitteln führt die Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zur sogenannten pharmakokinetischen Toleranz. Zur Aufrechterhaltung der Wirksamkeit des Arzneistoffes und zur Minimierung der Toxizität muss dann die Dosis entsprechend angepasst werden. Wird der Induktor abgesetzt, kommt es mit zeitlicher Verzögerung zur Deinduktion, so dass die Dosis erneut angepasst werden muss. Induktoren vom Phenobarbital (PB)-Typ besitzen eine Deinduktionsdauer von einer bis mehreren Wochen. Sie kann bei sehr persistenten Induktoren, wie z.B. TCDD, bis zu mehrere Monate betragen. Eine Gruppe von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen wird häufig gemeinsam induziert. Zum Beispiel induzieren polyaromatische Kohlenwasserstoffe, wie 3-Methylcholanthren und 2,3,7,8-Dibenzo-p-dioxin (TCDD), sowohl Cytochrom P450 1A1 und 1A2 (CYP1A1, CYP1A2) als auch Glutathion-S-Transferase 1 (GST1) und UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1).

Die Regulation von CYP-Enzymen kann auf verschiedene Weise erfolgen. Im Falle des CYP2E1 kann die Regulation auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene erfolgen. Die Expressionshöhe der CYP2E1 mRNA korreliert mit der Proteinexpression des Enzyms. Trotzdem kann es zu Unterschieden in der Regulation des Enzyms auf mRNA- und Proteinebene kommen (Ho *et al.*, 2004). Auf transkriptioneller Ebene kann die CYP2E1-Expression durch die zwei Polymorphismen der Nukleotide –1259 (*PstI*) und –1019 (*RsaI*) in der Region stromaufwärts des Startcodons reguliert werden. Mit Hilfe von Primärhepatozyten konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Zytokinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren und Insulin zu einer Herunterregulierung der CYP2E1 mRNA führt (Hakkola *et al.*, 2003; Thasler *et al.*, 2006).

Die CYP2B-Regulation ist durch die starke Induzierbarkeit einiger Isoenzyme durch strukturell unterschiedliche Xenobiotika, wie Barbiturate (z.B. Phenobarbital) und Pestizide, gekennzeichnet (Waxman *et al.*, 1992). Die Induktion durch Phenobarbital beinhaltet eine Okadainsäure-sensitive Dephosphorylierung. Isoenzyme der CYP2B-Familie, wie z.B. CYP2B2 der Ratte, CYP2B10 der Maus und humanes CYP2B6, besitzen PB-responsive Elemente, sogenannte PBREMs (*phenobarbital-responsive enhancer modules*). Werden Hepatozyten mit Phenobarbital behandelt, kommt es zu einer verstärkten Proteinbindung an PBREM sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Kim *et al.*, 1997; Honkakoski *et al.*, 1998). Durch Cotransfektionen in HepG2-Zellen konnte gezeigt werden, dass nur der nukleäre Constitutive Androstan Rezeptor (CAR) PBREM aktivieren kann (Honkakoski *et al.*, 1998).

2.5 Transgene Tiere

Transgene Organismen sind Lebewesen, denen entweder eigene Genomteile entfernt oder inaktiviert wurden oder die über zusätzliche artfremde Gene verfügen. Die Chromosomen transgener Tiere enthalten stabil integrierte Kopien exogener Gene, zusätzliche Kopien endogener Gene oder Genkonstrukte. Es handelt sich also um genetisch veränderte Organismen, die mit gentechnischen Methoden hergestellt werden, indem zusätzliche Gene in das Erbgut der Versuchstiere eingebracht oder Gene im tierischen Genom ausgeschaltet werden, um die Funktionsweise einzelner Gene zu studieren. Zu diesem Zweck verwendet man Mäuse, Ratten oder andere Säugetiere, in deren Oozyten oder Embryonen (Blastozysten) Fremd-DNA eingeführt wird.

In der Entwicklungsbiologie, Genetik und anderen biologischen und medizinischen Bereichen sind transgene Organismen wichtige Werkzeuge zur Untersuchung von Genfunktionen. Transgene Tiere werden für die Grundlagenforschung regulatorischer Gen-Elemente, zur Identifikation der Gen-Funktion mittels Über- und Unterexpression von Genen, für Modelle

von menschlichen Krankheiten und in der Toxikologie als Testobjekte gebraucht. Die Effizienz des Gentransfers ist hierbei niedrig und liegt bei der Maus mit 10 bis 15 Prozent noch am höchsten. Bei Schweinen beträgt sie durchschnittlich nur etwa zwei Prozent, beim Rind sogar nur ein Prozent. Für die Generierung transgener Tiere kommen verschiedene Techniken zur Anwendung, z.B. die Mikroinjektion linearer DNA in den Vorkern (Pronukleus) oder der Transfer embryonaler Stammzellen in Blastozysten.

Eine Strategie zur Herstellung transgener Lebewesen (eukaryotischer Vielzeller) sieht folgendermaßen aus: Zunächst werden pluripotente Stammzellen (ES) gewonnen und fremdes Erbgut in diese Zellen eingeschleust. Dies kann z.B. durch Mikroinjektion erfolgen. Im Anschluss daran können sich die so veränderten Stammzellen zu vollständigen Organismen entwickeln. Durch das Einbringen der so modifizierten Zellen in die Keimbahn können vollständig transgene Organismen erhalten werden. Im Gegensatz dazu können durch die Integration in somatisches Gewebe genetische Chimäre erzeugt werden, die nur partiell transfiziertes Gewebe enthalten. Diese Chimären können dann aber durch geeignete Kreuzungen zu vollständig transgenen Organismen weitergezüchtet werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung transgener Lebewesen ist das Einbringen von DNA über Infektion mit Retroviren oder die direkte Injektion in einige Gewebetypen.

Transgene Mäuse können des Weiteren mit Hilfe der Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus erhalten werden. Ein Plasmid, das das gewünschte Fremdgen enthält, wird in eine befruchtete Eizelle eingebracht, die dann scheinchwangeren Muttertieren implantiert wird. Die so erhaltenen Nachkommen sind mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit transfiziert und werden bezüglich des Transgens analysiert, also genotypisiert. Tiere, die das Transgen in sich tragen, werden anschließend mit Mäusen verpaart, die eine unter einem, z.B. organ-spezifischen, Promotor stehende Cre-Rekombinase des *E. coli* Bakteriophagen P1 tragen.

Hierbei handelt es sich um eine ortsspezifische Rekombinase, die eine DNA-Neuordnung über ihre DNA-Zielsequenz, nämlich loxP, vermittelt. Die loxP-Sequenzen bestehen aus 34 Basenpaaren und enthalten eine 8 bp Spacer Region, die von zwei 13 bp invertierten Wiederholungen (*inverted repeats*) flankiert wird (ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT). Diese dienen als Erkennungssequenzen für die DNA-Bindung der Cre-Rekombinase. Das Rekombinationsereignis ist lediglich von diesen beiden Bestandteilen abhängig und wird mit absoluter Zuverlässigkeit durchgeführt.

Je nach Plasmidaufbau können durch dieses Verfahren aber auch Tiere erhalten werden, die ein einzelnes Gen so verändert (mutiert) in sich tragen, dass das durch das Fremdgen codierte Protein nicht mehr exprimiert werden kann. Das Genprodukt wurde ausgeschaltet, so dass es sich in diesem Fall um sogenannte „knock out“-Tiere handelt. In einem Stamm von Mäusen können auch mehrere Gene ausgeschaltet („knocked out“) werden. Der Vorteil dieser Knock out-Tiere liegt darin, dass die Funktion des fehlenden Proteins im lebenden Tier oder seinen Zellen und Geweben untersucht werden kann, indem man nach Unterschieden zwischen den jeweiligen Mutanten und Wildtyp-Tieren (meist Geschwister aus demselben Wurf) sucht.

Die oben beschriebene Technik der Mikroinjektion zur Generierung transgener Tiere wurde zunächst 1980 von Gordon *et al.* etabliert. Ein rekombinantes Plasmid wurde direkt in den Vorkern befruchteter Eizellen injiziert und damit in die Chromosomen eingeführt. So konnten bei 2 von 78 neugeborenen Mäusen eine stabile Integration der injizierten DNA-Sequenz erzielt werden. Die Fremd-DNA konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.

Die Effizienz lag zu dieser Zeit bei 10-15% transgener Nachkommen und war daher in der Praxis sehr gut nutzbar. Nach der Übertragung des genetischen Materials wird dieses nach dem Zufallsprinzip in eines der Chromosomen des Embryos integriert. Somit enthält bei der Geburt der Tiere jede Zelle des Tieres eine Kopie dieser neuen Information. Die DNA muss vor der Verdopplung des genetischen Materials, die der ersten Zellteilung vorausgeht, in das

Genom integriert werden. Wenn dies nicht der Fall ist, wird das Gen nur in wenige Zellen eingebaut. Daher wird die DNA im frühesten Stadium in die befruchtete Eizelle eingeführt, nämlich direkt im, auf die Befruchtung folgenden, Vorkernstadium.

Nachdem das Spermium in die Eizelle eingedrungen ist, sind männlicher und weiblicher Vorkern im Lichtmikroskop einige Stunden lang sichtbar und liegen als getrennte Einheiten vor. Erst nach dieser Zeit verschmelzen sie zur sogenannten Zygote.

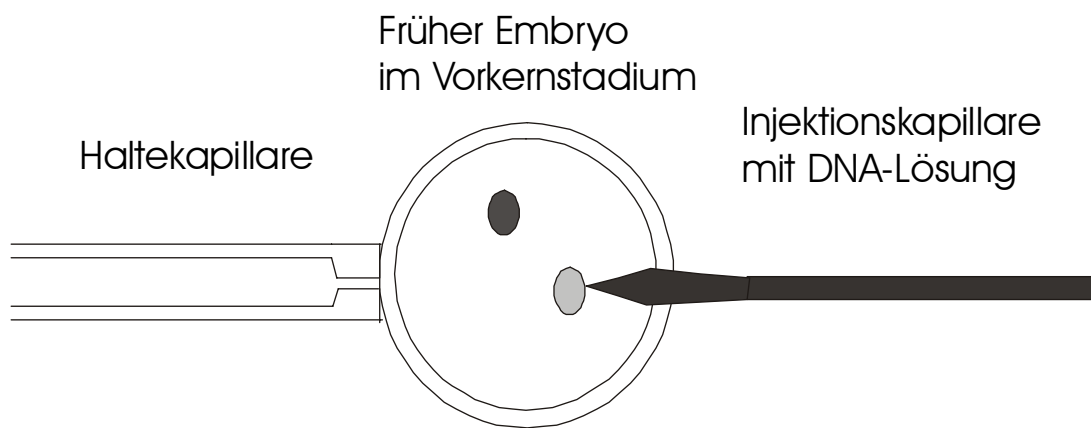


Abbildung 2.4: Mikroinjektion von DNA in den Vorkern einer befruchteten Eizelle (mit männlichem und weiblichem Vorkern).

Die DNA kann bei gleichbleibendem Resultat in jeden dieser Vorkerne injiziert werden, wobei normalerweise der männliche Vorkern für die Mikroinjektion bevorzugt wird, da dieser etwas größer ist als der weibliche Pronukleus und sich näher an der Oberfläche der Oozyte befindet (Abb. 2.4.). Die so veränderten Eizellen werden anschließend in den Uterus scheinträchtiger Empfängertiere übertragen und die Nachkommen auf die erfolgreiche Integration des betreffenden Transgens mittels PCR untersucht. Insgesamt trägt die Transgenese bei Mäusen wesentlich zur Identifikation von Mechanismen der Genregulation bei.

2.6 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich die Expression verschiedener Cytochrom P450-Isoenzyme in Mauslebertumoren, die punktmutiertes *Ctnnb1* enthalten, gegenüber Normalgewebe unterscheidet. Hierzu wurde die Expression von CYP1A, CYP2B, CYP2C und CYP2E1 in Mauslebertumoren auf RNA- und Proteinebene untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Generierung einer transgenen Maus, die induzierbar eine punktmutierte Form des humanen β -Catenins exprimiert. Zusätzlich zu normalem Wildtyp-*Ctnnb1* sollten diese Tiere ein humanes *Ctnnb1* tragen, das eine Punktmutation in Codon 33 besitzt (*Ctnnb1*-S33Y). Diese führt zu einem Austausch von Serin (S) nach Tyrosin (Y), so dass an dieser Stelle keine Phosphorylierung durch GSK3 β stattfinden kann. Damit sollte ein In-vivo-Modell zur Untersuchung von β -Catenin-Mutationen in der Mausleber erhalten werden.

Die durch Mikroinjektion erhaltenen transgenen Tg(loxP(pA) β Cat^{S33Y})-Mäuse wurden durch Genotypisierung charakterisiert und im Anschluss daran mit Tg(albCre)-Mäusen verpaart. Diese Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotors. Die Lebern der daraus entstandenen transgenen Tiere (Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})) wurden immunhistochemisch sowie auf RNA- und Proteinebene hinsichtlich der Expression des Transgens sowie dessen Zielgene untersucht. Langfristig könnte mit Hilfe der Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Maus ein in vivo-Modell erhalten werden, mit dessen Hilfe die Rolle des durch Punktmutation in Codon 33 aktivierten β -Catenins in der Leberkanzerogenese der Maus weiter aufgeklärt werden könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

- Acrylamid (30%; rotiphorese Gel 30) Roth
- Agar, bakteriologisch Life Technologies
- Agarose (ultra pure) Gibco BRL
- 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) Sigma
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) Life-Technologies
- Ampicillin Natriumsalz > 98% Sigma
- Ampuwa (bidest. Wasser) Fresenius
- Antikörper
 - Kaninchen-Anti-CYP450-Isoenzyme der Familien 2C, 1A, 2B Dr. R. Wolf, Biomedical Research Centre, University of Dundee, UK
 - Kaninchen-Anti-CYP450 2E1 Dr. M. Ingelman-Sundberg, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden
 - Kaninchen Anti-Glutathion-S-Transferase plazentulär (polyklonal) Bio Genex
 - Kaninchen Anti-Glutaminsynthetase AG Prof. Gebhardt, Universität Leipzig
 - Ziegen-anti-Kaninchen-IgG HRP Dako
 - Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (alkal. Phosphatase-konjugiert) Tropix
- Arginin·HCl Sigma
- Bacto[®] Trypton Difco

- Bacto[®] *Yeast Extract* (Hefeextrakt) Difco
- Bakterien
 - One Shot[®] *ccdB* Survival[™] Competent Cells Invitrogen
 - One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* Invitrogen
 - *E. coli* DH5 α AG Prof. Jung
 \bar{F}' *lendA1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 thi-1 recA1* Universität Tübingen
 $\bar{g}y$ *rA (Nal^r) deoR phoA λ relA1*
 Δ (lacZYA-argF)_{U169}(Φ 80lacZ Δ M15)
- Borsäure Merck
- Bradford Reagenz (Quick Start Bradford Protein Assay Kit) Bio-Rad
- Bromphenolblau Serva
- CDP-Star Chemoluminiszenzsubstrat Tropix
- Chloroform Merck
- Deionisiertes Wasser, RNase- und DNase-frei, DEPC-behandelt ICN Biomedicals, Inc.
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Merck
- Dinatriumhydrogenphosphat - Na₂HPO₄·2H₂O, p.a. Merck
- dNTP-Mix (10mM) Fermentas
- Eisessig Merck
- Ethanol Merck
- Ethidiumbromid Serva
- Entellan[®] Merck
- Enzyme
 - Taq-Polymerase [1U/ μ l], nativ oder recombinant Fermentas
 - Sca I [10 U/ μ l] Fermentas
 - Pst I [10 U/ μ l] Fermentas
 - Pvu I [10 U/ μ l] Fermentas
 - Sma I [10 U/ μ l] Fermentas
 - Sma I [50 U/ μ l] Fermentas
 - BsrG I [10 U/ μ l] Fermentas
 - BamH I [10 U/ μ l] Fermentas
 - EcoR I [10 U/ μ l] Fermentas

• T4 DNA Ligase [1 U/μl]	Promega
• Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
• FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco-BRL, Invitrogen
• Gene PORTER™ 2 mit DNA-Diluent	GTS Inc., Vertrieb: Peqlab
• Glycin	Merck
• Hämalaun	Merck
• Heringssperma-DNA	Stratagene
• Hybond-N Nylonmembran	Amersham Life-Science
• I-Block	Tropix
• Isopropanol (2-Propanol)	Merck
• Kaisers Glycingelatine	Merck
• LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche Applied Science
• Magnesiumchlorid (25mM)	Fermentas
• Magnesiumsulfat - MgSO ₄ , p.a.	Merck
• Marker	
• φX174 Hae III	New England Biolabs
• <i>BenchMark™ Prestained Protein Ladder</i>	Gibco BRL
• <i>DNA-Mass Ruler High Range</i>	MBI Fermentas
• <i>DNA-Mass Ruler Low Range</i>	MBI Fermentas
• Kaleidoscope Prestained Standard	Biorad
• pBR322	New England Biolabs
• <i>1kb Gene Ruler</i>	Fermentas
• <i>100 bp Ladder plus</i>	Fermentas
• β-Mercaptoethanol	Merck
• Methanol	Merck
• Natriumacetat	Merck
• Natriumazid	Merck
• Natriumcarbonat - Na ₂ CO ₃ , p.a.	Merck
• Natriumchlorid	Merck
• tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
• Natriumdihydrogenphosphat - NaH ₂ PO ₄ ·1H ₂ O, p.a.	Merck
• Natriumhydrogencarbonat - NaHCO ₃ , p.a.	Merck

- Natriumdodecylsulfat (SDS) Serva
- NBT / BCIP-Stammlösung: Roche Applied Science
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)
5-Brom-4-Chlor-3-indoloy-phosphor, Toluidin-Salz (BCIP)
- oligo(dT) [0,5 µg/µl] Fermentas
- Qualex Low Melt Agarose Hybaid-AGS
- Penicillin/Streptomycin Biochrom AG
- Phenobarbital Geyer
- Phenol Roth
- Proteinase K Roche Applied Science
- Random Hexamere (N)₆ [0,5 µg/µl] Fermentas
- Reverse Transkriptase Peqlab
- Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V, Lyophilisat Serva
- Rotiphorese Gel A (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) Roth
- 10 x RT-Puffer Fermentas
- Schweinenormalserum DAKO
- Streptavidin AP Biospa
- 5 x T4 Ligase-Puffer Promega
- 10x Taq-Puffer + oder + MgCl₂ Fermentas
- TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin) Ökometric GmbH
- Tetramethylethylendiamin (TEMED) Roth
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base) Roth
- Trizol Gibco BRL
- Trypsin/EDTA BioWhittaker Europe
- Trypton ICN Biomedicals
- Tween 20 Merck
- Wasserstoffperoxid Aldrich
- Xylol Merck
- Ziegennormalserum Biospa

- 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) 5 g APS
auf 50 ml bidest. Wasser
- 10x Assaypuffer 2 M Tris-Base
100 mM MgCl₂·6H₂O
pH 9,5
- Blockpuffer (I-Block) 1 l PBS
6,3 g I-Block
→ 1 h auf 65°C erwärmen bis eine milchige Lösung entsteht
0,5 ml Tween 20
200 mg Natriumazid
- EDTA 0,5 M EDTA
20 g NaOH-Pellets
pH 8
- High Salt Puffer für EluTip-DNA-Reinigung 1 M NaCl
20 mM Tris, pH 7,4
1 mM EDTA
- Injektionspuffer für EluTip-DNA-Reinigung 10mMTris
0.1mMEDTA
pH 7.4
- 10x Ladepuffer (-) 0,25 % (w/v) Xylencyanol
15 % (w/v) Ficoll 400
50 mM EDTA

- 2x Lämmli-Puffer
 - 125 mM 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 - 20% (v/v) Glycerin
 - 4% (w/v) SDS
 - 10% (v/v) β -Mercaptoethanol
 - 0,004% (w/v) Bromphenolblau

- LB-Amp-Medium
 - 1,0% (w/v) Trypton
 - 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 - 1,0% (w/v) NaCl
 - autoklavieren, abkühlen lassen und mit 0,1% (v/v) einer wässrigen sterilfiltrierten Ampicillinlösung (100 mg/ml) versetzen

- LB-Amp-Agar-Platten
 - 1,0 % (w/v) Trypton
 - 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 - 1,0 % (w/v) NaCl
 - 17 g Bacto-Agar
 - autoklavieren, auf 50-60°C abkühlen lassen, mit 0,1% (v/v) einer wässrigen sterilfiltrierten Ampicillinlösung (100 mg/ml) versetzen und in Ø 10 cm-Kulturschalen gießen

- Low Salt Puffer für EluTip-Aufreinigung:
 - 0,2 M NaCl
 - 20 mM Tris, pH 7,4
 - 1 mM EDTA

- Natriumacetat
 - 3 M Natriumacetat
 - pH 7,5

- NBT / BCIP-Färbelösung
 - 200 μ l NBT/BCIP-Stammlösung
 - 10 ml Tris-Puffer
 - Färbelösung erst unmittelbar vor Gebrauch aus Puffer und Stammlösung herstellen

- NBT / BCIP-Stammlösung (von Boehringer) 18,75 mg/ml NBT
9,4 mg/ml BCIP
in 67% DMSO (v/v)

- PBS 80 mM Na₂HPO₄x2H₂O
1,4 M NaCl
27 mM KCl
15 mM KH₂PO₄
pH 7,4

- PBS / S (PBS supplementiert mit Rinderserumalbumin und NaCl) 200 ml PBS
1% Rinderserumalbumin (einsinken lassen, nicht einrühren- schäumt!)
0,35 M NaCl

- PBS/T 1 l PBS
0,5 ml Tween 20
200 mg Natriumazid

- Puffer P1 (Plasmid Purification Maxi Kit) 6,06 g Tris-Base
3,72 g Na₂EDTAx2H₂O
pH 8,0
ad 1 l
100 mg Rnase A

- Puffer P2 (Plasmid Purification Maxi Kit) 8,0 g NaOH-Pellets
50 ml 20% (w/v) SDS
ad 1 l

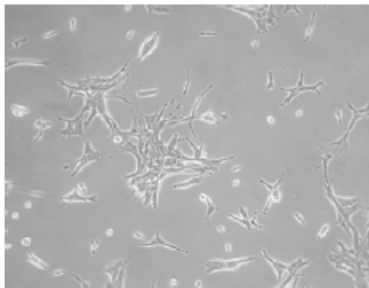
- Puffer P3 (Plasmid Purification Maxi Kit) 294,5 g Potassium Acetat
ad 1 l bidest. Wasser
pH 5,5

- Puffer QBT (Plasmid Purification Maxi Kit) 43,83 g NaCl
10,46 g MOPS
150 ml Isopropanol
ad 1 l
pH 7,0
- Puffer QC (Plasmid Purification Maxi Kit) 58,44 g NaCl
10,46 g MOPS
150 ml Isopropanol
pH 7,0
ad 1 l
- Puffer QF (Plasmid Purification Maxi Kit) 73,05 g NaCl
6,06 g Tris-Base
150 ml Isopropanol
pH 8,5
ad 1 l
- 10x RNA- Ladepuffer 50 ml Glycerin
37 mg EDTA
400 mg Bromphenolblau
ad 100 ml bidest. Wasser
- 20 % SDS 200 g SDS
ad 1 l bidest. Wasser
- 10x SDS-PAGE Laufpuffer 30 g Tris-Base
144 g Glycin
10 g SDS bzw. 50 ml 20% SDS
ad 1 l bidest. Wasser

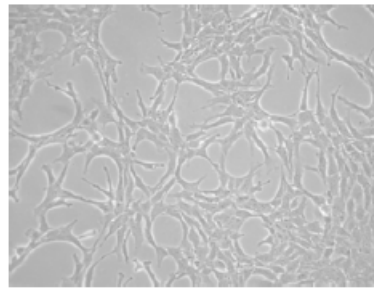
- 20x SSC
3 M NaCl
300 mM Na₃Citratx2H₂O
pH 7
- 50x TAE-Puffer
2 M Tris-Base
400 mM Natriumacetat
50 mM EDTA
pH 8
- 0,05 M TB-Puffer
6,0g Tris-Base
406 mg MgCl₂x6H₂O
pH 8,7
- 10x TBE-Puffer
900 mM Tris-Base
1,1 M Borsäure
25 mM EDTA
pH 8
- 10 x TBS-Puffer
200 mM Tris-HCl
1,35 M Natriumchlorid
- 0,15 M TBS-Puffer
0,6 g Tris-Base
5,8 g NaCl
pH 7,36
- 0,2 M TBS/S-Puffer
0,2 M Tris-Base
0,2 M Maleinsäure
pH 6,5
- 10x TE-Puffer
10 mM Tris-Base
1 mM EDTA

Medienwechsel: zweimal pro Woche

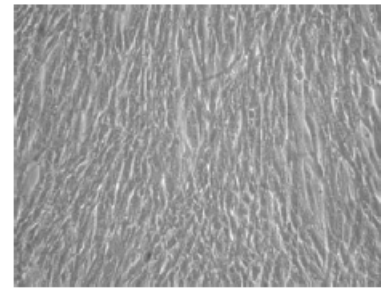
Fotos: Erhaltungskulturen (10er-Objektiv)



nach 3 Tagen



nach 5 Tagen



nach 7 Tagen

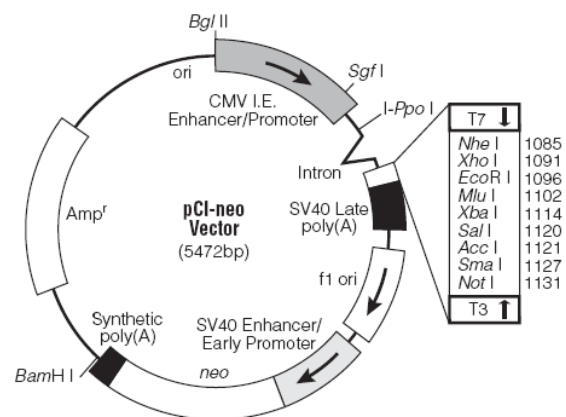
3.1.5 Plasmide

pCIneo (Leervektor)

Beschreibung: Expressionsvektor für Säugerzellen;
Grundvektor des pβCat^{S33Y}/CIneo

Promotor: *immediate-early* Enhancer/ Promotor-Region des menschlichen Cytomegalievirus (CMV)

Quelle: Fa. Promega

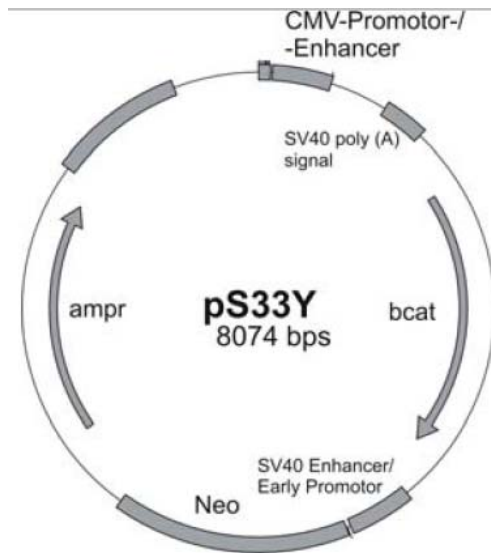


pβCat^{S33Y}/CIneo

Beschreibung: Expressionsvektor für punktmutiertes b-Catenin-Protein; codiert full-length-b-Catenin mit dominant-positiver S33Y-Mutation; S33Y = Serin an Position 33 gegen Tyrosin ausgetauscht

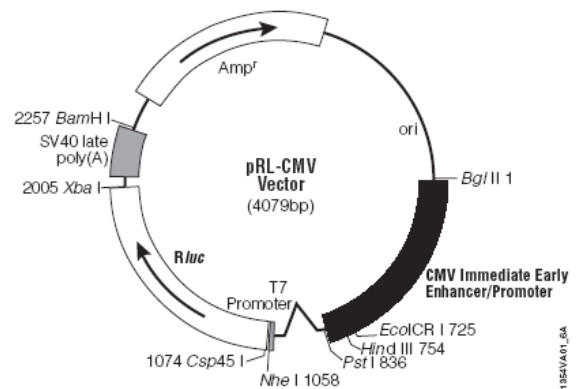
Ausgangsvektor: pCI-neo (Fa. Promega)

Quelle: Dr. Oliver Müller (Max-Planck Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund)



pRL-CMV

Beschreibung: interner Kontrollvektor in Kombination mit Reportervektoren für Cotransfektion in Säugerzellen mit leicht modifizierter *Rluc*-cDNA



Rluc codiert Renilla Luciferase

Promotor: CMV-Enhancer/
Promotorelemente starke Expression von *Rluc*

Quelle: Fa. Promega

β -Catenin/TCF (Topflash) Reporter

Beschreibung: T-Cell factor (TCF)Reporter-Plasmid
 Enthält zwei Sets von vier Kopien der TCF-Bindungsstelle (wild-typ), welche stromaufwärts des Thymidinkinase-Minimalpromotors und des Luciferase-Open-Reading-Frames liegen. Das zweite Set liegt allerdings in umgekehrter Orientierung vor.

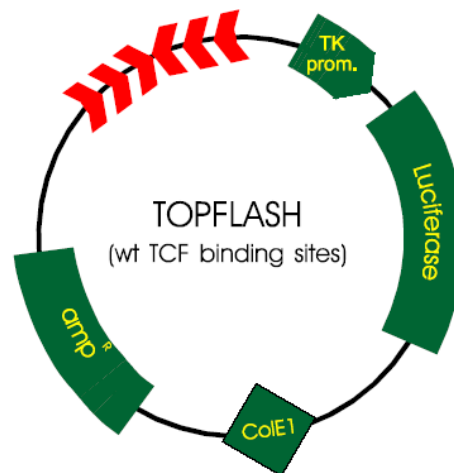


Abb. Upstate Biotech

Quelle: Dr. O. Müller (Max-Planck Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund, Germany)

5'-CYP2B1-Luc Reporter (pGL3C2B1)

Beschreibung: Reportergenkonstrukt für Cytochrom P450 2B1; abgeleitet von pGL3-Basic-Vektor; enthält die Phenobarbital-responsive Enhancer-Module (PBREM)-enthaltende Promotorregion des Cyp2B1-Gens

Quelle: Dr. K. Hirsch-Ernst (Universität Göttingen);

Ah Rezeptor (pDR/CMV4)

Beschreibung: Expressionsvektor für AhR

Quelle: Dr. L. Poellinger (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden);

CAR (pCR3mCAR1)

Beschreibung: Expressionsvektor für CAR
Quelle: Dr. M. Negishi (National Institute of Environmental Health Sciences, NIH, Research Triangle Park, N.C.)

pT81LUC/3xDRE Reporter

Beschreibung: abgeleitet von Leervektor pT81Luc (6,6kb);
ein Oligonukleotid mit drei hintereinander geschalteten Dioxin-responsiven Elementen (DREs) aus dem hCYP1A1-Enhancer, die die DRE-Core-Sequenz und angrenzende Basen enthalten;
dieses wurde zwischen XhoI- und HindIII-site der MCS kloniert

Promotor: “trunkierter” TK-Promotor (-81 bis +52, distales GC und CCAAT deletiert

Quelle: Schmiechen, 2001; Kress *et al.*, 1998

3.1.6 PCR-, Sequenzier- und Genotypisierungs-Primer

Primer	Sequenz
pCALNL5_for	5' - CGG GGA TCT CAT GCT GGA GT - 3'
pCALNL5_rev	5' - TTG TTC ATG GCA GCC AGC ATA - 3'
GatewayPrimer1_for	5' - CAC ATT ATA CGA GCC GGA AGC AT - 3'
GatewayPrimer2_rev	5' - CAG TGT GCC GGT CTC CGT TAT CG - 3'
Maus-CYP1A1_for	5' - TGT CCT CCG TTA CCT GCC TA - 3'
Maus-CYP1A1_rev	5' - GTG TCA AAC CCA GCT CCA AA - 3'
Maus-CYP2B10_for	5' - TAC TCC TAT TGC ATG TCT CCA AA - 3'
Maus-CYP2B10_rev	5' - TCC AGA AGT CTC TTT TCA CAT GT - 3'
Maus-CYP2E1_for	5' - TCC CTA AGT ATC CTC CGT GA - 3'
Maus-CYP2E1_rev	5' - GTA ATC GAA GCG TTT GTT GA - 3'
GatewayS33YEntry_F	5' - CACCGTATAACCATAACAACACTGTTTTGAAAATCCAG - 3'
GatewayS33YEntry_R	5' - ACTCCTAAAGGATGATTTACAGGTCAGTAT - 3'
MutagenS33Y_for	5' - GAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTG - 3'
MutagenS33Y_rev	5' - CAAGAGTCCCAAGGAGACCTTCCATCCCTTC - 3'
S33Ymiddle_for	5' - TGC GTTCTCCTCAGATGGTG - 3'
S33Ymiddle_rev	5' - ATTCGGTTGTGAACATCCC - 3'
up.int.cre_for	5' - TTT GCC TC ATT ACC GGT CGA TGC - 3'
int.cre_rev	5' - TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG - 3'
transgMausloxP_for	5' - ATT ATA CGA AGT TAT CTC GAG TCG CTC - 3'
transgMaus1_rev	5' - CCT CTT CCT CAG GAT TGC CTT TAC C - 3'
Cx26flox-A3_for	5' - CTT TCC AAT GCT GGT GGA GTG - 3'
Cx26flox-A5_rev	5' - ACA GAA ATG TGT TGG TGA TGG - 3'
b-Cat-K.o.662 - for	5' - ACT GCC TTT GTT CTC TTC CCT TCT G - 3'
b-Cat-K.o. 803n - rev	5' - CAG CCA AGG AGA GCA GGT GAG G - 3'
mx1	5' - TTC ACG GTT TCA ATT CTC CTC TGG - 3'
mx2	5' - CAC CGG CAT CAA CGT TTT CTT TC - 3'

3.1.7 Geräte

- CCD Kamera mit Rechneranschluss TI-1 Raytest
- DNA-Agarosegelelektrophoresekammern Gibco BRL
- EG&G Luminometer Berthold
- Glasplatten für mittelgroßes DNA-Gel (20x20cm) Biorad
- Gelkamm Biorad
- Heidolp Titromax 1000 Heidolph
- Heizblock Eppendorf
- Heraeus Minifuge T Heraeus
- Kugelmühle Mikro-Dismembrator B.Braun
- Mikroskop Leitz
- Netzgerät GPS 200/400 E-Pharmacia
- Netzgerät ST 606 T Gibco BRL
- Photometer Shimadzu
- Schüttler Multimed
- Spacer Biorad
- Speed-Vac Typ BA-VC-300H Bachhofer
- Thermoblock BT-11 Biotherm
- Thermocycler Uno-Thermoblock Biometra
- Trans Blot Cell Biorad
- Zentrifugen
 - Kühlzentrifuge 5417 R Eppendorf
 - Micro Tischzentrifuge Biofuge 13 Heraeus
 - Megafuge Heraeus
 - Beckman Zentrifuge J2-21 Beckman

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbung dient dem Nachweis und der Lokalisation von Proteinen in einem Gewebeverband oder innerhalb von Zellen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann die Verteilung bestimmter Antigene sichtbar gemacht werden. Hierfür eignen sich besonders Antigene, die spezifisch nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben vorkommen. Für Antikörperfärbungen wird fixiertes Gewebe verwendet, das aus Gewebeschnitten besteht (zum Beispiel Mikrotomschnitte von Organen der Maus oder des Menschen).

Die Darstellung von Antigenen in Geweben und Zellen durch Immunfärbung in einem Zweistufenprozess beinhaltet zunächst die Bindung eines Antikörpers (Primär-Antikörper) an das jeweils nachzuweisende Antigen und anschließend den Nachweis und das Sichtbarmachen von gebundenem Antikörper durch ein Enzym-Chromogen-System. Man unterscheidet hierbei indirekte und direkte Nachweismethoden. Bei der direkten Methode wird das Enzym direkt an den Primär-Antikörper gekoppelt, während bei der indirekten Methode das Enzym an einen Sekundär-Antikörper gebunden ist. Dieser sorgt für einen zusätzlichen Schritt zur Verstärkung des Antigen-Bindungsvorgangs und führt zu einer höheren Empfindlichkeit. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine indirekte Methode, das Biotin-Streptavidin-amplifizierte (B-SA) System, eingesetzt.

3.2.1.1 Entparaffinieren von Paraffinschnitten

Gewebeproben können durch Einbetten in Paraffin konserviert und für Mikrotomschnitte eingesetzt werden. In diesen Schnitten bleibt die Struktur, im Vergleich zu Gefrierschnitten, wesentlich besser erhalten. Um in Paraffin eingebettetes Gewebe immunhistochemisch untersuchen zu können, muss es zunächst entparaffiniert und in die wässrige Phase überführt werden.

Durchführung:

- Entparaffinieren in Xylolbad I (100% Xylol) 10 min
- Entparaffinieren in Xylolbad II (100% Xylol) 10 min
- Spülen in Ethanolbad I (100% Ethanol) 1 min
- Spülen in Ethanolbad II (100% Ethanol) 1 min

Durch anschließendes kurzes Eintauchen der Objektträger in die Gefäße einer absteigenden Ethanolreihe (96%iger, 80%iger und 50%iger Ethanol) werden die Schnitte rehydriert und können dann immunhistochemisch gefärbt werden.

3.2.1.2 Detektion von Glutaminsynthetase

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen kann sichtbar gemacht werden, in welchen Zellen des untersuchten Gewebes Glutaminsynthetase (GS) exprimiert wird.

Zunächst bindet der anti-GS Primärantikörper aus Kaninchen an das zelluläre Antigen. Im zweiten Schritt wird Merrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) gekoppeltes Schwein-Anti-Kaninchen-IgG als Sekundärantikörper eingesetzt (Handbuch

immunchemischer Färbemethoden, DAKO, 1989). Im dritten Schritt weist man das konjugierte Enzym durch katalytische Bildung eines Farbstoffes nach. Dabei geht H_2O_2 mit der Peroxidase einen Komplex ein, der mit dem Elektronendonator 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) reagiert. Unter Oxidation bildet AEC ein rosarotes Farbprodukt, das alkohollöslich ist. Im Anschluss daran kann mit Hämalaun gegengefärbt werden. Die Hämalaunfärbung wird als Übersichtsfärbung eingesetzt. Sie zeigt Zellkerne, sauren Schleim u.a. blau, alles übrige in verschiedenen Tonabstufungen in rot. Hämalaun als positiv geladener Farbstoff kann Basophilie einer Struktur anzeigen. Die meistens erwünschte selektive Kernfärbung wird durch die Azidität der Lösung und einen Überschuss an Alaun erreicht: Aluminiumionen und andere Kationen konkurrieren mit dem Farbstoff um die Bindung an negativ geladenen Valenzen, das saure Milieu vermindert die Dissoziation von Carboxylgruppen im Gewebe.

Durchführung der Inkubation und der Färbung:

Inkubation und Färbung schließen sich direkt an das Entparaffinieren des Gewebeschnittes an, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Schnitte nach der Entparaffinierung nicht austrocknen.

- Blockierung unspezifischer Peroxidasen durch Eintauchen des Schnitts in ein Methanol/ H_2O_2 -Gemisch 15 min
- Waschen in PBS 3 x 5 min
- Inkubation mit Schweinenormalserum 1:30 verd. in *Phosphate Buffered Saline* supplementiert mit Rinderserumalbumin und NaCl (PBS/S) 5 min
- Inkubation mit anti-GS 1:2000 verd. in PBS/S in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht

- Waschen in PBS/S 5 min
- Inkubation mit Schweinenormalserum 1:30 verd. in PBS/S 30 min
- Inkubation mit Schwein-anti-Kaninchen-IgG HRP 1:20 verd. in PBS/S 90 min
- Waschen in PBS 5 min
- Inkubation in Acetatpuffer 5 min
- Färbung mit AEC-Lösung 15 min
- Inkubation in Acetatpuffer 5 min
- Waschen in PBS 5 min
- Waschen in Aqua bidest. 5 min
- Bläuen in Leitungswasser 10 min
- Eindecken in Glyceringelatine

3.2.1.3 Detektion von Cytochrom P450

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen von Mauslebergewebeschnitten wird die Expression der Cytochrom P450-Isoenzyme der Familien 2C, 1A, 2B (zur Verfügung gestellt von Dr. R. Wolf, Biomedical Research Centre, University of Dundee, Dundee, UK) und 2E1 (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Ingelman-Sundberg, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden) untersucht. Hierfür werden Kaninchen-Antisera der entsprechenden Isoenzyme für die Färbung eingesetzt. Als Sekundärantikörper dient ein Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper.

Durchführung der Färbung:

Werden für die Färbung Gefrierschnitte eingesetzt, müssen diese zunächst 1 Stunde bei 45°C im Trockenschrank getrocknet werden.

- Auf dem Objektträger befindliches Gewebe mit einem Fettstift umranden
- Fixieren des Schnitts in 3%iger Paraformaldehyd-Lösung (gelöst in PBS) bei 4°C 5 min
- Inkubieren in 1x PBS 5 min
- Schnitt kurz in aufsteigende Methanolreihe eintauchen (50%, 70%, 90%)
- Inkubieren in Methanol/H₂O₂-Lösung (200 ml + 667 µl) 15 min
- Schnitt kurz in absteigende Methanolreihe eintauchen (90%, 70%, 50%)
- Inkubieren in 1x PBS 2 x 5 min
- Inkubieren in PBS/S-Lösung 5 min
- Schweinenormalserum 1:30 in PBS/S 5 min
- Je nach gewünschtem Antikörper: Inkubation bei 4°C mit über Nacht
 - Cyp 2E1 (Kaninchen) 1:1000 oder
 - Cyp 1A2 (Kaninchen) 1:1000 oder
 - Cyp 2C6 (Kaninchen) 1:300jeweils verdünnt in PBS/S-Lösung
- Inkubieren in PBS/S-Lösung 5 min
- Schweinenormalserum 1:30 in PBS/S 5 min
- Inkubation mit Schwein-anti-Kaninchen-IgG HRP 1:20 verdünnt in PBS/S-Lösung 20-60 min
- Inkubieren in PBS/S-Lösung 5 min
- Acetatpuffer pH 5,2 5 min

anschließende 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Färbung:

- Inkubieren in AEC-Lösung unter mikroskopischer Kontrolle 10-30 min
- Acetatpuffer pH 5,2 5 min
- Inkubieren in 1 x PBS 5 min
- Kurz in bidestilliertes Wasser eintauchen
- Inkubieren in Hämalaun 5 min
- Bläuen im fließenden Leitungswasser
- Eindecken in Glyceringelatine

3.2.2 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Maushepatomzelllinie 55.1c eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine adhärente Zelllinie, die aus einem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus gewonnen wurde. Diese Zellen weisen eine heterozygote Deletion im Exon 3 des *Ctnnb1*-Gens auf.

