

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der  
Universität Tübingen  
Abteilung für Toxikologie  
Abteilungsleiter: Professor Dr. M. Schwarz**

**Aktivierung von  $\beta$ -Catenin durch  
Genmutation in kultivierten  
Hepatomzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Ayse Acar,  
aus  
Istanbul/Türkei**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. N. Blin

## I. Widmung

Die Widmung dieser Arbeit geht insbesondere an meine Eltern, **Beyhan und Ismail Acar** und unseren nahestehenden Familienfreunden **Frau und Herrn Celik**. Dank ihrer Unterstützung in allen Lebenslagen war es mir möglich, mein Studium zu absolvieren und meine Promotion durchzuführen.

## II. Abkürzungsverzeichnis

2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-para-dioxin
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchonsäure-4,4`-Dicarbonyl-2,2`-Bichinolin
bp	Basenpaar
<i>Catnb</i>	Catenin-b ( $\beta$ -Catenin), Maus-Gen
CCD	Ladungsgekoppelte Vorrichtung; <i>charge coupled device</i>
cDNA	KOMPLEMENTÄRE DNA
CDP-Star-Dioxethan	spezielles 1,2-Dioxethan-Chemoluminiszenzsubstrat
Cre	Cre-Rekombinase; bindet und rekombiniert loxP-Sequenz
<i>CTNNB1</i>	Catenin-b ( $\beta$ -Catenin), Menschgen
ddDNTP	2`3`-Didesoxynukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
GSK3 $\beta$	Glykogen-Synthasekinase 3 $\beta$
HCV	Hepatitis C-Virus
HBV	Hepatitis B-Virus
HCl	Salzsäure
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgG	Immunglobulin G
LEF	lymphocyte enhancer binding factor
LOH	Loss of heterozygosity
LoxP	Locus of x-ing over; 34 bp lange Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase
Lsg	Lösung
mA	Milli-Ampère
M-MLV-RT	Enzym für Reverse-Transkriptase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKB	Proteinkinase B
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat; <i>sodium dodecyl sulfate</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF	T-cell factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Salzsäure
Wg	Wingless

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I. WIDMUNG</b>	<b>3</b>
<b>II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
<hr/>	
<b>1.1 DIE MEHRSTUFENTHEORIE DER KREBSENTSTEHUNG</b>	<b>10</b>
<b>1.2 DAS PRIMÄRE LEBERZELLKARZINOM DES MENSCHEN</b>	<b>11</b>
<b>1.3 MOLEKULÄRE URSACHEN DER HCC-ENTSTEHUNG</b>	<b>15</b>
<b>1.4 <math>\beta</math>-CATENIN</b>	<b>15</b>
<b>1.5 AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<hr/>	
<b>2.1. ZELLKULTUR</b>	<b>19</b>
2.1.1 AUFTAUEN TIEFGEFRORENER ZELLEN	19
2.1.2 PASSAGIERUNG	19
2.1.3 MEDIENWECHSEL	20
2.1.4. EINFRIEREN VON ADHÄRENTEN ZELLEN	21
<b>2.2 RNA-, DNA-, UND PROTEINISOLIERUNG</b>	<b>22</b>
2.2.1 RNA-ISOLIERUNG	24
2.2.1.1 Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter RNA	24
2.2.2 DNA-ISOLIERUNG	25
2.2.2.1 Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter DNA	25
2.2.3 PROTEINISOLIERUNG	26
<b>2.3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ISOLIERTER EINZELNER ZELLKOMPONENTEN</b>	<b>27</b>
<b>2.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)</b>	<b>28</b>
2.4.1 AMPLIFIZIERUNG VON DNA/RNA AUS TUMORZELLEN DER MAUSELEBER	29
2.4.1.1 Materialien und Geräte	29
2.4.1.2 Reagentien und Lösungen	29
2.4.2 KONTROLLE DER PCR-REAKTION MIT HILFE DES AGAROSE-GELS	30
2.4.2.1 Materialien und Geräte	30
2.4.3 AUFREINIGUNG DER PCR-PRODUKTE	31

2.4.3.1	Geräte und Materialien	31
2.4.3.2	Durchführung	32
2.4.4	ABSCHÄTZUNG DER GESAMTMENGE AN PCR-PRODUKT	32
2.4.4.1	Materialien und Geräte	32
2.4.4.2	Durchführung	33
2.4.5	SEQUENZIERUNG DER PCR-PRODUKTE	35
2.4.5.1	Material und Geräte	36
2.4.5.2	Reagentien	36
2.4.5.3	Durchführung	36
2.4.6	AUFREINIGUNG DER PROBEN ÜBER „CENTRI-SEP“-SÄULCHEN	37
2.4.6.2	Durchführung	37
2.4.7	SEQUENZANLAYSE	38
<b>2.5</b>	<b>REVERSE TRANSKRIPTASE</b>	<b>38</b>
2.5.1	EINFÜHRUNG	38
2.5.2	MATERIALIEN UND GERÄTE	39
2.5.3	REAGENTIEN UND LÖSUNGEN	39
2.5.4.1	Durchführung der RT-Reaktion	39
2.5.4.2	Pipettierschema	39
2.5.5	PCR-ANSATZ	40
<b>2.6</b>	<b>PROTEINE</b>	<b>40</b>
2.6.1	PROTEINBESTIMMUNG	41
2.6.1.1	Material	41
2.6.1.2	Lösungen	41
2.6.1.3	Proteinstandards in mg/ml	41
2.6.1.4	Durchführung	41
2.6.1.5	Auswertung	42
2.6.1.6	Anmerkung	42
2.6.2	WESTERN-BLOT	42
2.6.2.1	Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.6.2.1.1	Material und Geräte	43
2.6.2.1.2	Lösungen und Reagentien	43
2.6.2.1.3	Durchführung	45
2.6.2.1.4	Probenvorbereitung	45
2.6.2.1.5	Probenauftragung und Gellauf	45
2.6.2.2	Proteintransfer auf Polyvinylfluorid-Membran (PVDF-Membran)	46

2.6.2.2.1 Material und Geräte	47
2.6.2.2.2 Lösungen und Reagentien	47
Durchführung	47
2.6.2.3 Nachweisreaktion	49
2.6.2.3.1 Material und Geräte	49
2.6.2.3.2 Lösungen und Reagentien	49
2.6.2.3.3 Durchführung	51
2.6.3.4 Chemolumineszenznachweis	51
2.6.2.5 Die Quantifizierung der Chemolumineszenz-Signale	52

### **3. ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG** **53**

---

<b>3.1 EINFÜHRUNG</b>	<b>53</b>
<b>3.2 ERGEBNISSE ZU DEN EINZELNEN ZELLINIEN</b>	<b>55</b>
3.2.1 HEPF1-MAUSHEPATOMLINIE	55
3.2.2 74.3A-MAUSHEPATOMLINIE	57
3.2.3 53.4-MAUSHEPATOMLINIE	61
3.2.4 FTO-RATTENHEPATOMLINIE	64
3.2.5 MH1C1-RATTENHEPATOMLINIE	65
3.2.6 53.2B-MAUSHEPATOMLINIE	66
3.2.7 66.3-MAUSHEPATOMLINIE	67
3.2.8 70.4-MAUSHEPATOMZELLINIE	68
3.2.9 pW53-I-MAUSHEPATOMLINIE	69
3.2.10 55.1B-MAUSHEPATOMLINIE	71
3.2.11 55.1C-MAUSHEPATOMLINIE	74
3.2.12 56.1B MAUSHEPATOMLINIE	77
3.2.13 56.1C-MAUSHEPATOMLINIE	79
3.2.14 56.1D-MAUSHEPATOMLINIE	80
<b>3.3 WESTERN-BLOT-ANALYSEN</b>	<b>82</b>
<b>3.4 TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>83</b>
<b>3.5 ZUSAMMENFASSENDER DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>85</b>

### **4. DISKUSSION** **86**

---

<b>4.1 METHODISCHE ASPEKTE</b>	<b>86</b>
--------------------------------	-----------



<b>4.2 BEDEUTUNG VON AKTIVIERENDEN MUTATIONEN IM <i>CTNNB1/CATNB</i>-GEN</b>	<b>87</b>
<b>4.3 PHÄNOTYP <i>CTNNB1/CATNB</i>-MUTIERTER HEPATOMZELLEN</b>	<b>91</b>
<b><u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b><u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b><u>7. DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>101</u></b>
<b><u>8. LEBENSLAUF</u></b>	<b><u>102</u></b>

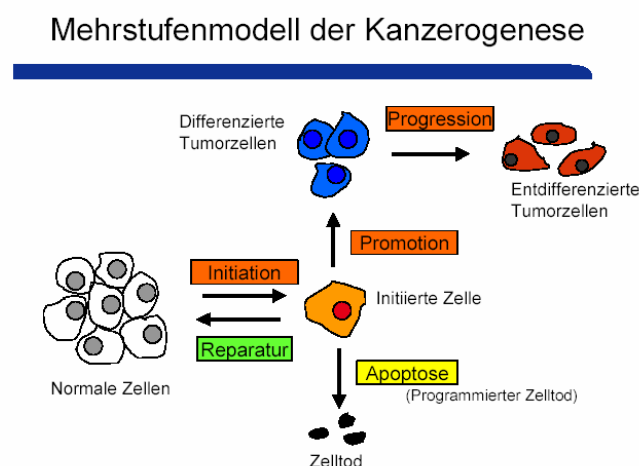
# 1. Einleitung

## 1.1 Die Mehrstufentheorie der Krebsentstehung

Im gesunden adulten Gewebe stehen Zellteilung und Zelltod im Gleichgewicht, das durch komplexe Mechanismen aufrechterhalten wird. Kommt es zur Störung des Gleichgewichts zugunsten erhöhter Zellteilungsraten, kann dies zur Entstehung von Tumoren bis hin zu deren bösartigen Formen führen. Charakteristisch für maligne Tumoren sind invasives Wachstum und Metastasen (Tochtergeschwülste). Mikroskopisch sind Zellatypien und genomische Veränderungen zu beobachten.

Krebsartig verwandelte Zellen entstehen normalerweise nie direkt aus normalen Körperzellen. Sie wandeln sich schrittweise über mehrere Stufen in maligne Zellen um in einem Prozess, der eine erhebliche Lebenszeit des Individuums einnimmt. Obwohl die einzelnen Schritte von der Transformation einer gesunden Körperzelle hin zur malignen Tumorzelle noch nicht vollständig geklärt sind, wird heute angenommen, dass mehrere geschwindigkeitsbestimmende Mutationen in zellregulatorisch wichtigen Genen sowie die Proliferation von Zwischenzellpopulationen für diesen Prozess von Bedeutung sind. Dies wird durch die Theorie der Krebsentwicklung vertreten (Fearon und Vogelstein, 1990; Moolgavkar und Knudson, 1981; Moolgavkar, 1983).

Nach dieser Theorie entstehen zunächst Tumorvorläuferzellen (s. Abb. 1.1), die sich zunehmend von den normalen Körperzellen unterscheiden und hierbei schrittweise neue Zell-Phänotypen mit erhöhter Malignität bilden.



**Abbildung 1.1:** Der Transformationsprozess wird in Initiation, Promotion und Progression eingeteilt.

Der gesamte Prozess wird hierbei häufig in die Phasen der Initiation, Promotion und Progression unterteilt.

Bei der Initiation wird die gesunde Zelle zunächst in eine „Tumorstromläuferzelle“ oder auch „initiierte“ Zelle umgewandelt. Heute kann man davon ausgehen, dass bei der Initiation eine Veränderung der Erbinformation erfolgt. Insgesamt ist die Initiation (Mutation) glücklicherweise ein seltenes Ereignis, was vermutlich u.a. dadurch bedingt ist, dass für die Manifestation von Mutationen Zellreplikation erforderlich ist. Daher ist in Geweben mit hoher Zellteilungsrate, wie z. B. der Haut und den Schleimhäuten die Entstehung initiiertter Zellen wahrscheinlicher als in Geweben mit niedriger Zellteilungsrate, wie z. B. der Leber.

Während der Promotionsphase kommt es zur klonalen Expansion initiiertter Zellen. In früheren Phasen kann dieser Prozess reversibel sein. Tumorstromotoren begünstigen die Entstehung von Tumoren. Sie wirken über spezifische Rezeptoren, können jedoch auch durch Induktion von Toxizität Gewebsregeneration verursachen, was mit einer Erhöhung des Tumorstromrisikos im Zielorgan verbunden ist.

Während der Progressionsphase kommt es zur Umwandlung der zunächst gutartigen Tumorzellen in maligne Populationen. Vermutlich sind hierfür Mutationsereignisse in den sogenannten Proto-Onkogenen und Tumorstrom-Suppressorgenen verantwortlich (Schulte-Hermann *et al.*, 1994).

In Proto-Onkogenen führt die genetische Veränderung zur Aktivierung des sog. Onkogens, dessen Genprodukt transformierende Eigenschaften besitzt. Der mit der Mutation eines Allels verbundene „Funktionsgewinn“ (gain of function) wirkt dabei dominant und reicht aus, um zur Ausprägung des veränderten Phänotyps zu führen. Hingegen können die von den Tumorstromsuppressorgenen kodierten Proteine die Transformation von Zellen verhindern. Im Vergleich zu Proto-Onkogenen geht die inhibierende Funktion (loss of function) erst mit der Inaktivierung beider Allele verloren.

## **1.2 Das primäre Leberzellkarzinom des Menschen**

Die Leber ist mit ca. 1,5 kg Gewicht die größte Drüse des menschlichen Körpers. Sie hat eine wichtige Rolle bei der Bildung und Ausscheidung der Galle. Weiterhin hat sie eine essentielle Funktion als Stoffwechsel-, Speicher- und Entgiftungsorgan. Wird die Funktion gestört, so kommt es zu verschiedenen Krankheitsbildern wie z. B. Hyperbilirubinämie, Vergiftung, Gerinnungsstörungen oder Hypalbuminämie. Mögliche Ursachen dafür können Infektionen, toxische Substanzen oder Tumoren sein.

Primäre Lebertumoren sind verschiedene gut- oder bösartige Neubildungen, die von den Leberparenchymzellen (Hepatozyten) ausgehen. Unter Leberkrebs sind maligne Tumoren zu verstehen, die aus lebereigenen Zellen entstehen und dementsprechend Leber- oder Gallengangszellen (Hepatozyten- oder Cholangiozyten) als Ursprung haben. Unter dem „primären malignen Lebertumor“ ist v. a. das sog. „Leberzellkarzinom“ gemeint, das von den Leberzellen (Hepatozyten) ausgeht. Ein anderer Ausdruck in der Fachsprache für das Leberzellkarzinom ist „primäres hepatozelluläres Karzinom (HCC)“ bzw. „malignes Hepatom“, bei Kleinkindern auch „Hepatoblastom“ genannt. Hepatoblastome sind embryonale, bösartige solide Tumoren in der Leber, die aus entartetem, primitivem Keimgewebe (Blastem) entstehen. Der von den Gallengangszellen (Cholangiozyten) ausgehende maligne Tumor wird in der Fachsprache als das „maligne Cholangiom“ bezeichnet.

Von „sekundären malignen Tumoren“ spricht man dagegen insbesondere bei Lebermetastasen und direktem Einbruch anderer maligner Tumoren in die Leber, die jedoch nicht vom Leberparenchym ausgehen.

Die Ursachen für die Entstehung des HCCs sind noch nicht eindeutig geklärt. So nimmt man an, dass für das Auftreten eine gesteigerte Regeneration als Folge von Zelltod und Entzündungsreaktion der Leberzellen verantwortlich ist. Die wesentlichen Risikofaktoren für das primäre HCC sind hepatotrope Viren, Alkoholabusus, kanzerogene Schimmelpilz-Produkte (z.B. Aflatoxine) in der Nahrung sowie in beschränktem Maße das Rauchen und die berufliche Exposition gegenüber Vinylchlorid, die im folgenden kurz beschrieben werden.

Viren: chronische Infektionen sowohl mit Hepatitis-B- (HBV) als auch mit Hepatitis-C-Viren (HCV) stehen in Zusammenhang mit einem mehrfach erhöhten Leberkrebsrisiko (Beasley *et al.*, 1981). Man kann davon ausgehen, dass weltweit 80% aller HCCs durch HBV verursacht sind (Newmann 1991). Aus diesem Grund wurden Infektionen mit HBV und HCV von der International Agency for Research on Cancer (IARC) in die Gruppe 1 der nachgewiesenen Karzinogene (IARC 1994) eingestuft.

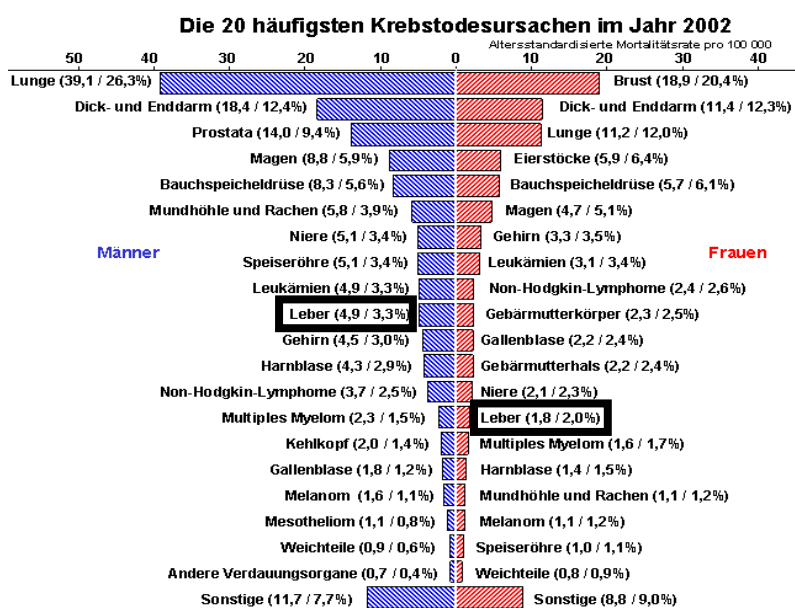
Alkohol: zahlreiche Studien belegen eine Risikoerhöhung für Leberkrebs bei vermehrtem Alkoholkonsum (z.B. Adami *et al.* 1992). Die IARC hat einen kausalen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Leberkrebs für erwiesen befunden (IARC 1998a). In den westlichen Industrienationen dürfte Alkohol den wesentlichen Risikofaktor für das Entstehen des HCC darstellen.

Schimmelpilze: ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist die Kontamination von Nahrungsmitteln mit Aflatoxinen (Toxine der Schimmelpilzspezies Aspergillus). Hierbei handelt es sich um ein Problem, welches primär tropische und subtropische Länder mit feuchtwarmem Klima betrifft. Aflatoxine werden von der IARC ebenfalls als kausal wirkendes Agens angesehen (IARC 1993a).

Berufliche Expositionen: zwischen Vinylchloridexpositionen und dem Auftreten von Leberangiosarkomen besteht ein kausaler Zusammenhang (IARC 1987). Weiterhin gibt es Hinweise auf Assoziationen mit der Exposition gegenüber inhalierten oder durch die Haut aufgenommenen Lösungsmitteln, chlorierten Kohlenwasserstoffen und Asphaltstäufen.

Rauchen: bisher ist kein ausreichendes Datenmaterial vorhanden, um von einem nachgewiesenen Zusammenhang zu sprechen. Jedoch dürfte die Risikoerhöhung nicht sehr stark sein.

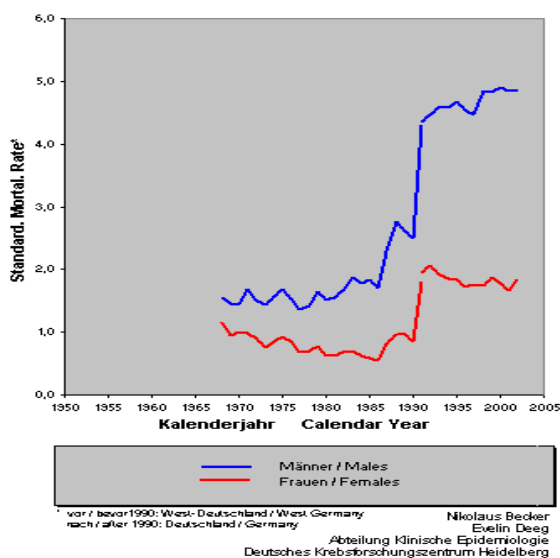
In den westlichen Industrienationen wie Deutschland gehört das HCC zu den vergleichsweise eher selteneren Tumorarten (s. Abb. 1.2). Betrachtet man jedoch die HCC-Mortalität weltweit, gehört sie zu den häufigsten Krebstodesursachen. Für Westdeutschland ist ab 1968 eine zeitliche Betrachtung zur Entwicklung von Leberzellkarzinomen möglich (s. Abb. 1.3).



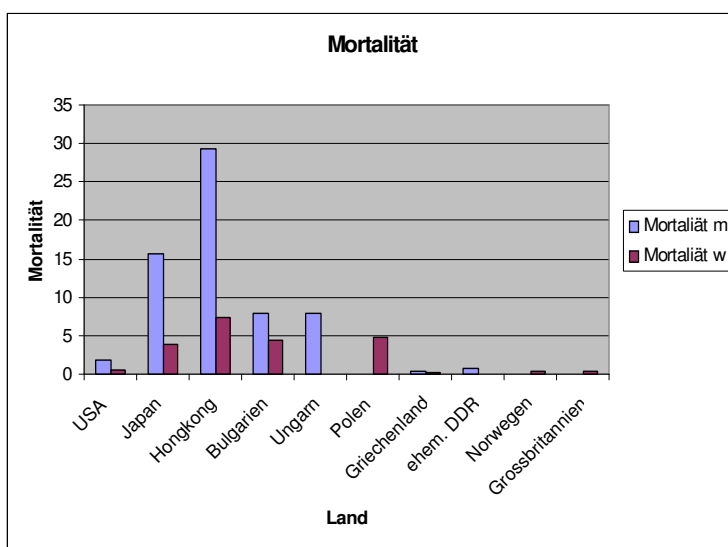
**Abbildung 1.2:** HCC-Mortalität in Deutschland. Die Daten wurden in der Abteilung für Klinische Epidemiologie im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg erarbeitet ([www.dkfz-heidelberg.de](http://www.dkfz-heidelberg.de)).

Der Anteil von Leberkrebs an den 20 häufigsten Krebstodesursachen lag in der Bundesrepublik im Jahre 2002 bei den Männern bei 4,9%, bei den Frauen bei 1,8%. In den USA beträgt die HCC-Sterblichkeit 1,8% bei Männern und 0,6% bei Frauen. Hingegen liegt sie in Japan mit 15,7% bei Männern und 3,9% bei Frauen um ein Vielfaches höher. In Hongkong erreicht sie um mehr als die zehnfach höhere Rate (29,2% bei Männern und 7,3% bei Frauen).

Im europäischen Ländervergleich haben bei Männern Bulgarien (8,0%) und Ungarn (7,9%), bei Frauen Polen (4,8%) und Bulgarien (4,5%) die höchsten HCC-Sterberaten. Die niedrigsten Sterberaten von 0,4% bei Männern bzw. 0,1% bei Frauen werden in Griechenland beobachtet, (s. Abbildung 1.4), (deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, [www.dkfz.heidelberg.de](http://www.dkfz.heidelberg.de)).



**Abbildung 1.3:** Zeitlicher Verlauf der HCC-Mortalität in Deutschland zwischen den Jahren 1968 und 2002. Nach zunächst weitgehend konstantem Verlauf der Mortalität bei den Männern und leicht rückläufigem Verlauf bei den Frauen ist ab Mitte der 80-er Jahre ein deutlicher Anstieg der Sterblichkeitsrate erkennbar. Daten entnommen aus deutschem Krebsforschungszentrum Heidelberg.



**Abbildung 1.4:** HCC-Mortalität im Ländervergleich. Die Daten wurden entnommen aus deutschem Krebsforschungszentrum Heidelberg, [www.dkfz.heidelberg.de](http://www.dkfz.heidelberg.de)

Die Heilungsprognosen bei der primären Form des Leberkrebses sind sehr ungünstig. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten bei Männern in Deutschland betragen nur 7,3 % (West) bzw. 2,6 % (Ost) und für Frauen 6,2 % (West) bzw. 2,8 % (Ost).

### **1.3 Molekuläre Ursachen der HCC-Entstehung**

Das primäre Leberzellkarzinom ist durch eine hohe chromosomale Instabilität charakterisiert (Buendia, 2002). Hierbei zeigen mit Hepatitis-B-Virus assoziierte Tumoren stärkere chromosomale Aberrationen als Tumoren, an deren Entstehung Hepatitis-C-Viren beteiligt waren. Häufig sind Veränderungen auf Chromosom 1q, 8q, 17q und der Verlust von 4q zu beobachten. In über 30% der HCCs werden Aberrationen des *CTNNB1*-Gens, das für das Proto-Onkoprotein  $\beta$ -Catenin kodiert, beobachtet (zur Übersicht s. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>). Häufig wird hierbei eine nukleäre Akkumulation des Proteins beobachtet. Auffallend ist, dass Tumoren mit aktiviertem  $\beta$ -Catenin höhere chromosomale Stabilität und eine günstigere Prognose zeigen (Huang *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2000; Laurent-Puig *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2001).

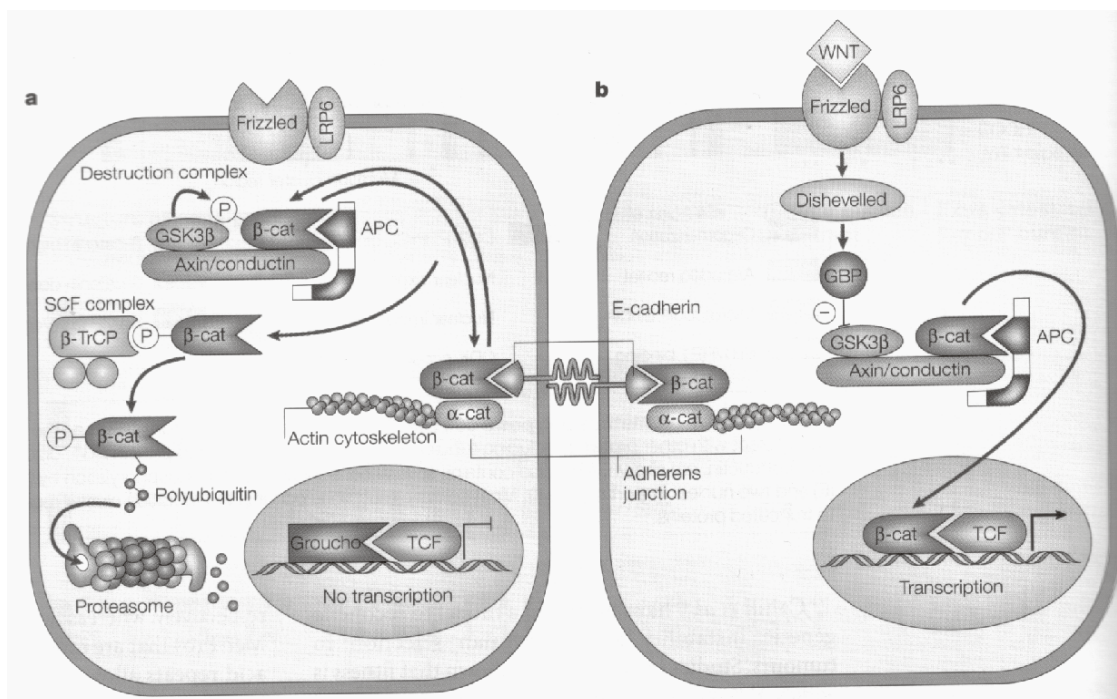
Auch in experimentell erzeugten Tumoren ist häufig eine Aktivierung von  $\beta$ -Catenin durch Mutation oder Deletion des Gens zu beobachten (s. z.B. de la Coste *et al.*, 1998; Aydinlik *et al.*, 2001).

### **1.4 $\beta$ -Catenin**

$\beta$ -Catenin ist ein Protein, das verschiedene, möglicherweise voneinander unabhängige Funktionen innerhalb der Zelle besitzt. Es hat sowohl eine wichtige Funktion bei der Zell-Zell-Adhäsion als auch eine bedeutsame Aufgabe im Wnt/Wingless- (Wnt/Wg-) Signalweg. Im Komplex mit  $\alpha$ -Catenin vermittelt  $\beta$ -Catenin an den cytoplasmatischen Anteil des E-Cadherins gebunden in homotypischen Zellen (adherens junctions) den Kontakt zum Cytoskelett (Actinbindung). Weiterhin besitzt  $\beta$ -Catenin eine Funktion im Wnt/Wg-Signalweg durch transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen. Dies geschieht in Zusammenarbeit mit einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die als *T-cell factors* (TCF's) oder auch *lymphocyte enhancer binding factors* (LEF's) bekannt sind. Im Zellkern verbinden sich  $\beta$ -Catenin und TCF zu einem transkriptionell aktiven Komplex, in dem das TCF das sequenzspezifisch bindende Protein darstellt, während  $\beta$ -Catenin die transaktivierende Domäne enthält.

