

**Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in der
Leber von Connexin32-Knock-out- und Connexin32-
Wildtyp-Mäusen sowie in Mauslebertumoren mit
Mutationen im β -Catenin- bzw. Ha-ras-Onkogen**

Dissertation

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2004

vorgelegt von

Sabine Stahl

Tag der mündlichen Prüfung:

08.10.2004

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Schwarz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. K. W. Bock

Meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Schwarz im Zeitraum von Mai 2001 bis August 2004 angefertigt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. M. Schwarz** für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. K. W. Bock** danke ich für die Bereitschaft das Zweitgutachten für diese Dissertation zu übernehmen.

Danken möchte ich auch Herrn **Dr. A. Buchmann** für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft in allen Belangen und sein immer offenes Ohr für Fragen, Probleme und Diskussionen.

Bei Herrn **Dr. C. Köhle** bedanke ich mich sehr für die freundliche Unterstützung und insbesondere für die große Geduld bei der Lösung aller denkbaren Computertechnischen Fragen und Probleme.

Ein großes Dankeschön geht an Frau **J. Mahr**, Frau **E. Zabinski**, Frau **S. Vetter**, Frau **B. Kaltschmitt** und Frau **I. Voith** für ihre stete Hilfsbereitschaft in allen Belangen des Laboralltags.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau **Dr. C. Ittrich** von der zentralen Einheit für Biostatistik des DKFZ in Heidelberg für die sehr gute Zusammenarbeit und die intensiven Bemühungen um die statistischen Auswertungen, die sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

An Frau **Dr. Ö. Altug-Teber** aus der Microarray Facility in Tübingen geht mein Dank für eine exzellente Kooperation rund um die Affymetrix-Analysen.

Bei allen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen bedanken.

Besonderer Dank gilt **meinen Eltern, Hannelore und Peter Stahl**, für ihre große Unterstützung jeglicher Art nicht nur während dieser Dissertation.

Frank verdient Dank für so viele Dinge, nicht zuletzt dafür, dass er mir immer zur Seite stand, war das Problem auch noch so groß.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Mehrstufenkonzept der Krebsentstehung	1
1.2	Das Modell der Nagerleber	3
1.3	Tumorpromotion	4
1.4	<i>Gap junctional intercellular communication (GJIC)</i>	5
1.5	Struktur der <i>gap junctions</i>	6
1.6	Rolle der <i>gap junctions</i> im Prozess der Krebsentstehung.....	9
1.7	Wirkungsweisen von Phenobarbital.....	12
1.8	Der Ras-Signalweg	13
1.9	β -Catenin- und Wnt-Signalweg	15
1.10	Aufgabenstellung	16
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Biochemikalien und Chemikalien.....	18
2.2	Geräte	20
2.3	Sonstiges	21
2.4	Gewebe.....	21
2.4.1	Lebernorgewebe.....	21
2.4.2	Lebertumorgewebe.....	22
2.5	Primer.....	22
2.5.1	Primer für Genotypisierung	22
2.5.2	Primer für die Kontrolle der RNA-Integrität	22
2.5.3	Primer für LightCycler-PCR.....	23
2.6	Antikörper	24
2.7	Puffer und Lösungen.....	24
2.7.1	RT-PCR und PCR	24
2.7.2	Gelelektrophorese	25
2.7.3	Western-Blot	25
2.7.4	Filterhybridisierung nach Clontech.....	27
2.7.5	Subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis	27

2.8	Reagenziensets	28
2.9	Versuchstiere	28
2.9.1	Tierhaltung und Zucht	28
2.9.2	Behandlungen der Versuchstiere	29
2.9.3	Liste der Versuchsmäuse	30
2.10	RT-PCR, PCR und LightCycler-PCR	31
2.10.1	RT-PCR und PCR	31
2.10.1.1	Genotypisierung	33
2.10.2	LightCycler-PCR	35
2.11	Isolierung von Gesamt-RNA	37
2.12	PolyA-RNA Anreicherung	37
2.13	RNA-Quantifizierung	38
2.14	Filterhybridisierung nach Clontech	38
2.14.1	DNaseI-Verdau von Gesamt-RNA	39
2.14.2	Kontrolle der RNA-Integrität über RT-PCR	39
2.14.3	Synthese von radioaktiv markierter cDNA	40
2.14.4	Reinigung der radioaktiv markierten cDNA über <i>NucleoSpin[®]</i>	
<i>Extraction Spin Columns</i>	40	
2.14.5	Hybridisierung des <i>AtlasTM mouse 1.2 Arrays</i>	41
2.14.6	Strippen des <i>AtlasTM mouse 1.2 Arrays</i>	41
2.15	Subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis	42
2.15.1	cDNA-Synthese, Restriktionsverdau und Adapterligation	44
2.15.2	Ligationseffizienztest	44
2.15.3	Tester-Treiber-Hybridisierungen und die anschließende	
Amplifizierung differentieller cDNAs	44	
2.15.4	Subtraktionseffizienztest	45
2.16	<i>Screening</i> zur Bestätigung der differentiellen cDNAs	45
2.16.1	Klonierung der differentiellen cDNAs	46
2.16.2	Kolonie-PCR	46
2.16.3	cDNA-Array (<i>dot blot</i>)	47
2.16.4	Synthese von Subtraktions- und cDNA-Sonden	48
2.16.5	cDNA-Array-Hybridisierung	49

2.16.6	Sequenzierung und BLAST-Search	49
2.17	Genexpressionsanalysen mit der Methode der Affymetrix- Microarray-Technologie	49
2.17.1	Statistische Auswertung der Affymetrix-Genexpressionsanalysen ..	50
2.17.2	RNA-Clean up.....	51
2.18	Western-Blot	51
2.18.1	Proteinisolierung	51
2.18.2	Proteinbestimmung	51
2.18.3	SDS-Page	52
2.18.4	Blot.....	53
2.18.5	Antikörper-Inkubation	53
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Körper- und relatives Lebergewicht der Versuchsmäuse	55
3.2	Genotypisierung der Versuchsmäuse.....	58
3.3	Analytisches Agarosegel der Gesamt-RNA.....	58
3.4	Analytisches Agarosegel der RT-PCR zur Kontrolle der RNA- Integrität	59
3.5	Filterhybridisierung nach Clontech.....	60
3.5.1	Messwerte der radioaktiv markierten cDNA	61
3.5.2	Hybridisierung der <i>AtlasTM mouse 1.2 Arrays</i>	62
3.5.3	Auswertung der hybridisierten <i>AtlasTM mouse 1.2 Arrays</i>	63
3.6	Subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis	66
3.6.1	Überprüfung der Effizienz von Ligation und Subtraktion	67
3.6.2	<i>Screening</i> zur Bestätigung der differentiell exprimierten cDNAs	69
3.7	Genexpressionsanalysen mit der Methode der Affymetrix-Microarray- Technologie.....	73
3.7.1	Genexpressionsanalysen im Lebernorgewebe von PB- behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT- Mäusen	73
3.7.2	Genexpressionsanalysen im Lebertumorgewebe von Cx32-WT- Mäusen im Vergleich zum Lebernorgewebe	86

4	Diskussion	92
4.1	Einordnung des Projekts	92
4.2	Versuchstiere (Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäuse)	93
4.3	Differentielle Genexpression im Lebernorgewebe von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen	93
4.3.1	Vergleich der eingesetzten Methoden	93
4.3.2	Ergebnisse der eingesetzten Methoden	95
4.4	Differentielle Genexpression im Lebertumorgewebe von Cx32-WT- Mäusen	99
5	Zusammenfassung	110
6	Literaturverzeichnis	112
7	Anhang	124
7.1	Filterpositionen der immobilisierten cDNAs auf dem <i>AtlasTM mouse</i>	
	<i>1.2 Array</i>	124
7.2	Tabellarische Darstellung der in Lebertumorgewebe gegenüber dem	
	Normalgewebe von Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimierten	
	Gene.....	124
8	Lebenslauf	134
9	Akademische Lehrer	135

Abkürzungen

Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
CP	<i>Crossing point</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
Cx	Connexin
CYP	Cytochrom P450
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEN	Diethylnitrosamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridindidiphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GJIC	<i>Gap junctional intercellular communication</i>
Ha-ras	<i>Harvey-ras</i>
Hepes	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
i.p.	Intraperitoneal
kb	Kilobasen
KN	Knock-out
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenindinukleotid
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenindinukleotid-Phosphat
PB	Phenobarbital
PBREM	<i>PB-responsive enhancer modul</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rotation per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RXR	Retinsäure-X-Rezeptor
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N''-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	<i>Volume per volume</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Das Mehrstufenkonzept der Krebsentstehung

Erfahrungen beim Menschen sowie tierexperimentelle Studien zeigen, dass es sich bei der Krebsentstehung um einen äußerst komplexen Prozess handelt, der beim Menschen 20-30 Jahre dauern kann. Zahlreiche Experimente belegen (Berenblum, 1941a und b; Berenblum und Shubik, 1947; Rous und Kidd, 1941; Friedewald und Rous, 1944; Mottram, 1944), dass sich hierbei normale Körperzellen in der Regel nicht unmittelbar in maligne Zellen umwandeln. Die Tumorentwicklung läuft vielmehr in einem mehrstufigen Prozess ab, der sich meist über einen großen Teil der Lebenszeit eines Individuums erstreckt. Nach dem Mehrstufenmodell der Krebsentstehung (siehe Abbildung 1) entstehen hierbei zunächst Tumorstadiumsvorläuferzellen (Zwischenzellpopulationen), die in zunehmendem Maße vom Phänotyp der Ausgangszelle abweichen (Moolgavkar und Knudson, 1981; Moolgavkar, 1983). Neue Zell-Phänotypen, die sich durch erhöhte Malignität auszeichnen, entstehen dabei jeweils innerhalb der vorausgegangenen Zwischenzellpopulationen. Ein wesentliches Element dieses Mehrstufenkonzeptes ist die Annahme, dass die sich schrittweise entwickelnden malignen Zellpopulationen jeweils aus Einzelzellen hervorgehen. Das bedeutet somit, dass jede dieser Zellpopulationen einen Klon identischer Zellen bildet („klonale Genese“ der Tumoren).

Zu Beginn der Krebsentstehung steht die Initiation, von der als gesichert angenommen werden kann, dass sie in vielen Fällen durch Veränderung der Erbinformation erfolgt. Hierunter versteht man Mutationen auf der Ebene der DNA, der Chromosomen oder des Genoms. Solche Mutationen können den betroffenen initiierten Zellen einen Selektionsvorteil verschaffen und damit die Basis für deren klonale Expansion schaffen. Der Initiation folgt die Promotionsphase. Die Tumorpromotion wird definiert als Prozess, der die Entstehung eines Tumors nach vorheriger Initiation beschleunigt und verstärkt (Boutwell, 1974). Der Verlauf der Promotion erstreckt sich stets über einen längeren Zeitraum, der Wochen, Monate oder Jahre einnehmen kann. Es kommt dabei zu einer selektiven Vermehrung der initiierten Zellen, zu einer

Vergrößerung der Zellklone aus Tumorvorläuferzellen, zur Bildung gutartiger Tumoren und schließlich zu einem erhöhten Risiko zur Progression hin zum malignen Tumor.

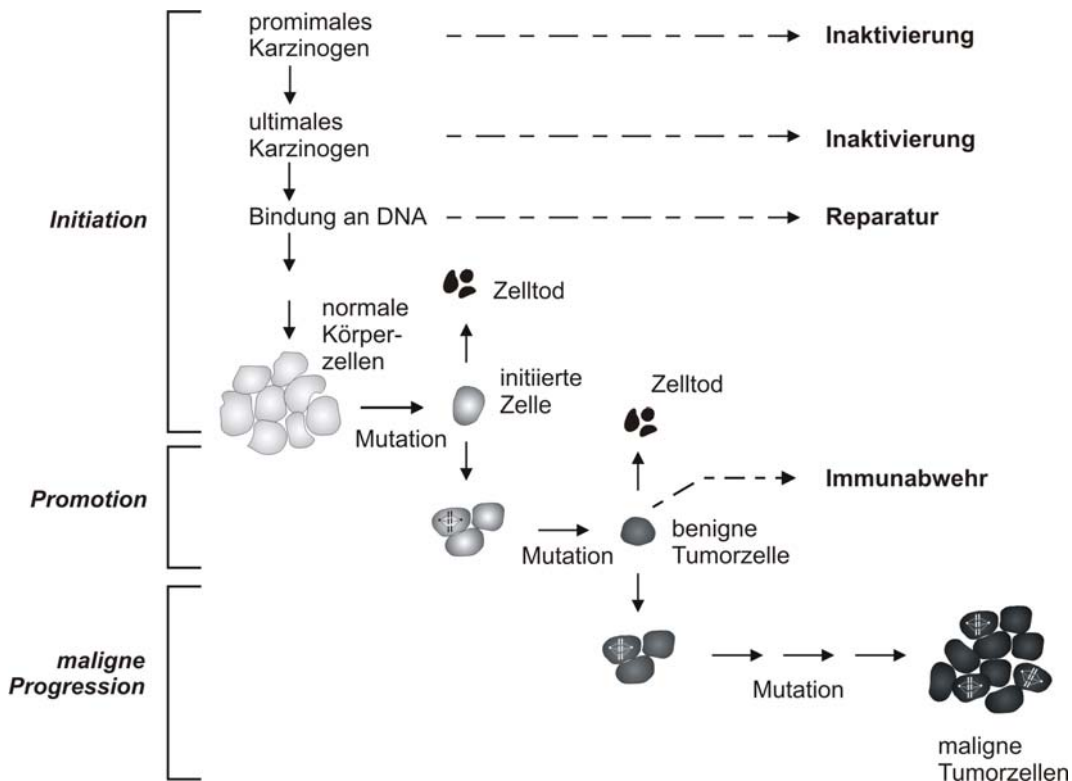


Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese. In der Initiation ist die bei einigen Kanzerogenen notwendige metabolische Aktivierung der an sich unwirksamen Ausgangssubstanz (proximales Kanzerogen) zum eigentlich wirksamen Agens (ultimales Kanzerogen) aufgeführt. Neben der Apoptose sind ferner die metabolische Inaktivierung, DNA-Reparatur und Immunabwehr als weitere Mechanismen zur Tumorabwehr integriert (verändert nach Schwarz und Bock, 1998).

Die Initiation (Übergang von der Normalzelle in die Tumorvorläuferzelle), die Konversion (Übergang von der Tumorvorläuferzelle in die Tumorzelle) und die Progression (schrittweise Malignisierung der Tumorzellpopulation hin zum manifesten malignen Tumor) werden von Mutationsereignissen in tumorassoziierten Genen geprägt. Gene, die durch Mutationsereignisse eine Bedeutung im Verlauf der Krebsentstehung besitzen, werden als Protoonkogene und

Tumorsuppressorgene bezeichnet. Für ein Protoonkogen, das durch Mutation zum Onkogen wird, bedeutet das, dass es den bestehenden Kontrollmechanismen entzogen wird und damit daueraktiv bleibt. Diese Veränderung ist dominant, da es meist ausreicht, wenn nur ein Allel der Zelle betroffen ist. Ein Beispiel für ein Protoonkogen ist Ha-ras, das eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der Zelle spielt (McCormick, 1993; Maronpot et al., 1995). Für die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene müssen meist beide Allele betroffen sein. Ein Tumorsuppressorgen ist zum Beispiel das p53, das an bestimmten Punkten des Zellzyklus eine entscheidende Bedeutung hat und damit relevant für die Tumorentstehung ist (Vousden und Lu, 2002).

Die Wahrscheinlichkeit einer Mutation steht in direktem Zusammenhang mit der Zellteilungsrate: Je höher die Zellteilungsrate ist, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten einer Mutation. Ferner ist bei dem ganzen Geschehen das Proliferationsverhalten der Zwischenzellpopulationen ausschlaggebend, wobei unter Proliferation hier die Nettozuwachsrate (definiert über Teilungs- und Absterberaten der zugrundeliegenden Zellpopulationen) dieser Zellen zu verstehen ist.

Das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Faktoren prägt somit den langandauernden Prozess der Kanzerogenese, indem es das Ausmaß der transformierten Zellpopulationen und damit die Wahrscheinlichkeit der Krebsentstehung entscheidend beeinflusst.

1.2 Das Modell der Nagerleber

In der Krebsforschung hat sich die Nagerleber als ein sehr geeignetes Modell erwiesen, um den Prozess von spontan oder chemisch induzierter Kanzerogenese genauer zu untersuchen. Die Gabe von chemischen Kanzerogenen führt in der Leber zu präneoplastisch veränderten Zellen, die als „Herde“ oder „Foci“ bezeichnet werden. Diese Foci zeigen eine veränderte Expression und Aktivität bestimmter Enzyme, was eine veränderte Anfärbecharakteristik dieser Zellen zur Folge hat. Darüber hinaus zeichnen sich diese Zellen durch einen monoklonalen Ursprung aus und ihr verändertes Wachstumsverhalten stellt einen geeigneten Angriffspunkt für Substanzen mit promovierenden Eigenschaften dar. Foci

besitzen einen veränderten Differenzierungsstatus (Phänotyp) gegenüber dem Normalgewebe und können als Vorläufer der eigentlichen Tumoren verstanden werden (zur Übersicht siehe Schulte-Hermann, Marian und Bursch in Marquardt und Schäfer, 1994). Sie können sowohl Glykogenspeicherung aufgrund von Veränderungen von Schlüsselenzymen des Kohlenhydratstoffwechsels zeigen, als auch eine Veränderung der Expression von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen aufweisen (Bannasch et al., 1980; Buchmann et al., 1992). Als Beispiele wären hierbei die Glukose-6-Phosphatase zu nennen, die durch ihre verminderte Expression in Tumoren einen häufig eingesetzten Tumormarker darstellt und verschiedene Cytochrom P450-Enzyme, die hier ebenfalls vermindert exprimiert werden. Im Gegensatz dazu werden Phase-II-Enzyme, wie die Glutathion-S-Transferase P, in den Foci verstärkt exprimiert gefunden (Buchmann et al., 1987; Pitot, 1990).

1.3 Tumorpromotion

Der Prozess der Tumorpromotion beschreibt die klonale Expansion der initiierten Tumorstromazellen und ist häufig mit Enzyminduktion und Wachstum verbunden. Aber auch Gewebeschäden in dem jeweiligen Erfolgsorgan können die Ursache sein. Es wird angenommen, dass tumormpromovierende Verbindungen keine Genschädigungen und Genmutationen induzieren können.

Viele tumormpromovierende Substanzen zeigen die Eigenschaft einer weitgehenden Organspezifität, während die Initiation oft in mehreren Organen gleichzeitig erfolgen kann. Aufgrund dieser Spezifität können Tumorstromatoren das Zielorgan einer kanzerogenen Einwirkung determinieren (zur Übersicht siehe Schulte-Hermann, Marian und Bursch in Marquardt und Schäfer, 1994). Östrogene z.B. können in hohen Dosen die Entstehung von Mamma-Tumoren bedingen. Das Auftreten der Östrogen-bedingten Tumoren wurde aber nur dann beobachtet, wenn bereits eine Vorbelastung oder Anlage für die Krebsentstehung bestand. Von dem Tumorstromotor Phenobarbital (PB), einem Antiepileptikum, konnte gezeigt werden, dass dieser in der Leber und der Schilddrüse nach gesetzter Initiation mit z. B. dem Kanzerogen Diethylnitrosamin (DEN) Krebsentstehung promoviert. Einen Hinweis darauf, wie dieser Prozess möglicherweise

verläuft, gaben Experimente, bei denen gezeigt werden konnte, dass leberspezifische Tumorpromotoren wie PB und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) Apoptose von transformierten Zellen zu unterbinden vermögen. Diese Inhibierung trägt dazu bei, dass präneoplastisch-veränderte Hepatozyten-Zellpopulationen in die Lage versetzt werden, sich ungehemmt zu vermehren (Bursch et al., 1992; Stinchcombe et al., 1995). Nach welchem Mechanismus diese Inhibierung der Apoptose verläuft, konnte noch nicht im Detail geklärt werden. Eine Hypothese, die in diesem Zusammenhang diskutiert wird, ist eine durch Tumorpromotoren hervorgerufene Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation, die über so genannte *gap junctions* vermittelt wird (Loewenstein, 1990; Yamasaki, 1991; Ren und Ruch, 1996; Ito et al., 1998).

1.4 *Gap junctional intercellular communication (GJIC)*

Das Überleben eines vielzelligen Organismus hängt von jedem einzelnen Zelltyp und dessen Fähigkeit ab, mit anderen Zellen koordiniert in Wechselwirkung zu treten. Der Organismus hat hierfür viele Strategien entwickelt, um dieses Ziel optimal zu erreichen. Darunter fallen Interaktionen, die mittels neuronaler oder endokriner Mechanismen über eine weite Entfernung vermittelt werden bzw. Interaktionen, die auf direkten physikalischen oder Zell-Zell Kontakten basieren. Ein Beispiel für diese direkte Kommunikation zwischen Zellen ist der Austausch von Molekülen über spezifische Kanäle, die Bestandteil der äußeren Plasmamembran sind und als *gap junctions* bezeichnet werden. Diese *gap junctions* unterscheiden sich von anderen Membrankanälen unter anderem dadurch, dass sie zwei Nachbarzellen miteinander verbinden, relativ unspezifisch sind und den Transfer von Molekülen durch die Kanäle ATP-unabhängig über passive Diffusion erlauben. Eine scheinbare Selektivität dieser Kanäle existiert lediglich in Bezug auf die Größe der Moleküle, die den Kanal passieren können. Nur Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 1.200 Dalton, wie z. B. cAMP, Inositoltriphosphat und Calcium, können durch den Kanal gelangen. Substanzen wie Proteine und Nukleinsäuren sind davon ausgeschlossen (Loewenstein, 1981). Dieser Austausch von Molekülen zwischen Zellen über *gap junction*-Kanäle wird als *gap junctional intercellular communication* (GJIC)

bezeichnet. Unter anderem ermöglicht die GJIC somit eine Weitergabe von hormonellen Signalen über den Transfer von *second messenger*, dient aber auch z.B. der Weiterleitung elektrischer Signale, wie sie in der Herzmuskulatur oder der glatten Muskulatur von Bedeutung ist (Loewenstein, 1981). Im allgemeinen kommunizieren die meisten Zellen in normalen Geweben über *gap junctions*. Es gibt nur wenige Ausnahmen, wie Skelettmuskelzellen, bestimmte Neuronen und zirkulierende Blutzellen (zur Übersicht siehe Kumar und Gilula, 1996).

1.5 Struktur der *gap junctions*

Gap junctions bestehen in der Regel aus einer lokalen Anhäufung von Membrankanälen, die einen direkten Übergang von einer Zelle in die benachbarte Zelle schaffen und so das Zytoplasma angrenzender Zellen miteinander verbinden. Das grundlegende Strukturelement der *gap junctions* ist ein Membranprotein, das als Connexin (Cx) bezeichnet wird. Die Zusammenlagerung von sechs Connexinen ergibt einen Halbkanal, der als Connexon bezeichnet wird (zu diesen und den folgenden Ausführungen siehe Abbildung 2). Das in die Membran eingelagerte Connexon einer Zelle assoziiert mit dem korrespondierenden Connexon der Nachbarzelle und bildet somit einen funktionsfähigen *gap junction*-Kanal über den Interzellularraum hinweg. Viele dieser Kanäle wiederum aggregieren und bilden sogenannte *gap junctions plaques* in der äußeren Plasmamembran. *Gap junctions* haben relativ kurze Halbwertszeiten von ein bis drei Stunden (Laird et al., 1991). Man geht davon aus, dass die *gap junctions* in Abhängigkeit von ihrer Phosphorylierung in eine der beiden Zellen aufgenommen und lysosomal abgebaut werden (Qin et al., 2003).

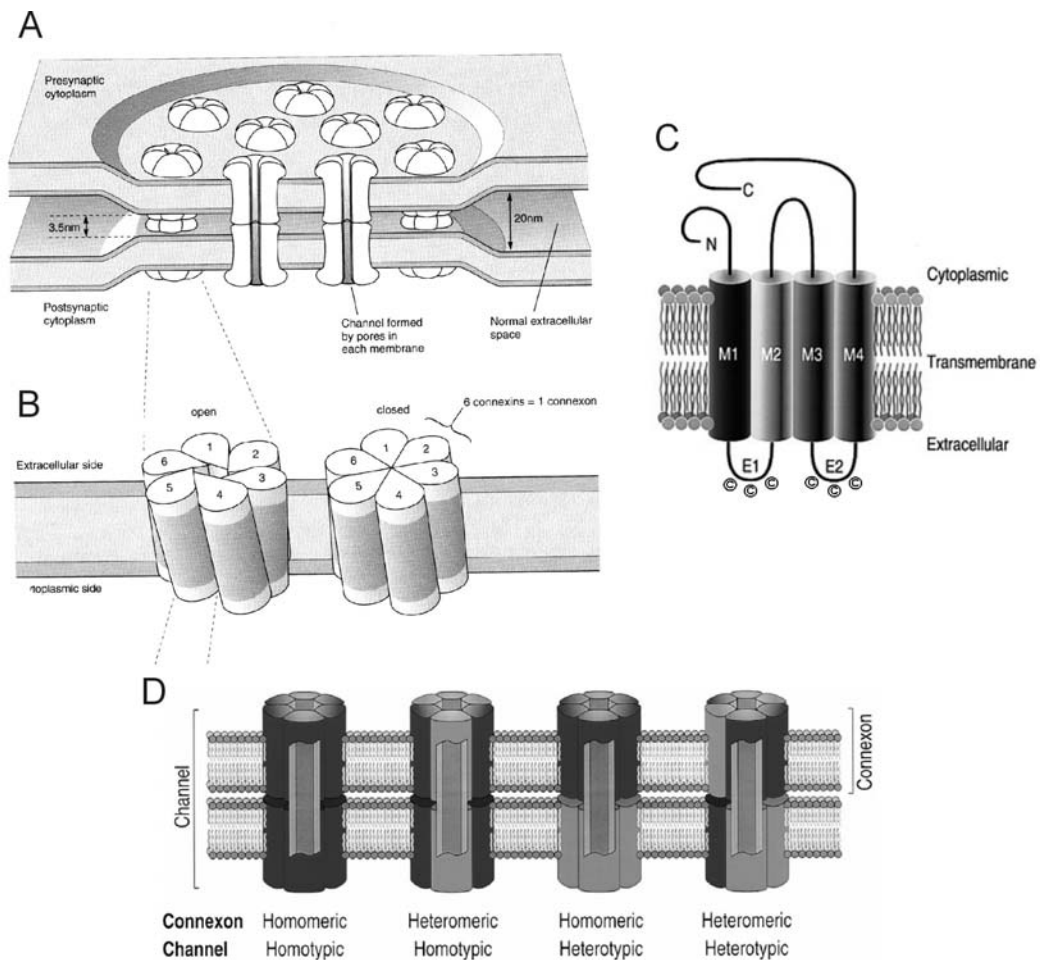


Abbildung 2: Connexin, Connexon und *gap junction*-Kanal; A) Ein in die Membran eingelagerter Halbkanal (Connexon) assoziiert mit dem korrespondierenden Connexon der Nachbarzelle und bildet einen funktionsfähigen *gap junction*-Kanal. Ein Connexon ist aufgebaut aus 6 Untereinheiten, die als Connexine bezeichnet werden (Willecke et al., 2002). B) Die 6 Connexin-Untereinheiten eines Connexons können koordiniert die Konfiguration ändern um den Halbkanal zu öffnen und zu schließen (Willecke et al., 2002). C) Schematische Darstellung der Struktur eines Connexinmoleküls mit 4 Transmembrandomänen (M1-M4) und 3 Schlaufen. Die Schlaufen zwischen der ersten und zweiten sowie zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne sind extrazellulär (E1 und E2). Jede dieser Domänen besitzt 3 konservierte Cysteinreste (Kumar und Gilula, 1996). D) Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Connexone für die Bildung eines funktionsfähigen *gap junction*-Kanals. Connexone können homomer (gleiche Connexin-Untereinheiten) oder heteromer (mehr als eine Isoform von Connexinen) sein und die *gap junction*-Kanäle können homotypisch (identische Connexone) oder heterotypisch (unterschiedliche Connexone) sein (Kumar und Gilula, 1996).

Die Connexine falten sich in der äußeren Plasmamembran in der Form eines „M“. Der Amino- und der Carboxyterminus befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite, der übrige Teil des Moleküls durchspannt viermal die Plasmamembran. Diese membrandurchspannenden Regionen, bezeichnet als M1-M4, sind parallel zueinander angeordnet. Im Unterschied zu M1, M2 und M4 zeichnet sich die Region M3 durch einen hohen Gehalt an hydrophilen Aminosäuren aus. Diese Aminosäuren geben bei der Bildung der Connexone aus den Connexinen der Innenseite des *gap junction*-Kanals ihren hydrophilen Charakter. Beim Vergleich der verschiedenen Arten der Connexine stellte sich heraus, dass die vier membrandurchspannenden Domänen und die extrazellulären Schleifen stark konserviert sind, während die zytoplasmatischen Regionen eine große Variabilität aufweisen. Von den konservierten Sequenzen wird angenommen, dass sie für die vergleichbaren Eigenschaften der Kanäle, z.B. die Permeabilität für relativ große Moleküle, verantwortlich sind. Die variablen Sequenzen, wie z.B. die zytosolische Schleife, können durch verschiedene Proteinkinasen (u. a. Proteinkinase A, Proteinkinase C und Tyrosinkinase Src) phosphoryliert werden und bieten somit einen Angriffspunkt für unterschiedliche Mechanismen, die die Durchlässigkeit der *gap junctions* regulieren (zur Übersicht siehe White et al., 1995; Trosko und Ruch, 1998; Takeda et al., 1989; Cruciani und Mikalsen, 2002).

Die Connexine werden von einer Multigenfamilie kodiert. Bis heute sind 17 verschiedene Connexingene im Mausgenom beschrieben und die meisten von diesen sind auch im menschlichen Genom gefunden worden (White and Paul, 1999; Manthey et al., 1999; Teubner et al., 2001). Im Laufe der Zeit haben sich zwei alternative Nomenklatorsysteme durchgesetzt. Das eine klassifiziert die Connexine nach ihren molekularen Massen, das andere wählt hierfür griechische Buchstaben. Die griechische Nomenklatur teilt die Connexine in zwei Klassen, α und β , ein, basierend auf Sequenzähnlichkeiten (Kumar und Gilula, 1992).

Connexine werden zell-, gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert. So tritt z.B. Cx43 vor allem im Herzmuskel auf (Beyer et al., 1987), wohingegen Cx32 und Cx26 hauptsächlich in der Leber nachzuweisen sind (Kumar und Gilula, 1986). Trotz der konservierten Sequenzen innerhalb der Connexine beruht die Vielfältigkeit dieser Proteine nicht auf einem alternativen *Splicen* der RNAs.

Vielmehr scheint es für jedes Connexin ein eigenes Gen zu geben. Für viele dieser Gene konnte gezeigt werden, dass sie auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Willecke et al., 1990). Bei dem Gen, das für das Cx32 kodiert, handelt es sich um ein auf dem X-Chromosom lokalisiertes Gen.

Die verschiedenen Isoformen der Connexine können in vielen unterschiedlichen Kombinationen miteinander assoziieren (siehe Abbildung 2):

homomeres Connexon:

zusammengesetzt aus einer Art von Connexinen

heteromeres Connexon:

zusammengesetzt aus mehreren verschiedenen Arten von Connexinen

homotypischer *gap junction*-Kanal:

zusammengesetzt aus zwei einheitlichen Connexonen

heterotypischer *gap junction*-Kanal:

zusammengesetzt aus zwei unterschiedlichen Connexonen

Die Triebkraft zur Bildung eines funktionsfähigen *gap junction*-Kanals aus zwei Connexonen geht dabei von den beteiligten Connexinen aus. So können bestimmte Connexine mit einigen Arten von Connexinen funktionsfähige Kanäle bilden, mit anderen dagegen nicht (Bruzzone et al., 1996).

Es wird davon ausgegangen, dass verschieden aufgebaute *gap junctions* auch unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf Permeabilität und Regulation zeigen. Auf diese Weise eröffnen sich regulatorische Möglichkeiten in Bezug auf die verschiedenen Signale, die einen *gap junction*-Kanal passieren. Mit zahlreichen Experimenten konnte diese Annahme belegt werden (Jiang und Goodenough, 1996; König und Zampighi, 1995; Traub et al., 1989; White et al., 1995).

1.6 Rolle der *gap junctions* im Prozess der Krebsentstehung

Den *gap junctions* wird eine Reihe von bedeutenden physiologischen Funktionen zugeordnet. So nehmen sie eine wichtige Rolle in der Kontrolle des normalen Wachstums und der Differenzierung ein (Pitts und Finbow, 1986; Loewenstein, 1981; Klaunig und Ruch, 1990).

Die Hypothese zur Wachstumskontrolle nach Loewenstein (1981) basiert auf der Annahme, dass Signalstoffe über *gap junctions* übertragen werden, die regulatorisch in die Wachstumskontrolle eingreifen. Wird diese über *gap junctions* vermittelte Kommunikation aus irgendwelchen Gründen unterbrochen, so kann es zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen kommen und damit im Extremfall zur Entstehung von Krebs.

Schon seit längerem geht man von der Annahme aus, dass der Verlust der GJIC eine entscheidende Rolle im Prozess der Kanzerogenese spielt (zur Übersicht siehe Mesnil, 2002; Naus, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Connexine in Tumorgewebe in niedriger Zahl exprimiert werden (Janssen-Timmen et al., 1986; Krutovskikh et al., 1991; Neveu et al., 1994) oder intrazellulär aberrant lokalisiert sind (Krutovskikh et al., 1994). Ferner wurde nicht nur im Tierexperiment, sondern auch bei humanen Leberkarzinomen eine signifikante Abnahme von Cx32 beobachtet (Krutovskikh et al., 1994; Yamaoka et al., 1995). Eine Überexpression von Connexinen führt dagegen zu einer Hemmung der Tumorentwicklung (Rose et al., 1993; Yano et al., 2001).

In Zusammenhang mit der Unterdrückung der GJIC werden auch Proteine einiger Onkogene (u.a. Ha-ras, Raf, pp60^{src}) gebracht, wobei diskutiert wird, dass sie durch Phosphorylierung des Connexins die GJIC negativ beeinflussen können (Beer et al., 1988; Loo et al., 1995; zur Übersicht siehe Trosko und Ruch, 1998).

Eine negative Regulation von Connexinen wurde auch in Normalgewebe beobachtet, nachdem es mitogenen Reizen, wie z. B. partielle Hepatektomie, ausgesetzt wurde (Traub et al., 1983). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Verminderung der GJIC proliferative Prozesse ermöglicht. Hierfür spricht ebenfalls die Beobachtung, dass Hepatozyten in der Leber von Cx32-Knock-out (KN)-Mäusen eine etwa 10-fach gesteigerte Zellteilungsrate aufweisen (Temme et al., 1997). Bei den Mäusen mit dem Cx32-Gendefekt konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass hier die Wahrscheinlichkeit der Entstehung chemisch induzierter Lebertumoren erhöht ist (Moennikes et al., 1999; Temme et al., 1997). Einer der bedeutendsten Hinweise auf die Beteiligung der GJIC an der Krebsentstehung war die Entdeckung, dass Tumorpromotorsubstanzen in der

Lage sind, die Kommunikation über *gap junction*-Kanäle zu unterdrücken (Klaunig, 1991; Budunova und Williams, 1994).

Es gibt mindestens zwei Mechanismen, wie Tumorpromotoren die GJIC beeinflussen können. Zum einem können sie mit Signalwegen in der Zelle interferieren, die zu einer direkten Blockade der GJIC führen, wie z.B. durch posttranslationale Modifikation der Connexine, was eine Fehllokalisation zur Folge haben könnte, oder durch Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels (Bruzzone et al., 1996; Yamasaki und Naus, 1996). Eine andere Möglichkeit wäre die Modifikation auf der Ebene der Transkription bzw. der Translation von *gap junction*-Proteinen. Hierzu konnte bei Behandlung mit verschiedenen Lebertumorpromotoren eine Abnahme des Expressionslevels von Connexinen nachgewiesen werden (Krutovskikh et al., 1991; Neveu et al., 1994; Sugie et al., 1987).

Über welchen Mechanismus die GJIC die Proliferation transformierter Zellen beeinflussen kann, konnte bis heute noch nicht geklärt werden. Dennoch werden hierbei zwei verschiedene Arten der Zell-Zell-Kommunikation in Betracht gezogen, die als homologe und heterologe GJIC bezeichnet werden. Homologe GJIC steht für die Kommunikation ähnlicher Zellen, d.h. normaler bzw. transformierter Zellen untereinander. Unter heterologer GJIC versteht man dagegen die Kommunikation zwischen transformierten Zellen und den umliegenden Normalzellen. Selbst wenn transformierte Zellen über homologe GJIC in der Lage sind, untereinander Signale auszutauschen, kann der Verlust der heterologen GJIC zwischen den transformierten Zellen und den umliegenden Normalzellen zu einer Störung der Wachstumskontrolle führen (zur Übersicht siehe Yamasaki und Naus, 1996). Durch den Verlust der heterologen GJIC sind präneoplastische und neoplastische Zellen somit von den umliegenden Normalzellen abgekoppelt und damit nicht mehr zugänglich für Signale, die von den umliegenden Normalzellen ausgehen (Yamasaki, 1990). Auch die promovierende Eigenschaft der Tumorpromotoren in Bezug auf die Tumorentwicklung kann in der Inhibierung der heterologen GJIC begründet liegen.

1.7 Wirkungsweisen von Phenobarbital

Das Barbiturat PB zeigt unterschiedlichste Effekte auf zahlreiche zelluläre Prozesse in der Leber, wie Wachstum, Apoptose und Kommunikation, und hat als klassischer Tumorpromotor Bedeutung bei der Tumorentstehung. Neben seiner Wirkungsweise als Tumorpromotor spielt PB auch eine Rolle im Fremdstoffmetabolismus, da es in der Lage ist, zahlreiche Fremdstoffmetabolisierende Enzyme zu induzieren, wie Cytochrom P450-Enzyme und Transferasen (Zelko und Negishi, 2000; zur Übersicht siehe Honkakoski und Negishi, 2000). Die stärkste Induktion zeigt sich dabei bei den CYP2B-Genen, bei denen auch die ersten „*PB response elements*“ gefunden worden sind. Diese *PB response elements* werden als *PB-responsive enhancer modul* PBREM bezeichnet und stellen eine 51 bp lange DNA-Sequenz dar (Honkakoski und Negishi, 1997). Die PBREM Sequenzen sind konserviert in Maus-, Ratte- und Mensch-CYP2B-Genen (Zelko und Negishi, 2000; Sueyoshi et al., 1999).

Der Rezeptor, der an PBREM bindet und die PB induzierte Genexpression vermittelt, wird als CAR (*constitutive androstane receptor*) bezeichnet (Kawamoto et al., 1999; Wei et al., 2000; Honkakoski und Negishi, 2000; Zelko und Negishi, 2000). PB induziert die Translokation von CAR in den Nukleus, woraufhin CAR als Heterodimer mit dem Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) an die PBREM Sequenz bindet und die Transkription der Zielgene bewirkt (zur Übersicht siehe Honkakoski und Negishi, 2000; Waxman, 1999). In einer Genexpressionsstudie mit Lebergewebe von PB-behandelten CAR-KN- und CAR-Wildtyp (WT)-Mäusen zeigte sich, dass auch Gene unabhängig von CAR durch PB reguliert werden können (Ueda et al., 2002).

Welchem Mechanismus die Tumorpromotion durch PB folgt ist unklar, aber möglicherweise sind hierzu Hinweise auf transkriptioneller Ebene zu finden, wie eine durch PB veränderte Genexpression bestimmter Gene.

PB ist einer von vielen Tumorpromotoren, die in der Lage sind, die über *gap junctions* vermittelte Kommunikation zu unterdrücken, wobei bis heute unklar ist, welcher Mechanismus dieser Wirkung zugrunde liegt (zur Übersicht siehe Yamasaki und Naus, 1996; Trosko und Ruch, 1998; Warner et al., 2003). Einen Hinweis gibt möglicherweise der Befund, dass es in Cx32-WT-Mäusen nach

Initiation mit DEN und anschließender Behandlung mit PB zu einer Tumorpromotion in Form eines signifikant erhöhten Anteils an neoplastisch veränderten Läsionen in der Leber kommt, wohingegen dies bei gleichbehandelten Cx32-KN-Mäusen nicht der Fall ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass das *gap junction*-Protein für die Tumorpromotion durch PB relevant ist. Ferner zeigte sich, dass ca. 80 % der Tumore von PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen eine verminderte oder fehlende Cx32-Membranlokalisation aufweisen, was Ursache der Promotionswirkung sein könnte (Moennikes et al., 2000).