Arbeiten mit Zellkulturen dürfen nur unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, um Kontaminationen der Zellen mit Bakterien, Hefen, Pilzen u.ä. zu vermeiden. Dazu gehört das Arbeiten unter einer sterilen Werkbank, und die Verwendung steril verpackter Arbeitsmittel (Einmalpipetten, Kulturplatten, Spritzen, Nadeln). Lösungen wie PBS sowie Glas- und Reaktionsgefäße werden vor ihrer Verwendung autoklaviert, Pasteurpipetten durch trockene Hitze sterilisiert. Medien werden durch Filter der Porengröße 0,22 µm sterilfiltriert. Arbeitsmaterialien werden mit 70% Ethanol abgesprüht, bevor sie unter die sterile Werkbank gelegt werden. Beim Öffnen eines Gefäßes werden Deckel und Rand abgeflammt. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ unter Wasserdampfsättigung kultiviert. Lösungen, mit denen die Zellen in Kontakt kommen, werden auf 37°C erwärmt. Alle Schalen

müssen regelmäßig mikroskopisch auf Dichte, Zustand und Kontaminationen überprüft werden. Zur Kennzeichnung werden die Zellkulturplatten mit Datum, Zelllinie, Nummer der Passage und evtl. Zellzahl oder Volumen an Zellsuspension beschriftet.

3.2.2.1 Auftauen tiefgefrorener Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden. Zum Auftauen dieser tiefgefrorenen Zellen werden die die Zellsuspension enthaltenden Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt bis nur noch wenig gefrorene Zellsuspension übrigbleibt. Die Zellsuspension wird in ein steriles 15 ml Falconröhrchen überführt und die Zellen bei Raumtemperatur und 200 g für 5 Minuten zentrifugiert (Heraeus Minifuge T, 1000 rpm). Anschließend wird der Mediumüberstand abgesaugt und die Zellen in 4 ml frischem DMEM-Medium resuspendiert. Die Zellen können nun in eine Kulturschale mit 6 cm Durchmesser überführt werden. Durch vorsichtiges, gleichmäßiges Schwenken der Kulturschale wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Schale gewährleistet. Vor dem Überführen der Schale in den Brutschrank wird mikroskopisch die Zelldichte und die Lebensfähigkeit der Zellen überprüft, um gegebenenfalls eine andere Plattengröße wählen zu können. Bei geringer Zellzahl bzw. schlechter Vitalität der Zellen werden die Zellen in eine Kulturschale mit 3,5 cm Durchmesser bzw. bei höherer Zelldichte in eine Kulturschale mit 10 cm Durchmesser überführt. Anschließend werden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

3.2.2.2 Passagierung adhärenter Zellen

Bevor die Zelldichte auf der Kulturschale zu hoch wird, sollten 55.1c Zellen nach vier bis fünf Tagen passagiert werden, so dass das weitere Wachsen der Zellen weiterhin möglich ist.

Andernfalls kann es zu einer Ablösung des Zellrasens und damit zum Absterben der Zellen kommen.

Erhaltungskulturen von 55.1c-Zellen werden auf Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser angelegt. Das Medium der Zellen wird zunächst mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml steriler 1x PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wird 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und diese 5-10 min im Brutschrank inkubiert. Das Ende der Inkubationszeit wird makroskopisch (sichtbares Ablösen des Zellrasens) und mikroskopisch (abgerundete Zellen) kontrolliert. Die Trypsinierung wird durch Zugabe von 9 ml Vollmedium (FCS enthält Trypsininhibitor) gestoppt. Die Zellen werden durch mehrmaliges Trituieren mit Hilfe einer 10 ml-Spritze mit Kanüle (0,9 x 40 mm) vereinzelt und resuspendiert. Für neue Erhaltungskulturen werden drei Kulturschalen mit je 10 cm Durchmesser mit 0,1 ml, 0,3 ml und 0,5 ml der Zellsuspension versetzt und diese in je 10 ml Vollmedium resuspendiert. Sollen die Zellen für Versuche, wie z.B. transiente Transfektionen, ausgesät werden, muss gegebenenfalls vor Aussaat der Zellen eine Zellzahlbestimmung (s. Kap. 3.2.5.) durchgeführt werden.

3.2.2.3 Medienwechsel

Jeden zweiten bis dritten Tag muss ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Hierfür wird zunächst das überstehende Zellkulturmedium mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Der Zellrasen wird, im Fall einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser, mit 10 ml steriler 1x PBS-Lösung gewaschen. Die Lösung wird abgesaugt und 10 ml Vollmedium werden auf die Kulturschale gegeben. Die Zellen können dann weiter im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert werden.

3.2.2.4 Einfrieren adhärenter Zellen

Wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht haben, können sie bei Bedarf in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Werden die Zellen frisch aufgetaut, sollten sie erst nach zwei folgenden Passagierungen wieder eingefroren werden. Allerdings sollten die Zellen auch nicht zu oft passagiert worden sein, da die Zellqualität dann leiden kann und die Zellen nach dem erneuten Auftauen eventuell nicht mehr für Versuche bzw. für die Zellkultur eingesetzt werden können.

Für das Einfrieren von Zellen müssen zunächst zum Trypsinieren benötigte Lösungen (FCS-haltiges Medium, 1x PBS, Trypsin/EDTA-Lösung) im 37°C warmen Wasserbad vorgewärmt werden. Mit Zelllinie, Passage, Datum und Name beschriftete Kryoröhrchen und FCS-haltiges Medium mit 10% DMSO (v/v) werden auf Eis vorgekühlt. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen – im Fall einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser – mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Nach Absaugen der PBS-Lösung wird 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und die Kulturschale 5-10 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (analog Kap. 3.2.2.). Nach Ablösung der Zellen wird die Reaktion durch Zugabe von 9 ml FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen werden durch Trituieren vereinzelt und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt (s. Kap. 3.2.5.). Die Zellsuspension wird nun in ein 15 ml-Röhrchen überführt und 5 min bei RT und 200 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Medium-Überstandes werden die Zellen in eiskaltem FCS-haltigem Medium mit 10 % DMSO (v/v) resuspendiert, so dass eine Endkonzentration von 1-2 x 10⁶ Zellen/ml erhalten wird. Je 1 ml dieser Suspension wird in einem eisgekühlten Kryoröhrchen 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend werden die gekühlten Zellsuspensionen über Nacht bei -70°C gelagert und können am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt werden.

3.2.2.5 Zellzahlbestimmung

Vor dem Auflegen des Deckglases wird die Neubauer-Zählkammer angehaucht und somit angefeuchtet. Das Deckglas wird vorsichtig so aufgesetzt, dass die Newtonschen Ringe sichtbar werden. Durch Trituieren werden die Zellen gut vereinzelt und bei über 80% konfluenten Zellkulturschalen die Zellsuspension vor der Zählung 1:10 mit Vollmedium verdünnt. 10-15 μl der Zellsuspension werden auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei werden 2-3 Kleinquadrate, bestehend aus 16 Kleinstquadraten (s. Abb. 3-1), gezählt. Pro Kleinquadrat ergibt sich so ein Gesamtvolumen von 0,1 μl . Die Zellzahl pro ml errechnet sich aus der Zahl der Zellen pro 16 Kleinstquadrate nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl} * 10\,000 * \text{Verdünnung}$$

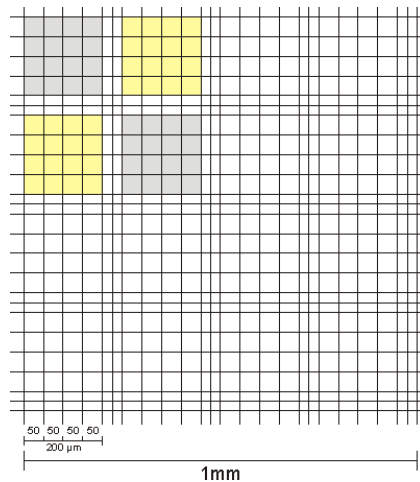


Abbildung 3.1: Neubauer-Zählkammer

3.2.3 Transiente Transfektion adhärenter Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen.

Dies kann mit chemischen, physikalischen oder biologischen Methoden erreicht werden.

Bei chemischen Transfektionsverfahren unterscheidet man zwischen der Kalzium-Phosphat-Präzipitation, der Lipofektion, sowie dem Einsatz kationischer Polymere. Physikalische Verfahren sind z.B. die Mikroinjektion oder die Elektroporation, während als biologische Verfahren Transferinfektion und Antikörper-vermittelte Transfektion unterschieden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Lipofektionen durchgeführt. Genetisches Material wird mit Hilfe von Liposomen, also Vesikeln, die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle eingebracht. Die in die Zelle einzuführende DNA wird mit Hilfe von kationischen Liposomen komplexiert. Diese fusionieren anschließend mit der Zelle, so dass die DNA in die Zelle aufgenommen wird. Man nimmt an, dass diese Aufnahme der DNA-Liposomen-Komplexe durch Endocytose erfolgt (Barron *et al.*, 1999). Häufig eingesetzte, kationische Lipide sind DOTMA (N-[1-(2,3-Dioleoyl)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) und DDAB (Dimethyldioctadecylammoniumbromid) sowie sogenannte Helferlipide, wie Cholesterin oder DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin). Die Vorteile der Plasmid-Liposomen-Komplexe bestehen darin, dass sie für gewöhnlich nicht immunogen und nur wenig zytotoxisch, sowie in der Größe nur wenig beschränkt sind. Ihr Nachteil ist die im Vergleich zu anderen Transfektionsmethoden relativ geringe Effizienz.

3.2.4 Transiente Transfektion mit GenePorter[®] 2

Das GenePorter[®] 2 Transfektionsreagenz (Peqlab, Erlangen) ermöglicht aufgrund einer speziellen Lipidrezeptur die Transfektion einer Reihe von Säugerzellen mit hoher Transfektionseffizienz. Des Weiteren wird aufgrund des speziellen Diluenten eine

Transfektion in serumhaltigem Medium möglich, was die toxische Wirkung des Transfektionsreagenz auf die Zellen verringert.

Sämtliche Transfektionen im Rahmen dieser Arbeit werden auf 24-well-Platten durchgeführt. Die Zellen – hier 55.1c-Maushepatomzellen – werden 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/Vertiefung ausgesät (dies entspricht ca. 60% Konfluenz). Zum Zeitpunkt der Transfektion haben die Zellen dann eine Konfluenz von ca. 70-80% erreicht. Für die Transfektion wird das lyophilisierte GenePorter[®] 2 Transfektionsreagenz zunächst in 1,5 ml Hydratisierungspuffer (Pepqab) rehydratisiert und das Reagenz durch Vortexen gelöst. Pro Vertiefung einer 24-well-Platte werden 3,5 µl GenePorter[®] 2 Transfektionsreagenz mit 21,5 µl FCS-freiem Medium versetzt und der Ansatz durch Vortexen gemischt (= Lösung 1). Je Ansatz werden 1,1 µg DNA (Zusammensetzung s.u.) mit 25 µl DNA-Diluent (Pepqab, Erlangen) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (Lösung 2). Zu Lösung 1 werden nun 25 µl Lösung 2 gegeben und dieser Ansatz durch Trituieren gemischt. Die so erhaltene Lösung 3 wird 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden pro Ansatz 450 µl FCS-haltiges Medium zugegeben und die Lösung gemischt (Transfektionslösung).

Das Medium wird nun von den Zellen abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 500 µl 1x PBS pro Vertiefung gewaschen. Nach Absaugen der PBS-Lösung werden pro Vertiefung 500 µl der Transfektionslösung zugegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. 24 Stunden nach der Transfektion können die Zellen je nach Versuchsaufbau entweder mit Induktoren behandelt werden oder es wird ein normaler Mediumwechsel durchgeführt, bevor die Zellkulturschale weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert wird. 48 Stunden nach erfolgter Transfektion werden die Zellen für den Dual-Luciferase Reporter[®] Assay aufgearbeitet.

3.2.5 Transfektionsschema

Die transienten Transfektionen der 55.1c-Maushepatomzellen werden auf 24-well-Platten durchgeführt. Pro Vertiefung einer 24-well-Platte werden insgesamt 1,1 µg DNA, bestehend aus 0,65 µg Expressionsvektor(en), 0,45 µg Reportervektor und 0,01 µg pRL-CMV-Renilla-Expressionsvektor, pipettiert. Alle Transfektionen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die verwendeten Vektoren sind in Kap. 2.1.4 beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit werden mit Hilfe von transienten Transfektionen von Maushepatomzellen die Auswirkungen von Wildtyp- bzw. in Codon 33 punktmutiertem *Ctnnb1* auf die Expression einzelner Gene untersucht. Dabei werden Reportergerkonstrukte verwendet, die eine ca. 2,7 kb große *upstream*-regulatorische Region des Cytochrom P450 2B1-Gens (pGL3C2B1) oder Dioxin-responsive Elemente (pT81Luc/3xDRE) enthalten.

Die Transfektionen werden nach folgendem Schema angesetzt:

Vektor	1	2	3	4	5	6	7	8	Menge in µg
Leervektor pCI-neo	+	+	-	-	+	+	-	-	0,325
pβCat^{S33Y}/CIneo	-	-	+	+	-	-	+	+	0,325
Leervektor Rezeptor¹	+	+	+	+	-	-	-	-	0,325
Rezeptor²	-	-	-	-	+	+	+	+	0,325
Renilla (pRL-CMV)	+	+	+	+	+	+	+	+	0,01
Reporter³	+	+	+	+	+	+	+	+	0,45

Rezeptor	AhR	CAR
¹: Leervektor für Rezeptor	pCMV4	pCI-neo
²: Vektor für Rezeptor	pDR-CMV	mCAR1/pCR3
³: Reportervektor	pT81Luc/ 3xDRE	pGL3C2B1
⁴: Induktor	TCDD	Phenobarbital
Lösungsmittel für Induktor	DMSO	1xPBS
µl Induktor	0,5	5
Stammkonzentration Induktor	10 ⁻⁵ M	0,2 M
Endkonzentration Induktor	10 ⁻⁸ M	2x10 ⁻³ M

Die Proben 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6 sowie 7 und 8 werden jeweils im gleichen Gefäß und als 5fach-Ansätze (4 Proben + Pipettierreserve) angesetzt, da sie sich lediglich in der Behandlung mit dem Induktor unterscheiden und bei der Transfektion die gleichen Vektoren eingesetzt werden.

3.2.6 Reportergenanalysen

Reportergene werden bei Expressionsstudien in eukaryotischen Zellen eingesetzt. Mit Hilfe dieser Gene können bestimmte Qualitäten und Effekte anderer Gene gezeigt werden. Reporter-Gene sind z.B. das Luciferase-Gen oder das β-Galactosidase-Gen. Die Aktivität der Proteine dieser Gene kann über ein messbares optisches Signal sichtbar gemacht werden.

β-Galactosidase kann zur Bestimmung der Transfektionseffizienz eingesetzt werden, während Luciferase zur Untersuchung einer Promotoraktivität eingesetzt werden kann. Luciferasen sind strukturell unterschiedliche Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine mit Sauerstoff reagieren (Oxidation) und es zur Biolumineszenz kommt. Unterschieden werden unter anderem Firefly-Luciferasen (aus dem Leuchtkäfer), bei denen Luciferol, ATP und Sauerstoff

zu Kohlendioxid, AMP und Licht reagieren, und Renilla-Luciferasen, die nur Luciferol und Sauerstoff (kein ATP) zur Reaktion benötigen. Die so erzeugte Biolumineszenz kann leicht mit einem Chemilumineszenzassay nachgewiesen werden (siehe unten).

Ein Beispiel für den Einsatz des Luciferase-Gens ist im Folgenden beschrieben. Bei Kulturzellen, die einen Rezeptor X exprimieren, für den ein Agonist gefunden werden soll, wird das Gen für Protein X durch das Luciferase-Gen ersetzt. Der Agonist kann den Promotor des Protein-X-Gens aktivieren, so dass statt Protein X die Luciferase exprimiert wird. Die Quantifizierung des Luciferase-Proteins liefert so indirekt Informationen über die Transkriptionsaktivität des vorangeschalteten Promotors, der die Expressionsstärke des Reporterproteins steuert.

3.2.6.1 Dual-Luciferase Reporter® Assay

Für die Reporteranalyse wird das Kit “Dual-Luciferase Reporter® Assay” von Promega eingesetzt. Im Rahmen dieses Assays werden Luciferasen aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*; *Firefly*) sowie der gemeinen Seefeder (*Renilla reniformis*; *sea pansy* bzw. *Renilla*) als Reporter verwendet. Dabei dient das Plasmid pRL-CMV, das das Gen für die Renilla-Luciferase enthält, als Coreporter, durch dessen Aktivität man einen Standard erhält, auf die die Aktivität der Firefly-Luciferase normiert werden kann. Durch den Einsatz unterschiedlicher Substrate und durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen können die beiden Enzyme sequentiell im selben Ansatz gemessen werden.

Für den Luciferase-Assay muss zunächst der im Kit erhaltene 5x Passive Lysis Buffer (PLB) mit bidestilliertem Wasser zu 1x PLB verdünnt werden. Dieser kann direkt verwendet oder bei -20°C gelagert werden. Pro Vertiefung einer 24-well-Platte werden 100 μl 1x PLB eingesetzt, so dass die Zellen passiv, also ohne Abschaben oder Einfrieren, lysiert werden können. Das *Luciferase Assay Substrat* für die Firefly-Luciferase wird in 10 ml

Luciferase Assay Buffer II gelöst, wodurch das *Luciferase Assay Reagent II (LAR II)* erhalten wird. Dieses ist vier Wochen bei -20°C bzw. ein Jahr bei -70°C haltbar. Das *Stop&Glo[®]*-Substrat für die Renilla-Luciferase wird im Verhältnis 1:50 in *Stop&Glo[®]*-Puffer verdünnt, so dass das *Stop&Glo[®] Reagent (S&G)* erhalten wird, welches maximal 14 Tage bei -20°C gelagert werden kann. Da beide Lösungen durch häufiges Auftauen und Einfrieren an Aktivität verlieren können, werden sie vor dem Einfrieren in 1,5 ml-Gefäße aliquotiert.

Die transfizierten Zellen müssen zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen werden, wobei pro Vertiefung einer 24-well-Platte je 500 μl PBS eingesetzt werden. Nach Absaugen der PBS-Lösung werden pro Vertiefung 100 μl 1x PLB zugegeben und die Zellen unter Schütteln bei Raumtemperatur 15 min lysiert (Heidolph Titromax 1000). Das so erhaltene Zelllysate wird für die Messung auf Eis gelagert und kann direkt zur Lumineszenz-Messung eingesetzt werden. Es kann nach der Messung bei -20°C gelagert werden und ist so ca. 3-4 Wochen haltbar.

Die Messung wird mit Hilfe des EG&G Berthold-Luminometers durchgeführt. In ein 5 ml-Röhrchen (Sarstedt) werden 50 μl LAR II vorgelegt. Nach Zugabe von 10 μl Lysat wird die Lösung durch Trituieren gemischt und die 10-sekündige Messung der Firefly-Lumineszenz im Luminometer durchgeführt. Anschließend werden 50 μl S&G-Reagenz zugegeben und der Ansatz durch Vortexen gemischt. Durch dieses Reagenz wird die Lumineszenz der Renilla-Luciferase messbar und gleichzeitig die durch die Firefly-Luciferase erzeugte Lumineszenz um den Faktor 100.000 gequencht. Nach erneuter 10-sekündiger Messung im Luminometer kann die Auswertung erfolgen. Hierfür wird der Quotient aus den Lumineszenzen der Firefly- und Renilla-Luciferase gebildet.

3.2.7 Western-Blot

Um die Expression von β -Catenin, Glutaminsynthetase und der Cytochrom P450-Isoenzyme auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Beim Protein-Blotting werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung zunächst gelelektrophoretisch getrennt, elektrophoretisch auf eine Trägermembran überführt und dann einer Nachweisreaktion unterzogen, die für die zu untersuchenden Proteine der getrennten Mischung spezifisch ist. An Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese schließen sich also der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran, die Nachweisreaktion und abschließend die Visualisierung an.

3.2.7.1 Proteinisolierung aus Gewebe

Für die Untersuchung der Expression verschiedener Proteine werden Lebergewebehomogenate eingesetzt. Zur Herstellung dieser Homogenate werden Leberproben in Homogenisierungspuffer (WCE-Puffer) mit Hilfe einer Kugelmühle unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zertrümmert und anschließend im Ultraschallbad beschallt, um eine vollständige Homogenisierung der Gewebe inklusive Zerstörung der Zellkerne zu erreichen.

Durchführung:

- alle benötigten Geräte (Teflongefäße, Mikrogefäße, Pinzette, Spatel) mit flüssigem Stickstoff vorkühlen.
- 500 μ l des Homogenisierungspuffers in gekühltem Teflongefäß vorlegen.
- Leberprobe und Stahlkugel zugeben und Gefäß verschließen.
- Probe 30 sec im Mikrodismembrator zertrümmern.

- Probe in gekühltes Mikrogefäß geben und 30 min auf Eis auftauen lassen.
- dabei Proben mehrmals vortexen und Lebergewebe anschließend 30 sec bei mittlerer Stärke mit Hilfe von Ultraschall vollständig zertrümmern.

Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14 000 rpm und 4°C wird eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und somit die Gesamtproteinmenge bestimmt. Die Leberhomogenate können nach 5-minütigem Erhitzen auf 95°C bei –20°C in 2x Laemmli-Puffer gelagert werden.

3.2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet.

In Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliant-Blau G250-Farbstoffs von 465 zu 595 nm. Der Grund dafür ist die Komplexbildung des Farbstoffs mit Proteinen, die zur Stabilisierung seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform führt. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes ist sehr viel höher als der des freien Farbstoffes. Somit kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Proteinbestimmung ist relativ unempfindlich gegen Störungen. Jedoch zeigt der Assay signifikante Unterschiede zwischen individuellen Proteinen. Er eignet sich daher besonders zur Gesamtproteinbestimmung in Zelllysaten. Ein weiterer Vorteil der Proteinbestimmung nach Bradford besteht darin, dass das

Absorptionsmaximum des Protein-Farbstoffkomplexes schon nach 2 min erreicht ist und anschließend circa eine Stunde konstant bleibt.

Für die Berechnung des Proteingehalts einer Probe werden Eichlösungen mit bekannten Proteinmengen benötigt, aus denen eine Eichgerade erstellt werden kann. Aus dieser können dann die zu ermittelnden Proteinmengen errechnet werden.

Die Eichgerade wird wie folgt pipettiert:

Proteinkonzentration in µg/ml	BSA in µl [5 mg/ml in Wasser]	bidestilliertes Wasser in µl	Lyse-Puffer in µl
0	0	980	20
25	5	975	20
50	10	970	20
75	15	965	20
100	20	960	20
125	25	955	20
150	30	950	20
200	40	940	20
300	50	920	20

Zunächst wird das Farbreagenz (Quick Start Bradford Protein Assay Kit, Bio-Rad) im Verhältnis 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Für die Proteinbestimmung werden je Probe Dreifachbestimmungen durchgeführt. Pro Probe werden 10 µl der Proteinlösung im Verhältnis 1:100 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und der Ansatz gut gemischt. Je 20 µl der so verdünnten Probe bzw. der Proteinstandards der Eichkurve werden mit 1000 µl des verdünnten Farbreagenz versetzt und gut gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur werden die Proben erneut gemischt. Die Extinktion der Proben bei 595 nm wird im Photometer gemessen. Anschließend kann aus den gemessenen Proteinstandards die Eichgerade erstellt und mit Hilfe der Geradengleichung und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Proteingehalt der Proben bestimmt werden.

Dieser berechnet sich wie folgt:

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = \frac{\text{Absorption} * \text{Verdünnung}}{\text{Steigung}_{\text{Eichgerade}}}$$

3.2.7.3 Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine lassen sich durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Bei der eindimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung der Anode in Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt. SDS ist ein anionisches Detergens, welches die Eigenladung von Proteinen so effektiv überdeckt, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Massenanteil Protein entstehen (1,4 g SDS/g Protein).

Vor der Elektrophorese werden die Proben denaturiert, so dass Sekundär-, Tertiär und Quartärstrukturen aufgelöst werden. Daher erfolgt die nachfolgende elektrophoretische Trennung der Proteine lediglich nach ihrem Molekulargewicht, nicht nach ihrer ursprünglichen Eigenladung oder nativen Konformation, wobei die Laufstrecke dem Logarithmus des Molekulargewichts proportional ist.

Für die Gelherstellung werden zunächst Acrylamidstammlösungen nach folgendem Schema hergestellt:

- Sammelgel-Stammlösung (Acrylamidkonzentration: 4%):
 - Rotiphorese Gel A (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) 13,3 ml
 - 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 25 ml
 - bidest. Wasser 60 ml
 - 20% SDS 0,5 ml

- Trenngel-Stammlösung (Acrylamidkonzentration: 10%):
 - Rotiphorese Gel A (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) 33 ml
 - 1,5 M Tris-HCl, pH 8,9 25 ml
 - bidest. Wasser 40 ml
 - 20% SDS 0,5 ml

Die Stammlösungen können aliquotiert und bei -20°C mehrere Monate oder bei 4°C für kürzere Zeiträume gelagert werden.

Für die Gelelektrophorese wird zunächst die Minigelkammer (10,3 cm x 8,3 cm) zusammengebaut und die seitlichen Ränder sowie der untere Rand der Kammer mit 1%-iger Agarose abgedichtet. Für ein 10%-iges Trenngel werden folgende Komponenten pipettiert:

- Trenngel-Stammlösung (Acrylamidkonzentration: 10%) 10 ml
- 10%-ige Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung 200 μl

Nach Mischen des Ansatzes werden 20 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationsstarter zugegeben und der Ansatz nach nochmaligem Mischen in die Gelkammer gegossen. Nach Überschichten des Trenngels mit Isopropanol lässt man das Gel mindestens 60 min polymerisieren. Nach 60 min kann das Isopropanol abgegossen und das 4%-ige Sammelgel vorbereitet werden. Hiefür werden folgende Komponenten pipettiert:

- Sammelgel-Stammlösung (Acrylamidkonzentration: 4%) 15 ml
- 10%-ige Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung 150 µl

Nach Mischen des Ansatzes werden 15 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationsstarter zugegeben und der Ansatz nach nochmaligem Mischen in die Gelkammer gegossen. Man lässt das Gel mindestens 60 min polymerisieren und setzt es anschließend in die Gelelektrophoreseapparatur ein. Diese wird mit 1x SDS-PAGE Laufpuffer gefüllt. Nach Ziehen des Gelkamms werden die einzelnen Taschen mit 1x SDS-PAGE Laufpuffer luftblasenfrei gespült und somit von Polymerteilchen gereinigt, die beim Auftrag der Proben stören würden.

Die Proben werden 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer verdünnt. Proben und Markerproteine werden 5 min bei 95°C inkubiert und kurz gründlich gemischt. Nach dem Abkühlen wird das Kondenswasser kurz abzentrifugiert und die Proben erneut gemischt. Mit Laemmli-Puffer versetzte Proben können bei –20°C mehrere Monate lang gelagert werden und müssen vor dem Probenauftrag erneut 5 min auf 40°C erhitzt und gemischt werden.

Von jeder Probe werden 10 µg Protein aufgetragen. Als Marker werde je 5 µl *BenchMarkTM Prestained Protein Ladder* (Gibco BRL; Fragmentgrößen: 184,2 kDa; 115,5 kDa; 83,6 kDa; 61,5 kDa; 50,8 kDa; 37,5 kDa; 25,4 kDa; 20,0 kDa; 14,0 kDa; 9,3 kDa) und *Kaleidoscope Prestained Standard* (Fragmentgrößen: 208 kDa; 144 kDa; 87 kDa; 44,1 kDa; 32,7 kDa; 17,7

kDa; 7,1 kDa) eingesetzt. Neben den eigentlichen Proben muss auch der *Kaleidoscope Prestained Standard* vor dem Gelauftrag 5 min auf 40°C erhitzt werden.

Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V ca. 60 min.

3.2.7.4 Proteintransfer auf eine Polyvinylfluorid-Membran (PVDF-Membran)

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Der Transfer muss immer senkrecht zur Trennrichtung erfolgen, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein elektrophoretischer Transfer durchgeführt (Towbin, 1979), bei dem die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Membran überführt werden. Hierfür wird das Wet-Verfahren (Tank-Blot) eingesetzt.

Als Blottingmembran wird eine Polyvinylidifluorid-Membran (PVDF-Membran) eingesetzt, die eine sehr gute Bindekapazität für Proteine (bis zu 600 µg/cm²), eine gute Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln, eine hohe Reißfestigkeit und ein gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis mit Chemilumineszenz-Detektionssystemen aufweist. Sie muss vor Verwendung erst noch mit Methanol benetzt werden. Bei der Wahl des Transferpuffers muss darauf geachtet werden, dass der Puffer kein Natriumchlorid oder andere gut leitende Salze enthält, da dies zu sehr hohen Strömen führt, was einen schlechteren Transfer und eine Überhitzung von Blot und Apparatur zur Folge haben kann. Außerdem ist es wichtig, dass sich der pH-Wert des Transferpuffers und der isoelektrische Punkt des zu transferierenden Proteins unterscheiden. Der Methanolgehalt im Transferpuffer erleichtert das Benetzen der Membran und lockert die Bindung der Proteine an SDS, was ihre Bindung an die PVDF-Membran verbessern und damit höhere Transferraten liefern soll (Jacobson und

Karsnäs, 1990). Membran, Filterpapiere und Gel dürfen nur mit Handschuhen angefasst werden, um Verschmutzungen und Fingerabdrücke zu vermeiden.

Zunächst wird die Transferapparatur mit 1x Transferpuffer (methanolhaltig) gefüllt und ca. 1 h im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt. Die PVDF-Membran wird mit Kugelschreiber beschriftet, kurz in Methanol angefeuchtet und anschließend mind. 10 min in 1x Transferpuffer (methanolhaltig) geschüttelt.

Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel entfernt und der Blot nach folgendem Schema von unten nach oben aufgebaut:

Kathode (schwarz)
Schwamm 1
Whatman 3 MM Papier
Gel
PVDF-Membran
Whatman 3 MM Papier
Schwamm 2
Anode (rot)

Der mit Transferpuffer angefeuchtete Schwamm 1 wird auf der schwarzen Platte der Transferkammer positioniert. Ein Whatmann 3 MM Filterpapier wird auf das Gel aufgelegt und beides wird mit dem Filterpapier nach unten auf Schwamm 1 gelegt. Die PVDF-Membran wird so auf das Gel aufgebracht, dass die Beschriftung dem Gel zugewandt ist und die Oberkante der Membran mit dem Gel abschließt. Luftblasen zwischen Gel und Membran werden entfernt, indem man mit einem Rührfisch vorsichtig über die Membran streicht. Auf die Membran wird ein zweites Whatmann 3 MM Filterpapier gelegt und Luftblasen wiederum entfernt. Nach Auflegen von Schwamm 2 wird die Transferkammer geschlossen und in die Transferapparatur eingebracht. Der Transfer erfolgt bei 400 mA 2,5 h bei 4°C unter Rühren

mit einem Magnetrührer. Anschließend läßt man die PVDF-Membran an der Luft bei Raumtemperatur trocknen.

3.2.7.5 Nachweisreaktion

Für die Nachweisreaktion werden Primär- und Sekundärantikörper in Blockierungspuffer, dessen Zusammensetzung von den verwendeten Antikörpern abhängt, angesetzt. Alle Antikörperinkubationen werden bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Die Volumina werden so gewählt, dass die Membran gut mit Lösung bedeckt ist (ca. 10 ml). Die vorher luftgetrocknete PVDF-Membran wird kurz in Methanol angefeuchtet bis sie durchscheinend ist. Die Membran wird anschließend 1,5 h in Block-Puffer (I-Block; Fa. Tropix) inkubiert. Anschließend wird sie für weitere 1,5 h in einer Lösung, die den ersten Antikörper verdünnt in Blockpuffer enthält, inkubiert. Nach 2 x 5 min Schütteln in Blockpuffer und weiteren 2 x 5 min Schütteln in PBS/T-Puffer wird die Membran 1 h in einer Lösung aus zweitem Antikörper, Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Alkalische Phosphatase-konjugiert), 1:10 000 verdünnt in Blockpuffer geschüttelt. Nach 2 x 5 minütigem Waschen in Blockpuffer und 2 x 5 minütigem Waschen in PBS/T-Puffer wird die Membran 2 x 2 min in 1x Assay-Puffer gewaschen. Bis zur anschließenden Inkubation mit dem Chemilumineszenz-Substrat kann die Membran in Assay-Puffer gelagert werden, gegebenenfalls auch über Nacht bei 4°C.

3.2.7.6 Chemilumineszenz-Nachweis (Visualisierung)

Die Aufnahme des Chemilumineszenz-Signals erfolgt mit Hilfe eines CCD-Kamerasystems. Als Chemilumineszenz-System wird die Umsetzung von CDP-Star von Tropix mit Alkalischer Phosphatase eingesetzt. CDP-Star ist ein 1,2-Dioxetan mit einer Phosphatgruppe

und zerfällt nach Hydrolyse der Phosphatgruppe durch Alkalische Phosphatase zu einem aktivierten Produkt. Im Zuge der Inaktivierung dieses Produktes wird ein Lichtquant entsendet, das detektiert werden kann. Das Tropix-System zeigt seine maximale Chemilumineszenz erst nach ca. 1 h, danach fällt das Ausmaß der Lichtentwicklung langsam auf einen Wert, der etwa 75% des Maximums entspricht. Auf diesem Niveau bleibt die Chemilumineszenzintensität über einen längeren Zeitraum fast konstant (mind. 1 Tag). Diese lange Phase der Chemilumineszenzentwicklung reicht aus, um eine Aufnahme mit der CCD-Kamera durchzuführen und ermöglicht auch eine eventuelle Wiederholung der Signalerfassung.

Die mit Assay-Puffer angefeuchtete Membran wird auf eine Glasplatte gelegt und mit ca. 1 ml gebrauchsfertiger CDP-Star-Lösung versetzt. Die Lösung sollte sich möglichst gleichmäßig auf der Membran verteilen und Luftblasen sollten verhindert werden. Die Membran wird 5 min mit dem Substrat bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend lässt man die Substratlösung ablaufen und legt die Membran in eine Klarsichthülle, wobei überschüssige Lösung mit Kimwipe-Tüchern ausgestrichen wird.

Die Visualisierung kann direkt mit Hilfe des CCD-Kamerasystems erfolgen, wobei zunächst eine Aufnahme der Membran unter Auflicht und voll geöffneter Blende gemacht wird, um die Lage der Banden von Markerproteinen und Proben vergleichen zu können. Anschließend wird die Aufnahmekammer geschlossen und die Aufnahme mit der entsprechenden Anzahl an Lesezeitrahmen so oft wiederholt, bis sich die automatische Kontrasteinstellung für „white level“ auf einen Wert von etwa 0,9 einstellt.

3.2.8 Untersuchung der mRNA-Expression

3.2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenen Lebern (Normalgewebe und Tumorgewebe) mit Trizol

Die Verwendung von Trizol (Invitrogen) zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen stellt eine Verbesserung der RNA-Isolierungsmethode nach Chomczynski und Sacchi (1987) dar. Trizol ist eine gebrauchsfertige Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, die zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben eingesetzt werden kann.

Circa 20 mg der zu untersuchenden Lebergewebeprobe werden mit Hilfe einer Kugelmühle zermörsert. Hierfür werden die Bestandteile der Kugelmühle zunächst in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. In das gekühlte Teflongefäß werden 500 µl Trizol vorgelegt und eingefroren, die Gewebeprobe zugegeben, die Kugel hineingegeben und das Gewebe im geschlossenen Gefäß ca. 30 sec zermörsert. Die pulverisierte Probe wird in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen, in dem 1,5 ml Trizol vorgelegt werden, gegeben. Nach 5 min Inkubation der Suspension bei Raumtemperatur werden 0,4 ml Chloroform zugegeben und 15 sec geschüttelt. Nach 2-3 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Suspension 25 min bei 4°C und 7500 rpm zentrifugiert (Beckman Zentrifuge J2-21). Die wässrige obere Phase wird in ein neues Gefäß überführt und mit 1,5 ml Isopropanol versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur (Fällung) werden die Proben bei 7500 rpm und 4°C 20 min zentrifugiert (Beckman Zentrifuge J2-21). Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 2 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 7000 rpm wird das Pellet 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Lagerung der RNA-Lösung erfolgt bei -70°C.

3.2.8.2 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgt photometrisch (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Konzentrationsbestimmung wird die RNA-Lösung 1:100 mit TE-Puffer versetzt und die Extinktion der Lösung bei 260 nm bestimmt. Als Leerwert dient die Absorption des reinen TE-Puffers. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einem Gehalt von 40 µg RNA/ml. Die Berechnung der Konzentration erfolgt daher nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration}_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Reinheitsgrad der RNA wird durch die Bestimmung des Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. In der Regel lag dieser zwischen 1,8 und 2,0.

3.2.8.3 Kontrolle der isolierten Gesamt-RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Anhand des Laufverhaltens der RNA in einem 1%-igen Agarosegel wird die RNA-Präparation überprüft. Hierzu werden 0,6 ml Agarose (ultra pure) in 60 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 50°C in eine Gelkammer gegossen. Die Auftragsvolumina der RNA-Proben werden abhängig von der jeweiligen RNA-Konzentration der Lösungen so gewählt, dass ca. 5 µg RNA auf das Gel aufgetragen werden. Als Marker wird die 9,5-0,24 kb RNA-Leiter (RNA-Fragmente: 9,49 kb; 7,46 kb; 4,40 kb; 2,37 kb; 1,35 kb; 0,24 kb) der Firma Gibco BRL eingesetzt. Die jeweiligen Probenvolumina werden mit 2 µl 10x Ladepuffer versetzt, auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen und 1,5 h bei 90 V in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in 0,1%iger

wässriger Ethidiumbromidlösung 15 min gefärbt und unter UV-Bestrahlung mit dem CCD-Kamerasystem ausgewertet.

3.2.9 Reverse Transkriptase-Reaktion

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt wie andere Polymerasen einen Primer (ein kurzer, komplementärer DNA-Abschnitt) zur Synthese, welcher an die RNA bindet. Als Primer werden ein Oligo-dT-Abschnitt (10-15 Basen), welcher komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist, sowie 'random' Hexamere (6 zufällig zusammengesetzte Basenpaare) eingesetzt.

3.2.9.1 RT-Reaktion ohne vorherigen DNase-Verdau

Für die RT-Reaktion wird folgender Ansatz pipettiert:

4 µl	RNA [125 ng/µl]
6,5 µl	Wasser
2 µl	10x RT-Puffer
4 µl	25 mM Magnesiumchlorid
2 µl	10 mM dNTP-Mix
0,5 µl	oligo(dT) [0,5 µg/µl]
0,5 µl	Random Hexamere (N) ₆ [0,5 µg/µl]
0,5 µl	Reverse Transkriptase
<hr/>	
Σ	20 µl

Der Ansatz wird 1 Stunde bei 42°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch fünfminütige Inkubation bei 95°C beendet.

3.2.9.2 RT-Reaktion mit vorherigem DNase-Verdau

Mit Hilfe des Quanti Tect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) kann die RT-Reaktion nach vorherigem DNase-Verdau (Elimination genomischer DNA) in einem Ansatz durchgeführt werden.

Die Reaktion wird nach folgendem Schema pipettiert:

Ansatz I:

1 µl	Quanti Tect® DNA-Wipeout Puffer (7x)
4 µl	Quanti Tect® RNase-freies Wasser
2 µl	RNA [125 ng/µl]

Ansatz I wird 2 min bei 42°C inkubiert, um eventuell im Ansatz vorhandene genomische DNA zu eliminieren, und anschließend direkt auf Eis gelagert.

Ansatz II:

0,5 µl	Quanti Tect® Reverse Transkriptase
2 µl	Quanti Tect® RT Puffer (2x)
0,5 µl	Quanti Tect® RT Primer Mix

Pro Probe werden 3 µl Ansatz II zu Ansatz I gegeben und gemischt. Der Mix wird 15 min bei 42°C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend 3 min bei 95°C inaktiviert. Die so

erhaltene cDNA wird 1:1 mit bidestilliertem Wasser gemischt und kann direkt für die Real-Time PCR eingesetzt werden.

3.2.10 Real-Time PCR (Lightcycler-Analyse)

Die Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sie bietet zusätzlich die Möglichkeit der relativen oder absoluten Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Reaktion (daher der Name "Real Time") durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. In der vorliegenden Arbeit wurde das Lightcycler-System von Roche eingesetzt.

Die einfachste Methode der Quantifizierung von PCR-Produkten ist der Einsatz von DNA-Farbstoffen, wie SYBR[®] Green I. Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein bzw. binden an doppelsträngige DNA. Dadurch steigt die Fluoreszenz der Farbstoffe an. Somit korreliert die Zunahme der DNA im Verlauf der PCR mit der Fluoreszenz-Zunahme von Zyklus zu Zyklus. Dieses Verfahren ist allerdings nur wenig spezifisch, da es nicht möglich ist, verschiedene PCR-Produkte zu unterscheiden und keine Multiplex-Messungen durchgeführt werden können. Vorteil des Verfahrens ist, dass nach der PCR eine Schmelzkurve aufgenommen wird, anhand derer die Fragmentlänge(n) der Produkte und dadurch die Spezifität der PCR überprüft werden kann.

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird durch langsame, kontinuierliche Temperaturerhöhung (50°C → 95°C) die DNA aufgeschmolzen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird aus dem Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Abnahme der Fluoreszenz registriert wird. Doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten weist einen höheren Schmelzpunkt auf, als unspezifisch entstandene Primerdimere, wodurch eine Unterscheidung möglich ist.

Durch die Höhe des Schmelzkurvenpeaks ist eine ungefähre, relative Mengenabschätzung des gebildeten Fragments möglich.

Für die Quantifizierung können verschiedene Rechenmodelle verwendet werden, wobei meistens ein Referenz-Gen (z.B. GAPDH oder Actin) mitgemessen wird, um einen relativen Menge-Vergleich durchzuführen (relative Quantifizierung). Zu Beginn der PCR ist die Templatenmenge begrenzt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich Primer, Template und Polymerase treffen, niedrig. Mit jedem PCR-Zyklus steigt die Produktmenge an, so dass es in den letzten Phasen der PCR zu einer Hybridisierung von Produktfragmenten untereinander kommt, die Substrate langsam verbraucht und letztlich Polymerase und Nucleotide langsam durch die Hitze zerstört werden. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Exponentiell bleibt eine PCR bei 12 bis 400 Ausgangskopien für ca. 30 Zyklen, bei 400 bis 3200 für 25 Zyklen und bei anfänglich 3200 bis 51200 für höchstens 20 Zyklen. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird häufig der CT-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") bzw. der Cp-Wert (Crossing Point) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Die Effizienz E kann mit Hilfe der Steigung m einer Standardkurve berechnet werden:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Eine Steigung m von -3.32 würde somit eine Effizienz von 100 % bedeuten, d.h. eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus, eine Steigung m von -3.58 eine Effizienz von 90 %.

