

# **Die Rolle onkogener Signalwege bei der experimentellen Hepatokanzerogenese**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Katharina Mock**

aus Radolfzell am Bodensee

Tübingen

2014

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2015

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schwarz  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Toxikologie, an der Eberhard Karls Universität Tübingen im Zeitraum vom Juni 2009 bis August 2014 unter der Betreuung von Prof. Dr. Michael Schwarz angefertigt.

In diesem Zeitraum übernahm ich die Betreuung einer Diplomandin, Eva Zeller, die die Regulation von Dusp6, Dusp14 und Egfr durch  $\beta$ -Catenin in Maushepatomzellen untersuchte.

**Teile dieser Arbeit wurden präsentiert:**

Zeller E\*, **Mock K\***, Horn M, Colnot S, Schwarz M, Braeuning A. Dual-specificity phosphatases are targets of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and candidate mediators of  $\beta$ -catenin/Ras signaling interactions. Biol Chem. 2012 Oct;393(10):1183-91.

*\*Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen*

**Mock K**, Zeller E, Horn M, Colnot S, Schwarz M, Braeuning A. Dual-specificity phosphatases are targets of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and candidate mediators of  $\beta$ -catenin/Ras signaling interactions, ToxNet Baden-Württemberg Symposium, Karlsruhe, Deutschland, 2012 (Vortrag).

Zeller E, **Mock K**, Hammer K, Ohrnberger S, Nordheim A, Braeuning A, Schwarz M. Interactions of  $\beta$ -catenin- and Ha-ras-dependent signaling in mouse liver, 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., Frankfurt a.M., Deutschland, 2011 (Poster Präsentation).

Zeller E, **Mock K**, Ohrnberger S, Nordheim A, Braeuning A, Schwarz M. Interactions of  $\beta$ -catenin- and Ha-ras-dependent signaling in mouse liver, ToxNet Baden-Württemberg Symposium, Konstanz, Deutschland, 2011 (Poster Präsentation).

## Danksagung

Zuallererst geht mein Dank an Prof. Dr. Michael Schwarz, für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und die Betreuung dieser Arbeit.

Ich danke Dr. Albert Braeuning für seine Betreuung und Hilfsbereitschaft.

Ich danke PD Dr. Peter Münzel für seine Hilfsbereitschaft.

Ich danke der Serviceeinrichtung Transgene Tiere des IZKF Tübingen unter der Leitung von Dr. Thomas Ott für die Beratung bei der Planung zur Erzeugung transgener Tiere und das Durchführen der Pronukleusinjektionen.

Ich danke Eva Zeller für gute Zusammenarbeit.

Ich danke Dr. Albrecht Buchmann für seine Hilfsbereitschaft.

Ich danke Michael Römer vom Lehrstuhl Kognitive Systeme (Prof. Dr. Andreas Zell) für die Hilfe bei der Erstellung von Heatmaps.

Ich danke Johanna Mahr, Silvia Vetter und Elke Zabinsky für die große technische Unterstützung und Annette von Bank bei der Handhabung aller verwaltungstechnischer und sonstiger Belange.

Ich danke dem Rest der Arbeitsgruppe, auch ehemaligen MitarbeiterInnen, insbesondere aber Frederik Uibel, für den wissenschaftlichen und zwischenmenschlichen Austausch.

Ich danke allen TierpflegerInnen für die gute Versorgung der Tiere und die Zusammenarbeit.

Ich danke der Europäischen Union (CancerSys), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 773) und dem deutschen Sozialstaat für die finanzielle Unterstützung.

Ich danke meiner Familie, meinem Freund, meinen Freunden, Teilen der Slamily, speziell Prof. Dr. Radovan Radon, und dem Carrer Service der Uni Tübingen für die moralische Unterstützung und wegweisende Hilfe.



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE LEBER .....	1
1.1.1	Physiologie der Leber .....	1
1.1.2	Metabolische Zonierung in der Leber.....	2
1.1.3	Regulation der Zonierung .....	3
1.2	HEPATOKANZEROGENESE .....	4
1.3	WICHTIGE SIGNALWEGE IN DER HEPATOKANZEROGENESE UND DER REGULATION DER ZONIERUNG.....	5
1.3.1	MAP-Kinase/Ras-Weg.....	5
1.3.2	Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg .....	7
1.3.3	EGF-Rezeptor .....	9
1.3.4	Wechselwirkung von $\beta$ -Catenin- und MAPK/Ras-Signalgebung .....	9
1.4	MODELLE ZUR MECHANISTISCHEN AUFKLÄRUNG DER HEPATOKANZEROGENESE .....	11
1.4.1	Gentechnische Mausmodelle.....	12
1.4.2	Tet-System .....	12
1.5	FRAGESTELLUNG.....	14
<b>2</b>	<b>Material und Geräte.....</b>	<b>15</b>
2.1	GERÄTE.....	15
2.1.1	Großgeräte .....	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte .....	16
2.2	CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN .....	17
2.3	SOFTWARE UND INTERNETSEITEN .....	19
2.4	MAUSSTÄMME .....	20
2.5	ZELLINIEN.....	20
2.6	PRIMER .....	21
2.7	ANTIKÖRPER.....	22
2.7.1	<i>Western Blotting</i> .....	22
2.7.2	Immunhistochemie.....	22
2.8	PLASMIDE .....	23