Wnt/Wg-vermittelte und über  $\beta$ -Catenin verschaltete Signale sind während der Embryonalentwicklung an der Entwicklung der Segmentpolarität in *Drosophila*, der Ausbildung der Körperachse in *Xenopus* und der Mesoderm-Induktion in *Caenorhabditis elegans* beteiligt. In *Drosophila* wird der Signalweg durch Bindung von Wg an dessen membranständigen Rezeptor Frizzled aktiviert. Weitere im Signalweg flussabwärts angeordnete Proteine sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst (zur Übersicht: Siegfried und Perrimon, 1994).

Als Zielgene des  $\beta$ -Catenin/TCF-Transkriptionskomplexes wurden u.a. cyclin D1 oder c-myc identifiziert. Die von diesen beiden Genen kodierten Proteine spielen im Zellzyklus eine wichtige Rolle. Ihre erhöhte und unkontrollierte Expression kann transformierend wirken. Weiterhin wurden zwei Proteine als Regulatoren der transkriptionellen Aktivität des  $\beta$ -Catenin/TCF-Komplexes entdeckt. Eines davon ist in *Drosophila* der Transkriptions-Korepressor Groucho (humanes Homolog – TLE1), das zweite ist p300/CBP. Während die Bindung von Groucho an den  $\beta$ -Catenin/TCF-Komplex dessen transaktivierende Wirkung unterdrückt, verringert die durch CBP ausgelöste Acetylierung an Lysin 25 im TCF-Molekül dessen Affinität zum  $\beta$ -Catenin (zur Übersicht: Willert und Nusse, 1998; Morin, 1999).



**Abbildung 1.5:** Funktion von  $\beta$ -Catenin bei der Zelladhäsion (a) und im WNT/Wingless Signalweg (b) (aus Fodde *et al* 2001).



Die intrazelluläre Konzentration von  $\beta$ -Catenin wird im wesentlichen über den Ubiquitin/Proteasom-vermittelten Abbau des Proteins reguliert (zur Übersicht s.: Willert und Nusse, 1998; Morin, 1999; s. auch Abbildung 1.5). Cytosolisches  $\beta$ -Catenin wird in einem Komplex, bestehend aus der Glycogensynthase-Kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), APC und Axin (auch als Axil oder Conduction bekannt) an spezifischen Serin- bzw. Threonin-Resten phosphoryliert. Die Phosphorylierung dient für die Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -TRCP als Erkennungsmerkmal und stellt somit einen Teil der „Ubiquitinierungsmaaschinerie“ dar. Die Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin führt schließlich zum schnellen proteolytischen Abbau im Proteasom. Wird GSK3 $\beta$  z.B. über den Wnt/WG-Signalweg oder durch Proteinkinase B (PKB) gehemmt, so wird der proteosomale Abbau des  $\beta$ -Catenins verhindert, was zur Akkumulation des Proteins und seiner nukleären Translokation führt.

In Tumoren werden häufig Abbaustörungen des  $\beta$ -Catenins beobachtet, die auf Mutationen im *apc*-Gen, im *axin*-Gen oder im *CTNNB1*-/*Catnb*-Gen selbst zurückzuführen sind. APC ist das Genprodukt des Tumorsuppressorgens adenomatous polyposis coli (*apc*) und prädisponiert Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) insbesondere für Kolonkrebs. So zeigen über 80% der erblichen und sporadisch auftretenden Kolonkarzinome Mutationen des APC-Gens in Regionen, die für Interaktion des Proteins mit  $\beta$ -Catenin bedeutsam sind. Da aufgrund der Mutation die GSK3 $\beta$ -abhängige Phosphorylierung und damit der Abbau des  $\beta$ -Catenins im Proteasom beeinträchtigt wird, führen diese Mutationen zur Akkumulation von cytosolischem  $\beta$ -Catenin (zur Übersicht: Willert und Nusse, 1998; Morin, 1999). Daneben werden insbesondere in hepatozellulären Tumoren Mutationen des *CTNNB1*-/*Catnb*-Gens beobachtet. Hierbei treten Deletionen von Exon 3 (entsprechend Exon 2 bei Maus) oder Aminosäure-Austausch in der aminoterminalen Domäne des  $\beta$ -Catenins auf, die beide zur Stabilisierung des Proteins und dessen intrazellulärer Akkumulation führen. Die Ursache hierfür liegt in der Elimination der für den Abbau des  $\beta$ -Catenins wichtigen GSK3 $\beta$ - (bzw. Caseinkinase II-) Phosphorylierungsstellen (Serin 33, 37, 45 und Threonin 41) durch Mutation des Gens an den entsprechenden Positionen (zur Übersicht: Willert und Nusse, 1998; Morin 1999). Letztlich sind in HCCs inaktivierende Mutationen im *axin-1*-Gen beschrieben, die ebenfalls zur Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins und seiner Aktivierung zum Onkoprotein beitragen (Sato et al., 2000). Andererseits kann die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin unabhängig von der beschriebenen mitogenen Wirkung auch zur Apoptose führen (Kim et al., 2000). Möglicherweise ist

dies ein Mechanismus zur Eliminierung von Zellen mit Fehlregulation im APC/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.

### **1.5 Aufgabenstellung**

Frühere Untersuchungen zum Auftreten von Mutationen im Ha-ras-Gen und im p53-Tumorsuppressorgen haben gezeigt, dass sich Primärtumoren und daraus abgeleitete Zelllinien in der Prävalenz der Mutationsereignisse deutlich unterscheiden (Kress *et al.*, 1992). Grund hierfür könnte der unterschiedliche Selektionsdruck für die durch Mutation veränderten Zellen *in vivo* bzw. *in vitro* sein.

In einer vorangegangenen Arbeit in der Arbeitsgruppe (Aydinlik *et al.* (2001) wurden Lebertumoren, die in Mäusen durch eine sequentielle Behandlung mit dem Hepatokanzerogen N-Nitrosodiethylamin (DEN) und dem Tumorpromotor Phenobarbital induziert worden waren, bezüglich des Auftretens von Mutationen im *Catnb*-Gen untersucht. 80% der so induzierten Tumoren zeigten Punktmutationen im Exon 2 des *Catnb*-Gens in den Codons 32, 33, 37 und 41. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob derartige Mutationsereignisse im *Catnb*-Gen auch in Hepatomlinien *in vitro* auftreten und inwieweit sich die Häufigkeit und das Muster der Mutationen von demjenigen *in vivo* unterscheidet. Die hierzu erforderlichen Untersuchungen wurden auf der Ebene der DNA, der RNA sowie auf Proteinebene durchgeführt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Zellkultur**

#### **2.1.1 Auftauen tiefgefrorener Zellen**

##### **Vorbereitung:**

Als Medium wurde für die gesamten Zellreihen HepF1-Medium verwendet. Das Medium wird auf ca. 36°C vorgewärmt, danach werden 9 ml davon in 15 ml-Falconröhrchen vorgelegt. Die Zellkulturplatte wird mit Zelllinie, Passage und Datum beschriftet.

##### **Durchführung:**

Ein Kryoröhrchen mit ca.  $1-2 \times 10^6$  Zellen wird aus dem Stickstofftank entnommen und unter Schütteln schnell im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, bis nur noch wenig Gefrorenes übrig bleibt. Nun wird die aufgetaute Zellsuspension sofort in das vorbereitete 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach kurzem Resuspendieren der Zellen wird 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 200 g zentrifugiert. Der Mediumüberstand wird bis auf einen kleinen Rest abgesaugt. Anschliesend werden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und vollständig in eine 6 cm Kulturschale überführt. Die Schale wird vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Vor der Überführung in den Brutschrank sollte man mikroskopisch die Zelldichte und Lebensfähigkeit der Zellen überprüfen, um gegebenenfalls noch eine andere Plattengröße wählen zu können. Bei geringer Zellzahl bzw. schlechter Lebensfähigkeit der Zellen werden die Zellen entsprechend in 3,5 cm Kulturschalen bzw. bei höheren Zellzahlen in 10 cm Kulturschalen kultiviert.

#### **2.1.2 Passagierung**

##### **Vorbereitung:**

- 1 x PBS, Trypsin/EDTA-Lösung (nur kurz - Autoproteolyse!) und Medium vorwärmen
- sterile Pipetten, sterile Spritzen und Kanülen und evtl. 15 ml Falconröhrchen bereitlegen
- Neubauer-Zählkammer vorbereiten
- Zellkulturplatten beschriften: Zelllinie, Passage, Datum

### **Durchführung:**

Das Medium wird mit einer sterilen Pasteurpipette von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wird 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen pipettiert und 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch Aufklopfen der Platten gegen Ende der Inkubationszeit lösen sich die Zellen besser ab und lassen sich anschließend leichter trennen. Das Ende der Inkubationszeit wird durch mikroskopische Kontrolle an den abgerundeten Zellen bzw. makroskopisch durch das Ablösen der Zellen beim Aufklopfen bestimmt. Die Trypsinierung wird durch Zugabe von 9 ml Vollmedium (FCS enthält Trypsininhibitor) gestoppt. Die Zellen werden durch mehrmaliges Triturieren mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit einer 0,9 x 40 mm Kanüle vereinzelt und gleichzeitig resuspendiert.

Die Zellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen werden anschließend in der gewünschten Zellzahl in frische Kulturplatten ausgesät. Dazu werden 10 ml Medium vorgelegt und ein entsprechendes Aliquot der Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellen werden durch vorsichtiges „über Kreuz“-Schwenken gleichmäßig verteilt und anschließend im Brutschrank inkubiert. Für eine Routine-Passagierung wird üblicherweise ein Aliquot der Zellsuspension mit frischem Medium 1:10 bis 1:50 verdünnt.

Bei Zelllinien, bei denen Reste der Trypsin-EDTA-Lösung das Wachstum bzw. das Anheften der Zellen an die Oberfläche der Zellkulturplatte auffällig stören, sollte die Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, 5 Minuten bei RT bei 200 g zentrifugiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert werden, bevor die Zellaussaat erfolgt.

### **2.1.3 Medienwechsel**

#### **Vorbereitung:**

- 1 x PBS und Medium vorwärmen
- sterile Pipetten bereitlegen

#### **Durchführung für 10 cm-Zellkulturschalen:**

Das Medium wird von den Zellen abgesaugt, die Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend wird 10 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben.

#### **2.1.4. Einfrieren von adhärennten Zellen**

Für das Einfrieren sollten sich die Zellen möglichst in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine Konfluenz von ca 80 % aufweisen, um genügend und gut lebensfähige Zellen zu erhalten.

##### **Vorbereitung:**

- 1 x PBS und Trypsin/EDTA-Lösung (nur kurz – Autoproteolyse!) vorwärmen
- sterile Pipetten, sterile Spritzen und Kanülen bereitlegen
- Neubauer-Zählkammer vorbereiten
- Eisbad: Eis in Styroporbox füllen, die später noch in den  $-70^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank passt
- Kryoröhrchen: mit Zelltyp, Passage, Datum und Name beschriften, im Eisbad vorkühlen
- Einfriermedium: benötigtes Volumen an Medium mit 10% DMSO (v/v) herstellen und im Eisbad vorkühlen

##### **Durchführung für 10 cm Zellkulturschalen:**

Das Medium wird von den Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wird mit 9 ml Vollmedium gestoppt und die Zellen werden durch Triturieren vereinzelt. Ein Aliquot wird für die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer entnommen. Die restliche Zellsuspension wird in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur und 200 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in frischem eiskalten Medium, das 10% (v/v) DMSO enthält, resuspendiert, so dass eine Konzentration von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml resultiert. Je 1 ml der Zellsuspension wird in ein vorgekühltes Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen werden anschliessend 1 Stunde auf Eis und 24 h bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Danach werden die Kryoröhrchen zur Langzeit-Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

## **2.2 RNA-, DNA-, und Proteinisolierung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Isolierung der RNA, DNA und Protein aus den Zellen Trizol verwendet. Der Vorteil der Trizol-Methode liegt darin, dass man aus einer Zellkultur die RNA, DNA und Proteine in unterschiedliche Phasen überführen, anschließend die Phasen trennen und die jeweilige Komponente ausfällen kann.

Das Trizol Reagenz ist ein gebrauchsfertiges Reagenz (monophasische Lösung aus Phenol und Guanidine I-sothiocyanate), welches für die vollständige Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe geeignet ist. Diese Methode ist eine Weiterentwicklung von Chomczynski und Sacchi von der einfachen RNA-Isolation. Während der Proben-Homogenisierung oder Lyse wird RNA in Trizol angereichert, wohingegen die Zellen aufgespalten und Zellkomponenten aufgelöst werden.

Die Chloroformzugabe und anschließende Zentrifugation führt zur zwei Phasen-Lösung, organische und wässrige Lösung. Die wässrige Phase wird abgetrennt, in der organischen Phase wird RNA mit Isopropylalkohol ausgefällt. In der wässrigen Phase bleiben DNA und Protein zurück.

Die Ethanolzugabe bewirkt die Ausfällung von DNA in der Interphase. Die anschließende Isopropylzugabe führt zu Proteinausfällung in der organischen Phase.

**Wichtig bei der Isolierung ist, dass Hautkontakt mit Trizol vermieden wird.**

Um einen RNA- und DNAsen-Kontakt zu vermeiden, müssen folgende Schritte beachtet werden:

ausschließlich autoklavierte Pipetten und Eppendorfgefäße benutzen,  
ausschließlich mit Handschuhen während des ganzen Isolierungsvorganges arbeiten,  
ausschließlich RNA- und DNase freie Chemikalien und Lösungen verwenden.

Zur Problematik der Trizolisolierung siehe Diskussion Kapitel 4.1.

### **Geräte:**

- Pipettenspitzen 1000, 500, 100 und 50 µl
- Eppendorfgefäße 1ml und 2 ml
- Heizblock
- Vortexer
- Zentrifuge mit Temperaturregelung
- Eis zum Kühlen

- Sauger, um das Kulturmedium der Zellen abzusaugen
- Zellkulturbank
- Pasteurpipetten

**Lösungen/Chemikalien:**

- *Trizol Reagent von GIBCOBRL*
- PBS-Lösung
- Chloroform
- Isopropylalkohol
- 75% Ethanol
- 100% Ethanol
- RNase freies H<sub>2</sub>O
- 0,1 M Natriumcitrat in 10% Ethanol
- 8 mM NaOH
- 0,3 M Guadine-Lösung in 95% Ethanol
- 1% SDS

**Durchführung:**

Bevor die Zellkultur aus dem Brutschrank entnommen wird, Handschuhe anziehen! Die nachfolgenden Arbeitsschritte werden in der Zellkultur-Arbeitsbank durchgeführt.

Der Zellkultur wird der Deckel abgenommen und das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette, welche an einem Sauger angebracht ist, vorsichtig und vollständig abgesaugt. Dabei ist es hilfreich, die Platte leicht zu kippen. So ist es möglich, das Medium am Rand der Platte abzusaugen, ohne die Zellen zu demolieren. Da die Zellen ohne Kulturmedium empfindlicher gegenüber Umweltreizen sind, müssen die nachfolgenden Schritte rasch aufeinander folgen.

Um das Kulturmedium vollständig zu entfernen, werden den Zellen 2 x 1 ml PBS-Lösung zugegeben, leicht geschwenkt und anschließend vorsichtig vollständig am Rand der Platte abgesaugt. Nun gibt man 2 ml Trizol auf die Zellen und mischt das ganze mit Hilfe einer Pipettenspitze. Dabei gehen die Zellwände kaputt, aus dem Zellinhalt (DNA, RNA und Proteine) bildet sich eine geleeartige Masse. Diese Masse wird mit Hilfe einer 1000 µl Pipette in zwei 2 ml Eppendorfgefäße verteilt und bei anstehenden Wartezeiten auf Eis gestellt.

Eine schematische Darstellung zur Isolierung einzelner Komponente ist in Kapitel 2.3 aufgeführt.

### **2.2.1 RNA-Isolierung**

1. Die Eppendorfgefäße vom Eis abnehmen und gut vortexen.
2. 5 Min. bei RT inkubieren lassen. Hierbei reichert sich RNA in Trizol an.
3. In jedes Eppendorfgefäß 0,2 ml Chloroform dazugeben.
4. 15 Sec. vortexen.
5. 15 Min. bei 4°C und 12 000 g zentrifugieren. Dabei bildet sich eine wässrige und organische Phase.
6. Die wässrige Phase vorsichtig je in ein anderes Eppendorfgefäß abpipettieren, hierin ist RNA enthalten. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Grenze zwischen beiden Phasen nicht verletzt wird bzw. von der organischen Phase nichts in die wässrige Phase kommt.
7. Die **organische Phase** wird später zur **DNA und Proteinisolation** weiter verwendet.
8. In die im sechsten Arbeitsschritt abpipettierte wässrige Phase gibt man nun pro Eppendorfgefäß 1 ml Isopropylalkohol dazu und mischt diese.
9. 10 Min. bei RT inkubieren lassen. Dabei fällt die RNA aus.
10. 10 Min bei 4°C und 12 000 g zentrifugieren.
11. Den Überstand abpipettieren und verwerfen.
12. Pro Eppendorfgefäß 1 ml 75% Ethanol hinzugeben, leicht schütteln (NICHT vortexen!), ohne das Pellet aufzuwirbeln.
13. 5 Min. bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
14. Überstand vollständig abpipettieren und verwerfen.
15. Ca. 10 Min. bei RT trocknen lassen.
16. RNA in 100 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O auflösen.
17. Zur vollständigen Auflösung ca. 10 min bei 55-60°C inkubieren lassen.
18. Lagerung bei -20°C möglich.

#### **2.2.1.1 Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter RNA**

Beim gesamten Messvorgang ist zu beachten, dass die RNA temperaturempfindlich ist und deshalb auf Eis gelagert werden sollte. Die Proben wurden vor der Messung 1:50 verdünnt.

Die Ausbeute an isolierter RNA wird photometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt.



Dabei gilt bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm:

$$A_{260} = 1 \quad \text{entspricht} \quad 40 \text{ ng}/\mu\text{l RNA}$$

(Messbereich möglichst zwischen  $A_{260} = 0,1$  und  $A_{260} = 1$ ). Das Verhältnis der Absorptionen  $A_{260/280}$  ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Der Quotient sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen.

### **2.2.2 DNA-Isolierung**

1. Die organische Phase, die bei der RNA-Isolierung getrennt wurde (siehe 2.2.1 Punkt 7. ), wird zur DNA- und Proteinisolierung weiterverarbeitet.
2. Die Reste der wässrigen Phase von der organischen Phase vollständig entfernen.
3. Je Eppendorfgefäß gibt man 0,3 ml 100% Ethanol dazu.
4. Vorsichtig mischen, dabei fällt DNA aus.
5. 3 Min. bei RT inkubieren lassen.
6. 5 Min. bei 4°C und 2000 g zentrifugieren
7. Der **Überstand** wird zur **Proteinpräparation** in zwei 2 ml Eppendorfgefäße abpipettiert.
8. Nun gibt man zum DNA pro Eppendorfgefäß 1 ml Citrat-Lösung dazu.
9. Leicht schütteln und 30 Min. bei RT stehen lassen.
10. 5 Min. bei 4°C und 2000 g zentrifugieren.
11. Erneut 1 ml Citrat pro Eppendorfgefäß dazugeben.
12. Leicht schütteln und 30 Min. bei RT stehen lassen.
13. 5 Min. bei 4°C und 2000 g zentrifugieren.
14. Überstand abpipettieren.
15. Ca 10 Min. bei 55°C trocknen lassen.
16. In 400 µl 8 mM NaOH lösen.
17. Lagerung im Kühlschrank möglich.

#### **2.2.2.1 Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter DNA**

Die Proben wurden vor der Messung 1:50 verdünnt.

Die Ausbeute an isolierter DNA wird photometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt.

Dabei gilt bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm :

$$A_{260} = 1 \quad \text{entspricht} \quad 50 \text{ ng}/\mu\text{l DNA}$$

(Messbereich möglichst zwischen  $A_{260} = 0,1$  und  $A_{260} = 1$ ). Das Verhältnis der Absorptionen  $A_{260}/A_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der DNA. Der Quotient sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen.

### **2.2.3 Proteinisolierung**

1. Der Überstand, der bei der DNA-Isolierung (siehe 2.2.2, Punkt 7.) abpipettiert wurde, wird zur Proteinisolierung weiterverarbeitet.
2. Zum Überstand gibt man je Eppendorfgefäß 0,8 ml Isopropylalkohol dazu. Isopropylalkoholzugabe bewirkt die Ausfällung von Protein.
3. 10 Min. bei RT inkubieren lassen.
4. 10 Min. bei 4°C und 12 000 g zentrifugieren.
5. Den Überstand abpipettieren und je Eppendorfgefäß 2 ml Guadine-Lsg. dazu geben und vortexen. Guadine-Lösung wird als „Waschlösung“ benutzt.
6. 20 Min. bei RT inkubieren lassen.
7. 5 Min. bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
8. Überstand abpipettieren und 2 ml Guadine-Lösung dazugeben, vortexen.
9. 20 Min. bei RT inkubieren lassen.
10. 5 Min. bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
11. Überstand abpipettieren und 1 ml 100% Ethanol hinzugeben. Die absolute Ethanolzugabe bewirkt, daß die Wasserreste entzogen werden.
12. 20 Min. bei RT inkubieren lassen.
13. 5 Min. bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
14. Überstand abpipettieren und Protein trocknen lassen.
15. Das Protein in 400 µl 1% SDS auflösen.
16. Lagerung bei -20°C möglich.

#### **2.2.3.1 Analyse der Proteinausbeute**

Siehe Proteinbestimmung Kapitel 2.6.1.

## 2.3 Schematische Darstellung isolierter einzelner Zellkomponenten

### RNA

1. Die EppendorfggefäÙe vom Eis abnehmen und gut vortexen.
2. 5 Min. bei RT inkubieren lassen (hierbei reichert sich RNA in Trizol an).
3. In jedes EppendorfggefäÙ 0,2 ml Chloroform dazugeben.
4. 15 Sec. vortexen.
5. 15 Min. bei 4°C und 12000g zentrifugieren.
6. Es bildet sich eine wäÙrige und organische Phase.
7. Die wäÙrige Phase vorsichtig je in ein anderes EppendorfggefäÙ abpipettieren, hierin ist RNA erhalten. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Grenze zwischen beiden Phasen nicht verletzt wird bzw. von der organischen Phase nichts in die wäÙrige Phase kommt.
8. Die organische Phase wird später zur DNA und Proteinisolation weiterverwendet.
9. in die bei 7. Abpipettierte wäÙrige Phase pro EppendorfggefäÙ 1 ml Isopropylalkohol hinzugeben und mischen.
10. 10 Min. bei RT zur Ausfällung von RNA stehen lassen.
11. 10 Min. bei 4°C und 12000 g zentrifugieren.
12. Überstand abpipettieren.
13. Pro EppendorfggefäÙ 1 ml 75% Ethanol hinzugeben, leicht Schütteln ohne das Pellet aufzuwirbeln, NICHT vortexen!
14. 5 Min. bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
15. Überstand vollständig abpipettieren.
16. Ca 10 Min. bei RT trocknen lassen.
17. In 100 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O auflösen.
18. 10 Min. bei 55-60°C inkubieren.
19. Lagerung bei -20°C.

### DNA

1. Die Reste der wäÙrigen Phase vollständig entfernen.
2. Je EppendorfggefäÙ 0,3 ml 100% Ethanol dazugeben.
3. Vorsichtig mischen; DNA fällt aus.
4. 3 Min. bei RT inkubieren lassen.
5. 5 Min. bei 4°C und 2000 g zentrifugieren.
6. Überstand wird zur Proteinpräparation in je 2,2 ml EppendorfggefäÙ abpipettiert.
7. Zum DNA pro Eppi 1 ml Citrat-Lsg geben.
8. Leicht schütteln, u 30 Min. bei RT stehen lassen.
9. 5 Min. bei 4°C und 2000 g zentrifugieren.
10. Erneut 1 ml Citrat pro EppendorfggefäÙ hinzugeben.
11. Leicht schütteln und 30 Min. bei RT stehen lassen.
12. 5 Min. bei 4°C und 2000 g zentrifugieren.
13. Überstand abpipettieren.
14. Ca 10 Min bei 55°C trocknen.
15. in 400 µl 8 mM NaOH lösen.
16. Lagerung im Kühlschrank möglich.

### Protein

1. Zum Überstand aus DNA-Präparation 0,8 ml Isopropylalkohol dazugeben.
2. 10 Min. bei RT inkubieren lassen.
3. 10 Min. bei 4°C und 12000g zentrifugieren.
4. Überstand abpipettieren und 2 ml Guadine-Lsg dazugeben, vortexen.
5. 20 Min. bei RT inkubieren lassen.
6. 5 Min bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
7. Überstand abpipettieren und 2 ml Guadine-Lsg dazugeben, vortexen.
8. 20 Min. bei RT inkubieren lassen.
9. 5 Min. bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
10. Überstand abpipettieren und 1 ml 100% Ethanol hinzugeben.
11. 20 Min. bei RT inkubieren lassen.
12. 5 Min. bei 4°C und 7500 g zentrifugieren.
13. Überstand abpipettieren und Pellet trocknen lassen.
14. In 400 µl 1% SDS auflösen.

## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es in vitro möglich, von bestimmten Nucleotidsequenzen millionenfach Kopien enzymatisch herzustellen (Saiki *et al.*, 1988). Dieser Vorgang wird als Amplifikation bezeichnet. Die Reaktionsschritte bei der Amplifikation einer Nucleinsäure mittels PCR ähneln den Reaktionsschritten der natürlichen Replikation. Bei der PCR synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase (in 5'-3'-Richtung) ausgehend vom 3'-Ende mit Hilfe von Primern (Startermolekülen). Als Primer dienen synthetische Oligonukleotide, die mit jeweils einem der Einzelstränge hybridisieren und die den zu amplifizierenden Sequenzabschnitt einrahmen. Das wichtigste Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch es zur exponentiellen Amplifizierung der Matrize kommt.

Ein PCR-Zyklus besteht aus:

- Denaturierung der doppelsträngigen DNA
- Primer-Anlagerung (Annealing)
- Verlängerung der Primer durch Taq-Polymerase (Extension)

Theoretisch ist eine unbegrenzte Vervielfältigung möglich. Jedoch wird dies praktisch durch die Verarmung an Primern und Desoxynukleotiden sowie häufig durch unerwünschte Amplifikation von Verunreinigungen oder Nebenprodukten, wie z. B. durch fehlerhafte Primeranlagerungen oder unvollständige Kettenverlängerung limitiert. Im Allgemeinen ist daher die Anzahl der Zyklen auf 30-40 begrenzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die hitzestabile *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) verwendet. Sie ermöglicht die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne Enzymzugabe. Die PCR-Experimente wurden im Biometra Uno Thermoblock (Thermocycler) durchgeführt. Mittels PCR wurden im Rahmen dieser Arbeit spezifisch diejenigen DNA-Abschnitte des  $\beta$ -Catenin-Gens amplifiziert, die Exon 2 des Gens umfassen.

## **2.4.1 Amplifizierung von DNA/RNA aus Tumorzellen der Mauseleber**

### **2.4.1.1 Materialien und Geräte**

- 0,5 ml autoklavierte Eppendorfgefäße
- autoklavierte Pipettenspitzen
- Biometra Uno Thermoblocker
- Kugel

### **2.4.1.2 Reagentien und Lösungen**

- Bidestilliertes Wasser (DNAse- und RNAse-frei) 25,0 µl
- 10 x TAQ-Puffer 5,0 µl
- dNTPs (2 mM) 5,0 µl
- Primer -5' (10 µM) 2,5 µl
- Primer-3' (10 µM) 2,5 µl
- DNS (~0,1 mg/ml) 2,5 µl
- TAQ-Polymerase (1 U/µl) 2,0 µl

Die Mengenangaben beziehen sich auf eine Probe.

Die PCR-Reaktion erfolgte im Biometra Uno Thermoblock, dessen Deckelheizung auf 110°C eingestellt wurde. Die Proben wurden 10 Min. bei 95°C denaturiert, die Taq-Polymerase hinzupipettiert und anschließend zwischen 35 und 45 Zyklen des folgenden Temperaturprogramms durchlaufen:

Temperatur	Dauer	Zweck
95°C	60 Sec.	Denaturierung der DNA
64°C	60 Sec.	Anlagerung der Primer (Annealing)
72°C	120 Sec.	Verlängerung der Primer (Extension)

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

## 2.4.2 Kontrolle der PCR-Reaktion mit Hilfe des Agarose-Gels

### 2.4.2.1 Materialien und Geräte

- Elektrophoreseapparatur
- Gelkamm
- Mikrowellenherd
- Spannungsgeber
- 0,5 ml autoklavierte Eppendorfgefäße
- autoklavierte Pipettenspitzen
- Klebeband zum Abdichten der Kammer
- Agarose 1,2 g
- 1 x TAE-Puffer ca. 1 l
- 5 x Ladepuffer:
  - Xylen Cyanol FF 2,5 µl
  - Ficoll 400 RT 150 mg
  - oder Saccharose 400 mg
  - oder Glycerin 300 mg
  - bidestilliertes Wasser ad 1 ml
- Ethidiumbromidbad 0,5 µg/ml:
  - Ethidiumbromid 0,5 mg
  - bidestilliertes Wasser ad 1000 ml
- Längenstandards:
  - ΨX 174 Hae III
  - GeneRuler™ 100 bpDNA Ladder Plus

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese. Dafür wurde die Gelkammer mit Klebeband abgedichtet und der Kamm eingelegt.