3.2.11 Plasmidtransformation und -präparation

3.2.11.1 Plasmidvermehrung in transformationskompetenten *E.coli* DH5 α und One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*

Plasmide können mit Hilfe von Bakterienzellen vermehrt werden. Diese Zellen sollten eine möglichst hohe Effizienz bezüglich der Aufnahme der Plasmid-DNA aufweisen. Außerdem sollten die Bakterienzellen die aufgenommene Plasmid-DNA nicht als Fremd-DNA erkennen, da sie sonst über Restriktionsenzyme abgebaut würde. Daher müssen transformationskompetente *E.coli*-Stämme einen bestimmten Genotyp aufweisen. Erkennung und Abbau von Fremd-DNA in Bakterien können z.B. mit Hilfe eines Adenin-methylierungsabhängigen Restriktionssystems erfolgen. Dabei handelt es sich um einen Enzymkomplex, der aus einer Untereinheit für die Erkennung spezifischer Sequenzen, einer Methylierungsuntereinheit und einer Restriktionseinheit aufgebaut ist. Um Fremd-DNA, z.B. nichtmethylierte DNA in Bakterienzellen vermehren zu können, müssen diese Bakterienstämme inaktivierende Mutationen in diesem Enzymkomplex aufweisen.

Um die spätere Selektion transformierter Zellen zu ermöglichen, müssen die Plasmide ein Antibiotikumresistenzgen, z.B. ein Ampicillinresistenzgen, tragen. In diesem Fall können nur Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, in ampicillinhaltigem Medium wachsen. Die *E.coli*-Zellen müssen zunächst vorbehandelt werden, um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen. Dabei werden die Bakterien bei 18°C kultiviert, mit Kalium-, Calcium- und Mangansalzen behandelt und anschließend für die Lagerung mit DMSO-Zusatz bei -70°C eingefroren. Dabei kann man hochkompetente Zellen mit einer Transformationseffizienz von 10^8 - 10^9 Transformanten pro μg Plasmid-DNA erhalten (Inoue *et al.*, 1990).

Für die Bakterientransformation und die Anzucht wird ein 200 µl-Aliquot der transformationskompetenten *E.coli* auf Eis aufgetaut und resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird mit 1 µl Plasmid-DNA-Lösung gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Erwärmen des Bakterien/Plasmid-Gemischs im Wasserbad auf 42°C für 45 sec wird es erneut 5 min auf Eis inkubiert und die Suspension in 3 verschiedenen Konzentrationen (unverdünnt, 1:10 und 1:50) direkt auf die vorbereiteten LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden Einzelklone, die auf den LB-Amp-Agarplatten gewachsen sind, steril gepickt und in je 4 ml LB-Amp-Medium gegeben. Die Ansätze werden über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Im Anschluss daran können die Bakterien dieser Kulturen durch kurzes Zentrifugieren bei 4°C und 13 000 rpm (Kühlzentrifuge - Eppendorf) pelletiert werden.

3.2.11.2 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus E.Coli-Bakterien erfolgt nasschemisch. 1,5 ml der über Nacht erhaltenen Suspension werden eine Minute bei 13 000 rpm in der Kühlzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 200 µl frisch angesetzte Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS w/v) zugegeben und der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis werden 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wird 5 Minuten auf Eis inkubiert und der dabei erhaltene weiße Niederschlag anschließend 5 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der die DNA enthaltende Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der weiße Niederschlag verworfen. In den Überstand wird das 2,5-fache Volumen 100%-igen Ethanol zugegeben und die Lösung 30 Minuten bei

-70°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 10 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet einmal mit 75%-igem Ethanol gewaschen.

Nachdem das Pellet ca. 5 Minuten an der Luft getrocknet ist, wird es in 50 µl bidestilliertem Wasser gelöst. Mit Hilfe von 2 µl Rnase A-Lösung (Roche) mit einer Konzentration von 1 mg/ml wird eventuell noch im Ansatz enthaltene RNA 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die DNA wird anschließend zweimal mit einer Mischung aus Phenol und Chloroform (1:1) im Verhältnis 1:1 versetzt und durch Invertieren extrahiert. Im Anschluss daran wird der Ansatz zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) im Verhältnis 1:1 versetzt und extrahiert. Der wässrige Überstand wird dann mit 5 µl 3 M Natriumacetat-Lösung versetzt und anschließend 150 µl 100%-iger Ethanol zugegeben. Die DNA wird 30 Minuten bei -70°C ausgefällt und danach der Ansatz 10 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die DNA mit 75%-igem Ethanol gewaschen und anschließend nach fünfminütiger Lufttrocknung in 50 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

3.2.11.3 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der DNA erfolgt photometrisch (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Konzentrationsbestimmung wird die DNA-Lösung 1:100 mit TE-Puffer versetzt und die Extinktion der Lösung bei 260 nm bestimmt. Als Leerwert dient die Absorption des reinen TE-Puffers. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einem Gehalt von 50 µg DNA/ml. Die Konzentration kann daher nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration}_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Reinheitsgrad der DNA wird durch die Bestimmung des Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. In der Regel liegt dieser zwischen 1,7 und 2,0.

3.2.11.4 Kontrolle des isolierten Plasmids mittels Agarose-Gelelektrophorese

Anhand des Laufverhaltens der DNA in einem 1%-igen Agarosegel wird die Plasmid-Präparation überprüft. Hierzu werden 0,6 ml Agarose (ultra pure) in 60 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 50°C in eine Gelkammer gegossen. Pro Probe werden jeweils 5 µl in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 2 µl 10x Ladepuffer versetzt. Diese Proben werden auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen und 1,5 h bei 90 V in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in 0,1%-iger wässriger Ethidiumbromidlösung 15 min gefärbt und unter UV-Bestrahlung mit dem CCD-Kamerasystem ausgewertet.

3.2.12 PCR

Die PCR dient zur Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte. Hierfür macht man sich die Eigenschaft von Polymerasen zunutze, DNA zu duplizieren. Voraussetzung für diesen Prozess ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, das dann entsprechend verlängert werden kann. Diese Oligonucleotide (*Primer*) sind ca. 20 Nucleotide lang. Sie binden an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang, was als *Annealing* bezeichnet wird.

Man verwendet in der Regel die DNA-Polymerase von thermophilen Bakterien, die z.B. bei über 110 °C in Geysiren leben. Die DNA-Polymerase dieser Lebewesen ist thermostabil und wird daher beim Erhitzen während der PCR-Zyklen nicht zerstört. Da nicht ständig neue

DNA-Polymerase hinzugefügt werden muss, kann der Vervielfältigungs-Vorgang erheblich vereinfacht und automatisiert werden. Eine der ersten thermostabilen DNA-Polymerasen, die für die PCR eingesetzt wurde, wird aus *Thermus aquaticus* gewonnen und wird Taq-Polymerase genannt. Ihr Nachteil liegt darin, dass sie manchmal Fehler beim Kopieren der DNA produziert, was zu Mutationen in der DNA-Sequenz führt. Polymerasen wie Pwo und Pfu, die aus Archaea gewonnen werden, besitzen einen Korrektur-Mechanismus, der die Anzahl der Mutationen in der kopierten DNA erheblich senkt.

3.2.13 Klonierung mit dem Gateway-System (Invitrogen)

Die Gateway®-Technologie von Invitrogen ist ein universelles Klonierungssystem, das auf der Fähigkeit der *site-specific-recombination* der Bakteriophage Lambda beruht (Landy, 1989). Die Gateway® Technologie ermöglicht den schnellen und effizienten Transfer von DNA Sequenzen in multiple Vektorsysteme, wobei Orientierung und reading frames beibehalten werden können. Ein weiterer Vorteil dieses Klonierungssystems besteht darin, dass für die Klonierung DNA in Form von PCR-Produkten, cDNA-Klonen, Restriktionsfragmenten u.a. eingesetzt werden kann. Des Weiteren kann jeder beliebige Vektor mit Hilfe des Gateway® *Vector conversion* Systems in einen Gateway®-Destination Vektor umgewandelt werden.

Die Klonierung mit Hilfe des Gateway® Systems besteht aus mehreren Schritten. Zunächst wird der Zielvektor mit Hilfe des Gateway® *Vector Conversion* Systems in einen Gateway® *Destination Vector* umgewandelt, in dem eine sogenannte, von attR-Sites flankierte, *reading frame* Kasette in den Zielvektor kloniert wird. Das zu klonierende DNA-Fragment wird per PCR amplifiziert. Die hierfür eingesetzten Primer enthalten attL-Sites, die später für die Rekombination eine Rolle spielen. Das so erhaltene attL-PCR-Produkt wird in einen käuflich erhältlichen Entry-Vektor (Invitrogen) kloniert. Mit Hilfe des LR-Clonase Systems kann dann

durch Rekombination das PCR-Insert des Entry-Vektors in den Zielvektor eingebracht werden.

3.2.13.1 Gateway® Vector Conversion System

Um den gewünschten Zielvektor in einen Gateway® Destination Vector umzuwandeln, muss zunächst eine geeignete *reading frame* Kasette gewählt werden. Der Zielvektor wird per Restriktionsverdau linearisiert, wobei *blunt ends* erhalten werden müssen. Die 5'-Phosphat-Enden des Vektors werden mit einer *Calf intestinal alkaline phosphatase* (Pharmacia) entfernt und die *reading frame* Kasette mit Hilfe einer T4 DNA Ligase in den Vektor kloniert. Der Ligationsansatz wird in One Shot® *ccdB* Survival™ Competent E.Coli-Bakterien (Invitrogen) transformiert. Anschließend müssen die so erhaltenen Klone dahingehend analysiert werden, ob die *reading frame* Kasette in der richtigen Orientierung im Vektor enthalten ist und ob diese funktional ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der pCALNL5-Vektor (Kanegae *et al.*, 1995; Riken Institut), der einen β -Actin Promotor/*CMV enhancer* in Kombination mit dem *site*-spezifischen Cre Rekombinasesystem enthält, als Zielvektor eingesetzt. Dieser muss zunächst in einen Gateway® Destination Vektor umgewandelt werden. Hierfür wird der Vektor mit Hilfe des Restriktionsenzym *SmaI* nach folgendem Schema linearisiert:

5 μ l	pCALNL5 [1 μ g/ μ l]
1 μ l	<i>SmaI</i> [50 U/ μ l]
1 μ l	10x <i>SmaI</i> -Puffer
3 μ l	Wasser
<hr/>	
Σ 10 μ l	

Der Ansatz wird 60 min bei 30°C verdaut und das Enzym anschließend 10 min bei 65°C inaktiviert. Der Verdau wird mittels eines 1%-igen Agarosegels kontrolliert.

Im nächsten Schritt werden 0,5 pmol des linearisierten Vektors pCALNL5 mit Hilfe von *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert, um die Re-Ligation des Vektors zu verhindern.

Die Berechnung der Menge von 0,5 pmol pCALNL5 erfolgt nach folgender Formel:

$$n(pCALNL5[pmol]) = \frac{m(pCALNL5[\mu g])}{6071bp * 660 \frac{pg}{pmol * bp} * 10^{-6} * \frac{\mu g}{pg}}$$

$$0,5 \text{ pmol pCALNL5} = 2,003 \mu\text{g}$$

Die Dephosphorylierung erfolgt nach folgendem Ansatz:

4 µl		= 2 µg linearisierter Vektor pCALNL5 aus Verdau (s.o.)
4 µl		10x Puffer One Phor All
31 µl		Wasser
1 µl		Calf Intestinal Alkaline Phosphatase [1 U/µl]
Σ 40 µl		

Der Ansatz wird 60 min bei 50°C inkubiert und die alkalische Phosphatase anschließend 15 min bei 65°C inaktiviert. Der Ansatz wird nun mit TE-Puffer (pH 8,0) verdünnt, so dass die Konzentration des linearisierten, dephosphorylierten Vektors pCALNL5 20 ng/µl beträgt.

Für die Ligation der *reading frame* Kassette RfB (Invitrogen) wird folgender Ansatz pipettiert:

2 μ l	Linearisierter, dephosphorylierter Vektor pCALNL5 [20 ng/ μ l]
2 μ l	5x T4 Ligase-Puffer (Promega)
2 μ l	<i>reading frame</i> Kassette RfB; [5 ng/ μ l]
1 μ l	T4 DNA Ligase (Promega); [1 U/ μ l]
3 μ l	Wasser
<hr/>	
Σ	10 μ l

Der Ansatz wird 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in One Shot[®] *ccdB* Survival[™] Competent Cells (Invitrogen) transformiert. Dieser E. Coli-Bakterienstamm ist resistent gegen *ccdB* und kann die Vermehrung von *ccdB*-Gen-enthaltenden Plasmiden unterstützen. Andere übliche E.Coli-Bakterienstämme, wie z.B. Top 10-Zellen von Invitrogen, eignen sich dagegen nicht für diese Transformation, da diese Stämme sensitiv gegen *ccdB*-Gen-Effekte sind. Für die Transformation wird ein Aliquot der One Shot[®] *ccdB* Survival[™] Competent Cells (Invitrogen) auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l des Ligationsansatzes versetzt. Als Positivkontrolle wird der Kontrollvektor pUC19 ebenfalls transformiert.

Die Transformationsansätze werden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erfolgtem Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden werden die Ansätze sofort wieder auf Eis inkubiert und mit je 250 μ l SOC-Medium (Invitrogen) versetzt. Die gut verschlossenen Gefäße werden anschließend horizontal 1 Stunde bei 37°C bei 225 rpm geschüttelt.

Je 50 μ l und 100 μ l der Transformationsansätze werden auf Chloramphenicol-Ampicillin-Agarplatten (LB-Agarplatten mit 30 μ g/ml Chloramphenicol und 100 μ g/ml Ampicillin)

ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der restliche Ansatz kann bei 4°C aufbewahrt werden und, wenn nötig, am nächsten Tag nochmals auf Agarplatten ausplattiert werden.

Da die Reading Frame Cassette RfB per *Blunt-end*-Ligation in den Vektor kloniert wird, besteht die Möglichkeit, dass die Kassette in zwei verschiedenen Orientierungen eingebaut wird. Aus diesem Grund müssen die über Nacht erhaltenen Transformanten analysiert werden. Hierfür werden je Ansatz 10 Kolonien gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium, das 30 µg/ml Chloramphenicol enthält, bei 37°C unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert.

Am nächsten Tag wird die DNA per Plasmidpräparation (s. Kap. 3.4.) isoliert. Mit Hilfe eines Restriktionsverdau mit den Enzymen BsrG I, BamH I und EcoR I kann die Orientierung der RfB-Kassette im Vektor überprüft werden.

Der Verdau erfolgt nach folgendem Schema:

1 µl	DNA
1 µl	Restriktionsenzym; [10 U/µl]
1 µl	10x Restriktionspuffer (abhängig vom Restriktionsenzym)
7 µl	Wasser
<hr/>	
Σ	10 µl

Jeder Verdau wird 60 min bei 37°C inkubiert und die Restriktionsenzyme anschließend 10 min bei 65°C inaktiviert. Die Ansätze werden dann mittels eines 1%-igen Agarosegels überprüft.

Der Verdau mit BsrG I, BamH I, Eco RI liefert folgende Fragmente bei richtiger Orientierung der RfB-Kassette:

Enzym	Fragmentgrößen bei richtiger Orientierung des Inserts
EcoR I	7340 bp 469 bp
BamH I	5224 bp 1545 bp 703 bp 337 bp
BsrG I	6124 bp 1289 bp 402 bp

In einem weiteren Schritt muss die Funktionalität des in den pCALNL5-Vektor klonierten *ccdB*-Gens kontrolliert werden. Hierfür werden jeweils 10 µg und 50 µg des die RfB-Kassette enthaltenden Vektors pRfB-CALNL5 sowohl in Top 10 Competent E.Coli-Bakterien (Invitrogen), als auch in One Shot® *ccdB* Survival™ T1 Phage- Resistant Cells (Invitrogen) transformiert. Die Transformation erfolgt analog wie oben beschrieben.

Jeweils 50 µl und 100 µl der Ansätze werden sowohl auf Ampicillin-enthaltende Agarplatten (LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin), als auch auf Chloramphenicol-Ampicillin-enthaltende Agarplatten (LB-Agarplatten mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei intaktem, funktionellem *ccdB*-Gen sollte der Destination Vektor in One Shot® *ccdB* One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen) exprimiert werden. Werden weniger

Klone erhalten, deutet dies auf ein inaktives *ccdB*-Gen oder auf Kontaminationen der Präparation mit anderen Antibiotika-resistenten Plasmiden hin.

Abschließend wird der erhaltene Gateway[®] Destination Vektor sequenziert. Hierbei werden folgende Sequenzierprimer eingesetzt (genaue Position der Primer s. Vektorsequenz im Anhang):

pCALNL5_for	5' - CGG GGA TCT CAT GCT GGA GT -3'
pCALNL5_rev	5' - TTG TTC ATG GCA GCC AGC ATA - 3'
GatewayPrimer1_for	5' - CAC ATT ATA CGA GCC GGA AGC AT - 3'
GatewayPrimer2_rev	5' - CAG TGT GCC GGT CTC CGT TAT CG - 3'

3.2.13.2 Amplifikation des Inserts *Ctnnb1*-S33Y per PCR

Die Amplifikation des 2,5 kb großen *Ctnnb1*-S33Y-Inserts erfolgt mit Hilfe des Expand Long Template PCR Systems (Roche). Als Template wird der das Insert enthaltende Vektor pβCat^{S33Y}/CIneo eingesetzt. Der Vorteil des Expand Long Template Systems von Roche liegt darin, dass die Genauigkeit der PCR Amplifikation verbessert wird, da das Kit die Proofreading-Aktivität der Pwo DNA Polymerase mit der hohen Prozessivität der Taq DNA Polymerase verbindet. Des Weiteren wird die Effizienz der PCR gesteigert, da durch die Enzymmischung die Anzahl angeschnittener bzw verkürzter PCR-Produkte reduziert wird. Die Zusammensetzung der im Kit enthaltenen PCR-Puffer wurde speziell für die Amplifikation langer PCR-Produkte entwickelt, was die Qualität der PCR verbessert.

Im Gateway-Klonierungssystem können PCR-Produkte direkt in einen TOPO[®]-enthaltenden Entry-Vektor inkloniert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird der pENTRTM/D-TOPO[®] Vektor verwendet. An den Forward-Primer werden am 5'-Ende vier Basen (CACC) angehängt. Der Überhang im Klonierungsvektor (GTGG) bindet an das 5'-Ende des PCR-Produktes und stabilisiert dadurch das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung.

Folgende Primer werden für die für die Amplifikation des *Ctnnb1*-S33Y-Inserts verwendet (genaue Position der Primer s. Anhang):

GatewayS33YEntry_F 5'- CACCGTATACCATAACAACACTGTTTTGAAAATCCAG – 3'

GatewayS33YEntry_R 5'- ACTCCTAAAGGATGATTTACAGGTCAGTAT – 3'

Die Reaktion wird nach folgendem Schema angesetzt:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Steriles, bidestilliertes Wasser	ad 50 µl	
dATP; [10 mM]	1,75 µl	350 µM
dCTP; [10 mM]	1,75 µl	350 µM
dGTP; [10 mM]	1,75 µl	350 µM
dTTP; [10 mM]	1,75 µl	350 µM
GatewayS33YEntry_F Primer; [20 µM]	0,75 µl	300 nM
GatewayS33YEntry_R Primer; [20 µM]	0,75 µl	300 nM
10x PCR-Puffer mit MgCl ₂ (Puffer 1)	5 µl	
Template pβCat ^{S33Y} /CIneo	1 µl	200 ng
Expand Long Template Enzym Mix	0,75 µl	
Σ	50 µl	

PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94°C	2 min	1 x
Denaturierung	94°C	10 sec	10 x
Annealing	63°C	30 sec	
Elongation	68°C	2 min	
Denaturierung	94°C	15 sec	25 x
Annealing	63°C	30 sec	
Elongation	68°C	2 min + 20 sec Verlängerung pro Zyklus	
Elongation	68°C	7 min	1 x

3.2.13.3 Klonierung des Inserts Ctnnb1-S33Y in den Entry-Vektor

Der zweite Schritt der Gateway-Klonierung besteht im Austausch des im Donor-Vektor enthaltenen *ccdB*-Gens gegen das PCR-Produkt. Bei dem *ccdB*-Gen handelt es sich um ein Selbstmordgen, dessen Genprodukt auf die im Labor normalerweise verwendeten Bakterienstämme toxisch wirkt, und das an seinen beiden Enden die attP-Verbindungsstellen trägt. Demnach sollten nach erfolgreicher Transformation nur diejenigen Bakterien überlebensfähig sein, bei denen der Austausch des *ccdB*-Gens gegen das PCR-Produkt erfolgt ist. Zusätzlich tragen die von Invitrogen erhältlichen Donor-Vektoren eine Antibiotika-Resistenz. Diese doppelte Selektion ist ein Grund für die hohe Effektivität dieser Klonierungsmethode. An der zwischen PCR-Produkt und Donor-Vektor erfolgenden Reaktion sind die Enzyme Integrase und IHF α/β beteiligt. Die attB1-site reagiert hierbei spezifisch mit attP1 und attB2 mit attP2, wodurch im entstehenden Entry-Klon die

attL-Sequenzen generiert werden. Als Bei-Produkt wird das mit den attR-Stellen flankierte Selbstmordgen erhalten.

Um einen Entry-Klon zu erhalten, wird im Rahmen dieser Arbeit das per PCR amplifizierte *Ctnnb1*-S33Y-Insert in einen Gateway Entry Vektor von Invitrogen kloniert. In diesem Fall wird der pENTRTM/D-TOPO[®] Vektor verwendet. Mit Hilfe des pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning Kits (Invitrogen) kann ein *Blunt-end* PCR Produkt direkt in einen Entry-Vektor des Gateway[®] Systems oder des MultiSite Gateway[®] Systems (Invitrogen) kloniert werden. Für diese Klonierung wird keine Ligase, keine Post-PCR-Prozedur und kein Restriktionsenzym benötigt. Die im Entry-Vektor enthaltene Topoisomerase I des Vaccinia Virus bindet in Duplex-DNA an spezifische Stellen (CCCTT) und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat in einem Strang (Shuman, 1991). Die Energie des gespaltenen Phosphodiester-Rückgrats wird durch Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Strangs und einem Tyrosylrest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. Die Phosphotyrosyl-Bindung zwischen DNA und Enzym kann anschließend durch die 5'-Hydroxylgruppe des gespaltenen Strangs angegriffen werden, was die Reaktion umkehrt und die Topoisomerase freisetzt (Shuman, 1994). TOPO[®] Klonierung nutzt diese Reaktion aus und ermöglicht damit das effiziente Klonieren von PCR Produkten. Direktes Zusammenführen von doppelsträngiger DNA mit Hilfe von TOPO[®]-angereicherten Oligonukleotiden erfolgt durch Addition eines einsträngigen 3'-Endes (Überhang) an die DNA (Cheng und Shuman, 2000). Dieser einzelsträngige Überhang ist identisch mit dem 5'-Ende des TOPO[®]-angereicherten DNA-Fragments. Im Gateway-Klonierungssystem können PCR-Produkte direkt in einen TOPO[®]-enthaltenden Vektor inkloniert werden. An den Forward-Primer werden am 5'-Ende vier Basen (CACC) angehängt. Der Überhang im Klonierungsvektor (GTGG) bindet an das 5'-Ende des PCR-Produktes und stabilisiert dadurch das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung.

Für die Ligation werden PCR-Produkt und pENTRTM/D-TOPO[®] Vektor im molaren Verhältnis 2:1 eingesetzt. 15 ng pENTRTM/D-TOPO[®] Vektor werden eingesetzt. Dies entspricht 8,81 amol. Die Berechnung der molaren Menge erfolgt nach folgender Formel:

$$x \cdot pmol \text{ pENTR}^{\text{TM}}/\text{D-TOPO}^{\text{®}} = \frac{0,015 \mu\text{g pENTR}^{\text{TM}}/\text{D-TOPO}^{\text{®}}}{2580 \text{ bp} * 660 \frac{\text{pg}}{\text{pmol} * \text{bp}} * 1 \frac{\mu\text{g}}{10^6 \text{ pg}}} =$$

$$\frac{0,015 \mu\text{g pENTR}^{\text{TM}}/\text{D-TOPO}^{\text{®}}}{1,7028 \frac{\mu\text{g}}{\text{pmol}}} = 8,81 * 10^{-3} \text{ pmol} = 8,81 \text{ amol}$$

Daraus ergibt sich, dass für die Ligation 8,81 amol pENTRTM/D-TOPO[®] Vektor (= 15 ng) und 17,62 amol Insert *Ctnnb1*-S33Y (= 28 ng) eingesetzt werden müssen.

Die Berechnung der Insertmenge erfolgt nach folgender Formel:

$$17,62 \text{ amol Insert } Ctnnb1 - S33Y = 17,62 * 10^{-3} \text{ pmol} = \frac{x \mu\text{g Insert } Ctnnb1 - S33Y}{2400 \text{ bp} * 660 \frac{\text{pg}}{\text{pmol} * \text{bp}} * 1 \frac{\mu\text{g}}{10^6 \text{ pg}}} =$$

$$\frac{x \mu\text{g Insert } Ctnnb1 - S33Y}{1,584 \frac{\mu\text{g}}{\text{pmol}}}$$

$$\Rightarrow 17,62 * 10^{-3} \text{ pmol} * 1,584 \frac{\mu\text{g}}{\text{pmol}} = 0,028 \mu\text{g}$$

Die Ligation wird sowohl im molekularen Verhältnis 1:1 (Insert:Vektor), als auch im Verhältnis 2:1 (Insert:Vektor) nach folgenden Ansätzen pipettiert:

	Ansatz 1	Ansatz 2
Verhältnis Insert:Vektor	1:1	2:1
Insert β -Catenin S33Y [14 ng/ μ l]	1 μ l	2 μ l
Salt Solution (Invitrogen)	1 μ l	1 μ l
bidest.. Wasser	3 μ l	2 μ l
pENTR TM /D-TOPO [®] [15 ng/ μ l]	1 μ l	1 μ l
Σ	6 μ l	6 μ l

Die Ansätze werden 8 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gegeben. Je 2 μ l der Ansätze werden analog Kap. 3.9.1. in One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli transformiert. Je 50 μ l, 100 μ l und 150 μ l der Transformationsansätze werden auf Kanamycin-haltigen Agarplatten (50 μ g/ml Kanamycin) ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die so erhaltenen Klone in je 1 ml Kanamycin-haltigem LB-Medium (50 μ g/ml Kanamycin) bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht vermehrt.

Die DNA wird im Anschluss daran durch nasschemische DNA-Minipräparation analog Kap. 3.9.2 erhalten und per Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen (s. folgende Tabelle) analysiert. Für den Verdau werden je 1 μ g DNA mit je 1 U Enzym bzw. im Fall des Doppelverdaus mit je 0,5 U Eco RI und Pvu I durchgeführt.

Restriktionsenzym	zu erwartendes Bandenmuster
Hind III [10 U/μl]	4434 bp 420 bp 126 bp
Eco RV [10 U/μl]	4614 bp 366 bp
Eco RI [10 U/μl] / Pvu I [10 U/μl]	3172 bp 1808 bp

Der Verdau wird nach folgendem Schema durchgeführt:

DNA [1 μg/μl]	1 μl
Restriktionsenzym(e) [10 U/μl]	1 μl
10x Puffer	1 μl
Bidest. Wasser	7 μl
Σ	10 μl

Die Ansätze werden 1 Stunde bei 37°C inkubiert und die Restriktionsenzyme anschließend durch zehninütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Danach wird der erfolgte Verdau per 1 %-igem Agarosegel überprüft. Des Weiteren werden die nach dem Restriktionsverdau als gewünschte Entry-Konstrukte identifizierten Klone zusätzlich per Sequenzierung mit S33Ymiddle_for- und rev-Primern, sowie M13_for- und _rev-Primern analysiert.

S33Ymiddle_for 5' - TGCGTTCTCCTCAGATGGTG – 3'

S33Ymiddle_rev 5' - ATTCGGTTGTGAACATCCC – 3'

Da die Sequenzierung ergab, dass die erhaltenen Entry-Klone eine zusätzliche Punktmutation im *Ctnnb1*-S33Y-Insert enthielten, das durch die PCR des Inserts entstanden war, musste vor der LR-Rekombinationsreaktion zunächst noch eine Mutagenese mit dem QikChangeTM XL-Kit von Stratagene durchgeführt werden, um das gewünschte Insert ohne Punktmutation zu erhalten.

3.2.13.4 Site-directed Mutagenesis

Eine durch die PCR des *Ctnnb1*-S33Y Inserts zusätzlich entstandene Punktmutation wird mit Hilfe der *site-directed* Mutagenese eliminiert. Es handelt sich hierbei um eine einfache und effektive Methode ohne Subklonierung, die auf der Arbeit von Fisher und Pei (1997) basiert. Für die *site-directed* Mutagenese wird das QikChangeTM XL-Kit von Stratagene verwendet.

Folgende Primer werden für die Reaktion eingesetzt:

MutagenS33Y_for	5' - GAAGGGATGGAAGGTCTCCTTGGGACTCTTG – 3'
MutagenS33Y_rev	5' - CAAGAGTCCCAAGGAGACCTTCCATCCCTTC – 3'

Die Mutagenese wird nach folgendem Schema angesetzt:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
10x Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Entry-Klon 2-1-5	1 µl (= 5 ng)	2 µl (=10 ng)	4 µl (=20 ng)	10 µl (=50 ng)
MutagenS33Y_for [100ng/µl] (Primer 1)	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl
MutagenS33Y_rev [100ng/µl] (Primer 2)	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl	1,3 µl
dNTP-Mix	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Wasser	39,4 µl	38,4 µl	36,4µl	30,4 µl
Pfu Turbo DNA- Polymerase [2,5 U/µl]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Σ	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Als Kontrollreaktion wird die Reaktion parallel mit Whitescript Kontrollplasmid durchgeführt:

10 x Puffer	5 µl
Whitescript Kontrollplasmid [5 ng/µl]	2 µl
Oligonucleotide Kontrollprimer 1 [100 ng/µl]	1,25 µl
Oligonucleotide Kontrollprimer 2 [100 ng/µl]	1,25 µl
dNTP-Mix	1 µl
Wasser	38,5 µl
Pfu Turbo DNA Polymerase [2,5 U/µl]	1 µl
Σ	51 µl

Die PCR erfolgt nach folgendem Schema:

95°C	30 sec	
95°C	30 sec	
55°C	1 min	x 12 Zyklen
68°C	2 min/ kb des Plasmids	

Die Amplifikation per PCR wird mit Hilfe eines 1%-igen Agarosegels überprüft.

Pro Ansatz wird anschließend je 1 µl Dpn I-Enzym (10 U/µl) zugegeben und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C verdaut. Das Restriktionsenzym Dpn I verdaut das in der PCR enthaltene Template, so dass nur das die richtige Sequenz enthaltende PCR-Produkt zurückbleibt.

Je 2 µl des Restriktionsverdaus werden nun in Top10-Zellen (Invitrogen) transformiert und die Suspension über Nacht bei 37°C auf Kanamycin-haltigen Agarplatten inkubiert. Die so erhaltenen Klone werden über Nacht in je 1,5 ml Kanamycin-haltigem LB-Medium pro Klon bei 37°C unter Schütteln kultiviert und die DNA am nächsten Tag durch DNA-Präparation isoliert. Die erhaltenen DNA-Lösungen werden nach RNase-Verdau photometrisch quantifiziert und die DNA mittels Sequenzierung mit S33Ymiddle_for- und S33Ymiddle_rev-Primern analysiert.

Des Weiteren wird die DNA mittels Restriktionsverdau untersucht. Hierfür werden folgende Restriktionsenzyme verwendet:

Enzym	Fragmentgrößen (Soll)
Hind III	4434 bp 420 bp 126 bp
Eco RV	4614 bp 366 bp
Eco RI / Pvu I	3172 bp 1808 bp

Die Verdauungen werden folgendermaßen angesetzt:

1 μ l (= 1 μ g) DNA

1 μ l Enzym [10 U/ μ l] bzw.

0,5 μ l Enzym 1 [10 U/ μ] + 0,5 μ l Enzym 2 [10 U/ μ l]

1 μ l 10x One Phor All-Puffer

6,5 μ l Wasser

Σ 10 μ l

Jeder Ansatz wird 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mittels eines 1%-igen Agarosegels analysiert.

3.2.13.5 LR-Clonase-System und Rekombination

Die Rekombination zwischen Gateway-Destination Vektor und Entry-Vektor erfolgt mit Hilfe des Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix.

Dieser Mix enthält die Bacteriophage Lambda Rekombinationsproteine Integrase (Int) und Excisionase (Xis), das E.Coli-codierte Protein Integration Host Factor (IHF) und Reaktionspuffer. Der Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix katalysiert die *in vitro* Rekombination zwischen einem attL-sites-enhaltenden Entry-Vektor und einem eine attR-site-enhaltenden Destination-Vektor. Dadurch wird der attB-enhaltende Expressionsvektor enthalten. Die Rekombination erfolgt nach folgendem Ansatz:

Entry-Vektor	= 100 ng	2 µl
Destination-Vektor	= 150 ng	1 µl
TE-Puffer, pH 8		5 µl
<hr/>		
Σ		8 µl

Der Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix wird ca. 2 Minuten auf Eis aufgetaut und kurz durch Vortexen gemischt. Zu dem Rekombinationsansatz werden 2 µl Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix gegeben und gut gemischt. Die Reaktion wird 1 Stunde bei 25°C inkubiert. Anschließend wird 1 µl Proteinase K zugegeben, um die Reaktion zu beenden. Der Ansatz wird kurz per Vortex gemischt und die Probe 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wird die Rekombinationsreaktion in 50 µl One Shot[®] OmniMAX[™] 2 T1 Phage-Resistant Cells transformiert. Je 50 µl, 100 µl und 150 µl des Transformationsansatzes werden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die so erhaltenen Klone können am nächsten Tag gepickt und in je 1,5 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium unter Schütteln bei 37°C über Nacht angezogen werden. Die so vermehrte DNA kann dann am nächsten Tag per nasschemischer Minipräparation

(s. Kap. 3.9.) isoliert und per Restriktionsverdau mit Eco RI und Sequenzierung mit pCALNL5_for- und rev-Primern, sowie S33Ymiddle_for und _rev-Primern analysiert werden.

Enzym	Fragmentgrößen
Eco RI	7220 bp 1370 bp
Not I	8590 bp

3.2.14 Generierung einer transgenen Maus

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generierung einer transgenen Maus, die leberspezifisch durch Punktmutation aktiviertes S33Y- β -Catenin exprimiert.

Die für humanes β -Catenin codierende Sequenz aus dem Expressionsvektor p β -Catenin^{S33Y}/CI-neo (Chtarbova, 2002) wird per PCR amplifiziert und in die *multiple cloning site* des Vektors pCALNL5, der eine CAG-loxP-neo-polyA-loxP-Kassette enthält, an diese Kassette anschließend einkloniert. Die Klonierung ist schematisch in Abbildung 3.2 dargestellt.

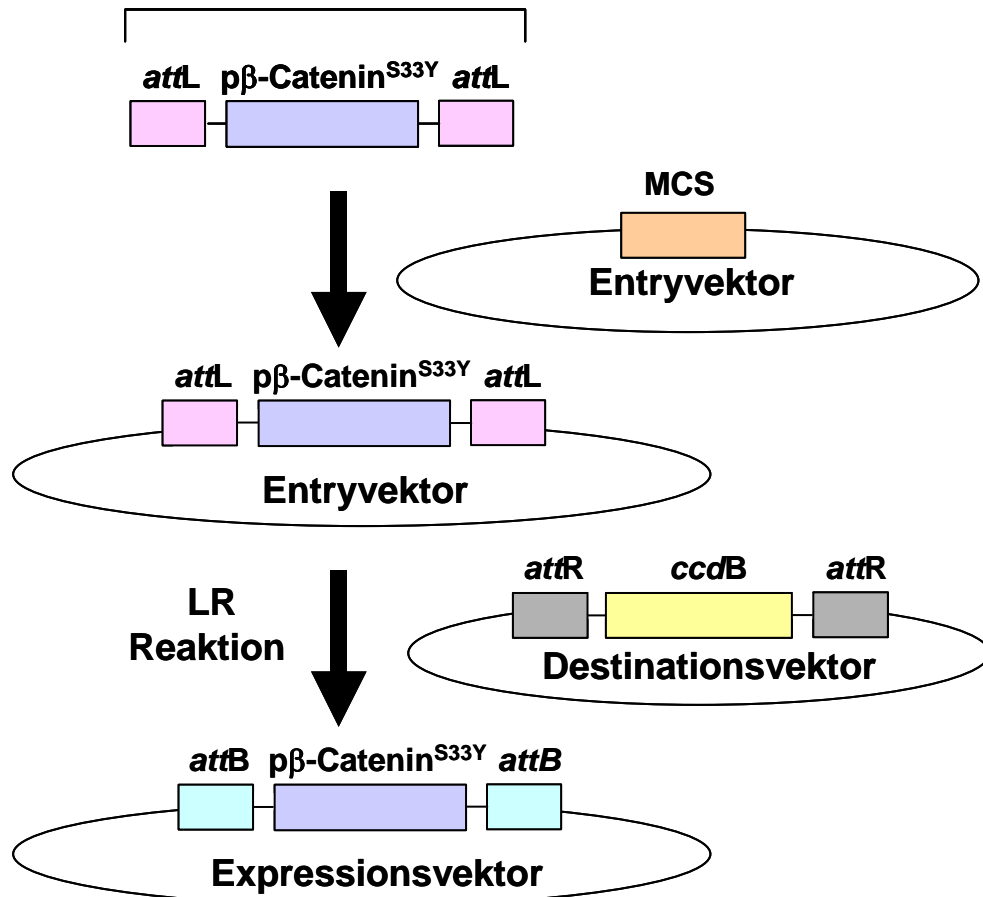


Abbildung 3.2: Klonierungsschema für pβ-Catenin^{S33Y}/CALNL5.

Die von CAG-Promotor und der codierenden Sequenz des *Ctnnb1*-S33Y flankierte loxP-neo-polyA-loxP-Kassette wird dann aus dem Konstrukt per Restriktionsverdau ausgeschnitten, aufgereinigt und per Mikroinjektion in FVB/N-Zygoten injiziert, aus denen später transgene Mäuse, Tg(loxP(pA)βCat^{S33Y})-Mäuse, erhalten wurden. Der FVB/N-Inzuchtstamm wurde in den frühen 70er Jahren als Inzuchtstamm etabliert. Dabei wurde eine Sensitivität gegen das Friend'sche Leukämie Virus B entdeckt. Zu dieser Zeit wurde eine Inzucht dieser Linie für das Fv1b-Allel durchgeführt und der Stamm wurde FVB genannt. Die Tiere tragen eine Mutation im *Pde6brd1*-Gen und leiden unter einer Retinadegeneration.

Die erhaltenen Tg(loxP(pA)βCat^{S33Y})-Mäuse werden durch Genotypisierung charakterisiert und im Anschluss daran mit Tg(albCre)-Mäusen verpaart (s. Abbildung 3.3). Diese Tiere

exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Leber-spezifischen Albumin-Promotors.

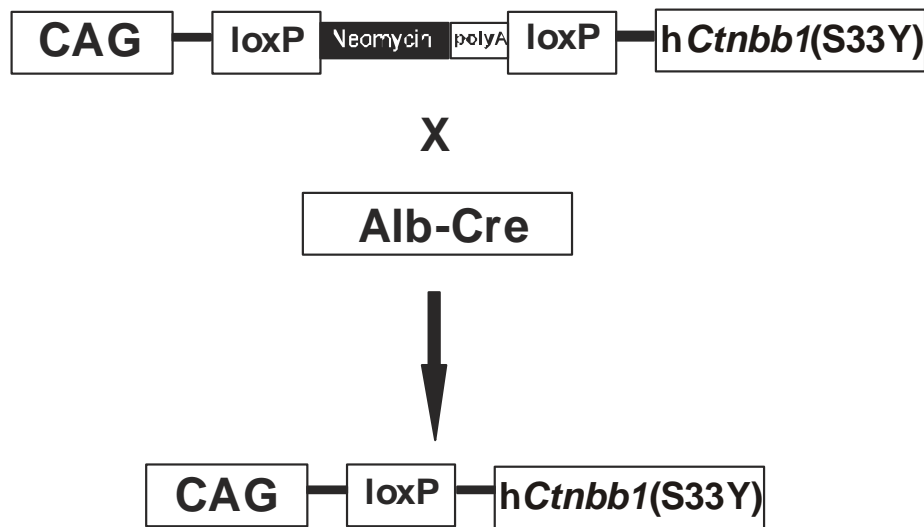


Abbildung 3.3: Verpaarungsschema zum Erhalt von Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Mäusen.

Aus den daraus entstandenen transgenen Tieren (TG(albCre/βCat^{S33Y})) werden die Lebern entnommen und die intrazelluläre Lokalisation des humanen, durch Punktmutation aktivierten S33Y-β-Catenins immunhistochemisch, sowie dessen Expression auf RNA- und Proteinebene untersucht.

3.2.14.1 Mikroinjektion

Mit Hilfe der Mikroinjektion können klonierte DNA-Sequenzen in das Mausgenom eingeschleust werden. Dabei findet die Integration der zusätzlichen DNA an einer nicht vorhersehbaren Stelle des Genoms statt. Für die Mikroinjektion müssen zunächst befruchtete Maus-Eizellen gewonnen werden. Diese werden für die Mikroinjektion vorbereitet. Anschließend wird die entsprechende DNA injiziert und die Eizellen in entsprechend

vorbereitete Weibchen übertragen. Die geborenen Jungtiere müssen dann mittels PCR genotypisiert und die per Mikroinjektion eingebrachte Fremd-DNA nachgewiesen werden.