DEN-induzierte Lebertumoren in der Maus zeigen häufig Mutationen sowohl im Ha-ras- als auch im β -Catenin-Gen, was aufgrund der Bedeutung dieser Gene in bestimmten Zellsignalwegen relevant für die Tumorenstehung sein könnte (nähere Erläuterungen siehe 1.8 und 1.9). Die Promotionswirkung von Tumorpromotoren wie PB könnte hierbei das Wachstum von Zellen, die in bestimmten Genen mutiert sind, begünstigen.

In Lebertumoren von PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen konnten zu 80 % β -Catenin-Mutationen nachgewiesen werden, wohingegen diese in Tumoren der unbehandelten Cx32-WT-Gruppe nicht zu beobachten waren. Im Gegensatz dazu wurden Ha-ras-Mutationen nur in Lebertumoren von unbehandelten Cx32-WT-Mäusen festgestellt. Diese signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von Ha-ras- und β -Catenin-Mutationen in Lebertumoren von PB-behandelten und unbehandelten Mäusen führten zu der Annahme, dass PB durch eine Selektion für β -Catenin-mutierte Zellen bei gleichzeitiger Unterdrückung von Ha-ras-mutierten Zellen promovierend wirkt (Aydinlik et al., 2001).

Wie oben erwähnt zeigen auch ca. 80 % der Tumore von PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen kaum oder kein Cx32. Das entspricht somit dem selben Anteil der Tumore, die β -Catenin-mutiert sind. Diese Befunde könnten möglicherweise auf einen Zusammenhang zwischen GJIC, β -Catenin und der Promotionswirkung von PB hindeuten.

1.8 Der Ras-Signalweg

Auf der Suche nach möglichen Erklärungen für das gestörte Wachstumsverhalten von Tumorzellen erhärten sich die Hinweise, dass diese Veränderung

möglicherweise auf Mutationen in Genen zurückzuführen sind, die eine entscheidende Rolle in der Wachstumsregulation spielen. Zu diesen aktivierten Protoonkogenen gehört unter anderem das Ha-ras-Gen, das in Mauslebertumoren häufig als mutiert nachgewiesen werden konnte (Wiseman et al., 1986; Reynolds et al., 1986; Buchmann et al., 1991). Es zeigte sich, dass eine Aktivierung von Mitgliedern der Ras-Genfamilie, wie Ha-ras, Ki-ras und N-ras, über Punktmutationen im Codon 12, 13 oder 61 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Tumoren in Mensch und Tieren spielt (zur Übersicht siehe Balmain und Brown, 1988). So konnte beobachtet werden, dass aktiviertes Ras in transformierten Maus-Hepatozyten zur Unterdrückung der Apoptose führt (Frey et al., 2000). In der Nagerleber sind Mutationen im Codon 61 des Ha-ras-Gens am häufigsten (Buchmann et al., 1989). In menschlichen Tumoren wie Dickdarm-Pankreas- und Schilddrüsentumoren konnten dagegen Mutationen im Codon 12, 13, 59 oder 61 nachgewiesen werden (Bos, 1989).

Das Ras-Protein ist ein niedermolekulares GTP-bindendes (G-) Protein, das Teil einer Signaltransduktionskaskade ist, zu der unter anderem auch Raf, ERK (*extracellular regulated kinase*), MEK (MAPK/ERK Kinase) und RTK (Rezeptor-Tyrosin-Kinase) gehören. Der Aktivierungsstatus von Ras-Proteinen ist davon abhängig, ob sie GTP (aktives Ras) oder GDP (inaktives Ras) gebunden haben. In normalen Zellen wird die Aktivität von Ras über das Verhältnis von gebundenem GTP zu GDP reguliert. Meist liegt Ras aber in der Zelle in der inaktiven GDP-gebundenen Form vor. Aktives Ras kann durch GTP-Hydrolyse unter Beteiligung des *GTPase-activating protein* GAP wieder in seinen inaktiven Status zurückversetzt werden. Wie gezeigt werden konnte wird gebundenes GTP von Ras-Proteinen, bei denen eine Mutation im Codon 12, 13 oder 61 nachzuweisen ist, nicht hydrolysiert. Dieses Phänomen erklärt, warum diese Mutationen zu einer Daueraktivierung des Ras-Proteins führen können und damit ihre Bedeutung bei der Krebsentstehung erhalten.

In normalen Zellen kommt es nach Stimulierung verschiedener Rezeptoren zu einem verstärkten Nukleotid-Austausch bei Ras, wobei GDP durch GTP ersetzt wird und damit Ras aktiviert wird. GTP-gebundenes Ras ist daraufhin in der Lage, Proteine zu binden und zu aktivieren, wie z. B. die Protein Serin/Threonin-Kinase

Raf, Type 1 Phosphatidylinositol-3-Kinase und Phospholipase C ϵ . Diese können ihrerseits wiederum Proteine aktivieren, woraus sich vielverzweigte Signalkaskaden ergeben, die unter anderem zur transkriptionellen Aktivierung zellwachstumsrelevanter Gene führen, wie den D-Typ Cyclinen (zur Übersicht siehe Downward, 2003).

1.9 β -Catenin- und Wnt-Signalweg

Das β -Catenin Protein wurde ursprünglich als ein Bindungspartner von E-Cadherin und α -Catenin identifiziert. Im Komplex mit diesen Proteinen gewährleistet es sowohl die Verbindung benachbarter Zellen miteinander als auch die Interaktion mit Aktin als Teil des Zytoskeletts.

β -Catenin spielt aber auch eine bedeutende Rolle im sogenannten Wnt/Wingless Signalweg, bei dem es nach Bindung des Glykoproteins Wnt an den Frizzled-Rezeptor zu einer Stabilisierung des β -Catenins kommt, was die Aktivierung von Zielgenen über Bindung des Transkriptionsfaktors TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) zur Folge hat. Zu den Zielgenen gehören unter anderem c-myc und Cyclin D1. In Abwesenheit von Wnt wird der β -Catenin-Gehalt über Phosphorylierung an bestimmten Serin/Threonin-Resten am N-terminalen Ende negativ reguliert. Die Phosphorylierung wird von der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β in einem Komplex unter anderem aus Axin 1 und APC-Protein (*adenomatous polyposis coli*) katalysiert. Dies führt zur Ubiquitinierung und anschließend zum proteosomalen Abbau des β -Catenins. In Tumoren konnte beobachtet werden, dass Mutationen in einer der Komponenten, die für den Abbau des β -Catenins verantwortlich sind, zur Stabilisierung des β -Catenins und damit zur konstitutiven Aktivierung der Zielgene führen. Mutationen sind im APC-Gen in fast 80 % aller kolorektalen Karzinome nachzuweisen, im β -Catenin-Gen dagegen in einigen kolorektalen Karzinomen und zahlreichen anderen Tumoren (zur Übersicht siehe Lustig und Behrens, 2003).

Der Wnt-Signalweg scheint auch in Bezug auf die Beeinflussung von *gap junction*-Proteinen eine Rolle zu spielen, was Hinweise auf die Beteiligung der *gap junctions* am Prozess der Krebsentstehung geben könnte (Ai et al., 2000; Van der Heyden et al., 1998). Ferner konnte gezeigt werden, dass für die Bildung der

gap junctions Zelladhensionsmoleküle von Bedeutung sind, wie z. B. das E-Cadherin für das Cx43 (Jongen et al., 1991). Als Zelladhensionsmolekül könnte somit auch β -Catenin einen möglichen Interaktionspartner von Connexinen darstellen und darüber deren Funktion beeinflussen.

1.10 Aufgabenstellung

Connexine sind Bestandteile der so genannten *gap junctions*, über die Kommunikation zwischen benachbarten Zelle (GJIC) vermittelt wird. Hepatozyten exprimieren die Connexine 32 (Cx32) und 26 (Cx26). Zahlreiche Befunde belegen eine Rolle von *gap junction*-Proteinen bei der Tumorentstehung. Ein bedeutender Hinweis auf die Beteiligung der *gap junctions* an der Krebsentstehung war die Entdeckung, dass Tumorpromotorsubstanzen wie z.B. PB in der Lage sind, diese Zell-Zell-Kommunikation zu unterdrücken und damit zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen beitragen können. Um die Rolle der Connexine im Prozess der Kanzerogenese, im speziellen der Leberkanzerogenese, näher zu untersuchen, wurde als Tiermodell die Cx32-KN-Maus und als Kontrolle die Cx32-WT-Maus eingesetzt. In vorausgegangenen Experimenten mit diesen beiden Stämmen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem Leberkanzerogen DEN bei den Mäusen mit dem Cx32-Gendefekt zu einem stärkeren Tumorwachstum in der Leber führt als dies bei den gleichbehandelten WT-Tieren der Fall war. Wurden diese Mäuse zusätzlich mit PB behandelt, so stellte man bei den Cx32-WT-Mäusen eine Tumorpromotion in der Leber fest, wohingegen diese in der Leber der Cx32-KN-Mäuse nicht zu beobachten war. Dies legt den Schluss nahe, dass funktionelles Cx32 für die durch PB bewirkte Promotion der Hepatokanzerogenese notwendig ist.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte auf molekularer Ebene nach möglichen Hinweisen bzw. Erklärungen für diese Beobachtungen gesucht werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung von Genen, die in Normalgewebe von Cx32-WT- und Cx32-KN-Mäusen differentiell exprimiert sind und eine Bedeutung bei der Tumorpromotion durch PB besitzen könnten. Hierzu wurde die Methode der Filterhybridisierung nach Clontech, die Methode der subtraktiven Hybridisierung auf PCR-Basis nach Clontech und ferner die Methode der

Affymetrix-Microarray-Technologie eingesetzt. Die Daten, die aus der Affymetrix-Analyse erhalten werden, wurden in Kooperation mit der Bioinformatikerin Dr. C. Ittrich von der zentralen Einheit für Biostatistik des DKFZ in Heidelberg statistisch ausgewertet. Kandidatengene wurden über LightCycler-PCR und Western-Blot verifiziert.

In einem weiteren Affymetrix-Microarray-Experiment sollte die differentielle Genexpression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe analysiert werden. Hierbei wurde Tumorgewebe aus Cx32-WT-Mäusen eingesetzt, wobei es sich um Tumoren handelte, die entweder Ha-ras- oder β -Catenin-mutiert waren. Die Daten, die hierbei erhalten wurden, wurden ebenfalls statistisch ausgewertet. Nach Identifizierung interessanter, für die Kanzerogenese relevanter Gene wurden repräsentative Kandidatengene ausgewählt, um deren Expressionsänderungen durch eine unabhängige Methode zu verifizieren oder zu falsifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Biochemikalien und Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Advantage [®] cDNA Polymerase Mix	Clontech, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit Michigan, USA
Agarose SEAKEM [®] GTG [®] (für RNA)	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Agarose Ultra Pure (für DNA)	GibcoBRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	GibcoBRL, Eggenstein
Amoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicilin	Sigma, Deisenhofen
AMV Reverse Transkriptase (25 U/μl)	Peqlab, Erlangen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bradford-Farbstoff-Konzentrat	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CDP-Star [®] -Reagenz	Applied Biosystems, CA, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
[α ³³ P]dATP	Amersham, Freiburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
DIG Easy Hyb	Roche, Mannheim
<u>DNA-Marker:</u>	
pBR322	Biolabs, Frankfurt am Main
100 bp Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
DNaseI (1 U/μl)	Clontech, Heidelberg
dNTP labelling mixture (DIG-dUTP)	Roche, Mannheim
dNTPs (5 mM, 10 mM) für PCR	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dodecylsulfat, Natrium-Salz (SDS)	Serva, Heidelberg
DTT (100 mM)	GibcoBRL, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA-Na ₂)	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen

Glyzerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
Heringssperma-DNA (10 mg/ml geschert)	Stratagene, La Jolla, USA
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (50 mM)	Roche, Mannheim
M-MLV-RT (200 U/ml) für PCR	Promega, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Nonidet [®] P-40	Sigma, Deisenhofen
Oligo(dT) für RT-PCR	Roche, Mannheim
PB	Th. Geyer, Renningen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Power Script Reverse Transkriptase	Clontech, Heidelberg
Primer für PCR	Interactiva, Ulm
	MWG Biotech AG, Ebersberg
	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Protein-Größenstandard	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Random Primer (N) ₆ (500 ng/ μ l)	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
RNAsin (40 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RsaI (10 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
5x RT-Puffer	Promega, Mannheim
Scintillationsflüssigkeit (Ultima Gold)	Packard, Groningen
SmaI (10 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SuperScript [™] RNase H ⁻ RT (200 U/ μ l)	GibcoBRL, Eggenstein
Taq-Polymerase (1 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
10x Taq-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trizol	GibcoBRL, Eggenstein
Tropix I-Block	Applied Biosystems, CA, USA
Trypton	GibcoBRL, Eggenstein

Tween[®]20

Serva, Heidelberg

X-Gal

Peqlab, Erlangen

Alle anderen in der Liste nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

2.2 Geräte

Autoklav Webeco Typ C

Webeco, Bad Schwartau

Bakterienbrutschrank

Heraeus, Hanau

DNA-Agarosegelelektrophoresekammern

E-Pharmacia, Uppsala, Schweden

Geldokumentation

Raytest, Straubenhardt

Hybridisierungsgefäße (ø 5 cm)

Techne, Duxford Cambridge,
England

Hybridisierungsöfen

Labtech International, Jahnsdorf

Hybridisierungsschalen

Boehringer, Mannheim

Kugelmühle Mikro-Dismembrator

Braun, Melsungen

LightCycler

Roche, Mannheim

Mini Protean II Gelhalter

BioRad, München

Mini Protean II Glasplatten und Spacer

BioRad, München

Mini Protean II Kammern

BioRad, München

Phosphor-Imager FujiFilm BAS-1500

Raytest, Straubenhardt

Phosphor-Imagerplatte (BAS-MS 2040)

Raytest, Straubenhardt

RNA-Agarosegelelektrophoresekammern

GibcoBRL, Eggenstein

Schüttelbad

GFL, Burgwedel

Scintillationszähler

Beckmann, München

Spannungsgeräte:

Netzgerät GPS 200/400

E-Pharmacia, Uppsala, Schweden

Netzgerät ST 305

GibcoBRL, Eggenstein

Netzgerät ST 606 T

GibcoBRL, Eggenstein

Spektralphotometer UV 160 A

Shimadzu, Düsseldorf

Thermocycler Uno Thermoblock

Biometra, Göttingen

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

Transblot Tanksystem

BioRad, München

Ultraschall Labsonic 2000

Braun, Melsungen

UV Crosslinker

Biometra, Göttingen

Zentrifugen:

Centrifuge 5417 R
 Model J2-21
 Biofuge fresco

Eppendorf, Hamburg
 Beckmann, München
 Heraeus, Hanau

2.3 Sonstiges

Einmalküvette PS (1,5 ml Halbmikroküvette)

Brand, Wertheim

Glaswaren

Schott, Mainz

LightCycler Software 3.5.3

Roche, Mannheim

LightCyclerkapillaren mit Deckel

Roche, Mannheim

Nylonmembran

Roche, Mannheim

Petrischalen (Ø 10 cm)

Becton Dickinson GmbH,
 Heidelberg

Proben- und Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)

Becton Dickinson GmbH,
 Heidelberg

Reaktionsgefäße (0,6 ml; 1,5 ml; 2 ml)

Biozym Diagnostik, Hess.
 Oldendorf

Software Tina V2.09a

Raytest, Straubenhardt

Tierkäfige, Macrolon Typ 3, Deckel und

Tecniplast Deutschland GmbH,

Trinkflaschen

Neumarkt-Sankt Veit

Transfer-Membran Immobilon-P, PVDF, 0,45 µm

Millipore, Eschborn

Tritix II Halbmaske mit Filter EN141 A1

Auergesellschaft GmbH, Berlin

3MM Whatman Filterpapier

Biometra, Göttingen

2.4 Gewebe

Gewebe wurde von Mäusen unterschiedlichen Genotyps und unterschiedlicher Generation erhalten.

2.4.1 Lebernorgewebe

- Lebernorgewebe von 8 männlichen C3H/He-Mäusen (4 Cx32-KN- und 4 Cx32-WT-Mäuse), die während der eigenen Diplomarbeit 2001 gezüchtet und getötet wurden. Das Lebergewebe wurde für Experiment 1 (Filterhybridisierung) und Experiment 2 (subtraktive Hybridisierung) eingesetzt.

- Lebernorgewebe von 12 männlichen C3H/He-Mäusen (6 Cx32-KN- und 6 Cx32-WT-Mäuse), die im Rahmen dieser Arbeit gezüchtet und getötet wurden. Das Lebergewebe wurde für Experiment 3 (Affymetrix-Microarray-Analyse 1) eingesetzt.
- Lebernorgewebe von 3 männlichen C57BL/6J-Mäusen (Cx32-WT-Mäuse), das aus dem „PRO“-Versuch, der von O. Mönnikes 1999 durchgeführt wurde, erhalten wurde (Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000). Das Lebergewebe wurde für Experiment 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) eingesetzt.

2.4.2 Lebertumorgewebe

Tumorgewebe aus der Leber von 5 männlichen C57BL/6J-Mäusen (Cx32-WT-Mäuse) wurde ebenfalls aus dem „PRO“-Versuch, der von O. Mönnikes 1999 durchgeführt wurde, erhalten (Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000). Das Tumorgewebe wurde für Experiment 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) eingesetzt.

2.5 Primer

2.5.1 Primer für Genotypisierung

Amplifizierung des Cx32-WT-Gens:

Cx32-INT-Anzini (5'-Primer): 5'-CCATAAGTCAGGTGTAAAGGAGC-3'

32REV2 (3'-Primer): 5'-AGATAAGCTGCAGGGACCATAGG-3'

Amplifizierung von Bereichen um das Cx32-KN-Gen:

Cx32-INT-Anzini (5'-Primer): 5'-CCATAAGTCAGGTGTAAAGGAGC-3'

NEO-Anzini-32 (3'-Primer): 5'-ATCATGCGAAACGATCCTCATCC-3'

2.5.2 Primer für die Kontrolle der RNA-Integrität

Amplifizierung des Ha-ras-Gens:

Ras 12A2 (5'-Primer): 5'-GTGGGGCAGGAGCTCCTGGATTG-3'

Ras 61B2 (3'-Primer): 5'-GTGCGCATGTACTGGTCCCGCAT-3'

2.5.3 Primer für LightCycler-PCR

Amplifizierung des Insulin-like growth factor binding protein 1-Gens (Igfbp1):

IGFBP1_for (5'-Primer): 5'-TGGCCGTTCTGATTCTC-3'

IGFBP1_rev (3'-Primer): 5'-AGCAGCCTTTGCCTCTTC-3'

Amplifizierung des Cyp2b10-Gens:

Cyp2b10_for (5'-Primer): 5'-TACTCCTATTCCATCTCTCCAAA-3'

Cyp2b10_rev (3'-Primer): 5'-TCCAGAAGTCTCTTTTCACATGT-3'

Amplifizierung des G3PDH-Gens:

G3PDH (5'-Primer): 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH (3'-Primer): 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Amplifizierung des Prothymosin α -Gens (Ptma):

Prothym_for (5'-Primer): 5'-GGGAGCAGGAGGCTGACAAT-3'

Prothym_rev (3'-Primer): 5'-TGAGACGGGAAGTGGAGGGT-3'

Amplifizierung des Cx32-Gens:

Siehe Primer für Genotypisierung

Amplifizierung des Superoxide dismutase 1-Gens (Sod1):

SOD_for (5'-Primer): 5'-TGGGTTCCACGTCCATCAG-3'

SOD_rev (3'-Primer): 5'-ACACCGTCCTTTCCAGCAG-3'

Amplifizierung des Nuclear factor, interleukin 3, regulated-Gens (Nfil3):

NFIL3_for (5'-Primer): 5'-CACGTATTCCACCTCCATC-3'

NFIL3_rev (3'-Primer): 5'-ACTTGCCCACTACACCCTC-3'

Amplifizierung des Retinol Dehydrogenase 6 -Gens (Rdh6):

RDH6_for (5'-Primer): 5'-ACCTGTCTGGGGTGACTGAC-3'

RDH6_rev (3'-Primer): 5'-AGAGGGCTTTTTTCAGGCTTC-3'

Amplifizierung des Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1-Gens (Gfra1):

GFRA_for (5'-Primer): 5'-TGTA CTTCGTGCTGCCACTC-3'

GFRA_rev (3'-Primer): 5'-GCTGAAGTTGGTTTCCTTGC-3'

Amplifizierung des DEAD (Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat) box polypeptide, Y-linked-Gens (Dby):

dead_for (5'-Primer): 5'-TTGTGCTCAAACAGGGTCTG-3'

dead_rev (3'-Primer): 5'-GGGGCTAACACCAAGGAGAT-3'

Amplifizierung des Glukose-6-Phosphat-Gens (G6pc):

G6P_for (5'-Primer): 5'-AGGAAGGATGGAGGAAGGAA-3'

G6P_rev (3'-Primer): 5'-TGGAACCAGATGGGAAAGAG-3'

Amplifizierung des Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked-Gene (Eif2s3y):

EIF2s3Y_for (5'-Primer): 5'-CGTCAGGATCTTGCCACTTT-3'

EIF2s3Y_rev (3'-Primer): 5'-ATCGGACAGTGTGAACACCA-3'

2.6 Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Firma/Herkunft
IGFBP1 (M-19); sc-6000	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA
PB3a (Maus: Cyp2b10)	Kaninchen, polyklonal	Dr. Wolf, Dundee, Schottland
Actin (I-19); sc-1616	Ziege, polyklonal	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Firma/Herkunft
Ziege-IgG; sc-2022	Merrettichperoxidase	Esel	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA

2.7 Puffer und Lösungen

2.7.1 RT-PCR und PCR

GNT-Puffer

50 mM KCl

1,5 mM MgCl₂ x 6H₂O

10 mM Tris-HCl; pH 8,5

0,45 % (v/v) Tween[®]20

0,45 % (v/v) Nonidet[®]P-40

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl; pH 8

1 mM EDTA

2.7.2 Gelelektrophorese

10x Ladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 15 % (w/v) Ficoll 400 50 mM EDTA
TAE-Puffer	2 M Tris-HCl; pH 8 400 mM Na-Acetat 50 mM EDTA
TBE-Puffer	90 mM Tris-HCl; pH 8 110 mM Borsäure 2,5 mM EDTA

2.7.3 Western-Blot

10x Assay Puffer	2 M Tris-HCl ;pH 9,5 100 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O
10x Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS
Homogenisierungspuffer	50 mM HEPES 150 mM NaCl 10 % (v/v) Glyzerin 1 % (v/v) Triton X-100 1,5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 1 mM EGTA 100 mM NaF 200 µM Na ₃ VO ₄ 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ x 10H ₂ O
<u>Kurz vor Gebrauch zugeben:</u>	1 mM PMSF 10 µg/µl Aprotinin 10 µg/µl Leupeptin 10 µg/µl Pepstatin

Material und Methoden

I-Block	1 l PBS 0,05 % (v/v) Tween [®] 20 1,33 % (w/v) Tropix I-Block 3 mM Natriumazid
2x Lämmli	125 mM Tris 20 % (v/v) Glyzerin 4 % (w/v) SDS 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,004 % (w/v) Bromphenolblau
10x PBS	80 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,4 M NaCl 27 mM KCl 15 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS/T	1 l PBS 0,05 % (v/v) Tween [®] 20 0,02 % (w/v) Natriumazid
Stammlösung Sammelgel (200 ml) 4 %-iges Polyacrylamidgel	26,6 ml Acrylamidlösung (30 %) 50 ml Tris-HCl (1,5 M); pH 8,9 1 ml SDS-Lösung (20 %) 122,4 ml H ₂ O
Sammelgel	20 ml Stammlösung Sammelgel 20 μ l APS-Lösung (10 %) 20 μ l TEMED
Stammlösung Trenngel (200 ml): 10 %-iges Polyacrylamidgel	66,67 ml Acrylamidlösung (30 %) 50 ml Tris-HCl (1,5 M); pH 8,9 1 ml SDS-Lösung (20 %) 82,33 ml H ₂ O

Trenngel	30 ml Stammlösung Trenngel 30 µl APS-Lösung (10 %) 30 µl TEMED
10x Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin
1x Transferpuffer	10x Transferpuffer (1:10) 20 % (v/v) Methanol

2.7.4 Filterhybridisierung nach Clontech

10x Denaturierungslösung	1 M NaOH 10 mM EDTA
10x DNaseI Puffer	400 mM Tris-HCl; pH 7,5 100 mM NaCl 60 mM MgCl ₂
2x Neutralisierungslösung	1 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; pH 7
20x SSC	3 M NaCl 300 mM Na ₃ Citrat x 2H ₂ O pH 7
Waschlösung 1	2x SSC 1 % (w/v) SDS
Waschlösung 2	0,1x SSC 0,5 % (w/v) SDS

2.7.5 Subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis

Agarplatten	LB-Medium 1 % (w/v) Bacto-Agar
-------------	-----------------------------------

Denaturierungslösung (<i>dot blot</i>)	0,3 N NaOH 15 % Ficoll
LB-Medium mit Ampicilin	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) Ampicilin

2.8 Reagenziensets

Atlas™ Mouse 1.2 Array Kit	Clontech, Heidelberg
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche, Mannheim
LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Oligotex	Qiagen, Hilden
PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech, Heidelberg
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TA Cloning® Kits	Invitrogen, Karlsruhe

2.9 Versuchstiere

2.9.1 Tierhaltung und Zucht

Mäuse der Stämme C3H/He wurden von Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld) erhalten. Cx32-defiziente Mäuse als Ausgang für die Zucht wurden unserer Arbeitsgruppe von Prof. Willecke, Institut für Genetik, Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Sie wurden ursprünglich durch gezielte homologe Rekombination generiert und hatten einen C57BL/6J x 129Sv Hintergrund (Nelles et al., 1996). Weibliche Cx32^{+/-} heterozygote Mäuse wurden mit männlichen C3H/He-Mäusen, die ein normales Cx32-Allel (Cx32^{Y/+}) besitzen, gekreuzt. Aus dieser Kreuzung resultieren Männchen, die sich in den Wildtyp-(Cx32^{Y/+}) und den Knock-out-Genotyp (Cx32^{Y/-}) aufteilen. Diese Mäuse dienten nach der Genotypisierung als Versuchstiere (Moennikes et al., 2000). Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ 3 unter einem künstlichen Tag/Nacht-Rhythmus

(Hell/Dunkelphase je 12 h) bei 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % im Tierstall des Instituts für Toxikologie gehalten. Sie erhielten Futter (Nr. 1429) der Firma Altromin (Lage) und Trinkwasser *ad libitum*.

Die Zucht der Cx32-defizienten Mäuse erfolgte durch Bruder-Schwester-Verpaarung in Haremshaltung, je ein Bock mit bis zu vier Weibchen.

2.9.2 Behandlungen der Versuchstiere

Von den 8 Mäusen, die für Experiment 1 (Filterhybridisierung) und 2 (subtraktive Hybridisierung) eingesetzt wurden, hatten 2 Cx32-KN- und 2 Cx32-WT-Mäuse im Alter von 4 Monaten PB-haltiges Futter (0,05 %, w/w) erhalten. Alle 8 Mäuse wurden zwei Wochen nach Beginn der PB-Behandlung getötet. Die Lebern wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die eingefrorenen Lebern wurden bei -70°C gelagert (eigene Diplomarbeit 2001).

Von den 12 Mäusen, die für Experiment 3 (Affymetrix-Microarray-Analyse 1) eingesetzt wurden, hatten 3 Cx32-KN- und 3 Cx32-WT-Mäuse im Alter von 2 Monaten PB-haltiges Futter (0,05 %, w/w) erhalten. Alle 12 Mäuse wurden zwei Wochen nach Beginn der PB-Behandlung getötet. Die Lebern wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die eingefrorenen Lebern wurden bei -70°C gelagert.

Das Lebernormalgewebe und das Tumorgewebe, das für Experiment 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) eingesetzt wurde, wurde aus dem „PRO“-Versuch, der von O. Mönnikes 1999 durchgeführt wurde, erhalten.

Das Lebernormalgewebe stammte hierbei aus 3 Cx32-WT-Mäusen, die im Alter von 6 Wochen eine DEN-Dosis von 90 µg je Körpergewicht i.p. erhielten. Im Alter von 45 Wochen wurden sie getötet. Normalgewebe wurde isoliert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das eingefrorene Normalgewebe wurden bei -70°C gelagert.

Das Tumorgewebe stammte aus 5 Cx32-WT-Mäusen, die ebenfalls im Alter von 6 Wochen eine DEN-Dosis von 90 µg je Körpergewicht i.p. appliziert bekommen hatten. Nach einem dreiwöchigem behandlungsfreiem Intervall wurden sie auf PB-haltiges Futter (0,05 %, w/w) gesetzt. Die Tiere wurden im Alter von 45

Wochen getötet. Tumorgewebe wurde isoliert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die eingefrorenen Tumoren wurden bei -70°C gelagert (Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000).

Über Mutationsanalysen, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, wurden β -Catenin-Mutationen in Tumoren PB-behandelter Cx32-WT-Mäuse und Ha-ras-Mutationen in Tumoren unbehandelter Cx32-WT-Mäuse identifiziert (Aydinlik et al., 2001). Für Experiment 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) wurden jeweils 3 β -Catenin- und 3 Ha-ras-mutierte Tumoren eingesetzt.

2.9.3 Liste der Versuchsmäuse

Tabelle 3: Mäuse (Lebernorgewebe), die für Experiment 1 (Filterhybridisierung), 2 (subtraktive Hybridisierung), 3 (Affymetrix-Microarray-Analyse 1) und 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) eingesetzt wurden.

Tierbezeichnung	Genotyp	Ohrmarkierung*	Behandlung
Experiment 1 und 2			
Cx32KN 1	Cx32-KN	R	-
Cx32KN 2	Cx32-KN	L	-
Cx32WT 3	Cx32-WT	LL	-
Cx32WT 4	Cx32-WT	RR	-
Cx32KN 5	Cx32-KN	LR	+PB
Cx32KN 6	Cx32-KN	R	+PB
Cx32WT 7	Cx32-WT	RRR	+PB
Cx32WT 8	Cx32-WT	LL	+PB
Experiment 3			
A	Cx32-KN	L	+PB
B	Cx32-KN	R	+PB
C	Cx32-KN	L	+PB
D	Cx32-KN	L	-
E	Cx32-KN	R	-
F	Cx32-KN	L	-
G	Cx32-WT	L	+PB
H	Cx32-WT	R	+PB
Fortsetzung Tabelle 3 nächste Seite			

Fortsetzung Tabelle 3			
I	Cx32-WT	R	+PB
J	Cx32-WT	L	-
K	Cx32-WT	R	-
L	Cx32-WT	L	-
Experiment 4**			
Pro 61 (NG 1)	Cx32-WT	L	-
Pro 63 (NG 2)	Cx32-WT	R	-
Pro 86 (NG 3)	Cx32-WT	-	-

*R = rechts, L = links;**Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000

Tabelle 4: Mäuse (Lebertumorgewebe*), die für Experiment 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) eingesetzt wurden.

Tierbezeichnung	Tumorbezeichnung	Mutationstyp	Genotyp	Ohrmarkierung**	Behandlung
Pro 108 (Ras 1)	T1	CAA → CGA (Codon 61)	Cx32-WT	L	-
Pro 108 (Ras 2)	T2	CAA → CGA (Codon 61)	Cx32-WT	L	-
Pro 121 (Ras 3)	T2	CAA → CGA (Codon 61)	Cx32-WT	R	-
Pro 75 (Cat 1)	T2	TCT → CCT (Codon 33)	Cx32-WT	R	+PB
Pro 100 (Cat 2)	T1	GAT → GGT (Codon 32)	Cx32-WT	LR	+PB
Pro 112 (Cat 3)	T4	TCT → CCT (Codon 33)	Cx32-WT	R	+PB

*Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000;**R = rechts, L = links

2.10 RT-PCR, PCR und LightCycler-PCR

2.10.1 RT-PCR und PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden über Primer definierte Genabschnitte spezifisch vervielfältigt. Erreicht wird dies

durch die zyklische Wiederholung von drei Reaktionsschritten, der Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstrangs, der Anlagerung der Primer (*annealing*) und der enzymatischen DNA-Synthese (*extension*). Die DNA-Synthese wird dabei von einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) katalysiert (Saiki et al., 1988). Zu Reaktionsbeginn nimmt die Zahl der amplifizierten DNA-Fragmente exponentiell mit der Zykluszahl zu. Eine Abweichung von dem exponentiellen Wachstum tritt nach ca. 17 Zyklen auf und erreicht nach ca. 35 Zyklen ein Maximum. Ausschlaggebend hierfür ist unter anderem die begrenzte Verfügbarkeit der beteiligten Komponenten.

Bei der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR, *reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction*) geht der eigentlichen PCR-Reaktion zunächst eine andere enzymatische Reaktion voraus. Da mittels PCR-Reaktion keine RNA vervielfältigt werden kann, muss die RNA erst durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA (copy DNA) umgeschrieben werden. Daraufhin können die in cDNA umgeschriebenen RNA-Fragmente für die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Der RT-PCR-Ansatz wurde wie folgt nach einer im Labor etablierten Standardvorschrift angesetzt:

Zuerst wurden die im RNA-Mix aufgeführten Komponenten zusammenpipettiert, 10 min bei 70°C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Als Kontrolle wurde in einem Ansatz anstelle von RNA Wasser eingesetzt.

RNA-Mix:

H ₂ O	10,5 µl
Oligo(dT) ₁₅ (100 µM)	1 µl
RNA (0.2 µg/µl)	1 µl
	<hr/>
	12,5 µl

Anschließend wurden zum RNA-Mix der RT-Mix zugeben.

RT-Mix:

5x RT-Puffer	4 μ l
RNAsin (40 U/ μ l)	0,5 μ l
dNTP (10 mM)	2 μ l
M-MLV-RT (200 U/ μ l)	1 μ l
	<hr/>
	7,5 μ l

Die RT-Reaktion benötigte 60 min bei 42°C. Nach der Inkubation wurde der Ansatz sofort auf Eis abgekühlt. Der RT-Ansatz wurde 1:10 mit TE-Puffer verdünnt und anschließend für die PCR-Reaktion eingesetzt. Die restliche cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Der PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

H ₂ O	29 μ l
10x Reaktionspuffer	5 μ l
dNTP (2 mM)	5 μ l
Primer, forward (10 μ M)	2,5 μ l
Primer, reverse (10 μ M)	2,5 μ l
cDNA (1:10)	5 μ l
Taq-Polymerase (1 U/ μ l)	1 μ l
	<hr/>
	50 μ l

Die PCR-Reaktion fand im Biometra Uno Thermoblock statt, dessen Deckelheizung auf 110°C eingestellt wurde.

2.10.1.1 Genotypisierung

Eine PCR wurde hier genutzt, um spezifisch diejenigen DNA-Abschnitte zu amplifizieren, in denen sich Cx32-KN-Mäuse von Cx32-WT-Mäusen unterscheiden. Auf diese Weise wurden die Mäuse genotypisiert.

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Analyse wurden Leberproben eingesetzt, die einem Proteinase K-Verdau unterworfen wurden (verändert nach Malumbres et al., 1997). Dazu wurde die Leberprobe (~50-100 mg) in 2 ml Rundbodengefäße gegeben, mit 250 μ l GNT-Puffer und 1,2 μ l Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml; Endkonzentration 100 μ g/ml) versetzt und anschließend 2 bis 4 h im Thermomixer unter Schütteln (niedrigste Stufe) bei 56°C inkubiert. Die

Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch Erhitzen auf 95°C für 15 min. Vorhandene Leberreste wurden 4 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Die Probelösung wurde bei -20°C gelagert oder direkt für die Genotypisierung über PCR eingesetzt.

Der PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen, wobei entweder die Primer für die Amplifizierung des Cx32-WT-Gens oder für die Amplifizierung von Bereichen um das Cx32-KN-Gen eingesetzt wurden:

H ₂ O	14 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP (10 mM)	5 µl
INT (5'-Primer; 20 pmol/µl)	1 µl
REV bzw NEO (3'-Primer; 20 pmol/µl)	1 µl
cDNA	1 µl
Tag-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
	<hr/>
	25 µl

Die PCR-Reaktion fand im Biometra Uno Thermoblock statt, dessen Deckelheizung auf 110°C eingestellt wurde, und wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tabelle 5: Temperaturprogramme für die Genotypisierung.

Gen	Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
Cx32-WT	94°C, 10 min	35	95°C, 60 s	60°C, 45 s	72°C, 60 s
Cx32-KN	94°C, 10 min	35	95°C, 60 s	63°C, 45 s	72°C, 60 s

Am Ende des Temperaturprogramms wurde der Ansatz nochmals 10 min bei 72°C inkubiert, um eine vollständige Verlängerung der DNA-Fragmente zu gewährleisten.

Die Überprüfung der PCR erfolgte über ein 1,5 %iges Agarosegel. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf „handwarm“ in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. 9 µl Probe wurden mit 1,5 µl 10x Ladepuffer versetzt, anschließend auf das fest gewordene Gel aufgetragen und 1 h bei 90 V in 1x TBE elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurde hierbei 100 bp Leiter von MBI Fermentas eingesetzt. Nach 1 h wurde das Gel in

0,1 %iger wässriger Ethidiumbromidlösung 15 min gefärbt und unter UV-Bestrahlung mit einem Geldokumentationssystem ausgewertet.

2.10.2 LightCycler-PCR

Der LightCycler stellt ein Geräte- und Reagenziensystem dar, das äußerst schnelle Zykluszeiten für die PCR mit einer gleichzeitigen Detektion der Reaktionskinetik ermöglicht. Damit verkürzt sich die Zeit der Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren auf 20 bis 30 min. Die Menge amplifizierter PCR wird über den Farbstoff SYBR[®]Green I detektiert. SYBR[®]Green I bindet an neu synthetisierte doppelsträngige DNA und generiert ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur DNA-Konzentration ist (Boehringer Mannheim, Biochemica Information Nr.102, 1998).

Die LightCycler-Analysen dienen der Verifizierung von Kandidatengen, die in Genexpressionsanalysen mit der Affymetrix-Microarray-Technologie eine differentielle Expression zeigten.

Für die LightCycler-Analysen wurde die Gesamt-RNA, die aus den Lebern der 12 Mäuse mit der Bezeichnung A-L (siehe Tabelle 3) isoliert wurde, anhand folgendem Ansatzes in cDNA umgeschrieben:

RNA (0.5 µg/µl)	1 µl
H ₂ O	10,5 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
RNasin	1 µl
Oligo(dT) (500 ng/µl)	0,5 µl
Random Primer (N) ₆ (500 ng/µl)	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase (25 U/µl)	0,5 µl
	20 µl

Der RT-Reaktionsmix wurde 60 min bei 42°C inkubiert und anschließend die Reverse Transkriptase 5 min bei 95°C inaktiviert.

Material und Methoden

Der LightCycler-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen, unter anderem aus Komponenten des LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I von Roche:

PCR-H ₂ O	13,4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
Primer, forward (20 µM)	0,5 µl
Primer, reverse (20 µM)	0,5 µl
10x PCR-Mix	2 µl
RT-Ansatz	2 µl
	20 µl

Der LightCycler-PCR-Ansatz wurde in Glaskapillaren als Reaktionsgefäße pipettiert, diese wurden verschlossen und dann 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Glaskapillaren in das Probenkarussell des LightCycler-Geräts eingesetzt wurden, wurde die PCR-Reaktion mit dem entsprechenden Temperaturprogramm gestartet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Temperaturprogramme für LightCycler-PCR.