Für ein 1,2%-iges Agarose-Gel wurden folgende Komponenten zusammen pipettiert:

- 100 ml 1x TAE-Puffer
- 1,2 g Agarose

Diese werden in der Mikrowelle bis zum Kochen erwärmt, anschließend in die Gelkammer gegossen und ca. eine halbe Stunde zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

Die Klebebänder und der Kamm werden vorsichtig entfernt, die Gelkammer in die Gelelektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer gefüllt.

Für die Probenauftragung wird je 5 µl Probe mit je 2 µl 5 x Ladepuffer gemischt und in die Taschen aufgetragen. Als Längenstandards wurden *ΨX 174 Hae III* und *GeneRuler™ 100 bpDNA Ladder Plus* eingesetzt.

Nach der Probenauftragung wird die Gelkammer geschlossen und eine Spannung von 120 Volt angelegt. Nach einer Laufzeit von 1 bis 1,5 Std. wird die Stromzufuhr unterbrochen, das Gel herausgenommen, mit deionisiertem Wasser gespült und in 0,1%iger wässriger Ethidiumbromidlösung 10 Min. gefärbt. Die Ethidiumbromidlösung wird in die Aufbewahrungsflasche zurückgegossen, das Gel mit deionisiertem Wasser gespült und unter UV-Bestrahlung mit dem CCD-Kamerasystem ausgewertet.

**CAVE: Bei allen Arbeitsschritten mit Ethidiumbromid sind Handschuhe zu tragen.**

### **2.4.3 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Vor der eigentlichen Sequenzierreaktion müssen störende Produkte von dem PCR-Produkt entfernt werden. So werden Salze, Nukleotide (dNTPs), Primer, Primerartefakte und –dimere sowie die Polymerase mit Hilfe von „*Qiagen PCR Purification Kit*“ von Qiagen abgetrennt.

Mit dem „*Qiagen PCR Purification Kit*“ ist es möglich, einzel- oder doppelsträngige DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 10 kb über Adsorptionschromatographie an Kieselgelmembranen zu reinigen.

Bei hoher Konzentration chaotroper Salze und einem pH-Wert von < 7 bindet sich die DNA an die Kieseloberfläche. Im nächsten Schritt wird mit einem alkoholhaltigen Puffer gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers kann dann die DNA unter Niedrigsalzbedingungen in einem pH-Bereich zwischen 7 und 8,5 eluiert werden. Je nach den späteren Anforderungen an die DNA kann man dazu Wasser, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 oder auch TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) verwenden.

Die Verwendung der zentrifugierbaren Kieselgelmembran-Säule („*Qiaquick Spin Column*“) ermöglicht eine schnelle Aufarbeitung der Proben.

#### **2.4.3.1 Geräte und Materialien**

- *Qiagen PCR Purification Kit*-Set
- Pipettenspitzen
- Zentrifuge mit Geschwindigkeitsregelung bis 12000 g

### **2.4.3.2 Durchführung**

Beim ersten Öffnen der PE-Puffer Ethanol zugeben;

1. Volumen der PCR-Probe bestimmen und 5 x soviel PB-Puffer dazugeben und mischen.
2. *QIA-quick spin column* in 2 ml Auffanggefäß setzen und die Probe vollständig auf die Säule auftragen.
3. Bei 10000 g = 10600 rpm 1 Min. zentrifugieren
4. Gelöste Menge verwerfen, das alte Auffanggefäß kann weiter verwendet werden.
5. 0,75 ml PE-Puffer (ethanolhaltig) hinzugeben, bei höchster Geschwindigkeit (12000 g) 1 Min. zentrifugieren. Gelöste Menge verwerfen und erneut bei höchster Geschwindigkeit 1 Min. zentrifugieren und die gelöste Menge verwerfen.
6. Säulchen herausnehmen, evtl. abtupfen und in autoklavierte 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen.
7. Zur Eluation der DNA 35 µl EB-Puffer (10 mM Tris HCl, pH 8,5) in die Mitte der Membran dazugeben, 1 Min. bei 10000 g zentrifugieren.
8. Säule herausnehmen und Deckel verschließen
9. Aufbewahrung bei -20°C möglich.

### **2.4.4 Abschätzung der Gesamtmenge an PCR-Produkt**

Für die Sequenzierreaktion werden ca. 50 ng PCR-Produkt benötigt.

Die Bestimmung der Konzentrationen der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgt mittels 1,2%-igem Agarose-Gel.

Dabei vergleicht man die Intensität der UV-Fluoreszenz der PCR-Produkt-Banden mit der Fluoreszenzintensität von Markerbanden bekannter Menge und ähnlicher Länge.

#### **2.4.4.1 Materialien und Geräte**

- Elektrophoreseapparatur
- Gelkamm
- Mikrowellenherd
- Spannungsgeber
- 0,5 ml autoklavierte Eppendorfgefäße
- autoklavierte Pipettenspitzen
- Klebeband zum Abdichten der Kammer
- Agarose 1,2 g



- 1 x TEA-Puffer ca. 1 l
- 5 x Ladepuffer:
  - Xylen Cyanol FF 2,5 µl
  - Ficoll 400 RT 150 mg
  - oder Saccharose 400 mg
  - oder Glycerin 300 mg
  - bidestilliertes Wasser ad 1 ml
- Ethidiumbromidbad 0,5 µg/ml:
  - Ethidiumbromid 0,5 mg
  - bidestilliertes Wasser ad 1000 ml
- Längenstandards:
  - ΨX 174 Hae III
  - MassRuler™ DNA Ladder, Mix

#### **2.4.4.2 Durchführung**

Der *MassRuler™ DNA Ladder Mix* wird als Markerbande eingesetzt. Davon werden 5 µl aufgetragen. Für die Mengenabschätzung wird ein 1,2%-iges Agarose-Gel vorbereitet (Durchführung siehe Kapitel „2.4.2 Kontrolle der PCR-Produkte“).

Die Proben wurden nach folgenden Verdünnungen aufgetragen:

- 5 µl + 2 µl Ladepuffer
- 2 µl + 2 µl Ladepuffer
- 1 µl + 2 µl Ladepuffer.

Daraus ergibt sich folgende Mengenverteilung der im Marker enthaltenen DNA-Fragmente:

<b>Fragmentgröße in bp</b>	<b>Menge in ng/5 µl</b>
1500	8
1031	50
900	45
800	40
700	35
600	30
500	50
400	20
300	15
200	10
100	5
80	4

Zur Durchführung der Gelelektrophorese siehe Kapitel „2.4.2 Kontrolle der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel“.

Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der PCR- und Markerbanden erfolgte anhand der Fotografie des CCD-Kamerasystem-Bildes mit bloßem Auge.

#### **2.4.5 Sequenzierung der PCR-Produkte**

Die Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidmethode (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wird nach Denaturierung der DNA der Matrizenstrang mit Sequenzprimern hybridisiert. Von diesem Matrizenstrang erfolgt dann die enzymatische Synthese zum komplementären Strang. Für die Amplifizierung des Exons 2 wurden folgende Sequenzierprimer eingesetzt:

- A1x (5'-Primer): 5'-AGCTCAGCGCAG AGCTGCT-3'
- P1a (de la Coste, 5'-Primer): 5'-TGC GTGGACAATG-3'
- P1: (5'-Primer): 5'-TTCAGGTAGCCATTTTC AGTTCAC-3'
- B1: (5'-Primer): 5'-CATTCTGGTG CCACCACCAC A-3'
- P2: (3'-Primer): 3'-CGACGAAGGTTT GTGTTTACG-5'
- C2: (3'-Primer): 3'-AGAGTCCCTTGTA CCGTCGAG-3'
- B2: (3'-Primer): 3'-CTCGCGTACT ACCGTACAGAC-5'
- A2: (3'-Primer): 3'-G GAAGGACTAC CTCGTCCTCT-5'

Neben den vier 3'-Desoxynukleotiden (dNTPs) enthält das Reaktionsgemisch auch alle vier, mit jeweils verschiedenen Fluorophoren markierten 2', 3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs). Nach Einbau eines ddNTPs durch die DNA-Polymerase bricht der Strang ab. Dies hat zur Folge, dass bei der Sequenzierreaktion unterschiedlich lange Einzelstrangfragmente entstehen, deren 5'-Ende vom Sequenzierprimer gebildet ist und deren letztes Nukleotid am 3'-Ende fluoreszenzmarkiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zyklische Sequenzierung durchgeführt. Dies hat den Vorteil, mit möglichst wenig Matrizen-DNA hinreichend reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei laufen prinzipiell die gleichen Schritte wie in der PCR-Reaktion ab.

Aufgrund der vier verschiedenen Fluorophoren-Markierungen der ddNTPs ist die Sequenzierreaktion in einem Ansatz für alle vier Nukleotide möglich.

Schließlich werden die Fragmente mit Hilfe der Kapillarelektrophorese an einem 4-Kanal-Fluoreszenzdetektor analysiert. Vor der Kapillarelektrophorese ist allerdings noch ein weiterer Reinigungsschritt (Molekularsiebchromatographie) nötig. Hierbei werden insbesondere die überschüssigen fluoreszenzmarkierten ddNTPs abgetrennt.

### 2.4.5.1 Material und Geräte

siehe „2.4.1 Amplifizierung von DNA /RNA aus Tumorzellen der Mauseleber“

### 2.4.5.2 Reagentien

- bidestilliertes Wasser
- ca. 50 ng PCR-Produkt
- Primer (1 pmol/μl)
- Terminatormix (lichtempfindlich)

### 2.4.5.3 Durchführung

Vor der eigentlichen Sequenzierung wurden die Proben für den PCR-Cycle-Sequenzieransatz nach folgendem Schema vorbereitet:

- bidestilliertes Wasser	___ μl
- ca. 50 ng PCR-Produkt	___ μl
- Primer (1 pmol/μl)	3,2 μl
- Terminatormix (lichtempfindlich)	<u>8,0 μl</u>
	Σ 20 μl

Die Wassermenge muss je nach Menge des PCR-Produkts so gewählt werden, dass das Gesamtvolumen des Ansatzes je Probe 20 μl beträgt.

Im Terminatormix (Teil des ABI Prism® Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Applied Biosystems) sind die nötigen Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs und die Polymerase enthalten.

Die zyklische Sequenzierreaktion wurde im Biometra Uno Thermoblock (Thermocycler) nach folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	Dauer
1. 96 °C	3 min
2. 96 °C	1 min
3. 50 °C	1 min
4. 60 °C	4 min

**⇒ 28 Zyklen**

Anschließend können die Proben bei 4 °C über Nacht gelagert werden.

## **2.4.6 Aufreinigung der Proben über „Centri-Sep“-Säulchen**

Nach der zyklischen Sequenzierreaktion sind noch überschüssige Nukleotide, Puffersalze usw. im Reaktionsgemisch vorhanden. Diese werden mit Hilfe der Molekularsiebchromatographie abgetrennt. Hierfür wurde eine zentrifugierbare Gelmatrix eingesetzt, durch die kleinere Moleküle (Nukleotide, Salze etc.) von DNA-Molekülen abgetrennt werden können. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit Hilfe der „Centrisep“- Säulchen der *EMP Biotech* GmbH.

### **2.4.6.1 Materialien und Geräte**

- „Centrisep“-Säulchen der *EMP Biotech*-Set
- autoklavierte Pipettenspitzen
- Zentrifuge mit Geschwindigkeitsregelung bis 2700 rpm = 750 g

### **2.4.6.2 Durchführung**

1. Säulchen mit 800 µl (ca. eine halbe Stunde oder über Nacht) bidestiliertem Wasser hydratisieren. Diese können bei 4 °C einige Tage aufbewahrt werden.
2. Säulchen auf RT erwärmen.
3. Die im Gel enthaltenen Luftblasen durch Abklopfen der Säulchen entfernen.
4. Das Gel einige Minuten zum Absetzen stehen lassen.
5. Zuerst den oberen, dann den unteren Verschluss entfernen und das Säulchen in ein 2 ml Auffanggefäß stellen.
6. Abwarten, bis das überschüssige Wasser durchgelaufen ist. Dabei ist es manchmal hilfreich, den oberen Deckel der Säulchen zu verschließen und wieder abzunehmen.
7. Durchlauf verwerfen.
8. Säulchen mit Auffanggefäß 2 Min. bei 2700 rpm = 750 g in der Eppendorf Kühlzentrifuge 5417 R zentrifugieren. Durchlauf und Auffanggefäß verwerfen.
9. Säulchen in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorftube überführen.
10. Der gesamte 20 µl Sequenzieransatz wird ohne die Säulchen zu verletzen oder zu berühren in die Säulen-Mitte pipettiert.
11. Säulchen mit Eppendorf bei 750 g 2 Min. zentrifugieren.
12. Im Durchlauf befindet sich die gereinigte Probe, Säulchen verwerfen.
13. Die gereinigte Probe entweder gleich zur Analyse verwenden oder im „Speed Vac“ eingengt.
14. Lagerung der eingengten Probe bei –20 °C möglich.

## 2.4.7 Sequenzanalyse

Für die Analyse wurde der Sequenzierautomat ABI Prism 310 eingesetzt.

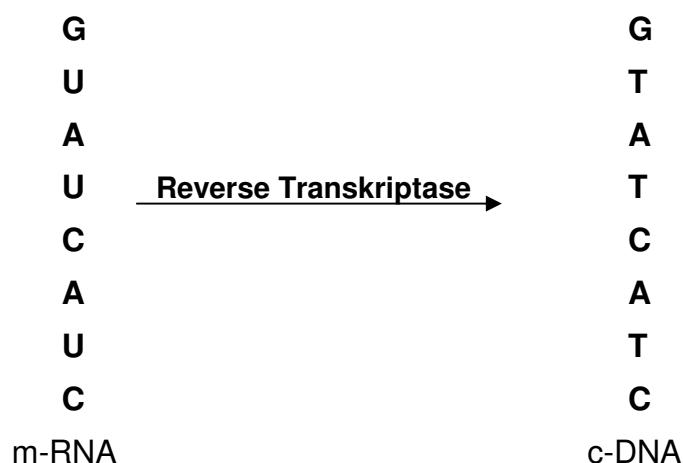
Vor der Kapillarelektrophorese müssen die eingegangenen Proben in 20 µl „Merck Wasser“ aufgelöst werden. Danach werden die Proben vollständig und luftblasenfrei in für den Sequenzierer passende 0,6 ml-Gefäße überführt. Der Sequenzierer wird vor Beginn des Programms auf das „Big Dye®-System“ eingestellt.

Als Ergebnis der Analyse erhält man sowohl eine Datei mit der vom Gerät gelesenen Sequenz, als auch das Elektropherogramm der Probe. Anhand des Elektropherogramms kann die erhaltene Sequenz manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

## 2.5 Reverse Transkriptase

### 2.5.1 Einführung

Die sog. RT-PCR ermöglicht die Expressionsanalyse von mRNA. Dazu wird die RNA mit Hilfe eines 3'-Primers zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Als wesentlicher Reaktionsschritt werden die Uracil-Basen in der mRNA durch Thymin-Basen ersetzt. Die so entstandene cDNA kann dann mittels PCR amplifiziert werden.



**Bsp:** Prinzip der Umschreibung von m-RNA in c-DNA mittels Reverse Transkriptase

### 2.5.2 Materialien und Geräte

- 0,5 ml autoklavierte Eppendorfgefäße
- autoklavierte Pipettenspitzen
- Biometra Uno Thermoblocker
- Kugel (DNA- und RNase freier Arbeitsplatz)
- PCR-Maschine: Biometra
- Eis zum Kühlen

### 2.5.3 Reagentien und Lösungen

- Oligo(dT)<sub>15</sub> (100 µM)
- RNA ((0,2 mg/ml)
- 5 x RT-Puffer
- RNAsin (40 U/µl)
- DNTPs (10 mM)
- M-MLV-RT (200 U/µl)

#### 2.5.4.1 Durchführung der RT-Reaktion

Wegen der Hitzelabilität der Chemikalien und RNA müssen bei folgenden Reaktionsschritten alle Chemikalien und RNA auf Eis gelagert werden. Um eine Verunreinigung der Proben zu vermeiden, wurden die Komponenten in der Kugel rasch zusammenpipettiert und anschließend bei Wartezeiten wieder auf Eis gelagert. Die RNA sollte nach Reinheit geprüft und deren Konzentration bestimmt werden (siehe Kapitel „2.2.1.1 Analyse von Ausbeute und Reinheit isolierter RNA“).

Als Kontrolle wurde zu jedem RT/PCR-Ansatz eine Probe ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

Um DNA-Verunreinigungen zu eliminieren, die möglicherweise bei der Isolierung zurückgeblieben sind, wurden die Proben mit DNase behandelt.

#### 2.5.4.2 Pipettierschema

Oligo(dT)<sub>15</sub> (100 µM)  
RNA 0,001 mg  
DEPC-Wasser  
  
DNase

1,0 µl
X µl
Y µl
-----
12,5 µl
1,0 µl
-----
13,5 µl

Es werden soviel µl RNA genommen, so dass eine Gesamtmenge von 0,001 mg RNA vorliegt. Dann mit Wasser auf 12,5 µl auffüllen.

Unmittelbar nach dem Zusammenpipettieren wird:

- 30 Min. bei 37 °C auf Biometra Uno Thermoblocker und anschließend
- 10 Min. bei 70 °C in der Biometra PCR-Maschine inkubiert

und danach **sofort** auf Eis abgeschreckt.

Nach den Inkubationszeiten werden folgende Komponente zum obigen Pipetierschema hinzupipettiert:

5 x RT-Puffer	4,0 µl
RNAsin (40 U/µl)	0,5 µl
dNTPs ( <b>10 mM</b> )	2,0 µl
M-MLV-RT (200 U/µl)	<u>1,0 µl</u>
	20,0 µl

Anschließend erneut in der Biometra PCR-Maschine

- 60 Min. bei 42°C inkubieren und auf Eis abschrecken.

Die so entstanden cDNA kann für die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Die Lagerung der cDNA wird bei -20°C empfohlen.

### **2.5.5 PCR-Ansatz**

Der PCR-Ansatz ist aus „Kapitel 2.4.1.2“ bis auf eine Änderung zu entnehmen. Dabei ist bei der Amplifizierung der cDNA 1µl statt 2 µl TAQ-Polymerase ausreichend.

## **2.6 Proteine**

Die Proteinisolierung erfolgte mit Trizol. Da Trizol die Proteinbestimmung nach Bradford oder Lowry möglicherweise stören kann, wurde bei der Proteinbestimmung die Methode nach BCA (Pierce) angewandt. Dabei liegt dem Proteinnachweis die Biuret-Reaktion zugrunde, bei der im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Protein zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert werden. Das wasserlösliche, stabile Natriumsalz der BCA ist ein spezifisches Nachweisreagenz für  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen, mit denen es in alkalischem Milieu einen intensiv violett gefärbten Komplex bildet, der bei einer Wellenlänge von 562 nm



photometrisch quantifiziert werden kann (Smith *et al.*, 1985). Die Proteinbestimmung wurde im Mikromaßstab auf 96-well-Platten durchgeführt und mit Hilfe eines „ELISA“-Readers ausgewertet.

## **2.6.1 Proteinbestimmung**

### **2.6.1.1 Material**

- „ELISA“-Reader: SLT-Spectra mit 550 nm Filter
- Mehrkanalpipette (5-200µl)
- 96-well-Platten für Verdünnung und Messung
- 1,5 ml Eppendorfgeläße für BSA-Standardreihe

### **2.6.1.2 Lösungen**

- Protein Test-Reagenz A (Pierce)
- Protein Test-Reagenz B: 4% CuSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O in bidest. Wasser
- 1% SDS-Lösung für Proteinstandards

### **2.6.1.3 Proteinstandards in mg/ml**

- 1
- 0.75
- 0.5
- 0.25
- 0.125
- 0.0625
- 0.03125

### **2.6.1.4 Durchführung**

1. 1 Teil Reagent B mit 50 Teilen Reagent A (z.B. 10 µl Reagent B + 500 µl Reagent B) mischen. Die Mischung ist bei Raumtemperatur maximal 1 Tag haltbar
2. 10 µl jeder Probe bzw. der Standards in ein Well geben
3. + 200 µl der Mischung aus Reagent A + B hinzugeben
4. 30 Minuten bei 37 °C inkubieren
5. 2 h bei Raumtemperatur inkubieren
6. Platten am „ELISA“-Reader bei 550 nm messen

### **2.6.1.5 Auswertung**

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der SDS-Standardreihe, die im gewählten Konzentrationsbereich eine lineare Funktion ergeben sollte. Der Verdünnungsfaktor der Proben muss bei Verwendung der oben angegebenen SDS-Konzentrationen noch berücksichtigt werden.

### **2.6.1.6 Anmerkung**

Im Vergleich zum Originalprotokoll wurde der Test leicht verändert. So wurde mangels geeignetem Filter bei 550 nm statt bei 562 nm gemessen. Um die Proteinkonzentration der Proben im linearen Konzentrationsbereich ablesen zu können, wurden die Proben unverdünnt und 1:10 verdünnt gemessen.

## **2.6.2 Western-Blot**

Beim Protein-Blotting wird die Proteinmischung gelelektrophoretisch in einzelne Komponenten getrennt, anschließend auf eine Membran überführt und danach einer Nachweisreaktion unterzogen, die für die zu untersuchende Proteinkomponente aus der Protein-Mischung spezifisch ist.

Nach der Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgt der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidfluorid-Membran, anschliessend die Nachweisreaktion und schließlich die Visualisierung.

### **2.6.2.1 Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteine werden mit „Lämmli-Puffer“ 1:1 gemischt und bei 95°C denaturiert. Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode, bei der Proteine unter denaturierenden Bedingungen getrennt werden. Dabei bewegen sich die Proteine im elektrischen Feld zweier Elektroden durch ein Polyacrylamidgel. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von ihrer Größe, ihrer Form und ihrer Ladung ab. SDS lagert sich an Proteine in stöchiometrischem Verhältnis an. Dadurch bekommen die Proteine eine einheitliche Form und eine zu ihrer Größe proportionale negative Ladung, wodurch eine Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung Anode ermöglicht wird.

Die hier durchgeführte diskontinuierliche SDS-PAGE ist eine Weiterentwicklung der SDS-PAGE: Durch ein Sammelgel mit hoher Porenweite, Chloridionen, Glycin-Ionen

und niedrigerem pH-Wert kommt es innerhalb der Proteinbande zu einer lokalen Ladungsträgerverarmung. Dies bewirkt die Entstehung eines sehr hohen elektrischen Feldes in der Proteinbande, das zu einer Verengung der Bande führt. Beim Eintreten der gebündelten Bande in das Trenngel mit einer geringeren Porenweite, einer höheren Salzkonzentration sowie einem höherem pH-Wert wird die Ladungsträgerverarmung aufgehoben, so dass die Auftrennung der Proteine gemäß ihrer molaren Masse stattfinden kann.

#### 2.6.2.1.1 Material und Geräte

- 10 %-ige Agaroselösung
- Gelauftragsspitzen
- Pateurpipetten
- Verikalgelelektrophoreseapparatur
- Glasplatten für PAGE-Gel ( 10,3 x 8,2 cm)
- Spacer
- Gelkamm
- Spannungsgeber
- Heizblock (auf 95 °C vorgeheizt)
- Tischzentrifuge
- Filzschreiber

#### 2.6.2.1.2 Lösungen und Reagentien

- 2x Lämmli-Puffer:
 

- Tris-Base	125 mM	1,51 g
- Glycerin	20% v/v	20 ml
- bidestilliertes Wasser mit HCl auf pH 6,8 titrieren		
- SDS	4% w/v	4 g
- 2-Mercaptoethanol	10% v/v	10 ml
- Bromphenolblau	0,004% w/v	4 mg
- bidest. Wasser		ad 100 ml

Lagerung als Aliquots zu 1 ml bei -20 °C möglich

- 1x Laufpuffer: durch 1:10 Verdünnung aus 10x Laufpuffer
- 10x Laufpuffer:

- Tris-Base	24,8 mM	30 g
- Glycin	192 mM	144 g
- SDS	1% w/v	10g
- bidest. Wasser		ad 1000 ml

Der pH von 8,3 muss nicht eingestellt werden. Lagerung bei RT möglich.

- Ammoniumperoxodisulfatlösung 10 %:

- Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10% w/v	1,2 g
- bidest. Wasser		ad 12 ml

- 0,5 M Tris/HCl pH 6,8:

- Tris-Base	0,5 M	60,57 g
- bidestilliertes Wasser		ad 1000 ml

mit konzentrierter Salzsäure auf pH 6,8 titrieren

- 1,5 M Tris/HCl pH 8,9:

- Tris-Base	1,5 M	181,71 g
- bidestilliertes Wasser		1000 ml

mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,9 titrieren. Lagerung bei RT.

- 4% Sammelgel-Stammlösung:

- 30% Acrylamid/0,8 Bisacrylamid	4%/0,11%	13,3 ml
- 0,5 M Tris/HCl pH 6,8	125 mM	25 ml
- 20% SDS	0,1%	500 µl
- bidest. Wasser		ad 100 ml

Die Lösung ist im Kühlschrank längere Zeit haltbar. Die Polymerisation wird mit 1% v/v 10%igem APS und 0,1% v/v TEMED induziert.

- 12,5% Trenngel-Stammlösung:

- 30% Acrylamid/0,8 Bisacrylamid		33,3 ml
- 1,5 M Tris/HCl pH 8,9	375mM	25 ml
- 20% SDS	0,1%	500 µl
- bidest Wasser		ad 100 ml

Die Lösung ist im Kühlschrank längere Zeit haltbar. Zur Polymerisation benötigtes Aliquot mit 1% v/v 12,5 igem APS und 0,1% v/v TEMED versetzen.

- 0,5% Agarose in Wasser
- Isopropanol
- Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- „BenchMark™ Prestained Protein Ladder“
- Protein-Proben

### 2.6.2.1.3 Durchführung

- Gelkammer zusammenbauen und mit Agarose abdichten.
- Füllhöhe vom Trenngel mit Filzschreiber 2 cm unter oberem Rand markieren.
- 8 ml Trenngel-Stammlösung mit 1 Volumenprozent an 10%-igem APS und mit 0,1 Volumenprozent TEMED versetzen und gut durchmischen.
- Gellösung bis zur Markierung in die vorbereitete Gelkammer luftblasenfrei füllen (dabei ist es hilfreich, die Kammer beim Befüllen um ca. 45 ° seitlich zu kippen).
- Mit etwas Isopropanol unmittelbar vorsichtig überschichten.
- 60 min auspolymerisieren lassen.
- Isopropanol abgießen.
- 4 ml Sammelgel-Stammlösung mit 1 Volumenprozent 10%-igem APS und 0,1 Volumenprozent TEMED versetzen und gut mischen.
- Sammelgel über das Trenngel luftblasenfrei gießen.
- Gelkamm luftblasenfrei einsetzen.
- 60 Min. auspolymerisieren lassen. Eventuell muss während der Polymerisation Sammelgellösung nachgefüllt und die Gelkammer nochmals von außen mit Agarose abgedichtet werden.
- Gel in mit Laufpuffer angefeuchtetem Küchenpapier und Frischhaltefolie einschlagen und über Nacht im Kühlschrank lagern. Längere Lagerung im Kühlschrank möglich.

### 2.6.2.1.4 Probenvorbereitung

- Agarosebeads mit je 100 µl 2x Lämmli-puffer versetzen.
- Die benötigte Menge Proteinproben 1:1 mit 2x Lämmli-puffer versetzen und bei 95°C 5 Min. denaturieren.
- Gut mischen und kurz abzentrifugieren.

### 2.6.2.1.5 Probenauftragung und Gellauf

- der untere Spacer am Gel muss entfernt werden, die seitlichen Spacer können belassen werden.
- Laufpuffer in die Elektrophoresekammer zugeben.
- Vorsichtig Gelkamm und Gelreste in Geltaschen entfernen.
- Gel in die Elektrophoreseapparatur einspannen, dabei darauf achten, dass im Bereich des entfernten Spacer im Laufpuffer keine Luftblasen sind. Es ist hilf-

reich zunächst die Gelkammer seitlich leicht gekippt in die Elektrophoresekammer einzuspannen, um das Entweichen der Luftblasen zu ermöglichen.

- Von jeder Probe wurde 11,2 µg pro Geltasche aufgetragen.
- Als Marker wurden 5 µl „BenchMarkTMPrestained Protein Ladder“ (Fragmentgrößen: 176,5 kDa; 113,7 kDa; 80,9 kDa; 63,8 kDa; 49,5 kDa; 37,4 kDa; 26,0 kDa; 19,6 kDa; 14,9 kDa; 8,4 kDa) und „Kaleidoscope Prestained Standard“ (Fragmentgrößen: 200 kDa; 127 kDa; 85 kDa; 40,7 kDa; 31,9 kDa; 18,7 kDa; 7,5 kDa) eingesetzt.
- In die nicht belegte Geltasche gleiches Volumen 2x Lämmli-puffer auftragen
- Elektrophorese bei 200 mA ca. 60 Min. (bis die Markerbande mit  $M_r=39$  kD etwa 1 cm vor dem unteren Gelrand angelangt ist).