2.9	KITS.....	24
2.10	BAKTERIEN.....	24
2.11	ENZYME.....	24
2.12	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	25
2.12.1	Zellkultur.....	25
2.12.2	Zellbehandlungen.....	26
2.12.3	Proteinisolierung und <i>Western-Blotting</i> .....	26
2.12.4	Immunhistochemische Färbung.....	28
2.12.5	Bakterienkultivierung.....	30
2.12.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.12.7	Reportergen-Untersuchung.....	31
2.12.8	Pronukleusinjektion.....	32
2.12.9	Genotypisierung und Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.12.10	Größenmarker.....	33
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.1	NEUBEWERTUNG VON GENEXPRESSIONSANALYSEN.....	34
3.2	ZELLKULTUR.....	34
3.2.1	Allgemeines.....	34
3.2.2	Medienwechsel und Subkultivierung.....	34
3.2.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	35
3.2.4	Behandlung von Zellen.....	35
3.3	RNA-UNTERSUCHUNG.....	36
3.3.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	36
3.3.2	Isolierung von RNA.....	36
3.3.3	DNase-Verdau.....	36
3.3.4	Reverse Transkription.....	36
3.3.5	LightCycler- <i>RealTime</i> -PCR.....	37
3.4	PROTEINUNTERSUCHUNG.....	37
3.4.1	Isolierung von Proteinen.....	37
3.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
3.4.3	<i>Western Blotting</i> .....	38
3.5	IMMUNHISTOCHEMIE.....	38
3.5.1	Kryo-Schnittpräparate.....	38

3.5.2	Carnoy-Fixierung .....	38
3.5.3	HE-Färbung.....	38
3.5.4	G-6-Pase-Färbung.....	39
3.5.5	GS-Färbung.....	39
3.5.6	CYP1A1/2C6/2E1/3A1-, E-Cadherin-, EGR1-, FBP1-, GSTm-, PEPCK- und phospho-MAPK-Färbung.....	39
3.5.7	BrdU-Färbung.....	40
3.6	ANALYSE UND DESIGN VON PLASMIDEN .....	40
3.6.1	Bakterienkultivierung zur Plasmidgewinnung .....	40
3.6.2	Restriktionsanalyse.....	41
3.6.3	Elektrophorese .....	41
3.6.4	Klonierung mithilfe des TOPO TA Cloning Kits .....	41
3.6.5	Herstellung des Plasmids pTRE-Tight-Ha-ras <sup>Q61K</sup> .....	42
3.6.6	Sequenzierung .....	42
3.7	REPORTERGEN-UNTERSUCHUNG .....	42
3.7.1	Transfektion.....	42
3.7.2	Luciferase-Messung .....	43
3.7.3	Zellviabilitäts-Assay.....	43
3.8	GENERIERUNG EINER TRANSGENEN MAUS .....	43
3.8.1	Vorbereitung des Plasmids pTRE-Tight-Ha-ras <sup>Q61K</sup> .....	44
3.8.2	Durchführung Pronukleusinjektion .....	44
3.9	TIERVERSUCHE .....	45
3.9.1	Tierhaltung .....	45
3.9.2	Tierzucht.....	45
3.9.3	Isolierung von genomischer DNA .....	45
3.9.4	Genotypisierungs-PCR.....	46
3.9.5	Sequenzierung .....	46
3.9.6	Leberspezifische Aktivierung von <i>Ha-ras</i> <sup>Q61K</sup> in transgenen Mäusen .....	47
3.9.7	Organentnahme.....	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
4.1	EINFLUSS VON B-CATENIN UND HA-RAS AUF DIE GLOBALE GENEXPRESSION IN DER LEBER DER MAUS .....	49