Gen	Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
Igfbp1	95°C, 10 min	55	95°C, 10 s	58°C, 5 s	72°C, 14 s
Cyp2b10	95°C, 10 min	60	95°C, 0 s	57°C, 5 s	72°C, 5 s
G3PDH	95°C, 10 min	55	95°C, 5 s	70°C, 5 s	72°C, 20 s
Ptma	95°C, 10 min	55	95°C, 10 s	58°C, 5 s	72°C, 11 s
Cx32	95°C, 10 min	55	95°C, 0 s	60°C, 5 s	72°C, 10 s
Sod1	95°C, 10 min	60	95°C, 5 s	68°C, 10 s	72°C, 7 s
Nfil3	95°C, 10 min	45	95°C, 5 s	63°C, 10 s	72°C, 6 s
Rdh6	95°C, 10 min	55	95°C, 7 s	58°C, 5 s	72°C, 7 s
Gfra1	95°C, 10 min	55	95°C, 7 s	58°C, 5 s	72°C, 7 s
Dby	95°C, 10 min	55	95°C, 7 s	59°C, 5 s	72°C, 7 s
G6pc	95°C, 10 min	50	95°C, 7 s	58°C, 5 s	72°C, 7 s
Eif2s3y	95°C, 10 min	55	95°C, 7 s	59°C, 5 s	72°C, 7 s

Die Auswertung erfolgte anschließend mit LightCycler-Software 3.5.3 von Roche. Aus den für ein amplifiziertes Gen erhaltenen *crossing points* (CP) einer Gruppe (4 Gruppen: 3 Cx32-KN-, 3 Cx32-WT-, 3 PB-behandelte Cx32-KN-, 3

PB-behandelte Cx32-WT-Mäuse) wurde der Mittelwert berechnet. Aus den Mittelwerten wurde dann über folgende Formel der Induktionsfaktor für das jeweilige Gen bestimmt.

$$\text{Induktionsfaktor} = \text{Eff}_{\text{Gen}}^{\Delta C_T (\text{Gruppe 1} - \text{Gruppe 2})} / \text{Eff}_{\text{G3PDH}}^{\Delta C_T (\text{Gruppe 1} - \text{Gruppe 2})}$$

Der Wert C_T gibt die Zykluszahl an, bei der die Fluoreszenz einen vorgegebenen Schwellenwert erreicht hat. Die Effizienz der Reaktion für ein Gen berechnet sich aus $10^{-1/\text{Steigung der Eichgeraden}}$, wobei sich die Eichgerade aus den Werten der unverdünnten Probe, der 1/10, 1/100, und 1/1000 Verdünnung der Probe ergibt.

2.11 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung von Trizol von GibcoBRL und gemäß der dazugehörigen Vorschrift. Trizol ist eine gebrauchsfertige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, die zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe eingesetzt wird. Die Verwendung von Trizol stellt eine Verbesserung der RNA-Isolierungsmethode nach Chomczynski und Sacchi, 1987 dar.

Bei der Isolierung der Gesamt-RNA mit Trizol wurde 1 ml Trizol pro 100 mg Gewebe eingesetzt. Zum Homogenisieren eines Leberstückchens (~200 mg pro eingesetztem Leberstückchen) wurde eine Kugelmühle eingesetzt. Die Bestandteile der Kugelmühle (Teflongefäß, Teflondeckel, Metallkugel, Pinzette etc.) wurden, bevor mit der Isolierung begonnen wurde, gründlich in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das RNA-Pellet wurde schließlich mit autoklaviertem DEPC-Wasser auf eine Endkonzentration von ca. 1 µg/µl verdünnt.

Die Bestimmung des RNA-Reinheitsgrades und die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte wie in 2.13 beschrieben.

Die Gesamt-RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.12 PolyA-RNA Anreicherung

Die PolyA-RNA Anreicherung aus Gesamt-RNA wurde mit Oligotex von Qiagen durchgeführt. Oligotex ist ein Affinitätsreagenz für die Detektion, Isolierung,

Reinigung und enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren, die einen PolyA-Schwanz mit 20 bis 250 mal der Base Adenosin, besitzen. PolyA-mRNA wird hierbei angereichert durch Hybridisierung des PolyA-Schwanzes an ein dT Oligomer, das auf einer Trägermatrix befestigt ist. Da die Hybridisierung hohe Salzkonzentrationen erfordert, kann die PolyA-RNA leicht durch ein Absenken der Salzkonzentration wieder eluiert werden. Die PolyA-Anreicherung erfolgte gemäß dem „*Oligotex mRNA Spin-Column Protocol, for Isolation of Poly A mRNA from total RNA*“ von Qiagen (OligotexTM Handbook 07/99, S.18, Qiagen). Die Bestimmung des RNA-Reinheitsgrades und die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte wie in 2.13 beschrieben.

Die PolyA-RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.13 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch (Sambrook et al., 1989). Hierzu wurde die RNA 1:400 bzw. 1:1000 in TE-Puffer verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Leerwert diente die Absorption des reinen TE-Puffers.

Der RNA-Reinheitsgrad wurde über den Quotient E_{260}/E_{280} bestimmt. Bei einer reinen RNA-Präparation liegt der Wert des Quotienten bei Messung in TE-Puffer bei 1,9 bis 2,1.

Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde wie folgt über E_{260} quantifiziert:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g RNA/ml}$$

$$\text{Konzentration der RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.14 Filterhybridisierung nach Clontech

Die Filterhybridisierung nach Clontech wurde für die Analyse der differentiellen Genexpression in PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen eingesetzt. Hierzu wurde der Reagenzienset *AtlasTM Mouse 1.2 Array Kit* verwendet und gemäß dem *AtlasTM cDNA Expression Array User Manual, Protocol PT3140-1, Version PR9X390* der Firma Clontech vorgegangen.

2.14.1 DNaseI-Verdau von Gesamt-RNA

Der DNaseI-Verdau diente dazu, restliche DNA-Kontaminationen von der isolierten Gesamt-RNA zu entfernen, da sich auch geringe Spuren von DNA negativ auf die spätere Filterhybridisierung der Filter hätten auswirken können. Der DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA erfolgte mit 1 U RNase-freier DNaseI pro 10 µg RNA. Nach dem DNaseI-Verdau wurde das RNA-Pellet in autoklaviertem DEPC-Wasser gelöst, so dass eine Endkonzentration von ca. 1 µg/µl resultierte.

Die Kontrolle des DNaseI-Verdaus erfolgte anhand des Laufverhaltens der Gesamt-RNA in einem 1 %igen Agarosegel, das mit TAE-Puffer angesetzt wurde. 5 µl Gesamt-RNA-Probe wurden mit 1 µl 10x Ladepuffer versetzt, anschließend auf das fest gewordene Gel aufgetragen und 1,5 h bei 90 V in 1x TAE elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurde die RNA-Leiter von GibcoBRL eingesetzt. Nach 1,5 h wurde das Gel in 0,1 %iger wässriger Ethidiumbromidlösung 15 min gefärbt und unter UV-Bestrahlung mit einem Geldokumentationssystem ausgewertet.

Die Bestimmung des RNA-Reinheitsgrades und die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte wie in 2.13 beschrieben.

Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.14.2 Kontrolle der RNA-Integrität über RT-PCR

Nach dem DNaseI-Verdau wurde die isolierte Gesamt-RNA mittels RT-PCR sowohl auf ihre Integrität überprüft als auch auf Kontamination mit genomischer DNA.

Hierzu wurden spezifische Primer für das Ha-ras-Gen (Protoonkogen, Genprodukt: kleines G-Protein) eingesetzt. Dieses Gen wurde gewählt, da seine Expressionsrate in der Zelle vergleichsweise niedrig ist und entsprechende Primer im Labor zur Verfügung standen. Wird das Fragment, das dem über die spezifischen Primer definierten Genabschnitt entspricht, trotz der geringen Zahl an mRNAs amplifiziert, so kann davon ausgegangen werden, dass der Großteil der RNA intakt vorliegt. Die eingesetzten spezifischen Primer-Kombinationen waren Intron-überspannend. Das bedeutet, dass bei einer DNA-Kontamination eine zusätzliche Bande bei höheren Basenpaar-Werten zu sehen gewesen wäre.

Die Amplifizierung des Ha-ras-Gens erfolgte nach folgendem Temperaturprogramm:

Tabelle 7: Amplifizierung des Ha-ras-Gens.

Gen	Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
Ha-ras	94°C, 10 min	35	95°C, 60 s	60°C, 45 s	72°C, 60 s

Am Ende des Temperaturprogramms wurde der Ansatz nochmals 5-10 min bei 72°C inkubiert, um eine vollständige Verlängerung der DNA-Fragmente zu gewährleisten.

Die Überprüfung der RT-PCR erfolgte wie unter 2.10.1.1 beschrieben. Als Marker wurde der pBR322 von Biolabs eingesetzt.

2.14.3 Synthese von radioaktiv markierter cDNA

Für die spätere Hybridisierung der Filter wurde die isolierte RNA enzymatisch in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben. Das Umschreiben erfolgte mit der *Power ScriptTM* reversen Transkriptase und Komponenten des Reagenziensets *AtlasTM Mouse 1.2 Array Kit*, sowie dem radioaktiven Nukleotid der Firma Amersham. Das hierbei eingesetzte [$\alpha^{33}\text{P}$]dATP sollte nicht älter als 2 Wochen sein (Halbwertszeit: 28 Tage).

2.14.4 Reinigung der radioaktiv markierten cDNA über *NucleoSpin[®] Extraction Spin Columns*

Über die Zentrifugationssäulchen *NucleoSpin[®] Extraction Spin Columns* wurde die radioaktiv markierte cDNA von nicht eingebauten Nukleotiden und kleinen cDNA-Fragmenten (< 0.1 kb) gereinigt. Das Maß der Radioaktivität der gereinigten cDNA wurde über den Scintillationszähler bestimmt. Dazu wurden 2 μl der cDNA-Probe mit 4 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und gründlich gemischt. Die Radioaktivität wurde im ^{32}P -Kanal gemessen und anschließend die Gesamtzahl der cpm berechnet, indem die gemessenen cpm mit dem Verdünnungsfaktor 50 multipliziert wurden. Der gereinigte cDNA-Ansatz, synthetisiert von Gesamt-RNA, sollte im Bereich von $2 \cdot 10^6$ cpm liegen.

2.14.5 Hybridisierung des *AtlasTM mouse 1.2 Arrays*

Bei der im folgenden beschriebenen Hybridisierung wurde die markierte cDNA mit dem Filter *AtlasTM mouse 1.2 Array* inkubiert. Dieser Filter besteht aus einer Nylonmembran, auf der als einzelne Punkte 1176 Maus cDNAs, 9 *housekeeping genes* als Kontroll-cDNAs und 3 Negativkontrollen immobilisiert sind. Welche Gene auf dem Filter aufgebracht sind, ist dem *AtlasTM Mouse 1.2 Array Kit* zu entnehmen. Die Länge der cDNAs auf dem Filter beträgt ca. 200-300 Nukleotide. Die Positionen der cDNAs auf dem Filter sind dem Anhang zu entnehmen.

Der Hybridisierungsvorgang erfolgte in einem Hybridisierungssofen mit rollenden zylindrischen Hybridisierungsgefäßen, die einen Durchmesser von 5 cm aufwiesen. Für die Vorhybridisierung wurden, abweichend von der Vorschrift, pro Filter 10 ml ExpressHybridisierungslösung (Kit) eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die Filter mit den Spots nach oben in eine Entwicklungskassette gelegt. Die Phosphor-Imager-Platte wurde mit der weißen Seite nach unten auf den Filter aufgebracht. Der Filter wurde anschließend mindestens 10 Tage exponiert.

Die Radioaktivität auf den hybridisierten Filtern wurde über das Phosphor-Imager-System der Firma Fuji vermessen. Die Auswertung der Daten des *AtlasTM mouse 1.2 Arrays* erfolgte mit Hilfe des Software-Programms *AtlasImageTM* der Firma Clontech.

2.14.6 Strippen des *AtlasTM mouse 1.2 Arrays*

Der Filter wurde nach der Hybridisierung *gestrippt*, wobei die markierten cDNA-Proben wieder von dem Filter abgewaschen wurden. Auf diese Weise konnte der Filter mindestens dreimal wiederverwendet werden. Nach dem *Strippen* wurde der Filter wieder in die Entwicklungskassette gelegt, die Phosphor-Imager-Platte aufgelegt und über 5 Tage exponiert. War danach noch Radioaktivität zu detektieren, wurde das *Strippen* wiederholt. War der Filter vollständig *gestrippt*, dann wurde dieser erneut zur Hybridisierung eingesetzt oder alternativ bei -20°C aufbewahrt.

2.15 Subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis

Die Methode der subtraktiven Hybridisierung auf PCR-Basis nach Clontech wurde für die Analyse der differentiellen Genexpression in unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen eingesetzt. Die hierfür benötigten Reagenzien wurden dem *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* entnommen und die Durchführung erfolgte gemäß dem *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual; Protocol PT1117-1, Version PR06687* von Clontech.

Bei der Methode der subtraktiven Hybridisierung werden die cDNAs zweier Systeme, in diesem Fall die cDNA aus der Leber von Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäusen, miteinander hybridisiert. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die cDNAs, die in beiden gemeinsam vorkommen, hierbei „subtrahiert“ werden, dagegen die cDNAs, die differentiell exprimiert sind, über PCR-Amplifikation spezifisch angereichert werden können (Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996). Das System, aus dem die differentiell exprimierten Gene angereichert werden sollen, wird dabei als „Tester“ bezeichnet, das andere als „Treiber“. Die spezifische Anreicherung der differentiellen Tester-cDNAs kann deshalb erfolgen, da zuvor an die Tester-cDNAs Adapter ligiert wurden, die als Primeransatzstellen dienen und eine spezifische Anreicherung über PCR-Amplifikation ermöglichen. Die subtraktive Hybridisierung wurde in zwei Ansätzen durchgeführt, wobei Cx32-KN- und Cx32-WT-Maus jeweils einmal als Tester und einmal als Treiber eingesetzt wurden. Im einzelnen setzt sich die Methode der subtraktiven Hybridisierung aus Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthese mit Tester und Treiber-PolyA-RNA, Restriktionsverdau, Adapter-ligation, erster und zweiter Hybridisierung und erster und nested PCR-Amplifikation zusammen (zur Übersicht siehe Abbildung 3).

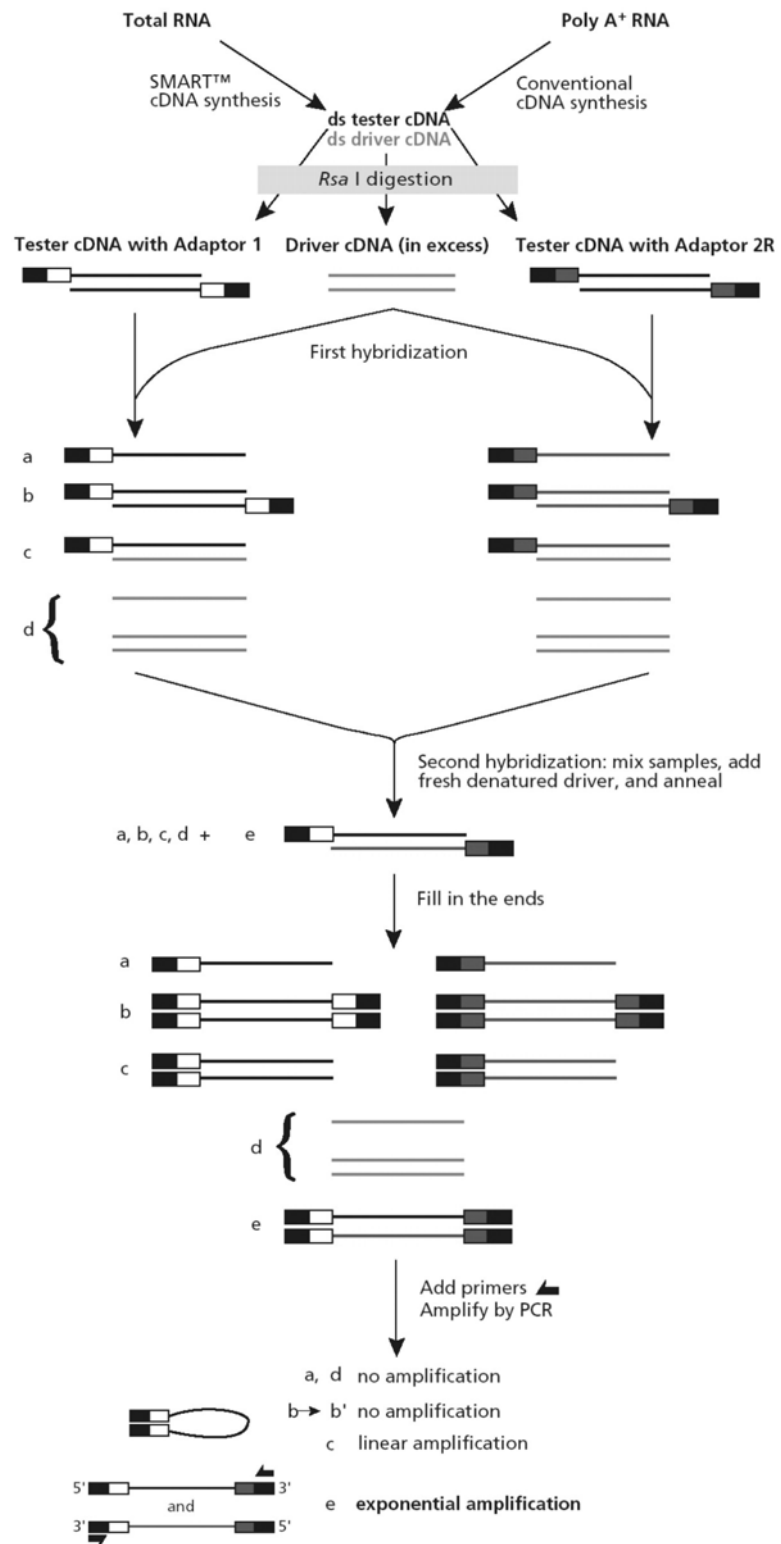


Abbildung 3: Schematische Darstellung der subtraktiven Hybridisierung nach Clontech (www.clontech.com).

2.15.1 cDNA-Synthese, Restriktionsverdau und Adapterligation

Aus den zu vergleichenden Geweben wurde Gesamt-RNA mit Trizol von GibcoBRL isoliert und anschließend über Oligotex von Qiagen PolyA-RNA angereichert. Über Erst- und Zweitstrangsynthese wurde aus der PolyA-RNA doppelsträngige cDNA synthetisiert. Diese wurde mit dem RsaI-Restriktionsenzym verdaut, wobei kürzere cDNA-Sequenzen mit stumpfen Enden (*blunt ends*) entstanden, die für die darauf folgende Adapterligation benötigt wurden. Die Tester-cDNA wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt, wobei jede Fraktion mit einem anderen Adapter, der als spätere Primeransatzstelle diente, ligiert wurde. Die Enden des Adapters haben keine Phosphatgruppe, so dass nur ein Strang von jedem Adapter an das 5'-Ende der cDNA binden kann. Ferner haben die beiden Adapter Bereiche von identischen Sequenzen, so dass eine PCR-Amplifikation möglich ist.

2.15.2 Ligationseffizienztest

Der Ligationseffizienztest stellte eine G3PDH-PCR dar, die zur Überprüfung diente, ob mindestens 25 % der cDNAs Adapter an beide Enden besaßen. Diese PCR wurde mit beiden Tester-Fraktionen und einer Kontroll-cDNA, die im Kit enthalten war, durchgeführt. Bei dem Ligationseffizienztest erfolgte ein Ansatz mit zwei G3PDH-spezifischen Primern und ein weiterer Ansatz mit einem G3PDH-spezifischen Primer und einem Adapter-spezifischen Primer. Das PCR-Produkt mit den zwei G3PDH-spezifischen Primern zeigte eine Bande bei 0,5 kb, das mit dem G3PDH- und Adapter-spezifischen Primer eine Bande bei 1,2 kb. Die Intensitäten beider Banden sollten annähernd gleich stark sein, da sonst die Ligationseffizienz zu gering wäre. Die Bandenintensitäten sollten sich nicht mehr als das Vierfache voneinander unterscheiden.

2.15.3 Tester-Treiber-Hybridisierungen und die anschließende Amplifizierung differentieller cDNAs

In der ersten Hybridisierung wurde nach Denaturierung ein Überschuss an Treiber-cDNA jeweils mit einer der Tester-Fraktionen hybridisiert. Die cDNAs, die in Tester und Treiber vorkamen, bildeten hierbei Mischhybride, wohingegen die cDNAs, die nur im Tester vorkamen, einzelsträngig blieben. Bei der zweiten

Hybridisierung wurden die beiden ersten Hybridisierungsansätze ohne Denaturierung und unter Zugabe von Treiber-cDNA gemischt. Nur die einzelsträngigen cDNAs können hierbei Hybride mit unterschiedlichen Adapter bilden und nach Auffüllung der Enden über PCR exponentiell angereichert werden. Die anderen cDNAs werden nicht oder nur linear amplifiziert. Häufig vorkommende differentielle cDNAs können zum Teil wieder mit sich selbst hybridisieren und tragen deshalb an beiden Enden identische Adapter. Aufgrund der Sequenzhomologie kann es hier zu einer Schlaufenbildung kommen, die eine Primeranlagerung und damit die Amplifikation verhindert (Suppressions-PCR, siehe *PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit User Manual*, S. 43). Auf die erste PCR folgte noch eine zweite PCR-Reaktion unter Verwendung von sogenannten Nested-PCR-Primer 1 und 2R. Diese ermöglichen eine weitere Anreicherung der differentiellen Transkripte und führen zusätzlich zu einer Abnahme von Hintergrund in Form von ungewollten PCR-Produkten.

Das Ergebnis der subtraktiven Hybridisierung ist somit, dass die cDNAs, die in Tester und Treiber gemeinsam vorkamen, effektiv eliminiert wurden und gleichzeitig die differentiell exprimierten cDNAs mengenmäßig angeglichen wurden.

2.15.4 Subtraktionseffizienztest

Mit dem Subtraktionseffizienztest wurde überprüft, ob die subtraktive Hybridisierung erfolgreich war. Hierbei wurde eine G3PDH-PCR mit subtrahierter und unsubtrahierter cDNA durchgeführt. Prinzip dieses Tests war, dass die G3PDH als ubiquitäres Transkript nach der Subtraktion vermindert vorliegen sollte. Nach verschiedenen Zyklenzahlen (18, 23, 28 und 33 Zyklen) wurden Proben entnommen und auf ein Agarosegel aufgetragen. Nur bei der PCR mit der unsubtrahierten cDNA sollte mit steigender Zyklenzahl die Bandenintensität zu nehmen. Bei der PCR mit der subtrahierten Probe sollten keine PCR-Produkte auftauchen, außer bei einer hoher Zyklenzahl (35 und höher).

2.16 Screening zur Bestätigung der differentiellen cDNAs

Die über PCR-Amplifikation erhaltenen differentiellen cDNAs wurden kloniert und anschließend einem *Screening* mittels cDNA-Array-Hybridisierung

unterworfen (siehe Dissertation von R. Hipfel, 1999). Hierzu wurden über Kolonie-PCR die *Inserts* einzelner Klone amplifiziert und dann auf doppelte Filter (*dot blot*) aufgetragen. Dem eigentlichen *Screening* wurde ein *Vorscreening* mittels sogenannter Subtraktionssonden vorgeschaltet, um den Hintergrund zu minimieren (Wang und Brown, 1991). Diese Subtraktionssonden wurden durch Markierung der nested PCR-Produkte erhalten. Klone, die hierbei als differentiell bestätigt wurden, wurden anschließend mit Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Maus-spezifischen Sonden, die aus der jeweiligen PolyA-RNA gewonnen wurden, gescreent. Mit Hilfe dieses zweifachen *Screening*-Verfahrens wurden somit differentielle Transkripte in der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen bestätigt. Auf den *dot blots*, die mit der Cx32-KN-Sonde hybridisiert wurden, sollten nur KN-Klone (Klone aus dem Ansatz mit KN als Tester) Signale geben und entsprechend auf den *dot blots*, die mit der Cx32-WT-Sonde hybridisiert wurden, nur WT-Klone (Klone aus dem Ansatz mit WT als Tester). Die mittels *Screening* bestätigten Klone wurden sequenziert und anschließend über Homologiesuche in Genbanken identifiziert.

2.16.1 Klonierung der differentiellen cDNAs

Die Klonierung der differentiellen cDNAs erfolgte nach Anleitung des TA Cloning[®] Kits von Invitrogen. Die Hitzeschock-Transformation fand dabei in kompetente INVαF' E.coli-Zellen statt. Der Ansatz wurde auf Ampicillin-Agarplatten mit 40 µl einer 40 mg/ml Lösung X-Gal ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und die Kolonien einer Blau-Weiß-Selektion unterworfen. Die Kolonien, bei denen das Gen für die β-Galaktosidase durch Einklonierung des *Inserts* unterbrochen wurde, stellten sich weiß dar, da hier das Substrat X-Gal nicht mehr in einen blauen Farbstoff umgesetzt werden konnte.

2.16.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente der Amplifizierung der klonierten *Inserts*. Für diese PCR wurden nach der Klonierung aus jedem Ansatz (KN als Tester, WT als Tester) insgesamt 310 weiße Klone gepickt. Jeder dieser Klone wurde in 1 ml LB-Medium mit Ampicilin (0,1 mg/ml) für mindestens 4 h bei 37°C angezüchtet.

Von dieser Kultur wurde anschließend 1 µl in folgender PCR eingesetzt:

H ₂ O	12,6 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl
Nested-PCR-Primer 1 (10 µM)	1 µl
Nested-PCR-Primer 2R (10 µM)	1 µl
Bakterienkultur	1 µl
Tag-Polymerase (1 U/µl)	2 µl
	20 µl

Die PCR-Reaktion fand im Biometra Uno Thermoblock statt, dessen Deckelheizung auf 110°C eingestellt wurde, und wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tabelle 8: Temperaturprogramm für Kolonie-PCR.

Gen	Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
Differentielles Transkript	94°C, 30 s	30	94°C, 30 s	95°C, 30 s	68°C, 3 min

Nach der Kolonie-PCR wurden 5 µl der amplifizierten *Inserts* auf einem 2 %igen Agarosegel, das mit TBE-Puffer angesetzt wurde, wie unter 2.10.1.1 beschrieben, überprüft.

2.16.3 cDNA-Array (*dot blot*)

Für die cDNA-Arrays (*dot blot*) wurden die Produkte der Kolonie-PCR als einzelne Tropfen auf Filter (positiv geladene Nylonmembran) aufgebracht, so dass je zwei Filter identisch waren. Es wurden jeweils 3 µl PCR-Produkt mit 2 µl 0,3N NaOH/15 % Ficoll vermischt und dann 1,5 µl der Gemisches auf die beiden Filter an gleichen Positionen aufgetropft. Die DNAs wurden anschließend bei 1200 J/cm² auf den Filtern fixiert. 700 µl der in LB-Medium angezüchteten Bakterien wurden mit 500 µl 50 %iger Glycerinlösung vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und als Stocks bei -70 °C gelagert.

2.16.4 Synthese von Subtraktions- und cDNA-Sonden

Die Synthese der Subtraktionssonden (*Vorscreening*) erfolgte aus den PCR-Produkten, die mit den Nested-PCR-Primern 1 und 2R erhalten wurden (zweite PCR-Reaktion bei der subtraktiven Hybridisierung). Von diesen PCR-Produkten wurden zuerst die Adapter entfernt, da die zu screenenden DNAs ebenfalls Adapter an den Enden aufwiesen. Anschließend wurden 100 µl PCR-Produkt mit 100 µl Phenol/Chlorform (25:24) extrahiert, mit 40 µl 4M NH₄OAc und 300 µl 95 %igen Ethanol gefällt und dann in 15 µl H₂O aufgenommen. Der Restriktionsverdau wurde in einem 20 µl-Ansatz für 160 min bei 37°C mit 10 Units RsaI und anschließend im gleichen Ansatz mit 10 Units SmaI für 150 min bei 30°C durchgeführt. Die Entfernung der Adapter erfolgte mit dem *Qiaquick PCR Purification Kit* von Qiagen. Für die Sondenmarkierung wurden die gereinigten DNAs einer Digoxigenin-Markierung unterworfen, die mit dem *DIG DNA Labeling and Detection Kit* von Roche durchgeführt wurde.

Die Synthese der cDNA-Sonden erfolgte aus der PolyA-RNA, die auch für die subtraktive Hybridisierung eingesetzt wurde. Hierzu wurden folgende Reagenzien 60 min bei 42°C inkubiert und anschließend 15 min bei 70°C abgestoppt:

PolyA-RNA (1 µg/µl)	1 µl
H ₂ O	23,5 µl
5x RT-Puffer	8 µl
dNTP labelling mixture (DIG-dUTP)	4 µl
Oligo(dT) ₁₅ (100 µM)	2 µl
DTT (100 mM)	1 µl
SuperScript™ RNase H ⁻ RT (200 U/µl)	0,5 µl
	<hr/>
	40 µl

Die Sonden wurden nach der Anleitung des *DIG DNA Labeling and Detection user manuals* und der zusätzlichen Verwendung des *DIG Wash and Block Buffer Sets* von Roche durch Auftropfen auf eine Nylonmembran und einen immunologischen Detektionsnachweis auf ihre Markierungseffizienz überprüft.

2.16.5 cDNA-Array-Hybridisierung

Die cDNA-Array-Hybridisierung erfolgte nach der Anleitung des *DIG DNA Labeling and Detection user manuals* und unter Verwendung der Hybridisierungslösung *DIG Easy Hyb* von Roche. Nach der Prähybridisierung fand die eigentliche Hybridisierung der cDNA-Arrays mit 3,5 ml Hybridisierungslösung, die zuvor mit frisch denaturierter Sonde (25 ng/ml *DIG Easy Hyb*) versetzt wurde, über Nacht bei 50°C statt. Bei der Hybridisierung mit den Subtraktionssonden wurden zusätzlich je 10 µl der Nested-PCR-Primer 1 und 2R der Hybridisierungslösung beigelegt. Dadurch sollten restliche Adaptersequenzen abgedeckt und zusätzlich der Hintergrund minimiert werden. Die immunologische Detektion erfolgte anschließend gemäß des *DIG DNA Labeling and Detection user manuals* und unter Verwendung des *DIG Wash and Block Buffer Sets* von Roche.

2.16.6 Sequenzierung und BLAST-Search

Klone, die beim *Screening* als differentiell exprimiert aufgefallen waren, wurden bei der Firma Seqlab, Göttingen, sequenziert. Hierzu wurden aus den Stocks dieser Klone über Kolonie-PCR (siehe 2.16.2) die klonierten *Inserts* amplifiziert und über *Qiaquick PCR Purification Kit* von Qiagen gereinigt. Es wurden 3,5 µl gereinigtes PCR-Produkt mit je 2 µl Nested-PCR-Primer 1 und 2R (zwei Ansätze) und 1,5 µl H₂O versetzt und anschließend zur Sequenzierung geschickt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin mit dem BLAST-Programm von NCBI auf Homologien mit bekannten Genen untersucht.

2.17 Genexpressionsanalysen mit der Methode der Affymetrix-Microarray-Technologie

Es wurden Genexpressionsanalysen mit der Affymetrix-Microarray-Technologie in der IZKF Microarray Facility in Tübingen durchgeführt. Hierbei wurde der *Murine Genome Chip U74A*, der etwa 12.000 *Gene/probe sets* umfaßt, für die Genexpressionsanalysen in Lebernorgewebe von PB-behandelten und unehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen eingesetzt (Affymetrix-Microarray-Analyse 1). Der *Murine Genome Chip 430A 2.0* mit etwa 22.600

Gene/*probe sets* kam bei den Genexpressionsanalysen in β -Catenin- bzw. Ha-ras-mutierten Lebertumoren von Cx32-WT-Mäusen zum Einsatz (Affymetrix-Microarray-Analyse 2).

Auf den Affymetrix-Chips wird jedes Gen/*probe set* in 11-20 unterschiedlichen Fragmenten (*probe cells*) präsentiert. Ein Fragment besteht aus ca. 25 Nukleotiden und existiert in zwei Formen, *Perfect Match* (komplementär zur entsprechenden Sequenz der Proben-cRNA) und *Miss Match* (nicht vollständig komplementär zur entsprechenden Sequenz der Proben-cRNA, da hier ein Nukleotid ausgetauscht wurde). Die für die Microarray-Experimente benötigte Gesamt-RNA wurde aus Mausleber unter Verwendung von Trizol von GibcoBRL isoliert, nach dem Qiagen *RNA-Clean-up* Protokoll zusätzlich aufgereinigt und anschließend an die Microarray Facility übergeben. Dort wurde die Gesamt-RNA über eine RT-Reaktion unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primer mit vorgeschaltetem T7-Promotor in cDNA umgeschrieben. Mittels einer RNA-Polymerase-Reaktion wurde dann die cDNA in cRNA umgewandelt, wobei biotinylierte Nukleotide für die Synthese verwendet wurden. Nach Fragmentierung der cRNA erfolgte die Hybridisierung der Chips. Die Färbung wurde unter Verwendung von Phycoerythrin-gekoppelten Streptavidin durchgeführt. Zur Detektion der Signale wurde der Agilent Gene Array Scanner 2500 eingesetzt. Die Daten, die hierbei erhalten worden sind, wurden anschließend in Zusammenarbeit mit unserer Kooperationspartnerin Dr. C. Ittrich von der zentralen Einheit für Biostatistik des DKFZ in Heidelberg ausgewertet.

2.17.1 Statistische Auswertung der Affymetrix-Genexpressionsanalysen

Die statistische Auswertung der Affymetrix-Genexpressionsanalysen erfolgte durch Frau Dr. C. Ittrich unter Verwendung der *gcrma software library* (Version 1.1.0) des *BioConductor Projects* (www.bioconductor.org). Für die Expressionsintensitäten der einzelnen Gene wurde ein Schätzer bestimmt und in logarithmischer Skalierung angegeben (Wu and Irizarry, 2004). Die statistische Auswertung der geschätzten Expressionsintensitäten erfolgte dann unter Verwendung eines linearen Modells. Diese Verfahrensweise bei der statistischen Auswertung berücksichtigt sowohl Ausmaß als auch Signifikanz von

interessanten Effekten. Die Analyse wurde mit der *software package R, version 1.8.1* (R-Development-Core-Team, 2003) zusammen mit der *Design software library* (Harell, 2001) durchgeführt.

2.17.2 RNA-Clean up

Die Gesamt-RNA, die für die Genexpressionsanalysen mit der Affymetrix-Microarray-Technologie eingesetzt wurde, musste einen sehr hohen Reinheitsgrad aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Gesamt-RNA nach der Isolierung zusätzlich aufgereinigt gemäß dem "*RNeasy Mini Protocol for RNA Clean-up*" von Qiagen (RNeasy[®] Mini Handbook 06/01, S.79, Qiagen).

2.18 Western-Blot

Die Western-Blot-Analysen dienten der Verifizierung von Kandidatengen auf Proteinebene, die in Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix-Microarray-Technologie eine differentielle Expression zeigten.

2.18.1 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung erfolgte unter Verwendung einer Kugelmühle. Die Bestandteile der Kugelmühle (Teflongefäß, Teflondeckel, Metallkugel, Pinzette etc.) wurden gründlich in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Zum Homogenisieren eines Leberstückchens von der Größe eines Stecknagelkopfes wurden 500 µl Homogenisierungspuffer in das vorgekühlte Teflongefäß pipettiert und das Leberstückchen und die Metallkugel dazugegeben und das Ganze 30 s bei höchster Stufe homogenisiert. Das entstandene Pulver wurde auf Eis aufgetaut und dabei mehrmals gevortext. Die aufgetauten Proben wurden unter Eiskühlung mit Ultraschall beschallt. Anschließend wurde 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.18.2 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge der Leberhomogenate wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Bei dieser kolorimetischen Methode zur quantitativen Proteinbestimmung findet eine Bindung des Farbstoffes Coomassie[®] Brilliant Blue G 250 an das Protein

statt, wobei die Art des Proteins entscheidend für die Stärke der Bindung ist. Die Messung erfolgt photometrisch bei 595 nm, dem Absorptionsmaximum des Protein-Farbstoff-Komplexes. Das Absorptionsmaximum des ungebundenen Farbstoffes liegt dagegen bei 465 nm.

Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

H ₂ O	798 µl
Proteinlösung	2 µl
Farbstoff-Konzentrat	200 µl
	<hr/>
	1000 µl

Nach gutem Durchmischen des Ansatzes, wurde nach 1-2 min die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichgerade ermittelt, wobei BSA als Proteinstandard eingesetzt wurde.

2.18.3 SDS-Page

Die Auftrennung der Proteine erfolgte gemäß der Methode von Lämmli (1970). In eine Elektrophoresekammer wurde ein Trenngel mit der gewünschten Konzentration Acrylamid eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 1-2 h war das Trenngel polymerisiert, das Isopropanol wurde abgeschüttet und auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Das Sammelgel benötigte etwa 1 h für die Polymerisation. Ein bestimmtes Volumen der Probe, etwa 8-16 µl, mit einem Proteingehalt von 100 µg wurde mit Homogenisierungspuffer auf 2 µg/µl verdünnt, dann 1:1 mit 2x Lämmli vermischt und anschließend 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Abkühlung wurden die Proben gevortext und dann in die Geltaschen pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass in jeder Geltasche die gleiche Proteinmenge vorhanden war. In den beiden äußeren Geltaschen wurden zusätzlich 6 µl eines farbig markierten Protein-Größenstandards eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V bis die Proteinproben das Sammelgel durchlaufen hatten und die Bromphenolblau-Wanderungsfront das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach Größe der zu untersuchenden Proteine und der Konzentration des Acrylamidgels.

2.18.4 Blot

Für den Transfer der Proteine auf eine Membran wurde zunächst eine Nitrocellulose-Membran auf Trenngelgröße zurechtgeschnitten, in Methanol kurz eingeweicht (etwa 30 s) und dann in 1x Transferpuffer äquilibriert. Ein Blotting-Tank wurde mit 1x Transferpuffer gefüllt, die darin enthaltene Blotkammer herausgenommen und geöffnet. Die Kathodenseite (schwarze Seite) wurde nach unten gelegt und wie folgt beschichtet:

Schwammtuch
Feuchtes Whatman Filterpapier
Trenngel
Nitrocellulose-Membran
Feuchtes Whatman Filterpapier
Schwammtuch

Blasen, die bei der Schichtung entstanden waren, wurden entfernt. Der Blotvorgang fand bei 400 mA und 4°C statt und dauerte 150 min. Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Blotkammer genommen und zwischen zwei Whatman Filterpapieren getrocknet.

2.18.5 Antikörper-Inkubation

Die trockene Membran wurde in Methanol befeuchtet, 2 min in PBS/T gespült und schließlich 1,5 h in Blockpuffer inkubiert. Der Blockpuffer wurde entfernt und daraufhin der Primärantikörper in 15 ml Blockpuffer im Verhältnis 1:500 bis 1:1000 zugegeben (IGFBP1: 1:1000; PB3a: 1: 1000; Actin: 1: 500). Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend folgten drei 5-minütige Waschschrte mit PBS/T und einmalig 15 min mit Blockpuffer. Der Sekundärantikörper wurde in Blockpuffer 1:10000 verdünnt und daraufhin die Membran in der Lösung des zweiten Antikörpers 0,5-1 h lang geschüttelt. Danach folgten wieder drei 5-minütige Waschschrte mit PBS/T und zwei 2-minütige Waschschrte mit 1x Assay Puffer. Die Membran wurde auf eine Einschweißfolie gelegt, vorsichtig mit 750 µl CDP-Star[®]-Reagenz beträufelt und

anschließend eingeschweißt. Nach etwa 1 h wurde die Membran mit der CSC-Kamera aufgenommen. Aus der Wanderungstrecke des detektierten Proteins wurde dessen Molekulargewicht durch Vergleich mit dem Protein-Molekulargewichtsstandard ermittelt. Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mit der Software TINA 2.09a (Raytest, Straubenhardt).

3 Ergebnisse

Um die Rolle der Connexine im Prozess der Leberkrebsentstehung bzw. die Wirkungsweise des PB als Tumorpromotor in der Mausleber näher zu untersuchen, wurde als Tiermodell die Cx32-KN- und als Kontrolle die Cx32-WT-Maus eingesetzt. Aus der Literatur gibt es bereits Hinweise, dass PB die Expression verschiedener Gene in der Leber beeinflussen kann (Frueh et al., 1997; Shibutani et al., 2002; Garcia-Allan et al., 2000; Ueda et al., 2002). Möglicherweise kann ein Expressionsprofil Aufschluss über die Wirkungsweise von PB bzw. die Rolle der Connexine im Prozess der Krebsentstehung geben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Genexpressionsanalysen in der Leber von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen durchgeführt. Für diese Genexpressionsanalysen wurde sowohl Lebernorgewebe aus Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen als auch Tumorgewebe aus der Leber von Cx32-WT-Mäusen, das entweder Ha-ras- oder β -Catenin-mutiert war, eingesetzt. Für die Analysen wurde Gesamt- bzw. PolyA-RNA aus den Tumoren bzw. den Lebern isoliert. Die Methoden, die hierbei zum Einsatz kamen, waren die Filterhybridisierung nach Clontech, die subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis nach Clontech und die Affymetrix-Microarray-Technologie.