### **2.6.2.2 Proteintransfer auf Polyvinylfluorid-Membran (PVDF-Membran)**

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt unmittelbar der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Der Transfer erfolgt immer senkrecht zur Trennrichtung, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entspricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein elektrophoretischer Transfer durchgeführt (Towbin 1979, Khyse-Andersen 1984). Dabei werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Membran überführt. Hierfür wurde das Wet-Verfahren (Tank-Blot) eingesetzt.

Als Blottingmembran wurde eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) eingesetzt. Die PVDF-Membran hat eine gute Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln, eine gute Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln, eine sehr gute Bindekapazität für Proteine (bis zu  $600 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2}$ ) und weist ein gutes Signal-/Hintergrund-Verhältnis mit Chemolumineszenz-Detektionssystemen auf. Vor der Verwendung muss sie noch mit Methanol benetzt (ca. 5 Min. in Methanol tränken) und ca. 10 Min. in Transferpuffer geschwenkt werden.

Bei der Wahl des Transferpuffers ist darauf zu achten, daß der Puffer kein Natriumchlorid oder andere gut leitende Salze enthält. Dies würde zu hohen Strömen führen, was einen schlechteren Transfer und eine Überhitzung von Blot und Apparatur zur Folge haben kann. Außerdem ist es wichtig, dass sich der pH-Wert des Transferpuffers und der isoelektrische Punkt des zu transferierenden Proteins unterscheiden.

Der Methanolgehalt im Transferpuffer erleichtert das Benetzen der Membran und lockert die Bindung der Proteine an SDS, was ihre Bindung an die PVDF-Membran

verbessern und damit höhere Transferraten liefern soll (Jacobson und Karsnäs 1990).

#### 2.6.2.2.1 Material und Geräte

- SDS-Polyacrylamidgel mit aufgetrennten Proteinen
- Polyvinylidifluorid(PVDF)-Membran
- "Whatman 3 MM" Papier
- Großer Teflon-Rührfisch
- Transferapparatur mit Transferkammer und Schwämmen
- Kühlschrank
- Magnetrührer

#### 2.6.2.2.2 Lösungen und Reagentien

- Methanol
- Transferpuffer
  - Tris-Base                      25 mM                      9,01 g
  - Glycin                            192 mM                     43,24 g
  - Methanol                        20% v/v                     600 mlad 3000 ml

Der pH-Wert von 8,3 muss nicht eingestellt werden. Lagerung bei Raumtemperatur möglich. Der Puffer verfärbt sich etwa zwei Tage nach Gebrauch gelb. Er sollte dann nicht wiederverwendet werden.

#### Durchführung

**Alle Schritte wurden mit Handschuhen durchgeführt, um eine Kontamination der Membran mit Fremdproteinen zu vermeiden.**

- Transferpuffer auf 8-10°C abkühlen und Transferapparatur damit füllen.
- PVDF-Membran auf benötigte Größe zuschneiden und mit einem Kugelschreiber beschriften.
- 5 Min. in Methanol einlegen und schwenken.
- 10 Min. in Transferpuffer unter Schwenken äquilibrieren.
- Vom SDS-Gel die größere Platte so entfernen, dass das Gel auf der kleineren Platte zu liegen kommt.
- Sammelgel mit Skalpell entfernen.

- Transferkammer (Biorad) nach folgendem Schema zusammenbauen:

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

- mit Transferpuffer getränktem Schwamm 1 auf schwarze Platte der Transferkammer legen
- trockenes „Whatman 3 MM“ Papier knapp überlappend luftblasenfrei auf Gel auflegen; Luftblasen mit einem großen Teflonrührfisch ausstreichen
- Papier und Gel gemeinsam so auf den Schwamm auflegen, so dass das Papier auf dem Schwamm zu Liegen kommt.
- PVDF-Membran so auf das Gel auflegen, dass die Beschriftung dem Gel zugewandt ist und die Oberkante des Gels mit der Membran abschließt.
- Luftblasen mit einem großen Teflonrührfisch ausstreichen.
- Membran mit einem in Transferpuffer angefeuchteten „Whatman 3 MM“ Papier bedecken, Luftblasen ausstreichen.
- Mit Transferpuffer angefeuchteten Schwamm 2 auflegen.
- Transferkammer schließen und in die Transferapparatur so einlegen, dass die schwarzen.
- Seiten von Transferkammer und Transferapparatur benachbart sind.
- Transfer 2,5 Stunden bei 400 mA im Kühlschrank unter Rühren mit Magnetrührer.
- Anschließend wird die PVDF-Membran an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet.



Die Transferzeit kann auch variiert werden. So ist es auch möglich, 12 Stunden bei 100 mA zu blotten.

### **2.6.2.3 Nachweisreaktion**

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Chemoluminiszenzsystems der Firma Tropix detektiert. Dabei werden spezifisch durch einen Primärantikörper markierte Proteine von einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundärantikörper (alkalische Phosphatase dephosphoryliert, CDP-Star, ein spezielles 1,2-Dioxethan-Chemoluminiszenzsubstrat) erkannt, welcher anschließend in ein aktiviertes Produkt zerfällt. Die Inaktivierung dieses Produktes erfolgt unter Emission eines Lichtquanten. Die Emission kann mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert werden.

Die Chemoluminiszenzaktivität entwickelt sich langsam und kann mindestens eine Stunde beobachtet werden. Daher ist es ratsam, vor der Auswertung die Membran ca. 15-20 Minuten in CDP-Star inkubieren zu lassen.

#### **2.6.2.3.1 Material und Geräte**

- PVDF-Membran mit geblotteten Proteinen
- Böhlinger-Einfrierboxen (Grundfläche 16,5 x 9,5) für große Membranen oder leere
- Pipettenspitzenboxen (Grundfläche 10x5 x 7 cm) für kleinere Membranen
- feste Klarsichtfolie, gefaltet
- Schütteltisch
- CCD-Kamera mit Rechneranschluss

#### **2.6.2.3.2 Lösungen und Reagentien**

- 10x TBS (200 mM Tris-HCl, 1,35 M NaCl)
  - Tris-Base 200 mM 24,2 g
  - Natriumchlorid NaCl 1,35 M 80,0 g
  - bidestilliertes Wasser ad 1000 ml  
mit konzentrierter Salzsäure pH 7,6 einstellen
- Blockpuffer (1x TBS, 0,1% Tween-20, 10% Milchpulver, 0,02% Azid)
  - 10x TBS 1x 50,0 ml
  - Tween-20 0,1% v/v 500,0 ml
  - Milchpulver 10% w/v 50,0 g
  - Natriumazid 0,03%w/v 100,0 mg

- bidestilliertes Wasser ad 500,0 ml

Milchpulver löst sich bei längerem Rühren. Gegebenenfalls die Suspension leicht erwärmen. Tween kann mit abgeschnittener Spitze sorgfältig pipettiert werden. Lösung immer frisch ansetzen!

- Waschpuffer1 (1x TBS, 0,1 Tween)
  - 10x TBS 1x 50,0 ml
  - Tween-20 0,1%v/v 500,0 µl
  - bidestilliertes Wasser ad 500,0 ml

Lagerung bei Raumtemperatur möglich, Tween mit abgeschnittener Spitze sorgfältig pipettieren.

- Waschpuffer2 (1x TS)
  - 10x TBS 1x 50,0 ml
  - bidestilliertes Wasser ad 500,0 ml

Lagerung bei Raumtemperatur möglich.

- 10x Assay-Puffer
  - Tris-Base 2M 24,2 g
  - Magnesiumchlorid  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  100mM 2,03 g
  - bidestilliertes Wasser ad 100,0 ml

Tris-Base zum Wasser geben, ph-Wert auf 9,5 einstellen,  $MgCl_2$  zugeben.

- 1x Assay-Puffer
  - 10x Assay-Puffer 10,0 ml
  - bidestilliertes Wasser ad 100,0 ml

- 1. Antikörper:  $\beta$ -Catenin, Mouse IgG1 1:500 verdünnt
  - Mouse IgG1 100,0 µl
  - Blockierungspuffer 50,0ml

- 2. Antikörper für  $\beta$ -Catenin Goat anti-Mouse Antibody
  - $\beta$ -Catenin: Tropix 2<sup>nd</sup> AB Goat-Anti-Mouse 10,0 µl
  - Blockierungspuffer 30,0 ml

- 1. Antikörper für Aktin: Goat polyclonal Antibody IgG 1:1000
  - goat polyklona IgG Aktin 35,0 µl
  - Blockierungspuffer 35,0 ml

- 2. Antikörper für Aktin: Donkey Anti-Goat IgG 1:10000
  - Donkey Anti Goat IgG 3,5 µl
  - Blockierungspuffer 35,0 ml

- CDP-Star-Chemoluminiszenzsubstrat (Tropix)

- Nitroblock

### **2.6.2.3.3 Durchführung**

Alle Antikörperinkubationen wurden bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Die Volumina wurden so gewählt, dass die Membran gut mit Lösung bedeckt wurde. Bei Verwendung von Böhlinger-Einfrierboxen als Inkubationsgefäße werden für jeden Inkubations- bzw. Waschschrift 40 ml Flüssigkeit benötigt. Bei Verwendung von leeren Pipettenspitzenboxen sind 12,5 ml ausreichend.

- Membran kurz mit Methanol (absolut) befeuchten, bis Membran durchscheinend ist
- 1,5 h in Blockpuffer schwenken
- 1,5 h mit Primärantikörper (anti-Akt-IgG) schwenken bei RT
  - 2 x 5 Min. in Blockpuffer (oder PBS) spülen
  - 2 x 5 Min. in PBS/T spülen
- 1 h mit Sekundärantikörper schwenken bei RT
  - 2 x 5 Min. in Blockpuffer (oder PBS) spülen
  - 2 x 5 Min. in PBS/T schwenken spülen
  - 2 x 5 Min. 1 x Assay Puffer schwenken spülen
- Membran kurz abtropfen lassen und in feste Klarsichtfolie einlegen
- „CDP Star ready to use“ von Tropix gleichmäßig auf die Membran pipettieren
- Klarsichtfolie so schließen, dass das Chemoluminiszenzsubstrat gleichmäßig und luftblasenfrei auf der Membran verteilt ist
- 5 bis 45 Min. inkubieren (die Chemoluminiszenz erreicht erst nach Inkubation ihre maximale Intensität)

### **2.6.3.4 Chemolumineszenznachweis**

Das Chemoluminiszenz-Signal wird in einer lichtdichten Aufnahmekammer mit einer hochempfindlichen CCD-Kamera aufgenommen und an einem angeschlossenen Rechner in Graustufen umgesetzt.

Dabei werden die Einstellungen so gewählt, dass eine lineare Beziehung zwischen Chemoluminiszenzsignal und Graustufe erhalten wird.

Diese Methode erlaubt mit Hilfe des installierten Software-Programmpakets TINA v2.09a die direkte rechnergestützte Quantifizierung der Signale.

- Filter am Kameraobjektiv entfernen
- Membran mit Beschriftung nach oben auf den Aufnahmetisch auflegen
- Software einstellen:

AGC	an
INVERT	aus
SUBTRACT BACKGROUND	aus
GAMMA	2,20
EXPOSURE TIME	1-8 Frames
SCAN-MODE	continuous
GAIN-BOOST	aus
X-BINNING	aus
Y-BINNING	aus

- Die Membran sollte den Bildausschnitt möglichst vollständig einnehmen, dementsprechend Tisch höhe und Schärfe des Objektivs einstellen
- Um die Lage der Banden von Markerproteinen und Proben vergleichen zu können, Bild bei offener Belichtungskammer und Auflicht aufnehmen und speichern.
- Aufnahmekammer schließen
- Voraufnahme zur Abschätzung der endgültigen Aufnahmezeit mit folgender Software-Einstellung

AGC	an
INVERT	an
SUBTRACT BACKGROUND	an
GAMMA	1,0
EXPOSURE TIME	500-3000 Frames
SCAN-MODE	time over
GAIN-BOOST	an
X-BINNING	an
Y-BINNING	an

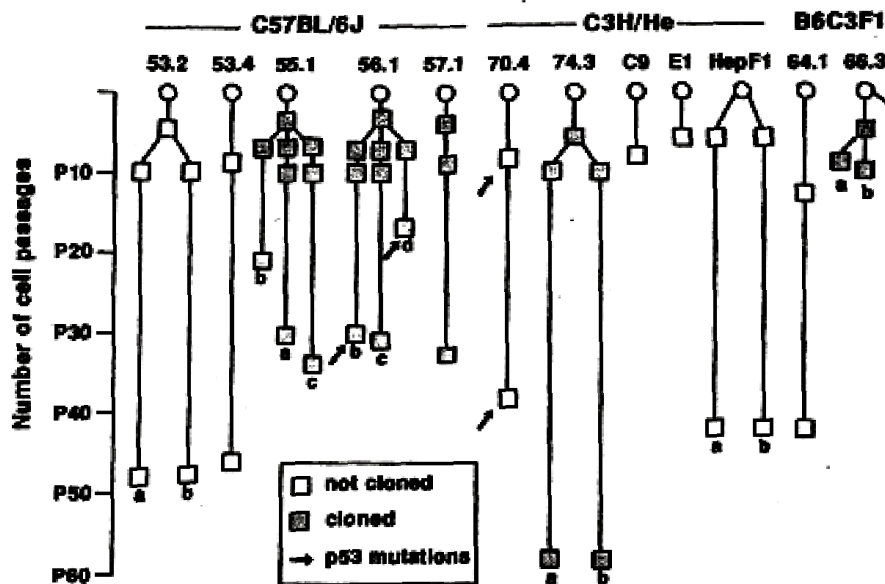
#### **2.6.2.5 Die Quantifizierung der Chemolumineszenz-Signale**

Die Quantifizierung der Chemolumineszenz-Signale wurde mit der Software TINA V2.09a durchgeführt. Dieses Programm ermöglicht es, die in einem definierten Bildbereich aufgenommenen Grauwerte zu integrieren.

### 3. Ergebnisse und Auswertung

#### 3.1 Einführung

Um die Frage der *Catnb*-Mutationprävalenz in Primärtumoren und in abgeleiteten Zelllinien zu klären, wurden insgesamt 14 Zelllinien untersucht. 12 der Zelllinien stammten aus Maus-Lebertumoren, 2 aus Ratten-Hepatomen. Alle Maus-Hepatomlinien wurden von Stefan Kress in der Arbeitsgruppe entwickelt und teilweise kloniert (Kress *et al.*, 1992). Aus dieser Publikation stammt auch die Information über die untersuchten Zelllinien, wie sie in Abbildung 3.1 dargestellt ist. So waren Zellen der Linien 56.1b, 56.1d und 70.4 im p53-Tumorsuppressorgen mutiert. Die Zelllinien FTO, MH1C1 und pW53-I stammen aus anderer Quelle.



**Abb 3.1:** Stammbaum der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Maus-Hepatomlinien (entnommen aus Kress *et al.* 1992).

Theoretisch war zu erwarten, dass die verschiedenen Linien auf Ebene der DNA entweder den *Catnb*-Wildtyp aufweisen, also das physiologische Protein exprimieren, oder Mutationen im *Catnb*-Gen zeigen. Hierbei könnte es sich um Punktmutationen in den bekannten „hot-spot“-Bereichen des Gens handeln, die auf Ebene der RNA bzw. des Proteins zu keiner Änderung in der Länge der Moleküle führen würden. Darüber hinaus waren in anderen Systemen partielle Deletionen des Gens oder die Einführung von Stopp-Codons in die DNA beschrieben, die Auswirkungen auf die Länge der RNA besitzen und zur der N-terminalen Verkürzung des Proteins führen. Die müssten

anhand der geänderten Laufeigenschaften des Proteins in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erkennbar sein. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit *Catnb*-Analysen auf DNA, RNA- und Proteinebene durchgeführt.

```

1  GAATTCCGAG CGTCAGTGCA GGAGCCGAT TCCGAGCGGG CGGCCGCGAG GTAGGTGAAG
61  CTCAGCGCAG AGCTGCTGTG ACACCGCTGC GTGGACAATG GCTACTCAAG GTTTGTGATT
121 CAGATGCCTG TCTGAGGATC TGCCTCATAG CCCTGCTGCC TGGCCAGACT GCCTTTGTTC
181 TCTTCCCTTC TGCACACTAC CACTGGCTTG GTGAAATAAT CAGCAAGCCA CCGATGGGAT
241 CTAATGAGTG CTCTCAGGCC ACCCCTGTCC CATGGAGCTC AACTGACCC TCACCTGCTC
301 TCCTTGCTG CTTTCTAAC AGTATTTCAA TGGGTCATTG TCGTAGATGG CTTCTTCAGG
361 TAGCATTTTC AGTTCACTAA CATACTCTGT TTTTACAGCT GACCTGATGG AGTTGGACAT
421 GGCCATGGAG CCGGACAGAA AAGCTGCTGT CAGCCACTGG CAGCAGCAGT CTTACTTGA
481 TTCTGGAATC CATCTGGTG CCACCACCAC AGCTCCTTCC CTGAGTGGCA AGGGCAACCC
541 TGAGGAAGAA GATGTTGACA CCTCCCAAGT CCTTTATGAA TGGGAGCAAG GCTTTTCCCA
601 GTCCTTCACG CAAGAGCAAG TAGCTGGTAA AGCATTGTG TTTGGAAGCT AGCATTAAGT
661 TTCTTGACAG GGCTGTGTGA CAGCTCAGCC ACAGCACAAG TGGGTTGAAG GAAGGGCGGA
721 GGGTAGCGGA GTCCACATG CCTAGTGAGT GTTGATTTA CCTTTTTCAG ATATTGACGG
781 GCAGTATGCA ATGACTAGGG CTCAGAGGGT CCAGCTGCC ATGTTCCCTG AGACGCTAGA
841 TGAGGGCATG CAGATCCCAT CCACGCAGTT TGACGCTGCT CATCCACTA ATGTCCAGCG
901 CTTGGCTGAA CCATCACAGA TGTGAAACA TGCAGTTGTC AATTTGATTA ACTATCAGGA
961 TGACGCGGAA CTTGCCACAC GTGCAATTCC TGAGCTGACA AAAGTCTAA ACGATGAGGA
1021 CCAGGTAAGC AGTGATGTAA CTTGCTTTTC AGTTTACTTT GAGGGAAGTT CTCAAGGGGA
1081 TGCCAATGGC TGCCTCACAC TAAGTTTGG AAATAATGG TGCCTCTTCA TCCTTTATTC
1141 TAGGTGGTAG TTAATAAAGC TGCTGTTATG GTCCATCAGC TTTCCAAAAA GGAAGCTTC
1201 AGACATGCCA TCATGCGCTC CCCTCAGATG GTGTCTGCCA TTGTACGCAC CATGCAGAAT
1261 ACAAATGATG TAGAGACAGC TCGTTGTACT GCTGGGACTC TGCAACAACCT TTCTCACCAC !!
1321 CGCGAGGGCT TGCTGGCCAT CTTTAAGTCT GGTGGCATCC CAGCGCTGGT GAAAATGCTT
1381 GGTAAGAGA ATGGCCAGGG AACTGAAGG GTAGGAAGTA GAAGGGTGCT GGCATGGCTA
1441 ACAAAGGCTC TCCTCTTCCC AGGTCACCAG TGGATTCTGT ACTGTTCTACGCCATCACGA
1501 CACTGCATAA TCTCCTGCTC CATCAGGAAG G

```

**Abb 3.2:** Teilbereich des *Catnb*-Gens der Maus. xxx = Codons mit hot-spot Mutationen (32-34, 36, 37, 41). **Introns:** 288, 144, 119, 80 bp (Summe: 631 bp); **Exons:** Summe: 900 bp; Abweichungen zur publizierten Sequenz, die allerdings nicht zum Aminosäuretausch führen, sind mit !! gekennzeichnet.

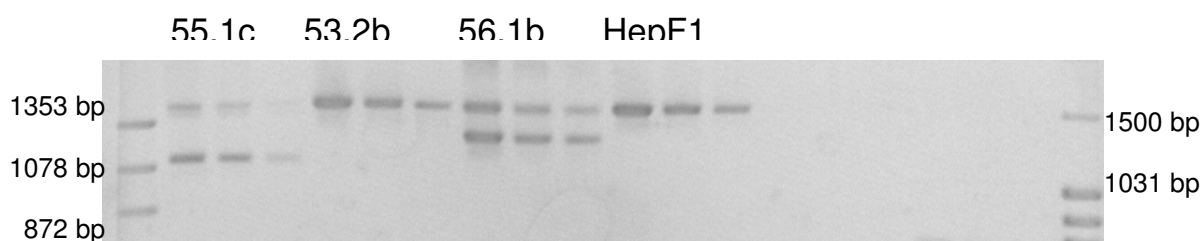
Die entsprechenden DNA-Bereiche wurden durch PCR amplifiziert und anschließend direkt sequenziert. In Abbildung 3.2 ist ein Teilbereich der genomischen Sequenz des *Catnb*-Gens der Maus dargestellt. Aus der Abbildung kann die Position und Sequenz der eingesetzten Primer für die PCR-Reaktion entnommen werden. Für die Analyse der RNA wurde der Sequenzierung eine reverse Transkriptionsreaktion vorgeschaltet. Die Analyse des Proteins erfolgte im *Western-blot*.

## **3.2 Ergebnisse zu den einzelnen Zelllinien**

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse für die einzelnen Zelllinien dargestellt. In Kapitel 3.4 sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt und in Kapitel 3.5 werden die Ergebnisse anschließend zusammengefasst.

### **3.2.1 HepF1-Maushepatomlinie**

#### **DNA:**



**Abb 3.3:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus HepF1, 56.1b, 53.2b und 55.1c-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. HepF1-Zellen zeigten die dem Wildtyp-Gen entsprechende Länge. Kürzere Fragmente in 56.1b- und 55.1c-Zellen weisen auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

Die Fragmentgröße der amplifizierten DNA aus Zellen der Linie HepF1 (s. Abb. 3.3) lag entsprechend auf dem der Wildtyp-Fragmentgröße, wie auch bei der Linie 53.2b. Bei den Zelllinien 56.1b und 55.1c war zusätzlich zur Wildtyp-Bande ein kürzeres PCR-Fragment zu erkennen, was auf eine heterozygote Deletion des *Catnb*-Gens in diesen Linien hinweist.

### RNA:

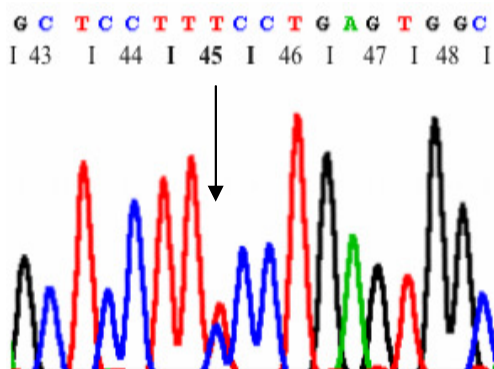


**Abb 3.4:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus HepF1, 53.2b und 56.1d-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Produkt eine Länge entsprechend 842 bp (s. HepF1-Zellen). Kürzere Fragmente in 56.1d-Zellen weisen auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

Die RNA der Zelllinie HepF1 entsprach dem der erwarteten Wildtyp-Fragmentgröße, wie auch bei der Linie 53.2b. Im Vergleich dazu war bei der Zelllinie 56.1d zusätzlich ein verkürztes Fragment zu erkennen, was auf eine heterozygote Deletion im *Catnb*-Gen hinweist. Interessanterweise zeigte die Bande des verkürzten Fragments eine stärkere Färbung als die entsprechende Wildtyp-Bande, was auf eine stärkere Expression des partiell deletierten Allels hinweisen könnte.

### Sequenz von DNA und RNA:

Die Sequenzen der DNA wurden mit den Primern P1 und P2, die der RNA mit P1A und C2 durchgeführt. Bei näherer Betrachtung dieser Sequenzen der Zelllinie HepF1 war auf DNA- und RNA-Ebene eine heterozygot angelegte Punktmutation im Exon 2 in Codon 45 (TCC → TTC) nachzuweisen.



**Abbildung 3.5:** Punktmutation in Codon 45 des *Catnb*-Gens der Linie HepF1. Der Pfeil deutet auf das durch Mutation veränderte Codon.



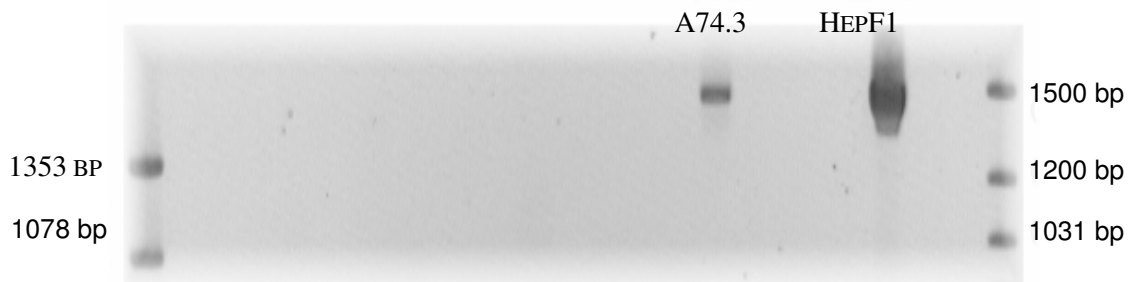
### Protein:

Die Proteindaten aus der Western-Blot-Analyse zur Linie HepF1 sind im Kapitel 3.3 dargestellt. Hierbei zeigte die Linie in Übereinstimmung mit den DNA- und RNA-Daten nur die dem Wildtyp- $\beta$ -Catenin entsprechende Bande.

### 3.2.2 74.3a-Maushepatomlinie

#### DNA:

Die Fragmentgrösse der amplifizierten DNA aus der Zelle der Linie 74.3a (s. Abb. 3.6) entsprach dem der Wildtyp-Fragmentgrösse. Eine homo- oder heterozygote Deletion war auf diesem und anderen gelelektrophoretischen Trennungen von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens nicht zu erkennen.



**Abb 3.6:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus HepF1, 74.3a-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: P1A+ A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1443 bp.

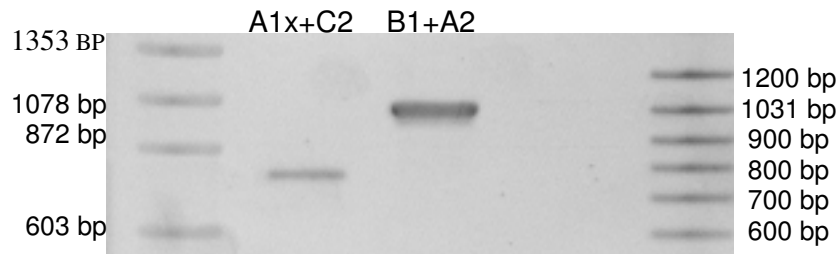
#### Sequenzen von DNA:

Die Sequenzen der mit den P1- und P2-Primern erzeugten und sequenzierten PCR-Produkte zeigten heterozygote Veränderungen auf genomischer Ebene. Bei genauer Betrachtung der P1-Sequenz kann man von Beginn der Sequenz Exon 1 abwärts im Hintergrund lesen.

Die gleichen Proben, die mit dem P1-Primer sequenziert wurden, wurden auch mit dem P2-Primer sequenziert. Die P2-Sequenzen ergaben jedoch keinen näheren Aufschluss darüber, wo eine mögliche Deletion liegen könnte. Ganz im Gegenteil war in diesen Sequenzen eine heterozygote Veränderung zu erkennen, die mit den P1-Sequenzen nicht in Einklang zu bringen war. Beim Lesen einer Hintergrunds-P2-Sequenz, die zuvor invertiert wurde, war kein passender Bereich im *Catnb*-Gen zu finden. Bei erneuter Inversion allerdings (sozusagen eine Re-Inversion) passte die Hintergrundssequenz ab Exon 2 aufwärts zur genomischen *Catnb*-Sequenz.

Zusammengefasst sprechen die Daten für eine Deletion in der „P1-Sequenz“ vor Exon 1 und für eine Inversion in der „P2-Sequenz“.

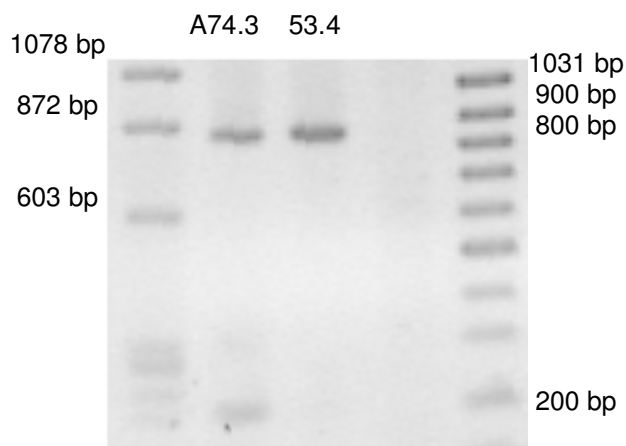
In Abbildung 3.7 ist ein weiteres Bild einer gelelektrophoretischen Trennung von DNA-Amplifikaten aus der Linie 74.3a gezeigt.