4.2	EINFLUSS VON B-CATENIN UND HA-RAS AUF DIE MRNA-EXPRESSION VON DUSP6, DUSP14 UND EGFR .....	52
4.2.1	Einfluss von $\beta$ -Catenin- und Ha-ras auf die mRNA-Expression von Dusp6, Dusp14 und Egfr <i>in vivo</i> .....	52
4.2.2	Einfluss von $\beta$ -Catenin auf die mRNA-Expression von Dusp6, Dusp14 und Egfr <i>in vitro</i> .....	54
4.3	EINFLUSS VON B-CATENIN UND HA-RAS AUF DIE PROTEINEXPRESSION.....	57
4.3.1	Einfluss von $\beta$ -Catenin auf die Proteinexpression <i>in vivo</i> .....	57
4.3.2	Einfluss von $\beta$ -Catenin und Ha-ras auf die Proteinexpression <i>in vitro</i> und Darstellung des <i>Crosstalks</i> .....	58
4.4	EFFEKTE VON B-CATENIN UND HA-RAS AUF DIE EXPRESSION VON ZONIERTEN MARKERPROTEINEN .....	62
4.5	GENERIERUNG EINER TRANSGENEN MAUS MIT LEBERSPEZIFISCHER TETRACYCLINABHÄNGIGER EXPRESSION VON <i>HA-RAS</i> <sup>Q61K</sup> .....	67
4.5.1	Konstruktion des Plasmids pTRE-Tight-Ha-ras <sup>Q61K</sup> .....	67
4.5.2	Testung von pTRE-Tight-Ha-ras <sup>Q61K</sup> <i>in vitro</i> .....	69
4.5.3	Pronukleusinjektion zur Erzeugung transgener Mäuse.....	73
4.5.4	Identifizierung von Nachkommen mit verändertem Erbgut und Erzeugung einer bitransgenen Mauslinie .....	74
4.5.5	Charakterisierung von bitransgenen Mäusen nach leberspezifischer Aktivierung des tetracyclinabhängigen <i>Ha-ras</i> <sup>Q61K</sup> -Transgens.....	76
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b><i>Curriculum vitae</i>.....</b>	<b>95</b>

## Abkürzungen

AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AK	Antikörper
Ak4	Adenylatkinase 4
Amp	Ampicillin
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
Aldh	Aldehyd-Dehydrogenase
Aox1	Aldehyd-Oxidase 1
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg1	Arginase 1 (Leber)
Asl	Argininosuccinat-Lyase
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAR	Konstitutiver Androstan-Rezeptor
Car2	<i>Carbonic anhydrase 2</i>
Cdh1	Cadherin 1
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ctsc	Cathepsin C
Cp	<i>Crossing point</i>
Cps1	Carbamoylphosphat-Synthetase I
Cre	<i>Cyclization recombination</i>
Cyp/CYP	Cytochrom P450
del	Deletiertes Allel
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
Dusp	<i>Dual-specificity phosphatase</i>
E-Cad	E-Cadherin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- N,N,N'N'-Tetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
EtOH	Ethanol
Fbp1	Fructose-1,6-bisphosphatase
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FKS	Fetales Kälberserum
Ftcd	<i>Formiminotransferase cyclodeaminase</i>
Fwd	<i>forward</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-6-Pase	Glucose-6-Phosphatase
Glcd	Glycin-Dehydrogenase (decarboxylierend)
Gpr49	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 49

GS	Glutaminsynthetase
GSK-3 $\beta$	Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$
GST	Glutathion-S-Transferase
H19	<i>H19 fetal liver mRNA</i>
HAc	Essigsäure
Hal	<i>Histidine Ammonia-Lyase</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
Hes1	<i>Hairy and enhancer of split 1</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
ldh3a	<i>Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD<sup>+</sup>) alpha</i>
IHC	Immunhistochemie
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
k.o.	<i>knockout</i>
KAc	Kaliumacetat
LAP	<i>Liver-enriched Activator Protein</i>
LB	Luria-Bertani
LEF	<i>Lymphoid Enhancer binding Factor</i>
LFA	Lipofectamine 2000
lox/P	<i>locus of X-over P1</i>
Luc	Luciferase
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
Mtap	S-Methyl-5'-thioadenosin-Phosphorylase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mt/mut	Mutation
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Oat	<i>Ornithine aminotransferase</i>
Otc	Ornithin-Transcarbamylase
P/S	Penicillin/Streptomycin-Lösung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEPCK/Pck1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rdh9	<i>Retinol dehydrogenase 9</i>
Rev	<i>reverse</i>
Rhbg	<i>Rhesus blood group-associated B glycoprotein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
rtTA	reverser tetracyclinabhängiger Transaktivator
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
Sds	Serin-Dehydratase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error Of Mean</i>
Sult5a1	Sulfotransferase 5a1

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCF	<i>T-Cell Factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	Tetracyclin responsives Element
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	tetracyclinabhängiger Transaktivator
WCE	<i>Whole Cell Extraction</i>
wt	Wildtyp-Allel