3.1 Körper- und relatives Lebergewicht der Versuchsmäuse

Die Versuchstiere für Experiment 1 (Filterhybridisierung) und 2 (subtraktive Hybridisierung) wurden während der eigenen Diplomarbeit 2001 gezüchtet und getötet. Die Mäuse für Experiment 3 (Affymetrix-Microarray-Analyse 1) wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit gezüchtet und getötet. Die Versuchsmäuse für Experiment 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) entstammten dem „PRO“-Versuch, der von O. Mönnikes 1999 durchgeführt wurde (Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000).

Das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere war bei den Cx32-WT-Mäusen im Vergleich zu den Cx32-KN-Mäusen leicht erhöht. Von der PB-Behandlung (PB-haltiges Futter: 0,05 %, w/w) wurde es nicht beeinflusst. Bei der

Ergebnisse

Betrachtung des relativen Lebergewichts waren dagegen Unterschiede festzustellen. Verfüttertes PB führte zu einer Erhöhung des relativen Lebergewichts. Bei den relativen Lebergewichten unterschieden sich die Cx32-WT-Mäuse kaum von den Cx32-KN-Mäusen (siehe Tabelle 9, Tabelle 10 und Abbildung 4).

Tabelle 9: Mäuse (Lebernorgane), die für Experiment 1 (Filterhybridisierung), 2 (subtraktive Hybridisierung), 3 (Affymetrix-Microarray-Analyse 1) und 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) eingesetzt wurden.

Tier- bezeichnung	Geno- typ	Behand- lung*	Tiergewicht [g]	Lebergewicht [g]	Rel. Leber- gewicht [%]
Experiment 1 und 2					
Cx32KN 1	Cx32-KN	-	24,1	1,1	4,6
Cx32KN 2	Cx32-KN	-	22,2	1,0	4,5
Cx32WT 3	Cx32-WT	-	25,6	1,0	3,9
Cx32WT 4	Cx32-WT	-	29,2	1,4	4,8
Cx32KN 5	Cx32-KN	+PB	29,2	2,2	7,5
Cx32KN 6	Cx32-KN	+PB	31,7	2,0	6,3
Cx32WT 7	Cx32-WT	+PB	37,5	2,6	6,9
Cx32WT 8	Cx32-WT	+PB	32,7	2,1	6,4
Experiment 3					
A	Cx32-KN	+PB	23,7	1,6	6,8
B	Cx32-KN	+PB	23,3	1,6	6,9
C	Cx32-KN	+PB	22,6	1,6	7,1
D	Cx32-KN	-	23,4	1,33	5,7
E	Cx32-KN	-	22,8	1,3	5,7
F	Cx32-KN	-	23,9	1,3	5,4
G	Cx32-WT	+PB	24,6	1,7	6,9
H	Cx32-WT	+PB	26,0	1,9	7,3
I	Cx32-WT	+PB	28,1	2,1	7,5
J	Cx32-WT	-	27,4	1,4	5,1
K	Cx32-WT	-	25,8	1,4	5,4
L	Cx32-WT	-	25,6	1,4	5,5
Fortsetzung Tabelle 9 nächste Seite					

Fortsetzung Tabelle 9					
Experiment 4**					
Pro 61 (NG 1)	Cx32-WT	-	37,1	1,4	3,8
Pro 63 (NG 2)	Cx32-WT	-	44,3	1,9	4,3
Pro 86 (NG 3)	Cx32-WT	-	38,3	1,4	3,7

*PB: 0,05 % (w/w);**Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000

Tabelle 10: Mäuse (Lebertumorgewebe*), die für Experiment 4 (Affymetrix-Microarray-Analyse 2) eingesetzt wurden.

Tierbezeichnung	Tumor** (g)	Genotyp	Behandlung***	Tiergewicht [g]	Lebergewicht [g]	Rel. Lebergewicht [%]
Pro 108 (Ras 1)	T1 (0,2)	Cx32-WT	-	44,1	2,4	5,4
Pro 108 (Ras 2)	T2 (0,1)	Cx32-WT	-			
Pro 121 (Ras 3)	T2 (0,2)	Cx32-WT	-	37,6	3,0	8,0
Pro 75 (Cat 1)	T2 (0,3)	Cx32-WT	+PB	33,1	2,9	8,8
Pro 100 (Cat 2)	T1 (0,7)	Cx32-WT	+PB	32,3	2,8	8,7
Pro 112 (Cat 3)	T4 (0,2)	Cx32-WT	+PB	39,4	3,0	7,6

*Dissertation von O. Mönnikes, 2000; Moennikes et al., 2000;**Mutationstyp der Tumoren siehe Tabelle 4;***PB: 0,05 % (w/w)

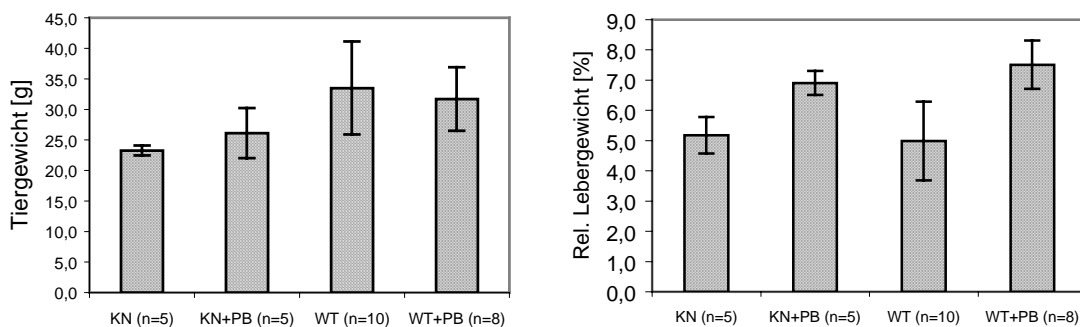


Abbildung 4: Körper- und relatives Lebergewicht der Versuchstiere. Die Balken repräsentieren die arithmetischen Mittel der Körper- bzw. relativen Lebergewichte der jeweiligen Versuchsgruppe (Cx32-KN-Maus +/- PB und Cx32-WT-Maus +/- PB). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Die Anzahl der Tiere ist mit n angegeben.

3.2 Genotypisierung der Versuchsmäuse

Nach der Tötung der Mäuse und Entnahme der Lebern wurden die jeweiligen Genotypen mittels PCR nochmals bestätigt. Hierzu wurde die aus den Mauslebern isolierte DNA unter Verwendung spezifischer Primerpaare für das Cx32-WT-Allel oder Cx32-KN-Allel amplifiziert (Moennikes et al., 1999). Für das Cx32-WT-Allel wurde ein PCR-Produkt mit einer Länge von 550 bp erhalten, für das Cx32-KN-Allel ein PCR-Produkt mit einer Länge von 414 bp. In Abbildung 5 wird beispielhaft die Genotypisierung von 4 Mäusen gezeigt.

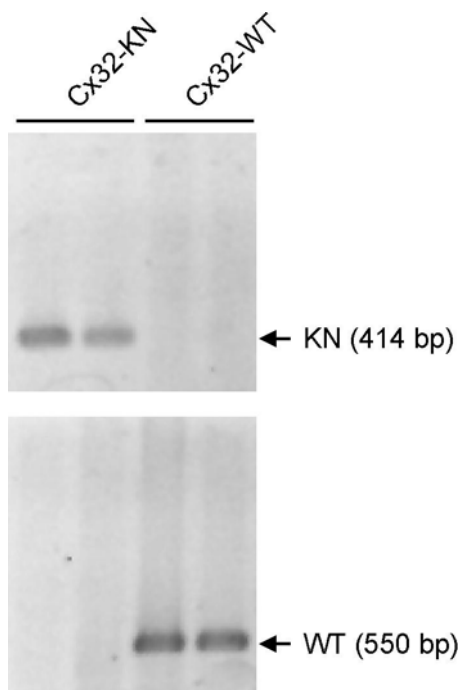


Abbildung 5: Cx32-Genotypisierung von 4 C3H-Mäusen mittels PCR.

3.3 Analytisches Agarosegel der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNAs, die aus den Lebern der PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäuse isoliert wurden, wurden nach dem DNaseI-Verdau mittels 1 %iger Agarosegele überprüft. Hierbei sollte sich zeigen, ob die Gesamt-RNA frei von Kontamination mit genomischer DNA war, und ferner, ob die RNA intakt war. Entscheidend für die Integrität der RNA waren dabei die Fragmente, die auf die 18S und 28S RNA zurückzuführen sind. Die Intensitäten

der 18S und 28S RNA-Banden sollten dabei ein Verhältnis von 1:1.5-2.5 zeigen (siehe Abbildung 6)

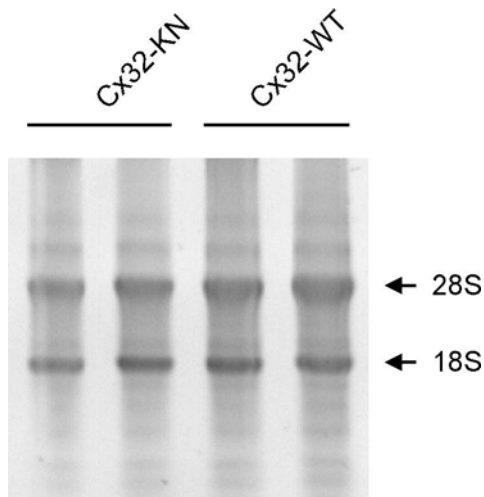


Abbildung 6: Auftrennung der Gesamt-RNA aus 2 Cx32-KN- und 2 Cx32-WT-Mäusen.

Die analytischen Agarosegele zeigten nach dem DNaseI-Verdau die beiden erwarteten, charakteristischen, diskreten RNA-Banden bei 1.9 und 4.5 kb, die die eukaryontische ribosomale 18S und 28S RNA repräsentieren. Das Auftreten dieser diskreten Banden bestätigte, dass die isolierte RNA intakt war. Auch das Verhältnis der Bandenintensitäten 18S zu 28S lag annähernd im Bereich von 1:1.5-2.5. Zusätzliche Banden, die bei kleineren kb-Werten auftraten, waren auf ribosomale 5S RNA und tRNA zurückzuführen. Die Effektivität des DNaseI-Verdau wurde bestätigt, da bei höheren kb-Werten keine Banden zu sehen waren, die auf eine noch vorhandene Kontamination mit genomischer DNA hingewiesen hätte.

3.4 Analytisches Agarosegel der RT-PCR zur Kontrolle der RNA-Integrität

Um zu gewährleisten, dass die isolierten Gesamt-RNAs wirklich intakt waren, wurden diese nach dem DNaseI-Verdau mittels RT-PCR nochmals sowohl auf ihre Integrität als auch auf Kontamination mit genomischer DNA überprüft.

Hierzu wurden zuerst die Gesamt-RNAs in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde das Ha-ras-Gen über spezifische Primer amplifiziert. Dieses Gen wurde gewählt, da seine Expressionsrate in der Zelle vergleichsweise niedrig ist und

entsprechende Primer im Labor zur Verfügung standen. Wurde das Fragment, das dem über die spezifischen Primer definierten Genabschnitt entsprach, trotz der geringen Zahl an mRNAs amplifiziert, so konnte davon ausgegangen werden, dass der Großteil der RNA intakt vorlag.

Die eingesetzten spezifischen Primer-Kombinationen waren Intron-überspannend. Das bedeutet, dass bei einer DNA-Kontamination eine zusätzliche Bande bei höheren bp-Werten zu sehen gewesen wäre (siehe Abbildung 7).

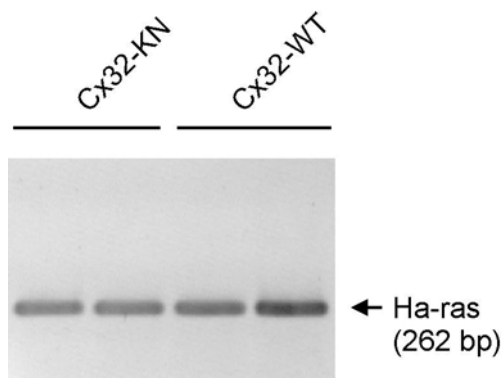


Abbildung 7: Amplifizierung des Ha-ras-Gens. Die Gesamt-RNA für die RT-PCR wurde aus den Lebern von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen isoliert.

Die Größe des erhaltenen RT-PCR-Produkts aus der Mausleber-RNA lag bei 262 bp und entsprach damit dem Ha-ras-Gen. Da keine weitere Bande bei höheren bp auftraten, konnte eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden.

3.5 Filterhybridisierung nach Clontech

Die Filterhybridisierung diente der Analyse der differentiellen Genexpression in PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen. Das Reagenzienset, das hierbei zum Einsatz kam, war der *AtlasTM Mouse 1.2 Array Kit* der Firma Clontech. Der darin enthaltene *AtlasTM mouse 1.2 Array* bestand aus einer Nylonmembran, auf der punktförmig 1176 Maus cDNAs, 9 *housekeeping genes* als Kontroll-cDNAs und 3 Negativkontrollen immobilisiert waren. Welche Gene auf dem Filter aufgebracht waren, ist dem *AtlasTM Mouse 1.2 Array Kit* zu entnehmen. Die Positionen der cDNAs auf dem Filter sind dem Anhang zu entnehmen.

3.5.1 Messwerte der radioaktiv markierten cDNA

Für die Hybridisierung der Filter wurde die isolierte Gesamt-RNA bzw. PolyA-RNA enzymatisch in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben und diese anschließend im Scintillationszähler vermessen. Für die Hybridisierung sollte gemäß der Clontech-Vorschrift die Radioaktivität für cDNA aus Gesamt-RNA im Bereich von $2 \cdot 10^6$ cpm und für cDNA aus PolyA-RNA im Bereich von $5 \cdot 10^6$ cpm liegen. Da aber das Umschreiben mit der *Power ScriptTM* reversen Transkriptase zum Teil weit höhere cpm-Werte ergab, wurde getestet, ob auch größere Radioaktivitätsmengen für die Hybridisierung eingesetzt werden können. Das birgt die Gefahr in sich, dass durch die Zunahme des unspezifischen Hintergrundes die Schwärzung des Filters verstärkt wird und die einzelnen hybridisierten Spots damit nicht mehr zu detektieren sind. Der Test ergab aber, dass auch höhere cpm-Werte für die Hybridisierung eingesetzt werden können, ohne dass die Schwärzung des Filters das Ergebnis negativ beeinflusst. Die für die Hybridisierung eingesetzten cpm-Werte lagen im Bereich von $3 \cdot 10^6$ cpm. Als Leerwert wurde der NE-Puffer aus dem Reagenzienset vermessen, mit dem die cDNA-Proben bei der Aufreinigung von den Zentrifugationssäulchen eluiert wurden. cDNA-Messwerte, die beispielsweise aus Gesamt- bzw. PolyA-RNA erhalten wurden, sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Messwerte der radioaktiven cDNA aus Mausleber-Gesamt-RNA.

Probe	Messwert [cpm/100µl Eluat]
Cx32KN 1	$33,8 \cdot 10^6$
Cx32WT 3	$31,7 \cdot 10^6$
Cx32KN 5 (+PB)	$52,2 \cdot 10^6$
Cx32WT 7 (+PB)	$39,7 \cdot 10^6$

Tabelle 12: Messwerte der radioaktiven cDNA aus Mausleber-PolyA-RNA.

Probe	Messwert [cpm/100µl Eluat]
Cx32KN 2	$8 \cdot 10^6$
Cx32WT 4	$13 \cdot 10^6$
Cx32KN 6 (+PB)	$11 \cdot 10^6$
Cx32WT 8 (+PB)	$13 \cdot 10^6$

3.5.2 Hybridisierung der *AtlasTM mouse 1.2 Arrays*

Die Hybridisierung der *AtlasTM mouse 1.2 Arrays* erfolgte in vier Hybridisierungssätzen, wobei sich ein Satz aus vier Filtern zusammensetzte. Die Filter wurden mit cDNA aus RNA von Cx32-KN-, Cx32-WT-, PB-behandelten Cx32-KN- und PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen hybridisiert. Zwei der vier Hybridisierungssätze wurden mit cDNA aus Gesamt-RNA hybridisiert, die anderen zwei Sätze mit cDNA aus PolyA-RNA (Tabelle 13). Die Gesamt-RNA wurde aus den Lebern der Mäuse mit der Bezeichnung Cx32KN 1, Cx32WT 3, Cx32KN 5, Cx32WT 7 isoliert, die PolyA-RNA aus den Lebern der Mäuse mit der Bezeichnung Cx32KN 2, Cx32WT 4, Cx32KN 6, Cx32WT 8 (siehe Tabelle 9).

Tabelle 13: Filterbezeichnungen bei den Hybridisierungsexperimenten.

	cDNA aus Gesamt-RNA		cDNA aus PolyA-RNA	
	1. Satz	2. Satz	3. Satz	4. Satz
Filter 1: KN	1A	2A	3A	4A
Filter 2: WT	1B	2B	3B	4B
Filter 3: KN+PB	1C	2C	3C	4C
Filter 4: WT+PB	1D	2D	3D	4D

Die radioaktiv markierten cDNAs wurden mit den entsprechenden Filtern hybridisiert und die Filter nach dem Waschen für mindestens 10 Tage exponiert. Die Vermessung der Radioaktivität auf den hybridisierten Filtern erfolgte über das Phosphor-Imager-System der Firma Fuji. In Abbildung 8 ist ein *AtlasTM mouse 1.2 Array* nach der Hybridisierung dargestellt.

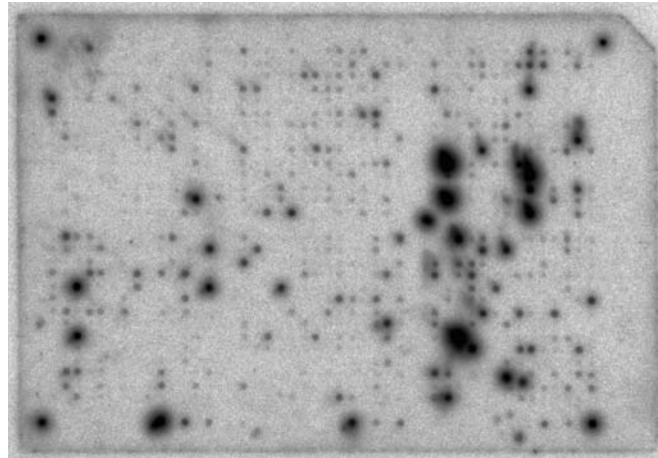


Abbildung 8: *Atlas™ mouse 1.2 Array* hybridisiert mit cDNA aus Mausleber-Gesamt-RNA. Fragmente der zu testenden Gene sind auf diesem Filter jeweils in Einzelspots auf der Nylonmembran immobilisiert.

3.5.3 Auswertung der hybridisierten *Atlas™ mouse 1.2 Arrays*

Die mittels Phosphor-Imager erstellten Autoradiogramme der hybridisierten *Atlas™ mouse 1.2 Arrays* wurden mit Hilfe des Software-Programms *AtlasImage™* der Firma Clontech ausgewertet. Die Filter tragen rechts und links am Rand Orientierungspunkte, mit Hilfe derer ein Raster auf den Filter gelegt wurde, über das den einzelnen Spots eine bestimmte Position zugeordnet werden konnte. Mit dem Programm wurden jeweils zwei Filter miteinander verglichen und dabei die Unterschiede in den Signalintensitäten der entsprechenden Spots berechnet. Berechnet wurde, nach Abzug des Hintergrunds, das Verhältnis der Signalintensitäten der entsprechenden Spots auf beiden Filtern. Die Filter mit der Bezeichnung 1B und 4B konnten nicht ausgewertet werden, da die Signale zu schwach waren.

Die ersten Auswertungen der Hybridisierungssätze zeigten, dass die Signalmuster der Filter, die mit cDNA aus Gesamt-RNA hybridisiert wurden, sehr unterschiedlich im Vergleich zu denen waren, die mit cDNA aus PolyA-RNA hybridisiert wurden. Da aus diesem Grund eine Auswertung der Kreuzvergleiche der vier Hybridisierungssätze nicht möglich war, wurde im weiteren so verfahren, dass der 1. und 2. Hybridisierungssatz getrennt von dem 3. und 4. Hybridisierungssatz ausgewertet wurde. Die Ergebnisse der Auswertungen sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 14: Differentiell exprimierte Gene in der Leber von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen (Filter hybridisiert mit cDNA aus Gesamt-RNA).

Gene, die in Cx32-KN- gegenüber Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimiert sind (Expressionsunterschied relativ zur Expression in Cx32-WT-Mäusen)				
Genbank Nr.	Gen	ind./red.*	Filter-Vergleiche	
M63802	Gap junction beta 1 protein (Gjb1); connexin32 (Cx32)	red.	2B vs 1A 2B vs 2A	
U83628	Defender against cell death 1 (Dad1)	ind.		
Gene, die unter PB in Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimiert sind (Expressionsunterschied relativ zur Expression in unbehandelten Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäusen)				
Genbank Nr.	Gen	ind./red.* (Cx32-KN)	ind./red.* (Cx32-WT)	Filter-Vergleiche
J04696	Glutathione-S-transferase mu2 (Gstm2); Gst5-5		ind.	2B vs 1D 2B vs 2D
J03752	Microsomal glutathione-S-transferase (Mgst1; Gst12)		ind.	
U42554	Sim transcription factor	ind.		1A vs 1C 1A vs 2C 2A vs 1C 2A vs 2C
J03752	Microsomal glutathione-S-transferase (Mgst1; Gst12)	ind.		
J04696	Glutathione-S-transferase mu2 (Gstm2); Gst5-5	ind.		
U44088	T-cell death-associated protein (Tdag51)	red.		
Gene, die unter PB in Cx32-KN- gegenüber Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimiert sind (Expressionsunterschied relativ zur Expression in behandelten Cx32-WT-Mäusen)				
Genbank Nr.	Gen	ind./red.*	Filter-Vergleiche	
U42554	Sim transcription factor	ind.	1D vs 1C	
U44088	T-cell death-associated protein (Tdag51)	red.	1D vs 2C	
U12147	Laminin alpha 2 subunit precursor (Lama2)	red.	2D vs 1C 2D vs 2C	

*ind./red.: induziert / reduziert

Tabelle 15: Differenziell exprimierte Gene in der Leber von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen (Filter hybridisiert mit cDNA aus PolyA-RNA).

Gene, die in Cx32-KN- gegenüber Cx32-WT-Mäusen differenziell exprimiert sind (Expressionsunterschied relativ zur Expression in Cx32-WT-Mäusen)				
Genbank Nr.	Gen	ind./red.*	Filter-Vergleiche	
M63802	Gap junction beta 1 protein (Gjb1); connexin32 (Cx32)	red.	3B vs 3A 3B vs 4A	
U41626	Split hand/foot gene	red.		
M61909	RelA protooncogene; NF-kappa-B transcription factor p65 subunit	ind.		
X56135	Prothymosin alpha (Ptma)	red.		
Gene, die unter PB in Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäusen differenziell exprimiert sind (Expressionsunterschied relativ zur Expression in unbehandelten Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäusen)				
Genbank Nr.	Gen	ind./red.* (Cx32-KN)	ind./red.* (Cx32-WT)	Filter-Vergleiche
X56135	Prothymosin alpha (Ptma)		red.	3B vs 3D 3B vs 4D
U65594	Breast cancer type 2 susceptibility protein (Brca2)		ind.	
J04696	Glutathione-S-transferase mu2 (Gstm2); Gst5-5		ind.	
U12147	Laminin alpha 2 subunit precursor (Lama2)		ind.	
Z22923	Collagen 9 alpha 2 subunit precursor (Col9A2)		ind.	
M61909	RelA protooncogene; NF-kappa-B transcription factor p65 subunit	red.		3A vs 3C 3A vs 4C 4A vs 3C 4A vs 4C
J03752	Microsomal glutathione-S-transferase (Mgst1; Gst12)	ind.		
J04696	Glutathione-S-transferase mu2 (Gstm2); Gst5-5	ind.		
Gene, die unter PB in Cx32-KN- gegenüber Cx32-WT-Mäusen differenziell exprimiert sind (Expressionsunterschied relativ zur Expression in behandelten Cx32-WT-Mäusen)				
Genbank Nr.	Gen	ind./red.*	Filter-Vergleiche	
U41626	Split hand/foot gene	red.	3D vs 3C 3D vs 4C 4D vs 3C 4D vs 4C	
M61909	RelA protooncogene; NF-kappa-B transcription factor p65 subunit	ind.		
U65594	Breast cancer type 2 susceptibility protein	red.		
U12147	Laminin alpha 2 subunit precursor (Lama2)	red.		
Z22923	Collagen 9 alpha 2 subunit precursor (Col9A2)	red.		

*ind./red.: induziert / reduziert

Bei der Auswertung der Filter wurden keine Cytochrom P450-Gene als differentiell exprimiert identifiziert, obwohl dies unter PB zu erwarten gewesen wäre, da auf dem *Mouse 1.2 Array* nur zwei Cytochrom-Isoformen (Cyp1a1 und Cyp1b1) vorhanden waren. Von den Glutathion-S-Transferasen waren ebenfalls nur die Sequenzen von 5 Isoformen auf dem Filter immobilisiert, wobei hier aber zumindest zwei (MGST1 und GSTM2) unter PB als differentiell exprimiert identifiziert werden konnten.

Die Auswertung der Filterhybridisierungen ergab wie erwartet, dass Cx32 in Cx32-KN- und Cx32-WT-Maus differentiell exprimiert war und bestätigte damit unser Tiermodell. Generell war es aber sehr schwierig, eindeutige Signalunterschiede beim Vergleich der Signalintensitäten der Gene auf den Filtern zu identifizieren. Ein Grund dafür war, dass die Filter nach der Hybridisierung einen starken, sehr unterschiedlichen Hintergrund zeigten. Aufgrund dieser Problematik wurden weitere Verfahrenstechniken zur globalen Analyse der differentiellen Genexpression in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen angewandt.

3.6 Subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis

Die Methode, die neben der Filterhybridisierung zur Analyse differentiell exprimierter Gene angewandt wurde, war die subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis. Für diese Analyse wurde isolierte PolyA-RNA aus der Leber von unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen eingesetzt. Die hierfür benötigten Reagenzien wurden dem *PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit* von Clontech entnommen.

Bei der subtraktiven Hybridisierung konnten mit Hilfe einer spezifischen PCR-Amplifikation differentielle Produkte angereichert werden. Diese wurden kloniert und anschließend einem *Screening* mittels cDNA-Array-Hybridisierung unterworfen, wobei cDNA-Sonden aus Lebergewebe von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen eingesetzt wurden. Vor diesem *Screening*-Verfahren wurden die differentiellen Produkte unter Einsatz von Subtraktionssonden vorselektiert. Das *Screening* diente der Überprüfung einzelner Klone auf ihre differentielle Expression. Die Klone, die auf diese Weise bestätigt werden konnten, wurden anschließend sequenziert und identifiziert.

3.6.1 Überprüfung der Effizienz von Ligation und Subtraktion

Die subtraktive Hybridisierung wurde in zwei Ansätzen durchgeführt, wobei Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäuse jeweils einmal als „Tester“ und einmal als „Treiber“ eingesetzt wurden. „Tester“ bezeichnete dabei das System aus dem die differentiell exprimierten Gene angereichert werden sollten. Die spezifische Anreicherung der differentiellen Tester-cDNAs konnte deshalb erfolgen, da zuvor an die Tester-cDNAs Adapter ligiert wurden, die als Primeransatzstellen dienten und eine spezifische Anreicherung über PCR-Amplifikation ermöglichten. Die RNA, die für die subtraktive Hybridisierung benötigt wurde, wurde jeweils aus zwei Tieren gepoolt. Somit stammte die Cx32-KN-RNA aus der Leber der Mäuse mit der Bezeichnung Cx32KN 1 und 2, die Cx32-WT-RNA aus den Lebern der Mäuse mit der Bezeichnung Cx32WT 3 und 4 (siehe Tabelle 9). Im einzelnen setzte sich die Methode der subtraktiven Hybridisierung aus Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthese mit Tester- und Treiber-PolyA-RNA, Restriktionsverdau, Adapterligation, erste und zweite Hybridisierung und erste und *nested* PCR-Amplifikation zusammen (siehe 2.15).

Zur Überprüfung der Effizienz von Adapterligation und Subtraktion wurden zwei Tests durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt sind.

Als Adapterligationstest wurde eine G3PDH-PCR durchgeführt, die zum einen mit zwei G3PDH-spezifischen Primern und zum anderen mit einem G3PDH-spezifischen Primer und einem Adapter-spezifischen Primer durchgeführt wurde. Das PCR-Produkt mit den zwei G3PDH-spezifischen Primern zeigte dabei eine Bande bei 0,5 kb, das mit dem G3PDH- und Adapter-spezifischen Primer eine Bande bei 1,2 kb. Die Bandenintensitäten unterschieden sich nicht mehr als um das Vierfache. Dies zeigte, dass die Ligation der Adapter effizient war.

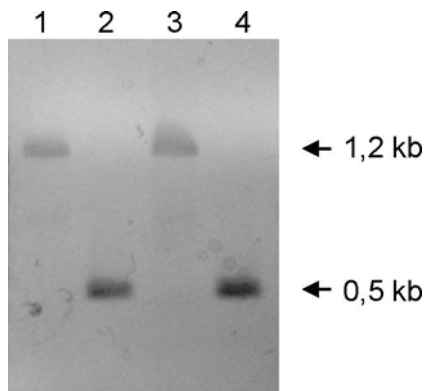


Abbildung 9: Ligationseffizienztest. G3PDH-PCR aus dem Ansatz mit Cx32-KN-Maus als Tester. Spur 1 und 2: PCR mit cDNA ligiert an Adapter 1. Spur 3 und 4: PCR mit cDNA ligiert an Adapter 2R. Spur 1 und 3: PCR mit G3PDH 3'-Primer und PCR-Primer 1 (1,2 kb). Spur 2 und 4: PCR mit G3PDH 3'-Primer und G3PDH 5'-Primer (0,5 kb).

Mit dem Subtraktionseffizienztest wurde überprüft, ob die subtraktive Hybridisierung erfolgreich war. Bei der subtraktiven Hybridisierung sollten als Ergebnis differentiell exprimierte cDNAs angereichert werden. cDNAs, die in Tester und Treiber gemeinsam vorkommen, sollten dagegen reduziert werden. Zur Überprüfung der Effizienz der Subtraktion wurde eine G3PDH-PCR mit subtrahierter und unsubtrahierter cDNA durchgeführt. Dabei wurden nach jeweils 18, 23, 28 und 33 Zyklen Proben entnommen und anschließend analysiert. Abbildung 10 zeigt, dass die durchgeführten Subtraktionen effizient waren, da die G3PDH als ubiquitäres Transkript nach der Subtraktion vermindert vorlag.

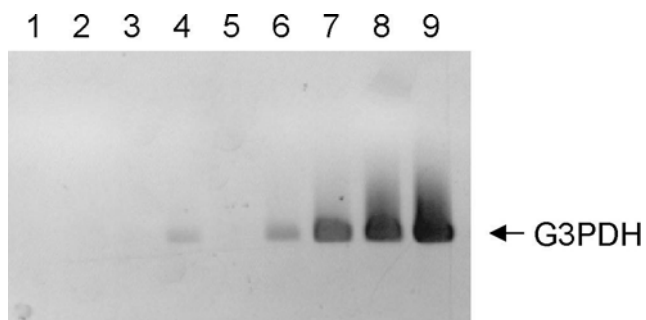


Abbildung 10: Subtraktionseffizienztest. G3PDH-PCR mit subtrahierter (Spur 1-4) bzw. unsubtrahierter (Spur 6-9) cDNA aus dem Ansatz mit Cx32-WT-Maus als Tester. Die PCR-Produkte nach jeweils 18,

23, 28 und 33 Zyklen sind hier gezeigt (Spur 1-4 bzw. 6-9). Erwartungsgemäß ist die ubiquitär exprimierte G3PDH in der subtrahierten Probe reduziert, in der unsubtrahierten Probe konnte sie dagegen angereichert werden.

3.6.2 Screening zur Bestätigung der differentiell exprimierten cDNAs

Konnte über den Subtraktionseffizienztest bestätigt werden, dass die Anreicherung differentieller Produkte aus der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen erfolgreich war, so wurden diese kloniert und anschließend über Kolonie-PCR amplifiziert. Die Größen der klonierten *Inserts* lagen im Bereich von 0,2 bis 1,2 kb. In Abbildung 11 sind einige dieser *Inserts*, die über Kolonie-PCR amplifiziert wurden, exemplarisch dargestellt. Mitunter kam es vor, dass aus einigen Klonen keine *Inserts* amplifiziert werden konnten, oder auch, dass zwei Produkte auftraten, was darauf zurückgeführt werden kann, dass mehr als ein Klon gepickt wurde.

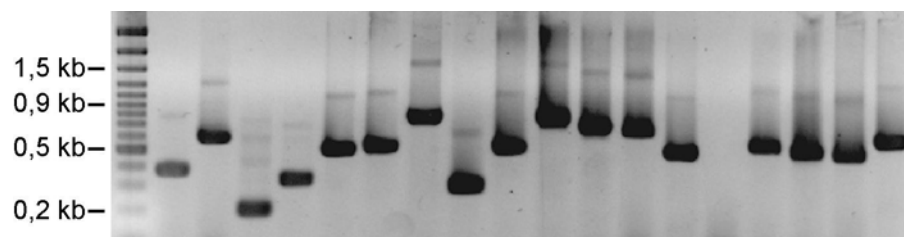


Abbildung 11: Klonierte *Inserts*, die über Kolonie-PCR amplifiziert wurden. Die sehr variablen Größen der klonierten cDNAs zeigen, dass bei der subtraktiven Hybridisierung viele verschiedene differentielle Transkripte angereichert werden konnten.

Mit den über Kolonie-PCR amplifizierten *Inserts* wurde anschließend ein *Screening* mittels cDNA-Array-Hybridisierung (*dot blot*) durchgeführt. Das *Screening* diente der Bestätigung differentiell exprimierter Gene. Dazu wurden die Produkte der Kolonie-PCR als einzelne Tropfen auf Filter (positiv geladene Nylonmembran) aufgebracht, so dass je zwei Filter identisch waren. Auf die obere Hälfte des Filters wurden Kolonie-PCR-Produkte aus dem Ansatz mit KN als Tester (differentiell exprimierte Gene in der Leber der Cx32-KN-Mäuse) aufgetragen, auf die untere Hälfte des Filters dagegen die Kolonie-PCR-Produkte aus dem Ansatz mit WT als Tester (differentiell exprimierte Gene in der Leber der Cx32-WT-Mäuse). In einem *Vorscreening* wurden die Filter zunächst mit KN- bzw. WT-Subtraktionssonden, die aus der Markierung der jeweiligen nested PCR-

Produkte (aus dem Ansatz mit KN als Tester bzw. WT als Tester) erhalten wurden, hybridisiert. Dies diente dazu, um den Hintergrund zu minimieren. In Abbildung 12 sind exemplarisch zwei cDNA-Arrays gezeigt, die mit der KN- bzw. WT-Subtraktionssonde hybridisiert wurden.

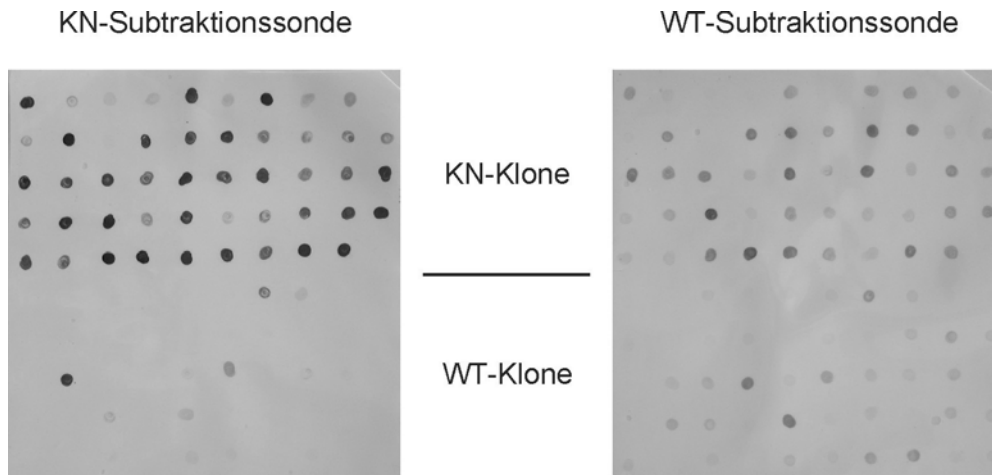


Abbildung 12: cDNA-Arrays, die mit Subtraktionssonden hybridisiert wurden. Auf jeden Array wurden 100 über Kolonie-PCR amplifizierte *Inserts* aus den Ansätzen mit KN als Tester (KN-Klone; differentiell exprimierte Gene in der Leber der Cx32-KN-Mäuse) und WT als Tester (WT-Klone; differentiell exprimierte Gene in der Leber der Cx32-WT-Mäuse) als Tropfen aufgetragen: jeweils 50 KN-Klone auf der oberen Hälfte und 50 WT-Klone auf der unteren Hälfte des Arrays. Die cDNA-Arrays wurden mit der KN-Subtraktionssonde (linker Array) bzw. der WT-Subtraktionssonde (rechter Array) hybridisiert.

In der Leber der Cx32-KN-Mäuse wurden nur die Klone als differentiell bestätigt, die mit der KN-Subtraktionssonde Signale in der oberen Hälfte des linken Arrays gaben, nicht aber in der oberen Hälfte des rechten Arrays. In gleicher Weise wurden in der Leber der Cx32-WT-Mäuse nur die Klone als differentiell bestätigt, die mit der WT-Subtraktionssonde Signale in der unteren Hälfte des rechten Arrays gaben, nicht aber in der unteren Hälfte des linken Arrays. Die Klone, die falsch positiv waren oder auf beiden Arrays keine Signale zeigten, wurden ausgeslektiert.

Insgesamt wurden 310 KN-Klone und 310 WT-Klone mit den Subtraktionssonden gescreent. 122 KN-Klone (39 %) und 64 WT-Klone (21 %) konnten dabei als

differentiell bestätigt werden. Somit war der Anteil der Klone, die mit den Subtraktionssonden bestätigt wurden, unerwartet gering. Grund hierfür war mitunter, dass sich nach den Hybridisierungen mit der WT-Subtraktionssonde größtenteils nur schwache, schwer auswertbare Signale zeigten.

Mit den 186 Klone, die mit dem *Vorscreening* als differentiell bestätigte wurden, erfolgte anschließend das eigentliche *Screening* mit cDNA-Sonden. Diese wurden aus der PolyA-RNA erhalten, die aus der Leber der Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäuse isoliert wurde. Die Auswertung dieses *Screening*-Verfahrens erwies sich als sehr schwierig, da die Signale hier noch viel schwächer waren als beim *Vorscreening*.

Letztendlich konnten anhand des zweifachen *Screening*-Verfahrens 13 KN-Klone und 3 WT-Klone und damit ihre *Inserts* als differentiell exprimierte cDNAs in der Leber von Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäusen bestätigt werden. In Abbildung 13 sind exemplarisch einige dieser Klone dargestellt.

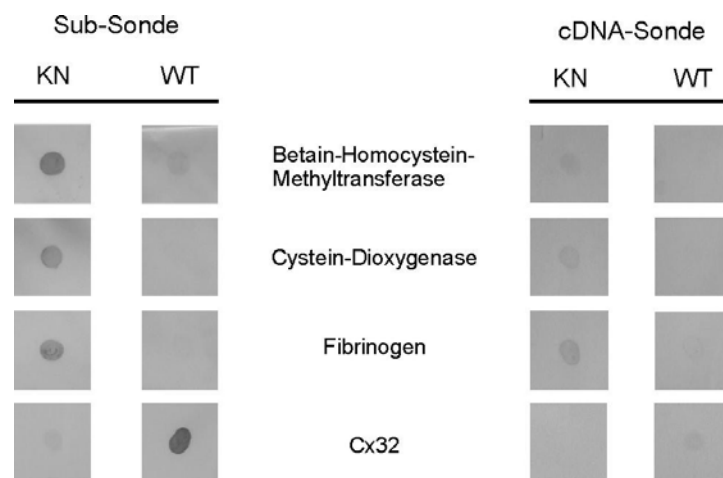


Abbildung 13: Auswahl einiger Klone, die zuerst mit der Subtraktionssonde (Sub-Sonde) und dann mit der cDNA-Sonde als differentiell bestätigt werden konnten. Gezeigt sind links die Signale dieser Klone nach der Hybridisierung mit der KN- bzw. WT-Subtraktionssonde und rechts die Signale dieser Klone nach der Hybridisierung mit der KN- bzw. WT-cDNA-Sonde. Die *Inserts* der bestätigten Klone wurden sequenziert und anschließend die Sequenzen über Homologiesuche identifiziert.