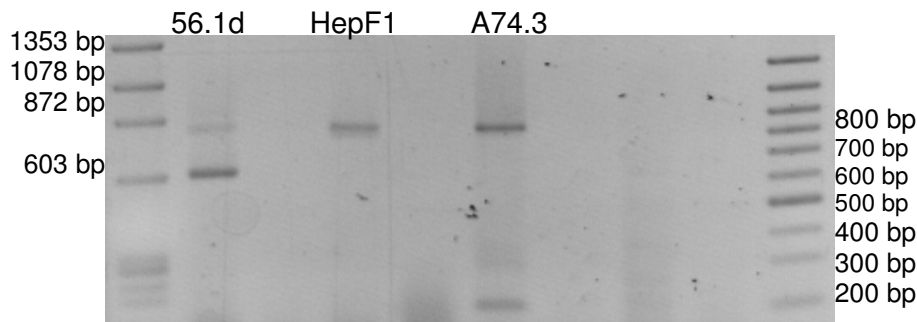
**Abb 3.7:** Zelllinie 74.3a mit verschiedenen Primerkombinationen: B1+A2 und A1x+C2. Bei der eingesetzten Primerkombinationen B1+A2 und A1x+C2 ergeben sich für das Wildtyp-Gen Längen entsprechend 1041 bzw 775 bp.

Auch bei erneuter Analyse von DNA der Linie 74.3a mit der B1+A2-Primerkombination (1041 bp) oder mit der A1x+C2-Primerkombination (775 bp) waren ausschließlich die Wildtypfragmentgrößen auf dem Gel nachzuweisen.

**RNA:**



**Abbildung 3.8**



**Abbildung 3.9**

**Abb. 3.8 und 3.9:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus 53.4, 74.3a, HepF1 und 56.1d-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 842 bp. Kürzere Fragmente in 74.3a und 56.1d- Zellen weisen auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

Wie oben gezeigt sprachen die Daten aus der Analyse der DNA der Linie 74.3a für eine heterozygot angelegte Mutation, die sich auch auf der Ebene der RNA weiter verfolgen ließ. Nach reverser Transkription und anschließender Amplifikation der erzeugten cDNA mit der Primerkombination A1x und A2 zeigte sich das Bild einer heterozygoten Deletion, erkennbar am Auftreten zweier Banden unterschiedlicher Länge. Die größere Bande mit ca. 870 bp entspricht der des erwarteten Wildtyp-Fragments, die kürzere Bande mit ca. 200 bp entspricht einem durch eine große Deletion stark verkürzten Fragment. Im Vergleich zeigen die DNAs der Zelllinien HepF1 und 53.4 die Wildtyp-Banden und die der Linie 56.1d eine heterozygote Deletion.

### **Sequenz der RNA:**

Um nähere Informationen über den Deletionsbereich zu bekommen, wurde die RNA revers transkribiert, über PCR amplifiziert und anschliessend sequenziert. Hierbei kamen die Primer A1x und P1A zum Einsatz. Nach Auswertung der Sequenzen war eine heterozygote Deletion beginnend beim Codon 34 im Exon 2 und vermutlich bis hin ins Exon 5 hineinreichend nachzuweisen.

In Abbildung 3.10 ist der Deletionsbereich eingezeichnet.

C1 A1  
 1 GAATTCCGAG CGTCAGTGCA GGAGGCCGAT TCCGAGCGGG CGGCCGCGAG GTAGGTGAAG  
 61 CTCAGCGCAG AGCTGCTGTG ACACCGCTGC GTGGACAATG GCTACTCAAG GTTTGTGATT A1x  
 121 CAGATGCCTG TCTGAGGATC TGCCTCATAG CCCTGCTGCC TGGCCAGACT GCCTTTGTTC  
 181 TCTTCCCTTC TGCACACTAC CACTGGCTTG GTGAAATAAT CAGCAAGCCA CCGATGGGAT  
 241 CTAATGAGTG CTCTCAGGCC ACCCCTGTCC CATGGAGCTC AACTGACCC TCACCTGCTC  
 301 TCCTTGGCTG CTTTCTAAC AGTATTTCAA TGGGTCATTG TCGTAGATGG CTTCTTCAGG P (M) 1  
 361 TAGCATTITC AGTTCACTAA CATACTCTGT TTTTACAGCT GACCTGATGG AGTTGGACAT D1  
 421 GGCCATGGAG CCGGACAGAA AAGCTGCTGT CAGCCACTGG CAGCAGCAGT CTTACTTGGA  
 481 TTCTGGAATC B1 CATTCTGTG CCACCACCTC AGCTCCTTCC CTGAGTGGCA AGGGCAACCC Exon2  
 541 TGAGGAAGAA GATGTTGACA CCTCCCAAGT CCTTTATGAA TGGGAGCAAG GCTTTTCCCA  
 601 GTCCTTCAG CAAGAGCAAG TAGCTGTAA AGCATTITGTG TTTGGAAGCT AGCATTAAGT  
 661 TTCTTGACAG GGCTGTGTGA CAGCTCAGCC ACAGCACAAG TGGGTTGAAG GAAGGGCGGA  
 721 GGGTAGCGGA GTCCACATG CCTAGTGAGT GTTGGATTTA CCTTTTTCAG ATATTGACGG  
 781 GCAGTATGCA ATGACTAGGG CTCAGAGGGT CCGAGCTGCC ATGTTCCCTG AGACGCTAGA C2  
 841 TGAGGGCATG CAGATCCCAT CCACGCAGTT TGACGCTGCT CATCCCACTA ATGTCCAGCG Exon3  
 901 CTTGGCTGAA CCATCACAGA TGTGAAACA TGCAGTTGTC AATTTGATTA ACTATCAGGA  
 961 TGACGCGGAA CTTGCCACAC GTGCAATTCC TGAGCTGACA AAAGTGTAA ACGATGAGGA  
 1021 CCAGGTAAGC AGTGATGTAA CTGCTTTTC AGTTTACTTT GAGGGAAGTT CTCAAGGGGA  
 1081 TGCCAATGGC TGCCTCACAC TAAGTTTGG AAATAATGG TGCCTCTTCA TCCTTTATTC  
 1141 TAGGTGGTAG TTAATAAAGC TGCTGTTATG GTCCATCAGC TTTCCAAAAA GGAAGCTTC B1  
 1201 ATACATECCA TTAGGGCTC CCCTCAGATG GTGTCTGCCA TTGTACGCAC CATGCAGAAT Exon4  
 1261 ACAAATGATG TAGAGACAGC TCGTTGTACT GCTGGGACTC TGCACAACCT TTCTCACCAC  
 1321 CGCGAGGGCT TGCTGGCCAT CTTTAAGTCT GGTGGCATCC CAGCGCTGGT GAAAATGCTT  
 1381 GGTAAGAGA ATGGCCAGGG AACTTGAAGG GTAGGAAGTA GAAGGGTGCT GGCATGGCTA  
 1441 ACAAAGGCTC TCCTCTTCCC AGGTCACCAG TGGATTCTGT ACTGTTCTAC GCCATCACGA Exon5  
 1501 CACTGCATAA TCTCCTGCTC CATCAGGAAG G AZ

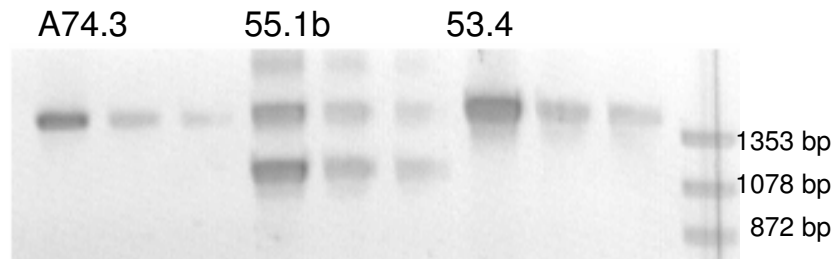
**Abbildung 3.10:** Genomischer Bereich des *Catnb*-Gens einschließlich der verwendeten Primer. Der türkis eingefärbte Bereich zeigt den Deletionsbereich der Linie 74.3a an. Der eingezeichnete Bereich „TGGATTCTG“ (bp 477-485) kann sowohl zu Exon 2 als auch zu Exon 5 ( bp 1461-1469) gehören. Der Deletionsbereich auf RNA-Ebene dieser Zelllinie entspricht dem Deletionsbereich der RNA der Zelllinie 53.4.

### Protein:

Im Western-Blot mit  $\beta$ -Catenin war für Zellen der Linie 74.3a nur die Wildtyp-Bande darstellbar. Die in dieser Linie vorliegende heterozygote Deletion dürfte dazu geführt haben, dass von dem durch die ausgesprochen große Deletion betroffenen Allel kein Protein kodiert wird. Siehe dazu die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse in Abbildung 3.40.

### 3.2.3 53.4-Maushepatomlinie

#### DNA:



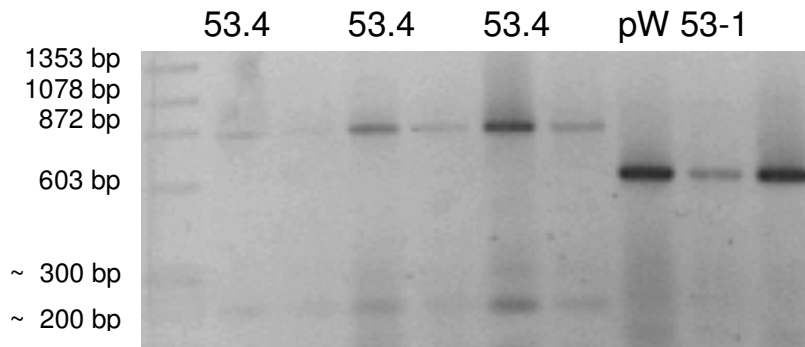
**Abb. 3.11:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 53.4, 55.1b und 74.3a-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. DNA aus 53.4-Zellen zeigte die Wildtyp-Länge. Davon abweichende Fragmentgrößen in Zellen der Linie 55.1b deuten auf Veränderungen des Gens in dieser Linie hin.

Die PCR-Amplifikate der DNA der Zelllinie 53.4 zeigten ausschließlich die Wildtyp-Fragmentgröße. Zum Vergleich sind PCR-Amplifikate der DNA der Zelllinie 74.3a (ebenso mit Wildtyp-Fragmentgröße) sowie die der Zelllinie 55.1b mit einer heterozygot angelegten Deletion dargestellt (s. Abb. 3.11).

#### Sequenzen der DNA:

Nach reverser Amplifikation wurde eine Sequenzanalyse der PCR-Amplifikate durchgeführt. Hierbei kamen die Primer P1, P2 und C2 zum Einsatz. Die „P1- und C2-Sequenzen“ zeigten insbesondere im Exon 2, dem „hot-spot-Mutationsbereich“ die Wildtypsequenz. Die mit dem Primer P2 sequenzierte DNA zeigte jedoch eine partielle Deletion. In der „Hintergrundssequenz“ kann man ab Exon 5 aufwärts eine zweite Sequenz erkennen (Daten nicht gezeigt). Über den genauen Bereich der Deletion war keine Aussage möglich.

### RNA:



**Abb. 3.12:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus 53.4 und pW53-I-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 842 bp. cDNA aus 53.4-Zellen zeigte neben einer Bande der Wildtyp-Länge eine zweite bei etwa 200-250 bp. Die bei der Linie pW53-I auftretende verkürzte Bande von etwa 600 bp lässt auf eine homozygote Deletion schließen.

Die bei der Sequenzierung der DNA-Amplifikate erkennbare Deletion konnte auch auf Ebene der RNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur DNA ist die heterozygote Deletion auf RNA-Ebene bei der gelelektrophoretischen Trennung zu erkennen. Die größere Bande mit ca. 870 bp kann man dem Wildtyp zuordnen. Die kleinere Bande mit ca. 200-250 bp entspricht der einer durch Deletion verkürzten RNA.

### Sequenzen der RNA:

Die vermutete Deletion war anhand der Sequenzanalyse nach reverser PCR zu belegen. So war hier eindeutig eine Hintergrundsequenz nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Auswertung der Sequenz war eine Deletion beginnend ab ca. Codon 36 im Exon 2 bis ins Exon 5 erkennbar. Die mit den Primern C2 und B2 erhaltenen Sequenzen ergaben die Wildtyp-Sequenz. In Abbildung 3.13 ist der Deletionsbereich in der RNA für diese Zelllinie eingezeichnet:

### Protein:

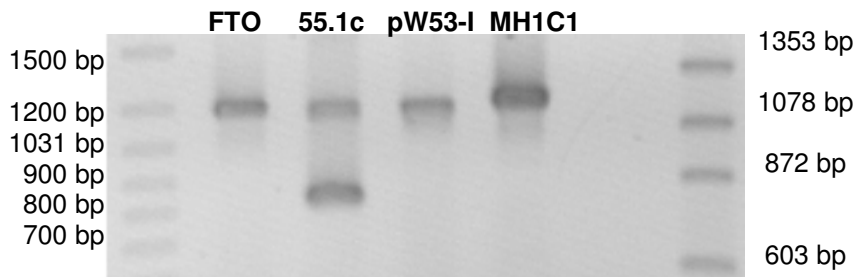
Bei der Western-Blot-Analyse war nur eine Bande (Wildtyp-Länge) erkennbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass von dem partiell-deletierten Allel kein stabiles Proteinexprimiert wird (siehe hierzu Abb. 3.41).

<sup>C1</sup>  
1 EAATTCGGAG CGTCAGTGCAG GGAGGCCGAT TCCGAGCGGG CGGCCGCGAG <sup>A1</sup> GTAGGTGAAG <sup>A1x</sup>  
de la Coste/PlA  
61 CTCAGCGCAG AGCTGCTGTG ACACCGCTGC GTGGACAATG GCTACTCAAG GTTTGTGATT  
121 CAGATGCCTG TCTGAGGATC TGCCTCATAG CCCTGCTGCC TGGCCAGACT GCCTTTGTTC  
181 TCTTCCCTTC TGCACACTAC CACTGGCTTG GTGAAATAAT CAGCAAGCCA CCGATGGGAT  
241 CTAATGAGTG CTCTCAGGCC ACCCCTGTCC CATGGAGCTC ATACTGACCC TCACCTGCTC  
301 TCCTTGCTG CTTTCTAAC AGTATTTCAA TGGGTCATTG TCGTAGATGG CTTCTTCAGG <sup>F(M)1</sup>  
361 TAGCATTTC AGTTCATAA CATACTCTGT TTTTACAGCT GACCTGATGG AGTTGGACAT <sup>D1</sup>  
421 GGCCATGGAG <sup>B1</sup> CCGGACAGAA AAGCTGCTGT CAGCCACTGG CAGCAGCAGT CTTACTTGGG  
481 TTCTGGAATC <sup>B1</sup> CATTCTGCTG CCACCACAC <sup>B1</sup> GCTCCTTC CTGAGTGGCA AGGGCAACCC  
541 TGAGGAAGAA GATGTTGACA CCTCCCAAGT CCTTTATGAA TGGGAGCAAG GCTTTTCCCA  
601 GTCCTTCACG CAAGAGCAAG TAGCTGGTAA AGCATTITGT TTTGGAAGCT AGCATTAAGT  
661 TTCTTGACAG GGCTGTGTGA CAGCTCAGCC ACAGCACAAG TGGGTTGAAG GAAGGGCGGA  
721 GGGTAGCGGA GTCCACATG CCTAGTGAGT GTTGATTTA CCTTTTTCAG ATATTGACGG  
781 GCAGTATGCA ATGACTAGGG CTCAGAGGGT <sup>C2</sup> CCGAGCTGCC ATGTTCCCTG AGACGCTAGA  
841 TGAGGGCATG CAGATCCCAT CCACGCAGTT TGACGCTGCT CATCCACTA ATGTCCAGCG  
901 CTTGGCTGAA CCATCACAGA TGTGAAACA TGCAGTTGTC AATTTGATTA ACTATCAGGA  
961 TGACGCGGAA CTTGCCACAC GTGCAATTCC TGAGCTGACA AAATGCTAA ACGATGAGGA  
1021 CCAGGTAAGC AGTGATGTAA CTGCTTTTC AGTTTACTTT GAGGGAAGTT CTCAAGGGGA  
1081 TGCCAATGGC TGCCTCACAC TAAGTTTGG AAATAATGG TGCCTCTTCA TCCTTTATTC  
1141 TAGGTGGTAG TTAATAAAGC <sup>B1</sup> TGCTGTTATG GTCCATCAGC TTTCCAAAAA GGAAGCTTC  
1201 <sup>B1</sup> ATACATGCCA TTAGCGCTC CCCTCAGATG GTGTCTGCCA TTGTACGCAC CATGCAGAAT  
1261 ACAATGATG TAGAGACAGC TCGTTGTA CTGTTGGACTC <sup>B1</sup> TGCACAACCT TTCTCACCAC  
1321 CGCGAGGGCT TGCTGGCCAT CTTTAAGTCT GGTGGCATCC CAGCGCTGGT GAAAATGCTT  
1381 GGTAAGAGA ATGGCCAGG AACTTGAAG GTAGGAAGTA GAAGGGTGCT GGCATGGCTA  
1441 ACAAAGGCTC TCCTCTTCCC AGGTCACCAG TGGATTCTGT ACTGTTCTAC GCCATCACGA  
1501 CACTGCATAA <sup>A2</sup> TCTCCTGCTC CATCAGGAAG G

**Abbildung 3.13:** Genomischer Bereich des *Catnb*-Gens. Mit eingezeichnet sind die Positionen der verwendeten Primer. Der türkis eingezeichnete Bereich zeigt den Deletionsbereich in der DNA der Zellen der Linie 53.4 an. Der eingezeichnete Bereich „TGGATTCTG“ (bp 477-485) kann sowohl zu Exon 2 als auch zu Exon 5 ( bp 1461-1469) gehören. Der auf RNA-Ebene detektierte Deletionsbereich entsprach exakt dem Deletionsbereich der RNA der Zelllinie 74.3a.

### 3.2.4 FTO-Rattenhepatomlinie

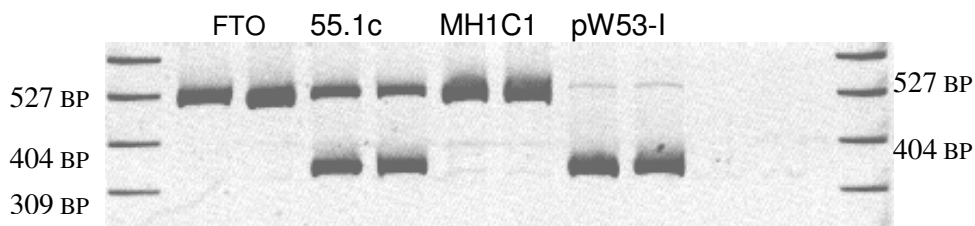
#### DNA:



**Abb. 3.14:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus MH1C1, pW53-I, 55.1c und FTO-Zellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + B2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1162 bp. DNA aus FTO-Zellen zeigte aufgrund dieser Analyse die Wildtyp-Fragmentlänge.

Die DNA der Zelllinie FTO zeigte ausschliesslich die Wildtyp-Fragmentgrösse (s. Abb. 3.14).

#### RNA:

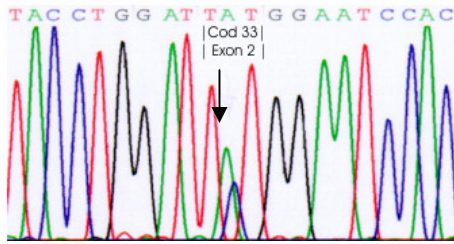


**Abb. 3.15:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus pW53-I und 55.1c-Maushepatomzellen sowie MH1C1 und FTO-Rattenhepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: P1A + B2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 581 bp. FTO-Zellen zeigten ausschliesslich Fragmente der Wildtypgrösse.

Die Fragmentgrösse der cDNA der Zelllinie FTO entsprach der Wildtypfragmentgrösse (s. Abb. 3.15).



### Sequenz von DNA und RNA:



**Abbildung 3.16:** Heterozygot angelegte Punktmutation in Codon 33 des *Catnb*-Gens der Linie FTO. Der Pfeil deutet auf das durch Mutation veränderte Codon.

Bei der Auswertung der Sequenzen war sowohl auf der Ebene der DNA als auch auf der Ebene der RNA eine heterozygot angelegte Punktmutation im Exon 2 im Codon 33 (TCT → TAT) nachzuweisen.

### Protein:

Bei dieser Zelllinie wurde keine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

### 3.2.5 MH1C1-Rattenhepatomlinie

#### DNA:

Die DNA dieser Zelllinie zeigte nach Amplifikation des Bereich von Exon 2 die Wildtyp-Fragmentlänge (s. Abb. 3.14).

#### RNA:

Auch nach reverser PCR der RNA (entsprechend Exon 2) war ausschliesslich die erwartete Wildtyp-Fragmentlänge nachzuweisen (s. Abb. 3.15).

#### Sequenzanalyse:

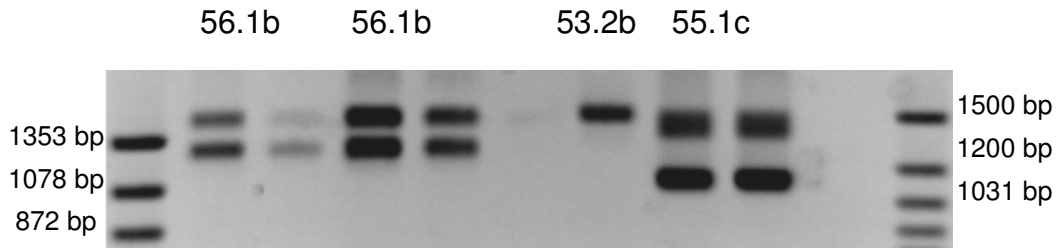
Im Zuge dieser Arbeit wurde keine Sequenzanalyse mit DNA der Linie MH1C1 durchgeführt. Allerdings ist aus parallel im Labor durchgeführten Analysen (J. Mahr, persönliche Mitteilung) bekannt, dass MH1C1-Zellen das *Catnb*-Gen in seiner Wildtypstruktur zeigen.

#### Protein:

Zu dieser Zelllinie wurde keine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

### 3.2.6 53.2b-Maushepatomlinie

#### DNA:



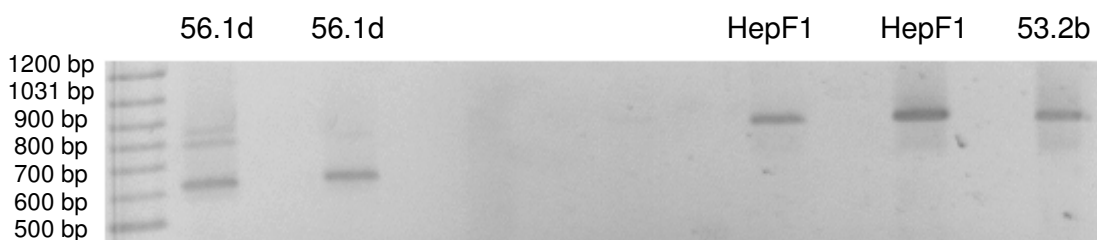
**Abb. 3.17:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 55.1c, 53.2b und 56.1b-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. DNA aus Zellen der Linie 53.2b zeigte ausschliesslich die Wildtyp-Bande. Kürzere Fragmente in 55.1c und 56.1b-Zelle weisen auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

Die Fragmentgröße der Zelllinie 53.2b entsprach der Wildtyp-Fragmentgröße. Im Vergleich dargestellt das Laufverhalten der PCR-Amplifikate aus Zellen der Linien 55.1c und 56.1b mit partieller Deletion eines der beiden *Catnb*-Allele.

#### Sequenz der DNA:

Die mit den Primern P1 und P2 durchgeführten Sequenzanalysen der DNA aus 53.2b-Zellen belegten die Exon 2-Wildtyp-Sequenz (Daten nicht gezeigt).

#### RNA:



**Abb. 3.18:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-RNA aus 53.2b, HepF1 und 56.1d-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für Wildtyp cDNA eine Länge entsprechend 842 bp, wie sie in 53.2b- (und HepF1)-Zellen nachzuweisen war. Kürzere Fragmente in 56.1d-Zellen weisen auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

Die Fragmentgröße der cDNA der Zelllinie 53.2b entsprach der Wildtyp-Fragmentgröße.

### **Sequenzen der RNA:**

Die Sequenzanalyse der cDNA von Zellen der Linie 53.2b ergab ausschließlich die Wildtyp-Sequenz; Insbesondere waren im Bereich entsprechend Exon 2 keine Mutationen zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

### **Protein:**

Das  $\beta$ -Catenin-Protein war bei der Western-Blot-Analyse eindeutig nachzuweisen und zeigte eine Bande bei der von der Wildtyp-Konfiguration erwarteten Größe. Siehe dazu Abb. 3.41.

## **3.2.7 66.3-Maushepatomlinie**

### **DNA:**



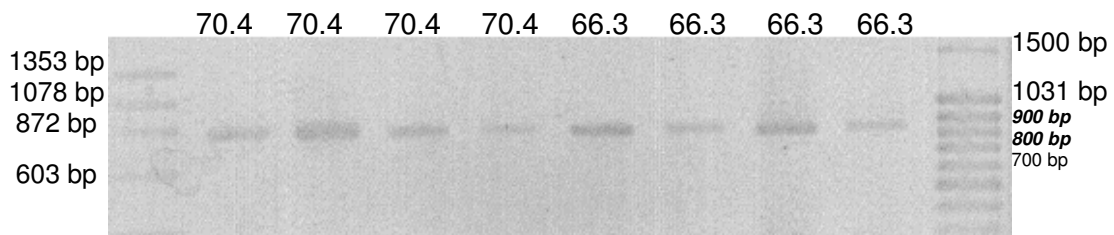
**Abb. 3.19:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 66.3, 56.1d und HepF1-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. 66.3-Zellen zeigten eine starke Bande bei etwa 1500 bp sowie eine schwache Bande kleinerer Größe, die vermutlich ein Artefakt darstellt. Das in 56.1d-Zellen nachweisbare kürzere Fragment weist auf eine partielle Gendeletion im *Catnb*-Gen dieser Zellen hin.

Die *Catnb*-PCR-Amplifikate der Zelllinie 66.3 entsprachen der Wildtyp-Fragmentgröße.

### **Sequenzanalyse der DNA:**

Eine Sequenzanalyse mit DNA der Zelllinie 66.3 wurde mit den Primern P1 und P2 durchgeführt. Hierbei war ausschließlich die Wildtypsequenz des Exons 2 nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

### RNA:



**Abb. 3.20:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten ausgehend von der *Catnb*-cDNA aus 70.4 und 66.3-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Fragment eine Länge entsprechend 842 bp.

Die Fragmentgröße der cDNA der Zelllinie 66.3 entsprach der Wildtyp-Fragmentgröße.

### Sequenzanalyse ausgehend von der RNA:

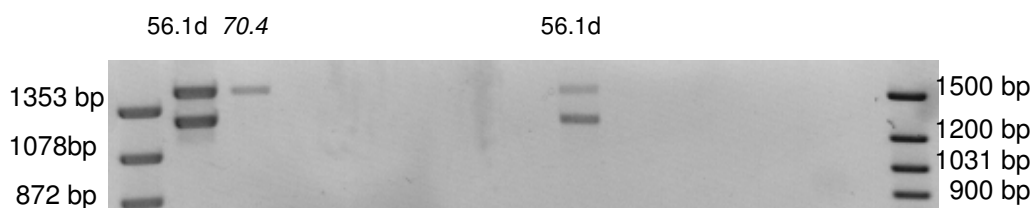
Die mit den Primern A1x und C2 durchgeführten Sequenzanalysen zeigten insbesondere im Bereich von Exon 2 die Wildtypsequenz (Daten nicht gezeigt).

### Protein:

Zellen der Linie 66.3 zeigten bei der Western-Blot-Analyse eine Bande entsprechend der Wildtyp  $\beta$ -Catenin-Größe. Siehe hierzu Abb. 3.39 und Abb. 3.40.

## 3.2.8 70.4-Maushepatomzelllinie

### DNA:



**Abb. 3.21:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 56.1d und 70.4-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. 70.4-Zellen

zeigten die vom Wildtyp erwartete Fragmentlänge. Das kürzere Fragment in 56.1d-Zellen weist auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

Die PCR-Amplifikate der Zelllinie 70.4 entsprachen der Wildtyp-Fragmentgröße.

### **Sequenzanalyse der DNA:**

Die mit den Primern P1 und P2 durchgeführten Sequenzanalysen mit DNA der Zelllinie 70.4 ergaben ausschließlich die Exon 2 Wildtyp-Sequenz (Daten nicht gezeigt).

### **RNA:**

Durch reverse PCR gewonnene Amplifikate aus 70.4-Zellen zeigten die Wildtypgröße (s. Abb. 3.20).