# 1 Einleitung

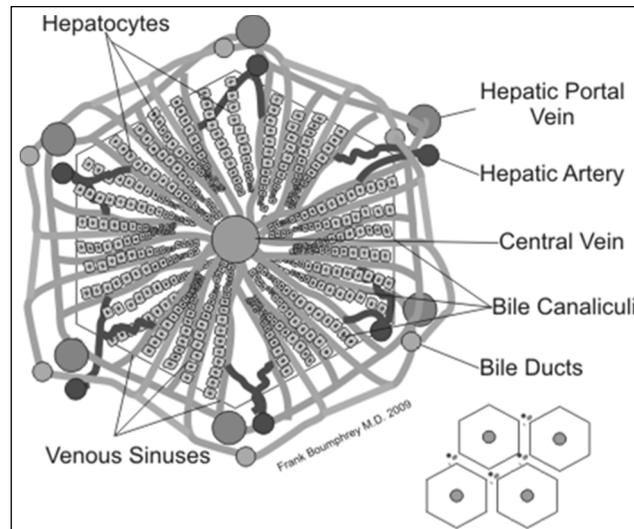
## 1.1 Die Leber

### 1.1.1 Physiologie der Leber

Die Leber (griech. *Hepar*) ist das zentrale Stoffwechselorgan der Wirbeltiere und beteiligt an zahlreichen Prozessen wie der Biosynthese von Plasmaproteinen, Hormonen, Harnstoff und Galle, Aufnahme von Nährstoffen aus dem Darm, sowie der Biotransformation von Fremdstoffen und Arzneimitteln. Da die Leber der Hauptspeicherort von Glykogen ist, trägt sie zudem zur Aufrechterhaltung eines stabilen Blutglucosespiegels bei. Sie besteht aus vier Lappen unterschiedlicher Größe und Form und wiegt beim Menschen etwa 1500 bis 2000 g. Die Blutversorgung erfolgt über zwei Hauptgefäße, an der Unterseite der Leber liegt die sogenannte Leberpforte, über die die Pfortader und die Leberarterien in die Leber eintreten und über die die Lebergallengänge sie verlassen. Die Leberarterie (engl. *central vein*) transportiert sauerstoffreiches Blut vom Herzen, die Pfortader (engl. *portal vein*) führt sauerstoffarmes Blut mit Nährstoffen aus Magen und Darm, Abbauprodukten der Milz sowie Hormonen der Bauchspeicheldrüse zur Leber. Etwa 80% der Gesamtorganmasse und 60% der Zellpopulation besteht aus funktionellen Hepatozyten, auch parenchymale Leberzellen genannt, die in adultem Zustand kaum proliferieren und eine Lebensspanne von ca. 30 Jahren haben. Zu den vier Haupttypen der nicht-parenchymatösen Zellen gehören blutgefäßbildende Endothelzellen, spezielle Makrophagen, genannt Kupffer-Zellen, fettspeichernde Ito-Zellen und spezialisierte Lymphozyten, Pit-Zellen (Jungermann, 1995).

Die Leberlappen sind morphologisch in winzige Leberläppchen (max. 1–2 mm) unterteilt, die einen idealisierten hexagonalen Querschnitt haben, deren Mitte die Zentralvene bildet und die vorwiegend aus Hepatozyten bestehen. Jeweils drei Leberläppchen begrenzen eine kleine Bindegewebszone, die man als Periportalfeld oder periportale Zone bezeichnet. In diesen Feldern verlaufen jeweils ein Ast der Leberarterie, ein Ast der Pfortader und ein Gallengang (engl. *bile ducts*), was zusammen als Glisson-Trias bezeichnet wird (s. Abb. 1.1). Der Blutfluss verläuft vom Periportalfeld zur Zentralvene entlang der Lebersinusoide, die mit einem fenestrierten Endothel ausgestattet sind, die einen Austausch von molekularen Substanzen unter 250 kDa zwischen den Hepatozyten und dem Blutstrom erlauben. Gallensäuren, die von den Hepatozyten abgesondert werden, wandern in die entgegengesetzte Richtung von der Zentralvene zum