Ergebnisse

Die bestätigten Klone wurden sequenziert und anschließend die erhaltenen Sequenzen mit dem BLAST-Programm von NCBI auf Homologien mit bekannten Genen untersucht. Zwei Gene wurden zweimal identifiziert, so dass sich die Zahl der KN-Klone auf 11 reduzierte. Die identifizierten Gene sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Differentiell exprimierte Gene in der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen.

Gene, die in Cx32-KN- gegenüber Cx32-WT-Mäusen induziert sind	
Genbank Nr.	Gen
NM_145518	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial precursor (Complex I-75KD)
AF021345	Selenoprotein P, plasma, 1 (Sepp1)
U70475	p45 NF-E2 related factor 2 (NRF2)
M69069	Histocompatibility 2, D region locus 1 (H2-D1),
X57780	M.musculus mRNA for mitochondrial gene for subunit I of cytochrome c oxidase
Y09335	Ketohexokinase (Khk),
Z22593	Fibrillarin (Fbl)
BC013638	Cysteine dioxygenase 1, cytosolic,
XM_130960	Fibrinogen, B beta polypeptide (Fgb)
XM_132149	Albumin 1 (Alb1)
AF033381	Betaine-homocysteine methyltransferase (Bhmt)
Gene, die in Cx32-WT- gegenüber Cx32-KN-Mäusen induziert sind	
Genbank Nr.	Gen
M23552	Serum amyloid P-component (Apcs)
X61800	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma (Cebpg),
M63802	Connexin32

Das Gen für Cx32 wurde nur im Ansatz mit WT als Tester identifiziert und bestätigt damit unser Modell von Cx32-KN- und Cx32-WT-Maus.

Die Methode der subtraktiven Hybridisierung auf PCR-Basis kann nur eine „ja/nein-Antwort“ in Bezug auf die differentielle Genexpression geben. Sie

identifiziert somit nur die Gene, die beim Vergleich zweier Systeme eine erhöhte Expression zeigen.

Zur Bewertung der mittels der subtraktiven Hybridisierung identifizierten Gene und um zusätzlich Informationen über den Grad der Genexpressionsveränderung zu erhalten, wurde schließlich die Affymetrix-Microarray-Technologie als ein sehr zuverlässiges Verfahren angewandt.

3.7 Genexpressionsanalysen mit der Methode der Affymetrix-Microarray-Technologie

3.7.1 Genexpressionsanalysen im Lebernorgangewebe von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen

Die Affymetrix-Microarray-Technologie ist ein sehr sensitives Verfahren, das in der Lage ist, eine sehr große Vielzahl von unterschiedlichsten Genen auf ihre Expression hin zu untersuchen. Dieses Verfahren wurde ebenfalls für die Analyse der differentiellen Genexpression in der Leber von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen eingesetzt (Affymetrix-Microarray-Analyse 1). Hierfür wurde Gesamt-RNA aus der Leber von 12 Mäusen, der 3 Cx32-KN-Mäuse mit der Bezeichnung D, E und F, der 3 Cx32-WT-Mäuse mit der Bezeichnung J, K, und L, der 3 mit PB-behandelten Cx32-KN-Mäuse mit der Bezeichnung A, B und C und der 3 mit PB-behandelten Cx32-WT-Mäuse mit der Bezeichnung G, H und I (siehe Tabelle 9) mit dem *Murine Genome Chip U74A* (etwa 12.000 Gene/*probe sets*) hybridisiert. Insgesamt wurden 12 Chips hybridisiert, pro Maus ein Chip.

Die Auswertung der Daten, die mit der Hybridisierung der 12 Affymetrix-Chips erhalten wurden, erfolgte in Zusammenarbeit mit unserer Kooperationspartnerin Dr. C. Ittrich von der zentralen Einheit für Biostatistik des DKFZ in Heidelberg. Die Genexpressionsprofile wurden statistisch ausgewertet, wobei nicht einzelne Gruppen miteinander verglichen wurden, sondern eine globale Analyse über alle Tiere nach einem linearen Modell vorgenommen wurde (siehe 2.17.1). Der Schwellenwert für die Signifikanz der Expression wurde hierbei mit einem p-Wert

kleiner/gleich 0,01 und einem Expressionsunterschied größer/gleich Faktor 2 ($|\log_2 \text{expression ratio}| \geq 1$) festgelegt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach drei Kriterien um den Effekt von Genotyp (Stamm), von PB (Behandlung) oder von beidem, Behandlung und Stamm (Wechselwirkung), auf die Genexpression in der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen herauszustellen. Diese Effekte sind in Abbildung 14 in Form von sogenannten Vulcanoplots gezeigt (Wolfinger et al., 2001).

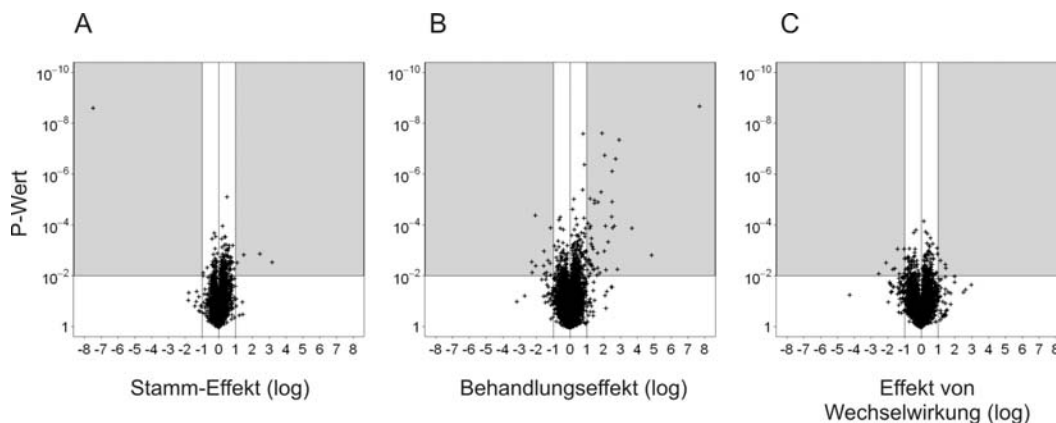


Abbildung 14: Vulcanoplots zur Darstellung des Effekts von Stamm (A), Behandlung (B) und Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm (C) auf die Genexpression in der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen. Jedes Kreuz steht für eines der 12.000 Gene/*probe sets*, die auf dem Microarray präsentiert sind. Die Kreuze auf den grau unterlegten Flächen zeigen die Gene an, deren Expression mit einem p-Wert kleiner/gleich 0,01 und einem Expressionsunterschied größer/gleich Faktor 2 ($|\log_2 \text{expression ratio}| \geq 1$) signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrolle verändert war.

Die größten Effekte auf die Genexpression waren hierbei unter der Behandlung mit PB festzustellen (Abbildung 14 B). 59 Gene zeigten hier eine veränderte Genexpression. Im Vergleich zur Behandlung war der Effekt des Stammes sehr gering (Abbildung 14 A). Nur 5 Gene waren hier in den beiden Genotypen unterschiedlich exprimiert. Eine Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm war bei 12 Genen festzustellen, deren Expression durch PB in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen unterschiedlich beeinflusst wurde (Abbildung 14 C).

Wie sich die Effekte von Behandlung und Stamm auf die Expression einzelner Gene auswirkte, ist in Abbildung 15 exemplarisch für drei Gene dargestellt. Es handelt sich hierbei um Cyp2b10, Cx32 und Igfbp1. Jeder Kreis in der Grafik steht für die Expressionsintensität (in logarithmischer Skalierung) des jeweiligen Gens in einer der 12 Mäuse. Auffallend war zunächst die relativ geringe Streuung der Werte innerhalb einer Gruppe. Die Mittelwerte der Expressionsintensitäten der behandelten Gruppen wurden hier miteinander verbunden und ebenso die Mittelwerte der unbehandelten Gruppen. Dies sollte die behandlungsbedingten Unterschiede in der Genexpression zwischen den Gruppen veranschaulichen.

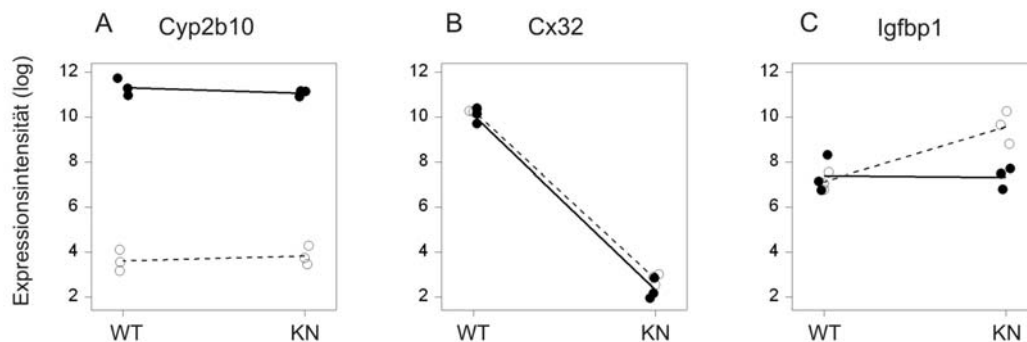


Abbildung 15: Expressionsunterschiede von drei ausgewählten Genen in Cx32-WT- und Cx32-KN-Mäusen. Die Kreise und Punkte geben die Expressionsintensität des jeweiligen Gens in den 12 Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen an (Kreis = unbehandelt; Punkt = PB-behandelt). Die Linien verbinden die jeweiligen Mittelwerte der Expressionsintensitäten der behandelten bzw. unbehandelten Gruppen miteinander (unterbrochene Linie = unbehandelt; durchgezogene Linie = PB-behandelt). Abweichung von der Parallelität der Linien (siehe C) zeigt eine Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm an.

Die Behandlung mit PB führte wie aus Abbildung 15 A ersichtlich zu einer starken Erhöhung der Expression von Cyp2b10 in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen ohne großen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Das *gap junction*-Protein Cx32 war wie zu erwarten in Cx32-KN-Mäusen praktisch nicht nachzuweisen (Abbildung 15 B). Die Behandlung mit PB bewirkte keine Veränderung der Expression von Cx32. Der Effekt einer Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm ist in Abbildung 15 C an der Expression von

Igfbp1 dargestellt. PB beeinflusste hier die Expression von Igfbp1 in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen unterschiedlich, veranschaulicht dargestellt durch die sich kreuzenden Linien in der Abbildung.

Die einzelnen Gene, die aufgrund des Effekts von Stamm, Behandlung oder Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm eine unterschiedliche Genexpression zeigen, sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Liste der Gene/exprimierten Sequenzen, die in ihrer Expression vom Stamm (Cx32-KN- versus Cx32-WT-Maus), der PB-Behandlung oder beidem, Stamm und Behandlung (Wechselwirkung), beeinflusst wurden. Die Diskriminanten sind mit $p \leq 0,01$ und einem Expressionsunterschied größer/gleich Faktor 2 festgelegt.

Gene, die in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimiert sind (Stamm-Effekt), Expressionsunterschied relativ zur Expression in Cx32-WT-Mäusen				
Genbank Nr.	Gen	Funktion	E*	
X81579	Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1)	Regulation von Zellwachstum	2,45	
X56135	Prothymosin alpha (Ptma)	Regulation von Zellwachstum	1,49	
M35725	Superoxide dismutase 1, soluble (Sod1)	Superoxid-Metabolismus	3,19	
U83148	Nuclear factor, interleukin 3, regulated (Nfil3)	Transkriptionsregulation	1,09	
X84215	Gap junction membrane channel protein beta 1 (Gjb1;Cx32)	Zell-Zell Signaltransduktion	-7,48	
Gene, die unter PB in Cx32-KN- und/oder Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimiert sind (Behandlungseffekt), Expressionsunterschied relativ zur Expression in unbehandelten Cx32-KN- bzw. Cx32-WT-Mäusen				
Genbank Nr.	Gen	Funktion	E* (WT)	E* (KN)
M12566	Orosomucoid 2 (Orm2)	Akute-Phase-Antwort	2,11	2,54
AW120896	Cysteine sulfinic acid decarboxylase (Csad)	Aminosäure-metabolismus	-1,59	-2,07
AW048730	Sphingosine phosphate lyase 1 (Sgpl1)	Aminosäure-metabolismus	1,07	0,89
U22516	Angiogenin (Ang)	Angiogenese	-1,15	-0,18
D50086	Neuropilin (Nrp)	Angiogenese	-1,16	-0,70
U49513	Chemokine (C-C motif) ligand 9 (Ccl9)	Chemotaxis	1,00	1,03
AI845798	Phospholipase A2, group XII (Pla2g12)**	Fettstoffwechsel	1,65	2,83
Fortsetzung Tabelle 17 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 17				
AI845798	Phospholipase A2, group XII (Pla2g12)**	Fettstoffwechsel	1,21	1,11
M21856	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10 (Cyp2b10)	Fremdstoff-metabolismus	7,72	7,25
M21855	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9 (Cyp2b9)	Fremdstoff-metabolismus	3,38	4,86
Y12657	Cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp26a1)	Fremdstoff-metabolismus	3,68	1,93
J03953	Glutathione-S-transferase, mu 3 (Gstm3)**	Fremdstoff-metabolismus	2,93	1,96
J03953	Glutathione-S-transferase, mu 3 (Gstm3)**	Fremdstoff-metabolismus	1,85	1,55
M19319	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 4 (Cyp2a4)	Fremdstoff-metabolismus	2,53	2,71
D17571	P450 (cytochrome) oxidoreductase (Por)	Fremdstoff-metabolismus	2,13	2,51
J03958	Glutathione-S-transferase, alpha 2 (Yc2) (Gsta2)	Fremdstoff-metabolismus	1,74	2,12
AF047542	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 37 (Cyp2c37)	Fremdstoff-metabolismus	1,84	1,91
AF026073	N-Sulfotransferase (Sultn)	Fremdstoff-metabolismus	1,66	1,06
D17674	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29 (Cyp2c29)	Fremdstoff-metabolismus	1,47	0,95
U89491	Epoxide hydrolase 1, microsomal (Ephx1)	Fremdstoff-metabolismus	1,27	1,34
D26137	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16 (Cyp3a16)	Fremdstoff-metabolismus	1,31	0,53
J04696	Glutathione-S-transferase, mu 2 (Gstm2)	Fremdstoff-metabolismus	1,27	1,06
X95279	Thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus) (Thrsp)	Gewebsspezifische Regulation des Fettstoffwechsels	1,65	0,73
U00445	Glucose-6-phosphatase, catalytic (G6pc)	Glykogen-Biosynthese	-0,39	-2,26
AA986114	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2 (Timd2)	Immunantwort	0,41	-1,15
U51014	Peptidase 4 (Pep4)	Kollagenabbau	1,17	0,37
AF039663	Prominin 1 (Prom1)**	Phototransduction	2,63	1,86
AF039663	Prominin 1 (Prom1)**	Phototransduction	1,21	0,72
AJ006584	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked (Eif2s3y)	Protein-biosynthese	0,71	-1,37
Fortsetzung Tabelle 17 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 17				
M74495	Adenylosuccinate synthetase 1, muscle (Adss1)	Purinnukleotid-Biosynthese	1,24	0,93
U49861	Deiodinase, iodothyronine, type I (Dio1)	Regulation der Verfügbarkeit von kurzlebigen T3	1,63	1,06
AF100777	WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (Wisp1)	Regulation von Zellwachstum	1,02	0,46
X81579	Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1)	Regulation von Zellwachstum	0,29	-2,24
AF030513	Retinol dehydrogenase 6 (Rdh6)	Retinol/Androgen-Metabolismus	-2,04	-0,07
X60367	Retinol binding protein 1, cellular (Rbp1)	Retinol-Metabolismus	0,99	1,18
M80631	Guanine nucleotide binding protein, alpha 14 (Gna14)	Signaltransduktion	1,37	1,78
AF014117	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 (Gfra1)	Signaltransduktion	-0,20	1,25
AI834950	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (Nr1d1)	Transkriptionsregulation	0,17	2,16
U09504	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2 (Nr1d2)	Transkriptionsregulation	0,33	1,26
AB014494	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl)	Transkriptionsregulation	-0,10	-1,39
U83148	Nuclear factor, interleukin 3, regulated (Nfil3)	Transkriptionsregulation	-0,26	-1,55
AA833514	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 (Abcc3)	Transport	1,45	1,17
X81627	Lipocalin 2 (Lcn2)	Transport	0,52	1,42
D37792	Synaptotagmin 1 (Syt1)	Transport	0,77	1,41
AI173996	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 (Abcc2)	Transport	1,13	0,76
AJ223066	Fatty acid binding protein 5, epidermal (Fabp5)	Transport	-0,73	-1,50
U52073	N-myc downstream regulated-like (Ndr1)	Zelldifferenzierung	1,38	0,85
U60593	N-myc downstream regulated 1 (Ndr1)	Zelldifferenzierung	1,15	0,81
X74938	Forkhead box A3 (Foxa3)	Zell-Glukose-Homeostase	-1,30	-0,35
AW124049	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 593, expressed (5Erd593e)	---	1,83	2,49
AW226939	Carboxylesterase 3 (Ces3)**	---	2,05	0,73
AW226939	Carboxylesterase 3 (Ces3)**	---	1,12	0,05
AJ007376	DEAD (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polypeptide, Y-linked (Dby)	---	0,15	-1,56
AI788959	Expressed sequence AI788959	---	1,68	1,09

Fortsetzung Tabelle 17 nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 17				
AI255972	RIKEN cDNA 4931406C07**	---	2,50	1,82
AW060190	RIKEN cDNA 4931406C07**	---	1,69	2,27
AI255972	RIKEN cDNA 4931406C07**	---	2,06	1,43
M88694	Thioether-S-methyltransferase (Temt)	---	1,11	1,14
S38219	---	---	1,28	1,17
Gene, die durch PB in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen unterschiedlich beeinflusst werden (Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm)				
Genbank Nr.	Gen	Funktion	E* (WT)	E* (KN)
AA986114	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2 (Timd2)	Immunantwort	0,41	-1,15
AW121639	ATP citrate lyase (Aclt)	Metabolismus	0,12	-0,90
AJ006584	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked (Eif2s3y)	Proteinbiosynthese	0,71	-1,37
X81579	Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igf1)	Regulation von Zellwachstum	0,29	-2,24
AF030513	Retinol dehydrogenase 6 (Rdh6)	Retinol/Androgen-Metabolismus	-2,04	-0,07
AF014117	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 (Gfra1)	Signaltransduktion	-0,20	1,25
D29015	Hepatic nuclear factor 4 (Hnf4)	Transkriptionsregulation	-0,38	0,77
U83148	Nuclear factor, interleukin 3, regulated (Nfil3)	Transkriptionsregulation	-0,26	-1,55
AF020308	Splicing factor, arginine/serine-rich 5 (SRp40, HRS) (Sfrs5)	Transkriptionsregulation	0,92	-0,48
AI843476	Synaptophysin-like protein (Syn1)	Transport	0,61	-0,40
AI850846	cDNA sequence BC037006	---	-0,95	0,53
AJ007376	DEAD (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polypeptide, Y-linked (Dby)	---	0,15	-1,56

*E: Expressionsunterschied logarithmiert zur Basis 2;**Gene/exprimierte Sequenzen werden von 2 oder 3 *probe sets* auf dem Chip präsentiert

Einige der in Tabelle 17 aufgelisteten Gene wurden aufgrund ihrer Funktion als bedeutend erachtet und ausgewählt, um ihre Expressionsunterschiede mit einer anderen Methode zu verifizieren. Mit LightCycler-PCR konnten wie aus Tabelle 18 ersichtlich das Igfbp1, Rdh6, Dby, G6pc, Cx32 und Cyp2b10 bestätigt werden, jedoch mit der Einschränkung, dass die hier berechneten Induktionsfaktoren generell niedriger waren als die Expressionsunterschiede, die in der Microarray-Analyse erhalten wurden. Die G3PDH wurde als Standard eingesetzt. Die in der

Ergebnisse

Microarray-Analyse beobachteten Expressionsunterschiede für Nfil3, Eif2s3y, Ptma, Sod1 und Gfra1 konnten mit der LightCycler-PCR nicht verifiziert werden.

Tabelle 18: LightCycler-PCR-Analysen zur Verifizierung einiger differentiell exprimierter Gene, die mittels der Microarray-Analyse identifiziert wurden (KN: Cx32-KN-Maus, WT: Cx32-WT-Maus, +PB: PB-behandelt).

Gen	Effizienz	Induktionsfaktor	Induktionsfaktor	Induktionsfaktor
		KN vs KN+PB*	WT vs WT+PB**	WT vs KN**
Igfbp1	1,7	0,42	1,26	3,16
Rdh6	1,6	0,86	0,59	1,64
Nfil3	1,8	0,72	0,63	1,13
Eif2s3y	1,7	2,07	0,43	0,38
Dby	1,9	0,64	1,02	1,02
G6pc	1,7	0,36	0,95	1,06
Cx32	2,0	1,51	0,90	0
Ptma	1,8	1,15	0,94	0,93
Sod1	1,7	1,10	0,48	1,11
Gfra1	1,7	1,26	1,80	0,90
Cyp2b10	1,6	291,98	556,0	1,85

*Kontrolle ist KN; **Kontrolle ist WT

Die Expressionsunterschiede des Igfbp1 und des Cyp2b10 konnten ebenso auf Proteinebene mit Western-Blot-Analysen, wie in Abbildung 16 gezeigt ist, bestätigt werden. Auf Proteinebene war Igfbp1 in den Cx32-KN-Mäusen stärker exprimiert als vergleichsweise in den Cx32-WT-Mäusen. Unter PB dagegen war die Igfbp1-Expression in den Cx32-KN-Mäusen reduziert, wohingegen sie unter PB in den Cx32-WT-Mäusen nicht verändert war. Die Proteinexpression von Cyp2b10 war dagegen unter PB-Behandlung in beiden Stämmen erhöht.

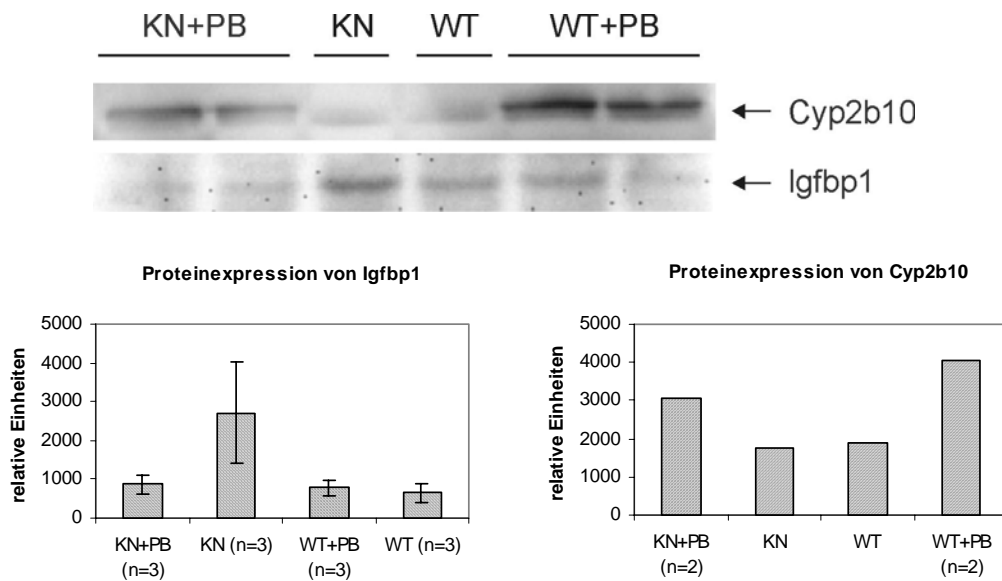


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Western-Blot-Analyse der Igfbp1- und Cyp2b10-Proteinexpression in der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen. Wie aus den densitometrischen Auswertungen ersichtlich ist, wurde die Igfbp1-Proteinexpression mittels Western-Blot in der Leber aller 12 Mäuse, die für die Affymetrix-Microarray-Analyse 1 eingesetzt wurden, untersucht. Die Cyp2b10-Proteinexpression wurde nur in 6 von diesen Mäusen analysiert (KN: Cx32-KN-Maus, WT: Cx32-WT-Maus, +PB: PB-behandelt).

Einige der unter PB veränderten 59 Gene, wie das Prominin 1, sind in Tabelle 17 mehr als einmal aufgelistet, da sie durch mehrere *probe sets* auf dem Chip repräsentiert waren. Die tatsächliche Zahl der unter PB veränderten Gene reduzierte sich somit auf 53. Von diesen zeigten 35 Gene und 4 undefinierte exprimierte Sequenzen eine erhöhte Expression, 9 Gene waren in beiden Genotypen reduziert und 5 Gene waren unterschiedlich in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen exprimiert. Ein Großteil der Gene, die unter PB in beiden Stämmen induziert waren, kodieren für Phase-I- und -II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Den größten Effekt zeigten dabei Mitglieder der Cyp-2-Familie, wie das bereits erwähnte Cyp2b10, die Cyp-Oxidoreduktase und einige Glutathion-S-Transferasen. Weitere durch PB induzierte Gene kodieren unter anderem für Proteine des Intermediärstoffwechsels oder für Proteine, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen. Die Gene, die unter PB in ihrer

Expressionshöhe reduziert waren, stellten sich dagegen als sehr heterogen in ihren Funktionen dar.

Einige der Gene in Tabelle 17 zeigten sowohl unter dem Behandlungsaspekt als auch unter dem Aspekt der Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm eine signifikant veränderte Genexpression. Unter diesen befanden sich zwei Gene, Eif2s3y und Dby, die auf dem Y-Chromosom lokalisiert sind. Die Expression dieser Gene wurde unter PB in den Cx32-KN-Mäusen erniedrigt, blieb dagegen aber in den Cx32-WT-Mäusen unverändert. Beim Vergleich der Expression von Eif2s3y und Dby mit der Expression ihrer Homologen auf dem X-Chromosom, Eif2s3x und Ddx3, zeigte sich für letztere keine Beeinflussung ihrer Expression durch PB (Abbildung 17).

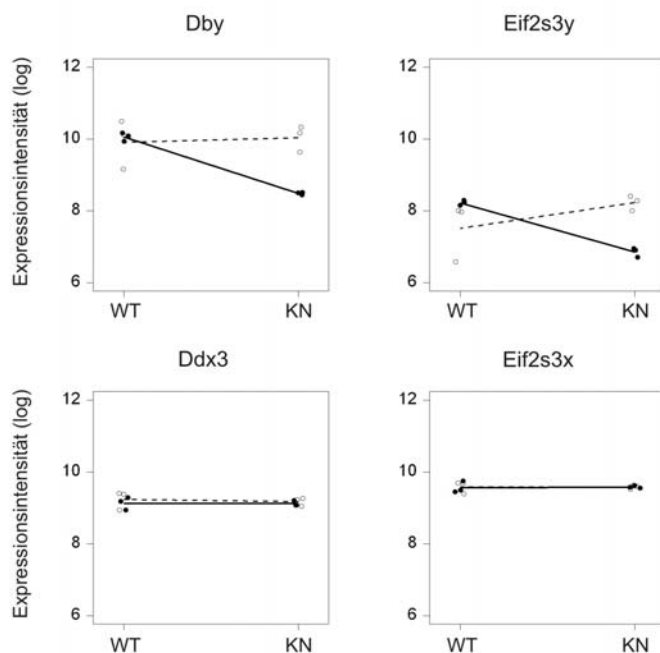


Abbildung 17: Der Einfluss von PB auf die Genexpression der Y-chromosomalen Gene Eif2s3y und Dby und ihrer Homologen, den X-chromosomalen Genen Eif2s3x und Ddx3, in Cx32-WT- und Cx32-KN-Mäusen. Die Kreise und Punkte geben die Expressionsintensität des jeweiligen Gens in den 12 Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen an (Kreis = unbehandelt; Punkt = PB-behandelt). Die Linien ver-

binden die jeweiligen Mittelwerte der Expressionsintensitäten der behandelten bzw. unbehandelten Gruppen miteinander (unterbrochene Linie = unbehandelt; durchgezogene Linie = PB-behandelt).

Um den Effekt der Behandlung und der Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm auf die Genexpression zu veranschaulichen, wurden hierarchische Clusteranalysen durchgeführt (Abbildung 18).

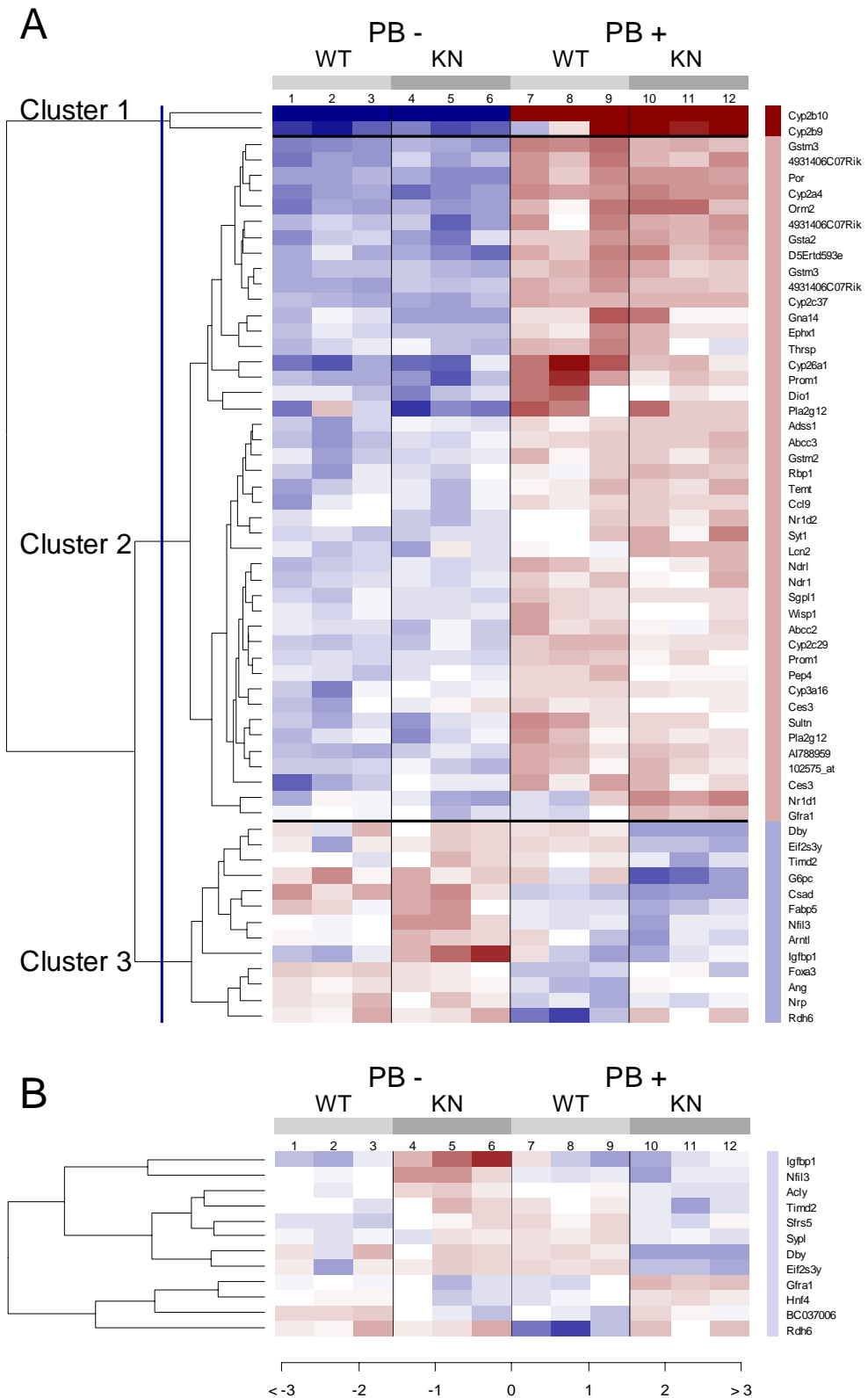


Abbildung 18: Hierarchische Clusteranalyse der Gene, deren Expression unter PB verändert war. Die rote bzw. blaue Farbe steht für eine erhöhte bzw. eine erniedrigte Genexpression relativ zum Mittelwert der Expressionsintensitäten in den 12 Mäusen. Die

Clusteranalyse A wurde mit den 59 Genen, die unter dem Aspekt des Behandlungseffekts identifiziert wurden, durchgeführt. Clusteranalyse B erfolgte mit den 12 Genen, die unter dem Aspekt der Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm identifiziert wurden. Um diejenigen Gene, die eine ähnliche Antwort auf die PB-Behandlung zeigen, hervorzuheben, wurde die Clusteranalyse A mit der blauen Linie subjektiv in 3 Cluster untergliedert: Cluster 1 und 2 zeigen Gene, die stark bzw. mittelstark induziert waren, dagegen zeigt Cluster 3 Gene, die in Cx32-KN- und/oder Cx32-WT-Mäusen reprimiert waren.

Bei dem Verfahren der Clusteranalyse wurde zuerst der Mittelwert aus den Expressionsintensitäten der Gene in den 12 Mäusen berechnet und anschließend dieser von den einzelnen Expressionsintensitäten der Gene in den 12 Mäusen abgezogen. Auf diese Weise wurden die Expressionsprofile der Gene über alle Gruppen zentriert. Eine blaue und rote Farbkodierung der Clusteranalyse diente dazu, eine erhöhte bzw. erniedrigte Genexpression relativ zum Mittelwert der Expressionintensitäten in den 12 Mäusen anschaulich darzustellen.

Eine Analyse erfolgte mit den 59 Genen, die einen signifikanten Behandlungseffekt zeigten, eine weitere mit den 12 Genen, die unter dem Aspekt der Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm identifiziert wurden.

Die unterschiedliche Farbverteilung in Abbildung 18 A macht deutlich, dass PB die Mehrzahl der Gene induziert und nur einen kleineren Teil der Gene reprimiert. Um Gene mit einer ähnlichen Antwort auf die PB-Behandlung hervorzuheben, wurde die Clusteranalyse subjektiv in 3 Cluster untergliedert (blaue Längslinie in Abbildung 18 A). Cluster 1 und 2 umfassen Gene, die unter PB stark bzw. mittelstark induziert waren (z.B. Cyp2b10 und Cyp2b9). Dagegen sind in Cluster 3 Gene dargestellt, die unter PB in Cx32-KN- und/oder Cx32-WT-Mäusen reprimiert waren.

Eine weitere Clusteranalyse wurde, wie in Abbildung 18 B gezeigt, mit den 12 Genen durchgeführt, deren Expression unter PB in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen unterschiedlich beeinflusst wurde (Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm). Aufgrund der starken Heterogenität der Funktion dieser Gene erschien eine Untergliederung der Cluster hier nicht sinnvoll.

Die Grafik in Abbildung 19 soll Aufschluss darüber geben, in wieweit PB die Genexpression in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen unterschiedlich beeinflusst. Hierzu wurden die unter PB ermittelten Expressionsunterschiede in den Cx32-KN-Mäusen gegen die entsprechenden Expressionsunterschiede in den Cx32-WT-Mäusen aufgetragen. Gene, bei denen sich der Behandlungseffekt in den beiden Stämmen um weniger als Faktor 2 unterscheidet, sind als Kreise auf der grau unterlegten Fläche gezeigt. Wie aus der Darstellung ersichtlich, befinden sich die meisten Gene innerhalb des grauen Bereichs mit der Ausnahme von 7 Genen, die unter PB in Cx32-KN-Mäusen stärker reprimiert waren als in den Cx32-WT-Mäusen.

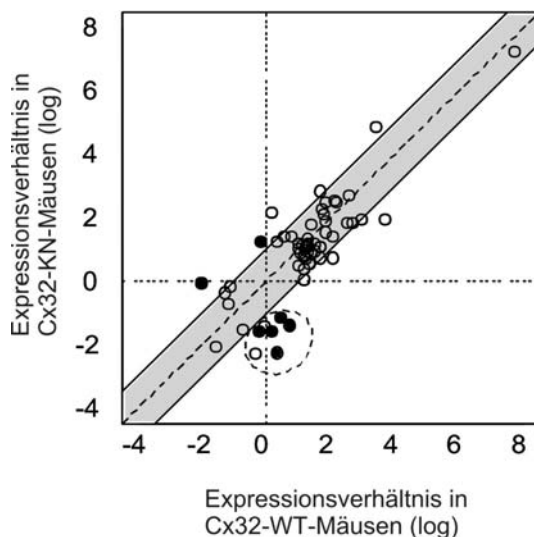


Abbildung 19: Vergleich der PB-Behandlungseffekte auf die Genexpression in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen. Die unter PB ermittelten Expressionsunterschiede in Cx32-KN-Mäusen sind hier graphisch gegen die entsprechenden Expressionsunterschiede in Cx32-WT-Mäusen aufgetragen. Die Kreise stehen für die 59 Gene, die einen signifikanten Behandlungseffekt zeigten. Die ausgefüllten Kreise sollen die Gene

anzeigen, die zusätzlich einen signifikanten Effekt aufgrund von Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm zeigten. Im Bereich der grau unterlegten Fläche sind die Gene dargestellt, bei denen der Behandlungseffekt in beiden Stämmen um weniger als Faktor 2 variierte. Diejenigen Gene, die vorzugsweise eine erniedrigte Expression in den Cx32-KN-Mäusen zeigten, sind mit einer gestrichelten Kreislinie hervorgehoben.

3.7.2 Genexpressionsanalysen im Lebertumorgewebe von Cx32-WT-Mäusen im Vergleich zum Lebernorgewebe

Die Affymetrix-Microarray-Technologie wurde für eine weitere Studie eingesetzt, bei der die differentielle Genexpression von Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe analysiert wurde (Affymetrix-Microarray-Analyse 2). Das Tumorgewebe wurde dafür aus der Leber von Cx32-WT-Mäusen gewonnen, wobei es sich hierbei um Tumoren handelte, die entweder Ha-ras- oder β -Catenin-mutiert waren. In vorausgegangenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Lebertumoren, die von DEN-behandelten Cx32-WT-Mäusen stammten, häufig Ha-ras-mutiert waren, wohingegen Lebertumoren, die von DEN- plus PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen stammten, häufig β -Catenin-mutiert waren (Aydinlik et al., 2001). Die Microarray-Analyse wurde in Kooperation mit Dr. Özge Altug-Teber aus der Microarray Facility in Tübingen durchgeführt. Der Chip, der hier zum Einsatz kam, war der *Murine Genome Chip 430A 2.0* mit etwa 22.600 immobilisierten Genen/*probe sets*. Insgesamt wurden 9 Chips für die Genexpressionsstudie eingesetzt. Diese wurden mit RNA aus 3 Ha-ras-mutierten Tumoren, 3 β -Catenin-mutierten Tumoren und 3 Lebernorgeweben hybridisiert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte wiederum in Zusammenarbeit mit unserer Kooperationspartnerin Dr. C. Ittrich von der zentralen Einheit für Biostatistik des DKFZ in Heidelberg. Der Schwellenwert für die Signifikanz der Expression wurde hierbei mit einem p-Wert kleiner/gleich 0,002 und einem Expressionsunterschied größer/gleich Faktor 4 ($|\log_2 \text{expression ratio}| \geq 2$) festgelegt.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen von Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber Normalgewebe bzw. von β -Catenin-mutierten Tumoren gegenüber Normalgewebe sind in Abbildung 20 in Form von Vulcanoplots dargestellt. Hierbei zeigten sich deutliche Expressionsunterschiede im Vergleich von Tumor zu Normalgewebe. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass sich die beiden Tumorarten in ihren Expressionsprofilen sehr deutlich voneinander unterscheiden. So zeigt der Vergleich von Abbildung 20 A und B, dass in β -Catenin-mutierten Tumoren einige Gene sehr stark in ihrer Expression vermindert waren, anders als dies in Ha-ras-mutierten Tumoren der Fall war. Hier war zwar

annähernd die gleiche Zahl Gene wie in den β -Catenin-mutierten Tumoren reprimiert, jedoch mit vergleichsweise geringfügiger Expressionserniedrigung.