3.1.1.1.1 Vorbereitung des Vektors β -Catenin^{S33Y}/CALNL5 für die

Mikroinjektion

Zunächst muss die aus CAG-Promotor, loxP-Site 1, neomycin-site, polyA-site, loxP-Site 2 und *Ctnnb1*-S33Y-Transgen bestehende Kasette per Restriktionsverdau aus dem Vektor β -Catenin^{S33Y}/CALNL5 ausgeschnitten werden. Anschließend wird der Restriktionsansatz mit Hilfe eines 1%-igen Agarosegels aufgetrennt und die gewünschte Bande mit Hilfe des Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel eluiert. Diese für die Mikroinjektion bestimmte Kasette wird im weiteren Verlauf mit Hilfe von EluTip-Säulchen (Schleicher & Schuell) aufgereinigt und kann dann für die Mikroinjektion eingesetzt werden. EluTip-Säulchen dienen der Aufreinigung von DNA-Fragmenten von 15 bp bis 50 kb.

EluTip-Säulchen passen auf eine handelsübliche Spritze mit Luer-Lock-Anschluss. Die Nukleinsäuren der aufgetragenen Probe werden von der Säulenmatrix adsorbiert, während kontaminierende Stoffe die Matrix durchlaufen. Die gereinigte Probe wird anschließend von der Minisäule eluiert. Für die Mikroinjektion ist es zwingend notwendig, dass alle restlichen Vektorsequenzen vollständig von der Mikroinjektionskasette getrennt werden und dass ein hochreiner DNA-Abschnitt erhalten wird, so dass die hochfeine Mikroinjektionskanüle während der Injektion nicht verstopfen kann.

Die Kasette für die Mikroinjektion wird mit Hilfe der Restriktionsenzyme PvuI und BamHI aus β -Catenin^{S33Y}/CALNL5 ausgeschnitten.

Hierfür wird folgender Ansatz pipettiert:

2,5 μ l	pS33Y-CALNL5 [2 μ g/ μ l]
2 μ l	Pvu I [10 U/ μ l]
2 μ l	BamHI [10 U/ μ l]
2 μ l	100x BSA
2 μ l	10x TANGO-Puffer
9,5 μ l	Wasser
<hr/>	
20 μ l	Σ

Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert und die Restriktionsenzyme am nächsten Tag durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Der Verdau wird auf ein 1%-iges Agarosegel gegeben und so die ausgeschnittene Kasette vom Rest des Vektors getrennt. Drei Fragmente mit einer Größe von 6812bp, was der Kasette für die Mikroinjektion entspricht, 1445 bp und 337 bp sollten hierbei nachweisbar sein. Die entsprechende Bande wird unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Schraubdeckel-Gefäß überführt. Mit Hilfe des Qiaquick Gelextraction-Kits (Qiagen) wird die DNA aus der Agarose extrahiert und die Konzentration der DNA über ein 1%iges Agarosegel mit Hilfe eines Mengenabschätzungsmarkers bestimmt. Die so erhaltene DNA wird anschließend über EluTip-d-Säulchen aufgereinigt. Das folgende Protokoll ist speziell auf die Reinigung von für die Mikroinjektion benötigte DNA abgestimmt.

Das aus dem Agarose-Gel extrahierte DNA-Fragment wird in 50 μ l Injektionspuffer resuspendiert. Zunächst müssen die EluTip-Säulen äquilibriert werden. Hierfür werden etwa 2 mm der Spitze einer EluTip-Säule mit einer Schere abgeschnitten und die Kappe am oberen Ende der Säule entfernt. Zwei 5 ml-Spritzen werden mit „Low Salt“ bzw. „High Salt“

markiert und die Säule auf die „High Salt“-Spritze aufgesteckt. 2 ml High Salt-Puffer werden mit Hilfe der Spritze langsam über die Säule gegeben. Die EluTip-Säule wird nun entfernt und auf die mit 5 ml Low Salt Puffer beladene „Low Salt“-Spritze gesteckt. Der Puffer wird langsam über die Säule gegeben, die nun bereit ist, um DNA zu binden. Zunächst wird die „Low Salt“-Spritze mit einem EluTip-Vorfilter versehen und darauf die vorbereitete EluTip-Säule aufgesteckt. Die in Injektionspuffer vorgelegte DNA wird in die Spritze gegeben und über den Vorfilter auf die EluTip-Säule gespritzt, wobei die DNA langsam mit ca. 1 ml/min durch die Spritze gedrückt wird. Der Durchfluss wird aufgefangen und nochmals über den Vorfilter auf die Säule gegeben. Nachfolgend werden 3 ml des Low Salt Puffers über die Säule gegeben. Der Vorfilter wird entfernt und das EluTip-Säulchen auf die „High Salt“-Spritze aufgesetzt. 0,4 ml High Salt Puffer werden in die Spritze gegeben und langsam auf die EluTip-Säule gegeben. Das Eluat wird aufgefangen. Anschließend werden nochmals 0,1 ml High Salt Puffer über die Säule gegeben und auch dieses Eluat aufgefangen und mit dem ersten Eluat vereint. Zu diesem Gesamteluat wird 1 ml absoluter Ethanol gegeben und die Lösung eine Stunde bei 4°C und 13 000 rpm in der Kühlzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die DNA in 30 µl bidestilliertem Wasser gelöst und mit Hilfe eines Mengenabschätzungsmarkers (Mass Ruler Mix, Fermentas) über ein 1%-iges Agarosegel quantifiziert.

3.1.1.1.2 Mikroinjektion der Transgen-tragenden Kasette aus

pβ-CateninS33Y/CALNL5

Für die Generierung transgener Tiere werden B6D2F1-Mäuse eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Kreuzung aus weiblichen C57Bl/6N Crl-Mäusen und männlichen DBA/2N Crl-Mäusen. C57Bl/6N Crl-Tiere könnten zwar auch für die Mikroinjektion eingesetzt werden,

würden allerdings weniger Embryonen liefern, was zur Folge hätte, dass mehr Tiere für den Versuch eingesetzt werden müssten. Die Embryonen der eingesetzten B6D2F1-Tiere lassen sich wesentlich leichter injizieren und können später aufgrund ihres schon vorhandenen C57Bl-Hintergrunds wieder in C57Bl/6N Crl-Tiere rückgekreuzt werden.

Insgesamt werden 5 sterile Männchen, 20 fertile Spender-Weibchen zur Isolierung von Zygoten und 20 fertile Weibchen zum Austragen (Ammen) eingesetzt. Pro Versuchstag werden 8 Weibchen superovuliert. So können ca. 200 befruchtete Eizellen erhalten werden, die für die Mikroinjektion eingesetzt werden können. Zunächst wird den 9 Wochen alten B6D2F1-Weibchen am Mittag des ersten Tages *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG) intraperitoneal injiziert, welches die Funktion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) nachahmt und zur Reifung besonders vieler Follikel führt. Am Mittag des dritten Tages wird humanes Chorion-Gonadotropin (hCG) intraperitoneal injiziert, welches die Wirkung des luteinisierenden Hormons (LH) nachahmt und die Ovulation induziert, die dann in der darauf folgenden Nacht stattfindet. Direkt im Anschluss kann die Verpaarung erfolgen. Nach dem sogenannten Plug-Check (Vaginal-Propf) wird am nächsten Morgen kontrolliert, ob es zur Verpaarung gekommen ist. Anschließend werden die Ovidukte geprüpft und Cumuluszellen mit Hepes-gepuffertem Medium abgedaut. Die Zygoten werden gewaschen und mehrere Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Embryokultur wird anschließend auf 60 mm-Schalen angelegt und mit Mineralöl überschichtet. Um die Embryonen zu waschen, werden diese von einer Schale in die andere von Öltropfen zu Öltropfen überführt. Für die Mikroinjektion werden 1,4 µl DNA mit einer Konzentration von 5 ng/µl in die Injektionsnadel aufgezogen. Die Konzentration der DNA sollte zwischen 2,5 und 5 ng/µl liegen, da bei einer höheren Konzentration zu viele Embryonen absterben und bei niedrigerer Konzentration zu wenig transgene Tiere erhalten werden. Die für die Generierung

einer transgenen Maus geeignete DNA-Konzentration wird abhängig von Reinheit und Konstruktgröße gewählt.

Die Mikroinjektion wird mit Hilfe des FemtoJet von Eppendorf und dem Axiovert 200-Mikroskop von Zeiss mit 320-facher Vergrößerung durchgeführt. Auf einen Objektträger wird ein Tropfen Hepes-gepuffertes M2-Medium gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Embryonen werden auf diesen Objektträger überführt und können unter dem Mikroskop dann mit Hilfe der Haltekapillare angesaugt und so gehalten werden.

Zunächst muss die Mikroinjektionsnadel richtig ausgerichtet werden. Dazu wird sie in das Medium eingetaucht. Da die Nadel vorne geschlossen ist, muss sie zunächst durch Anstoßen an die Haltekapillare geöffnet werden. Dann kann der erste Embryo mit der Haltekapillare angesaugt und die DNA in den weiblichen Vorkern injiziert werden. Dieser schwillt nach erfolgreicher Injektion der DNA an, was unter dem Mikroskop beobachtet werden kann. Anschließend wird die Injektionsnadel langsam und sehr vorsichtig aus dem Pronukleus herausgezogen, damit der Kern nicht mit aus dem Embryo herausgezogen und nicht lysiert wird. Die Embryonen werden nach 1- bis 2-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in das Infundibulum scheinchwangerer Weibchen (Ammen) transferiert. Nach ca. 19 Tagen werden die Jungtiere geboren, die im Alter von ca. 21 Tagen per PCR genotypisiert und charakterisiert werden können.

3.2.14.2 Maus-Zucht und Genotypisierung

Mäuse sind im Alter von ca. 7-8 Wochen geschlechtsreif und damit verpaarungsfähig. Für die Verpaarung werden zwei Weibchen mit einem Männchen ca. 10-12 Tage in einem Käfig gehalten bis die Weibchen sichtbar schwanger sind. Das Männchen wird dann abgesetzt und die Weibchen einzeln in Käfigen weiter gehalten. Ca. 3 Wochen nach Geburt der Jungtiere werden diese von der Mutter abgesetzt, nach Geschlecht getrennt und im Alter von

ca. 4 Wochen genotypisiert. Für die Genotypisierung der Tiere werden die Jungtiere in einer Forene-gesättigten Atmosphäre kurzzeitig betäubt und eine Gewebeprobe aus dem Ohr entnommen. Dies dient gleichzeitig zur Markierung der Tiere, so dass sie nach der Genotypisierung unterschieden werden können. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Tiere wie folgt markiert: links, rechts, links und rechts oder durch ein Loch im linken Ohr. So können maximal vier Jungtiere in einem Käfig gehalten werden bis ihr Genotyp bekannt ist.

Für die Genotypisierung wird zunächst die Gewebeprobe aus dem Ohr der Maus mittels Proteinase K bei 56°C über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wird die Proteinase K durch 15-minütiges Erhitzen bei 95°C inaktiviert und der Verdau 5 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert.

Der Verdau-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

8 µl	10x TAQ-Puffer
2 µl	Proteinase K (20 mg/ml)
70 µl	Wasser

Die Genotypisierung erfolgt mittels PCR. Hierfür werden je Ansatz 5 µl des Verdaumix eingesetzt.

Folgende Primer werden zur Genotypisierung der Gene *Ctnnb1*-S33Y-Transgen (loxP(S33Y)), *alb-cre* und *Cx26 flox* verwendet:

Primerbezeichnung	Sequenz
up.int.cre_for	5'- TTT GCC TC ATT ACC GGT CGA TGC - 3'
int.cre_rev	5'- TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG - 3'
transgMausloxP_for	5'- ATT ATA CGA AGT TAT CTC GAG TCG CTC - 3'
transgMaus1_rev	5'- CCT CTT CCT CAG GAT TGC CTT TAC C - 3'
Cx26flox-A3_for	5'- CTT TCC AAT GCT GGT GGA GTG - 3'
Cx26flox-A5_rev	5'- ACA GAA ATG TGT TGG TGA TGG- 3'

Die entsprechenden PCR-Ansätze werden wie folgt pipettiert:

	<i>Ctnnb1</i>-S33Y	alb-cre
Wasser	33 µl	25 µl
10x Taq-Puffer + MgCl ₂	5 µl	-
10x Taq-Puffer - MgCl ₂	-	5 µl
MgCl ₂ [25mM]	-	4 µl
dNTP [10mM]	1 µl	2 µl
Primer_for [10µM]	2,5 µl	4 µl
Primer_rev [10µM]	2,5 µl	4 µl
native Taq- Polymerase [1 U/µl]	1 µl	1 µl
DNA	5 µl	5 µl
Σ	50 µl	50 µl

Folgende PCR-Programme werden verwendet:

	PCR-Programm	Größe des PCR-Produkts
alb-cre – PCR	<u>95°C – 10 min</u> 95°C – 1 min 68°C – 1 min x 35 <u>72°C – 1 min</u> 72°C – 10 min 4°C - ∞	400 bp
<i>Ctnnb1</i> -S33Y-PCR	<u>95°C – 10min</u> 95°C – 1 min 66°C – 1 min x 35 <u>72°C – 1 min</u> 72°C – 10 min 4°C - ∞	314 bp

3.2.14.3 Organentnahme

Um die Expression des punktmutierten *Ctnnb1*-S33Y in der Leber der transgenen Tiere zu untersuchen und die Tiere genauer charakterisieren zu können, müssen die Lebern der Tiere entnommen werden. Hierfür werden die Tiere in einem mit 95% CO₂ und 5% O₂ gesättigten Exsikkator getötet und anschließend gestreckt. Die Tiere werden gewogen und danach mit Hilfe von Kanülen auf einer Styroporplatte fixiert. Der Bauchraum wird äußerlich mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Mit Hilfe von Schere und Pinzette wird der Bauchraum großflächig geöffnet und Haut und Fell seitlich neben dem Tier mit Hilfe einer Kanüle fixiert. Mit einer spitzen, scharfen Schere wird die Vena Cava inferior durchtrennt und anschließend die

Gallenblase entfernt. Die Leber wird entnommen und nach waschen in 1x PBS und kurzem, vorsichtigem Trockentupfen gewogen. Das Organ wird auf einem eisgekühlten Wachsbed mit Hilfe eines Skalpell geteilt. Der große Leberlappen wird für immunhistochemische Färbungen auf Trockeneis gegeben, in Alufolie eingewickelt und kann so anschließend bei -70°C gelagert werden (Moennicke *et al.*, 2003). Die restliche Leber wird in 2-3 mm große Stücke zerschnitten und in 1,5 ml-Schraubdeckelgefäße gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Leberstücke werden dann bei -70°C gelagert und können für RNA-, DNA- und Proteinisolierung eingesetzt werden. Weitere Leberteile können, je nach Fragestellung, z.B. für Carnoy-Färbungen eingesetzt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der GS- und Cytochrom P450-Expression in Mausleberläsionen

4.1.1 Immunhistochemie

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Lebergewebeproben entstammten zwei früheren Studien. Ziel jener Studien war die Untersuchung der Mechanismen der Tumorpromotion durch Phenobarbital (PB) in Connexin 32 (Cx32) Wildtyp und Knock-out Mäusen (C57Bl/129Sv x C3H/He) (Moennikes *et al.*, 2000).

Im ersten Experiment, der sogenannten Promotionsstudie, wurde geschlechtsreifen, 6 Wochen alten Mäusen einmalig der Tumorinitiator Diethylnitrosamin (DEN) injiziert. Danach wurde der Kontrollgruppe unbehandeltes Normalfutter gegeben, während die zweite Gruppe über 39 Wochen Futter, das mit dem Tumorpromotor PB versetzt wurde, erhielt. Unter diesen Bedingungen entwickelten die Tiere Lebertumoren, wobei PB die Hepatokarzinogenese förderte (Moennikes *et al.*, 2000). Im zweiten Experiment, der sogenannten Inhibitionsstudie, wurden 2 Wochen alte Jungtiere einmalig mit DEN behandelt und erhielten anschließend das PB-behandelte Futter. In diesem Experiment zeigte sich, dass PB die Hepatokarzinogenese hemmte, also inhibitorisch wirkte.

Etwa 80% der Tumoren der PB-behandelten Tiere der Promotionsstudie wiesen Punktmutationen im β -Catenin-Gen *Ctnnb1* auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Tumoren der nur mit DEN-behandelten Tiere und der Tiere der Inhibitionsstudie nur eine sehr geringe Zahl

Ctnnb1-mutierter Tumoren. Da die Überexpression der Glutaminsynthetase sehr gut mit dem Auftreten von Punktmutationen in *Ctnnb1* korreliert (Cadoret et al., 2001; Loeppen et al., 2002), stellt dieses Enzym einen idealen Marker zur Erkennung von Tumoren mit verändertem β -Catenin dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur Cx32 Wildtyp-Tiere dieser Studien untersucht.

Durch die immunhistochemische Färbung der Tumoren mit GS-Antikörpern konnten Tumoren mit Wildtyp- β -Catenin und punktmutiertem β -Catenin voneinander unterschieden werden. Im Gegensatz zu Tumoren, die eine Punktmutation in *Ctnnb1* aufweisen und dadurch eine Überexpression der Glutaminsynthetase zeigen, wird dieses Enzym in β -Catenin-Wildtyp-Tumoren nicht exprimiert.

Die folgende Abbildung (Abb. 4.1) zeigt einen Lebergewebeschnitt eines Tieres der Promotionsstudie. Hier zeigte die Sequenzierung der beiden Tumoren a und b (GS-positiver und GS-negativer Tumor), dass nur der GS-positive Tumor b eine Punktmutation in Codon 35 des *Ctnnb1* besitzt (T:A \rightarrow G:C). Tumor a, der keine GS-Expression besitzt, hat dagegen auch keine derartige Mutation im β -Catenin-Gen.

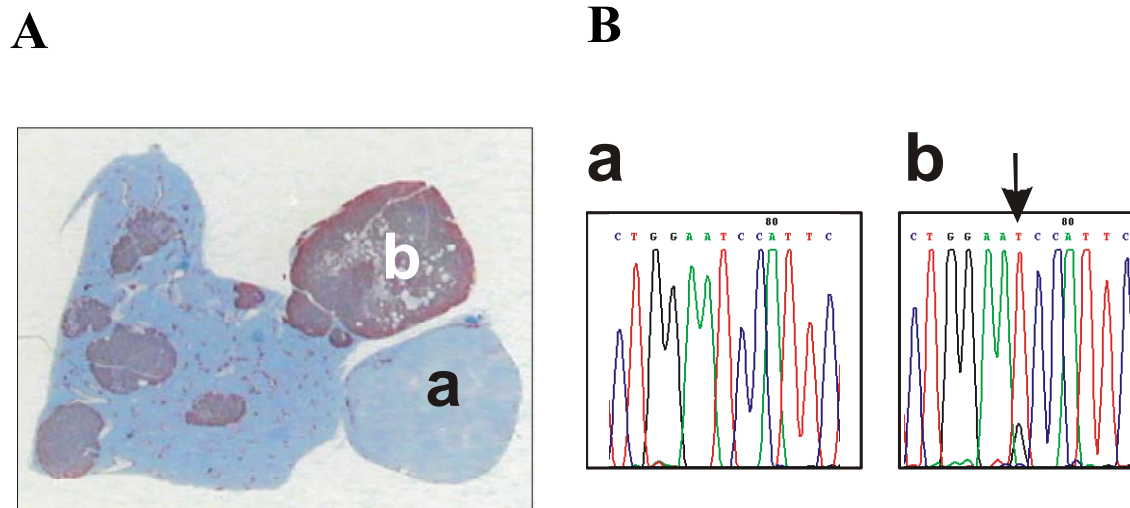


Abbildung 4.1: Immunhistochemische GS-Färbung und Mutationsanalyse von Mauslebergewebe

(A) Übersichtsvergrößerung eines Lebergewebeschnittes des Promotionsexperiments. Die Abbildung zeigt neben dunkel gefärbten GS-positiven Tumoren (u.a. Tumor b) auch einen GS-negativen Tumor, der ungefärbt bleibt (Tumor a). Neben GS-positiven und -negativen Tumoren sind außerdem GS-positive Zellschichten um die Zentralvenen erkennbar.

(B) Mutationsanalyse der DNA des GS-negativen (a) und GS-positiven (b) Mausleber-Tumorgewebes. Bild b zeigt deutlich im GS-positiven Tumorgewebe die Punktmutation in Codon 35, die zum Basenaustausch von T nach G führt (s. Pfeil). Zum Vergleich, a zeigt im gleichen Ausschnitt der Basensequenz der DNA des GS-negativen Tumorgewebes in Codon 35 keine Punktmutation, also keinen Basenaustausch.

Lebertumoren und präneoplastische Leberfoci von Nagern weisen oft eine anomale Cytochrom P450-Expression auf. Chemisch induzierte Lebertumoren in Nagern zeigen in der Regel eine verminderte Expression von Cytochrom P450-Isoenzymen, es sei denn die Tiere werden mit Enzym-induzierenden Substanzen, wie z.B. PB, behandelt (Buchmann *et al.*, 1985; Buchmann *et al.*, 1987; Kunz *et al.*, 1987; Buchmann *et al.*, 1992).

Auch in einigen humanen Tumoren zeigen Cytochrom P450-Isoenzyme oft eine verringerte Expression. Die Expression einiger CYP- Isoformen kann jedoch durch Substanzen, wie z.B.

PB oder 3-Methylcholanthren, in Nagerlebern auch induziert werden. Die molekularen Mechanismen der tumorspezifischen Veränderungen der CYP-Expression sind bisher allerdings noch weitgehend unbekannt. Eine Reihe von Genen, die zelluläre Prozesse, wie Transkription, Proliferation oder Differenzierung steuern, könnten hierbei eine Rolle spielen, darunter Protoonkogene wie *ras* oder *Cttnb1*. Diese sind in einer Reihe von Tumoren, darunter auch Mauslebertumoren, durch Punktmutation oder Deletion aktiviert. Da es bisher keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *Cttnb1*-Mutationen in Mauslebertumoren und der vermehrten Expression von Cytochrom P450-Enzymen gab, wurde diese Frage nun im Rahmen dieser Arbeit zunächst immunhistochemisch untersucht. Hierfür wurden Lebergewebeschnitte aus den oben genannten Studien (Promotions- und Inhibitionsstudie) nach immunhistochemischer Untersuchung der GS-Expression auch auf ihre Cytochrom P450-Expression hin analysiert. Hierbei wurden die Isoformen CYP2E1, 1A, 2B und 2C untersucht. GS-Färbung und Cytochrom P450-Färbung korrelierten insofern, als dass GS-positive Tumoren vermehrt auch starke Cytochrom P450-Expression der untersuchten Isoformen aufwiesen.

Mauslebergewebe von nur mit DEN behandelten Tieren zeigen multiple Tumorbereiche, die keine Cytochrom P450-Expression aufweisen. Dies ist in der folgenden Abbildung am Beispiel der CYP450-Familie 2C gezeigt (Abb. 4.2).

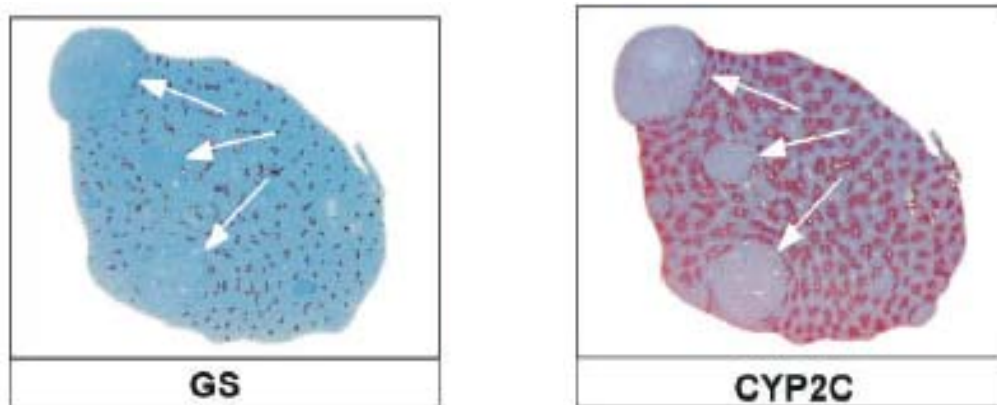


Abbildung 4.2: Immunhistochemische GS- und Cytochrom P450 2C-Färbung von Mauslebergewebe eines nur mit DEN behandelten Tieres.

Übersichtsvergrößerung eines Lebergewebeschnittes des Inhibitionsexperiments. Mauslebergewebe eines nur mit DEN behandelten Tieres der Inhibitionsstudie. Die Abbildung zeigt die immunhistochemische GS- und CYP2C-Analyse. In der GS-Färbung sind deutlich im Normalgewebe die typischen GS-positiven Zellschichten um die Zentralvenen (dunkel gefärbt) zu erkennen. Daneben zeigt das durch weiße Pfeile markierte Tumorgewebe keine GS-Expression. Auch die CYP2C-Färbung zeigt die zu erwartende CYP2C-Expression im Normalgewebe (dunkel gefärbte Zellen). Die vorab schon als GS-negative Tumoren gefundenen Bereiche bleiben auch hier ungefärbt, d.h. weder GS- noch CYP2C-Expression sind in diesen Tumoren nachweisbar.

Die Mehrzahl der Tumoren der PB-behandelten Tiere der Promotionsstudie wiesen dagegen eine Überexpression der GS auf. Mauslebergewebeschnitte eines solchen Tieres sind in der folgenden Abbildung gezeigt (Abb. 4.3). Die Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch sowohl auf ihre GS-, als auch auf ihre CYP2C-Expression hin untersucht. Außer einem, in der Abbildung mit einem weißen Pfeil gekennzeichneten, Tumor zeigten alle Tumoren eine vermehrte GS-Expression. Ein Großteil der Zellen dieser Tumoren wiesen eine positive GS-Färbung auf. Parallel dazu zeigte die CYP2C-Färbung, dass in GS-positiven Tumoren auch vermehrt die Isoenzyme der CYP2C-Familie exprimiert werden.

Diese Isoenzyme sind PB-induzierbar. Dies führt zu einer starken Zonierung der CYP2C-Expression in den Hepatozyten des umliegenden normalen Lebergewebes. Auffällig ist hierbei, dass GS-negative Tumorzellen auch eine verminderte CYP2C-Expression zeigen, obwohl die Tiere mit dem CYP2C-Induktor PB behandelt wurden.

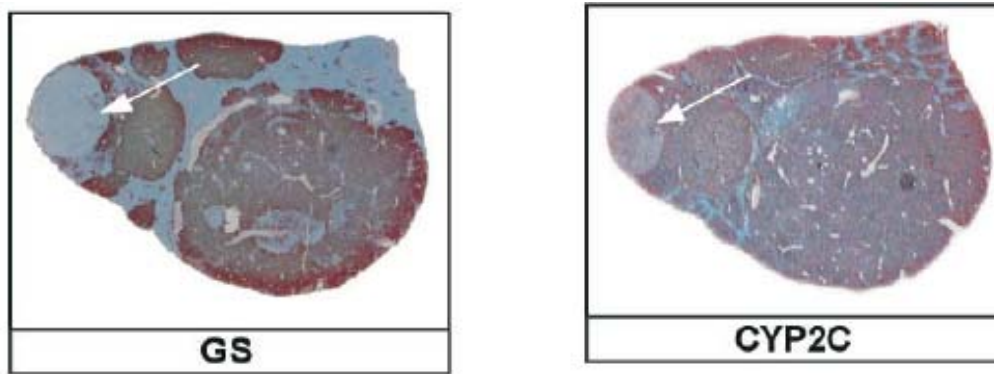


Abbildung 4.3: Immunhistochemische GS- und Cytochrom P450 2C-Färbung von Mauslebergewebe eines DEN/PB-behandelten Tieres.

Übersichtsvergrößerung eines Lebergewebeschnittes des Promotionsexperiments. Mauslebergewebe eines mit DEN/PB behandelten Tieres der Promotionsstudie. Die Abbildung zeigt die immunhistochemische GS- und CYP2C-Analyse. In der GS-Färbung sind im Normalgewebe die typischen GS-positiven Zellschichten um die Zentralvenen (dunkel gefärbt) zu erkennen. Neben GS-positivem Tumorgewebe findet sich hier auch ein Tumor, der keine GS-Expression aufweist (mit weißem Pfeil markiert). Auch die CYP2C-Färbung zeigt die zu erwartende CYP2C-Expression im Normalgewebe. GS- und CYP2C-Expression korrelieren. Tumoren, die eine erhöhte GS-Expression zeigen, weisen auch eine erhöhte CYP2C-Expression auf. Die CYP2C-Expression fehlt in dem mit einem weißen Pfeil markierten Tumor, der keine GS-Expression besitzt.

Die folgende Abbildung zeigt einen Serienschnitt von Lebergewebe einer mit DEN und PB behandelten Maus der Promotionsstudie.

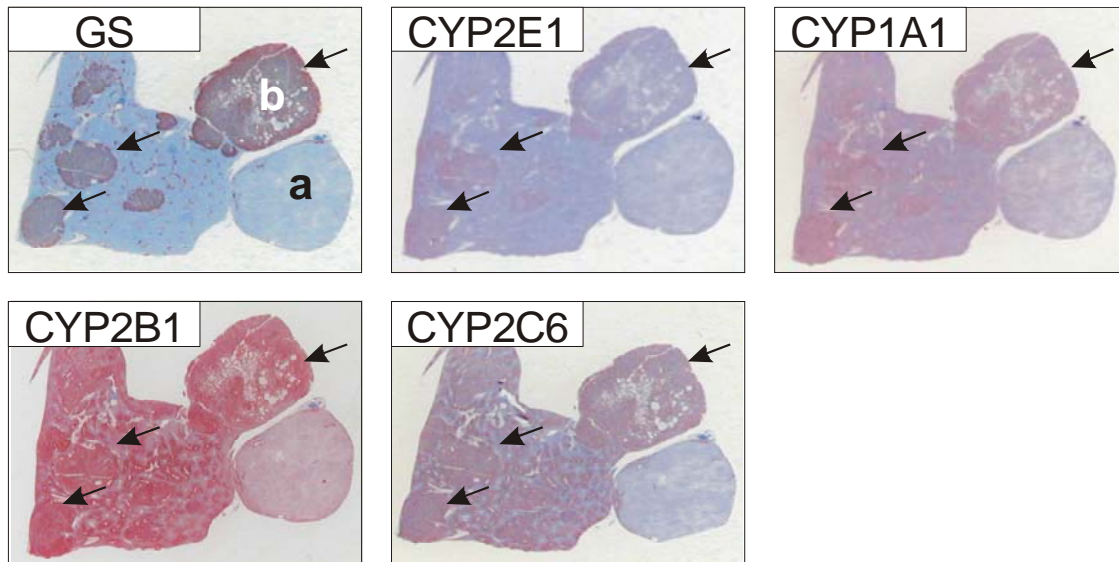


Abbildung 4.4: Immunhistochemische GS- und Cytochrom P 450-Färbung von Mauslebergewebe des Promotionsexperiments.

Übersichtsvergrößerung eines Lebergewebe-Serienschnittes des Promotionsexperiments. Mauslebergewebe eines mit DEN/PB behandelten Tieres der Promotionsstudie. Die Abbildung zeigt die immunhistochemische GS- und CYP-Analyse verschiedener CYP-Isoenzyme. Tumor a, der Wildtyp-*Ctnnb1* enthält, zeigt weder GS-, noch CYP450-Expression der untersuchten Isoenzyme. Tumor b, der nachgewiesen eine Punktmutation in Codon 35 des *Ctnnb1* besitzt, und die zwei weiteren mit Pfeilen markierten Tumoren dagegen zeigen in allen untersuchten Enzymen eine, z.T. deutliche, Überexpression. GS- und CYP450-Expression korrelieren auch hier in Normal- und Tumorgewebe.

Abbildung 4.4 zeigt einen Serienschnitt des bereits in Abb. 4.1 gezeigten Mauslebergewebeschnitts. Dieser Serienschnitt zeigt deutlich, dass GS-Expression und CYP450-Expression korrelieren. Tumoren mit vermehrter GS-Expression zeigen eine Expression in den untersuchten CYP450-Isoenzymen, wogegen GS-negative Tumoren keine CYP-Isoformen exprimieren. Die Färbung macht deutlich, dass PB-induzierbare CYP2B- und

CYP2C-Isoenzyme auch im Normalgewebe der Leber exprimiert werden. Die nicht oder nur sehr gering PB-induzierbaren Formen CYP2E1 und 1A werden in Tumoren der mit DEN und PB behandelten Tiere, die GS-Überexpression aufweisen, auch vermehrt exprimiert.

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass Ratten, die zuvor mit DEN und PB behandelt wurden, neoplastische Leberläsionen entwickeln, in denen eine vermehrte Expression von PB-induzierbaren CYP-Isoformen nachgewiesen werden kann. Die Expression von 3-Methylcholanthren-induzierbaren CYP-Isoenzymen bleibt dagegen unverändert. PB kann in diesen Tieren also als auch dann als Induktor wirken, wenn die Zellen normalerweise keine oder nur sehr geringe CYP-Expression besitzen (Buchmann *et al.*, 1987; Kunz *et al.*, 1987). Dagegen sind in GS-positiven Mauslebertumoren von PB-behandelten Tieren sowohl vermehrte Expression von PB- und 3-MC-induzierbaren CYP-Isoenzymen vorhanden.

Mausleberläsionen der Inhibitionsstudie zeigten nahezu keine Glutaminsynthetase-Expression. Dies war unabhängig davon, ob die Tiere mit DEN alleine oder mit DEN und PB behandelt wurden (Loeppen *et al.*, 2002). Ähnlich diesem Phänomen wurden auch nur wenige GS-positive Läsionen in nur mit DEN-behandelten Tieren der Promotionsstudie gefunden. Insgesamt konnten nur 12 GS-positive Läsionen in Lebern dieser Tiere gefunden werden, die im Vergleich zu den anderen gefunden Läsionen sehr klein waren. Auch in diesen Läsionen korrelierten GS- und CYP450-Expression. Ein Beispiel dieser Läsionen ist in der folgenden Abbildung gezeigt (Abb. 4.5).

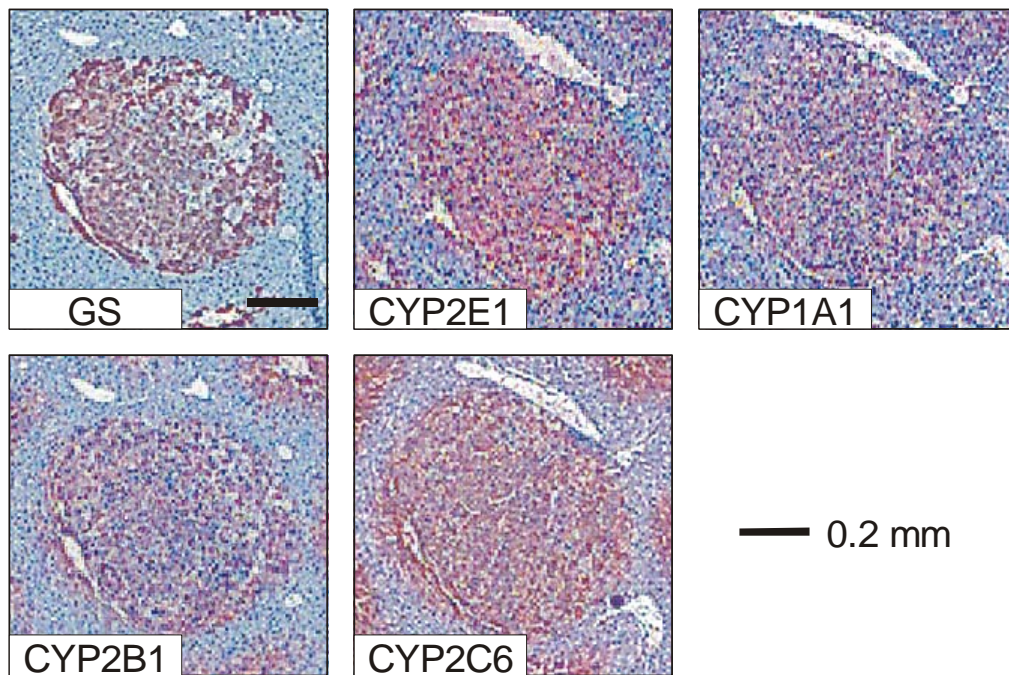


Abbildung 4.5: Immunhistochemische GS- und Cytochrom P 450-Färbung von Mauslebergewebe des Inhibitionsexperiments.

Übersichtsvergrößerung eines Lebergewebe-Serienschnittes des Inhibitionsexperiments. Mauslebergewebe eines mit DEN-behandelten Tieres der Inhibitionsstudie. Der Schnitt wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Die Abbildung zeigt die immunhistochemische GS- und CYP-Analyse verschiedener CYP-Isoenzyme. GS- und CYP450-Expression korrelieren auch hier im gezeigten Tumorgewebe.

Die Quantifizierung der CYP2E1-, 2B- und 2C-Expression in GS-positiven und GS-negativen Leberläsionen der beiden Studien ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Fast alle GS-positiven Lebertumoren der DEN/PB-behandelten Tiere wiesen erhöhte CYP-Expression auf. Auch alle 12 GS-positiven Leberläsionen der nicht mit PB-behandelten Tiere exprimierten vermehrt die untersuchten CYP 450-Isoenzyme 2E1 und 2C. Für 9 dieser 12 Läsionen traf dies auch für die CYP2B-Expression zu, wobei die Höhe der Expressionen etwas niedriger war als in den GS-positiven Tumoren der DEN/PB-behandelten Tiere.

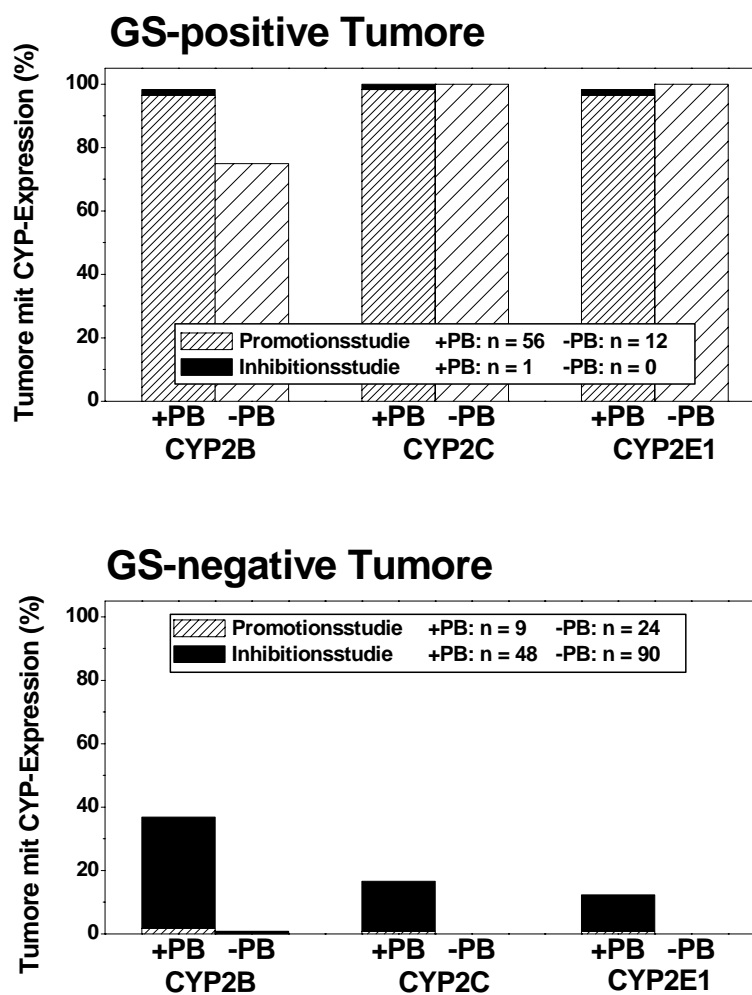


Abbildung 4.6: Quantifizierung der CYP450-Expression in GS-positiven und -negativen Lebertumoren.

Mauslebergewebeschnitte von DEN- und DEN/PB-behandelten Tieren wurden immunhistochemisch hinsichtlich ihrer GS- und CYP450 2B-, 2C- und 2E1-Expression untersucht und anschließend quantifiziert. Insgesamt wurden 114 Tumoren von DEN/PB-behandelten Tieren, sowie 126 Tumoren von nur mit DEN behandelten Tieren untersucht.

Cytochrom P450-Expression wurde auch in den GS-negativen Tumoren von PB- und nicht PB-behandelten Tieren untersucht. Nur eine von 126 Leberläsionen von nicht mit PB behandelten Mäusen zeigte CYP2B-Expression, während die anderen untersuchten

CYP-Isoformen nicht nachgewiesen werden konnten. Weniger als 20% der GS-negativen Leberläsionen von PB-behandelten Tieren, die alle aus der Inhibitionsstudie stammten, zeigten eine leichte Erhöhung der CYP2C- und 2E1-Expression. Ungefähr 40% dieser Läsionen waren CYP2B-positiv.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass fast alle GS-positiven, wahrscheinlich *Ctnnb1*-mutierte Läsionen eine erhöhte Expression der untersuchten Cytochrom P450-Isoenzyme besitzen. In Läsionen ohne *Ctnnb1*-Mutation dagegen korreliert die Cyp-Expression.

4.1.2 Untersuchung der Cytochrom P450- und der GS-Expression mittels Western Blot

Nach der immunhistochemischen Analyse der Cytochrom P450-Expression in GS-positiven und -negativen Mauslebertumoren wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analytik die Korrelation von Glutaminsynthetase(GS)- und Cytochrom P450 (CYP450)-Expression in Mauslebergewebe untersucht. Hierbei wurden Primärantikörper gegen die CYP450-Isoenzyme der Familien 2B, 2C und 3A, sowie gegen CYP2E1 eingesetzt.

β -Catenin diente als Ladekontrolle, da die Proteinmenge in allen Lebergewebeproben gleichbleibend war. Für die Western-Blot-Analyse wurde zuvor aus Homogenaten von Tumor- oder Normalgewebeproben das gesamte zelluläre Protein isoliert. Anschließend wurde die GS- und CYP450-Expression von Normalgewebe aus DEN- behandelten und DEN/PB-behandelten Mauslebern, sowie von Tumorgewebe aus DEN-behandelten und DEN/PB-behandelten Mauslebern miteinander verglichen. Für diese Untersuchung waren nur aus PB-behandelten Tieren *Ctnnb1*-mutierte Gewebeproben einsetzbar, da im Lebergewebe der nicht mit PB behandelten Tiere keine *Ctnnb1*-Mutationen gefunden wurden. Dagegen stammten alle *Ctnnb1*-Wildtyp-Gewebeproben aus nicht mit PB behandelten Mäusen der

Promotionsstudie. Abbildung 4.7 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Wie schon in vorangegangenen Studien war auch hier die Glutaminsynthetase-Expression in Tumoren PB-behandelter Mäuse, die Mutationen im *Ctnnb1*-Gen enthalten, im Vergleich zu Tumoren unbehandelter Mäuse und zum Normalgewebe beider Behandlungsgruppen deutlich erhöht.