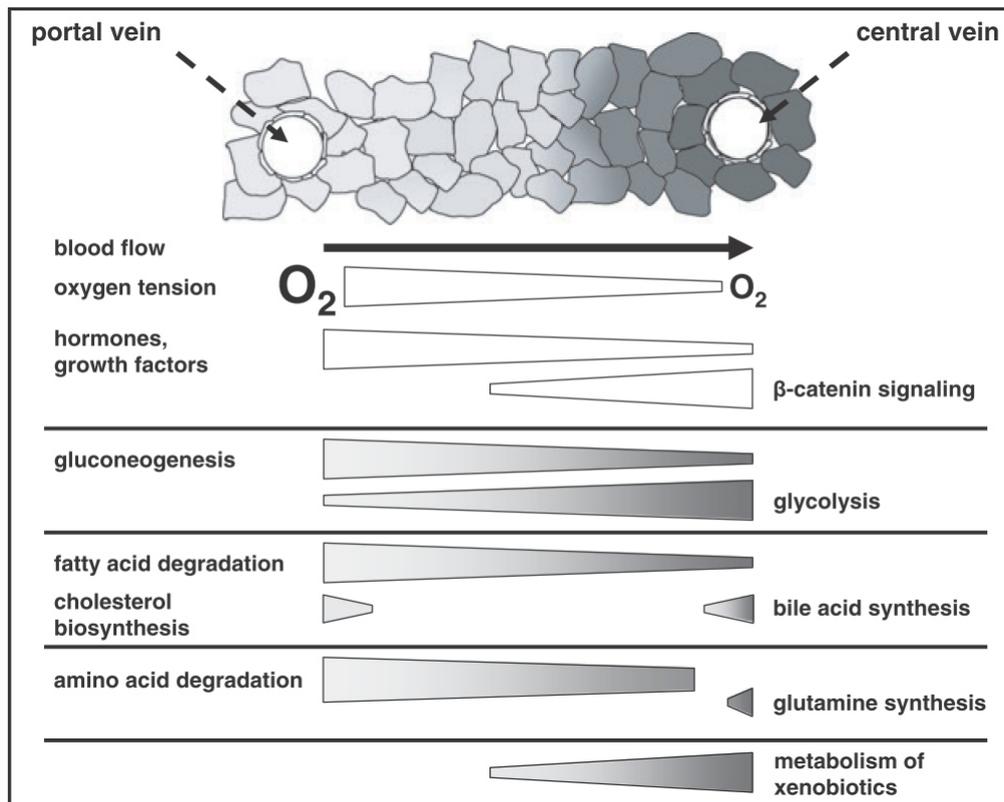
Periportalfeld in Gallenkanälchen (engl. *bile canaliculi*), die von benachbarten Hepatozyten gebildet werden.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der hexagonalen Struktur eines Zentralvenen-Leberläppchens. Die Glisson-Trias befinden sich jeweils zwischen den Sechsecken. (Abbildung entnommen von Frank Boumphrey, 2009 (CC )).

### 1.1.2 Metabolische Zonierung in der Leber

Obwohl das Lebergewebe histologisch betrachtet uniform ist, ist es bezüglich der Morphologie und Histochemie sehr heterogen, was mit der Blutversorgung und somit einem Gradienten im Gehalt an Sauerstoff, Substraten und Hormonen zusammenhängt. Zellen der periportalen Zone unterscheiden sich von denen die um die Zentralvene gelegen sind hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Schlüsselenzymen, Translokatoren, Rezeptoren und subzellulären Strukturen und haben folglich verschiedene funktionelle Kapazitäten (Gebhardt, 1992; Jungermann und Kietzmann, 1996). Dies ist die Basis des Modells der metabolischen Zonierung, nach dem viele Enzyme des Intermediärstoffwechsels bevorzugt in periportalen oder perivenösen Subpopulationen exprimiert werden (Braeuning *et al.*, 2006). So findet zum Beispiel das Freisetzen von Glucose aus Glycogen, Gluconeogenese und die Cholesterinbiosynthese vor allem in periportalen Hepatozyten statt, wohingegen perivenöse Hepatozyten eine hohe Aktivität der Glycolyse, Glutaminsynthese und des Fremdstoffmetabolismus aufweisen (s. Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der metabolischen Zonierung in der Leber entlang der periportalen Achse. Der Blutfluss mit abnehmender Sauerstoffmenge und Gehalt an Hormonen und Wachstumsfaktoren verläuft von der Pfortader (engl. *portal vein*) zur Zentralvene (engl. *central vein*). Periportal gelegene Hepatozyten sind an Gluconeogenese, Fettsäure- und Aminosäureabbau beteiligt, wohingegen Hepatozyten in der Gegend der Zentralvene erhöhte Glycolyse, Gallensäurebiosynthese und Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und Glutaminsynthetase (GS) zeigen.  $\beta$ -Catenin-Signalgebung liegt in perivenösen Hepatozyten vor. (Abbildung entnommen aus Braeuning *et al.*, 2006).

### 1.1.3 Regulation der Zonierung

Die molekularen Mechanismen, die der funktionellen Heterogenität der Zonen unterliegen, sind immer noch nicht aufgeklärt. Im Gespräch sind unter anderem die Rolle der Sauerstoffsättigung (Jungermann und Katz, 1989), die Wechselwirkung von Endothelzellen und Hepatozyten (Kuo und Darnell, 1991; Gebhardt und Gaunitz, 1997), Hormone (Oinonen *et al.*, 1993; Oinonen *et al.*, 2000) und Cytokine (Morgan, 2001). Vor kurzem wurde der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg als neuer Regulator der Zonierung der Genexpression in der Mausleber ermittelt. Aktives  $\beta$ -Catenin induziert ein perivenöses Expressionsprofil (Benhamouche *et al.*, 2006; Hailfinger *et al.*, 2006; Braeuning *et al.*, 2007a), wohingegen der Verlust von  $\beta$ -Catenin eine Störung der perivenösen Genexpression verursacht (Benhamouche *et al.*, 2006; Sekine *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2006).