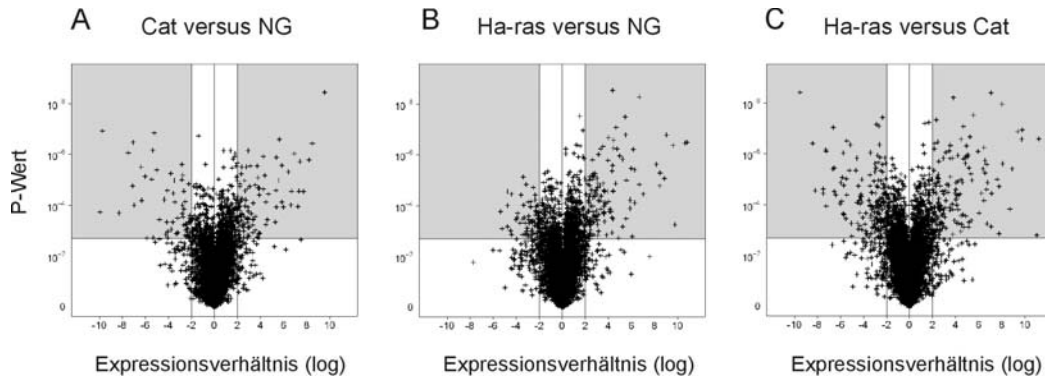


Abbildung 20: Vulkanplots zur Darstellung der Gene, die in β -Catenin (A)- bzw. Ha-ras (B)- mutierten Lebertumoren differenziell gegenüber dem Lebernorgalgewebe (NG) exprimiert sind. Ferner ist der Vergleich der differenziell exprimierten Gene in beiden Tumorarten dargestellt (C). Jedes Kreuz steht für eines der 22.600 Gene/probe sets, die auf dem Microarray präsentiert sind. Die Kreuze auf den grau unterlegten Flächen zeigen die Gene an, deren Expression mit einem p-Wert kleiner/gleich 0,002 und einem Expressionsunterschied größer/gleich Faktor 4 signifikant verändert waren.

In Ha-ras-mutierten Tumoren waren 204 Gene im Vergleich zum Normalgewebe differenziell exprimiert, davon zeigten 135 Gene eine erhöhte und 69 Gene eine erniedrigte Expression. In β -Catenin-mutierten Tumoren waren dagegen 163 Gene im Vergleich zum Normalgewebe differenziell exprimiert, von denen 102 Gene induziert und 61 Gene negativ reguliert waren. Nur 30 Gene waren in beiden Tumorarten gemeinsam verändert, von denen 5 Gene gegenläufig exprimiert waren (Tabelle 19).

Die geringe Übereinstimmung der differenziell exprimierten Gene in den beiden Tumorarten wird auch aus Abbildung 20 C deutlich, die einen Vergleich der differenziellen Gene in Ha-ras- und β -Catenin-mutierten Tumoren zeigt. Zusammengefasst stellt sich eine starke Heterogenität der beiden Tumorarten in ihren Expressionsprofilen dar.

Ergebnisse

Tabelle 19: Gene, die in β -Catenin- und Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe gemeinsam verändert waren.

Genbank Nr.	Gen	Synonym	E* (β-Cat)	E* (Ha-ras)
NM_007423	Alpha fetoprotein	Afp	8,20; 7,42; 3,94	10,85; 9,62; 8,46
NM_007585	Annexin A2	Anxa2	2,74	3,57
AF068182	B-cell linker	Blnk	3,02	2,63
NM_009770	B-cell translocation gene 3	Btg3	2,10	2,35
NM_019999	Brain protein 17	Brp17	-2,29	-2,61
AY061807	Calmodulin-like 4	Calml4	6,70	5,90
NM_023160	Camello-like 1	Cml1	-2,65	-3,38
BC010197	Carboxypeptidase E	Cpe	5,96	5,89
BC018263	cis-Retinoil/3alpha hydroxysterol short-chain dehydrogenase-like	CRAD-L	-5,20	2,82
NM_010740	Complement component 1, q subcomponent, receptor 1	C1qr1	2,91	3,67
NM_007792	Cysteine and glycine rich protein 2	Csrp2	3,20	-2,30
NM_007833	Decorin	Dcn	-3,60	-3,92
NM_026268	Dual specificity phosphatase 6	Dusp6	2,00	2,16
AK013765	Endothelial cell growth factor 1	Ecgf1	-2,35	-2,18
BC020038	Endothelial cell specific molecule1	Esm1	3,89	5,96
NM_024406	Fatty acid binding protein 4	Fabp4	2,55	4,14; 3,29
AV224521	Gelsolin	Gsn	-2,13	-2,15
U09114	Glutamine synthetase	Glul	2,13	-4,41
NM_025658	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4D	Ms4a4d	-2,80	-2,55
AW111083	Mus musculus transcribed sequence, weak similarity to protein sp:P22978	-	-6,38	3,34
AK018789	Neurotrophic tyrosin kinase receptor 2	Ntrk2	-2,82	-2,51
AK006371	Nicotinamide N-methyltransferase	Nnmt	-6,01	-4,73
AV303002	Nucleoporin like 1	Nupl1	2,08	3,09
Fortsetzung Tabelle 19 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 19				
BC010403	Presenilin 2	Psen2	-2,06	-2,02
NM_009052	Reduced expression 3	Rex3	4,59	8,86
AK009207	RIKEN cDNA 2310007H09 gene	-	4,26	-2,36
NM_025703	RIKEN cDNA 3930402F23 gene	-	2,31	3,66
BG963358	RIKEN cDNA 5730445F03 gene	-	2,96	2,50
BC021842	RIKEN cDNA E430021N18 gene	-	-2,64	-2,77
BC021916	S100 calcium binding protein A11	S100a11	2,11	3,66

*E: Expressionsunterschied logarithmiert zur Basis 2; Gene/exprimierte Sequenzen werden von 2 oder 3 *probe sets* auf dem Chip präsentiert

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Genexpressionsanalysen in Lebernorgewebe (Affymetrix-Microarray-Analyse 1, siehe 3.7.1) als auch in Tumorgewebe (Affymetrix-Microarray-Analyse 2: β -Catenin-mutierte Tumoren gegenüber Normalgewebe) von PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen durchgeführt. Der Vergleich der hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigte lediglich eine Übereinstimmung in 4 Genen. Cyp2b10, P450 (Cytochrom) Oxidoreduktase, Glutathion-S-Transferase mu 3 und Glutathion-S-Transferase mu 2 waren sowohl im Lebernorgewebe als auch in β -Catenin-mutierten Tumorgewebe von PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen erhöht exprimiert.

Mit den Genen, die in Ha-ras- und β -Catenin-mutierten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe differentiell exprimiert waren, wurden Clusteranalysen durchgeführt (Abbildung 21 A und B). Die rote Farbskalierung steht für erhöhte Genexpression, die blaue für eine erniedrigte Genexpression. Auch bei diesem Analyseverfahren wurde die starke Heterogenität der beiden Tumorarten in ihren Expressionsprofilen sichtbar. Gruppen von Genen, die z.B. in β -Catenin-mutierten Tumoren eine erniedrigte Expression zeigten, waren in Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe unverändert oder sogar leicht erhöht.

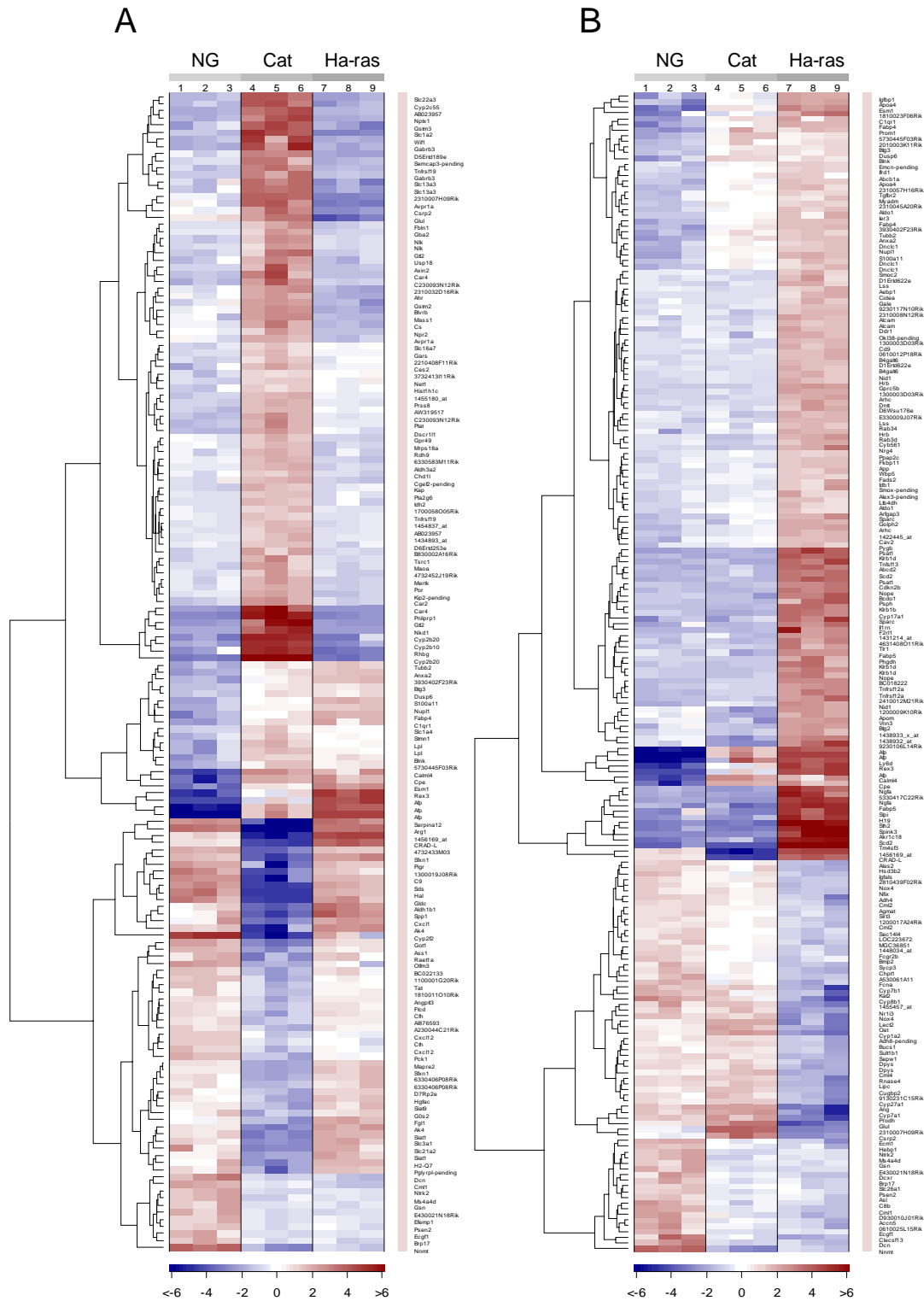


Abbildung 21: Clusteranalyse derjenigen Gene, die in β -Catenin- (A) bzw. Ha-ras- (B) mutierten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe signifikant differentiell exprimiert waren. Die rote Farbe steht für eine erhöhte, die blaue Farbe für eine erniedrigte Genexpression.

Im weiteren Auswerteverfahren wurden den Genen, die gegenüber dem Normalgewebe in den beiden Tumorarten differentiell exprimiert waren, spezifische Funktionen zugeordnet und anschließend nach diesen sortiert. Auf diese Weise erfolgte eine Einteilung der Gene in 4 Gruppen: metabolische Enzyme, regulatorische Proteine, strukturelle Proteine und andere. Die einzelnen Gruppen wurden zusätzlich noch in Untergruppen untergliedert (Tabellen sind dem Anhang beigelegt). Die differentiell exprimierten Gene beider Genexpressionsanalysen, β -Catenin-mutierte Tumoren gegenüber Normalgewebe bzw. Ha-ras-mutierte Tumoren gegenüber Normalgewebe, wurden in die gleichen Gruppen und Untergruppen eingeteilt, mit der Ausnahme, dass sie sich bei den regulatorischen Proteinen in einer Untergruppe unterschieden. In den β -Catenin-mutierten Tumoren waren interessanterweise einige Gene aus dem Wnt-Signalweg gegenüber dem Normalgewebe differentiell exprimiert, die bei den Ha-ras-mutierten Tumoren nicht verändert auftraten. Im Gegensatz dazu waren nur in den Ha-ras-mutierten Tumoren einige Gene gegenüber dem Normalgewebe verändert, denen eine Funktion bei der Signaltransduktion, die über kleine GTPasen vermittelt wird, zugeordnet wird.

Zusammengefasst machten die nach Funktionen geordneten differentiellen Gene der beiden Expressionsanalysen deutlich, dass hier ebenfalls sehr große Unterschiede zwischen Ha-ras- und β -Catenin-mutierten Tumoren existierten. So zeigte sich, dass in den beiden Tumorarten aufgrund ihrer unterschiedlichen Genexpressionsprofile unterschiedliche Signal- und Stoffwechselwege von Bedeutung zu sein scheinen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Analyse der differentiellen Genexpression in der Leber von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen. Eine Veränderung in der Expression bestimmter Gene könnte möglicherweise einen Hinweis auf die Rolle der Connexine im Prozess der Leberkrebsentstehung sowie auf die Wirkungsweise des PB als Tumorpromotor in der Leber der beiden Stämme geben. Die Genexpressionsanalysen wurden zunächst mit Lebernorgangewebe aus Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen durchgeführt, da PB, wie aus der Literatur bereits bekannt ist, in normalen Hepatozyten auf die Expression verschiedener Gene einen Einfluss nehmen kann (Frueh et al., 1997; Shibutani et al., 2002; Garcia-Allan et al., 2000; Ueda et al., 2002). Darüber hinaus wurde eine weitere Genexpressionsstudie durchgeführt, bei der Tumorgewebe aus der Leber von Cx32-WT-Mäusen eingesetzt wurde, das Mutationen im Ha-ras- oder β -Catenin-Gen aufwies.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde nicht die Expression einzelner definierter Gene untersucht, sondern eine globale Analyse durchgeführt, mit dem Ziel die differentielle Expression vieler verschiedener Gene gleichzeitig zu untersuchen. Die Verfahren, die hierbei zum Einsatz kamen, waren die Filterhybridisierung nach Clontech, die subtraktive Hybridisierung auf PCR-Basis nach Clontech und die Affymetrix-Microarray-Technologie.

4.1 Einordnung des Projekts

Die *gap junctions* der Hepatozyten bestehen aus den Proteinen Cx32 und Cx26. Es konnte gezeigt werden, dass ein Cx32-Gendefekt in der Leber von Mäusen (Cx32-KN-Maus) zu einem beschleunigten Wachstum chemisch-induzierter (z.B. mit DEN) präneoplastischer und neoplastischer Läsionen führt. Dies deutet daraufhin, dass Cx32 die Proliferation von transformierten Hepatozyten während der Entwicklung von Lebertumoren inhibiert und hierbei die Funktion eines Tumorsuppressors übernimmt (Temme et al., 1997; Moennikes et al., 1999). Es wird angenommen, dass dieser Effekt über die *gap junction*-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation GJIC verursacht wird. Da viele Tumorpromotorsubstanzen

einschließlich PB in der Lage sind, die Zell-Zell-Kommunikation über *gap junctions* zu blockieren (Klaunig et al., 1991; Budunova und Williams, 1994), wird vermutet, dass sie darüber die klonale Expansion neoplastischer Zellen bedingen. Diese Hypothese wurde von Moennikes et al. (2000) überprüft, indem die Wirkung von PB als Tumorpromotor in der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen untersucht wurde, in welcher präneoplastische und neoplastische Leberläsionen mit DEN induziert worden waren. Die Behandlung mit PB führte hierbei in Cx32-WT-Mäusen zu einer Tumorpromotion in Form eines signifikant erhöhten Anteils an neoplastisch-veränderten Läsionen, wohingegen dieser Effekt in Cx32-KN-Mäusen nicht zu beobachten war. Von Moennikes et al. (2000) konnte demnach gezeigt werden, dass funktionales Cx32 notwendig für die durch PB bewirkte Promotion der Hepatokanzerogenese ist.

Die Aufklärung der unterschiedlichen Empfindlichkeit von Cx32-KN- und Cx32-Mäusen gegenüber DEN bzw. PB war Ziel dieser Arbeit.

4.2 Versuchstiere (Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäuse)

Das relative Lebergewicht war in den PB-behandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen gegenüber den unbehandelten Kontrollen annähernd gleich erhöht. Der durch PB hervorgerufene Effekt der Lebervergrößerung war damit in den beiden Stämmen in gleicher Weise ausgeprägt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Moennikes et al. (1999). Hierbei zeigte sich, dass das Organwachstum durch den Cx32-Gendefekt nicht beeinflusst wird.

4.3 Differentielle Genexpression im Lebernorgangewebe von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen

4.3.1 Vergleich der eingesetzten Methoden

Zur Untersuchung unterschiedlicher Genexpression auf RNA-Ebene stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, wobei man heutzutage versucht, Alternativen zu der „ein Gen ein Experiment“- Basis zu finden. Um die differentielle Genexpression in der Leber von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei unterschiedliche Methoden eingesetzt.

Die Filterhybridisierungstechnik nach Clontech stellte dabei ein sehr einfaches Verfahren dar, das die Expressionsanalyse von ca. 1.000 Genen ermöglicht. Die Durchführung der Hybridisierung war äquivalent zur Vorgehensweise bei Southern- oder Northern-Blots. Ein großer Nachteil der Methode war der sehr starke, sehr unterschiedliche Hintergrund, der sich sehr häufig nach der Hybridisierung auf den Filtern zeigte. Der Hintergrund erschwerte die Auswertung der Signalintensitäten und war selbst mit Variationen in der Stringenz der Waschschritte nicht zu reduzieren. Auch Kontamination mit genomischer DNA, als häufige Ursache für einen starken Hintergrund, konnte ausgeschlossen werden, da die RNAs zuvor mit DNaseI verdaut wurden.

Um die Ergebnisse, die mit den Filterhybridisierungen erhalten wurden, besser bewerten zu können, wurde als Alternative die Methode der subtraktiven Hybridisierung auf PCR-Basis nach Clontech eingesetzt. Mit dieser Methode werden vor allem starke Expressionsunterschiede detektiert, was bei tumorbiologischen Fragestellungen von Vorteil ist, da angenommen wird, dass Gene mit starken Expressionsunterschieden biologisch bedeutsam sind (Zhang et al., 1997).

Das Verfahren der subtraktiven Hybridisierung ermöglicht zwar eine globale Analyse der Genexpression, allerdings sind die hierbei identifizierten Gene unbekannt. Erst eine anschließende Sequenzierung gibt Aufschluss darüber, welches Gen welche Expressionshöhe zeigt.

Die Gene, die mittels subtraktiver Hybridisierung als differentiell in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen identifiziert wurden, mussten über ein zweifaches *Screening*-Verfahren bestätigt werden. Das erwies sich als äußerst schwierig, da sehr viele Subtraktionsprodukte auf den cDNA-Arrays gar kein Signal zeigten oder falsch positiv waren (61 % bei den differentiell exprimierten Genen in den Cx32-KN-Mäusen und 79 % bei den Cx32-WT-Mäusen). Diese nicht-differentiellen Subtraktionsprodukte traten auf, da die entsprechenden cDNAs der Subtraktion entgangen waren bzw. nicht-differentielle cDNAs, obwohl sie nur in geringen Mengen nach der subtraktiven Hybridisierung vorhanden sein sollten, trotzdem zum Teil kloniert und somit erfasst wurden. Bei dem zweifachen *Screening*-Verfahren kam noch erschwerend hinzu, dass die Signale beim 2.

Screening generell viel schwächer waren als beim *Vorscreening*. Aufgrund dieser Problematik wurde ein zweites Experiment, das die differentielle Genexpression in der Leber von PB-behandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen analysieren sollte, mit dieser Methode nicht mehr durchgeführt.

Als dritte Methode wurde schließlich die Affymetrix-Microarray-Technologie eingesetzt. Dieses sehr sensitive Analyseverfahren ist in der Lage, 12.000 Gene und mehr in einem Ansatz in ihrer Expression zu untersuchen. Das stellt einen großen Vorteil dar, den diese Methode im Vergleich zur Filterhybridisierung und der subtraktiven Hybridisierung zu bieten hat. Zusätzlich stellte sich das Verfahren während der Durchführung der Hybridisierung als weniger anfällig dar, als dies bei der Durchführung der beiden anderen Methoden der Fall war.

Zusammengefasst zeigten die Erfahrungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, dass mit der Methode der Affymetrix-Technologie die mit Abstand zuverlässigsten Ergebnisse erhalten wurden.

4.3.2 Ergebnisse der eingesetzten Methoden

Die zur Analyse der differentiellen Genexpression eingesetzten Methoden ergaben, dass sich die Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäuse, auch unter PB-Behandlung, in der Regulation von nur sehr wenigen Genen unterschieden. Die hierbei identifizierten Gene stimmten aber, wie aus Tabelle 20 ersichtlich wird, bei den drei Methoden wenig überein.

Tabelle 20: Gene, die mittels Filterhybridisierung, subtraktiver Hybridisierung und Affymetrix-Microarray-Technologie übereinstimmend als differentiell exprimiert in der Leber von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen gefunden wurden.

	Subtraktive Hybridisierung	Affymetrix
Filterhybridisierung	Cx32	Cx32, Gstm2, Ptma
Affymetrix	Cx32	-

Da bei der Analyse der differentiellen Genexpression mit der Affymetrix-Technologie die zuverlässigsten Ergebnisse erhalten wurden, werden diese im folgenden näher diskutiert.

In den unbehandelten Stämmen konnten hierbei 5 Gene identifiziert werden, die in den Cx32-KN-Mäusen im Vergleich zu den Cx32-WT-Mäusen signifikant verändert waren. Unter den 5 identifizierten Genen waren keine Gene, über die das stärkere Wachstum von Lebertumoren in Cx32-KN-Mäusen im Vergleich zu Cx32-WT-Mäusen erklärt werden könnte.

Die Gene, die unter PB-Behandlung in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen verändert waren, wurden einander zugeordnet, um Gruppen von Genen mit ähnlichen Antworten zu identifizieren (siehe 3.7.1 Abbildung 18). Drei Gruppen (Cluster 1-3) wurden auf diese Weise erhalten. In zwei dieser Gruppen (Cluster 1 und 2) waren größtenteils Gene, die für die Cyp-2-Familie der Cytochrom P450-Enzyme und für Glutathion-S-Transferasen kodieren. Von diesen ist bekannt, dass sie nach PB-Stimulierung über den Transkriptionsfaktor CAR transkriptionell aktiviert werden (Ueda et al., 2002). Neben den Genen, die für Phase-I- und -II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus kodieren, waren noch weitere Gene in den beiden Gruppen vorhanden, die in vergleichbaren Studien unter PB noch nicht verändert gefunden wurden (Frueh et al., 1997; Shibutani et al., 2002; Garcia-Allan et al., 2000; Ueda et al., 2002).

Die dritte Gruppe (Cluster 3) enthielt Gene, die unter PB vermindert exprimiert waren. Dabei ist zu beobachten, dass einige Unterschiede zwischen Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen existierten. Als Beispiel ist das *Igfbp1* zu nennen. Ohne PB-Behandlung war *Igfbp1* in Cx32-KN-Mäusen um den Faktor 5 stärker exprimiert als in Cx32-WT-Mäusen. Unter PB dagegen wurde *Igfbp1* in Cx32-KN-Mäusen stark negativ reguliert, wohingegen sich die Expression des *Igfbp1* in den Cx32-WT-Mäusen kaum veränderte. Eine ähnliche negative Regulation des *Igfbp1* durch PB in der Mausleber wurde schon früher beschrieben (Ueda et al., 2002). Die erhöhte Expression des *Igfbp1* in Cx32-KN-Mäusen, die sowohl über LightCycler-PCR als auch mit Western-Blot verifiziert wurde, steht möglicherweise in Zusammenhang mit der Beobachtung, dass Hepatozyten in der Leber von Cx32-KN-Mäusen eine etwa 10-fach gesteigerte Zellteilungsrate aufweisen (Temme et al., 1997). Es ist bekannt, dass *Igfbp1* für die Leberregeneration nach der partiellen Hepatektomie erforderlich ist und während dieses Prozesses erhöht exprimiert wird (Leu et al., 2003).

Obwohl Igfbps als proapoptotisch in vielen Organen und Geweben gelten, konnte kürzlich gezeigt werden, dass Igfbp1 zu einer Verminderung der proapoptotischen Signale in der Leber beiträgt (Leu et al., 2003). Darüber hinaus wurde Igfbp1 im hepatozellulären Karzinom als überexprimiert nachgewiesen (Kondoh et al., 1999), was bedeutend für die Tumorentstehung sein könnte. Die Beobachtung, dass Cx32-KN-Mäuse im Vergleich zu Cx32-WT-Mäusen ein stärkeres Wachstum chemisch-induzierter (z.B. mit DEN) präneoplastischer und neoplastischer Läsionen zeigen (Temme et al., 1997; Moennikes et al., 1999), könnte somit auch in Zusammenhang mit der erhöhten Expression des Igfbp1 in der Leber der Cx32-KN-Mäuse stehen.

Von PB ist bekannt, dass es in seiner Funktion als Tumorpromotor Apoptose in Hepatozyten und Hepatomzelllinien zu unterdrücken vermag (Buchmann et al., 1999; Schulte-Hermann et al., 1995). In Cx32-WT-Mäusen, die im Vergleich zu Cx32-KN-Mäusen durch PB promovierbar sind (Moennikes et al., 2000), konnte hier aber weder auf RNA- noch auf Proteinebene eine Beeinflussung des PB auf die Expression des Igfbp1 nachgewiesen werden. Deshalb bleibt ein Zusammenhang des Igfbp1 mit der Tumorpromotion durch PB fragwürdig. Das zeigten auch die Genexpressionsanalysen, die mit Lebertumorgewebe von PB-behandelten und unbehandelten Cx32-WT-Mäusen durchgeführt wurden (siehe 3.7.2). Hier wurden in β -Catenin-mutierten Tumoren, für die unter PB in Cx32-WT-Mäusen selektioniert wird (Aydinlik et al., 2001), keine Veränderungen in der Expression des Igfbp1 beobachtet. In Ha-ras-mutierten Tumoren dagegen, die aus unbehandelten Cx32-WT-Mäusen stammten, war das Igfbp1 erhöht exprimiert.

Bei den Analysen der differentiellen Genexpression wurden interessanterweise zwei Gene identifiziert (Eif2s3y und Dby) die auf dem Y-Chromosom lokalisiert sind. Beide Gene zeigten bei der Regulation ihrer Expression eine Wechselwirkung zwischen Behandlung und Stamm (siehe 3.7.1 Abbildung 17). Eif2s3y kodiert für eine Untereinheit des eukaryotischen Translation-Initiation-Faktors EIF2 und das Dby (*DEAD box protein*) scheint eine RNA-Helikase Aktivität zu besitzen (You et al., 1999). Beide Gene sind auf einer kurzen chromosomalen Region lokalisiert, die für den Proliferationsfaktor Spy in der

Spermatogenese kodiert (Mazeyrat et al., 2001). Die X-chromosomalen Homologen dieser beiden Gene (Eif2s3x und Ddx3) zeigten dagegen weder in den beiden Stämmen noch unter PB eine veränderte Genexpression. Somit scheint die Bedeutung von Eif2s3y und Dby auf einer für das männliche Geschlecht spezifischen Funktion zu beruhen. Ihre genaue Funktion bzw. ein Zusammenhang von Eif2s3y und Dby mit der Tumorentstehung ist unklar.

Über die Microarray-Analysen wurde noch ein weiteres Gen identifiziert, das möglicherweise ebenso eine für das männliche Geschlecht spezifische Funktion besitzt. Rdh6, das für das Protein cis-Retinol androgen dehydrogenase 1 kodiert, zeigte unter PB in Cx32-KN-Mäusen keine veränderte Genexpression, wohingegen diese in den Cx32-WT-Mäusen um den Faktor 4 erniedrigt war. Die cis-Retinol androgen dehydrogenase 1 erkennt als Substrate 9-cis-Retinol oder 11-cis-Retinol, aber ebenso Steroide wie 5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol und 5α -androstan- 3α -ol-17-on. Es wird angenommen, dass diese Dehydrogenase an der Bildung von 9-cis Retinsäure, dem Liganden des Retinsäure-X-Rezeptors, und/oder von Dihydrotestosteron, einem Androgen, beteiligt ist (Chai et al., 1997).

Sowohl bei Eif2s3y und Dby als auch bei Rdh6 bleibt offen, welche Rolle diese Gene bei der Tumorpromotion durch PB in den Cx32-WT-Mäusen spielen. Auffällig ist nur, dass diese offensichtlich eine für das männliche Geschlecht spezifische Funktion besitzen. Interessanterweise wurde bei Mäusen beobachtet, dass die Männchen viel wahrscheinlicher Lebertumoren entwickeln als die Weibchen (Kemp et al., 1989). Dies könnte auf eine Bedeutung von Sexualhormonen bei der Entstehung der Leberkanzerogenese hinweisen.

Zusammengefasst wurden über die Genexpressionsanalysen keine eindeutigen Hinweise darauf erhalten, warum bei den Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Tumorentstehung besteht und ferner warum eine Tumorpromotion durch PB nur in Cx32-WT-Mäusen zu beobachten ist. Es wurden zwar einige interessante Gene als differentiell exprimiert identifiziert, jedoch kann über keines dieser Gene die unterschiedliche Empfindlichkeit von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen erklärt werden. Es ist

hierbei aber zu berücksichtigen, dass die Expressionsveränderung eines einzigen Gens nicht die alleinige Ursache für die Tumorentstehung ist.

Da sich die Genexpression im Lebernorgewebe der behandelten und unbehandelten Stämme nicht stark voneinander unterschied, wurde eine weitere Genexpressionsstudie durchgeführt. Diese sollte Klarheit darüber geben, ob sich die Genexpression möglicherweise im Tumorgewebe entscheidend verändert.

4.4 Differentielle Genexpression im Lebertumorgewebe von Cx32-WT-Mäusen

Die Genexpressionsanalysen im Tumorgewebe bestätigten die Vermutung, dass sich das Tumorgewebe auf transkriptioneller Ebene deutlich vom Lebernorgewebe unterscheidet. Für die Analysen wurde Tumorgewebe aus der Leber von Cx32-WT-Mäusen eingesetzt. Es handelte sich hierbei um Tumoren, die entweder Ha-ras- oder β -Catenin-mutiert waren. In vorausgegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lebertumoren der Cx32-WT-Maus, die durch einmalige Gabe des Leberkanzerogens DEN erzeugt wurden, zu etwa 30 % Ha-ras-mutiert waren. Interessanterweise wiesen dagegen Lebertumoren aus sequentiell mit DEN plus PB-behandelten Cx32-WT-Mäusen keine Ha-ras-Mutationen auf, sondern zeigten in etwa 80 % der Fälle aktivierende Mutationen im β -Catenin-Gen (Aydinlik et al., 2001). Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Tumorarten dadurch, dass in β -Catenin-mutierten Tumoren die Glutaminsynthetase stark exprimiert wird, wohingegen diese in Ha-ras-mutierten Tumoren nicht nachzuweisen ist (Loeppen et al., 2002). Dies konnte ebenfalls mit den hier durchgeführten Genexpressionsstudien bestätigt werden.

Der Nachweis exakter Genotyp-Phänotyp-Beziehungen erweist sich bei Tumoren allgemein als äußerst schwierig, da bei der Tumorentstehung u. a. eine Vielzahl genetischer Veränderungen eine Rolle spielen. Anders verhält es sich mit den in Nager experimentell erzeugten Leberadenomen. Es wird angenommen, dass bei der Entstehung von neoplastischen Läsionen in der Mausleber nur eine geschwindigkeitsbestimmende Veränderung erforderlich ist. Für diese Hypothese sprechen die Ergebnisse aus einer quantitativen Analyse, in der die Zahl der Läsionen in der Mausleber bestimmt wurde, die nach einmaliger Gabe

unterschiedlicher Dosen von DEN induziert wurden. Hierbei konnte eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung beobachtet werden (Vesselinovitch und Mihailovich, 1983). Das Tumorgewebe, das für die Genexpressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde, scheint damit besonders geeignet, da die Mutation im Ha-ras- bzw. β -Catenin-Gen möglicherweise die einzige geschwindigkeitsbestimmende genetische Veränderung in den Tumoren darstellt.

Ergebnis der differentiellen Genexpressionsanalysen war, dass in Ha-ras-mutierten Tumoren 204 Gene (135 Gene induziert, 69 Gene reprimiert) und in β -Catenin-mutierten Tumoren 163 Gene (102 Gene induziert und 61 Gene reprimiert) gegenüber dem Normalgewebe differentiell exprimiert waren. Nur 30 Gene waren in beiden Tumorarten gemeinsam verändert. Diese starke Heterogenität der beiden Tumorarten könnte möglicherweise auch ein Hinweis darauf sein, dass nicht auf transkriptioneller Ebene, sondern eher auf Proteinebene Veränderungen auftreten, die für die Tumorentstehung relevant sind. Auf der anderen Seite könnte aber gerade diese starke Heterogenität die Folge von Mutationen im Ha-ras- und β -Catenin-Gen sein, die zu unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf Transkriptionsebene führen.

Um nähere Informationen über die differentiell exprimierten Gene aus den beiden Genexpressionsanalysen zu erhalten, wurden diesen spezifische Funktionen zugeordnet und anschließend danach sortiert. Die Gene wurden hierbei in 4 Gruppen (metabolische Enzyme, regulatorische Proteine, strukturelle Proteine und andere) mit jeweils mehreren Untergruppen eingeteilt (Tabellen sind dem Anhang beigelegt). Die differentiell exprimierten Gene beider Expressionsanalysen wurden nach derselben Einteilung sortiert. Bei dieser Vorgehensweise fiel auf, dass in den beiden Tumorarten unterschiedliche Signal- und Stoffwechselwege von Bedeutung zu sein scheinen. So war z. B. für einen bestimmten Stoffwechselweg in den β -Catenin-mutierten Tumoren ein eindeutiger Zusammenhang der differentiell exprimierten Gene zu erkennen, der in dieser Weise in den Ha-ras-mutierten Tumoren nicht zu beobachten war. Im folgenden wird auf einige dieser Signal- und Stoffwechselwege, die besonders interessant erschienen, näher eingegangen.

Unter den Genen, die in den β -Catenin-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe differentiell exprimiert waren, fanden sich einige, deren Proteine direkt oder indirekt an Wnt/Wingless-abhängigen Signalwegen beteiligt sind und die meist inhibitorisch in diesem Signalweg aktiv sind (Abbildung 22 A). So wird β -Catenin durch Axin2 negativ reguliert, das Wnt-Signal durch Bindung von Naked Cuticle 1 an Dishevelled blockiert und der Transkriptionsfaktor Lef-1/TCF durch Phosphorylierung durch die Nemo like kinase inhibiert (zur Übersicht siehe Lustig und Behrens, 2003).

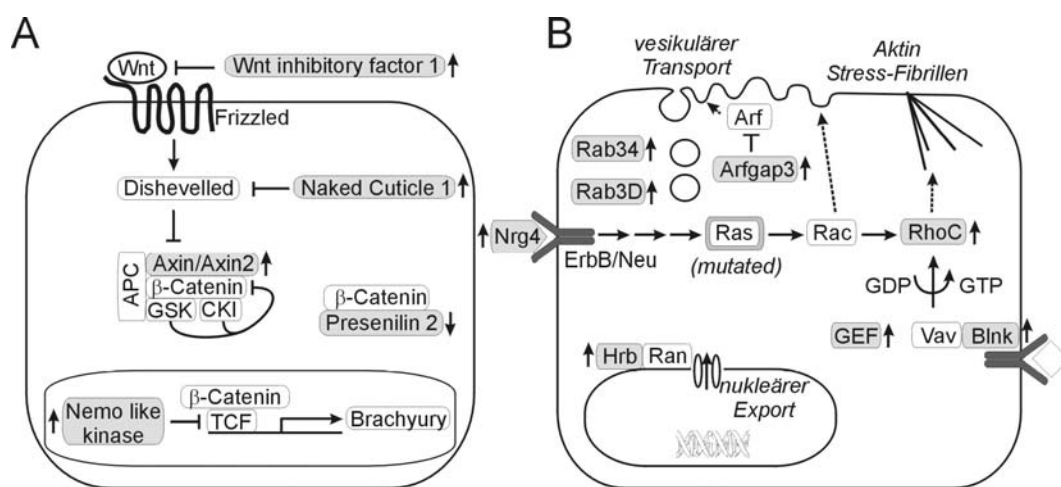


Abbildung 22: A) Schematische Darstellung einiger Gene, die für Proteine des Wnt-Signalwegs kodieren und in β -Catenin-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe differentiell exprimiert waren. B) Gene, die in Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe differentiell exprimiert waren und deren Proteine eine Funktion bei der Signaltransduktion, die über kleine GTPasen vermittelt wird, zugeordnet wird. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Expression ist durch Pfeile gekennzeichnet. APC: Adenomatosis polyposis coli susceptibility protein; GSK: Glykogen-Synthase-Kinase 3 β ; CKI: Casein-Kinase I; TCF: T-cell factor; Nrg4: Neuregulin-4; GEF: Guanine nucleotide exchange factor; Blnk: B-cell linker; Hrb: HIV-1 Rev-binding protein.

Axin2, das den Abbau von β -Catenin induziert, wurde auch in menschlichen Tumoren, wie kolorektalen Adenomen und Karzinomen und Lebertumoren, hochreguliert gefunden (Lustig et al., 2002). Hierbei wird vermutet, dass Axin2 Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus ist, der die Wnt-Signal-

transduktion durch Limitierung der Menge an β -Catenin negativ beeinflusst. Da Axin2 in Tumoren verändert ist, von denen bekannt ist, dass sie über den Wnt-Signalweg induziert werden, scheint hier die Axin2-Expression mit der Tumorentstehung zu korrelieren.

Die in β -Catenin-mutierten Tumoren veränderten Gene, die inhibitorisch im Wnt-Signalweg aktiv sind, könnten ebenfalls einem Rückkopplungsmechanismus unterliegen, der dafür verantwortlich ist, dass TCF-abhängige Gene nicht exprimiert werden. Dies würde bedeuten, dass die gesamten Gene, die hier über die Genexpressionsanalysen in den β -Catenin-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe als verändert gefunden wurden, nicht zu Wnt-Zielgenen gehören, die über eine Stabilisierung von β -Catenin und dessen anschließende Assoziation mit TCF-Transkriptionsfaktoren induziert werden. Dies könnte auch erklären, warum z. B. Cyclin D1 oder c-myc, die bekannte Zielgene von β -Catenin/TCF sind, in den β -Catenin-mutierten Tumoren nicht gegenüber dem Normalgewebe verändert waren. Ähnliche Beobachtungen wurden in unserer Arbeitsgruppe auch auf Proteinebene gemacht, als die Expression von Cyclin D1 und c-myc in β -Catenin-mutierten- und β -Catenin-WT-Tumoren aus der Mausleber mittels Western-Blot untersucht wurde (Aydinlik et al., 2001). Die Proteinexpression zeigte zwischen den beiden Tumortypen keine signifikanten Unterschiede und war auch von der PB-Behandlung der Mäuse unbeeinflusst. Diese Beobachtungen sprechen somit ebenfalls dagegen, dass PB für β -Catenin-mutierte Hepatozyten über eine Beteiligung des transkriptionellen Programms von β -Catenin/TCF selektioniert. Da aber mutiertes β -Catenin trotz des angenommenen Rückkopplungsmechanismus und der darüber verhinderten β -Catenin/TCF-Transkription transformierend wirkt, muss ein anderer Mechanismus hier bedeutend für die Tumorentstehung sein.

In den Ha-ras-mutierten Tumoren waren einige Gene gegenüber dem Normalgewebe verändert, deren Proteine Mitglieder der Ras-Familie sind (Abbildung 22 B). Ras ist der Prototyp einer großen Superfamilie von kleinen GTPasen, die zahlreiche zelluläre Prozesse regulieren. Dazu gehört die intrazelluläre Signaltransduktion für Zellwachstum und Differenzierung (Ras-Subfamilie), die Regulation des Aktin-Zytoskeletts (Rho-Subfamilie), der

zielgerichtete intrazelluläre Transport („*membrane trafficking*“: Rab-Subfamilie und „*vesicle trafficking*“: ARF-Subfamilie) und der nukleäre Transport (Ran) (Macara et al., 1996; Campbell et al., 1998). Bei den in Ha-ras-mutierten Tumoren veränderten Genen handelte es sich entweder um Gene, die direkt für kleine GTPasen kodieren oder aber um Gene, die für Proteine kodieren, die bei der Regulation von kleinen GTPasen eine Rolle spielen.