### **Sequenzanalyse ausgehend von der RNA:**

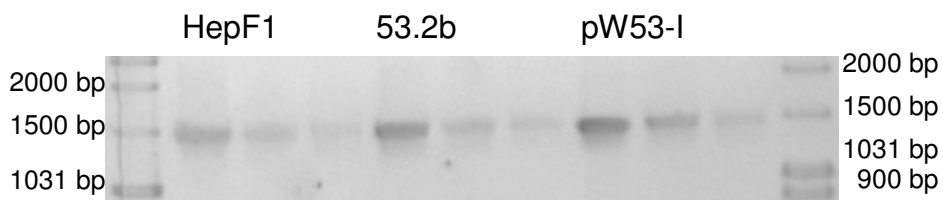
Die mit den Primern P1A und C2 durchgeführten Sequenzanalysen zeigten die Wildtypsequenz in dem Exon 2 entsprechenden Sequenzbereich (Daten nicht gezeigt).

### **Protein:**

Bei der Western-Blot-Analyse konnte ausschließlich eine Bande der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Die Daten weisen in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass 70.4-Zellen Wildtyp  $\beta$ -Catenin exprimieren. Siehe dazu Abb. 3.39 und 3.40.

## **3.2.9 pW53-I-Maushepatomlinie**

### **DNA:**



**Abb. 3.22:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus pW53-I, 53.2b und HepF1-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp.

Die Fragmentgröße der Zelllinie pW53-I entsprach der Wildtyp-Fragmentgröße (s. Abb. 3.22).

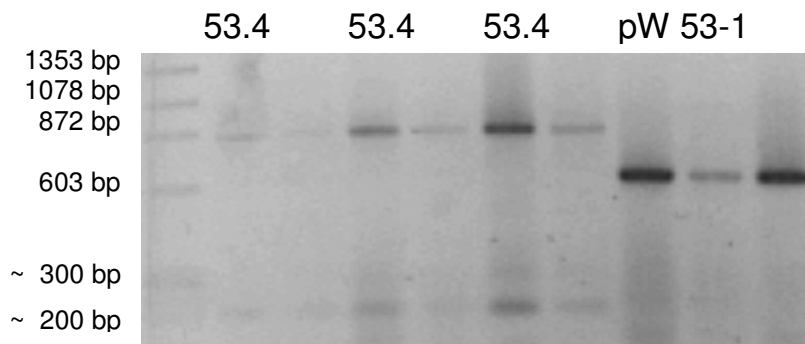
### Sequenzanalyse der DNA:

Eine Sequenzanalyse wurde mit den Primern P1 und P2 durchgeführt (Originaldaten nicht gezeigt). Bei dieser Analyse war eine homozygote Deletion der letzten 12 bp im Intron 1 bzw. der ersten 12 bp vor Exon 2 zu erkennen. Siehe dazu Abbildung 3.23.

		<i>Intron1   Exon 2</i>
b-Catenin-TMP	358	aggtagcattttcagttcactaacaractctgttttacagctgacctgatggagttggacat
pW53I_~2.Seg	253	aggtagcattttcagttcactaacatact-----ctgacctgatggagttggacat
		<i>Deletion 12 bp</i>

**Abb. 3.23:** *Catnb*-Deletion in Zellen der Linie pW53-I. Oben die Wildtypsequenz der DNA. Im Vergleich hierzu ist darunter der Deletionsbereich von 12 bp der pW53-I-Zellen dargestellt.

### RNA:



**Abb. 3.24:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten aus *Catnb*-cDNA von pW53-I, und 53.4-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für die Wildtyp-cDNA eine Länge entsprechend 842 bp. Bei pW53-I-Zellen war ein verkürztes Fragment nachzuweisen, was auf eine homozygote Deletion im *Catnb*-Gen schließen lässt.

Die homozygote Deletion von 12 bp auf der DNA-Ebene bewirkte eine homozygote Deletion von ca. 200 bp auf RNA-Ebene. So zeigte sich eine Fragmentgröße von ca. 600 bp anstelle der Wildtypgröße bei 842 bp, wie sie z.B. bei der Wildtypbande der 53.4-Zellen nachzuweisen ist (s. Abb. 3.24).

### Sequenzanalyse ausgehend von der RNA:

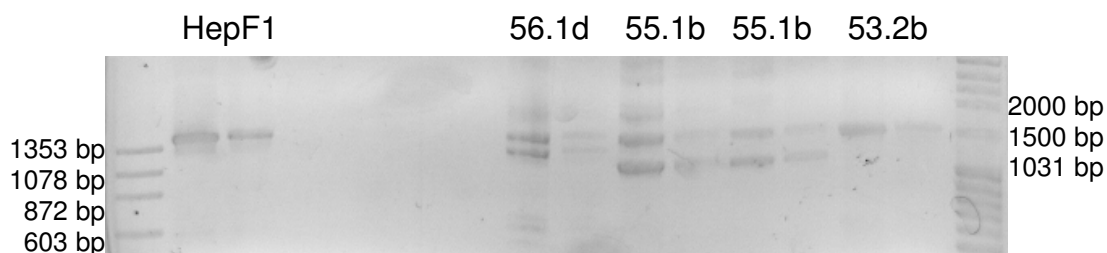
Bei Sequenzanalyse der cDNA aus pW53-I-Zellen war der genaue Deletionsbereich darstellbar. Die homozygote Deletion von 12 bp auf DNA-Ebene unmittelbar vor Exon 2 führte offenbar zur homozygoten Deletion von Exon 2 auf RNA-Ebene. Vermutlich ist hierfür der Verlust einer Splice-Acceptorstelle, bedingt durch die Deletion verantwortlich. Exon 2 hat eine Fragmentgröße von 228 bp. Bei der eingesetzten Primer-Kombination A1x und A2 wäre bei Deletion von Exon 2 eine Fragmentgröße von 614 bp zu erwarten, was mit der bei der gelelektrophoretischen Trennung beobachteten Fragmentlänge in Einklang steht.

### Protein:

Aufgrund der homozygoten Deletion von Exon 2 sowie der dadurch verkürzten RNA wäre bei dieser Zelllinie ein Protein mit deutlich kleinerer relativer Molmasse zu erwarten. Interessanterweise war dies bei der Western-Blot-Analyse nicht nachzuweisen. Es wurden 2 unterschiedliche Proteinisolate analysiert, wobei widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden: Einmal war  $\beta$ -Catenin von Wildtypgröße und einmal von kleinerer Größe (wie zu erwarten) nachweisbar. Die Wiederholung der Western-Blots mit denselben Proben führte zum gleichen Resultat. Bekannt ist aus früheren Untersuchungen, dass diese Zelllinie nicht klonal gehalten werden kann. Vermutlich sind zwei unterschiedliche Zelltypen vorliegend, die sich gegenseitig in der Kultur in ihrem Wachstum unterstützten. Je nach dem, wieviel von dem jeweiligen Zelltyp im Ansatz vorlag, ist es möglich, dass die Probe mehr  $\beta$ -Catenin vom Wildtyp oder von der verkürzten Länge enthält. Siehe dazu Abb. 3.40 und 3.41.

### 3.2.10 55.1b-Maushepatomlinie

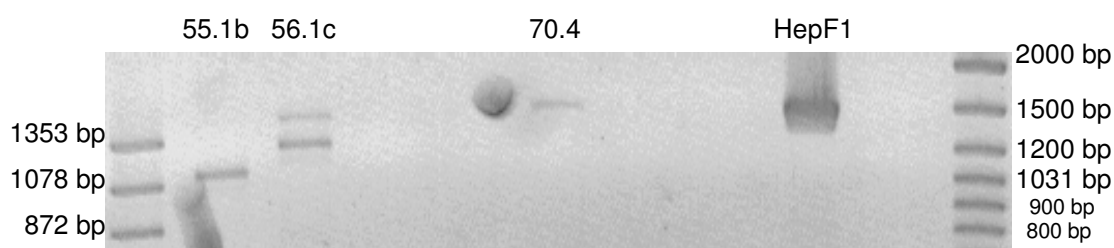
#### DNA:



**Abb. 3.25:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 53.2b, 55.1c, 55.1b, 56-1d und HepF1-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten

Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. 55.1b Zellen zeigten neben der Wildtyp-Bande eine Bande kleiner Größe, die auf eine heterozygot angelegte partielle Deletion im *Catnb*-Gen dieser Zellen hinweist.

Die DNA der Zelllinie wurde mit den Primern A1x und A2 amplifiziert. Wie aus Abbildung 3.25 zu entnehmen ist, zeigten Zellen der Linie 55.1b eine heterozygot angelegte Deletion von etwa 350 bp. Bei einer späteren Analyse (s. Abb. 3.26) war dagegen nur Bande von verkürzter Länge zu erkennen, die auf eine homozygote Deletion hindeuten würde. Denkbar ist, dass das Wildtyp-Allel nur schwach exprimiert wird und deshalb bei der zweiten Analyse nicht amplifiziert werden konnte.



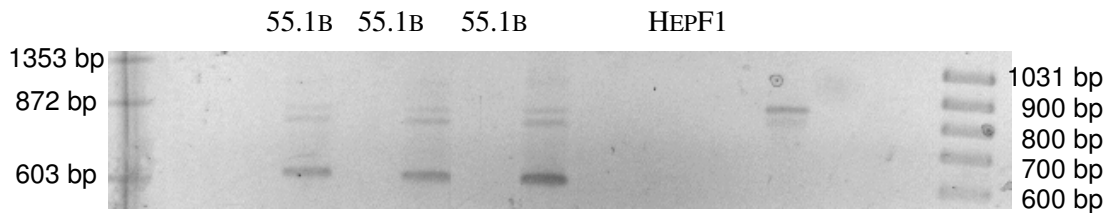
**Abb. 3.26:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus HepF1, 70.4, 56.1c und 55.1c-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. DNA der 55.1b-Zellen zeigte nur eine Bande kleinerer Größe, was auf eine homozygote Deletion schließen lässt.

### Sequenzanalyse der DNA:

Für die Sequenzierreaktion wurden die Primer P1A, A1x, P1, P2 und C2 eingesetzt. Mit den Primern P1 und P2 ließ sich die Wildtypsequenz im Exon 2 darstellen. Bei den anderen Primern waren Überlagerungen im sequenzierten Bereich zu erkennen. Bei Auswertung des Hintergrunds dieser Sequenzen zeigte sich ein Deletionsbereich von 354 bp, welcher identisch mit dem Deletionsbereich ist, der im *Catnb*-Gen der Zelllinie 55.1c nachzuweisen ist (siehe dazu Abb. 3.29). Da 55.1b und 55.1c-Zellen dem gleichen Tumor entstammen und aus der gleichen Zelllinie (Linie 55.1) kloniert wurden (s. Abb. 3.1), muss angenommen werden, dass entweder der Tumor selbst die Mutation trug oder dass die Mutation während der ersten Passagen der daraus isolierten Ausgangszelllinie entstand.



## RNA:



**Abbildung 3.27:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus HepF1 und 55.1b-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 842 bp. HepF1 lässt sich als Wildtyp-Fragmentgröße darstellen. Bei 55.1b-Zellen wird eine verkürzte Bande gefunden, die auf eine partielle Veränderung auf genomischer Ebene schließen lässt.

Die cDNA wurde mit der Primerkombination A1x + A2 amplifiziert. Dies entspricht der Wildtyp-Fragmentgröße von 842 bp. Bei genauerer Betrachtung von Abbildung 3.27 sind bei Linie 55.1b 3 Banden zu erkennen. Die Bande vom höchsten Molekulargewicht lässt sich als Wildtyp-Bande interpretieren (entsprechend der Bande der HepF1-Linie). Bei den kürzeren Fragmenten handelt es sich um Amplifikate mit partiellen Deletionen.

## Sequenzanalyse der DNA:

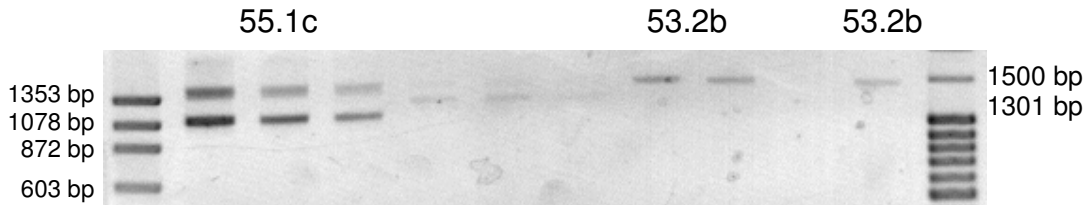
Anhand der Sequenzen bekommt man Aufschluss über die Deletion. Die RNA wurde revers umgeschrieben und die cDNA mit P1A- und C2 Primern sequenziert. Die Sequenz mit dem P1A-Primer zeigte die Wildtyp-Sequenz von Exon 2. Bei Benutzung des C2-Primers zeigte sich dagegen eine Überlagerung. Aufgrund der Auswertung der Hintergrundsequenz kann man schließen, dass eine Deletion von Exon 2 vorliegt. Dies führt im Gel zu der verkürzten Bande mit 614 bp (s. Abb. 3.27). Die Natur der mittleren Bande ist ungeklärt.

## Protein:

Die Western-Blot- Analyse lieferte bei dieser Zelllinie kein klares Ergebnis.

### 3.2.11 55.1c-Maushepatomlinie

#### DNA:



**Abbildung 3.28:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 53.2b und 55.1c-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. 53.2b-Zelle hat die Wildtypfragmentgröße. Das zusätzliche kürzere Fragment in 55.1c-Zellen weist auf eine partielle Gendeletion auf einem *Catnb*-Allel in dieser Zelle hin.

Die mit der Primerkombination A1x + A2 erzeugten PCR-Produkte zeigten bei der gelelektrophoretischen Trennung von DNA der Zelllinie 55.1c 2 Banden, was auf die Anwesenheit einer heterozygot angelegten Deletion hindeutet (s. Abb. 3.28). Die größere Bande dürfte die Wildtyp-Bande sein. Die kleinere Bande entspricht der durch die Deletion verkürzten DNA. Im Vergleich dazu zeigte DNA der Zelllinie 53.2b die Wildtyp-Fragmentlänge (s. dazu auch Abb. 3.3).

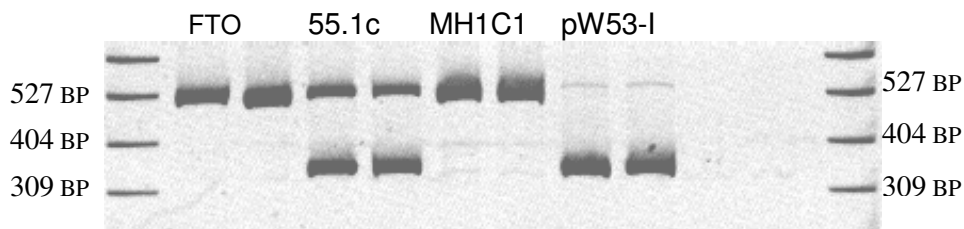
#### Sequenzanalyse der DNA:

Die Sequenzanalyse wurde zunächst mit den Primern P1 und P2 durchgeführt und ergab ausschließlich Signale entsprechend der Wildtypsequenz, insbesondere im Bereich des Exons 2. Anschließend wurde mit den Primern A1x und C2 sequenziert. Diese geben Aufschluss über eine Deletionsbereich von 354 bp (Daten nicht gezeigt). Der markierte Bereich zwischen bp 345-698 (s. Abb. 3.29) zeigt den Deletionsbereich an.

<sup>C1</sup>  
1 GAATTCCGAG CGTCAGTGCA GGAGGCCGAT TCCGAGCGGG CGGCCGCGAG GTAGGTGAAG<sup>A1</sup>  
61 CTCAGCGCAG AGCTGCTGTG ACACCGCTGC GTGGACAATG GCTACTCAAG GTTTGTGATT<sup>A1x</sup>  
121 CAGATGCCTG TCTGAGGATC TGCCTCATAG CCCTGCTGCC TGGCCAGACT GCCTTTGTTC  
181 TCTTCCCTT TGCACACTAC CACTGGCTTG GTGAAATAAT CAGCAAGCCA CCGATGGGAT  
241 CTAATGAGTG CTCTCAGGCC ACCCCTGTCC CATGGAGCTC ATACTGACCC TCACCTGCTC  
301 TCCTTGCTG CTTTCTAAC AGTATTTCAA TGGGTCATTG TCGTAGATGG CTTCTTCAGG  
361 TAGCATTTC AGTTCACTAA CATACTCTGT TTTTACAGCT GACCTGATG<sup>D1</sup> AGTTGGACAT  
421 GGCCATGGAG CCGGACAGAA AAGCTGCTGT CAGCCACTGG CAGCAGCAGT CTTACTTGGAA  
481 TTCTGGAATC<sup>B1</sup> CATTCGCTGT CACCCACCAC AGCTCCTTCC CTGAGTGGCA AGGGCAACCC  
541 TGAGGAAGAA GATGTTGACA CCTCCCAAGT CCTTTATGAA TGGGAGCAAG GCTTTTCCCA  
601 GTCCTTCACG CAAGAGCAAG TAGCTGGTAA AGCATTGTG TTTGGAAGCT AGCATTAAAGT  
661 TTCTTGACAG GGCTGTGTGA CAGCTCAGCC ACAGCACAAG TGGGTTGAAG GAAGGGCGGA  
721 GGGTAGCGGA GTCCACATG CCTAGTGAGT GTTGATTTA CCTTTTTCAG ATATTGACGG  
781 GCAGTATGCA ATGACTAGGG CTCAGAGGGT CCAGCTGCC<sup>C2</sup> ATGTTCCCTG AGACGCTAGA  
841 TGAGGGCATG CAGATCCCAT CCACGCAGTT TGACGCTGCT CATCCACTA ATGTCCAGCG

**Abb. 3.29:** Genomischer Bereich des *Catnb*-Gens mit den in dieser Arbeit benutzten Primern. Der türkis eingzeichnete Bereich zeigt den Deletionsbereich in der DNA der 55.1c-Zellen zwischen bp 345-698 an.

**RNA:**



**Abb. 3.30:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikate der *Catnb*-cDNA aus pW53-I und 55.1c-Maushepatomzellen; MH1C1 und FTO-Rattenhepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: P1A + B2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 581 bp. cDNA aus 55.1-Zellen zeigte 2 Fragmente unterschiedlicher Größe, die auf eine heterozygot angelegte Deletion hinweisen.

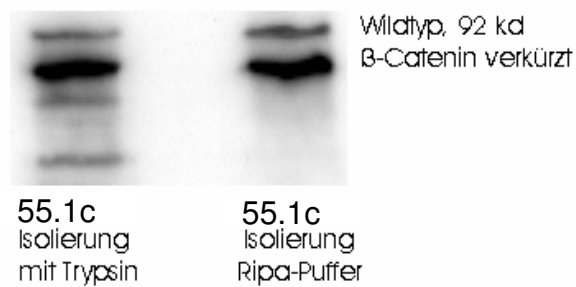
Die cDNA der Zelllinie 55.1c zeigte 2 Banden, was auf eine heterozygot angelegte Deletion im *Catnb*-Gen hinweist. Die Bande bei 480 bp in Abb. 3.30 entspricht der Wildtyp-Fragmentlänge, die Bande mit der Fragmentgröße zwischen 300 und 400 bp entspricht einem durch Deletion verkürztem Produkt. Im Vergleich dazu sind DNA-

Amplifikate aus den Zelllinien pW53-I mit homozygoter Deletion sowie aus MH1C1- und FTO-Zellen mit Wildtyp-Fragmentgröße dargestellt.

### Sequenzanalyse ausgehend von der RNA:

Zur Sequenzanalyse der cDNA wurden die Primer P1A und B2 eingesetzt. Bei beiden Sequenzierungen zeigten sich Sequenz-Überlagerungen (Daten nicht gezeigt). Bei Auswertung dieser Sequenzen war eine heterozygote Deletion von Exon 2 nachzuweisen. Die Deletion von Exon 2 führte bei der verwendeten Primerkombination zur einer Fragmentgröße von 353 bp. Diese Fragmentgröße entspricht der Bande mit der kürzeren Laufstrecke in Abb. 3.30.

### Protein:

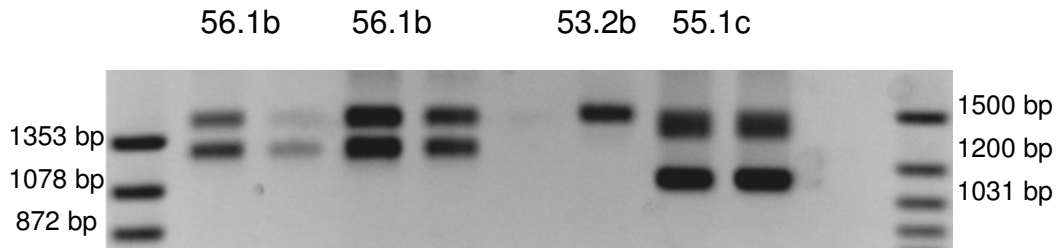


**Abb. 3.31:** Western-Blot-Analyse von Protein aus 55.1c-Zellen. Die Proteinisolierung erfolgte nach zwei unterschiedlichen Protokollen. Deutlich ist jedoch bei beiden Versuchen eine starke Bande (β-Catenin-Wildtyp) sowie eine Proteinbande mit längerer Laufstrecke (β-Catenin durch Deletion verkürzt) erkennbar.

Auf Proteinebene waren in 55.1c-Zellen zwei Banden erkennbar, eine entsprechend dem Wildtyp β-Catenin, eine andere mit verkürzter Laufstrecke entsprechend dem von der Deletion betroffenen Allel (Abb. 3.31). In diesem Experiment wurden Proteinisolate nach zwei verschiedenen Methoden gewonnen (Trypsin versus Ripa-Puffer). Zur Problematik der Trypsinisolierung siehe auch Diskussionsteil in Kapitel 4.1.

### 3.2.12 56.1b Maushepatomlinie

#### DNA:



**Abb. 3.32:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 55.1c, 53.2b und 56.1b-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. 56.1b-Zellen zeigten deutlich zwei Fragmente. DNA aus 53.2b-Zellen zeigte die Wildtyp-Fragmentgröße. Die kürzeren Fragmente in 55.1c und 56.1b-Zellen weisen auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

PCR-Amplifikate aus 56.1b-Zellen zeigten 2 Fragmentgrößen, eine von ca. 1500 bp entsprechend der Wildtyp-Größe, eine zweite von ca. 1200 bp verkürzt durch partielle Deletion des Gens.

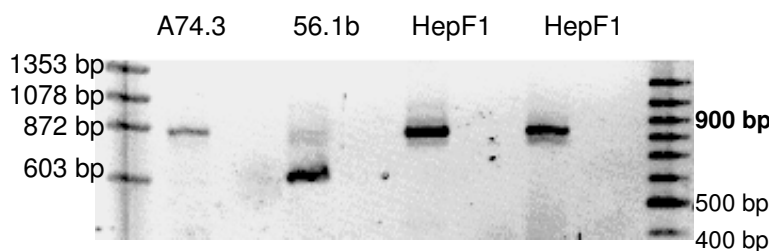
#### Sequenzanalyse der DNA:

Die Sequenzanalyse wurde mit den Primern A1x, P1 und P2 durchgeführt. Die Sequenzierung mit Primer P1 ergab die Wildtypsequenz. Bei Einsatz der Primer A1x- und P2 war eine zusätzliche Hintergrundsequenz erkennbar (Daten nicht gezeigt). Nach Auswertung dieser Sequenz ergab sich eine heterozygot angelegte Deletion von 199 bp, die vom terminalen Intron 1 bis etwa Mitte von Exon 2 reicht. In Abbildung 3.33 ist der Deletionsbereich im *Catnb*-Gen dieser Zellen markiert.

C1 A1  
 1 GAATTCCGAG CGTCAGTGC A GGAGCCGAT TCCGAGCGGG CGGCCGCGAG GTAGGTGAAG  
 61 CTCAGCGCAG AGCTGCTGTG ACACCGCTGC GTGGACAATG GCTACTCAAG GTTTGTGATT A1x  
 121 CAGATGCCTG TCTGAGGATC TGCCTCATAG CCCTGCTGCC TGGCCAGACT GCCTTTGTTC  
 181 TCTTCCCTT TGCACACTAC CACTGGCTTG GTGAAATAAT CAGCAAGCCA CCGATGGGAT  
 241 CTAATGAGTG CTCTCAGGCC ACCCCTGTCC CATGGAGCTC ATACTGACCC TCACCTGCTC  
 301 TCCTTGCTG CCTTTCTAAC AGTATTTCAA TGGGTCATTG TCGTAGATGG CTTCTTCAGG  
 361 TAGCATTTC AGTTCACTAA CATACTCTGT TTTTACAGCT GACCTGATGG AGTTGGACAT  
 421 GGCCATGGAG CCGGACAGAA AAGCTGCTGT CAGCCACTGG CAGCAGCAGT CTTACTTGG A  
 481 TTCTGGAATC CATTCTGGTG CCACCACCAC AGCTCCTTCC CTGAGTGGCA AGGGCAACCC  
 541 TGAGGAAGAA GATGTTGACA CCTCCCAAGT CCTTTATGAA TGGGAGCAAG GCTTTTCCCA  
 601 GTCCTTACAG CAAGAGCAAG TAGCTGTAA AGCATTGTG TTTGGAAGCT AGCATTAAAGT

**Abb. 3.33:** Ausschnitt aus der Sequenz des *Catnb*-Gens. Der türkis markierte Bereich zeigt den Deletionsbereich von bp 314-417 ( $\Sigma$  199 bp) in 56.1b-Zellen.

**RNA:**



**Abb. 3.34:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus HepF1, 56.1b und 74.3a-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Fragment eine Länge entsprechend 842 bp. In 56.1b-Zellen war ein verkürztes Fragment nachweisbar, was auf eine partielle Gendeletion hindeutet. Die Bande der Wildtypgröße ist nur schwach erkennbar.

Auffällig war, dass die Wildtypbande von 56.1b-Zellen eine schwächere Färbung als die des durch Deletion verkürzten Fragments zeigte, was auf eine stärkere Expression des partiell deletierten Allels hinweisen könnte.

**Sequenzanalyse ausgehend von der RNA:**

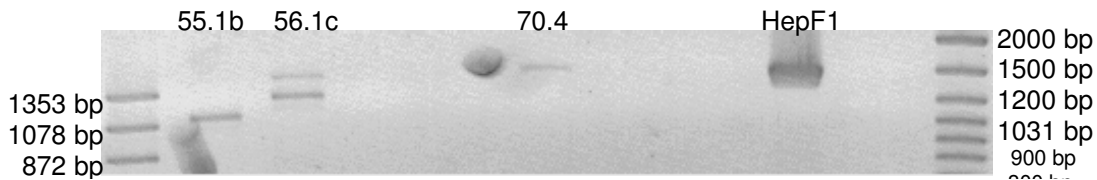
Die Sequenzanalyse der cDNA wurde mit den Primern A1x, B2 und C2 durchgeführt. Bei allen Sequenzierungen zeigten sich Doppelsequenzen mit Hinweis auf eine partielle heterozygot angelegte Deletion von Exon 2 (Daten nicht gezeigt).

**Protein:**

Mit Protein aus Zellen dieser Linie wurde keine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

### 3.2.13 56.1c-Maushepatomlinie

#### DNA:



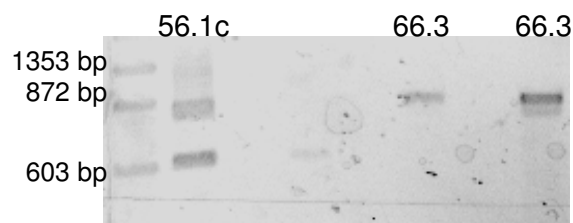
**Abb. 3.35:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus HepF1, 70.4, 56.1c und 55.1b-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. DNA aus 56.1c-Zellen ergab deutlich zwei Banden. DNA aus HepF1 und 70.4-Zellen zeigte die Wildtyp-Fragmentgröße. Das kürzere Fragment in 56.1c-Zellen weist auf eine partielle Gendeletion in diesen Zellen hin.

Bei gelelektrophoretischer Trennung der PCR-Amplifikate aus 56.1c-Zellen zeigten sich 2 Banden, wobei die größere dem Wildtyp-Fragment entspricht. Die zweite Bande entspricht einer DNA-Größe von ca. 1200 bp und weist auf das Vorliegen einer Deletion hin.

#### Sequenzanalyse der DNA:

Für die Sequenzanalysen wurden die Primer A1x und P2 eingesetzt; hierbei zeigte sich deutlich eine Überlagerung. Nach Auswertung der der Sequenzen war eine Deletion von 199 bp vom terminalen Intron 1 bis Mitte Exon 2 nachzuweisen, welche mit dem Deletionsbereich im *Catnb*-Gen von Zellen der Linie 56.1b identisch ist. Siehe dazu Abb. 3.33. Beide Linien stammen von einer Ausgangslinie ab (s. Stammbaum in Abb. 3.1).

#### RNA:



**Abb. 3.36:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus 66.3 und 56.1c-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Fragment eine Länge entsprechend 842 bp. cDNA aus 56.1c-Zellen zeigte 2 Banden entsprechend dem Wildtyp und einem partiell deletierten Produkt.