Zusätzlich gibt es Hinweise, dass das periportale Expressionsprofil durch aktive MAPK/Ras-Signalgebung (Braeuning *et al.*, 2007a; Braeuning *et al.*, 2007b) oder durch Inhibition von Wnt-Signalgebung durch den Tumorsuppressor APC, einem negativen Regulator der  $\beta$ -Catenin-Stabilität, reguliert wird (Benhamouche *et al.*, 2006).

## 1.2 Hepatokanzerogenese

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine bösartige Tumorerkrankung und die zweithäufigste Todesursache bedingt durch Krebs weltweit. Im Jahr 2012 wurden über 780.000 Fälle diagnostiziert, es ist der fünfthäufigste Krebs bei Männern und steht bei Frauen an neunter Stelle. Am häufigsten treten Erkrankungen in Ost-Asien und West-Afrika auf. Die Prognosen für Leberkrebs sind sehr schlecht (Ferlay *et al.*, 2010; GLOBOCAN 2012, <http://globocan.iarc.fr>). In den meisten Fällen entwickelt sich ein hepatozelluläres Karzinom aus der Vorgeschichte einer chronischen Lebererkrankung (70-90% aller Patienten), es gilt als Haupttodesursache für Patienten mit Leberzirrhose. Das weltweite heterogene Auftreten spiegelt die Schwankungen der Hauptrisikofaktoren wider: Hepatitis-C- und B-Infektionen (zusammen mit Aflatoxin B1-Exposition), sowie Alkoholmissbrauch, auch synergistisch (Forner *et al.*, 2012).

Die Hepatokanzerogenese ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, in dem viele Signalkaskaden verändert sind, was zu einem heterogenen molekularen Profil führt. Der erste Schritt zur Tumorbildung ist ein DNA-Schaden, der spontan oder durch exogene Noxen entsteht und weder durch Reparatur noch durch Apoptose beseitigt wird und sich so in einer Mutation manifestiert. Dabei sind zwei Arten von Genen, die von Mutationen betroffen sein können, bei der Kanzerogenese entscheidend: Protoonkogene und Tumorsuppressorgene. Onkogene fungieren als Proliferationssignalgeber wohingegen Tumorsuppressoren den Zellzyklus kontrollieren und Apoptose auslösen können. Während also bei der ersten Gengruppe eine aktivierende Mutation für die Kanzerogenese entscheidend ist, fördert die Deletion oder der Verlust der zweiten Gengruppe die Tumorentstehung (Barrett und Wiseman, 1987).

Im menschlichen HCC findet man die häufigsten Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 (25-40% aller Tumore) und in *CTNNB1* (in ca. 25%, vorherrschend in Verbindung mit einer Hepatitis-C-Infektion), dem Gen das für  $\beta$ -Catenin kodiert. Andere Mutationen sind seltener. Genduplikationen und Deletionen sind weitverbreitet und betreffen wichtige Onkogene und Tumorsuppressoren. Epigenetische Veränderungen sind unklar, aber Hemmungen von Tumorsuppressoren und Reaktivierung von Onkogenen wurde

beobachtet. Einige Signalkaskaden, die mit Zellüberleben und Proliferation in Beziehung stehen, sind aktiviert und sprechen somit auf gezielte Behandlung in präklinischen Studien an. Hinsichtlich Proliferationskaskaden sind die Signalwege von EGFR und Ras in über 50% aller HCCs aktiviert, während der mTOR-Signalweg (engl. *mechanistic Target of Rapamycin*) in 40-50% aller Lebertumore zerstört ist, aufgrund einer *upstream* Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN (engl. *Phosphatase and Tensin homolog*) oder Mutationen der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Vergleichbar ist in 20% der frühen HCCs die IGF-1-Signalgebung (engl. *Insulin-like growth factor receptor 1*) aktiv und Deregulierungen des HGF/c-Met- Signalwegs sind häufig. Wnt-Signalgebung ist in einem Drittel der HCCs aktiviert, als Ergebnis aktivierender Mutationen im Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin, Überexpression von Wnt-Rezeptoren oder Inaktivierung von E-Cadherin. Zudem ist das HCC ein hochvaskularisierter Krebs, Angiogenese durch u.a. VEGF-Signalgebung (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) ist ein weiteres Schlüsselereignis (Forner *et al.*, 2012).

Der Erfolg in der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms baut darauf diese Signalwege und deren Deregulation besser zu verstehen um sie pharmakologisch manipulieren zu können.