Die Ras-Proteine wechseln zwischen einer GTP-gebundenen, aktiven und einer GDP-gebundenen, inaktiven Form und dienen deshalb als molekulare Schalter (an/aus-Systeme) bei der Signaltransduktion von der Zellmembran in den Kern. Dieser Wechsel zwischen den beiden Formen wird von zwei Klassen von regulatorischen Proteinen reguliert. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) sind Ras-Aktivatoren, da sie die aktive GTP-gebundene Form der G-Proteine bedingen. Sie nehmen eine Schlüsselrolle zwischen Zelloberflächenrezeptoren und Ras-Aktivierung ein. Im Gegensatz dazu bewirken GTPase-activating proteins (GAPs) die GTP-Hydrolyse und versetzen Ras damit zurück in seine inaktive, GDP-gebundene Form (zur Übersicht siehe Downward, 2003). Die G-Proteine Rac und Rho wechseln ebenfalls zwischen der GTP- und GDP-gebundenen Form, werden über GEFs und GAPs reguliert und durch Ras-GTP aktiviert. Beide Proteine sind an der Regulation des aktiven Zytoskeletts beteiligt und spielen daher bei zahlreichen zellulären Prozessen, u. a. Zelladhäsion, Bildung von Stress-Fibrillen und *membrane ruffling*, eine Rolle (Nobes und Hall, 1995). Alle diese Prozesse, die durch das Onkogen Ras aktiviert werden können, sind somit bedeutend für den invasiven Phänotyp von transformierten Zellen (Qiu et al., 1995). Auch dass RhoC im menschlichen hepatozellulären Karzinom überexprimiert nachgewiesen wurde, könnte auf eine Bedeutung dieser kleinen GTPase bei der Tumorentstehung hinweisen (Wang et al., 2003).

In den Ha-ras-mutierten Tumoren waren auch Gene gegenüber dem Normalgewebe erhöht exprimiert, die mit kleinen GTPasen interagieren. So gehört das HIV-1 Rev-binding protein (Hrb) zu einer Gruppe von Proteinen, die als Ran-interacting proteins (Rips) bezeichnet werden. Ran ist eine kleine GTPase, die für Proteinimport, mRNA-Export und Aufrechterhaltung von nukleären Strukturen erforderlich ist (Saitoh et al., 1996). Das B-cell linker

protein (Blnk) verbindet dagegen u. a. die B-cell receptor-associated Syk tyrosine kinase mit Vav, das ein GEF der Rho-Familie ist. Blnk stellt ein zentrales Linker-Protein dar und ist damit bedeutend für eine Vielzahl von Signalwegen (Fu et al., 1998). Ebenfalls in den Ha-ras-mutierten Tumoren induziert war das Neuregulin-4 (Nrg4), das ein Ligand der ErbB-4-Rezeptor-Tyrosin-Kinase ist. Die Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie aktivieren u. a. Signalwege, die Apoptose inhibieren und so das Überleben der Zelle gewährleisten. Zu den Proteinen, die über die ErbB-vermittelte Signaltransduktion aktiviert werden, zählt u. a. Ha-ras. Aufgrund der Eigenschaft, apoptotische Signale zu verhindern, sind die ErbB-Rezeptoren bedeutend für die Tumorentstehung (Danielsen und Maihle, 2002).

Eine weitere interessante Beobachtung konnte in den β -Catenin-mutierten Tumoren gemacht werden, in denen eine Gruppe von Genen verändert war, deren Proteine in gemeinsamen Stoffwechselwegen angesiedelt sind (Abbildung 23). Darunter befanden sich Gene, die in β -Catenin-mutierten Tumoren deutlich negativ reguliert vorlagen, in Ha-ras-mutierten Tumoren jedoch weitgehend unveränderte Expression gegenüber dem Normalgewebe zeigten. Die Proteine, für die diese Gene kodieren, sind am Abbau von Aminosäuren beteiligt (u. a. Glycin-Decarboxylase, Serin-Dehydratase und Cystathionin- γ -Lyase) bzw. gehören zum Harnstoffzyklus (Arginase und Argininosuccinat-Synthetase).

Zusammengefasst ergibt sich das Bild, dass in den β -Catenin-mutierten Tumoren aufgrund des verminderten Abbaus mehr Aminosäuren u. a. für Synthesen zur Verfügung stehen. Darüber hinaus bewirkt die negative Regulation von Enzymen des Harnstoffzyklus, dass weniger Ammoniak über die Bildung von Harnstoff ausgeschieden wird. Da aber gleichzeitig die Glutamin-Synthetase erhöht exprimiert wird, kann der anfallende Stickstoff zur Bildung von Glutamin genutzt werden, das wiederum für die Purin/Pyrimidin-Biosynthese benötigt wird und damit wichtig für die DNA-Synthese ist.

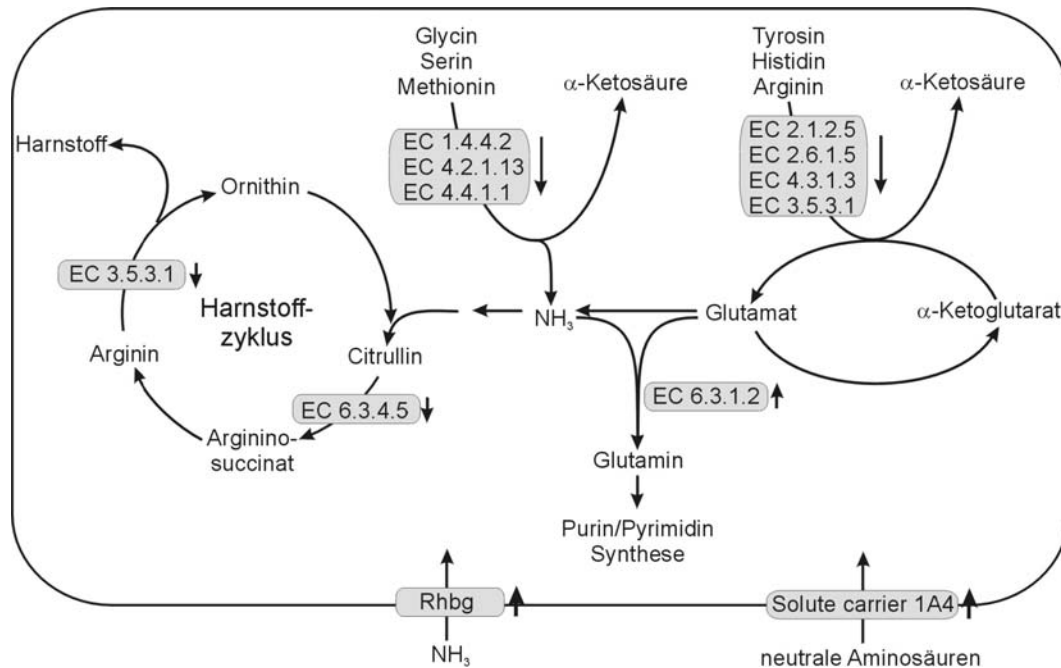


Abbildung 23: In β -Catenin-mutierten Tumoren waren eine Gruppe von Genen gegenüber dem Normalgewebe differentiell exprimiert, die für Proteine im Aminosäureabbau und der Ammoniak-Entgiftung kodieren. Die Unterschiede in der Expression sind durch Pfeile gekennzeichnet. Harnstoffzyklus: EC 3.5.3.1: Arginase, EC 6.3.4.5: Argininosuccinat-Synthetase; Aminosäureabbau: EC 1.4.4.2: Glycin-Decarboxylase, EC 4.2.1.13: Serin-Dehydratase, EC 4.4.1.1: Cystathionin- γ -Lyase, EC 2.1.2.5: Formiminotransferase-Cyclodeaminase, EC 2.6.1.5: Tyrosin-Aminotransferase, EC 4.3.1.3: Histidin-Ammonia-Lyase; EC 6.3.1.2: Glutamin-Synthetase; Rhbg: Rhesus blood group-associated B glycoprotein.

In β -Catenin-mutierten Tumoren waren ferner zwei Gene gegenüber dem Normalgewebe erhöht exprimiert, die für Proteine aus dem Citratzyklus kodieren (Abbildung 24). Dabei handelte es sich um die Citrat-Synthase und die Isocitrat-Dehydrogenase, wobei die letztere die NADP^+ -abhängige mitochondriale Isoform darstellte. Die erhöhte Expression der Isocitrat-Dehydrogenase bewirkt, dass vermehrt Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ bereit gestellt werden. Diese werden schließlich über den Antiport von Citrat/Malat durch die Mitochondrienmembran ins Zytosol transportiert und stehen dort für Oxidationsreaktionen zur Verfügung, die über Monooxygenasen wie den Cytochrom P450-Enzyme katalysiert werden. Es ist bekannt, dass Cytochrom

P450-Enzyme durch PB induziert werden (Zelko und Negishi, 2000; zur Übersicht siehe Honkakoski und Negishi, 2000). Da unter PB in der Leber von Cx32-WT-Mäusen für β -Catenin-mutierte Tumoren selektioniert wird (Aydinlik et al., 2001), könnte hier ein Zusammenhang mit der erhöhten Expression der Isocitrat-Dehydrogenase bestehen.

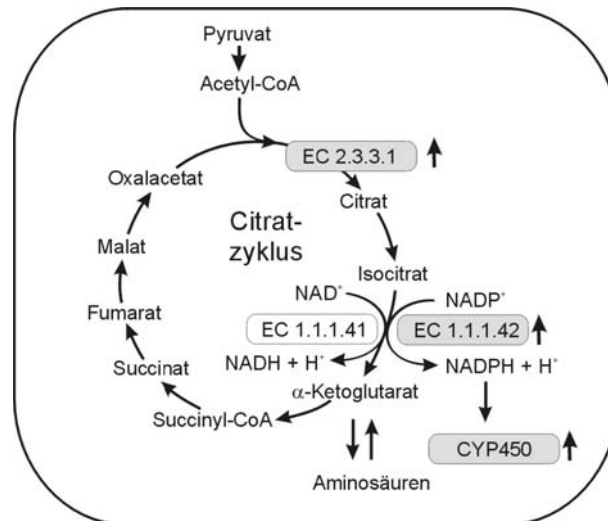


Abbildung 24: In β -Catenin-mutierten Tumoren waren zwei Gene gegenüber dem Normalgewebe erhöht exprimiert, die für Enzyme aus dem Citratzyklus kodieren, darunter die NADP⁺-abhängige mitochondriale Isocitrat-Dehydrogenase 2 (EC 1.1.1.42). Die erhöhte Expression dieses Enzyms bewirkt, dass vermehrt Reduktionsäquivalente anfallen, die für Oxidationsreaktionen, die durch Cytochrom P450-Enzyme katalysiert werden, genutzt werden können. EC 2.3.3.1: Citrat-Synthase; EC 1.1.1.41: Isocitrat-Dehydrogenase, NAD⁺.

Ein Stoffwechselweg, der in Ha-ras-mutierten Tumoren sehr bedeutend zu sein scheint, ist der Fettstoffwechsel. So waren allein 23 Gene in den Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe verändert, deren Proteinen eine Funktion im Fettstoffwechsel zugeordnet werden kann. Im Gegensatz dazu wurde in β -Catenin-mutierten Tumoren in dieser Weise nur 6 Gene gefunden. Unter den 23 in Ha-ras-mutierten Tumoren veränderten Gene waren einige, die für Proteine im Cholesterinstoffwechsel kodieren (Abbildung 25 A).

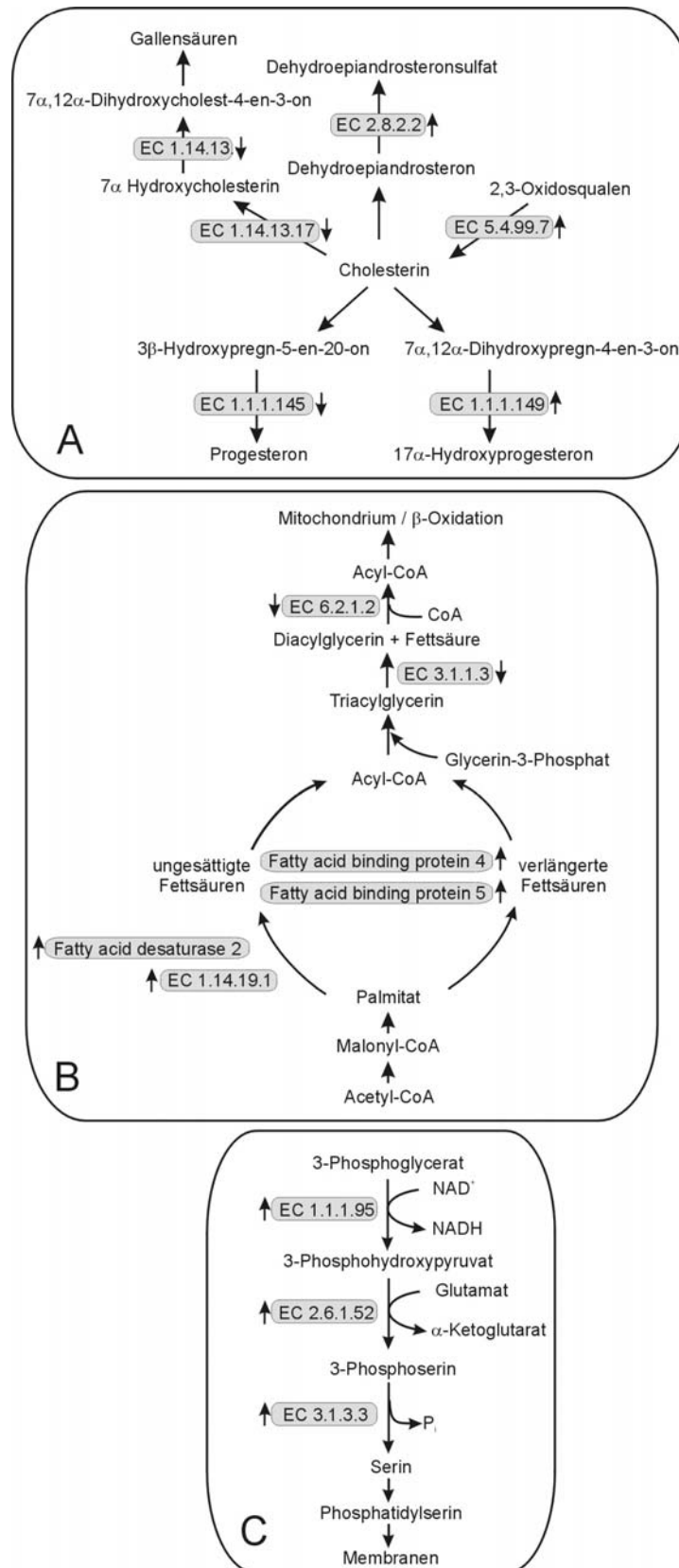


Abbildung 25: Schematische Darstellung einiger Gene, deren Proteine eine Rolle im Fettstoffwechsel spielen und die in Ha-ras-mutierten Tumoren eine veränderte Expression

zeigten. Darunter waren Gene, die für Proteine im Cholesterin (A)- bzw. Fettsäurestoffwechsel (B) kodieren. Ebenfalls erhöhte Expression zeigten die Gene, die für Proteine kodieren, die die Biosynthese von Serin katalysieren. Serin wird über die Synthese von Phosphatidylserin für die Membranbildung benötigt. Die Unterschiede in der Expression sind durch Pfeile gekennzeichnet. Cholesterinstoffwechsel: EC 1.14.13.-: CYP 8b1, EC 1.14.13.17: CYP 7a1/7b1, EC 5.4.99.7: Lanosterol-Synthase, EC 2.8.2.2: Sulfotransferase hydroxysteroid preferring 2, EC 1.1.1.145: Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2, EC 1.1.1.149: 20 α - Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Fettsäurestoffwechsel: EC 6.2.1.2: Butyryl-CoA-Synthetase 1, EC 3.1.1.3: Lipase, EC 1.14.19.1: Stearoyl-CoA-Desaturase 2. Serin-Biosynthese: EC 1.1.1.95: 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, EC 2.6.1.52: Phosphoserin-Aminotransferase, EC 3.1.3.3: Phosphoserin-Phosphatase.

Hierbei ist eine Tendenz zur vermehrten Bildung von Cholesterin zu erkennen, da weniger Cholesterin zu Gallensäuren umgewandelt wird und über die erhöhte Expression der Lanosterol-Synthase schließlich vermehrt Cholesterin gebildet wird. Auch der Steroid-Metabolismus, bei dem Cholesterin die Ausgangssubstanz darstellt, könnte damit von Bedeutung sein. Neben dem Cholesterinstoffwechsel scheint auch der Fettsäurestoffwechsel in den Ha-ras-mutierten Tumoren eine Rolle zu spielen (Abbildung 25 B).

Zwei der Gene aus dem Fettsäurestoffwechsel, die in Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe erhöht exprimiert waren, kodieren für Desaturasen. Diese Enzyme katalysieren die Synthese ungesättigter Fettsäuren und könnten damit bedeutend für die Membransynthese sein. Diesbezüglich war auch auffällig, dass in den Ha-ras-mutierten Tumoren die drei Gene, die für die Biosynthese von Serin wichtig sind, erhöht exprimiert waren. Aus Serin wird Phosphatidylserin synthetisiert, das wiederum für die Synthese von Phospholipiden benötigt wird, die Hauptbestandteile von Membranen darstellen. Somit scheint es in den Ha-ras-mutierten Tumoren möglicherweise eine Tendenz zu vermehrter Membransynthese zu geben.

Zum Schluss soll noch kurz auf ein interessantes Gen eingegangen werden, das für einen Rezeptor kodiert und das nur in den Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe negativ reguliert war. Bei diesem Gen handelte es sich um Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 (Nr1i3), das für den

Constitutive androstane receptor beta (CAR-beta) kodiert. Der Rezeptor CAR vermittelt die durch PB induzierte Genexpression (Kawamoto et al., 1999; Wei et al., 2000; Honkakoski und Negishi, 2000; Zelko und Negishi, 2000). Da PB in der Leber von Cx32-WT-Mäusen nur für β -Catenin-mutierte Tumoren selektiert (Aydinlik et al., 2001), könnte die negative Regulation von CAR damit eine Erklärung für die fehlende Promotionswirkung von PB auf Ha-ras-mutierte Tumoren sein.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die differentielle Genexpression in der Leber von PB-behandelten und unbehandelten Connexin32-Knockout (Cx32-KN)- und Connexin32-Wildtyp (Cx32-WT)-Mäusen untersucht. In vorausgegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cx32 für den Prozess der Leberkrebsentstehung und ferner für die tumorpromovierende Wirkung des Modelltumorpromotors Phenobarbital (PB) in der Leber der beiden Stämme von entscheidender Bedeutung ist. So entwickeln Cx32-KN-Mäuse mehr hepatozelluläre Tumoren nach Gabe des Kanzerogens Diethylnitrosamin (DEN) als Cx32-WT-Mäuse. Im Gegensatz dazu kann die Entstehung von Lebertumoren in der Leber von Cx32-WT-Mäusen durch PB-Behandlung promoviert werden, nicht jedoch von Cx32-KN-Mäusen.

PB-Behandlung verändert in normalen Hepatozyten die Expression zahlreicher Gene, wobei unklar ist, welche von diesen für die Tumorpromotion relevant sind. Ziel dieser Arbeit war es, mittels globaler Genexpressionsanalysen die unterschiedliche Empfindlichkeit von Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen bezüglich der Entstehung von Lebertumoren und deren Beeinflussung durch PB aufzuklären. Es wurden dafür drei verschiedene Analysemethoden eingesetzt, wobei die Methode der Affymetrix-Microarray-Technologie die zuverlässigsten Ergebnisse brachte. Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten ergab, dass sich die Genexpression in der Leber von unbehandelten Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen nur geringfügig unterschied. Erstaunlicherweise konnte nur für 5 Gene, darunter Cx32, eine differentielle Expression verifiziert werden. Unter PB-Behandlung zeigten sich dagegen 59 Gene verändert. Hierbei war auffällig, dass die meisten von diesen in Cx32-KN- und Cx32-WT-Mäusen in gleicher Weise induziert bzw. reprimiert waren. Eine unterschiedliche Beeinflussung der Genexpression durch PB in den beiden Stämmen wurde bei 12 Genen nachgewiesen. Insgesamt wurden einige interessante Gene, die für die Tumorpromotion relevant sein könnten, als differentiell exprimiert identifiziert. Darunter das Gen, das für das Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1) kodiert und bei der Wachstumsregulation von Bedeutung ist.

In einer zweiten Studie wurde die Genexpression in Lebertumorgewebe untersucht. Dabei handelte es sich um Tumoren aus Cx32-WT-Mäusen, die entweder Ha-ras- oder β -Catenin-mutiert waren. Vorausgegangene Untersuchungen zeigten, dass in der Leber DEN-behandelter Cx32-WT-Mäuse häufig Ha-ras-mutierte Tumoren entstehen, während sich in Mäusen, die zusätzlich PB-behandelt wurden, in der Regel β -Catenin-mutierte Tumoren entwickeln. Die statistische Auswertung der bei der globalen Expressionsanalyse erhaltenen Daten zeigte große Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe, wobei sich Ha-ras- und β -Catenin-mutierte Tumoren in ihren Expressionsprofilen deutlich voneinander unterschieden. So waren in Ha-ras-mutierten Tumoren 204 Gene (135 Gene induziert, 69 Gene reprimiert) und in β -Catenin-mutierten Tumoren 163 Gene (102 Gene induziert und 61 Gene reprimiert) gegenüber dem Normalgewebe differentiell exprimiert. Interessanterweise waren nur 30 Gene in beiden Tumorarten gemeinsam verändert. Bei der Analyse der Funktion der veränderten Gene zeigte sich, dass für die Überlebensstrategie der beiden Tumorarten unterschiedliche Signal- und Stoffwechselwege von Bedeutung zu sein scheinen. So ergaben sich Hinweise auf starke Veränderungen im Aminosäurestoffwechsel in β -Catenin-mutierten Tumoren, während in Ha-ras-mutierten Tumoren der Fettsäurestoffwechsel gestört zu sein scheint. Interessanterweise fanden sich auch unter den in β -Catenin-mutierten Tumoren induzierten Genen einige, deren Proteine inhibitorisch im Wnt/Wingless-Signalweg aktiv sind. In Ha-ras-mutierten Tumoren waren dagegen einige Gene verändert, die für kleine GTPasen kodieren sowie Gene, deren Proteine bei der Regulation dieser kleinen GTPasen von Bedeutung sind. Darüber hinaus war in Ha-ras-mutierten Tumoren das Gen für den CAR-Rezeptor, der im Lebernorgewebe als Transkriptionsfaktor PB-responsive Gene reguliert, stark vermindert exprimiert. Dies könnte unter Umständen eine Erklärung für die fehlende Promotionswirkung von PB auf Ha-ras-mutierte Tumoren liefern.

6 Literaturverzeichnis

- Ai, Z., Fischer, A., Spray, D.C., Brown, A.M. und Fisman, G.L.** (2000)
Wnt-1 regulation of Cx43 in cardiac myocytes.
J. Clin. Invest. 105: 161-171
- Aydinlik, H., Nguyen, T.D., Moennikes, O., Buchmann, A. und Schwarz, M.** (2001)
Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of β -catenin-mutated mouse liver tumors.
Oncogene 20: 7812-7816
- Balmain, A. und Brown, K.** (1988)
Oncogene activation in chemical carcinogenesis.
Adv. Cancer Res. 51: 147-182
- Bannasch, P., Mayer, D. und Hacker, H.J.** (1980)
Hepatocellular glycogenesis and hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 605: 217-245
- Beer D.G., Neveu, M.J., Paul, D.L., Rapp, U.R. und Pitot, H.C.** (1988)
Expression of the c-raf proto-oncogene, γ -glutamyltranspeptidase, and gap junction protein in rat liver neoplasms.
Cancer Res. 48: 1610-1617
- Berenblum, I.** (1941a)
The cocarcinogenic action of Croton resin.
Cancer Res. 1: 44-48
- Berenblum, I.** (1941b)
The mechanism of carcinogenesis.
Cancer Res. 1: 807-814
- Berenblum, I. und Shubik, P.** (1947)
A new quantitative approach to the study of stages of chemical carcinogenesis in the mouse skin.
Br. J. Cancer 1: 383-391
- Beyer, E.C., Paul, D.L. und Goodenough, D.A.** (1987)
Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver.
J. Cell Biol. 105: 2621-2629
- Boehringer Mannheim** (1998)
Biochemica Information, 102: 3-5
- Bos, J.L.** (1989)
Ras oncogenes in human cancer: a review.
Cancer Res. 49: 4683-4689
- Boutwell, R.K.** (1974)
The function and mechanism of promoters of carcinogenesis.
Crit. Rev. Toxicol. 2: 419-443

Bradford, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72: 248-254

Bruzzone, R., White, T.W. und Paul, D.L. (1996)

Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling.

Eur. J. Biochem. 238: 1-27

Buchmann, A., Bauer-Hofmann, R., Mahr, J., Drinkwater, N.R., Luz, A. und Schwarz, M. (1991)

Mutational activation of the Ha-ras gene in liver tumors of different rodent strain: correlation with susceptibility to hepatocarcinogenesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 911-915

Buchmann, A., Bock, K.W. und Schwarz, M. (1992)

Enzyme and immunohistochemical phenotyping of diethylnitrosamine-induced liver lesions of male C3H/He, B6C3F1 and C57BL/6J mice.

Carcinogenesis 13:691-697

Buchmann, A., Mahr, J., Bauer-Hoffmann, R. und Schwarz, M. (1989)

Mutations at codon 61 of the Ha-ras protooncogene in precancerous liver lesions of the B6C3F1 mouse.

Mol. Carcinogenesis 2: 121-125

Buchmann, A., Schwarz, M., Schmitt, R., Wolf, C.R., Oesch, F. und Kunz, W. (1987)

Development of the cytochrom P450-altered preneoplastic and neoplastic lesions during nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in the rat.

Cancer Res. 47: 2911-2918

Buchmann, A., Willy, C., Buenemann, C.L., Stroh, C., Schmiechen, A. und Schwarz, M. (1999)

Inhibition of transforming growth factor beta 1-induced hepatoma cell apoptosis by liver tumor promoters: characterization of primary signaling events and effects on CPP32-like caspase activity.

Cell Death Differ. 6: 190-200

Budunova, I.V. und Williams, G.M. (1994)

Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication.

Cell. Biol. Toxicol. 10: 71-116

Bursch, W., Oberhammer, E. und Schulte-Hermann, R. (1992)

Cell death by apoptosis and its protective role against disease.

TIPS 13: 245-251

Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., und Der, C.J. (1998)

Increasing complexity of Ras signaling.

Oncogene 17: 1395-1413

- Chai, X., Zhai, Y. und Napoli, J.L.** (1997)
cDNA cloning and characterization of a cis-retinol/3alpha-hydroxysterol short-chain dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 272: 33125-33131
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. 162: 156-159
- Cruciani, V. und Mikalsen, S.O.** (2002)
Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases
Biol. Cell 94: 433-443
- Danielsen, A.J. und Maihle, N.J.** (2002)
The EGF/ErbB receptor family and apoptosis.
Growth Factors 20: 1-15
- Diatchenko, L., Lau Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. und Siebert, P.D.** (1996)
Suppression subtractive hybridisation: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6025-6030
- Downward, J.** (2003)
Targeting ras signalling pathways in cancer therapy.
Nat. Rev. Cancer 3: 11-22
- Evert, M., Ott, T., Temme, A., Willecke, K. und Dombrowski, F.** (2002)
Morphology and morphometric investigation of hepatocellular preneoplastic lesions and neoplasms in connexin32-deficient mice.
Carcinogenesis 23: 697-703
- Frey, S., Buchmann, A., Bursch, W., Schulte-Hermann, R. und Schwarz, M.** (2000)
Suppression of apoptosis in C3H mouse liver tumors by activated Ha-ras oncogene.
Carcinogenesis 21: 161-166
- Friedewald, W.F. und Rous, P.** (1944)
The initiating and promoting elements in tumor promotion.
J. Exp. Med. 80: 101-125
- Frueh, F.W., Zanger U.M. und Meyer, U.A.** (1997)
Extent and character of phenobarbital-mediated changes in gene expression in the liver.
Mol. Pharmacol. 51: 363-369
- Fu, C., Turck, C.W., Kurosaki, T. und Chan, A.C.** (1998)
BLNK: a central linker protein in B cell activation.
Immunity 9: 93-103
- Garcia-Allan, C., Lord, P.G., Loughlin, J.M., Orton, T.C und Sidaway, J.F.** (2000)
Identification of phenobarbitone-modulated genes in mouse liver by differential display.
J. Biochem. Mol. Toxicol. 14: 65-72

Gurskaya, N.G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D., Khaspekov, G.L., Lukyanov, K.A., Vagner, L.L., Ermolaeva, O.D., Lukyanov, S.A. und Sverdlov, E.D. (1996)

Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate.

Anal. Biochem. 240: 90-97

Harrel, F.E. (2001)

Regression Modeling Strategies: with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis.

New York: Springer: 568

Honkakoski, P. und Negishi, M. (1997)

Characterization of a phenobarbital-responsive enhancer module in mouse P450 CYP2B10 gene.

J. Biol. Chem. 272: 14943-14949

Honkakoski, P. und Negishi, M. (2000)

Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors.

Biochem J. 347: 321-337

Ito, S., Tsuda, M., Yoshitake, A., Yanai, T., und Masegi, T. (1998)

Effect of phenobarbital on hepatic gap junctional intercellular communication in rats.

Toxicol. Pathol. 26: 253-259

Janssen-Timmen, U., Traub, O., Dermietzel, R., Rabes, H.M. and Willecke, K. (1986)

Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody.

Carcinogenesis 7: 1475-1482

Jiang, J.X. und Goodenough, D.A. (1996)

Heteromeric connexons in lens gap junction channel.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 287-291

Jongen, W.M.F., Fitzgerald, D.J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, J.T., Gros, D., Takeichi, M. und Yamasaki, H. (1991)

Regulation of Cx43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin.

J. Cell Biol. 114: 545-555

Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K. und Negishi, M. (1999)

Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B genes.

Mol. Cell. Biol. 19: 6318-6322

Kemp, C.J., Leary, C.N. und Drinkwater, N.R. (1989)

Promotion of murine hepatocarcinogenesis by testosterone is androgen receptor-dependent but not cell autonomous.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7505-7509

Klaunig, J.E. (1991)

Alterations in intercellular communication during the stage of promotion. Gap junctions and hepatic tumor promotion.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 198: 688-692

Klaunig, J.E. und Ruch, R.J. (1990)

Possible role of inhibition of intercellular communication in nongenotoxic carcinogenesis.

Lab. Invest. 62: 135-145

Kondoh, N., Wakatsuki, T., Ryo, A., Hada, A., Aihara, T., Horiuchi, S., Goseki, N., Matsubara, O., Takenaka, K., Shichita, M., Tanaka, K., Shuda, M. und Yamamoto, M. (1999)

Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis.

Cancer Res. 59: 4990-4996

Konig, N. und Zampighi, G. (1995)

Purification of bovine lens cell-to-cell channels composed of connexin44 and connexin50.

J. Cell Sci. 108: 3091-3098

Krutovskikh, V.A., Mazzoleni, G., Mironov, N., Omori, Y., Aguelon, A.M., Mesnil, M., Berger, F., Partensky, C. und Yamasaki, H. (1994)

Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin32.

Int. J. Cancer 56: 87-94

Krutovskikh, V.A., Oyamada, M. und Yamasaki, H. (1991)

Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication in vivo.

Carcinogenesis 12: 1701-1706

Kumar, N.M. und Gilula, B.N. (1986)

Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein.

J. Cell Biol., 103: 767-776

Kumar, N.M. und Gilula, B.N. (1992)

Molecular biology and genetics of gap junctions channels.

Semin. Cell Biol. 3: 3-16

Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1996)

The gap junction communication channel.

Cell 84: 381-388.

Laird, D.W., Puranam, K.L. und Revel, J.P. (1991)

Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes.

Biochem. J. 273:62-72

Lämmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 277: 680-685

Leu, J.I., Crissey, M.A. und Taub, R. (2003)

Massive hepatic apoptosis associated with TGF-beta 1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein 1-deficient mice.
J. Clin. Invest. 111: 129-139

Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Kurek, R., Buchmann, A. und Schwarz, M. (2002)

Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital.
Cancer Res. 62: 5685-5688

Loewenstein, W.R. (1981)

Junctional intercellular communication: the cell-cell membrane channel.
Physiol. Rev. 61: 829-913

Loewenstein, W.R. (1990)

Cell-to-cell communication and the control of growth.
Amer. Rev. Respir. Dis. 142:48-53

Loo, L.W.M., Berestecky, J.M., Kanemitsu, M.Y. und Lau, A.F. (1995)

pp60^{src}-mediated phosphorylation of connexin43, a gap junction protein.
J. Biol. Chem. 270: 12751-12761

Lustig, B. und Behrens, J. (2003)

The Wnt signalling pathway and its role in tumor development.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 129: 199-221

Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., Behrens, J. (2002)

Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors.
Mol. Cell Biol. 22: 1184-1193

Macara, I.G., Lounsbury, K.M., Richards, S.A., McKiernan, C. und Bar-Sagi, D. (1996)

The Ras superfamily of GTPases.
FASEB J. 10: 625-630

Malumbres, M., Manges, R., Ferrer, N., Lu, S. und Pellicer, A. (1997)

Isolation of high molecular weight DNA for reliable genotyping of transgenic mice.
BioTechniques 22: 1114-1119

Manthey, D., Bukauskas, F., Lee, C.G., Kozak, C.A. und Willecke, K. (1999)

Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin57 in human HeLa cells.
J. Biol. Chem. 274:14716-14723

- Maronpot, R.R., Fox, T., Malarkey, D.E. und Goldsworthy, T.L.** (1995)
Mutations in the ras oncogene: clues to etiology of molecular pathogenesis of mouse liver tumors.
Toxicology 101: 125-156
- Mazeyrat, S., Saut, N., Grigoriev, V., Mahadevaiah, S.K., Ojarikre, O.A., Rattigan, A., Bishop, C., Eicher, E.M., Mitchell, M.J. und Burgoyne, P.S.** (2001)
A Y-encoded subunit of the translation initiation factor Eif2 is essential for mouse spermatogenesis.
Nat. Genet. 29: 49-53
- McCormik, F.** (1993)
How receptors turn Ras on.
Nature 363: 15-16
- Mesnil, M.** (2002)
Connexins and cancer.
Biol Cell 94: 493-500
- Moennikes, O., Buchmann, A., Ott, T., Willecke, K. und Schwarz, M.** (1999)
The effect of connexin32 null mutation on hepatocarcinogenesis in different mouse strains.
Carcinogenesis 20: 1379-1382
- Moennikes, O., Buchmann, A., Romualdi, A., Ott, T., Werringloer, J., Willecke, K. und Schwarz, M.** (2000)
Lack of Phenobarbital-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in Cx32-null mice.
Cancer Res. 60: 5087-5091
- Moolgavkar, S.H.** (1983)
Model of human carcinogenesis: action of environmental agents.
Environ. Health Perspect. 50: 285-291.
- Moolgavkar, S.H. und Knudson, A.G.** (1981)
Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. 66: 1037-1052
- Mottram, J.C.** (1944)
A developing factor in experimental blastogenesis.
J. Pathol. Bacteriol. 56: 181-187
- Naus, C.C.** (2002)
Gap junctions and tumor progression.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 80: 136-141
- Nelles, E., Buetzler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H.D., Dahl, U., Traub, O., Stuempel, F., Jungermann, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Dermietzel, R. und Willecke, K.** (1996)
Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9565-9570

Neveu, M.J., Hully, J.R., Babcock, K.L., Hertzberg, E.L., Nicholson, B.J., Paul, D.L. and Pitot, H.C. (1994)

Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver.

J. Cell Sci. 107: 83-95

Nobes, C.D. und Hall, A. (1995)

Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility.

Biochem. Soc. Trans 23: 456-459

Pitot, H.C. (1990)

Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 465-500

Pitts, J.D. und Finbow, M.E. (1986)

The gap junction.

J. Cell. Sci. 4 (Suppl.): 239-266

Qin, H., Shao, Q., Igdoura, S., Alaoui-Jamali, M. und Laird, D.W. (2003)

Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells.

J. Biol. Chem. 278:30005-14

Qiu, R.G., Chen, J., McCormick, F. und Symons, M. (1995)

A role for Rho in Ras transformation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 11781-11785

R-Development-Core-Team (2003)

R: a language and environment for statistical computing, Vienna, Austria

Ren, P. und Ruch, R.J. (1996)

Inhibition of gap junctional intercellular communication by barbiturates in long-term primary cultured rat hepatocytes is correlated with liver tumor promoting activity.

Carcinogenesis 17: 2119-2124

Reynolds, S.H., Stowers, S.J., Maronpot, R.R., Anderson, M.W. und Aaronson, S.A. (1986)

Detection and identification of activated oncogenes in spontaneously occurring benign and malignant hepatocellular tumors of B6C3F1 mouse.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 33-37

Rose, B., Mehta, P.P. und Loewenstein, W.R. (1993)

Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity.

Carcinogenesis 14: 1073-1075

Rous, P. und Kidd, J.G. (1941)

Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of the tar tumors of rabbits.