Im Normalgewebe sowohl von DEN- als auch von DEN/PB-behandelten Mäusen ist zwar auch eine GS-Expression nachweisbar, die aber im Verhältnis zu Tumoren aus DEN/PB-behandelten Mäusen, die eine Punktmutation in *Ctnnb1* aufweisen, relativ gering ausfällt.

Durch die PB-Behandlung der Mäuse wurde die GS-Expression in normalen Hepatozyten nur unwesentlich verändert. Allerdings zeigte sich, dass sich die Cytochrom P450-Expression, ähnlich wie die GS-Expression, in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren änderte. Die Proteinexpression der untersuchten CYP450-Isoenzyme war in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren, die eine deutlich erhöhte GS-Expression aufwiesen, ebenfalls erhöht im Vergleich zu Lebernorgangewebe.

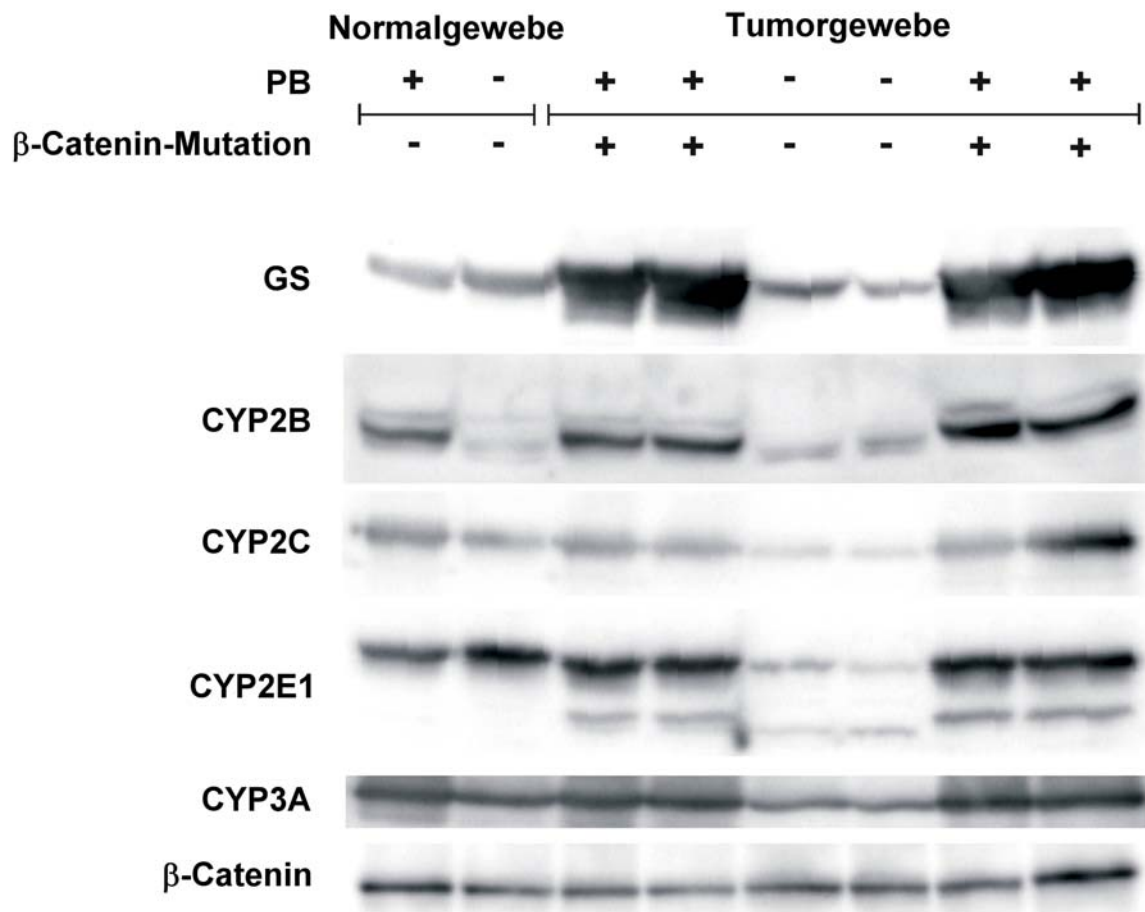


Abbildung 4.7: Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der CYP- und GS-Proteinexpression in Mausleber-Tumor- und Normalgewebe.

Aus Gewebehomogenaten von Lebertumoren und normalem Lebergewebe von DEN- und DEN/PB-behandelten Mäusen wurde Gesamtprotein isoliert und per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und hinsichtlich ihrer GS-, β -Catenin und CYP2B1-, 2C6-, 2E1- und 3A1-Expression untersucht.

Entsprechend der Ergebnisse vorangegangener Studien kann die GS-Expression als Marker für mutiertes β -Catenin im Lebergewebe dienen. Die Proteinexpression von CYP2B, 2C und 2E1 in GS-positiven und damit wahrscheinlich *Ctnnb1*-mutierten Lebertumoren ist sehr viel höher als in *Ctnnb1*-Wildtyp Tumoren. Die Expression des CYP3A-Isoenzym zeigte dagegen nur geringe Unterschiede in den untersuchten Lebergewebeproben. Das normale Lebergewebe von PB-behandelten Tieren zeigte eine erhöhte CYP2B-Expression, was auf

den Induktionseffekt des PB zurückzuführen ist. Die Expressionsgehalte der anderen untersuchten CYP-Isoenzyme, wie CYP2C und 2E1, wurden dagegen durch PB nicht oder nur schwach verändert. Die Expression der letztgenannten CYP-Isoformen war in *Ctnnb1*-Wildtyp Tumoren vermindert und entsprach nur etwa 20-40 % der Menge, die in normalem Lebergewebe von nicht mit PB behandelten Mäusen gemessen werden konnte. Dieses wurde durch Quantifizierung der durchgeführten Western Blot-Analysen mit Hilfe des Programms TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ermittelt. CYP3A bildete hier allerdings eine Ausnahme, da es nur zu 30 % vermindert exprimiert wurde.

Im Gegensatz dazu wurden die verschiedenen untersuchten CYP-Isoenzyme etwa 2-3 mal höher in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren im Vergleich zu Lebernorgewebe PB-behandelter Tiere exprimiert. Die CYP3A-Expression blieb in diesen Geweben nahezu unverändert. Wie bereits erwähnt und wie auch schon in vorangegangenen Studien gezeigt (Aydinlik *et al.*, 2001), blieb die Expression von β -Catenin unverändert in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren, verglichen mit Lebertumoren, die Wildtyp-*Ctnnb1* enthielten.

Neben den bereits genannten CYP-Isoformen wurde des Weiteren die Proteinexpression des Ah-Rezeptors und seines Zielgens Cytochrom P450 1A1 per Western Blot analysiert. Das Normallebergewebe zweier mit TCDD behandelte Mäuse (250 ng/kg Körpergewicht), einem starken CYP1A1-Induktor, diente als Positivkontrolle für die CYP1A1-Induktion.

Im Lebernorgewebe blieb die CYP1A1-Proteinexpression durch PB-Behandlung fast unverändert, wurde aber durch TCDD deutlich verstärkt (s. Abb. 4.8). Lebertumoren, die *Ctnnb1*-Mutationen enthielten, zeigten eine erhöhte CYP1A-Proteinexpression im Vergleich zu normalem Lebergewebe von nicht mit TCDD behandelten Mäusen. *Ctnnb1*-Wildtyp Tumoren enthielten dagegen kaum nachweisbare Proteinmengen dieses Enzyms. Die Proteinexpression des Ah-Rezeptors war in allen Lebertumorproben im Vergleich zu Lebernorgewebe erhöht.

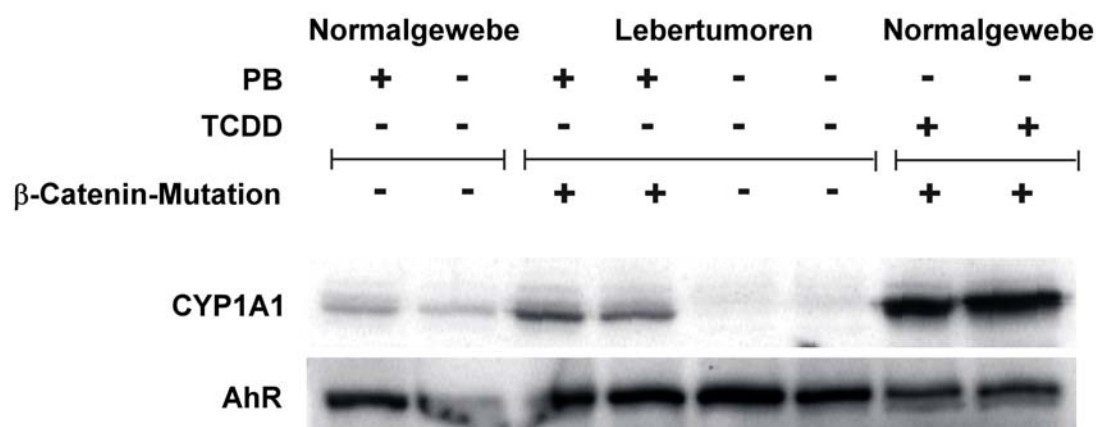


Abbildung 4.8: Western Blot-Analyse der Ah-Rezeptor- und CYP1A-Expression in *Cttnb1*-Wildtyp und –mutierten Tumoren.

Aus Gewebehomogenaten von Lebertumoren und normalem Lebergewebe von DEN- und DEN/PB-behandelten Mäusen wurde Gesamtprotein isoliert und per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und hinsichtlich ihrer CYP1A- und AhR-Expression untersucht. Normallebergewebe aus TCDD-behandelten Mäusen (250 ng/kg Körpergewicht) diente als Positivkontrolle für die CYP1A-Induktion.

4.2 Untersuchung der mRNA-Expression der Glutaminsynthetase und der Cytochrom P450-Isoenzyme in Lebertumoren der Maus

Mit Hilfe des Lightcycler-Systems von Roche wurden quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt, um die mRNA-Expression von Glutaminsynthetase und verschiedenen Cytochrom P450-Isoenzymen in Mauslebertumoren im Vergleich zu normalem Mauslebergewebe zu untersuchen. Hierbei sollte geklärt werden, ob die vermehrte Expression von GS-Protein und CYP-Proteinen durch eine verstärkte Transkriptionsaktivität in *Cttnb1*-mutierten Lebertumoren verursacht wird. Des Weiteren wurde der Einfluß von PB auf die Expression dieser Enzyme in normalen Hepatozyten untersucht. Zur Normalisierung wurde das *Housekeeping*-Gen GAPDH eingesetzt.

In normalem Lebergewebe PB-behandelter Mäuse war die mRNA-Expression des Enzyms CYP2B10 um den Faktor 321 erhöht im Vergleich zu Lebergewebe von nicht mit PB behandelten Tieren. Die mRNA-Expression des Enzyms CYP1A1 blieb dagegen nahezu unverändert. Hier zeigte sich nur eine Expressionserhöhung um den Faktor 1,75. Die mRNA-Gehalte von Glutaminsynthetase und CYP2E1 blieben ebenfalls in PB-behandelten Tieren unverändert im Vergleich zu nicht mit PB behandelten Mäusen. Lebertumoren, die keine Mutationen in *Cttnb1* aufwiesen, exprimierten die untersuchten CYP-Isoenzyme auf mRNA-Ebene in geringerem Maße als Zellen des Lebernorgangewebes von nicht mit PB behandelten Tieren. Dies steht in Einklang mit den durch Western Blot Analyse erhaltenen Ergebnissen. Das Isoenzym CYP2B10 bildete hier allerdings eine Ausnahme, bei dem kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden konnte.

Gen	GS	CYP 2B10	CYP 2E1	CYP 1A1	GAPDH
PCR Effizienz	1,84	1,67	1,68	1,84	1,87
<i>CP Werte</i>					
<i>- PB</i>					
Normallebergewebe	25,2	39,6	18,0	33,8	17,7
<i>Ctnnb1</i> wt Tumoren	28,2	42,4	24,9	39,9	19,7
<i>+ PB</i>					
Normallebergewebe	26,2	27,8	17,0	32,5	17,3
<i>Ctnnb1</i> mutierte Tumoren	19,2	31,3	18,1	34,1	19,8
<i>Vergleich Ctnnb1 wt Tumoren mit unbehandeltem Normallebergewebe</i>					
Expressionsraten	0,59	0,81	0,1	0,087	-
p-Werte	0,604	0,739	0,002	0,045	-
<i>Vergleich Ctnnb1 mutierte Tumoren mit PB-behandeltem Normallebergewebe</i>					
Expressionsraten	331,2	0,77	2,58	1,717	-
p-Werte	0,001	0,356	0,016	0,429	-
<i>Vergleich Ctnnb1 mutierte Tumoren mit Ctnnb1 wt Tumoren</i>					
Expressionsraten	232,5	301,7	32,7	34,4	-
p-Werte	0,001	0,001	0,001	0,012	-
<i>Vergleich PB-behandeltes mit unbehandeltem Normallebergewebe</i>					
Expressionsraten	0,41	320,6	1,28	1,75	-
p-Werte	0,051	0,001	0,49	0,047	-

Tabelle 4.1: Relative mRNA Quantifizierung von GS und CYP-Isoenzymen durch real-time PCR. Die Berechnung der Expressionsraten erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Expressionsrate} = \frac{\left(E_{\text{target}}\right)^{\text{delta}CP_{\text{target}(Ctnnb1\text{mutiert-wt})}}}{\left(E_{\text{reference}}\right)^{\text{delta}CP_{\text{reference}(Ctnnb1\text{mutiert-wt})}}}$$

Ctnnb1-mutierte Lebertumoren zeigten gegenüber dem normalen Lebergewebe PB-behandelter Tiere eine um den Faktor 331 erhöhte GS-Expression auf mRNA-Ebene. Die mRNA-Expression von CYP2B10 und CYP1A1 blieb dagegen in diesen Tumoren nahezu unverändert, während CYP2E1 auf mRNA-Ebene um einen Faktor von ca. 2,6 vermehrt exprimiert wurde. Der Vergleich der mRNA-Gehalte von *Ctnnb1*-mutierten Tumoren und nicht *Ctnnb1*-mutierten Tumoren zeigte, dass CYP2B10, CYP2E1 und CYP1A1 signifikant vermehrt exprimiert wurden und zwar um die Faktoren 300, 34 und 33.

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin direkt oder indirekt die Transkription der GS und der untersuchten CYP 450-Isoenzyme in Mauslebertumoren beeinflusst.

4.3 Transiente Transfektion von Maushepatomzellen (Zelllinie 55.1c)

Die Induktion von Isoenzymen der Familien CYP1A und CYP2B durch Fremdstoffe (Xenobiotika) wird durch die Rezeptoren AhR und CAR vermittelt. Durch transiente Transfektionen der Maushepatomzelllinie 55.1c (Kress *et al.*, 1992), die eine Deletion in *Ctnnb1* aufweisen, wurde der Effekt von mutiertem β -Catenin auf die transkriptionelle Aktivierung der oben genannten Proteine untersucht. Hierfür wurden AhR- und CAR-responsive Luciferase-Reportergenkonstrukte eingesetzt.

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von 55.1c-Zellen mit einem Expressionsvektor, der punktmutiertes *Ctnnb1* (*Ctnnb1*-S33Y) enthält, zu einer starken Aktivierung des β -Catenin/TCF-responsiven Reportergenkonstruktes TopFlash (Schwarz *et al.*, 2003) führt. Dieser Effekt wurde auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet und ist in Abbildung 4.9 gezeigt.

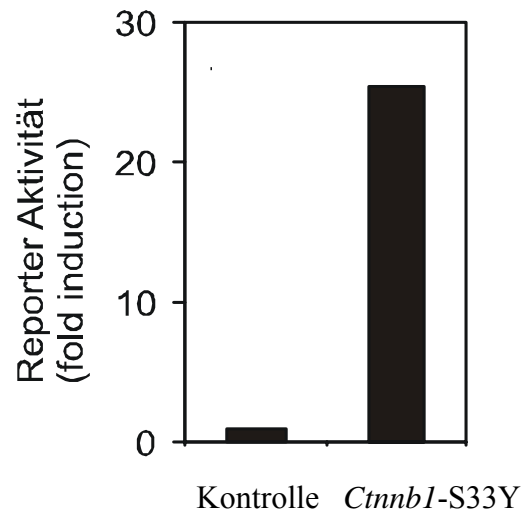


Abbildung 4.9: Aktivierung des β -Catenin/TCF-responsiven Reportergenkonstruktes TopFlash durch punktmutiertes *Ctnnb1* (*Ctnnb1*-S33Y).

55.1c Maushepatomzellen wurden transient mit einem für *Ctnnb1*-S33Y codierenden Expressionsvektor und dem β -Catenin/TCF-responsiven Reportergenkonstrukt TopFlash transfiziert.

Co-Transfektion des Expressionsvektors $p\beta\text{Cat}^{\text{S33Y}}$ /CIneo für punktmutiertes *Ctnnb1* zusammen mit einem Luciferase-Reportergenkonstrukt, das ein ca. 2,7 kb großes Fragment der 5'-flankierenden Promotorregion des Ratten-CYP2B1-Gens (pGL3C2B1) (Heder *et al.*, 2001) enthält, ergab eine Stimulation der Reportergenaktivität um den Faktor 13 (s. Abbildung 4.10).

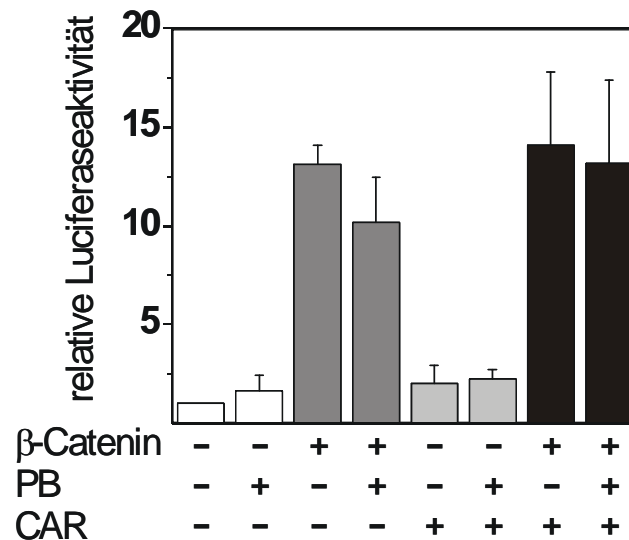


Abbildung 4.10: Aktivierung des PB-responsiven Reportergenkonstrukts pGL3C2B1 durch punktmutiertes β -Catenin und CAR in Maushepatomzellen (55.1c).

55.1c Maushepatomzellen wurden transient mit Expressionsvektoren, die für S33Y- β -Catenin sowie für CAR codieren, und dem PB-responsiven Reportergenkonstrukt pGL3C2B1, das ~2,7 kb der Upstream regulatorischen Region des CYP2B1-Gens trägt, transfiziert. Ein Teil der transfizierten Zellen wurde 24 h mit 1,5 μ M PB inkubiert. Die Ergebnisse wurden relativ zum Leervektor pCIneo ausgewertet. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, deren durchschnittliche Ergebnisse hier gezeigt sind.

Phenobarbital, das in vivo die Isoenzyme der CYP2B-Familie induziert, stimulierte den eingesetzten CYP2B1-Reporter selbst nur verhältnismäßig schwach und führte zu einer schwachen Abnahme der S33Y- β -Catenin-vermittelten Aktivierung des pGL3C2B1-Konstrukts.

Die Co-Transfektion eines Expressionsvektors für mCAR-1 (pCR3-mCAR) (Ueda *et al.*, 2002) ergab eine leichte Aktivierung des Reporters pGL3C2B1, die durch PB nicht beeinflusst wurde. Wurde der mCAR-1-Expressionsvektor zusammen mit S33Y- β -Catenin transfiziert, wurde die Aktivierung des Luciferase-Konstrukts nicht weiter verstärkt. Auch hier hatte die PB-Behandlung keinen weiteren Effekt (s. Abb. 4.10).

Neben den beschriebenen Transfektionen wurden auch (Co-)Transfektionen mit einem TK-getriebenen Reportergenkonstrukt (pT81LUC3_DRE), das drei DRE-Core Motive enthält, in 55.1c-Maushepatomzellen durchgeführt. Die Bedingungen entsprachen denen der bereits beschriebenen Transfektionen. Dieses Reportergenkonstrukt ist sehr gut geeignet, um AhR-vermittelte Antworten mittels transienter Transfektion zu untersuchen. Durch Behandlung der transfizierten Zellen mit TCDD konnte die Aktivität des Reporters um den Faktor 20 im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen, die nur mit Leervektor transfiziert wurden, aktiviert werden.

Im Gegensatz zu dem bereits beschriebenen pGL3C2B1-Reporter wurde der DRE-getriebene Reporter nur unwesentlich durch Co-Transfektion mit dem *Ctnnb1*-S33Y-Expressionsvektor aktiviert. Wurden diese Zellen allerdings zusätzlich mit TCDD behandelt, so erhöhte sich die Reportergenaktivität deutlich (s. Abb. 4.11).

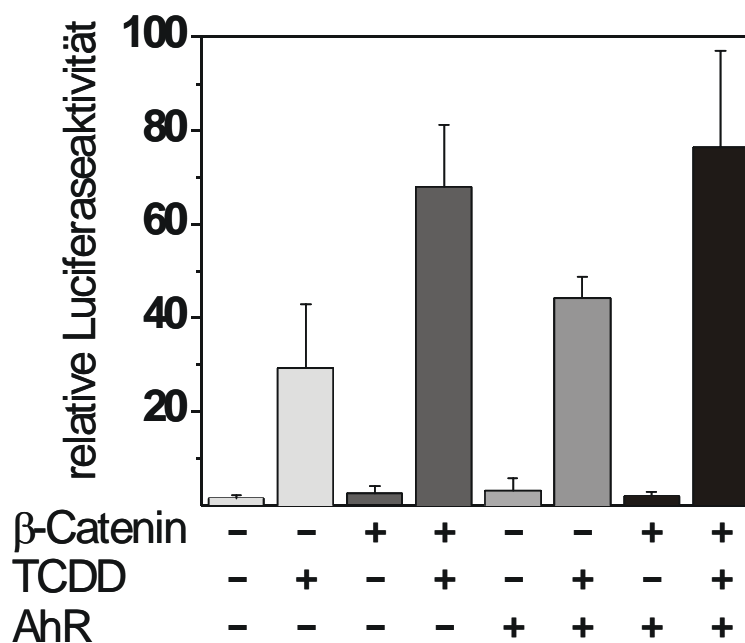


Abbildung 4.11: Aktivierung eines TCDD-responsiven Reporter-genkonstrukts durch punktmutiertes β -Catenin und AhR in Maushepatomzellen (55.1c).

55.1c Maushepatomzellen wurden transient mit Expressionsvektoren, die für S33Y- β -Catenin sowie für AhR codieren, und dem 3 x DRE Luciferase-Reporter-genkonstrukt transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 20 nM TCDD oder 0,1 % (v/v) DMSO als Kontrolle behandelt. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, deren durchschnittliche Ergebnisse hier gezeigt sind.

Durch gleichzeitige Transfektion des AhR-Expressionsvektors verstärkte sich die TCDD-vermittelte Stimulation des pT81LUC3_DRE-Reporters. Allerdings konnte die Stimulierung des Reporters durch den S33Y- β -Catenin-Expressionsvektor und TCDD-Behandlung nicht weiter verstärkt werden. Die Inkubation von Maushepatomzellen mit TCDD führt zu einer negativen Regulation des Ah-Rezeptors (Pollenz, 1996). Dieser Effekt konnte auch im Rahmen dieser Arbeit in 55.1c-Maushepatomzellen beobachtet werden. Einen stabilisierenden Effekt des Reporter-genkonstrukts durch Transfektion der Zellen mit dem S33Y- β -Catenin-Expressionsvektor konnte allerdings nicht beobachtet werden. Somit ist dies als Erklärung für die in den oben beschriebenen Transfektionen beschriebenen Effekte auszuschließen.

4.4 Generierung einer transgenen Maus

4.4.1 Klonierung des p β -Catenin^{S33Y}/CALNL5 -Konstrukts für die Mikroinjektion mittels Gateway System (Invitrogen)

4.4.1.1 Gateway Vector Conversion System

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der 6098 bp große Vektor pCALNL5 (Riken BioResource Center, Japan) in einen Gateway® Destination Vektor umgewandelt. Der Vektor wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *Sma*I linearisiert und der Verdau mittels eines 1%igen Agarosegels kontrolliert (s. Abb. 4.12).

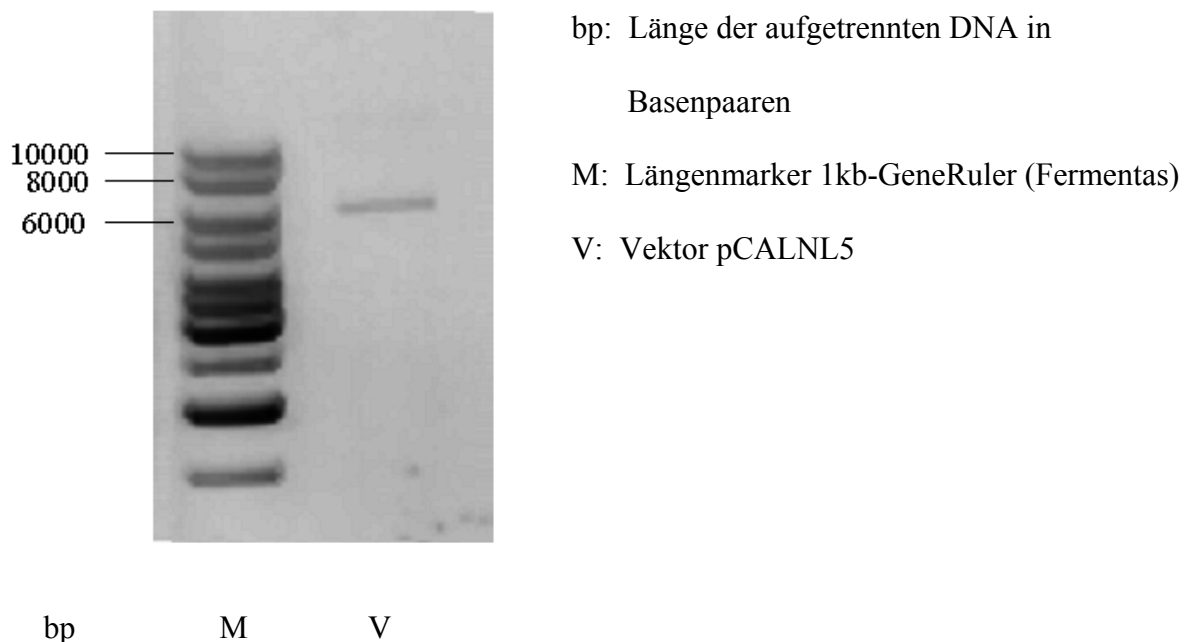


Abbildung 4.12: Linearisierung des Vektors pCALNL5 mit *Sma*I.

Im Anschluss daran wurde der linearisierte pCALNL5-Vektor mit Hilfe von Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Pharmacia) dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu verhindern. Der so vorbereitete Vektor konnte dann für die Ligation mit der *reading frame* Kassette RfB (Invitrogen) eingesetzt werden. Die aus der Ligation und anschließenden Transformantion erhaltenen Klone wurden vermehrt und anschließend die erfolgreiche Klonierung bzw. die Orientierung der RfB-Kassette im Vektor mit Hilfe eines Restriktionsverdaus mit den Enzymen BsrG I (s. Abb. 4.13 A), EcoR I (s. Abb. 4.13 B) und BamH I (s. Abb. 4.13 C) analysiert. Die jeweiligen Ansätze wurden mittels eines 1%igen Agarosegels überprüft.

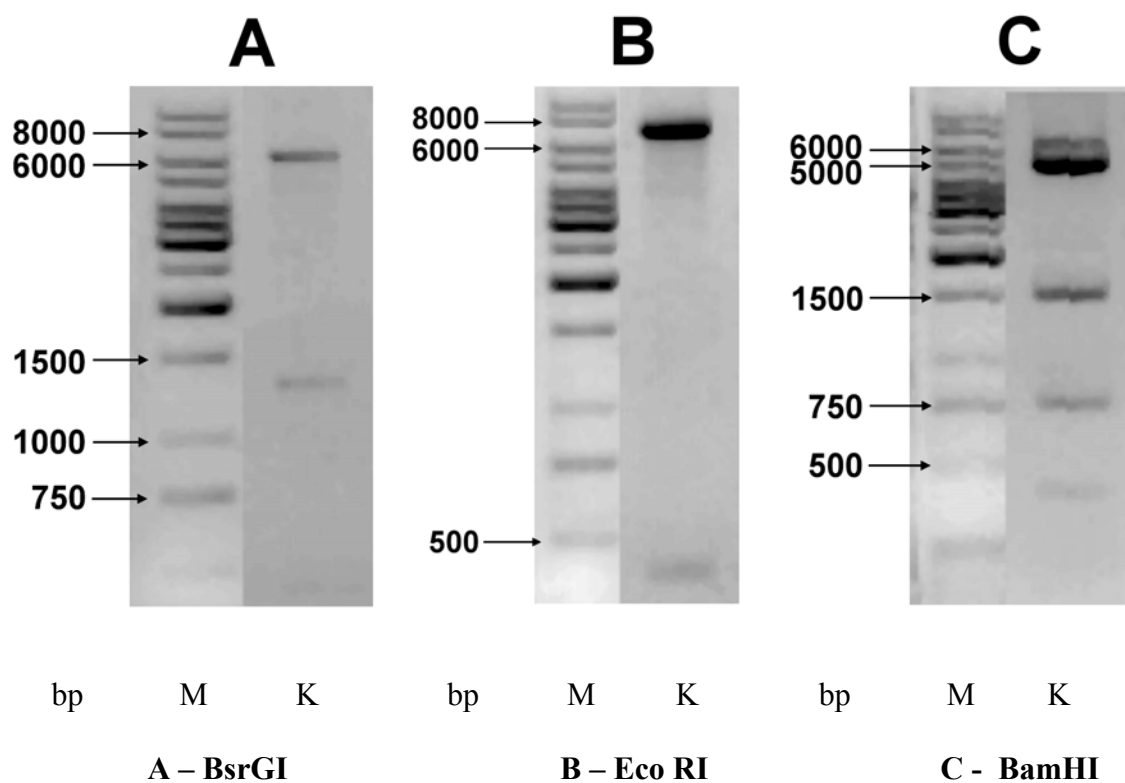


Abbildung 4.13: Restriktionsverdau des pRfB-CALNL5-Konstruktes mit BsrGI, EcoRI und BamHI.

Die Länge der aufgetrennten DNA in Basenpaaren (bp) des 1 kb-Längenmarkers GeneRuler (M, Fermentas) und von Klon 1.5 – pRfB-CALNL5 (K) ist für die Restriktionsverdaus mit den Enzymen BsrGI, EcoRI und BamHI dargestellt.

Das neu erhaltene pRfB-CALNL5-Konstrukt mit einer Größe von 7809 bp wurde in allen drei Restriktionsverdau in die zu erwartenden Fragmente gespalten. Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym BsrGI lieferte drei Fragmente mit folgenden Längen: 6124 bp, 1283 bp und 402 bp (auf dem Agarosegel nicht nachweisbar). Der Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI lieferte ein 7340 bp großes Fragment, sowie ein 469 bp großes Teilstück. Im letzten Verdau mit dem Restriktionsenzym BamHI wurden Fragmente der Länge 5224 bp, 1545 bp, 703 bp und 337 bp erhalten.

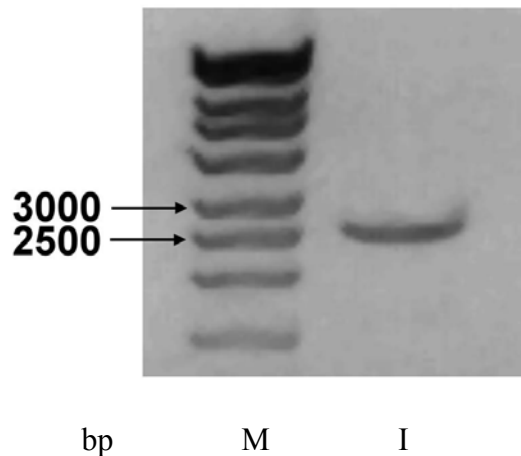
Nachfolgend musste die Funktionalität des in den pCALNL5-Vektor klonierten *ccdB*-Gens kontrolliert werden. Hierfür wurde der die RfB-Kassette enthaltende Vektor pRfB-CALNL5 sowohl in Top 10 Competent E.Coli-Bakterien (Invitrogen), als auch in One Shot[®] *ccdB* Survival[™] T1 Phage- Resistant Cells (Invitrogen) transformiert. Die Ansätze wurden anschließend sowohl auf Ampicillin-enthaltenden Agarpalatten, als auch auf Chloramphenicol-Ampicillin Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. In One Shot[®] *ccdB* Survival[™] Competent Cells (Invitrogen) wurden ca. 10000 mal mehr Kolonien erhalten als in One Shot[®] TOP10 Chemically Competent Cells, was dafür sprach, dass das *ccdB*-Gen in dem neu erhaltenen sogenannten Destination Vektor intakt und funktionell ist.

Die abschließende Sequenzierung des pRfB-CALNL5 Gateway[®] Destination Vektors zeigte, dass es sich hier um den gewünschten Vektor mit intakter einklonierter Kassette handelte (Sequenzierungsergebnis s. Anhang).

4.4.1.2 Amplifikation des Inserts Ctnnb1-S33Y

Für die Herstellung des Gateway Entry-Vektors wurde das 2,5 kb große *Ctnnb1*-S33Y-Insert des zuvor für transiente Transfektionen eingesetzten Expressionsvektors pβ-Catenin^{S33Y}/CIneo mit Hilfe des Expand Long Template PCR Systems (Roche) amplifiziert.

Die Amplifikation wurde 1:100 verdünnt und anschließend mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels kontrolliert. Durch die Verwendung des Mass Ruler™ Mix-Größenmarkers von Fermentas konnte so gleichzeitig die Konzentration des PCR-Produkts abgeschätzt werden.



bp: Länge der aufgetrennten DNA in Basenpaaren.

M: Längenmarker Mass Ruler (Fermentas), Auftragsmenge 5 μ l.

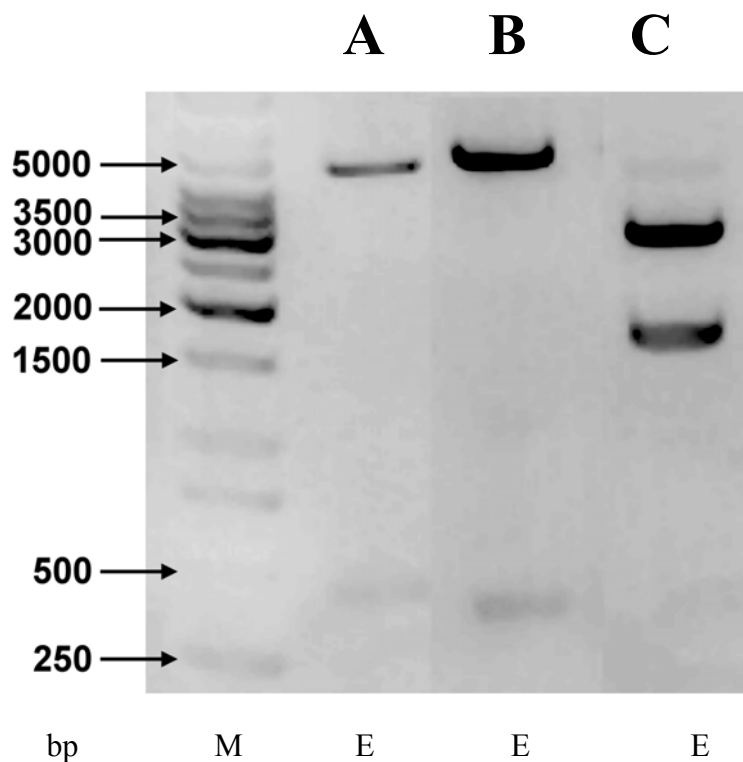
I: PCR-Produkt S33Y- β -Catenin-Insert, Auftragsmenge 5 μ l.

Abbildung 4.14: PCR-Amplifizierung des *Ctnnb1*-S33Y-Inserts.

Das Agarosegel (s. Abb. 4.14) zeigt deutlich das saubere PCR-Produkt mit einer Länge von 2595 bp. Die Intensität der 2500 bp großen Bande des Größenmarkers entspricht einer DNA-Konzentration von 13 ng/ μ l. Die Bande des PCR-Produkts entspricht in ihrer Intensität in etwa dieser Bande des Größenmarkers. Daraus ergibt sich, dass der aufgetragene PCR-Ansatz eine Insert-Konzentration von ca 1,3 ng/ μ l enthielt. Dieses PCR-Produkt konnte direkt in einen TOPO®-enthaltenden Gateway Entry-Vektor (pENTR™/D-TOPO® Vektor) einkloniert werden.

4.4.1.3 Klonierung des p β -Catenin^{S33Y}/D-TOPO[®]-Konstrukts

Für die Rekombination wurde ein Entry-Vektor benötigt, der das in pCALNL5 einzuklonierende *Ctnnb1*-S33Y-Insert enthielt. Das per PCR amplifizierte *Ctnnb1*-S33Y-Insert (s. Kapitel 4.4.1.2) wurde daher in den Gateway Entry Vektor pENTRTM/D-TOPO[®] einkloniert. Die Ligation wurde sowohl im molekularen Verhältnis 1:1 (Insert:Vektor), als auch im Verhältnis 2:1 (Insert:Vektor) durchgeführt. Die so erhaltenen Konstrukte wurden nach anschließender Transformation, Vermehrung und Isolierung per Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen HindIII, EcoRV und EcoRI/PvuI analysiert. Der Verdau wurde dann mittels eines 1%-igen Agarosegels überprüft (s. Abb. 4.15).



A – HindIII B – Eco RV C – EcoRI/PvuI

bp: Länge der aufgetrennten DNA in Basenpaaren.

M: Längenmarker 1kb-GeneRuler (Fermentas).

E: Klon 2.1 – Entry-Vektor p β -Catenin^{S33Y}/D-TOPO[®].

Abbildung 4.15: Restriktionsverdau des Entry-Vektors p β -Catenin^{S33Y}/D-TOPO[®].

In allen drei Restriktionsverdau wurden die zu erwartenden Fragmente erhalten. Der Verdau mit HindIII lieferte Fragmente der Größe 4434 bp, 420 bp und 126 bp. Der Verdau mit EcoRV lieferte zwei Fragmente der Größe 4614 bp und 366 bp, während durch den Verdau mit EcoRI/PvuI zwei 3172 bp und 1808 bp große Fragmente erhalten wurden. Bei dem untersuchten Klon 2.1 handelte es sich also um den gewünschten Entry-Vektor p β -Catenin^{S33Y}/D-TOPO[®].

Dieser durch den Restriktionsverdau als gewünschter Entry-Vektor identifizierte Klon wurde anschließend zusätzlich per Sequenzierung mit spezifischen Primern analysiert (Sequenzierungsergebnisse s. Anhang). Ein Ausschnitt dieser Sequenzierung ist in Abbildung 4.16 gezeigt.

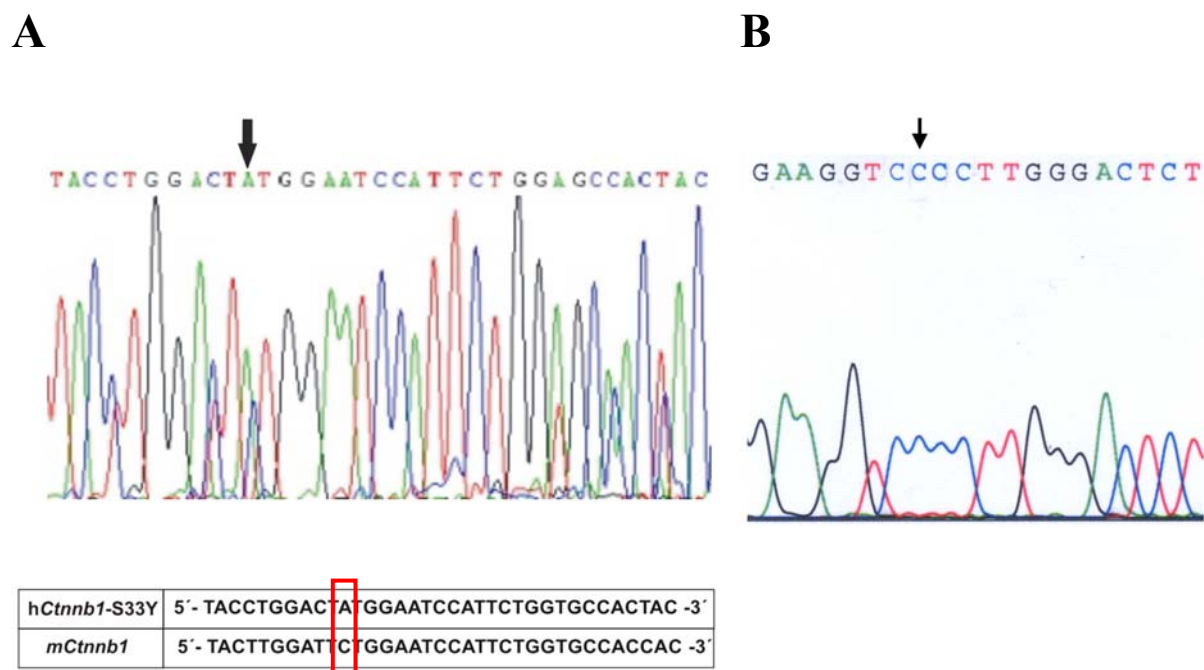


Abbildung 4.16: Mutationsanalyse des Entry-Vektors p β -Catenin^{S33Y}/D-TOPO[®].

(A) zeigt deutlich die Punktmutation in Codon 33, die zum Basenaustausch von C nach A führt. Die Sequenzfolge in diesem Bereich ist für *Ctnnb1*-S33Y sowie für Wildtyp-*Ctnnb1* gezeigt.

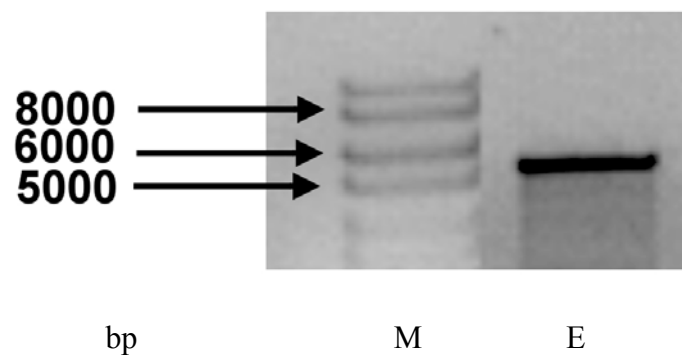
(B) zeigt deutlich die Punktmutation bei Position 1377 bp, die zum Basenaustausch von T nach C führt (CTC → CCC).