### 1.3 Wichtige Signalwege in der Hepatokanzerogenese und der Regulation der Zonierung

Im Gegensatz zur hohen Prävalenz in humanen hepatozellulären Karzinomen, findet man in Mauslebertumoren für gewöhnlich keine Mutationen in *p53*. Wenn keine tumorpromovierenden Substanzen verabreicht werden sind bis zu 90% der chemisch induzierten Tumore im Mausmodell in *Ha-ras* oder *B-raf* mutiert, was in menschlichen HCCs gemeinhin nicht vorkommt. Mutationen in *Ctnnb1*, dem Gen das für  $\beta$ -Catenin kodiert, sind in der Maus weniger häufig als im Menschen, durch Gabe von tumorpromovierenden Substanzen kann die Inzidenz aber auf bis zu 80% gesteigert werden (Kohle *et al.*, 2008).

#### 1.3.1 MAP-Kinase/Ras-Weg

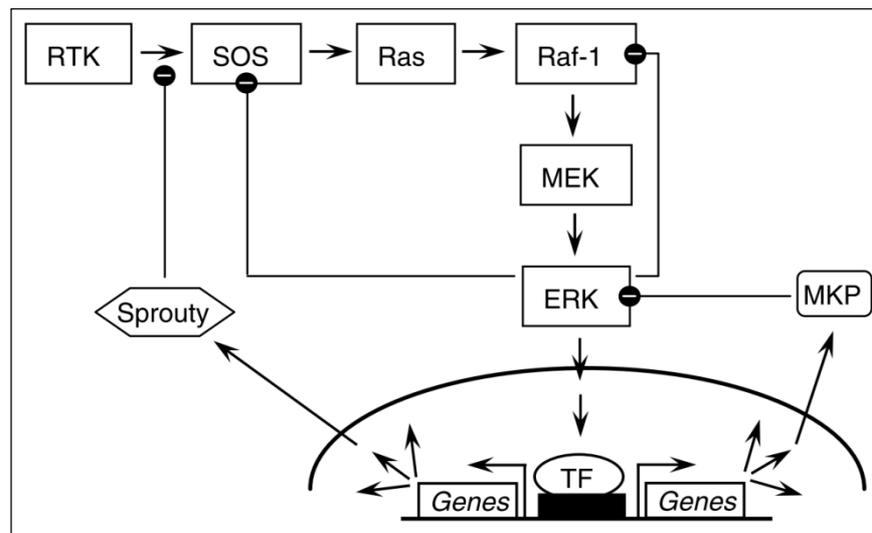
In 20-30% aller menschlichen Tumore wird eine aktivierende Mutation eines *Ras*-Gens beobachtet, was sie an die Spitze der Untersuchungen der Signaltransduktion und des Verstehens der molekularen Onkologie stellt (Malumbres und Barbacid, 2003). *Ras*-

Mutationen im menschlichen HCC sind unüblich, abgesehen von Patienten, die Vinylchlorid ausgesetzt waren (Ogata *et al.*, 1991; Weihrauch *et al.*, 2001). Allerdings wird häufig eine Aktivierung des MAPK/Ras-Weges beobachtet, weswegen Kinaseinhibitoren wie Sorafenib therapeutisch eingesetzt werden (Calvisi *et al.*, 2006; Villanueva *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2009).

Bei chemisch induzierter Kanzerogenese in der Leber von Mäusen findet man als häufigste Mutation eine Transversion von C nach A im Codon 61 des *Ha-ras*-Gens, was zu einer Aminosäuresubstitution von Glutamin (Q) zu Lysin (K) führt und so zu einer konstitutiven Aktivierung des *downstream* Signalwegs (Buchmann *et al.*, 1991; Bauer-Hofmann *et al.*, 1992). *Ha-ras* ist ein kleines G-Protein, das Teil des MAP-Kinase-Signalwegs ist, welcher extrazelluläre Signale in die Zelle übermittelt. Er ist so an der Kontrolle fundamentaler Zellprozesse, wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose beteiligt. MAPK-Signalwege sind aus dreigliedrigen Kinasemodulen aufgebaut, in welchen eine MAP-Kinase (MAPK) durch Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) aktiviert wird, die wiederum durch eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert wurde (Marshall, 1994; Dhillon *et al.*, 2007). Sechs verschiedenartige Gruppen von MAPKs sind bislang in Säugetieren charakterisiert worden, wobei der ERK-Signalweg am besten untersucht und in ungefähr einem Drittel aller humanen Krebsarten dereguliert ist. Neben Zellproliferation steht ERK im Zusammenhang mit vielen anderen Aspekten des Tumorphänotyps. Viele extrazelluläre Signale, aber besonders Wachstumsfaktoren und Mitogene, stimulieren den ERK-Signalweg. Liganden-vermittelte Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen löst die Rekrutierung des Gbr2/SOS-Proteinkomplexes an die innere Zellmembran aus, wo es durch GTP-Austausch Ras aktiviert, welches dann eine Kinase-Kaskade initiiert, angefangen durch Phosphorylierung von Raf. Raf-Kinasen phosphorylieren und aktivieren MEK (MEK1 und 2), die dann wiederum ERK (ERK1 und 2) aktivieren (s. Abb. 1.3). Die meisten mit Krebs assoziierten Läsionen, die zu konstitutiver Aktivierung von ERK führen, treten in diesen frühen Schritten des Signalwegs auf: Überexpression von Rezeptor-Tyrosinkinasen, aktivierende Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen, anhaltende autokrine oder parakrine Produktion von aktivierenden Liganden, *Ras*- oder *B-Raf*-Mutationen. Die hohe Frequenz der aktivierenden Mutationen um die Ras-Raf-Achse weist darauf hin, dass dies der regulatorische *Hotspot* des Signalwegs ist. Der MAPK/Ras/ERK-Weg ist zahlreichen negativen *Feedback Loops* unterworfen (Dhillon *et al.*, 2007; Abb. 1.3), u.a. durch die spezifischen Phosphatasen DUSP (auch MKP), die ein transkriptionelles Ziel von ERK sind (Owens und Keyse, 2007; Ekerot *et al.*, 2008). Die cytoplasmatische ERK1/2-spezifische Phosphatase DUSP6 wurde kürzlich durch