Das Ergebnis der cDNA-Analyse ist in Abb. 3.36 dargestellt. Das größere PCR-Produkt bei ca. 870 bp entspricht dem Wildtyp; das Produkt bei ca. 600 bp ist durch Deletion verkürzt. Im Vergleich zeigt die cDNA von 66.3-Zellen nur die Wildtyp-Konfiguration.

### **Sequenzanalyse ausgehend von der RNA:**

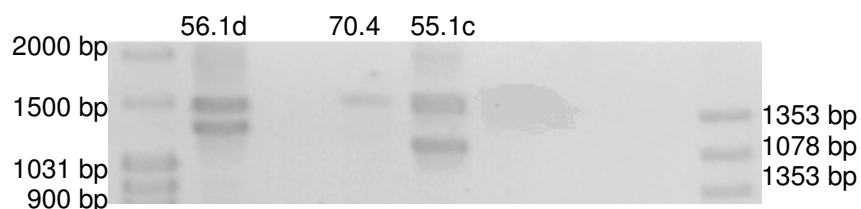
Bei der Sequenzanalyse der cDNA aus 56.1c-Zellen mit den Primern A1x, B2 und C2 zeigten sich in allen Fällen Überlagerungen (Daten nicht gezeigt). Nach Auswertung der Hintergrundsequenzen war eine heterozygot angelegte Deletion von Exon 2 wie bei der Zelllinie 56.1b zu identifizieren. Beide Linien wurden aus einer gemeinsamen Ausgangslinie kloniert (s. Abb. 3.1).

### **Protein:**

Bei der Western-Blot-Analyse zeigte sich eine Doppelbande, die sich auf eine Wildtyp- und eine durch Deletion verkürzte Variante des  $\beta$ -Catenin-Proteins zurückführen lässt. (s. Abb 3.40).

### **3.2.14 56.1d-Maushepatomlinie**

#### **DNA:**



**Abb. 3.37:** Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Amplifikaten des *Catnb*-Gens aus 55.1c, 70.4 und 56.1d-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Gen eine Länge entsprechend 1473 bp. DNA aus 56.1d-Zellen zeigte 2 deutliche Banden. DNA aus 70.4-Zellen ausschliesslich die Wildtypfragmentgröße. Die kürzeren Fragmente aus 55.1c und 56.1d-Zellen weisen auf eine partielle Gendeletion im *Catnb*-Gen dieser Zellen hin.

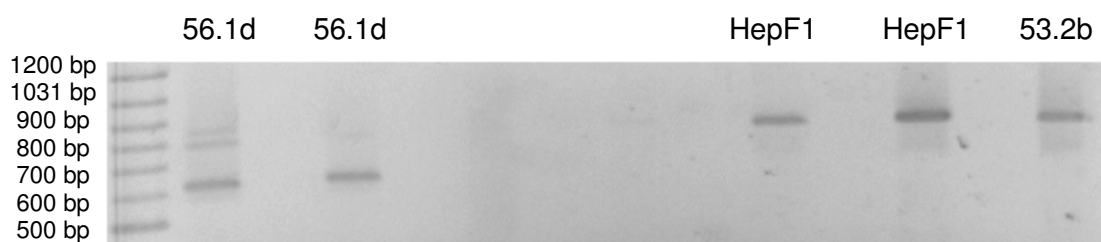
Die DNA wurde mit der Primerkombination A1x + A2 amplifiziert. PCR-Amplifikate aus 56.1d-Zellen zeigten die Wildtyp-Fragmentgröße von 1473 bp sowie eine Bande mit verkürzter Laufstrecke entsprechend ca. 1300 bp, die auf eine heterozygot angelegte Mutation hindeutet.



### Sequenzanalyse der DNA:

Die Sequenzanalysen wurden mit den Primern P1, P2 und A1x durchgeführt. Die Sequenzierung mit Primer P1 ergab die Wildtypsequenz im Exon 2. Die Sequenzierungen mit den Primern P2- und A1x zeigten dagegen Überlagerungen. Nach Auswertung der Hintergrundsequenzen war ein Deletionsbereich von 199 bp im terminalen Intron 1 bis Mitte von Exon 2 nachweisbar, welcher mit demjenigen der Zelllinien 56.1b und 56.1c identisch ist. Siehe dazu Abb. 3.33.

### RNA:



**Abb. 3.38:** Gelelektrophoretische Trennung von über reverse Transkription und PCR generierten Amplifikaten der *Catnb*-cDNA aus 53.2b, HepF1 und 56.1d-Maushepatomzellen. Bei der eingesetzten Primerkombination: A1x + A2 ergibt sich für das Wildtyp-Fragment eine Länge entsprechend 842 bp. Von der Wildtyp-Fragmentgröße abweichende Banden in 56.1d-Zellen weisen auf genomische Veränderungen hin.

Bei der Trennung der cDNA-Amplifikate aus 56.1d-Zellen waren 3 Banden zu erkennen. Eine davon entspricht vermutlich dem Wildtyp, eine zweite dem durch Deletion verkürzten Fragment. Das Zustandekommen der dritten Bande ist ungeklärt.

### Sequenzanalyse ausgehend von der RNA:

Die cDNA-Sequenzanalysen wurden mit den Primern P1A, C2 und B2 durchgeführt. Bei allen drei Sequenzierungen zeigte sich eine zweite Hintergrundsequenz (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Sequenz ergab die bereits oben beschriebene Deletion von Exon 2, wie sie auch in Zellen der Linien 56.1b und 56.1c nachweisbar war.

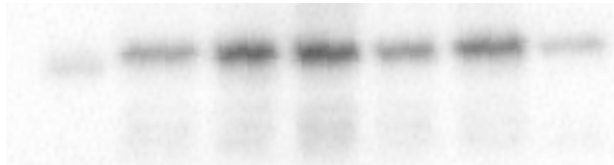
### Protein:

Von Zellen dieser Linie wurde kein Protein isoliert.

### 3.3 Western-Blot-Analysen

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse von Western-Blot-Analysen, die mit Proteinisolaten aus Zellen der verschiedenen Hepatomlinien durchgeführt wurden und der Strukturaufklärung des  $\beta$ -Catenin-Proteins dienten, zusammengefasst.

Pos.  
 Probe 70.4 70.4 HepF1 HepF1 66.3 66.3



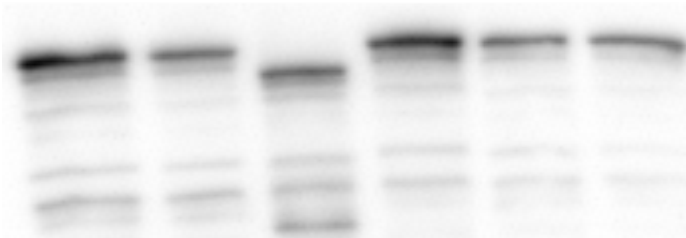
**Abb. 3.39:** Western-Blot-Analyse von Protein aus 66.3-, HepF1- und 70.4-Zellen. Der Blot wurde mit einem für  $\beta$ -Catenin spezifischen Antikörper gefärbt. Protein aus Mausleber wurde als „Positivkontrolle“ mit aufgetrennt. In allen Proben entsprach die Laufstrecke des  $\beta$ -Catenin-Proteins einem Protein von voller Länge.

66.3 70.4 A74.3 pW53-I 56.1c pW53-I



**Abb. 3.40:** Western-Blot-Analyse von Proteinisolaten aus 66.3-, 70.4-, 74.3a-, pW53-I- und 56.1c-Zellen. Zellen der ersten 3 Linien zeigten das  $\beta$ -Catenin-Protein in voller Länge. Bei 56.1c-Zellen war eine zweite Proteinbande kleinerer Größe zu erkennen, die vermutlich auf eine heterozygot angelegte Deletion eines der beiden *Catnb*-Allele zurückzuführen ist. Bei pW53-I-Zellen wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten (s. Spur 4 und 6 im Vergleich), wobei sich  $\beta$ -Catenin einmal in der Wildtyp-Länge, einmal als trunkiertes Protein zeigte.

53.4 53.4 pW53-I pW53-I 53.2d 53.2d



**Abb. 3.41:**  $\beta$ -Catenin in der Westen-Blot-Analyse mit Lysaten aus Zellen der Linien 53.4, pW53-I und 53.2d. Protein aus 53.4- und 53.2b-Zellen zeigte die volle Länge. Mit Protein aus Zellen der Linie pW53-I wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten (s. auch Legende zu Abb. 3.40).

### 3.4 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

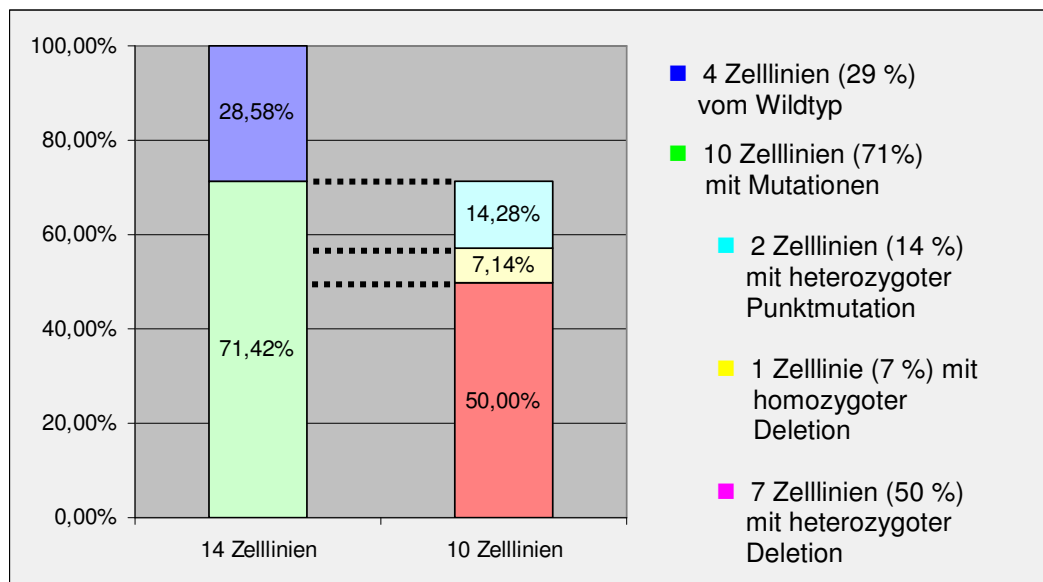
<u>Zell- linie</u>	<u>Isolier- datum</u>	<u>Amplifika- tion DNA Primer- kombina- tion</u>	<u>DNA Sequenz Primer</u>	<u>Amplifika- tion RNA Primerkom- bination</u>	<u>RNA Sequenz Primer</u>	<u>Bemerkungen</u>	<u>Western-Blot</u>
HepF1	21.02.2001	A1x +A2	P1, P2 → Heterozygote Punktmutation Exon 2 im Codon 45			Siehe dazu Kapitel 3.2.1	Volle Länge
	22.02.2001	A1x +A2	P1, P2 → Heterozygote Punktmutation Exon 2 im Codon 45	A1x +A2	P1A, C2 → Heterozygote Punktmut. Exon 2 im Codon 45 TCC → TTC		Volle Länge
74.3a	27.02.2001	P1A+A2	P1 → Deletion P2 → Inversion	A1x +A2 Heterozygote Deletion	A1x → Deletion P1A → Deletion C2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.2	
	06.03.2001	P1A+A2	P1 → Deletion P2 → Inversion	A1x +A2 Heterozygote Deletion	A1x → Deletion P1A → Deletion C2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.2	Volle Länge
53.4	29.03.2001	A1x +A2	P1 → Wildtyp	A1x +A2 Heterozygote Deletion	P1A → Deletion A1x → Deletion A2 → Deletion C2 → Wildtyp B2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.3	Volle Länge
	22.04.2004	A1x +A2	P1 → Wildtyp P2 → Deletion C2 → Wildtyp			Siehe dazu Kapitel 3.2.3	
FTO		A1x + B2	Heterozygote Pkt.mutation im Exon 2 Codon 33 TCT → TAT	P1A + B2	Heterozygote Pkt.mutation im Exon 2 Codon 33 TCT → TAT	Siehe dazu Kapitel 3.2.4	
MH1C1		A1x + B2	Wildtyp	P1A + B2	Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.5	
53.2b	22.02.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → Wildtyp	A1x + A2	A1x → Wildtyp C2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.6	Volle Länge
	22.04.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp	A1x + A2	C2 → Wildtyp B2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.6	Volle Länge
66.3	24.03.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → Wildtyp	A1x + A2	A1x → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.7	Volle Länge
	16.05.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → Wildtyp	A1x + A2	A1x → Wildtyp C2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.7	Volle Länge
70.4	27.02.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → Wildtyp	A1x + A2	P1A → Wildtyp C2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.8	Volle Länge
	06.03.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → Wildtyp	A1x + A2	C2 → Wildtyp	Siehe dazu Kapitel 3.2.8	Volle Länge

pW53-l	24.03.2001	A1x + A2	P1, P2 → homozygote Deletion von 12 bp	A1x + A2	A1x, C2 → homozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.9	unklar
	22.04.2001	A1x + A2	P1, P2 → homozygote Deletion von 12 bp	A1x + A2	B2 → homozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.9	Eine sichtbar verkürzte Proteinbande
55.1b	22.04.2001	A1x + A2	P1A, A1x, C2 → heterozygote Deletion von 354 bp			3 Banden: 4000 bp, Wildtyp und ca 1100 bp Siehe dazu Kapitel 3.2.10	
	24.03.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → Wildtyp C2 → heterozygote Deletion von 354 bp	A1x + A2	P1A, C2 → heterozygote Deletion von Exon 2	3 Banden Siehe dazu Kapitel 3.2.10	
55.1c	22.02.2001	A1x + A2	A1x, C2 → heterozygote Deletion 354 bp			Siehe dazu Kapitel 3.2.11	Eine verkürzte Bande sowie Bande bei voller Länge
	26.02.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → Wildtyp A1x → heterozygote Deletion von 354 bp			Siehe dazu Kapitel 3.2.11	
	xxxxxx			P1A + B2	P1A, B2 → Heterozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.11	
56.1b	22.02.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp A1x, P2 → heterozygote Deletion 199 bp	A1x + A2	A1x, B2, C2 → Heterozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.12	
	26.02.2004	A1x + A2	P1 → Wildtyp P2 → heterozygote Deletion 199 bp	A1x + A2	A1x, B2 → Heterozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.12	
56.1c	24.03.2001	A1x + A2	A1x → heterozygote Deletion 199 bp	A1x + A2	A1x, B2 → Heterozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.13	Eine verkürzte Bande sowie Bande bei voller Länge
	24.03.2001	A1x + A2	P2 → heterozygote Deletion 199 bp	A1x + A2	B2, C2 → Heterozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.13	Eine verkürzte Bande sowie Bande bei voller Länge
56.1d	06.03.2001	A1x + A2	A1x, P2 → heterozygote Deletion 199 bp			Siehe dazu Kapitel 3.2.14	
	16.05.2001	A1x + A2	P1 → Wildtyp	A1x + A2	P1A, B2, C2 → Heterozygote Deletion Exon 2	Siehe dazu Kapitel 3.2.14	

### 3.5 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es möglich, in 10 der 14 Zelllinien Mutationen auf DNA-Ebene nachzuweisen. Diese führten zur Veränderung in Struktur oder Sequenz der RNA und damit des Proteins. Bei 7 der Zelllinien war auf DNA-Ebene eine heterozygot angelegte Deletion im *Catnb*-Gen nachweisbar, die zu einer Verkürzung der RNA führte. In zwei Zelllinien war eine heterozygote Punktmutation auf DNA- und RNA-Ebene nachzuweisen. Eine Zelllinie wies eine homozygote Deletion auf DNA- und entsprechend auch auf RNA-Ebene auf. Im folgenden Diagramm (s. Abb. 3.42) sind die Ergebnisse zusammenfassend graphisch dargestellt.

Auf Proteinebene kann für 8 von 14 Zelllinien eine Aussage getroffen werden. Zellen dreier Linien, die bei Analyse der DNA und der RNA die *Catnb*-Wildtyp-Sequenz zeigten, exprimierten  $\beta$ -Catenin von voller Länge. Bei 2 der Zelllinien, die eine heterozygote Deletion auf DNA- und RNA-Ebene aufwiesen, war bei der Western-Blot Analyse des Proteins ein entsprechend verkürztes  $\beta$ -Catenin neben dem Wildtyp-Protein nachweisbar. 3 weitere Zelllinien wiesen größere heterozygote Deletionen auf DNA- und RNA-Ebene auf. Bei diesen wurde von dem durch die Deletion betroffenen Allel offenbar kein stabiles und damit bei der Western-Analyse kein nachweisbares Protein erzeugt. Bei den restlichen 6 Zelllinien war entweder keine Aussage auf Proteinebene möglich oder es wurde keine Western-Blot-Analyse durchgeführt.



**Abb. 3.42:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Mutationsanalyse im *Catnb*-Gen der verschiedenen Hepatomlinien.

## **4. Diskussion**

Mutationen im *CTNNB1*-Gen, das beim Menschen für das Onkoprotein  $\beta$ -Catenin kodiert, werden in etwa 30% der menschlichen hepatozellulären Karzinome beobachtet und treten besonders häufig auch in Hepatoblastomen auf (zu einer Zusammenfassung s. z.B. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>). Auch in experimentell erzeugten Lebertumoren der Maus sind Mutationen im *Catnb*-Gen häufig, welches das Maus-Orthologe zum menschlichen *CTNNB1*-Gen darstellt. Allerdings treten diese nur unter bestimmten Behandlungsbedingungen auf, insbesondere nach Gabe des Tumorpromotors Phenobarbital (Aydinlik *et al.*, 2001). Auch in menschlichen Hepatomlinien wurde vereinzelt über das Vorkommen von *CTNNB1*-Mutationen berichtet (s. z.B. de la Coste *et al.*, 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, systematisch in einer grossen Zahl unterschiedlicher Maushepatomlinien, die aus Vorarbeiten im Labor zur Verfügung standen, nach Aberrationen im *Catnb*-Gen zu suchen und diese molekular zu charakterisieren. Hierbei war geplant, die Analysen soweit möglich auf der Ebene der DNA, der RNA und der Proteinebene durchzuführen.

### **4.1 Methodische Aspekte**

Prinzipiell ist es möglich, DNA, RNA und Protein in einer gemeinsamen Aufarbeitungsprozedur zu gewinnen. Hierzu kann eine Isolierung mittels Trizol-Reagenz eingesetzt werden. Nach dieser Methode ist es theoretisch möglich, alle drei Makromoleküle nacheinander durch Ausfällung mit entsprechenden Medien zu trennen. In der Praxis zeigen sich jedoch bereits bei der initialen Trennung Schwierigkeiten, die sich auf die nachfolgenden Arbeitsschritte wie z.B. Konzentrationsbestimmungen und Amplifikation über PCR fortsetzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Zell-Aufschlussverfahren mit Trizol-Reagenz eingesetzt. Unter der Einwirkung von Trizol-Reagens wird die Aktivität von Nukleasen und anderen Enzymen gehemmt. Die inhibitorische Wirkung auf die enzymatische Aktivität wirkt sich allerdings störend auf die Aktivität von Polymerasen aus, die zum Umschreiben der RNA in cDNA bzw. bei der Amplifikation der DNA über PCR zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund muss Trizol möglichst quantitativ aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Trizol ist rosafarben. Aufgrund der in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen war eine vollständige Entfernung von Trizol aus den Gemischen und Lösungen nicht möglich, was direkt an der nach wie vor vorhandenen

Rosatönung der Proben erkennbar war. Trizolreste hatten zunächst zur Folge, dass die Makromoleküle nicht vollständig lösbar waren. Dies führte dazu, dass sich insbesondere bei der Konzentrationsbestimmung von RNA und Protein bei Mehrfachmessungen deutlich unterschiedliche Werte ergaben. Aus diesem Grund konnten bei der RNA-Umschreibung und bei Einsatz von Protein in Western-Blot-Analysen nur näherungsweise gleiche Mengen eingesetzt werden. Häufig waren mehrmalige Umschreibungsversuche von RNA in DNA notwendig. Bei der DNA-Amplifikation wirkte Trizol ebenfalls störend, so dass mehrmalige Amplifikationsversuche erforderlich waren. Zur Umgehung dieses Problems wurden verdünntere Lösungen eingesetzt, um die Trizol-Konzentrationen niedrig zu halten. Zum Ausgleich wurde die Zahl der Amplifikationszyklen erhöht, was dann allerdings zur Folge hatte, dass verstärkt unspezifische Nebensequenzen amplifiziert wurden.

Bei der Analyse im Western-Blot waren aufgrund der Schwierigkeiten bei der Protein-Konzentrationsbestimmung keine quantitativen Aussagen zum  $\beta$ -Catenin möglich. Auch hier gab es darüber hinaus das Problem unspezifischer Nebenbanden. Bei der alternativ eingesetzten Isolierungsmethode mittels Ripa-Puffer trat dieser Effekt dagegen nicht auf. Die Erfahrung dieser Arbeit zeigte, dass es sinnvoller ist, Protein und Nukleinsäuren getrennt zu isolieren. Die in einer konfluent gewachsenen Kulturschale von 10 cm Durchmesser vorhandene Zellmenge war in jedem Fall ausreichend, um nach herkömmlicher Methodik DNA, RNA und Protein getrennt zu isolieren.

#### **4.2 Bedeutung von aktivierenden Mutationen im *CTNNB1/Catnb*-Gen**

Fehlregulationen im Wnt/ $\beta$ -Catenin/TCF-Signalweg (Wnt/Wg-Signalweg) spielen bei der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle (zur Übersicht s. Polakis, 2000).  $\beta$ -Catenin ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, gemeinsam mit TCF/Lef1-Molekülen als Transkriptionsfaktor wirksam. Unter seiner transkriptionellen Kontrolle stehen eine Vielzahl von Genen, die potentiell bei der Kanzerogenese bedeutsam sein könnten, so z.B. die Proto-Onkogene Cyclin D1 und c-Myc. Störungen im Signalweg sind häufig auf eine Abbauhemmung des Proteins zurück zu führen:  $\beta$ -Catenin wird nach Polyubiquitinierung proteasomal abgebaut. Hierzu ist zuvor die Phosphorylierung des Proteins an 4 konservativen Serin/Threonin-Resten erforderlich, welche durch die Caseinkinase  $1\alpha/\beta$  (als primer-Kinase) sowie die Glykogensynthase Kinase  $3\beta$  (GSK3) vermittelt wird. Die Phosphorylierungsreaktion erfordert die vorherige Bildung eines Multi-Proteinkomplexes bestehend aus den Proteinen APC, Axin oder Axin2 und der

GSK3 (zur Übersicht s. Behrens, 2000). Alle genannten Proteine können in Tumoren durch Mutation der entsprechenden Gene in ihrer Funktion verändert sein. Besonders häufig sind APC-Mutationen in kolorektalen Tumoren. *CTNNB1*-Mutationen und inaktivierende *axin*-Mutationen treten häufig in HCCs auf. Die Mutationen im menschlichen *CTNNB1*-Gen betreffen die N-terminal lokalisierten konservierten Phosphorylierungsstellen. Besonders häufig sind partielle Gendeletionen. In HCCs sind darüber hinaus Punktmutationen an verschiedenen Stellen des Proteins zu finden, welche häufig auch die Aminosäure Serin<sub>45</sub> betreffen (zu Übersicht s. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>).

Mutationen im Maus-orthologen *Catnb*-Gen sind auch in experimentell erzeugten Lebertumoren häufig (s. z.B. de La Coste *et al.*, 1998; Devereux *et al.*, 1999). In vorausgegangenen Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten wir nachweisen, dass *Catnb*-Mutationen in Lebertumoren von Mäusen besonders dann häufig auftreten, wenn die Tiere während der Promotionsphase der Kanzerogenese mit dem Modell-Tumorpromotor Phenobarbital behandelt werden (Aydinlik *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse wurden kürzlich durch eine Arbeit einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Calvisi *et al.*, 2004). Mäuse, bei denen Lebertumoren ohne eine Behandlung mit Phenobarbital induziert wurden, zeigten keine *Catnb*-Mutationen, dagegen häufig Mutationen im *Ha-ras*-Onkogen. Dieser Befund ist für die vorliegende Arbeit insofern von Bedeutung, als die verschiedenen Zelllinien, die in der Arbeit untersucht wurden, von Lebertumoren aus Mäusen etabliert wurden, die nur mit dem Leberkanzerogen Diethylnitrosamin, nicht jedoch mit Phenobarbital behandelt waren (Kress *et al.*, 1992). Im Jahre 1992 war noch nicht bekannt, dass  $\beta$ -Catenin bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen könnte. Deshalb wurden die damals erzeugten Tumoren nicht bezüglich des Auftretens von *Catnb*-Mutation analysiert. Es muss allerdings aufgrund der heute zur Verfügung stehenden Daten davon ausgegangen werden, dass die überwiegende Zahl der Tumoren, wenn nicht gar alle, und die daraus abgeleiteten primären Hepatomzellen in Kultur frei von aktivierenden Mutationen im *Catnb*-Gen waren.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit insgesamt 12 der 1992 von Kress *et al.* etablierten Maus-Hepatomlinien durchgeführt. Zellen von drei der Linien (56.1b, 56.1d und 70.4) trugen Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen. Darüber hinaus wurden zwei Hepatomlinien, die aus Lebertumoren der Ratte abgeleitet waren, mit in die Untersuchung aufgenommen. Mutationen im *Catnb*-Gen werden im Prinzip auf der Ebene der DNA nachgewiesen, haben jedoch Auswirkungen auf die Struktur der RNA und unter Umständen auch auf die Struktur des Proteins, die ebenfalls nachgewiesen



werden können. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit das *Catnb*-Gen selbst, die davon abgeleitete RNA sowie das von dieser abgeleitete  $\beta$ -Catenin-Protein bezüglich des Vorkommens von Aberrationen analysiert. Hierbei konnten in etwa 60% der Zelllinien (8/14) Deletionen im *Catnb*-Gen nachgewiesen werden, die zu einer aminoterminalen Trunkation des Proteins führten und die wichtigen, hochkonservierten Caseinkinase- und GSK3-Phosphorylierungsstellen eliminierten. Darüber hinaus waren in etwa 15% der Zelllinien (2/14) Punktmutationen im *Catnb*-Gen nachweisbar, wobei eine der Punktmutationen zu einem Aminosäuretausch in dem für die Phosphorylierung durch die „primer“ Caseinkinase II wichtigen Serin<sub>45</sub> führte. Insgesamt zeigten demnach 10 der 14 untersuchten Linien (etwa 70%) Aberrationen im *Catnb*-Gen, die vermutlich zur Dysregulation der von  $\beta$ -Catenin regulierten Signalwege führen.

Diese Befunde sind in verschiedener Hinsicht interessant und diskussionswürdig. Zunächst lässt sich festhalten, dass die Mutationen im *Catnb*-Gen in den verschiedenen Zelllinien mit grosser Sicherheit erst während der Kultivierung *in vitro* entstanden sind. Das bedeutet aber auch, dass *Catnb*-Mutationen, die zur Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Proteins führen, Hepatomzellen in der Kultur einen Selektionsvorteil verschaffen, der dazu führt, dass die durch Mutation veränderte Zelle sich klonal vermehrt und während der nachfolgenden Passagierung nicht-mutierte Zellen aus der Kultur verdrängt. Denkbar wäre z.B., dass die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin bei Hepatomzellen *in vitro* eine Verkürzung der Zellzykluszeit, eine Beschleunigung des Anheftens an das Substrat nach Ausplattieren der Zellen oder eine Verminderung der Apoptoseraten bedingt. Offensichtlich ist dieser Selektionsvorteil aber für Nager-Hepatomzellen *in vivo* nicht gegeben, zumindest nicht in Abwesenheit des Tumorpromotors Phenobarbital. Der Grund für dieses unterschiedliche *in vitro* und *in vivo* Verhalten der Zellen ist nicht bekannt. Denkbar wäre z.B., dass *Catnb*-Mutationen *in vivo* „toxisch“ für Hepatomzellen sind. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Proto-Onkogenen in Tumorstufen (erstmalig gezeigt für aktiviertes Ras) zur Aktivierung eines zellulären Abwehrprogramms führt, welches Zellzyklusarrest und die Induktion eines zellulären Seneszenzprogramms, eventuell auch die Induktion von Apoptose, bedingt. Beteiligt sind u. a. die Proteine E2F, p16/p19ARF, Mdm2, p53 und p21 (s. z.B. Palmero *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1997). Ebenso ist bekannt, dass die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin durch Mutation des Gens den p16/p19ARF/Mdm2/p53-*checkpoint* zu aktivieren vermag (Damalas *et al.*, 2001). Dies könnte z.B. erklären, weshalb *CTNNB1*-Mutationen beim Menschen erst in Adenomen, nicht dagegen in frühen fokalen hepatozellulären Hyperplasien auftreten, in denen p53 noch nicht durch Mutation inaktiviert ist (Chen *et al.*, 2002). Dies würde auch erklären, weshalb *CTNNB1*-Mutationen in menschlichen

HCCs häufig gepaart mit p53-Mutationen auftreten (Levy *et al.*, 2002; Tannapfel *et al.*, 2002; Pranke *et al.*, 2003; Edamoto *et al.*, 2003).