Die Punktmutation in Codon 33, die zum Basenaustausch von C nach A führt (TCT → TAT) führt, konnte mit Hilfe der Sequenzierung nachgewiesen werden. Daneben zeigte sich in der Sequenzierung allerdings auch, dass das *Ctnnb1*-S33Y-Insert des Entry-Konstruktes neben der gewünschten Mutation in Codon 33 eine weitere Punktmutation an Position 1377 bp enthielt, die zum Basenaustausch von T nach C (CTC → CCC) führte. Diese wurde aufgrund eines Fehlers der in der PCR eingesetzten Polymerase verursacht. Aus diesem Grund wurde vor der Durchführung der LR-Rekombinationsreaktion zunächst eine Mutagenese mit Hilfe des QikChangeTM XL-Kits von Stratagene durchgeführt, um das gewünschte *Ctnnb1*-S33Y-Insert zu erhalten.

4.4.1.4 Site directed Mutagenesis

Eine durch die PCR des *Ctnnb1*-S33Y-Inserts zusätzlich entstandene Punktmutation wurde mit Hilfe der *site directed mutagenesis* eliminiert.

Es handelt sich hierbei um eine einfache und effektive Methode ohne Subklonierung, die auf der Arbeit von Fisher und Pei (1997) basiert. Als Kontrollreaktion wurde die Reaktion parallel mit Whitescript Kontrollplasmid durchgeführt. Die Amplifikation per PCR wurde mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels überprüft.



bp: Länge der aufgetrennten DNA in Basenpaaren.

M: Längenmarker 1kb-GeneRuler (fermentas).

E: Klon 2.1 – Entry-Vektor p β -Catenin^{S33Y}/D-TOPO[®] nach site directed Mutagenese.

Abbildung 4.17: Site directed mutagenesis des Entry-Vektors p β -CateninS33Y/D-TOPO[®].

Anhand des Agarosegels konnte gezeigt werden, dass nach der PCR ein sauberes Produkt erhalten wurde, da keine Nebenbanden auftraten. Das saubere PCR-Produkt wurde anschließend mit DpnI verdaut. Dieses Restriktionsenzym verdaut das in der PCR enthaltene Template, so dass nur das die richtige Sequenz enthaltende PCR-Produkt zurückbleibt. Die so erhaltene DNA wurde mittels Sequenzierung mit Hilfe spezifischer Primer analysiert (Abb. 4.18).

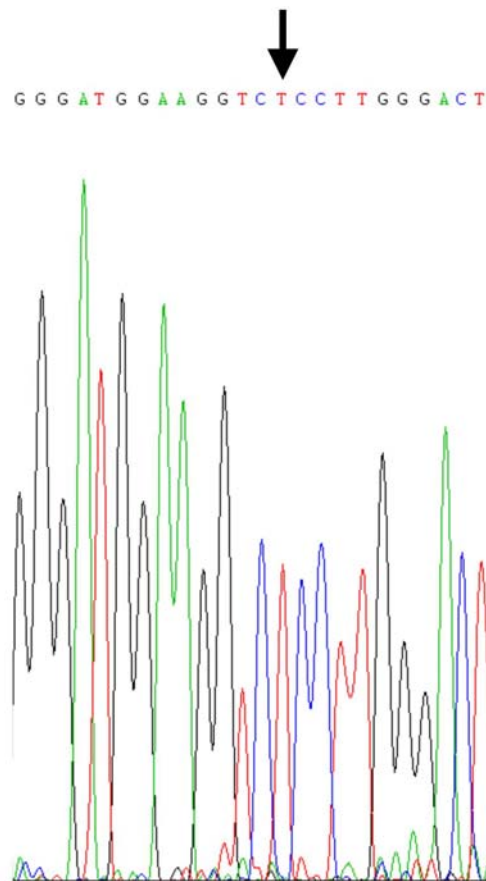


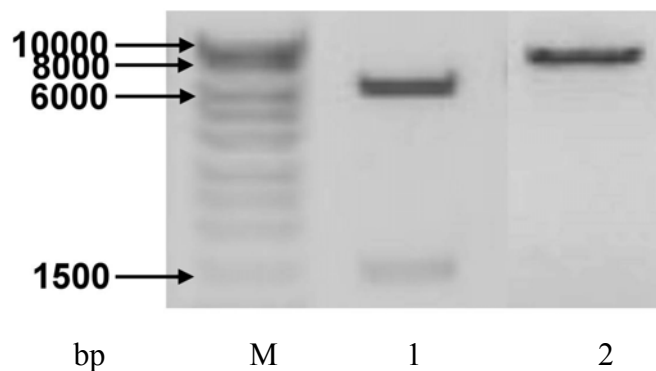
Abbildung 4.18: Sequenzierung des Entry-Vektors p β -CateninS33Y/D-TOPO[®] nach Mutagenese.

Die Sequenzierung zeigt, dass der während der Amplifikation entstandene Basenaustausch bei Position 1377 bp von T nach C durch *site directed mutagenesis* rückgängig gemacht werden konnte. Das *Ctnnb1*-S33Y-Insert des Entry-Vektors weist an dieser Stelle nun die Wildtyp-Sequenz (CTC) auf.

Hier zeigte sich, dass die während der PCR entstandene Mutation in Position 1377 bp, die zu einem Basenaustausch von T nach C geführt hatte, rückgängig gemacht werden konnte und das *Ctnnb1*-S33Y-Insert an dieser Stelle nun wieder die Wildtyp-Sequenz CTC anstelle des Triplets CCC enthielt. Der Entry-Vektor konnte anschließend für die Rekombination mit dem LR-Clonase-System eingesetzt werden.

4.4.1.5 Rekombination mit Hilfe des LR-Clonase-Systems

Die Rekombination zwischen Gateway-Destination Vektor und Entry-Vektor erfolgte mit Hilfe des Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen). Dieser katalysiert die *in vitro* Rekombination zwischen einem Entry-Vektor, der ein attL-flankiertes Gen enthält, und einem eine attR-site-enthaltenden Destination-Vektor. Dadurch wird der attB-enthaltende Expressionsvektor erhalten. Dieser wurde per Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Not I, sowie per Sequenzierung kontrolliert (s. Abb. 4.19).



bp: Länge der aufgetrennten DNA in Basenpaaren.

M: Längenmarker Mass Ruler Mix (Fermentas).

1: Eco RI-Verdau von Klon3 - pβ-Catenin^{S33Y}/CALNL5.

2: Not I-Verdau von Klon3 - pβ-Catenin^{S33Y}/CALNL5.

Abbildung 4.19: Restriktionsverdau von Klon3 - pβ-Catenin^{S33Y}/CALNL5 – nach Rekombination.

Der Restriktionsverdau von Klon 3 mit den Enzymen Eco RI und Not I lieferte die erwarteten Fragmente der Größe 7220 bp und 1370 bp, sowie 8590 bp. Klon 3 aus der Rekombinationsreaktion wurde daraufhin zusätzlich per Sequenzierung analysiert. Hierin

fand sich die gewünschte Punktmutation in Codon 33 des *Ctnnb1*-S33Y-Inserts, sowie die loxP-Stellen des Destination Vektors pCALNL5. Die Sequenzierungen sind im Anhang gezeigt. Die folgende Abbildung 4.21 zeigt beispielhaft Ausschnitte dieser Ergebnisse.

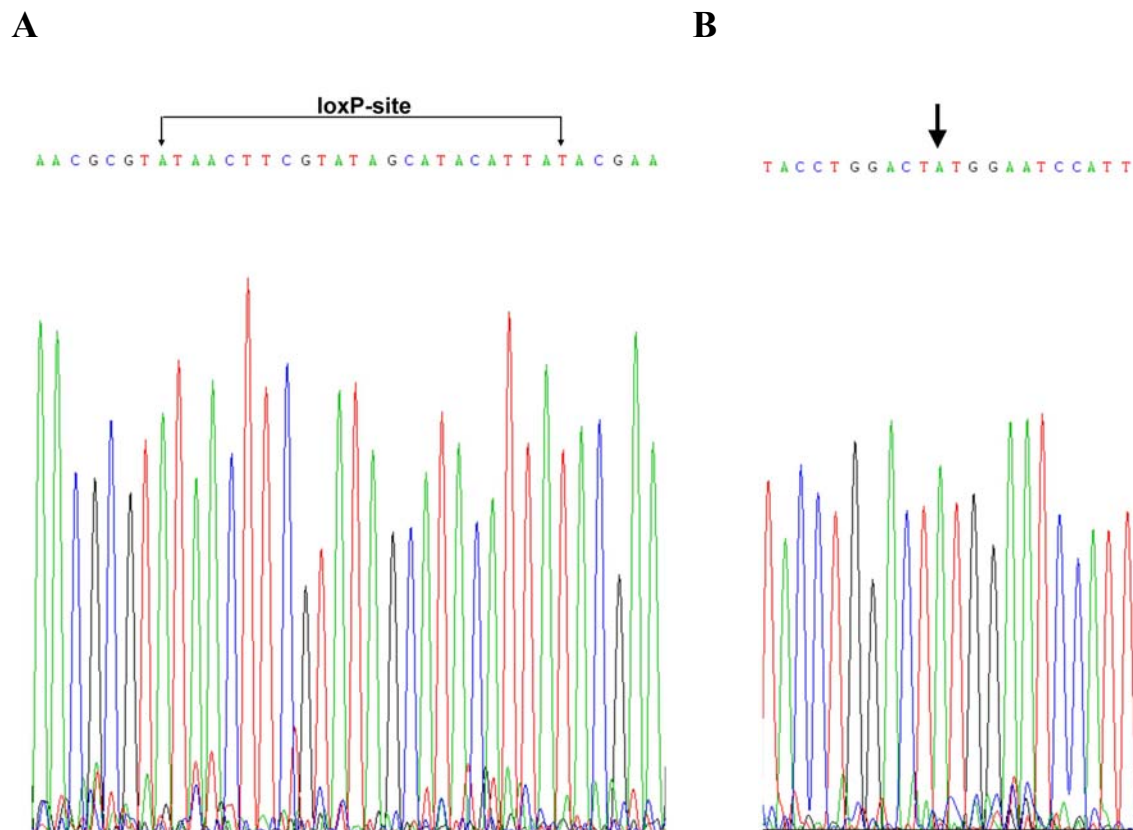


Abbildung 4.20: Sequenzierung von Klon 3 - pβ-CateninS33Y/CALNL5 – nach Rekombination.

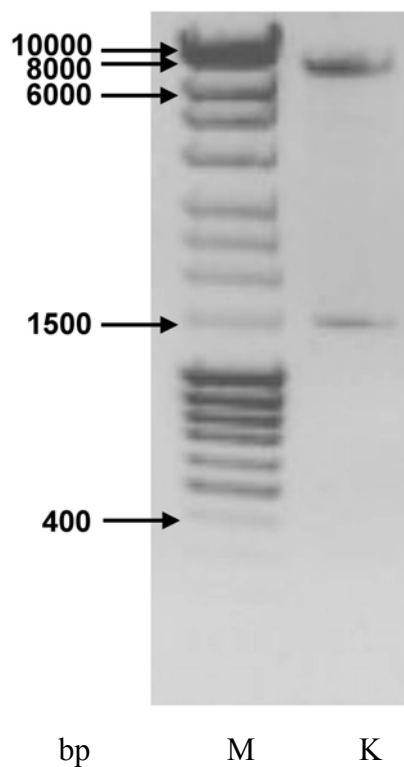
(A) Die Sequenzierung zeigt eine der beiden loxP-sites des Klons 3 aus der Rekombination. (B) Die gewünschte Punktmutation in Codon 33 ist in Klon 3 aus der Rekombination enthalten. Hierbei handelt es sich also um das inklonierte Insert *Ctnnb1*-S33Y

Die Punktmutation in Codon 33 des *Ctnnb1*-S33Y-Inserts, sowie die loxP-Schnittstellen sind in der Sequenzierung deutlich zu sehen. Insgesamt handelte es sich bei dem erhaltenen Klon 3 also um das gewünschte, für die Mikroinjektion benötigte Konstrukt

p β -CateninS33Y/CALNL5, das anschließend für die Mikroinjektion vorbereitet und gereinigt wurde.

4.5 Mikroinjektion

Zunächst wurde die Kasette, bestehend aus CAG-Promotor, loxP-Site 1, neomycin-site, polyA-site, loxP-Site 2 und *Ctnnb1*-S33Y-Insert, per Restriktionsverdau mit PvuI/BamHI aus dem Vektor p β -Catenin^{S33Y}/CALNL5 ausgeschnitten. Die so erhaltene Kasette wurde mittels eines 1%-igen Agarosegels vom restlichen Vektorgerüst getrennt und mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kits aus dem Agarosegel eluiert (s. Abb. 4.21).



bp: Länge der aufgetrennten DNA in Basenpaaren.

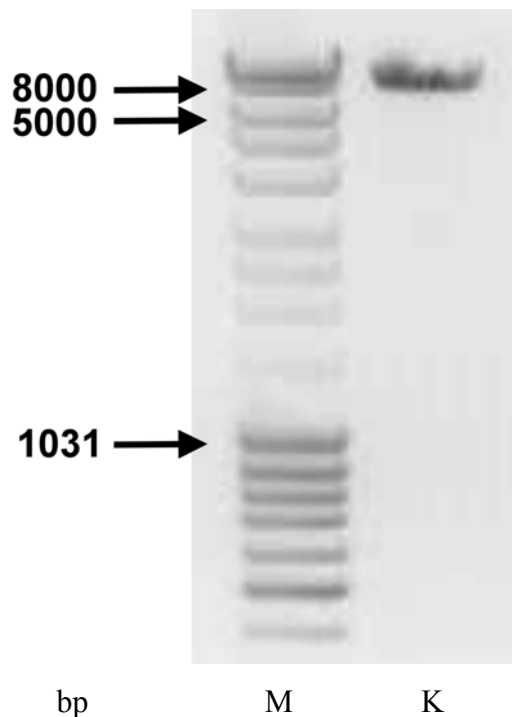
M: Längenmarker Mass Ruler Mix (Fermentas).

K: PvuI/BamHI-Verdau von Klon3 - p β -Catenin^{S33Y}/CALNL5.

Abbildung 4.21: Restriktionsverdau des Vektors p β -CateninS33Y/CALNL5.

Das Gel zeigte zwei der drei erwarteten Banden der Größe 6812 bp, die der Insert-tragenden Kasette entspricht, und der Größe 1445 bp, die einem der beiden pCALNL5-Fragmente entspricht. Das dritte, 337 bp große Fragment, das ein weiteres Reststück des Vektors darstellt, konnte auf diesem Gel nicht sichtbar gemacht werden, da es in zu geringer Intensität erhalten wurde. Die Identität der Insert-tragenden Kasette wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Nach Elution der für die Mikroinjektion benötigten 6812 bp großen Kasette wurde die DNA über EluTip-Säulchen aufgereinigt und deren Konzentration über ein 1%iges Agarosegel mit Hilfe des Mass Ruler™ Mix-Größenmarkers von Fermentas bestimmt (s. Abb. 4.22).



bp: Länge der aufgetrennten DNA in Basenpaaren.

M: Längenmarker Mass Ruler Mix (Fermentas) – 5 µl Marker wurden aufgetragen.

K: Mikroinjektionskasette – 1 µl DNA wurden aufgetragen.

Abbildung 4.22: Mengenabschätzung der Transgen-tragenden Kasette für die Mikroinjektion.

Die Intensität der Bande der Mikroinjektionskassette ist etwas stärker als die der 1031 bp großen Bande des Markers. Diese entspricht einer DNA-Menge von 50 ng. Die Auftragsmenge der Mikroinjektionskassette betrug 1 μ l. So konnte die Konzentration der Insert-tragenden Kassette mit ca. 60 ng/ μ l abgeschätzt werden.

Die Vorbereitung der Tiere, sowie die nachfolgend beschriebene Mikroinjektion wurde von Herrn Thomas Hennek im Arbeitskreis von Herrn Dr. Thomas Ott, Leiter der Serviceeinrichtung Transgene Tiere der Universität Tübingen, durchgeführt.

Für die Generierung transgener Tiere wurden B6D2F1-Mäuse eingesetzt. Insgesamt wurden ca. 200 befruchtete Eizellen der C57Bl/6N CrlxDBA/2N F1-Hybriden erhalten, die für die Mikroinjektion eingesetzt werden konnten. Die Mikroinjektion ist in der folgenden Abbildung beispielhaft anhand einer der befruchteten Eizellen im Vorkernstadium gezeigt.



Abbildung 4.23: Mikroinjektion der Ctnnb1-S33Y-enthaltenden Kassette in den Vorkern einer befruchteten B6D2F1-Maus-Eizelle.

Die DNA wird in den Vorkern der befruchteten Eizelle injiziert. Rechts ist die Haltekapillare zu sehen, die die Eizelle während der Mikroinjektion fixiert. Links ist die bereits in die Membran der Eizelle eingedrungene, die DNA enthaltende Kanüle gezeigt. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von T. Hennek, Serviceeinrichtung Transgene Tiere, Tübingen).

Die Eizelle wurde mit Hilfe einer Haltekapillare fixiert. Anschließend konnte mit Hilfe einer Kanüle die DNA in den Vorkern injiziert werden. Die so veränderten Eizellen wurden anschließend in B6D2F1-Mäuse eingesetzt, um transgene Tg(loxP(pA)βCat^{S33Y}) Nachkommen zu erhalten. Die aus diesem Wurf erhaltenen Nachkommen wurden bezüglich des Transgens *Ctnnb1-S33Y* untersucht. Insgesamt wurden 15 Tg(loxP(pA)βCat^{S33Y})-Tiere (F1) erhalten, davon 9 Weibchen und 6 Männchen, die für die Verpaarung mit Tg(alb-Cre)-Tieren eingesetzt werden konnten.

4.5.1 Maus-Zucht und Genotypisierung

Um transgene Tiere zu erhalten, die in der Leber konstitutiv *Ctnnb1-S33Y* exprimieren, wurden Tg(lox(pA)β-Cat^{S33Y})-Tiere mit Tg(alb-Cre)-Tieren verpaart. Diese exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des leber-spezifischen Albumin-Promotors. Im Alter von ca. 4-6 Wochen wurden die erhaltenen Nachkommen genotypisiert, um sowohl *Ctnnb1-S33Y* als auch *cre* nachzuweisen. Tiere, die nur das Transgen *Ctnnb1-S33Y* trugen, wurden für weitere Verpaarungen weiter gehalten, während Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Tiere für die Organentnahme eingesetzt wurden.

Für die Genotypisierung wurden den Tieren wenige Millimeter große Ohrgewebeproben entnommen, was gleichzeitig zur Markierung der Jungtiere diente. Die enthaltene DNA wurde mittels eines über Nacht andauerenden Verdauens mit Proteinase K erhalten und als Template für die Genotypisierung mittels PCR eingesetzt. Diese wurde anschließend mittels eines 1%igen Agarosegels ausgewertet. Im Folgenden sind Gelelektrophoresen der *alb-cre*-, sowie der *Ctnnb1-S33Y*-Genotypisierung beispielhaft gezeigt (s. Abb. 4.24).

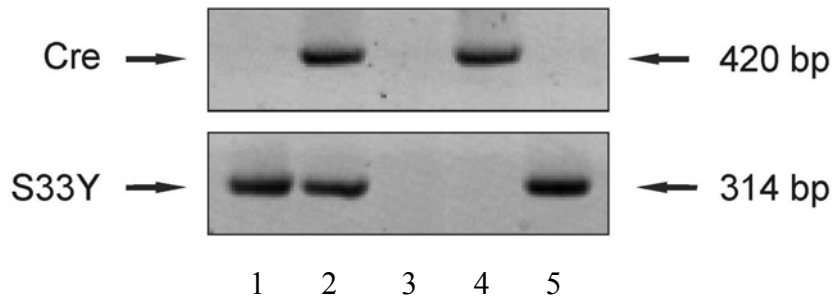


Abbildung 4.24: Genotypisierung der transgenen Mäuse mittels PCR.

Aus dem Ohrgehörte erhaltene DNA wird mittels PCR und spezifischen Primern für Cre-Rekombinase bzw. *Ctnnb1-S33Y* amplifiziert und per 1%igem Agarosegel ausgewertet. Hier handelt es sich um zwei Tg(lox(pA) β Cat^{S33Y})-Tiere (Nr 1 und 5), ein Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tier (Nr 2), ein Tg(albCre)-Tier (Nr 4), sowie ein Wildtyp-Tier (Nr 3).

Nur Tiere, die sowohl *alb-cre*, als auch *Ctnnb1-S33Y* trugen, wurden für die Leberentnahme eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in 4 Verpaarungen insgesamt 57 Weibchen und 31 Männchen eingesetzt, davon 44 Tg(lox(pA) β -Cat^{S33Y})-Tiere und 44 Tg(albCre)-Tiere. Aus diesen 4 Verpaarungen wurden insgesamt 348 Tiere erhalten, davon 47 Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tiere, deren Lebergewebe immunhistochemisch, sowie hinsichtlich ihrer Glutaminsynthetase- und Cytochrom P450-Expression auf RNA- und Proteinebene untersucht werden konnte. Eine Übersicht über alle Verpaarungen ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

		Tg(lox(pA)/βCat ^{S33Y})	Tg(albCre)	Anzahl Nachkommen	Tg(lox(pA)/βCat ^{S33Y})	Tg(albCre/βCat ^{S33Y})
1. Verpaarung	Weibchen	9	-	35	1	3
	Männchen	-	5	33	5	1
2. Verpaarung	Weibchen	9	5	29	8	9
	Männchen	3	5	65	8	4
3. Verpaarung	Weibchen	11	15	68	12	11
	Männchen	8	6	83	13	10
4. Verpaarung	Weibchen	4	-	21	4	4
	Männchen	-	8	14	4	5
Summe		44	44	348	55	47

Tabelle 4.2: Verpaarung von Tg(lox(pA)βCat^{S33Y})-Tieren mit Tg(albCre)-Tieren.

Übersicht über die Verpaarung von Tg(lox(pA)βCat^{S33Y})-Tieren mit Tg(alb-Cre)-Tieren. Insgesamt wurden 348 Nachkommen erhalten, von denen 47 Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Tiere waren.

4.5.2 Organentnahme

Um die Expressionsmuster von *Ctnnb1*-S33Y, sowie von β-Catenin-Zielgenen in der Leber der neu generierten transgenen Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Tiere zu untersuchen, wurden die Lebern dieser Tiere entnommen.

Die Organe der untersuchten transgenen Tiere unterschieden sich optisch nicht von Lebern von Wildtyp-Tieren. Auch das Lebergewicht wies keine Auffälligkeiten auf. Eine Übersicht über das Gewicht der erhaltenen Organe ist in Abbildung 4.25 gezeigt.

A

Tier-Nr	Genotyp	Tiergewicht [g]	Lebergewicht [g]	rel. Lebergewicht [%]
1	Tg(lox(pA) β Cat ^{S33Y} /Alb-Cre)	26,29	0,97	3,69
2		17,13	0,94	5,49
3		21,78	1,2	5,51
4		19,27	1,06	5,50
5		22,89	1,14	4,98
6		27,18	1,32	4,86
7		28,00	1,38	4,93

B

Tier-Nr	Genotyp	Tiergewicht [g]	Lebergewicht [g]	rel. Lebergewicht [%]
12	Tg(lox(pA) β Cat ^{S33Y})	26,83	1,35	5,03
13		23,35	1,15	4,93
15	Tg(albCre)	18,25	1,03	5,64
16		24,24	1,34	5,53
17		18,71	1,11	5,93
18	wt	24,78	1,38	5,57
19		15,32	0,74	4,83
20		18,09	0,87	4,81

Abbildung 4.25: Übersicht über Körper- und Lebergewicht der untersuchten Tiere.

Übersicht über Körper- und Lebergewicht transgener Tiere, wie Tg(lox(pA) β Cat^{S33Y})-Mäuse, Tg(albCre)-Mäuse, sowie Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Mäuse. Weder Körper-, noch Lebergewicht der Tiere wiesen Auffälligkeiten auf.

Das Tiergewicht aller untersuchten transgenen Tiere sowie das der Wildtyp-Tiere lag mit durchschnittlich 20 g bei allen Tieren im gleichen Bereich. Auch die Lebern der Tiere wiesen keine makroskopischen Auffälligkeiten auf und unterschieden sich äußerlich nicht. Die Lebergewichte der untersuchten Tiere lagen bei allen Tieren in der gleichen Größenordnung mit einem Gewicht von durchschnittlich 1 g. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Tiere mindestens bis zum Alter von 8 Wochen normal entwickeln.

4.5.3 Immunhistochemische Untersuchung des Lebergewebes von Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) Tieren

Tg(lox(pA) β Cat^{S33Y}) heterozygote Mäuse wurden mit Tg(albCre) Mäusen, die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotors exprimieren, verpaart. Die aus dieser Verpaarung erhaltenen transgenen (albCre/ β Cat^{S33Y})-Tiere entwickelten sich normal, was anhand der Tiergewichte und der Lebergewichte bzw. der relativen Lebergewichte deutlich wurde (s. Kap. 4.5.4). Die Tiere wurden im Alter von 8 Wochen getötet und die Lebern für weitere Analysen, darunter die immunhistochemische Untersuchung der Expression des Transgens *Ctnnb1*-S33Y, eingesetzt (s. Abb. 4.26).

Tier-Nr

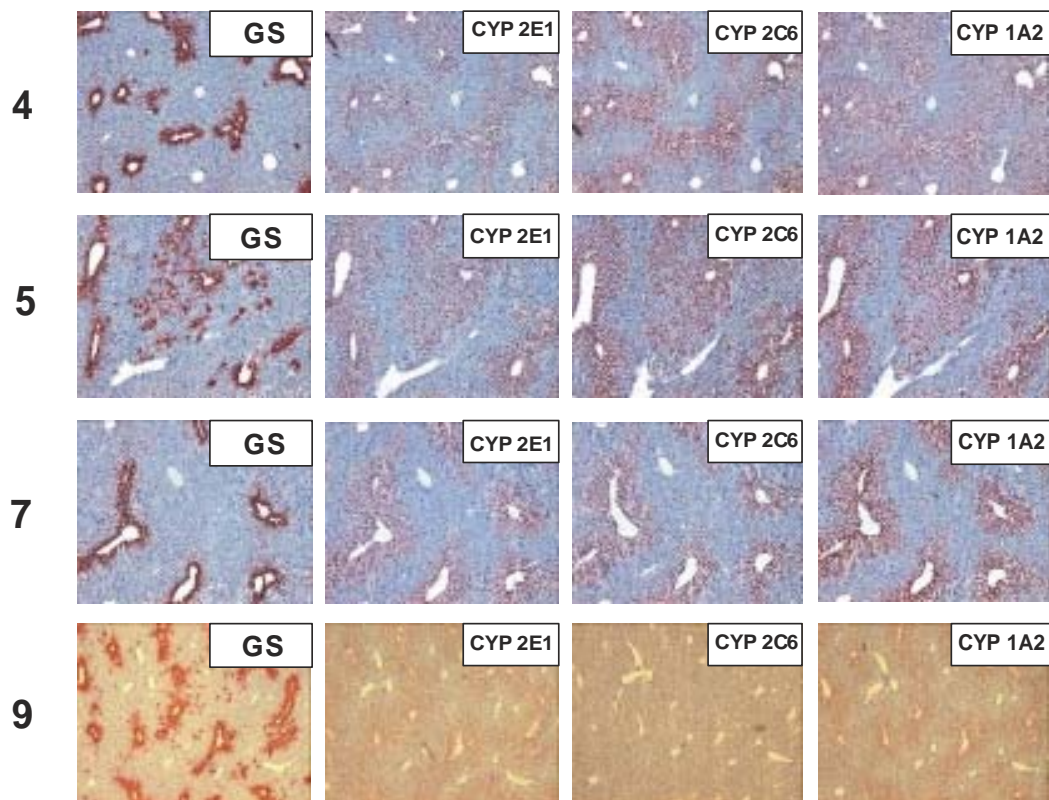


Abbildung 4.26: Immunhistochemische Untersuchung der Protein-Expression in transgenen Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Mäusen.

Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Tiere wurden immunhistochemisch untersucht. Außer Tier Nr 9 wurden alle Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Die Tiere 4, 5, 7, 9 wurden auch mittels Western Blot-Analyse hinsichtlich ihrer Proteinexpression untersucht. Es handelte sich hierbei um 8 Wochen alte transgene Tiere. Die immunhistochemische Untersuchung der Lebergewebsschnitte dieser Tiere zeigte, dass einzelne Zellen das humane, punktmutierte Ctnnb1-S33Y exprimieren, da das Zielgen GS exprimiert wird. Diese GS-Expression fungiert als Marker für die Expression von punktmutiertem β-Catenin und korreliert mit der Expression verschiedener CYP 450-Isoenzyme.

Die immunhistochemische Untersuchung der Lebergewebe von transgenen Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Mäusen zeigte, dass nur einzelne Zellen das humane, punktmutierte Ctnnb1-S33Y exprimieren. Das β-Catenin-Zielgen GS diente hierbei als Marker für

punktmutiertes β -Catenin (s. Abb. 4.26). In Wildtyp-Mäusen zeigen nur ein bis drei Zellreihen um die Zentralvenen GS-Expression. Neben diesen Zellen sind in den hier generierten transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) Tieren auch einzelne Zellen im umgebenden Lebergewebe gefärbt. Diese Zellen exprimieren also auch GS und des Weiteren auch die untersuchten CYP450 Isoenzyme 1A2, 2B1, 2C6, und 2E1. Allerdings zeigten nicht alle Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tiere die gleiche Expression der untersuchten Enzyme. Innerhalb der erhaltenen Individuen zeigten sich deutliche Unterschiede, insofern, dass auch einzelne Tiere erhalten wurden, die sich immunhistochemisch nicht von Wildtyp-Tieren unterschieden. Insgesamt konnte nur in 10% der erhaltenen transgenen Tiere GS-positive Hepatozyten in der periportalen oder midzonalen Zone des Leberläppchens nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um einzelne, nicht in Clustern vorliegende Zellen innerhalb des normalen Leberparenchyms. Die Quantifizierung dieser Bereiche ergab, dass nur etwa 0,5-2,2 % der Hepatozyten das β -Catenin-S33Y-Protein exprimierten. Da für die Expression des Transgens die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des leber-spezifischen Albumin-Promotors eingesetzt wurde, wurden keine GS-positiven Zellen im nicht-parenchymalen Lebergewebe detektiert. Zusammengefasst bedeutet dies, dass das eingebrachte Transgen *Ctnnb1*-S33Y in den generierten transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Mäusen zwar exprimiert wird, allerdings in weit weniger großem Maß als erwartet.

4.5.4 Untersuchung der mRNA-Expression in Lebergewebe von Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tieren durch real-time PCR

Mit Hilfe der Real Time PCR wurde die mRNA-Expression des Transgens, der Glutaminsynthetase und von CYP450 Isoenzymen in transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tieren untersucht. Aus Lebergewebshomogenaten wurde mRNA mit Hilfe von Trizol isoliert und

diese per RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Template für die Real Time PCR eingesetzt. Mit Hilfe spezifischer Primer konnte die Expression von β -Catenin-S33Y, sowie von GS und CYP450-Isoenzymen untersucht werden. Das Ergebnis dieser Analyse zeigt die Tabelle 4.3.

Gen	albCre	GS	CYP 2B10	CYP 2E1	CYP 1A1	18S-RNA
PCR Effizienz	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<i>CP Werte</i>						
wt	43,5	19,7	38,7	16,7	30,7	11,9
Tg(albCre)	23,8	19,8	36,7	17,3	32,3	12,00
Tg(lox(pA)βCat^{S33Y})	33,5	19,9	37,3	16,9	29,9	11,7
Tg(albCre/βCat^{S33Y}) – Alter: 2 Wochen	26,9	20,4	42,9	19,3	32,2	12,1
Tg(albCre/βCat^{S33Y}) – Alter: 4 Wochen	22,9	19,2	42,9	17,1	31,7	11,8
Tg(albCre/βCat^{S33Y}) – Alter: 6 Wochen	22,5	21,2	39,4	17,4	31,5	12,3
<i>Vergleich Tg(albCre)-Tiere mit wt-Tieren</i>						
Expressionsraten	889930,62	0,93	3,82	0,64	0,32	-
p-Werte	0,001	0,777	0,589	0,200	0,001	-
<i>Vergleich Tg(lox(pA)βCat^{S33Y})-Tiere mit wt-Tieren</i>						
Expressionsraten	1028,74	0,87	2,56	1,67	0,84	-
p-Werte	0,209	0,713	0,596	0,833	0,498	-
<i>Vergleich 2 Wochen alte Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Tiere mit wt-Tieren</i>						
Expressionsraten	95950,32	0,61	0,11	0,16	0,34	-
p-Werte	0,001	0,805	0,426	0,107	0,001	-
<i>Vergleich 4 Wochen alte Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Tiere mit wt-Tieren</i>						
Expressionsraten	1593020,42	1,40	0,05	0,78	0,50	-
p-Werte	0,001	0,430	0,440	0,538	0,308	-
<i>Vergleich 6 Wochen alte Tg(albCre/βCat^{S33Y})-Tiere mit wt-Tieren</i>						
Expressionsraten	2206507,67	0,36	0,61	0,62	0,57	-
p-Werte	0,001	0,306	0,735	0,307	0,001	-

Tabelle 4.3: Relative mRNA Quantifizierung von GS und CYP-Isoenzymen in transgenen Tieren durch real-time PCR.

Die Berechnung der Expressionsraten erfolgte nach folgender Formel:

$$Expressionsrate = \frac{\left(E_{target}\right)^{\Delta CP_{target(Cmnblmutiert-wt)}}}{\left(E_{reference}\right)^{\Delta CP_{reference(Cmnblmutiert-wt)}}$$

Alle untersuchten transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) Tiere exprimieren das Enzym Cre-Recombinase. Es kann also davon ausgegangen werden, dass dieses Enzym in den entsprechenden Tieren exprimiert wird. Aus den erhaltenen Ergebnissen wird weiterhin deutlich, dass keine erhöhte mRNA-Expression des β -Catenin-Zielgens GS vorliegt. Auch die untersuchten CYP450 Isoenzyme 1A1, 2B10 und 2E1 zeigten in transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Mäusen keine erhöhte Expression im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dies könnte sich durch die geringe Zahl Transgen-exprimierender Hepatozyten im Lebergewebe erklären lassen.

4.5.5 Untersuchung der Protein-Expression in Lebergewebe von Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) Tieren

Die Proteinexpression von GS, CYP und β -Catenin der Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) Tiere wurde mittels Western Blot analysiert. Die hierfür benötigten Proteinproben wurden aus Lebergewebshomogenaten isoliert. Zum Vergleich wurde Protein einer Wildtyp-Maus isoliert und ebenfalls aufgetragen. Bezüglich der Proteinexpression wurden sowohl 8 Wochen alte Tiere, also geschlechtsreife Tiere, als auch Jungtiere im Alter von 2 Wochen untersucht. In diesen Tieren wurde die Expression von Glutaminsynthetase, sowie der CYP450 Isoenzyme 2B1, 2C6, 2E1 und 1A2 untersucht. Zum Vergleich und als Ladekontrolle wurde die β -Catenin-Proteinexpression von allen untersuchten Tieren analysiert (s. Abb. 4.27).

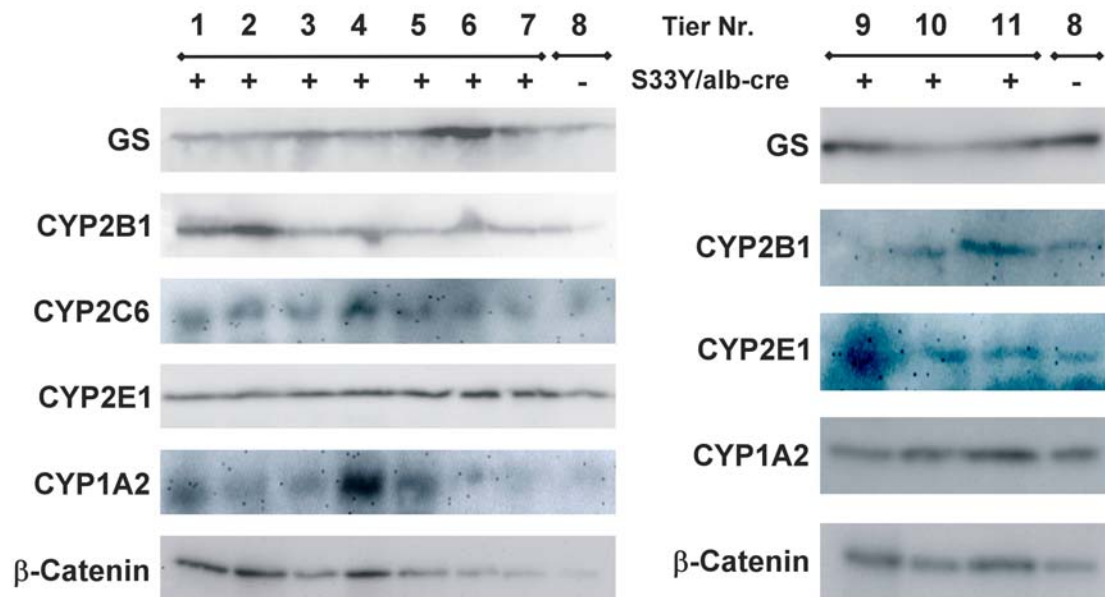


Abbildung 4.27: Untersuchung der Cytochrom P450-Expression in transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tieren.

Aus Gewebekomplexen von Lebern transgener Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) Mäuse (Nr 1-7 und 9-11) und einer Wildtyp-Maus (Nr. 8) wurde Gesamtprotein isoliert und per SDS-PAGE aufgetrennt, gebliedert und hinsichtlich ihrer GS-, β -Catenin und CYP2B1-, 2C6-, 2E1- und 1A2-Expression untersucht. Hierbei wurden 8 Wochen alte transgene Tiere (Nr 1-7) und 2 Wochen alte transgene Tiere (Nr 9-11) untersucht.

Nur ein Teil der transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tiere zeigt eine leicht erhoherte Expression der untersuchten Proteine Glutaminsynthetase, CYP450 2B1, 2C6, 2E1 und 1A2. Die Expression von GS und CYP450 Isoenzymen korreliert auch hier. Dies entspricht dem Bild, das bei der immunhistochemischen Färbung dieser Tiere erhalten wurde. Ein Teil der Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Nachkommen zeigte das gleiche Expressionslevel der GS und der untersuchten CYP450 Isoenzyme wie Wildtyp-Tiere. Auch zwischen geschlechtsreifen, 8 Wochen alten Tieren (Nr 1-7) und 2 Wochen alten Jungtieren (Nr 9-11) konnte kein Unterschied in der GS- und CYP450-Expression gefunden werden. Dies spricht dafür, dass

sich die Expression des Transgens *Ctnnb1*-S33Y im Laufe des Lebens der transgenen Tiere nicht verändert bzw. von Anfang an in nur geringem Maße vorhanden ist (s. 4.27).

5 Diskussion

5.1 Untersuchung der GS- und Cytochrom P450-Expression in Mausleberläsionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern Mauslebertumoren, die punktmutiertes *Cttnb1* enthalten und somit stark erhöhte GS-Expressionslevel zeigen, auch eine veränderte CYP-Expression aufweisen, mit dem Ziel, die molekularen Mechanismen der Expressionsregulation aufzuklären. Anzunehmen war, dass Gene, die in der Steuerung der Zellproliferation und –differenzierung, sowie der Transkription eine Rolle spielen, wie die Protoonkogene *ras* und *Cttnb1*, die in Mauslebertumoren aufgrund von Punktmutationen oft in aktivierter Form vorliegen, hierbei involviert sind. Um dies bezüglich des *Cttnb1* zu untersuchen, wurde die Expression sowohl von GS als Marker für punktmutiertes *Cttnb1*, als auch von Isoenzymen u.a. der Familien CYP2B, CYP2C und das Isoenzym CYP2E1 in Mauslebertumoren auf RNA- und Proteinebene untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mauslebertumoren stammten aus der so genannten Promotionsstudie. Hierin wurden Mäuse im Alter von 6 Wochen einmalig mit dem Karzinogen DEN behandelt. Eine Gruppe dieser Tiere wurde anschließend 39 Wochen (bis zur Tötung) mit PB behandelt, während die zweite Gruppe unbehandelt blieb (Moennikes *et al.*, 1999). Wie erwartet, konnte in Lebertumoren von PB-behandelten Tieren eine erhöhte Expression der PB-induzierbaren Isoenzyme der CYP2B-Familie festgestellt werden. Daneben zeigten die Tumoren dieser Tiere auch eine vermehrte Expression von Isoenzymen der CYP1A-Familie, sowie von CYP2E1. Dies war insofern bemerkenswert, da es sich hier um eine 3-MC-induzierbare, sowie um eine Ethanol-induzierbare Form von CYP-Isoenzymen handelte. Die Expression der untersuchten CYP-Enzyme korrelierte zu 100% mit der GS-Expression in den

Lebertumoren von PB-behandelten Tieren der Promotionsstudie. GS-positive Tumoren zeigten eine unveränderte oder nur leicht erhöhte CYP-Expression im Vergleich zu umgebendem Normalgewebe. Diese war dagegen in GS-negativem Tumorgewebe verringert. Bemerkenswert hierbei war, dass sogar in GS-positiven Tumoren von nicht mit PB behandelten Tieren eine erhöhte CYP-Expression beobachtet werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei der Induktion von GS und den untersuchten CYP-Isoenzymen um einen ähnlichen Mechanismus handeln könnte. Da GS ein Marker für punktmutiertes *Ctnnb1* darstellt, wäre es möglich, dass in GS-positiven Tumoren, die eine veränderte bzw. leicht erhöhte CYP-Expression aufweisen, das durch Punktmutation aktivierte β -Catenin bei der Induktion der untersuchten Enzyme eine Rolle spielt. Ob es sich hierbei um einen direkten Zusammenhang oder eine indirekte Wirkung des β -Catenins handelt, konnte aus diesen Beobachtungen allerdings nicht eindeutig geklärt werden. Die beobachtete β -Catenin-vermittelte Induktion unterscheidet sich aber aller Wahrscheinlichkeit nach von der bisher bekannten PB-vermittelten Induktion von CYP-Isoenzymen. Da in Tumoren von PB-behandelten Tieren der Inhibitionsstudie GS-negative Tumoren mit erhöhter Expression von PB-induzierbaren CYP-Isoenzymen gefunden wurden, kann angenommen werden, dass in diesen Geweben der klassische PB-Induktionsmechanismus die Ursache für die erhöhte CYP-Expression darstellt.