J. Exp. Med. 73: 365-390

Saiki, R.K., Gelfund, D.H., Stoffel, S., Scharf S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487-491

Saitoh, H., Cooke, C.A., Burgess, W.H., Earnshaw, W.C. und Dasso, M. (1996)

Direct and indirect association of the small GTPase ran with nuclear pore proteins and soluble transport factors: studies in *Xenopus laevis* egg extracts.
Mol. Biol. Cell. 7: 1319-1334

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)

Molecular Cloning - A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Torok, L., Ellinger, A. und Mullauer, L. (1995)

Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis.
Toxicology Letters 82-83: 143-148

Schulte-Hermann, R., Marian, B. und Bursch, W. (1994)

Tumorpromotion.
Marquardt, H., Schäfer, S., G., Lehrbuch der Toxikologie,
Mannheim; Leipzig; Wien; Zürich: BI-Wissenschaftsverlag: 148-177

Schwarz, M. und Bock, K.W. (1998)

Mechanismen der Entstehung fremdstoffbedingter Krebsformen.
In: Ganten, D. und Ruckpaul, K., Hrsg., Handbuch der Molekularen Medizin, Band 2,
Tumorerkrankungen Berlin, Heidelberg; Springer Verlag, 27-49

Shibutani, M., Takahashi, N., Kobayashi, T., Uneyama, C., Masutomi, N., Nishikawa, A. und Hirose, M. (2002)

Molecular profiling of genes up-regulated during promotion by phenobarbital treatment in a medium-term rat liver bioassay.
Carcinogenesis 23: 1047-1055

Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K.W. und Schwarz, M. (1995)

Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin mediated tumor promotion in rat liver.
Carcinogenesis 16: 1271-1275

Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. und Negishi, M. (1999)

The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene.
J. Biol. Chem. 274: 6043-6046

Sugie, S., Mori, H. und Takahashi, M. (1987)

Effect of in vivo exposure to liver tumor promoters PB and DDT on the gap junctions of rat hepatocytes: a quantitative freeze-fracture analysis.
Carcinogenesis 8: 45-51

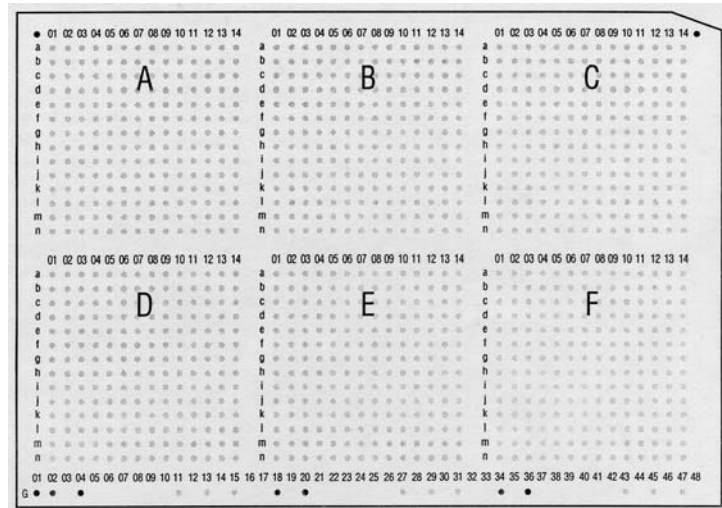
- Takeda, A., Saheki, S., Shimazu, T. und Takeuchi, N.** (1989)
Phosphorylation of the 27 kDa gap junction protein by protein kinase C in vivo and rat hepatocytes.
J. Biochem. 106: 723-727
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.D., Nelles, E., Schwarz, M. und Willecke, K.** (1997)
High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32.
Curr. Biol. 7: 713-716
- Teubner, B., Odermatt, B., Güldenagel, M., Söhl, G., Degen, J., Bukauskas, F., Kronengold, J., Verselis, V.K., Jung, Y.T. und Kozak, C.A.** (2001)
Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons.
J. Neurosci. 21: 1117-1126
- Traub, O., Drüge, P.M. und Willecke, K.** (1983)
Degradation and resynthesis of gap junction protein in plasma membranes of regenerating liver after partial hepatectomy or cholestasis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 755-759
- Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brummer, F., Hülser, D. und Willecke, K.** (1989)
Comparative characterization of the 21-kD and the 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes.
J. Cell Biol. 1058: 1039-1051
- Trosko, J.E. und Ruch, R.J.** (1998)
Cell-cell communication in carcinogenesis.
Frontiers in Bioscience 3: 208-236
- Ueda, A., Hamadeh, H.K., Webb, H.K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C., Lehmann, J.M. and Negishi, M.** (2002)
Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital.
Mol. Pharmacol. 61: 1-6
- Van der Heyden, M.A., Rook, M.B., Hermans, M.M., Rjksen, G., Boonstra, J., Defize, L.H. und Destree, O.H.** (1998)
Identification of Cx43 as a functional target of Wnt signalling.
J. Cell Sci. 111: 1741-1749
- Vesselinovitch, S.D., und Mihailovich, N.** (1983)
Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse.
Cancer Res. 43: 4253-4259
- Vousden, K.H. und Lu, X.** (2002)
Live or let die: the cell's response to p53.
Nat. Rev. Cancer 2: 605-615

- Wang, W., Yang, L.Y., Yang, Z.L., Huang, G.W. und Lu, W.Q.** (2003)
Expression and significance of RhoC gene in hepatocellular carcinoma.
World J. Gastroenterol. 9: 1950-1953
- Wang, Z. und Brown, D.D.** (1991)
A gene expression screen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11505-11509
- Warner, K.A., Fernstrom, M.J. und Ruch, R.J.** (2003)
Inhibition of mouse hepatocyte gap junctional intercellular communication by phenobarbital correlates with strain-specific hepatocarcinogenesis.
Toxicol. Science 71: 190-197
- Waxman, D.J.** (1999)
P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR.
Arch. Biochem. Biophys. 369: 11-23
- Wei, P., Zhang, J., Egan-Hafley, M., Liang, S. und Moore, D.D.** (2000)
The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism.
Nature 407: 920-923
- White, T.W. and Paul, D.L.** (1999)
Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions.
Annu. Rev. Physiol. 61: 283-310
- White, T.W., Bruzzone, R. und Paul, D.L.** (1995)
The connexin family of intercellular channel forming proteins.
Kidney Int. 48: 1148-1157
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U. und Söhl, G.** (2002)
Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome.
Biol. Chem. 383: 725-737
- Willecke, K., Jungbluth, S., Dahl, E., Hennemann, H., Heynkes, R. und Grzeschik, K.H.** (1990)
Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes.
Eur. J. Cell Biol. 53: 275-280
- Wiseman, R.W., Stowers, S.J., Miller, E.C., Anderson, M.W. und Miller, J.A.** (1986)
Activating mutations of the c-Ha-ras protooncogene in chemically induced hepatomas of the male B6C3F1 mouse.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5825-5829
- Wolfinger, R.D., Gibson, G., Wolfinger, E.D., Bennett, L., Hamadeh, H., Bushel, P., Afshari, C. und Paules, R.S.** (2001)
Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models.
J. Comput. Biol. 8: 625-637

- Wu, Z. und Irizarry, R.A.** (2004)
Stochastic models inspired by hybridization theory for short oligonucleotide arrays.
Proceedings of RECOMB 2004
- Yamaoka, K., Nouchi, T., Tazawa, J., Hiranuma, S., Marumo, F. und Sato, C.** (1995)
Expression of gap junction protein Cx32 and E-cadherin in human hepatocellular carcinoma.
J. Hepatol. 22: 536-539
- Yamasaki, H.** (1990)
Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis.
Carcinogenesis 11: 1051-1058
- Yamasaki, H.** (1991)
Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis.
Environ. Health Persp. 93: 191-197
- Yamasaki, H. und Naus, C.C.** (1996)
Role of connexin genes in growth control.
Carcinogenesis 17: 1199-1213
- Yano, T., Hernandez-Blazquez, F.J., Omori, Y. und Yamasaki, H.** (2001)
Reduction of malignant phenotype of HepG2 cells is associated with the expression of Cx26 but not Cx32.
Carcinogenesis 22: 1593-1600
- You, L.R., Chen, C.M., Yeh, T.S., Tsai, T.Y., Ma, R.T., Lin, C.H. und Lee, Y.H.** (1999)
Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase.
J. Virol. 73: 2841-53
- Zelko, I. und Negishi, M.** (2000)
Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 277: 1-6
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V.E., Kern, S.E., Hruban, R.H., Hamilton, S.R., Vogelstein, B. und Kinzler, K.W.** (1997)
Gene expression profiles in normal and cancer cells.
Science 276: 1268-1272

7 Anhang

7.1 Filterpositionen der immobilisierten cDNAs auf dem *AtlasTM mouse 1.2 Array*



7.2 Tabellarische Darstellung der in Lebertumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe von Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimierten Gene

Tabelle 21: nach Funktionen geordnete Gene, die in β -Catenin-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe von Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimiert waren.

Genbank Nr.	Gen	Synonym	E*	P-Wert
Metabolische Enzyme				
Kohlenhydratstoffwechsel				
AK012104	citrate synthase	Cs	2,92	3,46E-04
BMI24000	glucosidase beta 2	Gba2	2,51	5,11E-04
NM_008322	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	Idh2	2,38	5,97E-04
AW106963	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	Pck1	-3,42	7,04E-05
Fettstoffwechsel				
NM_018874	pancreatic lipase related protein 1	Pnliprp1	8,49	3,62E-07
AK017272	lipoprotein lipase	Lpl	3,37; 3,30	3,53E-04; 5,87E-04
BE979765	retinol dehydrogenase 9	Rdh9	2,63	5,27E-04
NM_024406	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Fabp4	2,55	1,74E-03
Fortsetzung Tabelle 21 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 21				
BB829192	sialyltransferase 9 (CMP-NeuAc:lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase)	Siat9	-2,47	9,07E-04
BC018263	cis-retinol/3alpha hydroxysterol short-chain DH-like	CRAD-L	-5,20	1,38E-07
Aminosäurestoffwechsel, Harnstoffzyklus				
U09114	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	Glul	2,13	1,83E-03
BC019483	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	Cth	-2,12	4,52E-04
NM_080845	formiminotransferase cyclodeaminase	Ftcd	-2,13	3,05E-04
BC024120	tyrosine aminotransferase	Tat	-2,55	1,44E-03
NM_007494	argininosuccinate synthetase 1	Ass1	-4,10	2,58E-05
AA792094	glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble	Got1	-5,00	4,00E-06
BC021950	serine dehydratase	Sds	-7,06	3,15E-07
NM_138595	glycine decarboxylase	Glde	-7,11	1,76E-05
L07645	histidine ammonia lyase	Hal	-7,45	8,38E-07
NM_007482	arginase 1, liver	Arg1	-9,72	1,13E-07
Nukleotidstoffwechsel				
AK013765	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	Ecgf1	-2,35	1,09E-03
Fremdstoffmetabolismus				
AF128849	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide20	Cyp2b20	9,55; 7,71	3,37E-09; 2,97E-05
NM_009998	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide10	Cyp2b10	6,94	8,98E-07
J03953	glutathione S-transferase, mu 3	Gstm3	5,40	1,09E-04
NM_028089	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide55	Cyp2c55	5,35	2,60E-05
BC015290	carboxylesterase 2	Ces2	2,99	1,57E-03
NM_008183	glutathione S-transferase, mu 2	Gstm2	2,82	1,91E-03
NM_008898	P450 (cytochrome) oxidoreductase	Por	2,60	1,09E-05
AK006371	nicotinamide N-methyltransferase	Nnmt	-6,01	7,08E-06
NM_007817	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide2	Cyp2f2	-9,91	1,79E-04
Proteinprozessierung				
BC010197	carboxypeptidase E	Cpe	5,96	1,11E-04
NM_008872	plasminogen activator, tissue	Plat	3,81	2,07E-05
NM_011909	ubiquitin specific protease 18	Usp18	3,34	1,17E-03
BC003851	protease, serine, 8 (prostasin)	Prss8	2,94	6,85E-07
NM_007585	annexin A2	Anxa2	2,74	6,09E-05
NM_019447	hepatocyte growth factor activator	Hgfac	-2,23	4,43E-04
NM_009175	sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-)	Siat1	-2,72; -3,78	2,75E-04; 5,46E-06
AK014346	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, 12	Serpina12	-8,26	1,91E-04
Nukleinsäureprozessierung, nukleäre Proteine				
BC021747	glycyl-tRNA synthetase	Gars	2,22	1,03E-04
NM_015786	histone 1, H1c	Hist1h1c	2,21	1,78E-03
AV303002	nucleoporin like 1	Nupl1	2,08	1,27E-04
NM_026539	chromodomain helicase DNA binding protein 1-like	Chd11	2,03	2,92E-04
Andere metabolische Enzyme				
NM_007607	carbonic anhydrase 4	Car4	7,32; 4,46	2,78E-05; 5,61E-04
NM_009801	carbonic anhydrase 2	Car2	3,53	1,57E-05
BC027279	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	Blvrb	2,86	2,19E-05
Fortsetzung Tabelle 21 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 21				
NM_007437	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2	Aldh3a2	2,35	3,01E-06
BC020001	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	Aldh1b1	-4,35	5,71E-05
NM_009647	adenylate kinase 4	Ak4	-3,50; -5,33	1,05E-05; 1,79E-03
Regulatorische Proteine				
Rezeptoren				
BB367779	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, β -3	Gabbr3	5,86; 4,27	7,09E-05; 2,28E-05
NM_013869	TNF receptor superfamily, member 19	Tnfrsf19	4,36; 2,01	6,46E-06; 2,05E-06
NM_016847	arginine vasopressin receptor 1A	Avpr1a	3,55; 2,21	8,99E-04; 9,76E-04
AF435926	monogenic, audiogenic seizure susceptibility 1	Mass1	3,37	3,34E-04
NM_013464	aryl-hydrocarbon receptor	Ahr	2,40	2,24E-04
AW558468	natriuretic peptide receptor 2	Npr2	2,13	1,36E-03
BB751088	G protein-coupled receptor 49	Gpr49	2,07	1,09E-04
AK018789	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Ntrk2	-2,82	9,58E-06
NM_011082	polymeric immunoglobulin receptor	Pigr	-5,87	1,88E-03
Signaltransduktion				
BC020038	endothelial cell-specific molecule 1	Esm1	3,89	3,89E-05
NM_018884	semaF cytoplasmic domain associated protein 3	Semcap3	3,58	2,66E-04
AF068182	B-cell linker	Blnk	3,02	7,05E-04
AW986246	monoamine oxidase A	Maoa	2,90	3,10E-04
NM_008587	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	Mertk	2,69	1,04E-04
BC003487	phospholipase A2, group VI	Pla2g6	2,36	5,47E-05
NM_019671	neuroepithelial cell transforming gene 1	Net1	2,35	2,03E-04
NM_019688	cAMP-regulated GEF II	Cgef2	2,23	1,98E-03
NM_026268	dual specificity phosphatase 6	Dusp6	2,00	8,03E-04
BC019491	angiopoietin-like 3	Angptl3	-2,54	6,68E-05
NM_013655	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	-2,63; -2,34	5,72E-04; 7,93E-04
NM_025658	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, 4D	Ms4a4d	-2,80	2,04E-04
NM_008176	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	-4,03	1,82E-03
NM_009016	retinoic acid early transcript 1, alpha	Raet1a	-4,03	1,02E-03
NM_009263	secreted phosphoprotein 1	Spp1	-4,75	3,51E-04
Wnt-Signalweg				
NM_027280	naked cuticle 1 homolog (Drosophila)	Nkd1	6,43	4,70E-06
BC004048	Wnt inhibitory factor 1	Wif1	5,27	4,49E-04
BB398993	axin2	Axin2	3,69	1,70E-03
AU035920	nemo like kinase	Nlk	3,39; 2,87	7,95E-05; 4,54E-04
Calciumstoffwechsel, Calcium-Signaltransduktion				
AY061807	calmodulin-like 4	Calml4	6,70	2,81E-05
AB061524	Down syndrome critical region gene 1-like 1	Dscr111	3,90	2,14E-05
BC021916	S100 calcium binding protein A11 (calizzarin)	S100a11	2,11	1,46E-03
Transkriptionsfaktoren				
-	-	-	-	-
Zellteilung, Differenzierung, Apoptose				
NM_009052	reduced expression 3	Rex3	4,59	3,52E-04
NM_009770	B-cell translocation gene 3	Btg3	2,10	8,04E-05
Fortsetzung Tabelle 21 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 21				
BC010403	presenilin 2	Psen2	-2,06	4,22E-04
NM_008059	G0/G1 switch gene 2	G0s2	-2,41	1,62E-03
Strukturelle Proteine				
Zytoskelett				
BC003475	tubulin, beta 2	Tubb2	2,57	2,55E-04
BC010581	stathmin 1	Stmn1	2,55	9,69E-04
AV224521	gelsolin	Gsn	-2,13	1,13E-03
BC027056	microtubule-associated protein, RP/EB family, 2	Mapre2	-2,82	2,46E-06
Extrazelluläre Matrix, Zelladhäsion				
BC007140	fibulin 1	Fbln1	2,90	2,88E-04
BC023060	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	Efemp1	-2,12	2,38E-04
BC021946	fibrinogen-like protein 1	Fgl1	-2,20	1,59E-03
NM_023160	camello-like 1	Cml1	-2,65	2,86E-05
NM_007833	decorin	Dcn	-3,60	4,38E-04
NM_021319	peptidoglycan recognition protein-like	Pglyrpl	-3,75	8,32E-04
Andere				
Transport				
NM_007423	alpha fetoprotein	Afp	8,20; 7,42; 3,94	1,62E-06; 1,88E-06; 1,17E-03
NM_021375	Rhesus blood group-associated B glycoprotein	Rhbg	6,63	9,32E-05
U75372	solute carrier family 1, member 2	Slc1a2	5,86	2,67E-06
A1152800	neuronal pentraxin 1	Nptx1	5,58	1,05E-05
NM_011395	solute carrier family 22, member 3	Slc22a3	5,40	1,28E-06
NM_054055	solute carrier family 13, member 3	Slc13a3	4,47; 3,84	7,16E-05; 1,84E-03
NM_011391	solute carrier family 16, member 7	Slc16a7	2,19	2,39E-04
BB277461	solute carrier family 1, member 4	Slc1a4	2,14	5,06E-04
NM_009205	solute carrier family 3, member 1	Slc3a1	-3,58	3,45E-05
AK004616	solute carrier family 21, member 2	Slc21a2	-4,23	1,32E-03
BC005743	sideroflexin 1 (iron ion transport)	Sfxn1	-5,45; -2,74	9,27E-06; 6,43E-06
Komplementsystem, Immunsystem				
NM_010740	complement component 1,q subcomponent, receptor 1	C1qr1	2,91	1,36E-03
BC026782	complement component factor h	Cfh	-2,50	5,10E-04
M29881	histocompatibility 2, Q region locus 7	H2-Q7	-3,32	1,25E-03
NM_013485	complement component 9	C9	-6,94	9,54E-05
Sonstige				
NM_007792	cysteine and glycine-rich protein 2	Csrp2	3,20	2,06E-04
BC016215	thrombospondin repeat containing 1	Tsrc1	2,93	7,19E-04
NM_019686	kinase interacting protein 2	Kip2	2,75	3,01E-06
AV174022	kidney androgen regulated protein	Kap	2,67	2,70E-05
NM_026768	mitochondrial ribosomal protein S18A	Mrps18a	2,08	4,24E-04
NM_019999	brain protein 17	Brp17	-2,29	1,59E-03
AF442824	olfactomedin 3	Olfm3	-4,15	4,47E-04
Unbekannte Sequenzen				
BM119226	GTL2,imprinted maternally expressed untranslated	Gtl2	7,25	1,05E-04
Fortsetzung Tabelle 21 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 21				
BB271021	cDNA sequence AB023957	AB023957	5,65	2,41E-07
BC023470	RIKEN cDNA C230093N12 gene	siehe Gen	4,71	3,70E-05
AK009207	RIKEN cDNA 2310007H09 gene	siehe Gen	4,26	1,19E-06
BB093563	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated	Gtl2	3,85	1,24E-03
BC023470	RIKEN cDNA C230093N12 gene	siehe Gen	3,78	8,03E-06
AA543734	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 189, expressed	D5Ertd189	3,73	2,70E-06
BG063148	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_064512.1 (H.sapiens)	siehe Gen	3,13	2,74E-06
BC027159	expressed sequence AW319517	AW319517	3,03	1,84E-05
BG963358	RIKEN cDNA 5730445F03 gene	siehe Gen	2,96	1,66E-04
BC018484	RIKEN cDNA B830002A16 gene	siehe Gen	2,93	1,15E-04
AV291259	RIKEN cDNA 2310032D16 gene	siehe Gen	2,87	3,43E-04
BC004781	RIKEN cDNA 4732452J19 gene	siehe Gen	2,51	6,88E-04
AK008856	RIKEN cDNA 2210408F11 gene	siehe Gen	2,31	2,68E-04
NM_025703	RIKEN cDNA 3930402F23 gene	siehe Gen	2,31	3,60E-04
BB514333	Mus musculus 10 day old male pancreas cDNA	siehe Gen	2,31	5,72E-06
AI845177	Mus musculus, clone IMAGE:1365759, mRNA	siehe Gen	2,28	6,83E-05
NM_133237	cDNA sequence AB023957	siehe Gen	2,23	1,85E-05
AK014408	RIKEN cDNA 3732413I11 gene	siehe Gen	2,21	1,51E-04
BB178770	RIKEN cDNA 6330583M11 gene	siehe Gen	2,20	1,49E-05
BQ174328	DNA segment, Chr 6, ERATO Doi 253, expressed	D6Ertd253	2,13	1,08E-04
AW536702	RIKEN cDNA 1700058O05 gene	siehe Gen	2,02	4,54E-05
BC016562	RIKEN cDNA 1810011O10 gene	siehe Gen	-2,13	1,71E-03
AV059397	RIKEN cDNA 6330406P08 gene	siehe Gen	-2,17	1,97E-03
BF531708	expressed sequence AI876593	siehe Gen	-2,23	1,49E-05
BG070689	DNasegment,Chr7,Roswell Park 2 complex	D7Rp2e	-2,30	8,04E-04
AF000969	RIKEN cDNA A230044C21 gene	siehe Gen	-2,43	5,62E-04
BC021842	RIKEN cDNA E430021N18 gene	siehe Gen	-2,64	1,35E-04
AV059397	RIKEN cDNA 6330406P08 gene	siehe Gen	-2,79	9,55E-05
BC022133	cDNA sequence BC022133	siehe Gen	-3,15	1,17E-03
AV006463	RIKEN cDNA 1100001G20 gene	siehe Gen	-3,19	3,00E-04
AV239350	hypothetical protein 4732433M03	siehe Gen	-5,37	6,67E-07
AK005066	RIKEN cDNA 1300019J08 gene	siehe Gen	-6,30	6,38E-05
AW111083	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein sp:P22978 (D.melanogaster)	-	-6,38	3,07E-06

*E: Expressionsunterschied logarithmiert zur Basis 2; einige Gene/exprimierte Sequenzen werden von 2 oder 3 *probe sets* auf dem Chip präsentiert

Tabelle 22: nach Funktionen geordnete Gene, die in Ha-ras-mutierten Tumoren gegenüber dem Normalgewebe von Cx32-WT-Mäusen differentiell exprimiert waren.

Genbank Nr.	Gen	Synonym	E*	P-Wert
Metabolische Enzyme				
Kohlenhydratstoffwechsel				
BG793658	aldolase 1, A isoform	Aldo1	2,69; 2,30	4,45E-05; 7,06E-05
AW547988	brain glycogen phosphorylase	Pygb	2,47	5,63E-04
Fortsetzung Tabelle 22 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 22				
BC027438	galactose-4-epimerase, UDP	Gale	2,14	3,35E-04
BC012247	dicarbonyl L-xylulose reductase	Dcxr	-2,92	1,32E-03
Fettstoffwechsel				
NM_009286	sulfotransferase, hydroxysteroid preferring 2	Sth2	9,04	1,63E-07
NM_009128	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	Scd2	8,48; 4,97	5,02E-06; 1,05E-06
NM_134066	aldo-keto reductase family 1, member C18	Akr1c18	8,16	2,23E-06
BC002008	fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	7,01; 3,64	3,44E-05; 2,00E-04
NM_011994	ATP-binding cassette,sub-family D (ALD),member 2	Abcd2	5,24	1,41E-06
NM_021486	beta-carotene 15, 15'-dioxygenase 1	Bcdo1	4,63	1,35E-05
NM_007809	cytochrome P450,family 17,subfamily a,polypeptide1	Cyp17a1	4,35	2,57E-06
NM_024406	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Fabp4	4,14; 3,29	1,27E-04; 1,61E-05
BC018263	cis-retinol/3alpha hydroxysterol short-chain DH-like	CRAD-L	2,82	5,22E-06
AK014742	lanosterol synthase	Lss	2,66; 2,64	1,60E-04; 9,93E-05
BG066773	UDP-Gal: β -GlcNAc β -1,4-galactosyltransferase, 6	B4galt6	2,62; 2,35	1,54E-06; 9,16E-06
NM_007702	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	Cidea	2,40	3,19E-04
BC014865	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	Ltb4dh	2,32	4,43E-04
BC010332	phosphatidic acid phosphatase type 2c	Ppap2c	2,07	3,67E-05
BB430611	fatty acid desaturase 2	Fads2	2,04	9,90E-06
NM_054094	butyryl Coenzyme A synthetase 1	Bucs1	-2,15	3,04E-04
NM_024264	cytochrome P450,family 27,subfamily a,polypeptide1	Cyp27a1	-2,60	1,33E-03
BC026757	hydroxysteroid dehydrogenase-2, delta<5>-3-beta	Hsd3b2	-2,91	2,43E-04
BC016251	choline phosphotransferase 1	Chpt1	-2,95	6,66E-05
NM_008280	lipase, hepatic	Lipc	-3,33	8,83E-05
NM_007825	cytochrome P450,family 7,subfamily b,polypeptide1	Cyp7b1	-4,39	1,29E-03
NM_007824	cytochrome P450,family 7,subfamily a,polypeptide1	Cyp7a1	-4,75	6,34E-04
BC010973	cytochrome P450,family 8,subfamily b,polypeptide1	Cyp8b1	-5,20	7,54E-04
Aminosäurestoffwechsel, Harnstoffzyklus				
BC004827	phosphoserine aminotransferase 1	Psat1	6,17; 5,50	6,01E-07; 1,57E-07
NM_133900	phosphoserine phosphatase	Psph	4,39	3,12E-04
AA561726	3-phosphoglycerate dehydrogenase	Phgdh	3,58	1,84E-04
NM_133768	argininosuccinate lyase	Asl	-2,06	9,37E-04
BC008119	ornithine aminotransferase	Oat	-2,85	4,52E-04
BC012637	kynurenine aminotransferase II	Kat2	-3,97	1,98E-03
U09114	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	Glul	-4,41	3,37E-05
NM_011172	proline dehydrogenase	Prodh	-4,73	9,33E-05
Nukleotidstoffwechsel				
AK013765	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	Ecgf1	-2,18	1,62E-03
AW490997	dihydropyrimidinase	Dpys	-2,63; -2,74	3,89E-04; 1,05E-04
Fremdstoffmetabolismus				
BB819674	ATP-binding cassette,sub-family B (MDR/TAP), 1A	Abcb1a	2,08	1,88E-03
NM_019878	sulfotransferase family 1B, member 1	Sult1b1	-2,15	6,00E-04
NM_009993	cytochrome P450,family 1,subfamily a,polypeptide2	Cyp1a2	-3,56	3,85E-05
Fortsetzung Tabelle 22 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 22				
AI256046	Mus musculus, Similar to cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase), polypeptide 19	---	-3,98	3,37E-04
AK006371	nicotinamide N-methyltransferase	Nnmt	-4,73	2,82E-05
Proteinprozessierung				
NM_009258	serine protease inhibitor, Kazal type 3	Spink3	8,45	4,90E-06
NM_011414	secretory leukocyte protease inhibitor	Slpi	6,10	1,53E-03
BC010197	carboxypeptidase E	Cpe	5,89	1,19E-04
NM_007585	annexin A2	Anxa2	3,57	1,32E-05
NM_024169	FK506 binding protein 11	Fkbp11	2,28	6,04E-05
NM_022433	sirtuin 3 (silent mating type information regulation 2, homolog) 3 (S. cerevisiae)	Sirt3	-2,13	4,38E-04
Nukleinsäureprozessierung, nukleäre Proteine				
AV303002	nucleoporin like 1	Nupl1	3,09	1,30E-05
AF316014	deoxynucleotidyltransferase, terminal	Dntt	2,94	2,46E-05
U43884	inhibitor of DNA binding 1	Idb1	2,46	8,42E-04
AF090696	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	Cugbp2	-2,64	4,16E-04
BM899344	synaptonemal complex protein 3	Sycp3	-2,77	3,79E-04
BC005569	ribonuclease, RNase A family 4	Rnase4	-3,31	2,81E-04
NM_007447	angiogenin	Ang	-5,34	1,63E-04
Andere metabolische Enzyme				
BC004831	spermine oxidase	Smox	2,45	1,24E-03
AK017155	agmatine ureohydrolase (agmatinase)	Agmat	-2,13	8,71E-05
BC026584	alcohol dehydrogenase 8	Adh8	-2,18	6,76E-04
AB041034	NADPH oxidase 4	Nox4	-2,39; -3,87	5,78E-04; 1,86E-04
AF117613	heme binding protein 1	Hebp1	-2,66	9,35E-04
M63244	aminolevulinic acid synthase 2, erythroid	Alas2	-3,14	1,45E-05
NM_011996	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	Adh4	-3,24	1,25E-03
Regulatorische Proteine				
Rezeptoren				
NM_010742	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	Ly6d	9,78	5,37E-04
AF342896	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1D	Klr1d	5,47; 4,11; 3,95	3,13E-08; 1,66E-04; 1,58E-06
NM_007974	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	F2r1	5,25	6,28E-04
NM_008526	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1B	Klr1b	4,78	5,66E-07
NM_020043	neighbor of Punc E11	Nope	4,66; 3,95	8,06E-08; 2,82E-05
NM_013749	TNF receptor superfamily, member 12a	Tnfrsf12a	4,42; 3,99	5,34E-07; 2,00E-07
AF316985	toll-like receptor 1	Tlr1	3,63	9,97E-05
BC020004	G protein coupled receptor, family C group 5, member B	Gprc5b	3,54	4,50E-07
BB234940	discoidin domain receptor family, member 1	Ddr1	2,92	2,65E-04
NM_007657	CD9 antigen	Cd9	2,52	2,42E-05
BG793483	transforming growth factor, beta receptor II	Tgfb2	2,32	1,55E-03
NM_007471	amyloid beta (A4) precursor protein	App	2,22	3,21E-04
BM224327	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	Fcgr2b	-2,25	1,67E-04
AK018789	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	Ntrk2	-2,51	1,89E-05
AF009328	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	Nr1i3	-3,18	4,64E-04
Fortsetzung Tabelle 22 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 22				
Signaltransduktion				
BC025461	transmembrane 4 superfamily member 3	Tm4sf3	10,66	3,32E-07
NM_010915	nerve growth factor, alpha	Ngfa	6,69; 6,29	4,95E-09; 3,75E-06
BC020038	endothelial cell-specific molecule 1	Esm1	5,96	3,25E-06
NM_023517	TNF (ligand) superfamily, member 13	Tnfsf13	5,56	9,50E-06
M57525	interleukin 1 receptor antagonist	Il1rn	4,31	1,10E-03
NM_008341	insulin-like growth factor binding protein 1	Igfbp1	4,15	1,56E-04
AF068182	B-cell linker	Blnk	2,63	1,45E-03
NM_026268	dual specificity phosphatase 6	Dusp6	2,16	5,38E-04
AV239587	bone morphogenetic protein 2	Bmp2	-2,08	1,97E-03
NM_025658	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, 4D	Ms4a4d	-2,55	3,46E-04
NM_008340	Igfbp, acid labile subunit	Igfals	-2,77	1,39E-03
Signaltransduktion, über kleine GTPasen vermittelt				
A1503490	ras homolog gene family, member C	Arhc	3,64; 3,14	2,49E-05; 9,41E-07
BE688720	Mus musculus, Similar to RAS, guanyl releasing protein 2, clone IMAGE:4481738, mRNA	---	3,37	4,13E-05
BE688720	Mus musculus, Similar to RAS, guanyl releasing protein 2, clone IMAGE:4481738, mRNA	---	3,01	3,56E-05
BG071632	HIV-1 Rev binding protein	Hrb	3,18; 2,72	9,34E-04; 6,47E-06
BM230485	RAB3D, member RAS oncogene family	Rab3d	2,79	2,88E-05
AF327929	RAB34, member of RAS oncogene family	Rab34	2,37	5,47E-04
BG067878	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 3	Arfgap3	2,06	5,13E-04
Calciumstoffwechsel, Calcium-Signaltransduktion				
AY061807	calmodulin-like 4	Calml4	5,90	5,84E-05
BC021916	S100 calcium binding protein A11 (calizzarin)	S100a11	3,66	7,32E-05
Transkriptionsfaktoren				
AW049660	nuclear factor I/X	Nfix	-2,15	4,88E-04
Zellteilung, Differenzierung, Apoptose				
NM_009052	reduced expression 3	Rex3	8,86	8,33E-06
AF059567	CDK inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	Cdkn2b	4,45	2,53E-07
NM_007570	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Btg2	3,09	1,37E-03
BC022135	pregnancy-induced growth inhibitor	Ok138	2,65	1,22E-03
NM_009770	B-cell translocation gene 3	Btg3	2,35	4,26E-05
BI078799	myeloid-associated differentiation marker	Myadm	2,24	1,52E-03
BC010403	presenilin 2	Psen2	-2,02	4,77E-04
Strukturelle Proteine				
Zytoskelett				
BC003475	tubulin, beta 2	Tubb2	3,30	6,27E-05
NM_019682	dynein, cytoplasmic, light chain 1	Dncl1	2,98; 2,85; 2,72	1,52E-04; 2,35E-04; 4,13E-04
AV224521	gelsolin	Gsn	-2,15	1,09E-03
Extrazelluläre Matrix, Zelladhension				
BC004638	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	Sparc	5,54; 3,62	3,04E-04; 1,68E-04
NM_010917	nidogen 1	Nid1	4,32; 2,68	4,07E-06; 5,53E-06
BF583242	activated leukocyte cell adhesion molecule	Alcam	2,77; 2,26	2,20E-04; 1,59E-04
Fortsetzung Tabelle 22 nächste Seite				

Anhang

Fortsetzung Tabelle 22				
AK006809	SPARC related modular calcium binding 2	Smoc2	2,09	2,00E-04
BE381767	camello-like 2	Cml2	-2,08; -2,51	5,23E-04; 1,15E-03
NM_023455	camello-like 4	Cml4	-2,34	5,65E-05
NM_023160	camello-like 1	Cml1	-3,38	6,98E-06
NM_007899	extracellular matrix protein	Ecm1	-3,66	4,65E-04
NM_007833	decorin	Dcn	-3,92	2,74E-04
Andere				
Transport				
NM_007423	alpha fetoprotein	Afp	10,85;9,62; 8,46; 8,46	3,07E-07;4,02E-07; 1,67E-05; 1,67E-05
BC010769	apolipoprotein A-IV	Apoa4	4,26; 2,85	1,66E-04; 4,16E-05
NM_016900	caveolin 2	Cav2	3,08	3,55E-04
BC006732	cytochrome b-561	Cyb561	2,52	9,77E-05
NM_018816	apolipoprotein M	Apom	2,27	3,88E-04
BC026948	SEC14-like 4 (S. cerevisiae)	Sec1414	-2,03	2,31E-04
BC022130	solute carrier family 26, member 1	Slc26a1	-2,03	5,05E-04
NM_021370	amiloride-sensitive cation channel 5, intestinal	Accn5	-3,08	9,38E-04
Komplementsystem, Immunsystem				
NM_010740	complement component 1,q subcomponent,receptor 1	C1qr1	3,67	3,96E-04
BC022129	complement component 8, beta subunit	C8b	-3,05	1,35E-03
Sonstige				
NM_023123	H19 fetal liver mRNA	H19	6,69	1,46E-05
NM_008935	prominin 1	Prom1	3,84	1,32E-03
NM_032002	neuregulin 4	Nrg4	3,17	2,13E-04
BC011152	golgi phosphoprotein 2	Golph2	3,06	5,16E-04
BM935811	Mus musculus integrin α 6, clone IMAGE:5036677	---	3,00	7,96E-06
NM_011979	vanin 3	Vnn3	2,96	3,37E-04
NM_133662	immediate early response 3	Ier3	2,65	4,48E-04
AB034693	endomucin	Emcn	2,37	5,18E-04
AK004598	ALEX3 protein	Alex3	2,35	1,19E-03
NM_013562	interferon-related developmental regulator 1	Ifrd1	2,35	1,58E-05
BC007478	WW domain binding protein 5	Wbp5	2,32	1,50E-04
NM_009636	AE binding protein 1	Aebp1	2,10	2,69E-04
NM_007792	cysteine and glycine-rich protein 2	Csrp2	-2,30	1,21E-03
BC020489	hypothetical protein LOC22367	siehe Gen	-2,32	1,47E-04
BC025145	hypothetical protein MGC36851	siehe Gen	-2,40	4,49E-04
NM_019999	brain protein 17	Brp17	-2,61	8,15E-04
BB464434	selenoprotein W, muscle 1	Sepw1	-2,71	6,58E-05
BC025105	hypothetical protein A530061A11	siehe Gen	-2,92	3,44E-04
NM_010702	leukocyte cell-derived chemotaxin 2	Lect2	-3,04	7,16E-04
NM_007995	ficolin A	Fcna	-3,45	3,20E-04
NM_016751	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 13	Clecsf13	-4,47	9,19E-04
Fortsetzung Tabelle 22 nächste Seite				

Fortsetzung Tabelle 22				
Unbekannte Sequenzen				
AK017241	RIKEN cDNA 5330417C22 gene	siehe Gen	6,31	7,44E-05
BC021795	RIKEN cDNA 1810023F06 gene	siehe Gen	4,88	1,73E-03
AK010477	RIKEN cDNA 2410012M21 gene	siehe Gen	4,41	2,64E-05
BC026654	cDNA sequence BC018222	BC018222	4,35	2,66E-09
NM_138685	RIKEN cDNA 9230106L14 gene	siehe Gen	4,33	2,76E-04
AK018605	RIKEN cDNA 4631408O11 gene	siehe Gen	3,99	6,45E-05
BG297038	-	-	3,79	7,84E-05
NM_025703	RIKEN cDNA 3930402F23 gene	siehe Gen	3,66	2,69E-05
AK007421	RIKEN cDNA 1300003D03 gene	siehe Gen	3,35	5,67E-07
AW111083	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein sp:P22978 (D.melanogaster)	-	3,34	1,28E-04
NM_138587	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 176,	D6Wsu176	3,15	5,93E-05
NM_026473	RIKEN cDNA 2310057H16 gene	siehe Gen	3,04	1,90E-05
NM_026167	RIKEN cDNA 1200009K10 gene	siehe Gen	2,65	2,84E-04
NM_133770	RIKEN cDNA 0610012P18 gene	siehe Gen	2,62	8,99E-06
NM_026179	RIKEN cDNA 1300003D03 gene	siehe Gen	2,60	7,14E-06
BG963358	RIKEN cDNA 5730445F03 gene	siehe Gen	2,50	4,22E-04
NM_133929	RIKEN cDNA E330009J07 gene	siehe Gen	2,48	3,65E-04
BC026655	RIKEN cDNA 2310045A20 gene	siehe Gen	2,44	3,44E-05
NM_133825	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 622, expressed	D1Ertd622	2,43	6,85E-06
NM_133825	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 622, expressed	D1Ertd622	2,38	1,98E-03
BC021951	RIKEN cDNA 2010003K11 gene	siehe Gen	2,25	1,90E-03
BI649826	RIKEN cDNA 2310008N12 gene	siehe Gen	2,22	3,22E-04
NM_133775	RIKEN cDNA 9230117N10 gene	siehe Gen	2,21	1,39E-05
NM_028785	RIKEN cDNA 1200017A24 gene	siehe Gen	-2,10	1,81E-04
BC020021	RIKEN cDNA 2810439F02 gene	siehe Gen	-2,24	1,04E-04
AA215276	Mus musculus transcribed sequences	-	-2,30	2,23E-04
AK009207	RIKEN cDNA 2310007H09 gene	siehe Gen	-2,36	3,75E-05
NM_133960	RIKEN cDNA 9130231C15 gene	siehe Gen	-2,71	1,73E-03
BC021842	RIKEN cDNA E430021N18 gene	siehe Gen	-2,77	1,03E-04
BC010592	RIKEN cDNA 0610025L15 gene	siehe Gen	-3,19	1,30E-03
NM_134147	RIKEN cDNA D930010J01 gene	siehe Gen	-3,41	1,27E-03

*E: Expressionsunterschied logarithmiert zur Basis 2; einige Gene/exprimierte Sequenzen werden von 2 oder 3 *probe sets* auf dem Chip präsentiert

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Sabine Stahl

geboren am 11. November 1974 in Böblingen

ledig

SCHULAUSBILDUNG

1985 - 1994: Gymnasium Tutzing

01.07.1994: Allgemeine Hochschulreife

AUSBILDUNG

November 1994 -

September 1995: Studium der Biologie an der Universität Regensburg

Oktober 1995 -

März 2001: Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur
differentiellen Genexpression in Connexin32-Knock-out-
und Connexin32-Wildtyp-Mäusen

Mai 2001 -

August 2004: Promotion im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 686-1
„Mechanismen der Entstehung solider Tumoren und
experimentelle Therapiekonzepte“

Thema der Doktorarbeit: Untersuchungen zur differentiellen
Genexpression in der Leber von Connexin32-Knock-out-
und Connexin32-Wildtyp-Mäusen sowie in Mausleber-
tumoren mit Mutationen im β -Catenin- bzw. Ha-ras-
Onkogen

Diplom- und Doktorarbeit wurden unter Anleitung von Prof. Dr. M. Schwarz am
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen erstellt.

9 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Albert	PD Dr. Stevanovic
Prof. Dr. Bayer	PD Dr. Stoeva
Prof. Dr. Bisswanger	Prof. Dr. Strähle
Prof. Dr. Bock	Prof. Dr. Voelter
Prof. Dr. Bohley	Prof. Dr. Wegmann
Prof. Dr. Breyer-Pfaff	Prof. Dr. Werringloer
Dr. Buchmann	Prof. Dr. Weser
Prof. Dr. Eisele	Prof. Dr. Wiesinger
Prof. Dr. Fröhlich	
Prof. Dr. Gauglitz	
Prof. Dr. Günzl	
Prof. Dr. Hagenmaier	
Prof. Dr. Hamprecht	
Prof. Dr. Hanack	
Prof. Dr. Hoffmann	
Prof. Dr. Jung	
Prof. Dr. Lindner	
Prof. Dr. Mayer	
Prof. Dr. Mecke	
PD Dr. Münzel	
Prof. Dr. Nakel	
Prof. Dr. Oberhammer	
Prof. Dr. Pfaff	
Prof. Dr. Pfeiffer	
Prof. Dr. Probst	
Prof. Dr. Rammensee	
Prof. Dr. Reinecke	
Prof. Dr. Reutter	
Prof. Dr. Schwarz	