Unter der oben geschilderten Annahme, dass die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin in Maus-Hepatozyten *in vivo* „toxisch“ sein könnte und zur Elimination der *Catnb*-mutierten Hepatomzellen führen würde, könnte die Wirkung von Phenobarbital darin bestehen, diesen negativen Selektionsdruck zu unterdrücken und so die klonale Vermehrung der mutierten Zellen zu erlauben. In der Tat ist z.B. bekannt, dass Phenobarbital bei Hepatomzellen *in vitro* und *in vivo* stark anti-apoptotische Wirkung zeigt, die ein Überleben von *Catnb*-mutierten Hepatozyten während der Promotionsphase erlauben könnte (Buchmann *et al.*, 1999; Bursch *et al.*, 1984; Schulte-Hermann *et al.*, 1990). In Weiterführung dieser Überlegung wären die „Umweltbedingungen“ für Hepatomzellen bei der *in vitro* Kultur, in analoger Weise wie bei der Behandlung der Zellen mit Phenobarbital *in vivo* geeignet, den Zellen optimale Wachstums- und Überlebenschancen zu garantieren; der *in vivo* vorliegende (und durch Phenobarbital ausgeschaltete) *checkpoint* würde *in vitro*, vermutlich durch Komponenten aus dem Serum, unterdrückt.

Das Auftreten mutierter Populationen ist demnach, wie oben beschrieben, zum einen von der Mutationshäufigkeit, zum anderen von dem durch die Umwelt der mutierten Zellen gegebenen Selektionsdruck bestimmt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die sehr unterschiedliche Frequenz von *CTNNB1*-Mutationen in menschlichen HCCs unterschiedlicher Genese: HBV-assoziierte HCCs sind sehr selten *CTNNB1*-mutiert; offensichtlich bringt die Mutation unter den Bedingungen der durch HBV induzierten Hepatitiden keinen Selektionsvorteil. Ganz anders bei den HCV-assoziierten HCCs, die häufig Mutationen im *CTNNB1*-Gen zeigen. Hier scheint die Aktivierung der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalwege Proliferations- oder sonstige Vorteile zu bringen (Laurent-Puig *et al.*, 2001).

HCCs, deren Entstehung durch eine chronische HCV-induzierte Hepatitis promoviert wird, zeigen eine Aktivierung von  $\beta$ -Catenin ebenso wie Mauslebertumoren, die unter der Promotionswirkung von Phenobarbital entstanden. Im experimentellen System ist dieser Prozess zumindest zum Teil reversibel; Absetzen der Behandlung mit Phenobarbital führt zur Regression der Mehrzahl der Leberläsionen (Dragan *et al.*, 1993). Theoretisch wäre somit bei HCV-assoziierten Tumoren eine Unterbrechung des durch die Virus-Infektion gegebenen chronischen Stimulus die vermutlich beste Therapieoption.

### **4.3 Phänotyp *CTNNB1/Catnb*-mutierter Hepatomzellen**

Transgene Mäuse mit aktiviertem  $\beta$ -Catenin zeigen eine ausgeprägte Hepatomegalie. Dies ist auf eine stark gesteigerte Proliferation der Hepatozyten bei unveränderter Apoptoserate zurückzuführen (Cadoret *et al.*, 2001). Mäuse mit konstitutiver Expression des Transgens versterben in den ersten Wochen nach der Geburt, so dass weder Tumoren noch präneoplastisch veränderte Läsionen beobachtet werden können. Allerdings traten auch in transgenen Mäusen mit einer konditional exprimierten *Catnb*-Mutante keine spontanen präneoplastisch veränderten Hepatozyten auf (Harada *et al.*, 2002). Offensichtlich reicht die *Catnb*-Deletionsmutante alleine nicht zur Ausbildung stabiler transformierter Klone in der Mausleber aus. Im Vergleich dazu entwickelten Mäuse mit gleichzeitiger transgener Expression von aktiviertem *Ha-ras* und aktiviertem *Catnb* innerhalb kurzer Zeit maligne Lebertumoren (Harada *et al.*, 2002).

In zahlreichen Studien wurde mittels globaler Genexpressionsanalyse versucht, den Phänotyp menschlicher HCCs mit ihren pathologischen bzw. virologischen Eigenschaften zu korrelieren (Delpuech *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde gezielt die Expressionsänderung von Genen analysiert, die für bestimmte Markerenzyme oder andere Markerproteine kodieren. Eines davon ist die Glutamin-Synthetase. Dieses Enzym ist in *CTNNB1*-mutierten menschlichen HCCs und in *Catnb*-mutierten Mauslebertumoren überexprimiert (Cadoret *et al.*, 2002; Loeppen *et al.*, 2002). Glutamin-Synthetase-positive, *Catnb*-mutierte Mauslebertumoren zeigen darüber hinaus eine erhöhte Expression verschiedener Cytochrom P450-Isoformen (Loeppen *et al.*, 2004). In parallel hierzu im Labor durchgeführten Untersuchungen zur Expression der Glutamin-Synthetase konnte Alexander Sturzu (Diplomarbeit, 2004) nachweisen, dass die Expression des Enzyms in den in der vorliegenden Arbeit molekular charakterisierten Hepatomlinien gut mit deren *Catnb*-Mutationsstatus korreliert. Linien mit durch Mutation aktiviertem  $\beta$ -Catenin zeigten starke Glutamin-Synthetase-Expression im Gegensatz zur Linien mit Wildtyp-*Catnb*-Gen. Die Glutamin-Synthetase kann demnach als Marker für das Vorliegen einer *Catnb/CTNNB1*-Mutation dienen, was diagnostisch von Bedeutung sein könnte.

## **5. Zusammenfassung**

Das Protein  $\beta$ -Catenin hat zwei wichtige Aufgaben in der Zelle: Zum einen ist es gemeinsam mit Cadherinen an der physikalischen Verankerung benachbarter Zellen beteiligt, zum anderen wirkt es als Transkriptionsfaktor im Zellkern. Zahlreiche Studien belegen seine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung; Darüber hinaus ist es auch im adulten Organismus an der Steuerung von Zellteilung und – differenzierung beteiligt. Das *CTNNB1*-Gen, das beim Menschen für  $\beta$ -Catenin kodiert, ist in etwa 30% der menschlichen hepatozellulären Karzinome durch Mutation verändert; Besonders häufig sind Mutationen in Hepatoblastomen. Mutationen treten auch in experimentell erzeugten Tumoren auf. In Lebertumoren von Mäusen, die mit dem Modell-Tumorpromotor Phenobarbital (PB) behandelt worden waren, waren in etwa 80% der Fälle Mutationen im *Catnb*-Gen, dem Maus-Orthologen des *CTNNB1*-Gens, nachzuweisen. Dagegen zeigten Hepatome aus Tieren ohne PB-Behandlung keine *Catnb*-Mutationen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Hepatomlinien aus Mäusen und Ratten analysiert, die z. T. im Labor etabliert worden waren oder aus anderen Quellen zur Verfügung standen. Keine der Linien stammte aus einem Tumor eines mit PB behandelten Tieres. Ziel der Arbeit war, die verschiedenen Linien bezüglich ihres *Catnb*-Mutationsstatus molekulargenetisch zu charakterisieren. Die Analysen erfolgten auf der Ebene der DNA, der RNA und auf der Proteinebene. Insgesamt wurden 14 Linien untersucht. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die überwiegende Zahl der untersuchten Linien (10/14) zeigten Aberrationen im *Catnb*-Gen, die in der Regel auf der RNA-Ebene bestätigt werden konnten und häufig Auswirkungen auf das Laufverhalten des Proteins bei der gelelektrophoretischen Trennung hatten.
- Der in den Zelllinien beobachtete Typ der Aberrationen unterscheidet sich gravierend von jenen Mutationsmustern, die in den Tumoren selbst beobachtet werden. Häufig traten Deletionen im Gen auf, die zu einer partiellen Verkürzung des Proteins im aminoterminalen Bereich führten. In den Primärtumoren der Maus wurden dagegen ausschließlich Punktmutationen beobachtet.

Die Daten weisen darauf hin, dass die Mutationen im *Catnb*-Gen erst während der Kultivierung der Linien *in vitro* entstanden sind und den mutierten Zellen dort einen Selektionsvorteil verschaffen. Hier besteht vermutlich eine Analogie zum Selektionsdruck einer *in vivo* PB-Behandlung.

## 6. Literaturverzeichnis

- Eigene Arbeiten der Gruppe  
Siehe Referenz Nr. 2, 4, 6, 7, 33, 38, 39, 57, 61
- Zelllinien  
Siehe Referenz Nr. 33

### β-Catenin-Übersichtsartikel:

- **Willert, K., and Nusse, R.**  
β-Catenin: a key mediator of Wnt Signaling. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 8: 95-102, 1998.
- **Morin, P.J.**  
β-Catenin signaling and cancer. *BioEssays*, 21: 1021-1030, 1999.
- **Polakis, P.**  
Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851.

### In der Arbeit zitierte Referenzen (fortlaufend)

1. **Adami Ho, Hsing AW, McLaughlin Jk, Trichopoulos D, Hacker D, Ekbohm A, Persson I.**  
Alcoholism and liver cirrhosis in the etiology of primary liver cancer. *Int J Cancer*. 1992 Jul 30;51(6):898-902.
2. **Aydinlik, H., Nguyen, T. D., Moennikes, O., Buchmann, A., and Schwarz, M.**  
Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of β-catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene*, 20: 7812-7816, 2001.
3. **Barker, Nick, Morin, Patice J., and Clevers Hans.**  
The Yin-Yang of TCF/β- Catenin Signaling. *Advances in CANCER RESEARCH* 0065-230X/00.
4. **Bauer-Hofmann, R., Klimek, F., Buchmann, A., Muller, O., Bannasch, P. and Schwarz, M.**  
(1992) Role of mutations at codon 61 of the c-Ha-ras gene during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in C3H/He mice. *Mol Carcinog*, 6, 60-7.
5. **Blum CA., Tanaka T., Zhong X., Li Q, Dashwood WM., Pereira C., Xu M., Dashwood RH.**  
Mutational analysis of *CTNNB1* and *Apc* in tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3methylimidazo[4,5-f]quinoline: mutational 'hot-spots' and the relative expression of β-catenin and c-jun. *Mol Carcinog*. 2003 Apr;36(4):195-203.
6. **Buchmann A., Willy C., Buenemann CL., Stroh C., Schmiechen A., Schwarz M.**

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.* 1999 Feb;6(2):190-200.

7. **Buchmann, A., Bauer-Hofmann, R., Mahr, J., Drinkwater, N.R., Luz, A. and Schwarz M.**  
(1991) Mutational activation of the c-Ha-ras gene in liver tumors of different rodent strains: correlation with susceptibility to hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 911-911.
8. **Buenidia, M. A.**  
Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: Common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol*, 39: 530-535, 2002.
9. **Bursch, W., Lauer, B., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Schuppler, J. and Schulte-Hermann, R.**  
(1984) Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis*, 5, 453-8.
10. **Cadoret, A., Ovejero, C., Saadi-Kheddouci, S., Souil, E., Fabre, M., Romagnolo, B., Kahn, A., and Perret, C.**  
Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of  $\beta$ -catenin. *Cancer res*, 61: 3245-3249, 2001.
11. **Calvisi, D.F., Ladu, S., Factor, V.M. and Thorgeirsson, S.S. (2004)**  
Activation of  $\beta$ -catenin provides proliferative and invasive advantages in c-myc/TGF- $\alpha$  hepatocarcinogenesis promoted by Phenobarbital. *Carcinogenesis*, 25, 901-8.
12. **Calvisi, D. F., Factor, V M., Loi, R., and Thorgeirsson, S. S.**  
(2001) Activation of  $\beta$ -catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res*, 61: 2085-2091.
13. **Carruba, G., Cervello, M., Miceli, M. D., Farruggio, R., Notarbartolo, M., Virruso, L., Giannitrapani L., Gambino, R., Montalto, G., and Castagnetta L.**  
Truncated form of  $\beta$ -catenin and reduced expression of wild-type catenins feature HepG2 human liver cancer cells. *Ann NY Acad Sci*, 886:212-216, 1999.
14. **Chen YW., Jeng YM., Yeh SH., and Chen PJ.**  
p53 gene and Wnt signaling in benign neoplasms:  $\beta$ -catenin mutations in hepatic adenoma but not in focal nodular hyperplasia. *Hepatology*, 2002 Oct;36(4 Pt 1):927-35.
15. **Clevers, Hans.**  
Axin and hepatocellular carcinomas. *Nature genetics*, volume 24, March 2000.
16. **Coi, J., Zhou, X., Liu, Y., and Tang, Z.**  
Mutation and overexpression of the  $\beta$ -catenin gene may play an important role in primary hepatocellular carcinoma among Chinese people. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127: 577-581, 2001.

17. **Damalas, A., Kahan, S., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. and Oren, M.**  
(2001) Deregulated  $\beta$ -catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *Embo J*, **20**, 4912-22.
18. **De La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., and Perret, C.**  
Somatic mutations of the  $\beta$ -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 8847-8851, 1998.
19. **Delpuech, O., Trabut, J. B., Carnot, F., Feuillard, J., Brechot, C., and Kremsdorf, D.**  
Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **21**: 2926-2937, 2002.
20. **Devereux, T.R., Anna, C.H., Foley, F.F., White, C.M., Sills, R.C. and Barrett, J.C.**  
(1999) Mutation of  $\beta$ -catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene*, **18**, 4726-33.
21. **Devereux, T. R., Stern, M. C., Flake, G. P., Yu, M. C., Zhang, Z. Q., London, S. J., and Taylor, J. A.**  
*CTNNB1* mutations and  $\beta$ -catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog*, **31**: 68-73, 2001.
22. **Dragan, Y.P., Sargent, L., Xu, Y.D., Xu, Y.H. and Pitot, H.C.**  
(1993) The initiation-promotion-progression model of rat hepatocarcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, **202**, 16-24.
23. **Edamoto Y., Hara A., Biernat W., Terrecciano L., Cathomas G., Riehle HM., Matsuda M., Fukii H., Scoazec JY., and Ohgaki H.**  
Alternation of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, Hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer*. 2003 Sep 1; **106**(3):334-41.
24. **Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990)**  
A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
25. **Harada, N., Miyoshi, H., Murai, N., Oshima, H., Tamai, Y., Oshima, M. and Taketo, M.M.**  
(2002) Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of  $\beta$ -catenin. *Cancer Res*, **62**, 1971-7.
26. **Harada, N., Oshima, H., Katoh, M., Tamai, Y., Oshima, M. and Taketo, M.M.**  
(2004) Hepatocarcinogenesis in mice with  $\beta$ -catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res*, **64**, 48-54.

27. **Hendrich, S., Glauert, H.P. and Pitot, HC.**  
(1986) The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital. *Carcinogenesis*, 7, 2041-5.
28. **Hsu, H.C., Jeng, Y.M., Mao, T.L., Chu, J.S., Lai, P.L. and Peng, S.Y.**  
(2000)  $\beta$ -catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol*, 157, 763-770.
29. **Huang, H., Fujii, H., Sankila, A., Mahler-Araujo, B.M., Matsuda, M., Cathomas, G. and Ohgaki, H.**  
(1999)  $\beta$ -catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol*, 155, 1795-1801.
30. **Inagawa, S., Itabashi, M., Adachi, S., Kawamoto, T., Hori, M., Shimazaki, J., Yoshimi, F., and Fukao, K.**  
Expression and prognostic roles of  $\beta$ -catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression postoperative survival. *Clin Cancer Res*, 8: 450-456, 2002.
31. **Ishiguro H., Tsunoda T., Tanaka T., Fujii Y., Nakamura Y., and Furukawa Y.**  
Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. *Oncogene*, 2001 Aug 16;20(36):5062-6.
32. **Kim K, Pang KM, Evans M, and Hay ED.**  
Overexpression of  $\beta$ -catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol. Biol. Cell*, 11:3509-3523.
33. **Kress, S., K nig, J., Schweizer, J., Loehrke, H., Bauer-Hofmann, R., and Schwarz, M.**  
P53 mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors. *Molec. Carcinogenesis*, 6: 148-158, 1992.
34. **Kolaja, K.L., Stevenson, D.E., Walborg, E.F., Jr. and Klaunig, J.E.**  
(1996) Reversibility of promoter induced hepatic focal lesion growth in mice. *Carcinogenesis*, 17, 1403-9.
35. **Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Boiulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J.**  
Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 120.: 1763-1773, 2001.
36. **LaVecchia C., Lucchini F., Franchschi S., Negri E., Levi F.**  
Trends in mortality from primary liver cancer in Europe. *Eur J Cancer*. 2000 May; 36(7):909-15.
37. **Levy, L., Renard, C. A., Wie, Y., and Buendia, M. A.**  
Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, 963: 21-36, 2002.



38. **Loeppen S, Koehle C, Buchmann A, Schwarz M.**  
A  $\beta$ -catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors. *Carcinogenesis*, 26, 239-248, October 2004.
39. **Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Kurek, R., Buchmann, A., and Schwarz, M.**  
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, 2002.
40. **Maronpot, R.R., Fox, T., Malarkey, D.E. and Goldsworthy, T.L.**  
(1995) Mutations in the ras proto-oncogene: Clues to etiology and molecular pathogenesis of mouse liver tumors. *Toxicology*, 101, 125-156.
41. **Moolgavkar SH, and Knudson AG Jr**  
Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *Natl Cancer Inst*. 1981 Jun; 66(6): 1037-52.
42. **Moolgavkar SH.**  
Model for human carcinogenesis: action of environmental agents. *Environ Health Perspect*. 1983 Apr;50:285-91.
43. **Murata, M., Miyoshi, Y., Ohsawa, M., Shibata, K., Ohta, T., Imai, Y., Nishikawa, M., Iwao, K., Tateishi, H., Shimano, T., Kobayashi, T., and Nakamura, Y.**  
Accumulation of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm and the nuclei during the early hepatic tumorigenesis. *Hepatol res*, 21: 126-135, 2001.
44. **Newmann, M.E.**  
(1991) Worldwide immunization program targets hepatitis B and liver cancer. *J Natl Cancer Inst*, 83, 666-8.
45. **Ogawa, K., Yamada, Y., Kishibe, K., Ishizaki, K. and Tokusashi, Y.**  
(1999)  $\beta$ -catenin mutations are frequent in hepatocellular carcinomas but absent in adenomas induced by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Cancer Res*, 59, 1830-3.
46. **Palmero, I., Pantoja, C. and Serrano, M.**  
(1998) p19arf links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, 395, 125-126.
47. **Park WS, Oh RR, Park JY., Kim PJ, Shin MS, Lee JH, Kim HS., Lee SH, Kim SY., Park YG, An WG., Kim HS., Jang JJ., Yoo NJ. and Lee JY.**  
Nuclear localization of  $\beta$ -catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. *J Pathol*. 2001 Apr;193(4):483-90.
48. **Pitot, H.C.**  
(1990) Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990, 30, 465-500.
49. **Prange, W., Breuhahn, K., Fischer, F., Zilkens, C., Pietsch, T., Petmecky, K., Eilers, R., Dienes, H.P. and Schirmacher, P.**

- (2003)  $\beta$ -catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes. *J Pathol*, **201**, 250-9.
50. **Renard, C.A., Fourel, G., Bralet, M.P., Degott, C., De la Coste, A., Perret, C., Tiollais and Buendia, M.A.**  
(2000) Hepatocellular carcinoma in WHV/N-myc2 transgenic mice: oncogenic mutations of beta-catenin and synergistic effect of p53 null alleles. *Oncogene*, **19**, 2678-2686.
51. **Sarcci R. and Repetto F.**  
Time trends of primary liver cancer: indication of increased incidence in selected cancer registry populations. *J Natl Cancer Ins.* 1980 Aug;65(2):241-7.
52. **Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y. and Nakamura, Y.**  
(2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*, **24**, 245-50.
53. **Schulte-Hermann R.**  
Tumor promotion in the liver. *Arch Toxicol.* 1985 Aug;57(3):147-58
54. **Schulte-Hermann R., Bursch W., Grasl-Kraupp B.**  
Relevance of apoptosis for carcinogenesis. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1994; **78**: 15-
55. **Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., L, M.I. and Ruttkay-Nedecky, B.**  
(1995) Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. *Mutation Research*, **333**, 81-87.
56. **Schulte-Hermann, R., Timmermann Trosiener, I., Barthel, G. and Bursch, W.**  
(1990) DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res*, **50**, 5127-35.
57. **Schwarz, M., Buchmann, A., Bauer-Hofmann, R. and Mahr, J.**  
(1991) Molecular genetic analysis of preneoplastic and neoplastic liver lesions in the mouse. *Prog Histochem Cytochem*, **23**, 107-14.
58. **Seiji S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y., and Nakamura, Y.**  
AXIN mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*, **24**: 245-250, 2000.
59. **Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W.**

- (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.
60. **Siegfried E. and Perrimon N.**  
Drosophila wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling. *Bioessays*. 1994 Jun;16(6):395-404.
61. **Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bocj, K.W. and Schwarz, M.**  
(1995) Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis*, *16*, 1271-5.
62. **Tanaka, S., Sugimachi, K., Maehara, S., Harimoto, N., Shirabe, K., and Wands, J. R.**  
Oncogenic signal transduction and therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma. *Surgery*, *131*: s142-147, 2002.
63. **Takahashi M., Tsunoda T., Seiki M., Nakamura Y. and Furukawa Y.**  
Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene*, 2002 Aug 29;21(38):5861-7.
64. **Tannapfel A. and Wittekind C.**  
Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch*. 2002 Apr;440(4):345-52. Epub 2002 Mar 06.
65. **Taniguchi, K., roberts, L. R., Aderca, I. N., Dong, X., Qian, C., Murphy, L. M., Nagorney, D. M., Burgart, L. J., roche, P. C., Smith, D. I., Ross, J. A., and Liu, W.**  
Mutational spectrum of  $\beta$ -catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, *21*: 4863-4871, 2002.
66. **Trosko JE and Ruch RJ.**  
Cell-cell communication in carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*, *3*:208-236 1998.
67. **Trosko, J.E. and Goodman J.A.**  
Intercellular communication may facilitate apoptosis. Implications for tumor promotion. *Molec. Carcinog.*, *11*:8-11 1994
68. **Udatsu, Y., Kusafuka, T., Kuroda, S., Miao, J., and Okada, A.**  
High frequency of  $\beta$ -catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int*, *17*: 508-512, 2001.
69. **Valladares Alvarez G.**  
Risk factors for the progression of chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Peru*. 2003 Apr-Jun;23(2):126-33.
70. **Wei, Y., Van Nhieu, J. T., Prigent, S., Strivatanakul, P., Tiollais, P., and Buendia, M. A.**

Altered expression of E-cadherin in hepatocellular carcinoma: correlations with genetic alterations,  $\beta$ -catenin expression, and clinical features. *Hepatology*, 36: 693-701, 2002.

71. **Woawa K., Nakanishi H., Takeshita F., Futakuchi M., Asamoto M., Imaida K., Tatematsu M. and Shirai T.**

Establishment of rat hepatocellular carcinoma cell lines with differing metastatic potential in nude mice. *Int J Cancer*. 2001 Mar 15;91(6):797-802.

72. **Wong, C. M., Fan, S. T., and Ng, I. O.**

(2001)  $\beta$ -Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*, 92: 136-145.

73. **Yamamoto, A., Sakamoto, M., Fujii, G., Tsuiji, H., Keneteka, K., Asaka, M., and Hirohashi, S.**

Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with  $\beta$ -catenin mutations. *Hepatology*, 37: 528-533, 2003.

## 7. Danksagung

Für die Unterstützung bei dieser Arbeit möchte ich mich bei den folgenden Personen herzlichst bedanken.

Mein Dank geht vor allem an Herrn **Prof. Schwarz** für die Vertretung dieser Arbeit vor der „*Medizinischen Fakultät*“, für die Vergabe des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Materialien und für die einmalige Chance, in seinem Team arbeiten zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt seiner Unterstützung bei der Niederschrift dieser Dissertation und seiner freundlichen, aufmunternden sowie positiven Einstellung. Hierdurch war es mir möglich, diese Arbeit zum Abschluss zu führen.

Herrn **Dr. Wulbrand** danke ich für die Einführung in diese Thematik, sowie für die Hilfestellung bei der Einarbeitung in die Welt der Zellkultur und Mutationsanalytik. Durch seine Hilfe und Unterstützung wurden die Grundsteine dieser Arbeit gelegt.

Es ist mir ein grosses Anliegen, mich bei **Dr. Buchmann** zu bedanken. Seine immer freundliche, angenehme und kompetente Art bei der Auswertung trugen zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit bei. Seine geduldvolle Unterstützung bei den äußerst komplex und unendlich erscheinenden Sequenzanalysen haben zum Gelingen dieser Arbeit geführt.

Bei Frau **Johanna Mahr** möchte ich mich für ihre großen Bemühungen und Ratschläge bei der Amplifikationstechnik und für ihre stets gute Laune bedanken. Die Bereitstellung von Reagenzien auch außerhalb der Laborzeiten ermöglichten es mir, effizient zu arbeiten.

Ein Dank geht ebenso an Frau **Elke Zabinsky** für ihre Hilfe und den Einsatz ihrer Erfahrungen bei den Western-Blots. Die äußerst angenehme Zusammenarbeit trug dazu bei, die täglich langen Laborzeiten zu überstehen.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Freunde, die mir das Leben während und auch außerhalb des Studiums sowie in der Entstehungsphase dieser Doktorarbeit lebenswert gemacht haben.

Insbesondere möchte ich hier **Deniz Arslan, Huriye Aydinlik, Yeliz Kilicer, Hatice Sert, Asiye Simsek und Necmiye Topal** erwähnen, die jederzeit ein Ohr für Freude und Kummer hatten. Bei **Edda-Lilli Wulle** möchte ich mich für Ihren Optimismus bedanken, von dem sie stets ein Stück auch für mich übrig hatte.

Ein dicker Dank geht an **Adnan Irken**, der nicht nur seine EDV-Kenntnisse mit besonderen Einfällen, Geduld und Geschicklichkeit zum Einsatz gebracht hat, sondern auch in hoffnungslos erscheinenden Momenten seine Fähigkeit zur Motivation zumeist erfolgreich einsetzen konnte ;-).

Ganz herzlicher Dank geht an **Martina Welz**; nicht nur für die letzten Korrekturen meiner Arbeit, sondern auch für die schöne Zeit während unseres Studiums.

Ebenso geht ein Dank an **Mehmet Varli** für seine „soziale Ader“ mit seiner positiven Lebenseinstellung, für seine unzähligen Hilfestellungen während meines Aufenthaltes in Tübingen, für die abwechslungs- und ideenreiche Freizeitgestaltung und natürlich für das Korrekturlesen meiner Dr.-Arbeit.

Last but not least möchte ich mich bei einem **besonderen Menschen** bedanken, der die letzten Jahre meines Lebens mich in einer mir unbewussten Weise begleitet hat. Ich wünsche ihm alles Gute und einen Lebensweg, der ihn erfüllt. Schön zu wissen, dass es ihn gibt.

## **8. Lebenslauf**

Name: Acar  
Vorname: Ayse  
Geburtsdatum & -ort: 21. August 1973, Istanbul (Türkei)

### **Schulbildung:**

1980-1984 Grundschule in Rottenburg/Baisingen  
1984-1989 Hauptschule in Rottenburg/Ergenzingen (Hauptschulabschluss)  
1989-1991 Wirtschaftsschule in Rottenburg (Fachschulreife)  
1991-1994 Wirtschaftsgymnasium Tübingen (Abitur)

### **Berufsausbildung:**

1994–1996 Chemisches Institut Dr. Flad, Stuttgart  
(Staatlich geprüfte Chemisch-technische Assistentin)  
10/1996 Beginn des Medizinstudiums in Tübingen  
15.05.2003 Abschluss mit der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)

#### **Famulaturen:**

31.07.2000-10.09.2000 Uni.-Frauenklinik, Tübingen  
23.07.2001-20.08.2001 Uni.-Hautklinik Ambulanz, Tübingen  
03.09.2001-24.09.2001 Uni.-Neurochirurgie, Tübingen  
20.08.2001-03.09.2001 Praxisfamulatur, Allgemeinmed. und Schmerztherapie,  
Tübingen  
24.09.2001-14.10.2001 Uni.-Kinderklinik, Tübingen

#### **Praktisches Jahr:**

29.04.2002-23.06.2002 Medizin – Kardiologie, Marienhospital Stuttgart  
24.06.2002-18.08.2002 Medizin – Gastroenterologie, Marienhospital Stuttgart  
19.08.2002-13.10.2002 Gynäkologie/Geburtshilfe, Marienhospital Stuttgart  
14.10.2002-08.12.2002 Gynäkologie/Geburtshilfe, Spital Visp, CH  
09.12.2002-19.01.2002 Allg.- und Visceralchirurgie, Marienhospital Stuttgart

### **Berufliche Tätigkeiten:**

09/2003-12/2004 Ass.ärztin, Abt. Gyn./Geburtshilfe, Spital Sta Maria Visp, CH  
Seit 01/2005 Ass.ärztin, Abt. Gyn./Geburtshilfe, Kantonsspital Schaffhausen, CH