Die hier untersuchten *Ctnnb1*-mutierten, GS-positiven Tumoren zeigten im Vergleich zu normalem Lebergewebe eine ähnlich hohe oder zum Teil leicht erhöhte Cytochrom P450-Expression. Diese Isoenzyme wurden dagegen in *Ctnnb1*-Wildtyp, GS-negativen Mauslebertumoren nur vermindert exprimiert. Die Ergebnisse konnten sowohl auf Proteinebene, als auch auf mRNA-Ebene reproduziert werden. Hierbei wurden sowohl Isoenzyme PB-induzierbarer CYP-Familien, wie CYP2B und CYP2C, als auch

3-MC-induzierbare Isoenzyme vom Typ CYP1A und des Weiteren das Ethanol-induzierbare CYP2E1-Enzym untersucht. Bemerkenswerterweise ähnelten sich die Expressionsmuster aller untersuchten CYP-Isoenzyme in PB-behandelten und unbehandelten Tieren, so dass ein reiner Induktionseffekt durch PB zumindest im Fall von CYP2B und CYP2C ausgeschlossen werden kann. Der zugrunde liegende Mechanismus in diesen Tumoren könnte also durchaus auf die in den Tumorgeweben enthaltene *Ctnnb1*-Punktmutation zurückzuführen sein. Es kann angenommen werden, dass durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin in diesen Tumoren an der Regulation der Expression verschiedener CYP-Isoenzyme beteiligt ist. Diese Vermutung wurde auch durch Untersuchungen von Sekine *et al.* (2006) untermauert. In hepatozyten-spezifischen β -Catenin Knock-out-Mäusen (*albCre*/ β Cat^{loxP/loxP}) wurde sowohl GS, als auch die CYP-Isoenzyme 1A2 und 2E1 deutlich vermindert exprimiert. Dagegen blieb die Expression von CYP1A1 und CYP3A11 unverändert. β -Catenin scheint also bei der Expression einzelner CYP-Isoenzyme eine wichtige Rolle zu spielen. Auch Untersuchungen von Hailfinger *et al.* (2006) bestätigten diese Vermutung, da gezeigt werden konnte, dass Wnt3a-behandelte und damit vermehrt β -Catenin-exprimierende perizentrale Hepatozyten eine verstärkte CYP1A1-, CYP2B10- und CYP2E1-Expression zeigen. Auch AhR wird in diesen Zellen vermehrt exprimiert.

In Tumorgewebe wird eine Vielzahl von Zielgenen, darunter c-jun, Matrix Metalloproteinase MMP-7, Axin-2 und Glutaminsynthetase, durch aktiviertes β -Catenin transkriptionell aktiviert (siehe hierzu <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>). Diese Aktivierung wird durch Interaktion von β -Catenin mit Mitgliedern der TCF/Lef1-Transkriptionsfaktor-Familie vermittelt (Lustig and Behrens, 2003). Potentielle TCF/Lef1-Bindungsstellen konnten nach *in silico*-Analyse auch im GS-Promotor/Enhancer gefunden werden (<http://corg.molgen.mpg.de>). Denkbar wäre, dass auch in den Promotoren der hier

untersuchten CYP-Isoenzyme potentielle TCF-Bindungsstellen vorhanden sind, die durch β -Catenin aktiviert werden können.

Anhand der bisher gewonnenen Ergebnisse konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei der Aktivierung von CYP-Isoenzymen durch β -Catenin um eine direkte oder indirekte Wirkung des Proteins handelt. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurden Maushepatomzellen transient transfiziert. Als Expressionsvektor wurde ein Konstrukt, das die codierende Sequenz des in Codon 33 punktmultierten, humanen β -Catenin-Gens (*CTNNB1-S33Y*) enthielt (β -Catenin^{S33Y}-Expressionsvektor), zusammen mit zwei verschiedenen Reportergenkonstrukten transient transfiziert. Eines dieser Reportergenkonstrukte exprimiert die Firefly-Luciferase unter Kontrolle eines ~2.7 kb großen Fragments der 5'-flankierenden Promoterregion des Ratten-CYP2B1-Gens (pGL3C2B1), während im zweiten Konstrukt eine TK-getriebene Luciferase mit drei DRE-Core-Motiven enthalten war (pT81Luc3_DRE). Während das pGL3C2B1-Reportergenkonstrukt allein durch β -Catenin^{S33Y} aktiviert werden konnte, wurde im Fall des pT81Luc3_DRE-Reportergenkonstruktes 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) als zusätzlicher Aktivator bei der Transfektion benötigt. TCDD stellt einen Liganden des Aryl-Hydrocarbon Rezeptors (AhR) dar. Hierbei handelt es sich um einen ligandengesteuerten Transkriptionsfaktor, der die Effekte zahlreicher xenobiotischer und toxischer Substanzen vermittelt. Hierzu zählen im Besonderen die Dioxin-ähnlichen halogenierten aromatischen Hydrocarbone (HAH), zu denen der typische Agonist TCDD gehört. Der Ah-Rezeptor liegt im Zytosol gebunden an Hsp90 vor. Bindet TCDD an AhR, kann dieser Komplex in den Zellkern translozieren, wo es zur Ablösung von Hsp90 kommt. AhR dimerisiert in der Folge mit seinem Partnerprotein Arnt und liegt somit als aktivierter Transkriptionsfaktor vor (Gu *et al.*, 2000; Bock *et al.*, 1994).

Da die Induktion von CYP-Enzymen im Falle der CYP1A-Familie durch AhR bzw. im Falle der CYP2B-Familie durch den *constitutive androstane receptor* (CAR) vermittelt wird,

wurden für diese transienten Transfektionen des Weiteren AhR- und mCAR-1-Expressionsvektoren eingesetzt.

Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, dass die Transfektion von durch Punktmutation aktiviertem β -Catenin (β -Catenin^{S33Y}) zu einer starken Aktivierung des β -Catenin/TCF-responsiven Reportergenkonstrukts TopFlash (Schwarz *et al.*, 2003) führt. Dieser Effekt konnte hier nochmals reproduziert werden. Des Weiteren führte die Transfektion von Maushepatomzellen mit dem β -Catenin^{S33Y}-Expressionsvektor und dem pGL3C2B1-Reportergenkonstrukt zu einer Aktivierung der Reportergenaktivität. PB wurde für die Aktivierung der Reportergenaktivität nicht benötigt, da es nach PB-Behandlung der transfizierten Zellen eher zu einer leichten Verminderung der durch β -Catenin^{S33Y} hervorgerufenen Aktivierung des Reportergenkonstruktes kam.

Wurden Maushepatomzellen nur mit dem mCAR-1-Expressionsvektor pCR3-mCAR (Ueda *et al.*, 2002) transfiziert, kam es zu einer leichten Aktivierung des CYP2B1-Reportergenkonstrukts, die durch PB nicht beeinflusst werden konnte. Die Transfektion von β -Catenin^{S33Y} dagegen steigerte die Reporteraktivität im Vergleich zur alleinigen Transfektion mit m-CAR-1 deutlich. Da dieser Effekt durch Co-Transfektion mit m-CAR-1 nicht weiter gesteigert werden konnte, kann angenommen werden, dass die β -Catenin-abhängige Aktivierung des CYP2B1-Reporters unabhängig von CAR verläuft. Es handelt sich also hier aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um denselben Induktionsmechanismus, wie er in der normalen CYP2B-Induktion beobachtet wird. Bei der Induktion von CYP2B-Enzymen über CAR werden mindestens zwei Schritte durchlaufen, die in unterschiedlicher Weise reguliert werden: die nukleäre Translokation und die Rezeptoraktivierung im Zellkern (Sueyoshi and Negishi, 2001; Handschin and Meyer, 2005). Im Zytoplasma liegt CAR in einem Proteinkomplex gebunden u.a. an Hsp90 und dem *cytoplasmic CAR retention* Protein (CCRP) vor. Zur Translokation muss CAR aus diesem Proteinkomplex durch

Dephosphorylierung mittels Protein Phosphatase 2A herausgelöst werden. Dieser Schritt wird durch verschiedene Substanzen, darunter PB, aktiviert. Nach der Translokation in den Zellkern bindet CAR zunächst an den *retinoic X receptor* (RXR) und anschließend als Heterodimer CAR-RXR an Enhancer-Sequenzen der DNA, so genannte *phenobarbital responsive element modules* (PBREs oder PBREMs). Nachdem die Chromatinstruktur in dieser Region verändert wurde, erfolgt die Transkription des Strukturgens (Tzamelis and Moore, 2001; Sueyoshi and Negishi, 2001).

Möglich wäre auch hier, wie im Falle der GS, dass im Promotorbereich von CYP2B-Isoenzymen TCF-Bindungsstellen vorhanden sind, mit denen β -Catenin/TCF-Komplexe interagieren und so die Transkription des Gens aktivieren könnten.

In einer zweiten Versuchsreihe von transienten Transfektionen wurden Maushepatomzellen in ähnlicher Weise transfiziert wie oben beschrieben. Allerdings wurde hier, anders als in den oben beschriebenen Experimenten, ein TK-getriebenes Luciferase-Konstrukt, das drei DRE-Core Motive enthielt, eingesetzt (pT81Luc3_DRE). Die Behandlung der mit leerem Expressionsvektor transfizierten Zellen mit TCDD führte zu einer deutlichen Erhöhung der Reporterogenaktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Transfektion mit β -Catenin^{S33Y} zeigte, dass das 3xDRE-enthaltende Konstrukt im Gegensatz zu pGL3C2B1 nur in sehr geringem Maße durch β -Catenin^{S33Y} aktiviert wird. Wurden diese Zellen allerdings mit TCDD behandelt, konnte die Aktivierung des Reporters deutlich gesteigert werden. Allerdings konnten auch hier die durch β -Catenin^{S33Y} beobachteten Effekte durch AhR nicht weiter gesteigert werden. Die Inkubation von Maushepatomzellen mit TCDD führt zu einer negativen Regulation von AhR (Pollenz, 1996). Da hier ein nur DRE-enthaltendes Reportergenkonstrukt eingesetzt wurde, muss davon ausgegangen werden, dass neben der klassischen transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen durch β -Catenin/TCF-Komplexe, die an TCF-Bindungsstellen in der Promotorregion der entsprechenden Zielgene binden, noch

ein weiterer Mechanismus existiert, mit Hilfe dessen β -Catenin die Transkription von CYP aktivieren kann. Eine Stabilisierung der Rezeptoren mCAR und AhR scheint also bei der Aktivierung oder Induktion von CYP2B1 und CYP1A1 durch aktiviertes β -Catenin, in diesem Fall β -Catenin^{S33Y}, keine Rolle zu spielen. Die β -Catenin-vermittelten transkriptionellen Effekte konnten durch Co-Transfektion mit den Rezeptoren AhR und mCAR-1 nicht weiter gesteigert werden. Dies führt zu der Annahme, dass die zelluläre Expression dieser Transkriptionsfaktoren hoch genug ist und sie daher nicht die limitierenden Faktoren für die Aktivierung von Zielgenen darstellt.

Alternativ könnte es möglich sein, dass die β -Catenin-vermittelte Induktion der untersuchten CYP-Isoenzyme unabhängig von den klassischen nukleären Induktionswegen verläuft. Durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin könnte also direkt oder indirekt, unabhängig von den bereits bekannten, klassischen Induktionswegen, CYP-Enzyme aktivieren und regulieren. Welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen und um welche Art von Induktion es sich handelt, kann aber anhand der bisher erhaltenen Ergebnisse noch nicht weiter aufgeklärt werden und bedarf daher weiterer Untersuchung.

CYP-Monooxygenasen spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung und/oder Inaktivierung vieler Antikrebs-Medikamente, die zurzeit in der Krebstherapie eingesetzt werden. Des Weiteren ist bekannt, dass das *mdr1* (multidrug resistance 1)-Gen durch den TCF-4/ β -Catenin-Komplex in der Kolorektalkarzinogenese transaktiviert wird (Yamada *et al.*, 2000). Demzufolge könnten durch β -Catenin verursachte Veränderungen der Aktivität von CYP-Isoenzymen die Tumorempfindlichkeit und die Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika in gewisser Weise beeinflussen.

5.2 Generierung einer transgenen Maus

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Generierung einer transgenen Maus, die induzierbar eine punktmutierte Form des humanen β -Catenin-Gens *CTNNB1* exprimiert. Diese Tiere wurden so verändert, dass neben Maus-Wildtyp-*Ctnnb1* auch ein humanes β -Catenin-Gen (*CTNNB1-S33Y*), das eine Punktmutation in Codon 33 besitzt, exprimiert wird. Diese Mutation führt zu einem Austausch von Serin (S) nach Tyrosin (Y). Hierfür wurde die für humanes, durch Punktmutation aktivierte β -Catenin codierende Sequenz des Expressionsvektors p β -Catenin^{S33Y}/CI-neo (Chtarbova *et al.*, 2002) per PCR amplifiziert und in die *multiple cloning site* des Vektors pCALNL5, der eine CAG-loxP-neo-polyA-loxP-Kassette enthielt, an diese Kassette anschließend einkloniert. Aus dem so erhaltenen Konstrukt p β Cat^{S33Y}/CALNL5 wurde der Transgen-tragende Bereich, bestehend aus CAG-loxP-neo-polyA-loxP-Element und nachfolgend der codierenden Sequenz für β -Catenin^{S33Y}, per Restriktionverdau ausgeschnitten und für die Mikroinjektion aufgereinigt. Diese Kassette wurde anschließend mit Hilfe der Mikroinjektion in B6D2F1-Zygoten injiziert und die so erhaltenen transgenen Tg(loxP(pA) β Cat^{S33Y})-Mäuse durch Genotypisierung charakterisiert. Um transgene Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) Tiere zu erhalten, wurden Tg(loxP(pA) β Cat^{S33Y})-Mäuse mit Tg(albCre)-Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Leber-spezifischen Albumin-Promotors exprimieren, verpaart. Aus den daraus entstandenen transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tieren wurden die Lebern entnommen und die intrazelluläre Lokalisation des humanen, durch Punktmutation aktivierten β -Catenins immunhistochemisch, sowie dessen Expression auf RNA- und Proteinebene indirekt untersucht.

β -Catenin ist ein hochkonserviertes ubiquitäres Protein in Vertebraten. Es besitzt zwei Funktionen in Säugerzellen. Zum einen stellt es eine Komponente der *adherens junctions*

dar, interagiert als solche u.a. mit E-Cadherin und bindet an α -Catenin, das dann an das Zytoskelett bindet (Weis and Nelson, 2009). Des Weiteren kann es einen Komplex mit APC (adenomatous polyposis coli) bilden und stellt somit einen wichtigen Teil des Wnt-Signalwegs dar, der unter anderem bei der Kontrolle der Embryonalentwicklung eine Rolle spielt (Polakis, 2007). Weiterhin ist β -Catenin an der Zelldifferenzierung und der Lebertumorigenese in Maus und Mensch beteiligt. In Anwesenheit eines Wnt-Signals nimmt der β -Catenin-Gehalt des Zytoplasmas zu, woraufhin β -Catenin in den Zellkern transloziert. Dort transaktiviert es Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie. Liegt kein Wnt-Signal am *frizzled*-Rezeptor vor, wird β -Catenin phosphoryliert und letztlich abgebaut, d.h. der β -Catenin-Gehalt der Zelle wird negativ reguliert und es kann keine Aktivierung der entsprechenden Zielgene im Zellkern stattfinden.

Nachdem aus vorangegangenen Studien unseres Arbeitskreises bekannt war, dass Lebertumoren PB-behandelter Mäuse vermehrt Punktmutationen in *Ctnnb1*, z.B. Mutationen in Codon 33 des Exons 2, aufweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine konditionale Knock-in-Maus generiert, die leberspezifisch humanes, durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin (β -Catenin^{S33Y}) exprimiert. Ein β -Catenin^{S33Y}-Expressionsvektor, der einen neopolyA-Spacer zwischen dem CAG-Promotor und der für humanes β -Catenin^{S33Y} codierenden Sequenz enthält, wurde in Pronuclei von B6D2F1-Mauszygoten mikroinjiziert. Die daraus erhaltenen transgenen Tg(loxP(pA) β Cat^{S33Y})-Tiere wurden anschließend mit Tg(albCre)-Mäusen verpaart, um den flox-flankierten Spacer auszuschneiden und *CTNNB1*-S33Y zu aktivieren. Transgene Tg(albCre)-Mäuse exprimieren Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotors. So können durch diese Verpaarung transgene Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Mäuse erhalten werden, die durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin (β -Catenin^{S33Y}) gezielt in der Leber exprimieren. Der Albumin-Promotor ist vor der Geburt der Tiere nicht signifikant aktiv. Seine maximale Aktivität erreicht er erst in mindestens zwei

Wochen alten Jungtieren (Postic *et al.*, 2000). Dadurch bleibt die Entwicklung der Jungtiere relativ ungestört, da das *CTNNB1-S33Y*-Transgen während der Embryonalentwicklung der Tiere noch nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert wird. Des Weiteren ist das Transgen durch die Wahl des Albuminpromotors nur in Hepatozyten aktiv und nicht in nicht-parenchymalen Zellen, was die Zellspezifität in der Leber garantiert. Um die Expression von β -Catenin^{S33Y} nachzuweisen, wurde der die Punktmutation enthaltende Genabschnitt des Transgens per PCR amplifiziert und die Mutation per Sequenzierung nachgewiesen. Die Funktionalität des Transgens wurde durch Bestimmung der Expression verschiedener β -Catenin-Zielgene, wie z.B. Glutaminsynthetase (GS), überprüft. Hier zeigten Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Mäuse eine leicht erhöhte Expression der untersuchten Zielgene, wie GS und verschiedene CYP-Isoenzyme, auf Proteinebene.

Hepatozyten der periportalen und perivenösen Zonen des Leberläppchens weisen Unterschiede in Gehalt und Aktivität verschiedener Enzyme und anderer Proteine auf. So tritt GS hauptsächlich in perivenösen Hepatozyten auf, da GS-mRNA nur in diesen Hepatozyten spezifisch exprimiert wird (Gebhardt und Mecke, 1983; Braeuning *et al.*, 2006). Auch die Mehrzahl fremdstoffmetabolisierender CYP-Enzyme wird zum größten Teil in perivenösen Hepatozyten exprimiert, da in diesen hauptsächlich mRNA-Expressionen dieser CYP-Enzyme nachweisbar sind (Bühler *et al.*, 1992). Die Mechanismen dieser Zonierung konnten bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Man geht aber davon aus, dass zwei gegenläufige Signalwege, die durch Ha-ras- und β -Catenin-abhängige Faktoren gesteuert werden, hier beteiligt sind (Hailfinger *et al.*, 2006). Da β -Catenin demnach also bei der zonierten Expression einiger Leberproteine eine Rolle spielt, wurde die Expression und damit die Zonierung verschiedener CYP-Isoenzyme, sowie des Transgens und der GS in Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tieren immunhistochemisch untersucht. Die Transgen-Expression unterschied sich deutlich zwischen einzelnen Individuen. Nur 10% der untersuchten Tiere

wiesen GS-positive Hepatozyten in der periportalen oder midzonalen Zone des Leberläppchens auf. Diese waren als Einzelzellen im normalen Leberparenchym verteilt. Die Quantifizierung dieser GS-positiven Hepatozyten ergab, dass nur in ca. 0,5–2,2% aller Leberzellen β -Catenin^{S33Y} exprimiert wurde. Die Expression verschiedener CYP-Isoenzyme, wie CYP1A, CYP2B und CYP2E1, korrelierte mit der beobachteten GS-Expression der Transgen-exprimierenden Zellen. Dies spricht für einen gemeinsamen Regulationsmechanismus von GS und CYP durch aktiviertes β -Catenin.

Vorangegangene Studien in vivo in der Maus hatten gezeigt, dass ein gut regulierter β -Catenin-Signalweg während der Embryonalentwicklung (Micsenyi *et al.*, 2004) und dem postnatalen Leberwachstum sehr wichtig ist (Apte *et al.*, 2007). In den durch Verpaarung von Tg(loxP(pA) β Cat^{S33Y})- und Tg(albCre)-Mäusen erhaltenen transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tieren konnten keine Auffälligkeiten in Lebergröße und -gewicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten Studien mit transgenen Mäusen, die NH₂-terminal verkürztes *Ctnnb1* (Δ N131 β -Catenin) in der Leber, im Darm und der Niere exprimieren, dass diese Tiere sofort nach der Geburt aufgrund von vermehrter Zellproliferation bzw. Leberzellhyperplasie schwere Hepatomegalien entwickeln, während keine Apoptose-Aktivierung nachweisbar ist (Cadoret *et al.*, 2001). Auch die Morbiditätsrate dieser Tiere ist im Vergleich zu Wildtyp-Tieren stark erhöht. In dem im Rahmen dieser Arbeit generierten Mausmodell waren allerdings keine Veränderungen der Proliferationsrate GS-positiver, β -Catenin^{S33Y}-exprimierender Hepatozyten nachweisbar. Die untersuchten Lebern zeigten keinen Hinweis auf Hepatomegalie oder ähnliche Veränderungen. Auch eine erhöhte Morbiditäts- oder Mortalitätsrate dieser Tiere konnte im Rahmen der bisherigen Studien nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Regulation des β -Catenin-Signalwegs während der Embryonalentwicklung der Tiere in den hier generierten transgenen Mäusen nicht beeinträchtigt ist. Die bisher erhaltenen Tiere entwickelten sich

normal. Dies könnte allerdings auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass nur einzelne, wenige Zellen, die über das gesamte Leberläppchen verteilt gefunden wurden, GS-Expression und damit Transgen-Expression aufwiesen. Die β -Catenin^{S33Y}-exprimierenden Zellen waren nur als wenige Einzelzellen im Leberparenchym zu sehen. Eine Clusterbildung dieser Zellen konnte in den bisher untersuchten Tieren nicht gefunden werden. Dagegen zeigten die von Cadoret *et al.* untersuchten transgenen Δ N131- β -Catenin-Tiere eine einheitliche, über das gesamte Leberparenchym verteilte GS-Expression.

Die Ursache für die nur sehr geringe Expression von β -Catenin-Zielgenen bzw. die nur in einzelnen Zellen des Leberparenchyms nachweisbare Transgen-Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Da das eingebrachte *CTNNB1*-S33Y unter Kontrolle des konstitutiv aktiven, starken CAG-Promotors stand, wäre eigentlich eine gleichmäßig starke β -Catenin^{S33Y}-Expression im Leberparenchym zu erwarten gewesen. Für die Cre-Rekombinase-Expression wurde, wie oben beschrieben, der leberspezifische Albumin-Promotor eingesetzt, der erst in mindestens zwei Wochen alten Jungtieren seine maximale Aktivität erreicht. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass es sich hier nicht um einen durch die Expression von durch Punktmutation aktiviertem β -Catenin hervorgerufenen tiefgreifenden Defekt in der Embryonalentwicklung handelt, der die Jungtiere eventuell bereits im Mutterleib absterben lassen würde. Allerdings wäre prinzipiell durch Überexpression des durch Punktmutation aktivierten β -Catenins eine starke Erhöhung der Apoptoserate und damit verstärkter Zelltod in der Leber der transgenen Tiere denkbar. Die Tatsache, dass die Lebergewichte transgener Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Mäuse von denen der Wildtyp-Tiere des gleichen Wurfes nicht zu unterscheiden waren, spricht aber dagegen, dass dies in den hier untersuchten transgenen Tieren in erhöhtem Maße der Fall ist.

Die Untersuchung genomischer DNA und der mRNA der Lebern transgener Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tiere hat gezeigt, dass nur dann phänotypische Effekte nachweisbar

waren, wenn die Rekombination in hohem Maße stattfand. Dass in den hier untersuchten transgenen Tg(albCre/ β Cat^{S33Y}) nur wenig bis keine Aktivierung von Zielgenen des β -Catenins detektiert werden konnte, ist durch die Tatsache erklärbar, dass nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen im Leberparenchym das Transgen und damit β -Catenin-Zielgene, wie GS, exprimierten. Auch die Korrelation der GS- und CYP-Expression wie sie in vitro in Maushepatomzellen beobachtet wurde, konnte in vivo nicht eindeutig reproduziert werden, was ebenfalls auf die sehr geringe Anzahl β -Catenin^{S33Y}-exprimierender Zellen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin, wenn es in entsprechend hohem Maß in der Leber transgener Tiere exprimiert wird, die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme und anderer Proteine in transgenen Mäusen beeinflussen kann. Allerdings fällt die Transgenexpression in der Leber in dem hier generierten Modell aus bisher noch unbekanntem Gründen insgesamt sehr viel geringer aus als zuvor erwartet.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierte transgene Maus, die durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin in einer kleinen Anzahl von Hepatozyten, die über das gesamte Leberläppchen verteilt sind, bedingt exprimiert, weist eine mosaikartige Transgenexpression auf. Dies und die hohe Variabilität innerhalb der erhaltenen transgenen Individuen macht Untersuchungen zur Expression verschiedener bekannter β -Catenin-Zielgene, sowie potentieller neuer Zielgene in Lebern dieser Tiere sehr schwierig. Da Transgen-exprimierende Hepatozyten nur in sehr geringer Zahl im Lebergewebe vorhanden sind, können Untersuchungen der mRNA- und Proteinexpression verschiedener Zielgene nur schlecht oder gar nicht untersucht werden, da die viel höhere Zahl von Wildtyp-Hepatozyten in den untersuchten Homogenaten das Ergebnis verfälscht. Unterschiede in der Expression von Zielgenen, wie z.B. GS, werden in Leberhomogenaten aufgrund der sehr geringen Zahl Transgen-exprimierender Zellen von

Wildtyp-Zellen überdeckt und können damit nicht oder nur sehr schwer nachgewiesen werden. Abhilfe könnte eventuell die Isolation GS-positiver, β -Catenin^{S33Y}-exprimierender Zellen aus Leberhomogenaten transgener Tiere schaffen. Des Weiteren könnten mit Hilfe von Primärkulturen von Hepatozyten transgener Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})- Mäuse weitere Untersuchung zur Charakterisierung der neu generierten transgenen Mauslinie durchgeführt werden.

Alles in allem könnte die im Rahmen dieser Arbeit generierte transgene Maus, die leberspezifisch punktmutierte *CTNNB1* (*CTNNB1-S33Y*) exprimiert, als Modell zur Untersuchung des Verhaltens einzelner Onkogen-exprimierender Hepatozyten in vivo vor dem Hintergrund phänotypisch normaler Hepatozyten herangezogen werden. Zu weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Tiere könnten sowohl Lebern PB-behandelter Tiere mit nicht behandelten Tieren verglichen, sowie Primärkulturen von Hepatozyten transgener Tiere eingesetzt werden. Des Weiteren könnten mit Hilfe von Mikrodissektionen einzelne, GS-positive und damit wahrscheinlich β -Catenin^{S33Y}-exprimierende Zellen isoliert und für mRNA- und Proteinisolierungen herangezogen werden. Mit Hilfe dieser Methode könnten gezielt Transgen-exprimierende Hepatozyten mit Wildtyp-Hepatozyten hinsichtlich ihrer Expression von β -Catenin-Zielgenen auf mRNA- und Proteinebene untersucht und eventuell vorhandene Expressionsunterschiede sichtbar gemacht werden.

Da mutiertes β -Catenin für die Entstehung einer Vielzahl von Lebertumoren in Maus und Mensch verantwortlich zu sein scheint, wäre es möglich, dass das hier generierte Mausmodell dazu beitragen kann, die Rolle von β -Catenin und seinen Mutationen in der Lebertumorigenese aufzuklären. Langfristig könnte also mit Hilfe der Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Maus ein in vivo-Modell erhalten werden, mit dessen Hilfe die Rolle des durch Punktmutation aktivierten β -Catenins in der Leberkanzerogenese der Maus weiter aufgeklärt werden könnte.

6 Zusammenfassung

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan des Körpers und das primäre Leberzellkarzinom (HCC) zählt zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Der Tumorpromotor Phenobarbital (PB) fördert die Hepatokarzinogenese in Nagern, wenn er im Anschluss an ein tumor-initiiertes Leberkarzinogen, wie z.B. Diethylnitrosamin, gegeben wird. In der Mausleber resultiert der promovierende Effekt von PB aus einer selektiven Stimulation des klonalen Wachstums von Hepatozyten, die eine aktivierende Mutation im β -Catenin-Gen (*Ctnnb1*) aufweisen. β -Catenin spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. Zelldifferenzierung und Lebertumorigenese in Maus und Mensch. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Expression fremdstoffmetabolisierender Cytochrom P450-Enzyme in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren gegenüber Normalgewebe unterscheidet. Zudem sollte eine transgene Maus generiert werden, die induzierbar eine punktmutierte Form des humanen β -Catenins exprimiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration verschiedener Cytochrom P450-Isoenzyme in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren selektiv erhöht ist. Immunhistochemische und Western Blot Analysen zeigten, dass *Ctnnb1*-mutierte Mauslebertumoren eine höhere Konzentration an CYP1A1, 2B1, 2C6 und 2E1 aufweisen als Tumoren ohne *Ctnnb1*-Mutation oder normales Lebergewebe. Auch auf mRNA-Ebene konnten erhöhte CYP-Expressionen nachgewiesen werden. Die β -Catenin-Expression blieb dabei in allen untersuchten Tumoren unverändert. Um den Mechanismus, der der Verstärkung der CYP-Expression in *Ctnnb1*-mutierten Mauslebertumoren zugrunde liegt, zu untersuchen, wurden Maushepatomzellen transient transfiziert. Hierfür wurde ein Expressionsvektor, der die codierende Sequenz für humanes, durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin (β -Catenin^{S33Y}) enthielt, eingesetzt. Dessen transaktivierende Funktionalität wurde im Vorfeld mittels Transfektion mit einem β -Cat/TCF-

responsiven Reportergenkonstrukt (TopFlash) nachgewiesen. Interessanterweise wurden Luciferase-Reportergenkonstrukte, die regulatorische Upstream-Sequenzen des CYP2B1-Gens oder des CYP1A1-Gens enthielten, durch β -Catenin^{S33Y} aktiviert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch Mutation aktiviertes β -Catenin zu einer transkriptionellen Aktivierung von CYP-Isoenzymen in Mauslebertumoren führt. Da CYP-Isoenzyme bei der Aktivierung und/oder Inaktivierung verschiedener klinisch wichtiger Krebsmedikamente eine Rolle spielen, könnten die hier erhaltenen Ergebnisse für die Chemotherapie humaner Krebsarten, in denen eine Aktivierung von β -Catenin durch Mutationen beobachtet werden kann, von Bedeutung sein.

Um die Rolle von *Cttnb1*-Mutationen in vivo zu untersuchen, wurde eine Knock-in-Maus generiert, die durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin (β -Catenin^{S33Y}) unter der Kontrolle des leberspezifischen Albumin-Promotors exprimiert. Die Expression des Transgens wurde per PCR überprüft und die β -Catenin-Mutation per Sequenzierung nachgewiesen. Seine Funktionalität wurde mittels Expressionsuntersuchungen von β -Catenin-Zielgenen, wie z.B. Glutaminsynthetase (GS), überprüft. Transgene Tg(albCre/ β Cat^{S33Y})-Tiere zeigten aufgrund einer sehr geringen Zahl an GS-positiven, β -Catenin^{S33Y}-exprimierenden Zellen im Leberparenchym nur eine leicht erhöhte Expression von GS und verschiedenen CYP-Isoenzymen auf mRNA- und Proteinebene. Da β -Catenin eine wichtige Rolle bei der zonierten Expression einiger Leberproteine spielt, wurde die Zonierung des Proteins, sowie von β -Catenin-Zielgenen, wie GS, und CYP-Enzymen, mittels Immunhistochemie untersucht. Diese Experimente zeigten ebenfalls, dass nur eine geringe Zahl von Hepatozyten das β -Catenin^{S33Y}-Transgen exprimierten. Diese waren nicht in Clustern angelegt, sondern lagen als Einzelzellen im normalen Leberparenchym vor. Diese einzelnen Transgen-exprimierenden Zellen wiesen allerdings eine erhöhte GS- und CYP-Expression auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Punktmutation aktiviertes β -Catenin die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme und anderer Proteine in transgenen Tieren beeinflusst. Da Mutationen im β -Catenin-Gen in einer Reihe von Lebertumoren in Maus und Mensch enthalten sind, könnte mit dem hier generierten Mausmodell ein in vivo-Modell vorliegen, mit dessen Hilfe die Rolle von *Ctnnb1*-Mutationen und das Verhalten einzelner Onkogen-exprimierender Zellen in der Lebertumorigenese näher untersucht werden kann.

7 Literatur

Apte, U; Thompson, MD; Cui, S; Liu, B; Cieply, B; Monga, SP. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology*. 2008, 47(1): 288-95.

Aydinlik, H; Nguyen, TD; Moennikes, O; Buchmann, A; Schwarz, M. Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene*. 2001, 20(53): 7812-6.

Barron, LG; Uyechi, LS; Szoka, FC Jr. Cationic lipids are essential for gene delivery mediated by intravenous administration of lipoplexes. *Gene Ther*. 1999, 6(6): 1179-83.

Behrens, J; Lustig, B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol*. 2004, 48(5-6):477-87.

Behrens, J; von Kries, JP; Kühl, M; Bruhn, L; Wedlich, D; Grosschedl, R; Birchmeier, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996, 382(6592): 638-42.

Bock, KW. Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1994; 125: 1-42

Bock, KW; Lilienblum, W; Pfeil, H; Eriksson, LC. Increased uridine diphosphate-glucuronyltransferase activity in preneoplastic liver nodules and Morris hepatomas. *Cancer Res*. 1982, 42(9): 3747-52.

Brabletz, T; Jung, A; Dag, S; Hlubek, F; Kirchner, T. Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*. 1999, 155(4): 1033-8.

Braeuning, A; Ittrich, C; Köhle, C; Hailfinger, S; Bonin, M; Buchmann, A; Schwarz, M. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J*. 2006, 273(22): 5051-61

- Brosnan, ME; Brosnan, JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *Am J Clin Nutr.* 2009, 90(3): 857 - 861.
- Buchmann, A; Kuhlmann, W; Schwarz, M; Kunz, W; Wolf, CR; Moll, E; Friedberg, T; Oesch, F. Regulation and expression of four cytochrome P-450 isoenzymes, NADPH-cytochrome P-450 reductase, the glutathione transferases B and C and microsomal epoxide hydrolase in preneoplastic and neoplastic lesions in rat liver. *Carcinogenesis.* 1985, 6(4): 513-21.
- Buchmann, A; Bauer-Hofmann, R; Mahr, J; Drinkwater, NR; Luz, A; Schwarz, M. Mutational activation of the c-Ha-ras gene in liver tumors of different rodent strains: correlation with susceptibility to hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991, 88(3): 911-5.
- Buchmann, A; Bock, KW; Schwarz, M. Enzyme and immunohistochemical phenotyping of diethylnitrosamine-induced liver lesions of male C3H/He, B6C3F1 and C57BL/6J mice. *Carcinogenesis.* 1992, 13(4): 691-7.
- Buchmann, A; Schwarz, M; Schmitt, R; Wolf, CR; Oesch, F; Kunz, W. Development of cytochrome P-450-altered preneoplastic and neoplastic lesions during nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res.* 1987, 47(11): 2911-8.
- Bühler, R; Lindros, KO; Nordling, A; Johansson, I; Ingelman-Sundberg, M. Zonation of cytochrome P450 isozyme expression and induction in rat liver. *Eur J Biochem.* 1992, 15; 204(1): 407-12.
- Cadigan, KM; Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997, 11(24): 3286-305.
- Cadoret, A; Ovejero, C; Saadi-Kheddouci, S; Souil, E; Fabre, M; Romagnolo, B; Kahn, A; Perret, C. Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin. *Cancer Res.* 2001, 61(8): 3245-9.

Cadoret, A; Ovejero, C; Terris, B; Souil, E; Lévy, L; Lamers, WH; Kitajewski, J; Kahn, A; Perret, C. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene*. 2002, 21(54):8293-301.

Calvisi, DF; Factor, VM; Loi, R; Thorgeirsson, SS. Activation of beta-catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res*. 2001, 61(5): 2085- 91.

Chtarbova, S; Nimmrich, I; Erdmann, S; Herter, P; Renner, M; Kitajewski, J; Müller, O. Murine Nr4a1 and Herpud1 are up-regulated by Wnt-1, but the homologous human genes are independent from beta-catenin activation. *Biochem J*. 2002, 367(Pt 3): 723-8.

Crawford, HC; Fingleton, BM; Rudolph-Owen, LA; Goss, KJ; Rubinfeld, B; Polakis, P; Matrisian, LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 1999, 18(18): 2883-91.

Crawford, HC; Fingleton, B; Gustavson, MD; Kurpios, N; Wagenaar, RA; Hassell, JA; Matrisian, LM. The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors. *Mol Cell Biol*. 2001, 21(4): 1370-83.

Cunningham, C.C.; Van Horn, C.G. Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol Research & Health* 2003, 27(4): 281–299.

De La Coste, A ; Romagnolo, B ; Billuart, P; Renard, CA ; Buendia, MA; Soubrane, O; Fabre, M ; Chelly, J; Beldjord, C; Kahn, A; Perret, C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95(15): 8847-51.

Fearon, ER; Vogelstein, B. A Genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990, 61(5): 759-67.

Gaunitz, F; Gaunitz, C; Papke, M; Gebhardt, R. Cis-regulatory sequences from the first intron of the rat glutamine synthetase gene are involved in hepatocyte specific expression of the enzyme. *Biol Chem.* 1997, 378(1): 11-8.

Gebhardt, R; Mecke, D. Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO J.* 1983, 2(4): 567-70.

Gebhardt, R; Tanaka, T; Williams, GM. Glutamine synthetase heterogeneous expression as a marker for the cellular lineage of preneoplastic and neoplastic liver populations. *Carcinogenesis.* 1989, 10(10): 1917-23.

Gu, YZ; Hogenesch, JB; Bradfield, CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40: 519-61.

Hailfinger, S; Jaworski, M; Braeuning, A; Buchmann, A; Schwarz, M. Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology.* 2006, 43(3): 407-14.

Hakkola, J; Hu, Y; Ingelman-Sundberg, M. Mechanisms of down-regulation of CYP2E1 expression by inflammatory cytokines in rat hepatoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 304(3): 1048-54.

Handschin, C; Meyer, UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2003, 55(4): 649-73.

Handschin, C; Meyer, UA. Regulatory network of lipid-sensing nuclear receptors: roles for CAR, PXR, LXR, and FXR. *Arch Biochem Biophys.* 2005, 433(2): 387-96.

Harada, N; Tamai, Y; Ishikawa, T; Sauer, B; Takaku, K; Oshima, M; Taketo, MM. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* 1999, 18(21): 5931-42.

Hashimoto, H; Toide, K; Kitamura, R; Fulita, M; Tagawa, S; Itoh, S; Kamataki, T. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem.* 193, 218: 585-95

He, TC; Sparks, AB; Rago, C; Hermeking, H; Zawel, L; da Costa, LT; Morin, PJ; Vogelstein, B; Kinzler, KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998, 281(5382): 1509-12.

Heder, AF; Hirsch-Ernst, KI; Bauer, D; Kahl, GF; Desel, H. Induction of cytochrome P450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol*. 2001, 62(1): 71-9.

Ho, JC; Cheung, ST; Leung, KL; Ng, IO; Fan, ST. Decreased expression of cytochrome P450 2E1 is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2004, 111(4): 494-500.

Honkakoski, P; Zelko, I; Sueyoshi, T; Negishi, M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol*. 1998, 18(10): 5652-8.

Honkakoski, P; Negishi, M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*. 2000, 347(Pt 2): 321-37.

Howe, LR; Subbaramaiah, K; Chung, WJ; Dannenberg, AJ; Brown, AM. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1999, 59(7): 1572-7.

Huang, H ; Fujii, H; Sankila, A; Mahler-Araujo, BM; Matsuda, M; Cathomas, G; Ohgaki, H. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol*. 1999, 155(6): 1795-801.

Huelsken, J; Behrens, J. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2002, 115(21): 3977-8.

Ingelman-Sundberg, M; Oscarson, M; McLellan, RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 1999, 20(8): 342-9.

Inomata, M; Ochiai, A; Akimoto, S; Kitano, S; Hirohashi, S. Alteration of beta-catenin expression in colonic epithelial cells of familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* 1996, 56(9): 2213-7.

Inoue, H; Nojima, H; Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990, 96 (1): 23-8.

Itoh, K; Krupnik, VE; Sokol, SY. Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol.* 1998, 8(10): 591-4.

Jacobson, G; Kårsnäs, P. Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer. *Electrophoresis.* 1990, 11(1): 46-52.

Kim, J; Kemper, B. Phenobarbital alters protein binding to the CYP2B1/2 phenobarbital-responsive unit in native chromatin. *J Biol Chem.* 1997, 272(47): 29423-5.

Kress, S; Sutter, C; Strickland, PT; Mukhtar, H; Schweizer, J; Schwarz, M. Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res.* 1992, 52(22): 6400-3.

Kunz, HW; Buchmann, A; Schwarz, M; Schmitt, R; Kuhlmann, WD; Wolf, CR; Oesch, F. Expression and inducibility of drug-metabolizing enzymes in preneoplastic and neoplastic lesions of rat liver during nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Arch Toxicol.* 1987, 60(1-3): 198-203.

Landy, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem.* 1989, 58: 913-49.

Lee, JS; Ishimoto, A; Yanagawa, S. Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem.* 1999, 274(30): 21464-70.

Li, L; Mao, J; Sun, L; Liu, W; Wu, D. Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem.* 2002, 277(8): 5977-81.

Liu, T; DeCostanzo, AJ; Liu, X; Wang, Hy; Hallagan, S; Moon, RT; Malbon, CC. G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science.* 2001, 292(5522): 1718-22.

Loeppen, S; Schneider, D; Gaunitz, F; Gebhardt, R; Kurek, R; Buchmann, A; Schwarz, M. Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital. *Cancer Res.* 2002, 62(20): 5685-8.

Lustig, B; Behrens, J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003, 129(4): 199-221.

Malbon, CC; Wang, H; Moon, RT. Wnt signaling and heterotrimeric G-proteins: strange bedfellows or a classic romance? *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 287(3): 589-93.

Maronpot, RR; Fox, T; Malarkey, DE; Goldsworthy, TL. Mutations in the ras proto-oncogene: clues to etiology and molecular pathogenesis of mouse liver tumors. *Toxicology.* 1995, 101(3): 125-56.

Marquardt, H.; Schäfer, S.G. Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsges., 1994

McCrea, PD; Turck, CW; Gumbiner, B. A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science.* 1991, 254(5036): 1359-61.

Micsenyi, A; Tan, X; Sneddon, T; Luo, JH; Michalopoulos, GK; Monga, SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology.* 2004, 126(4): 1134-46.

Moennikes, O; Buchmann, A; Ott, T; Willecke, K; Schwarz, M. The effect of connexin32 null mutation on hepatocarcinogenesis in different mouse strains. *Carcinogenesis*. 1999, 20(7): 1379-82.

Moennikes, O; Buchmann, A; Romualdi, A; Ott, T; Werringloer, J; Willecke, K; Schwarz, M. Lack of phenobarbital-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in connexin32-null mice. *Cancer Res*. 2000, 15; 60(18): 5087-91.

Moennikes, O; Stahl, S; Bannasch, P; Buchmann, A; Schwarz, M. WY-14,643-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in connexin32-wild-type and connexin32-null mice. *Carcinogenesis*. 2003, 24(9): 1561-5.

Molenaar, M; van de Wetering, M; Oosterwegel, M; Peterson-Maduro, J; Godsave, S; Korinek, V; Roose, J; Destree, O; Clevers, H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1996, 86(3): 391-9.

Moolgavkar, SH. Model for human carcinogenesis: action of environmental agents. *Environ Health Perspect*. 1983, 50: 285-91.

Moolgavkar, SH; Knudson, AG Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 1981, 66(6): 1037-52.

Morin, PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays*. 1999, 21(12): 1021-30.

Mukhopadhyay, M; Shtrom, S; Rodriguez-Esteban, C; Chen, L; Tsukui, T; Gomer, L; Dorward, DW; Glinka, A; Grinberg, A; Huang, SP; Niehrs, C; Belmonte, JC; Westphal, H. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell*. 2001, 1(3): 423-34.

Myasoedova, KN. New findings in studies of cytochromes P450. *Biochemistry (Mosc)*. 2008, 73(9): 965-9.

Park, NH; Chung, YH; Youn, KH; Song, BC; Yang, SH; Kim, JA; Lee, HC; Yu, E; Lee, YS; Lee, SG; Kim, KW; Suh, DJ. Close correlation of p53 mutation to microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2001; 33(5): 397-401.

Peifer, M; Pai, LM; Casey, M. Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol.* 1994, 166(2): 543-56.

Peifer, M; Berg, S; Reynolds, AB. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell.* 1994, 76(5): 789-91.

Peifer, M; Sweeton, D; Casey, M; Wieschaus, E. Wingless signal and Zeste-white 3 kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of Armadillo. *Development.* 1994, 120(2): 369-80.

Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007, 17(1): 45-51.

Polakis, P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev.* 1999, 9(1): 15-21.

Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000, 14(15): 1837-51.

Polakis, P; Hart, M; Rubinfeld, B. Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol.* 1999, 470: 23-32.

Pollenz, RS. The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol.* 1996, 49(3): 391-8.

Postic, C; Magnuson, MA. DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age. *Genesis.* 2000, 26(2): 149-50.

Renard, CA; Fourel, G; Bralet, MP; Degott, C; De La Coste, A; Perret, C; Tiollais, P; Buendia, MA. Hepatocellular carcinoma in WHV/N-myc2 transgenic mice: oncogenic mutations of beta-catenin and synergistic effect of p53 null alleles. *Oncogene*. 2000, 19(22): 2678-86.

Rijsewijk, F; van Deemter, L; Wagenaar, E; Sonnenberg, A; Nusse, R. Transfection of the int-1 mammary oncogene in cuboidal RAC mammary cell line results in morphological transformation and tumorigenicity. *EMBO J*. 1987, 6(1): 127-31.

Rijsewijk, F; Schuermann, M; Wagenaar, E; Parren, P; Weigel, D; Nusse, R. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*. 1987, 50(4): 649-57.

Schwarz, M; Buchmann, A; Bauer-Hofmann, R; Mahr, J. Molecular genetic analysis of preneoplastic and neoplastic liver lesions in the mouse. *Prog Histochem Cytochem*. 1991, 23(1-4): 107-14.

Schwarz, M; Wanke, I; Wulbrand, U; Moennikes, O; Buchmann, A. Role of connexin32 and beta-catenin in tumor promotion in mouse liver. *Toxicol Pathol*. 2003, 31(1): 99-102.

Shtutman, M; Zhurinsky, J; Simcha, I; Albanese, C; D'Amico, M; Pestell, R; Ben-Ze'ev, A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999, 96(10): 5522-7.

Sekine, S; Lan, BY; Bedolli, M; Feng, S; Hebrok, M. Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology*. 2006, 43(4): 817-25.

Stepniak, E; Radice, GL; Vasioukhin, V. Adhesive and signalling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009, 1(5): a002949.

Sueyoshi, T; Negishi, M. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001, 41: 123-43.

Taniguchi, K; Roberts, LR; Aderca, IN; Dong, X; Qian, C; Murphy, LM; Nagorney, DM; Burgart, LJ; Roche, PC; Smith, DI; Ross, JA; Liu, W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*. 2002; 21(31): 4863-71.

Tetsu, O; McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999, 398(6726): 422-6.

Thasler, WE; Dayoub, R; Mühlbauer, M; Hellerbrand, C; Singer, T; Gräbe, A; Jauch, KW; Schlitt, HJ; Weiss, TS. Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augments liver regeneration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006, 316(2): 822-9.

Thompson, MD; Monga, SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*. 2007, 45(5): 1298-305.

Towbin, H; Staehelin, T; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 1992, 24: 145-9.

Tzamelis, I; Moore, DD. Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR. *Trends Endocrinol Metab*. 2001, 12(1): 7-10.

Ueda, A; Hamadeh, HK; Webb, HK; Yamamoto, Y; Sueyoshi, T; Afshari, CA; Lehmann, JM; Negishi, M. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol Pharmacol*. 2002, 61(1): 1-6.

von Kries, JP; Winbeck, G; Asbrand, C; Schwarz-Romond, T; Sochnikova, N; Dell'Oro, A; Behrens, J; Birchmeier, W. Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol*. 2000, 7(9): 800-7.

Wang, D; Mann, J; DuBois, R. WNT and cyclooxygenase-2 cross-talk accelerates adenoma growth. *Cell Cycle*. 2000, 60: 4761– 4766

Waxman, DJ; Azaroff, L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J.* 1992, 281 (Pt 3): 577-92.

Weis, WI; Neslon, WJ. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem.* 2006. 281 (47): 35593-7.

Willert, K; Nusse, R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 1998, 8(1): 95-102.

Yamada, T; Takaoka, AS; Naishiro, Y; Hayashi, R; Maruyama, K; Maesawa, C; Ochiai, A; Hirohashi, S. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/ β -catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 2000, 60: 4761–4766

Zhang, X; Gaspard, JP; Chung, DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 2001, 61(16): 6050-4.

Publikationen

Artikel

Generation of a transgenic mouse with liver-specific expression of mutationally activated beta-catenin.

Schreiber S, Rignall B, Marx-Stölting P, Braeuning A, Ott T, Buchmann A, Schwarz M, Koehle C.

(in preparation)

Tumor promotion in liver of mice with a conditional Cx26 knockout.

Marx-Stoelting P, Mahr J, Knorpp T, **Schreiber S**, Templin MF, Ott T, Buchmann A, Schwarz M.

Toxicol Sci. 2008, 103(2):260-7.

A beta-catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors.

Loeppen S, Koehle C, Buchmann A, Schwarz M.

Carcinogenesis. 2005, 26(1):239-48.

A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice.

Moennikes O, **Loeppen S**, Buchmann A, Andersson P, Ittrich C, Poellinger L, Schwarz M.

Cancer Res. 2004, 64(14):4707-10.

Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital.

Loeppen S, Schneider D, Gaunitz F, Gebhardt R, Kurek R, Buchmann A, Schwarz M.

Cancer Res. 2002, 62(20):5685-8.

Kongressbeiträge (Vorträge)

Beta-Catenin-vermittelte Überexpression von Cytochrom P450-Isoenzymen in Lebertumoren der Maus.

Loeppen, S., Buchmann, A., Koehle, C. and Schwarz, M.

45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 9.-11. März 2004, Mainz.

3.1.1.1.3 Kongressbeiträge (Poster)

Transgenic expression of S33Y mutated beta-catenin in mouse liver constitutively activates beta-catenin signalling.

Schreiber, S., Ott, T., Koehle, C., Marx-Stoelting, P. Buchmann, A., Schwarz, M.

48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 13.-15. März 2007, Mainz.

Promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital is mediated by overexpression of glutamin synthetase in beta-catenin-mutated mouse liver tumors.

Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Buchmann, A., Schwarz, M.

44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 17.-20. März 2003, Mainz.

Promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital is mediated by overexpression of glutamin synthetase in beta-catenin-mutated mouse liver tumors.

Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Buchmann, A., Schwarz, M.

Gemeinsame Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM) und der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), 7.-10. September, 2002, Halle.

Akademische Lehrer

Klaus Albert

Ernst Bayer

Hans Bisswanger

Karl Walter Bock

Peter Bohley

Volkmar Braun

Ursula Breyer-Pfaff

Albrecht Buchmann

Karl Eisele

Kai-Uwe Fröhlich

Günter Gauglitz

Rolf Gebhardt

Günter Häfelinger

Hanspaul Hagenmaier

Bernd Hamprecht

Michael Hanack

Volker Hoffmann

Günther Jung

Detlef Krug

Ekkehard Lindner

Dieter Mecke

Peter Münzel

Werner Nakel

Helga Ninnemann

Heinz Oberhammer

Dieter Oelkrug

Walter Pfeiffer

Helmut Pommer

Hansgeorg Probst

Michael Schwarz

Joachim Strähle

Wolfgang Voelter

Ulrich Weber

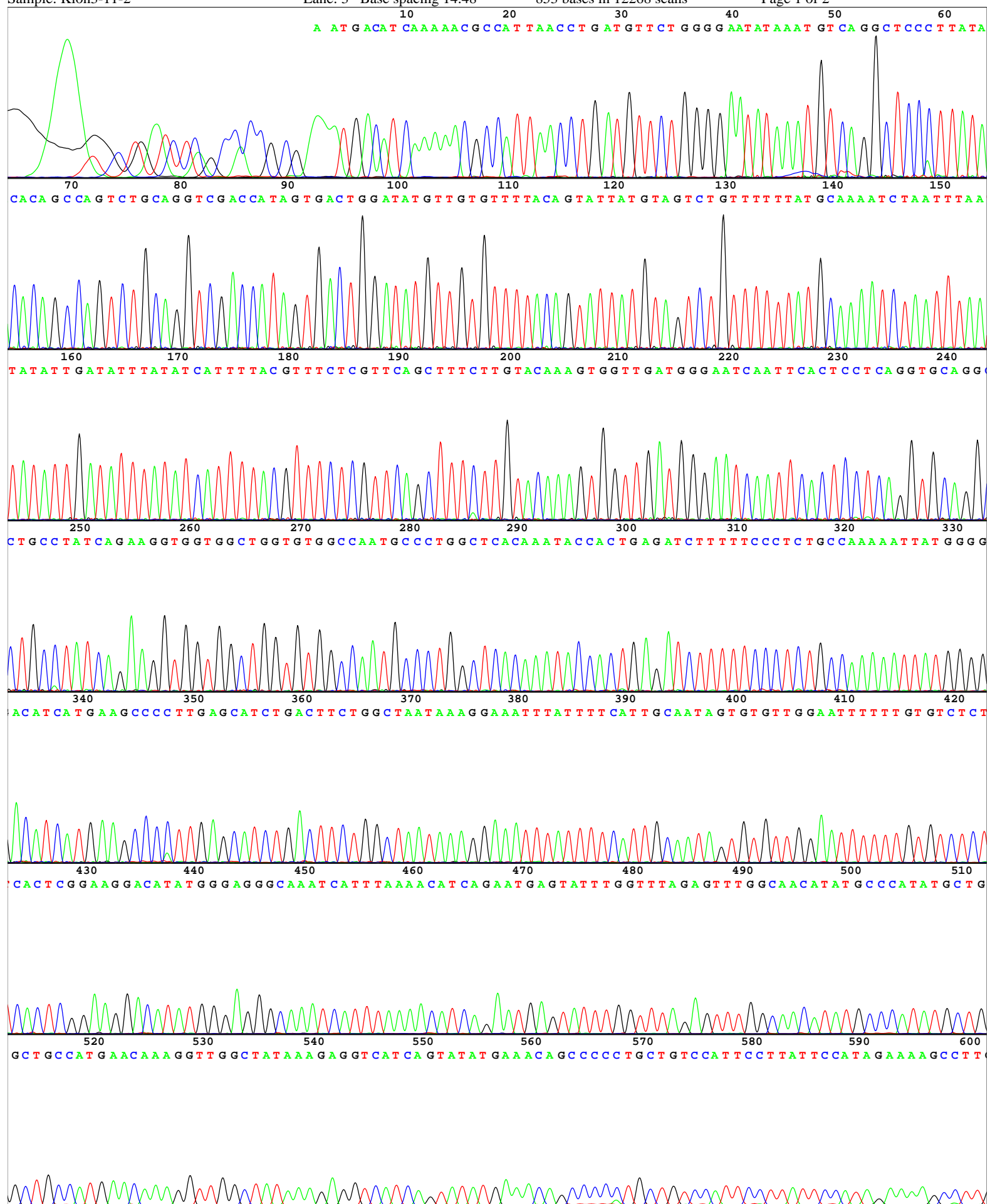
Klaus Wegmann

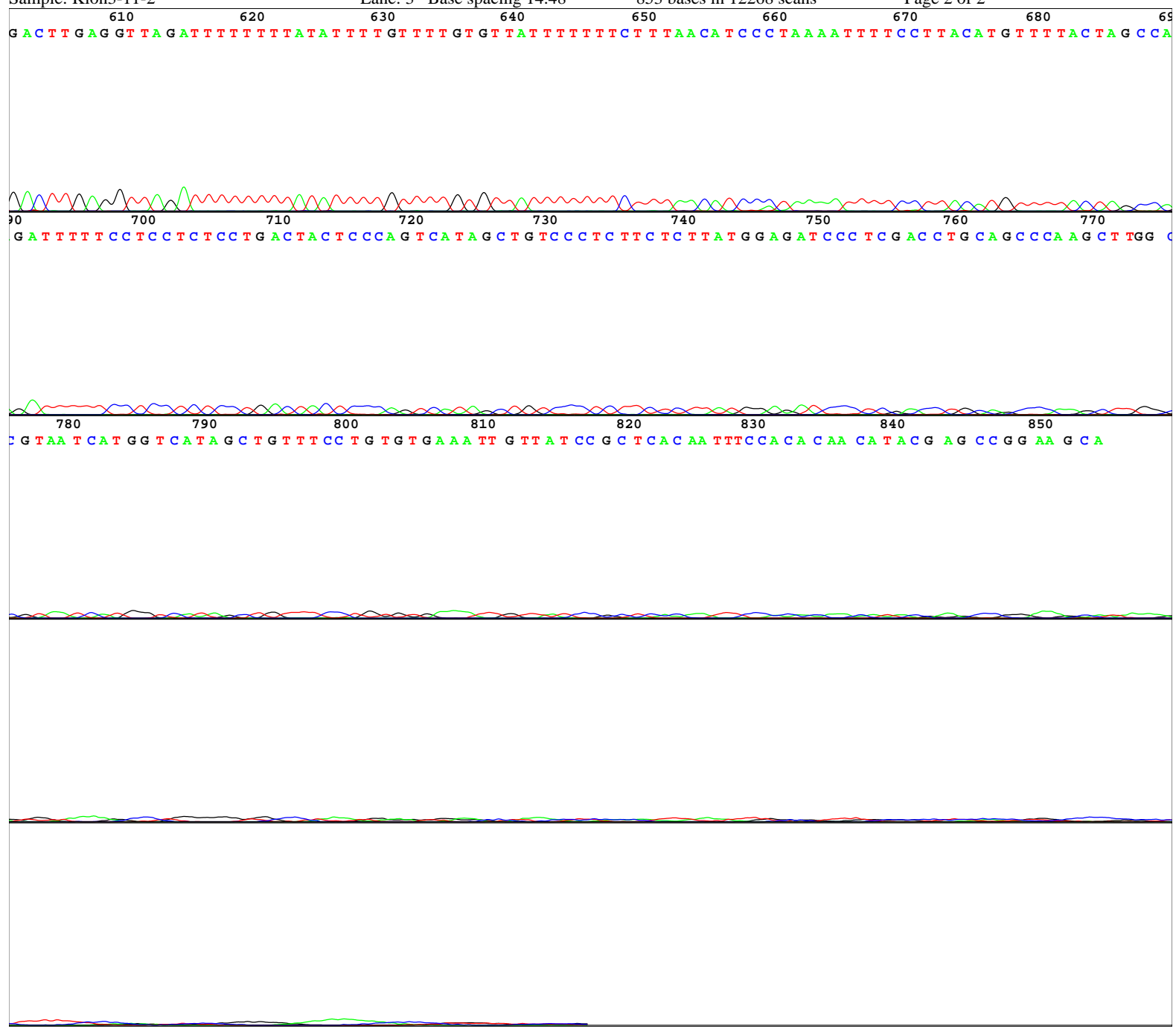
Ulrich Weser

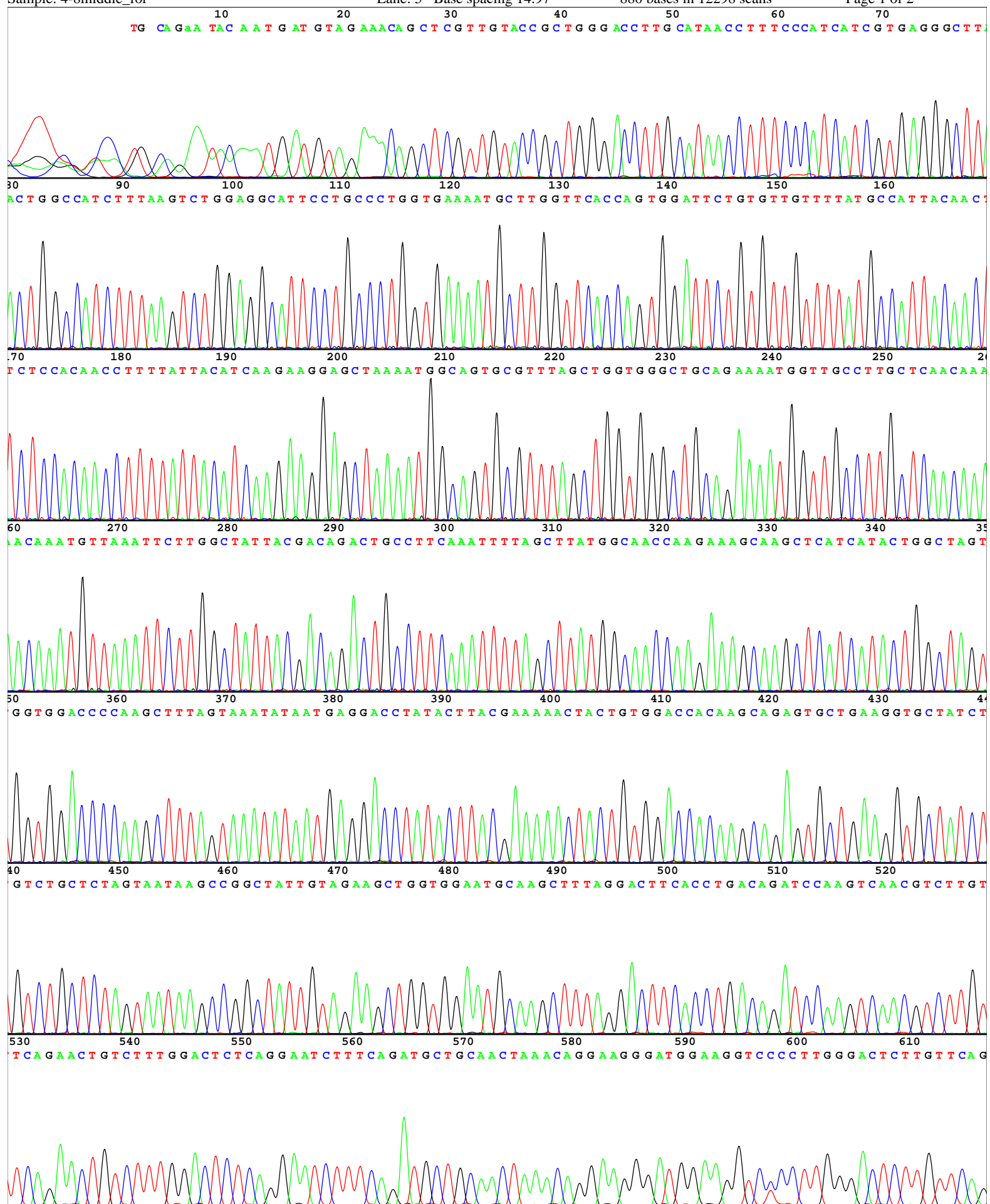
Jürgen Werringloer

Heinrich Wiesinger

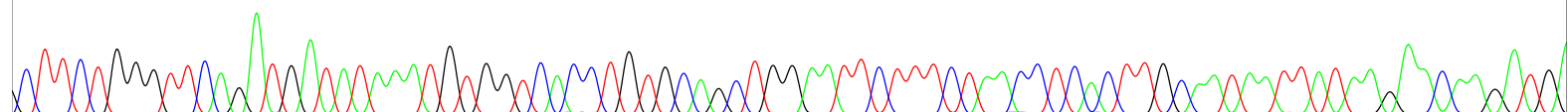
Anhang



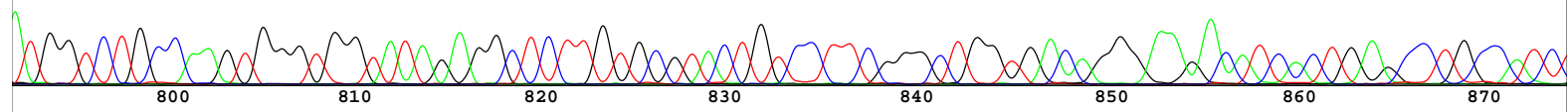




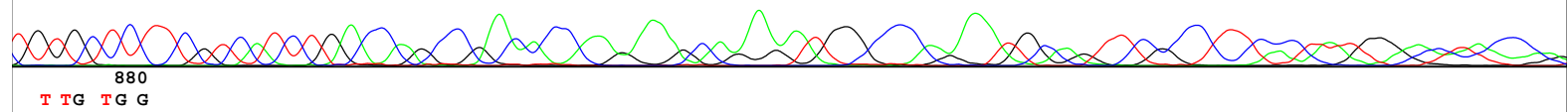
620 630 640 650 660 670 680 690 700
CTTCTGGGTTCA GATGATATAAATGTGGTCAACCTGTGTCAGCTGGAAATCTTCTAACCTCACCTTGCAAATAATTATAAGAACAAAGATG



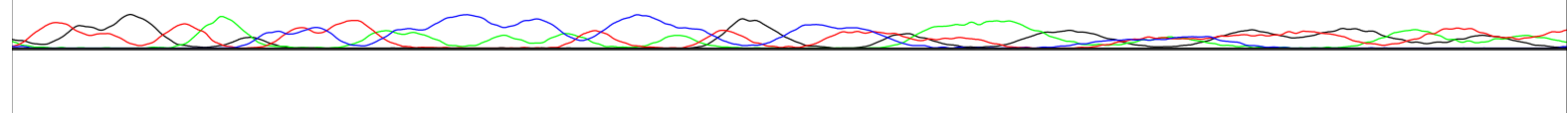
710 720 730 740 750 760 770 780 790
ATGGTCTTGCCAAAGTGGGTGTGATAGAGGCTCTTGTGTGCTACTGTCCCTTCGGGCTGGTGTGACAGGGAAAGACATCACTGAGCCTGCCATC

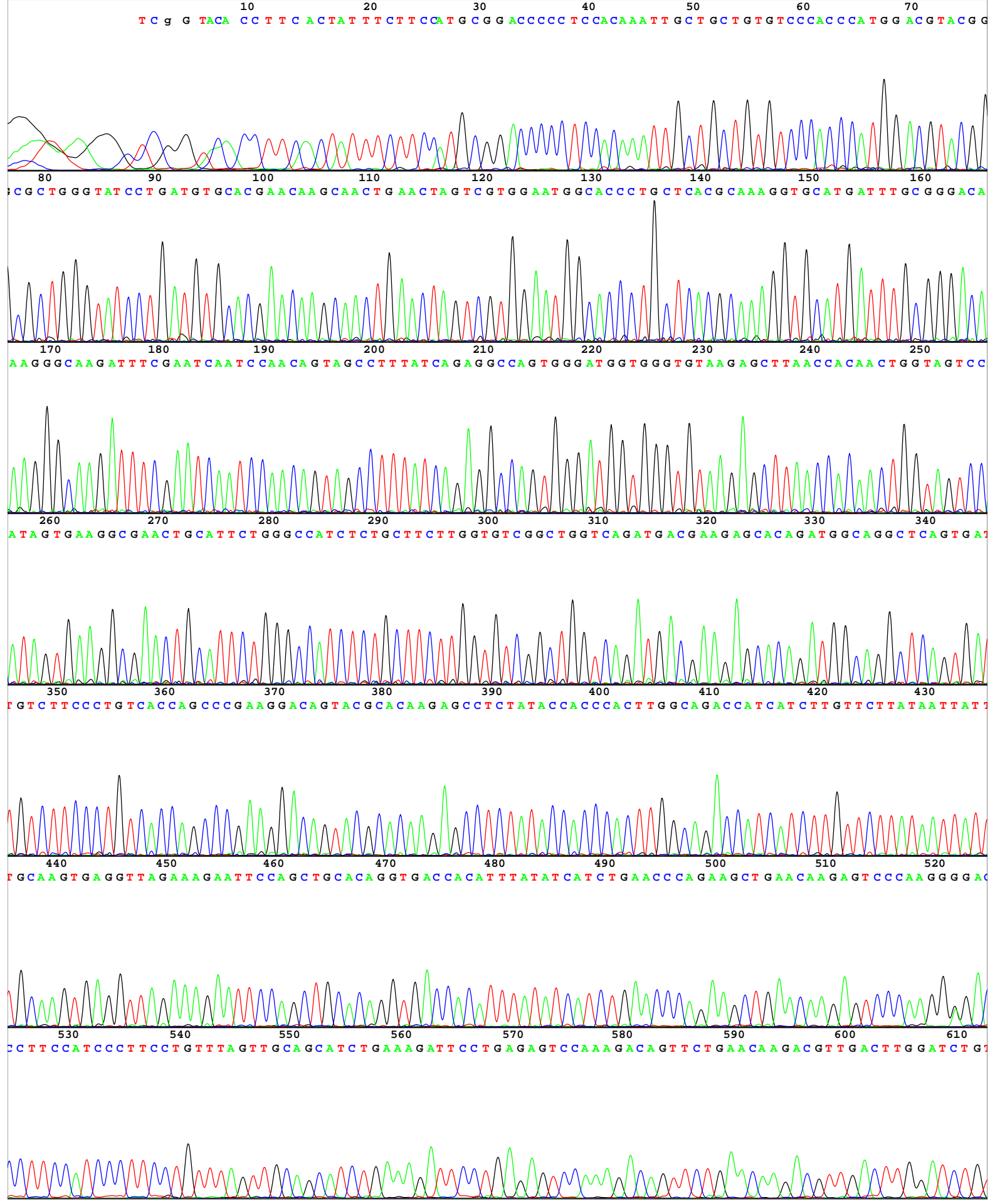


800 810 820 830 840 850 860 870
TGTGCTCTTCGTCATCTGTACCAAGCCGACACCAGAA GCA G A TGG CCCAGAA TGCAG TTCG CCTTCACTA TGGAAAC TA CCCAG

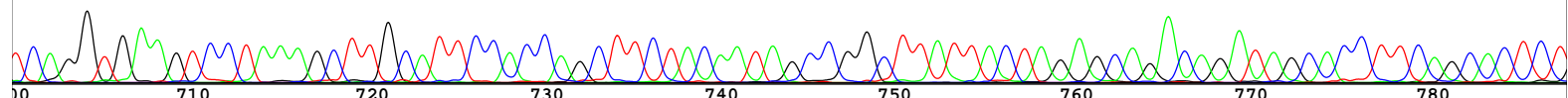


880
TTG TGG

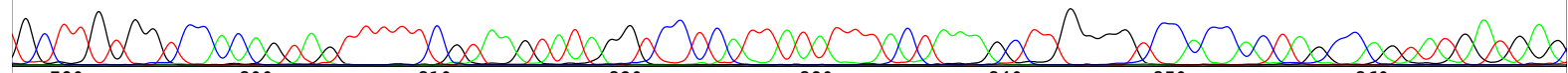




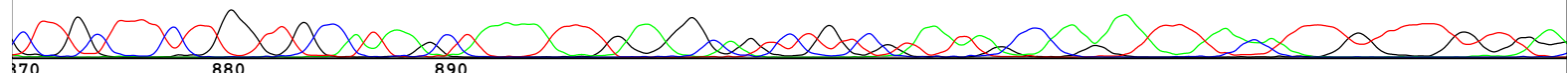
620 630 640 650 660 670 680 690 700
T C A G G T G A A G T C C T A A A G C T T G C A T T C C A C C A G C T T C T A C A A T A G C C G G C T T A T T A C T A G A G C A G A C A G A T A G C A C C T T C A G C A C T C T



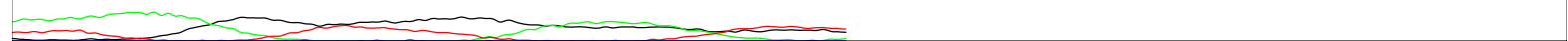
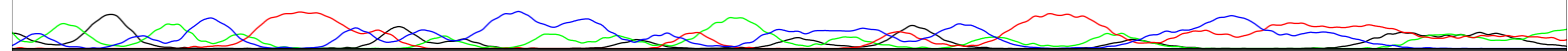
710 720 730 740 750 760 770 780
G C T T G T G G T C C A C A G T A G T T T T T C G T A A G T A T A G G T C C T C A T T A T A T T T A C T A A A G C T T G G G G T C C A C C A C T A G C C A G T A T G A T G A G



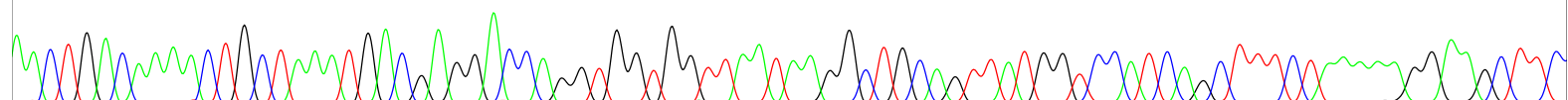
790 800 810 820 830 840 850 860
C T T G C T T T C T T G G T T G C C A T A A G C T A A A A T T T G A A G G C A G T C T G T C G T A A T A G C C C A A G A A T T T T A A C A T T T G T T T T G T T G A G



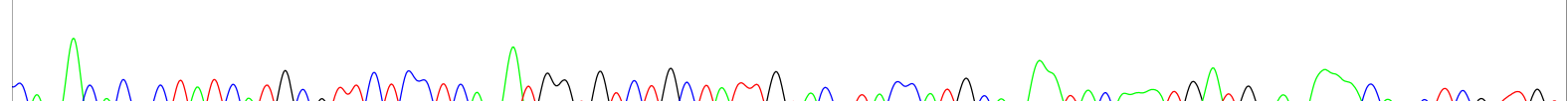
870 880 890
G C A A G G C A A C C A T T T T C T G C A G



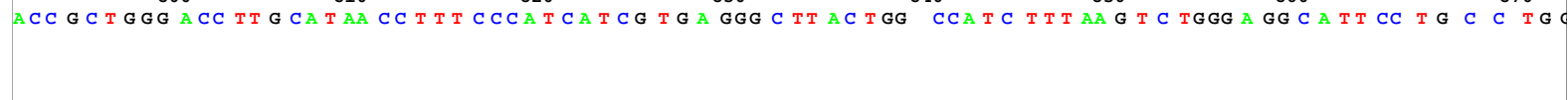
620 630 640 650 660 670 680 690 700
A A C T G A C A A A A C T G C T A A A T G A C G A G G A C C A G G T G G T G G T T A A T A A G G C T G C A G T T A T G G T C C A T C A G C T T T C T A A A A A G G A A G C T T C



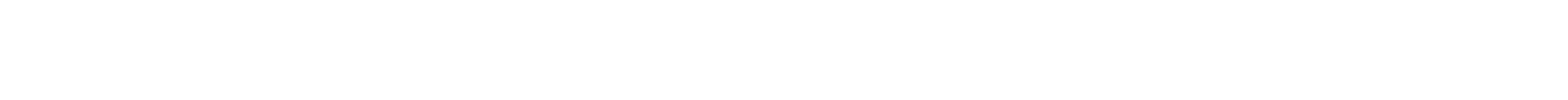
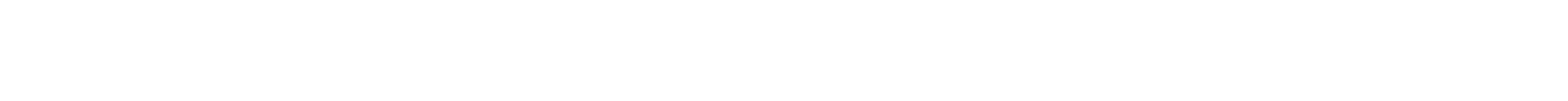
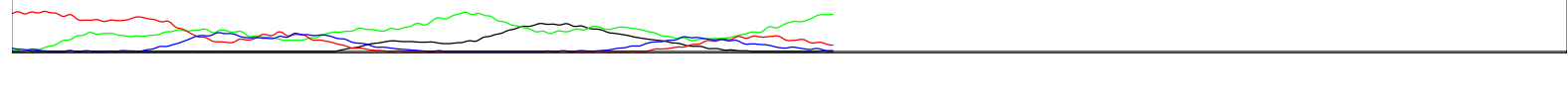
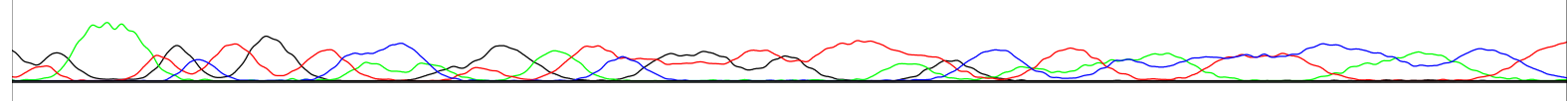
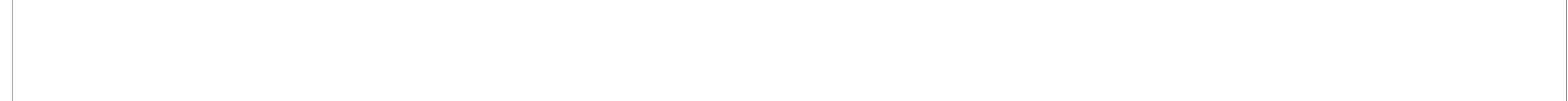
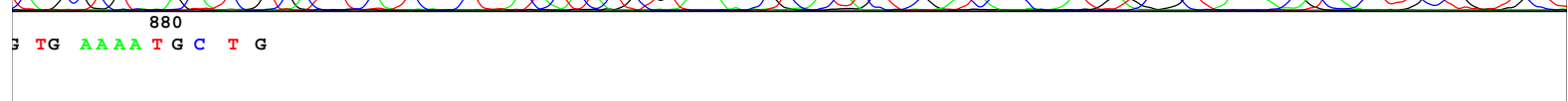
710 720 730 740 750 760 770 780 790
C A G A C A C G C T A T C A T G C G T T C T C C T C A G A T G G T G T C T G C T A T T G T A C G T A C C A T G C A G A A T A C A A A T G A T G T A G A A A C A G C T C G T T G T

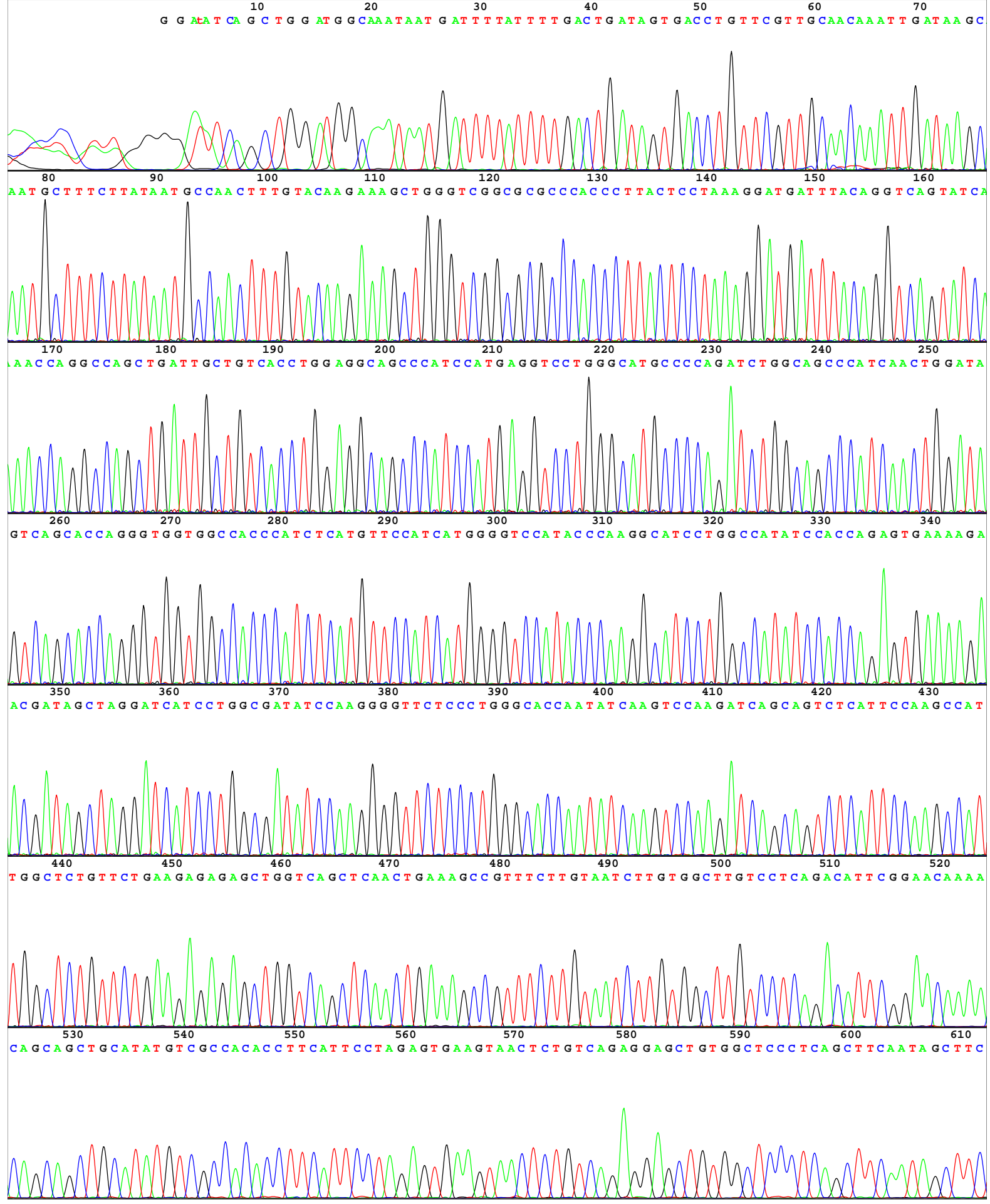


800 810 820 830 840 850 860 870
A C C G C T G G G A C C T T G C A T A A C C T T T C C C A T C A T C G T G A G G G C T T A C T G G C C A T C T T T A A G T C T G G G A G G C A T T C C T G C C T G C

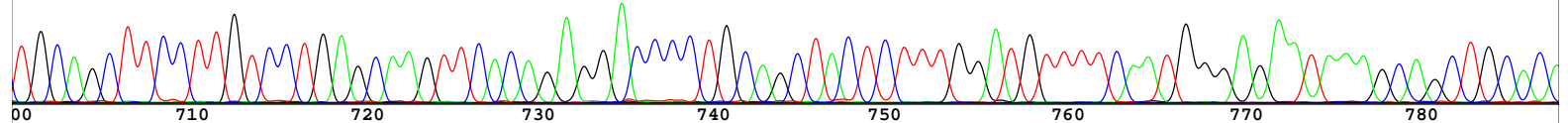


880
T G A A A A T G C T G

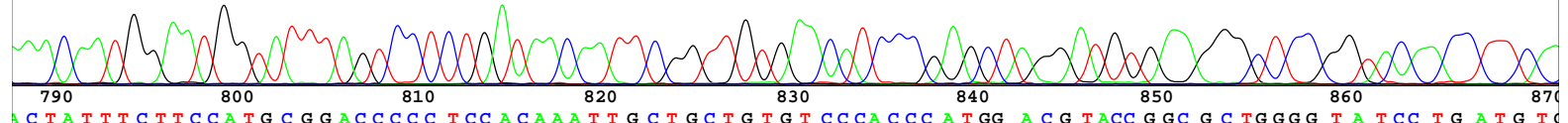




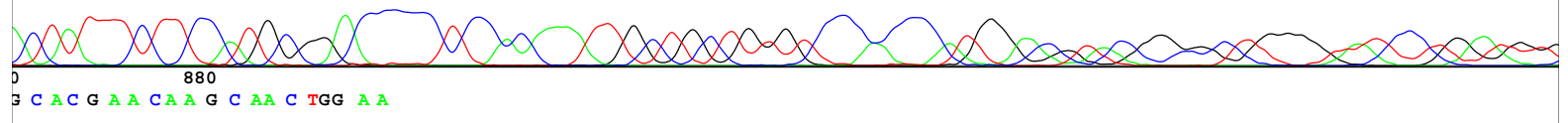
T G C A G C T T C C T T G T C C C T G A G C A A G T T C A C A G A G G A C C C C T G C A G C T A C T C T T T G G A T G T T T T C A A T G G G A G A A T A A A G C A G C T G C A C A



A A C A A T G G A A T G G T A T T T A G T C C C T C T G A T A A C A A T T C G G T T G T G A A C A T C C C G A G C T A G G A T G T G A A G G G C T C C G G T A C A A C C T T C A A



C T A T T T C T T C C A T G C G G A C C C C C T C C A C A A T T G C T G C T G T G T C C C A C C C A T G G A C G T A C C G G C G C T G G G G T A T C C T G A T G T C



G C A C G A A C A A G C A A C T G G A A