mathematische Modellierung als äußerst wahrscheinlicher Kandidat der Konfiguration des MAPK-Signalwegs während der zellulären Transformation durch Ras-Onkogene ausfindig gemacht (Bluthgen *et al.*, 2009).

Aktives ERK phosphoryliert zahlreiche cytoplasmatische und nukleäre Ziele, wie Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren und Cytoskelettproteine. Ein frühes Genprodukt, das transkriptionell induziert wird, ist Egr-1 (Qureshi *et al.*, 1991; Gregg und Fraizer, 2011). Ein wichtiges Ziel von ERK ist auch der nukleärer Transkriptionsfaktor AP-1 (Dhillon *et al.*, 2007).



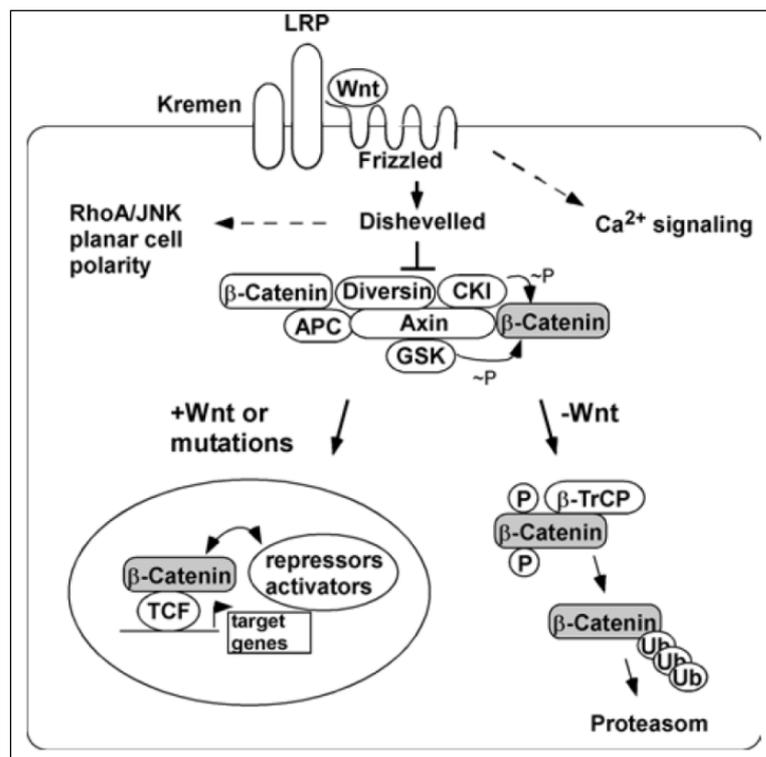
**Abbildung 1.3:** MAPK/Ras-Weg mit negativen *Feedback Loops*: Aktiviertes ERK kann Raf durch direkte Phosphorylierung inhibieren und zusätzlich mit der Bindung des Ras-GTP-Austauschfaktors SOS zum Rezeptor interferieren. Aktiviertes ERK kumuliert im Zellkern und induziert die Transkription von MKPs (DUSPs), die die Aktivierungsseite von ERK dephosphorylieren und von *Sprouty*-Proteinfamilien die mit der Ras- und Raf-Aktivierung über Rezeptoren interferieren (Abbildung entnommen aus Dhillon *et al.*, 2007). Abk.: RTK = Rezeptor-Tyrosinkinase, SOS = *Son of Sevenless*, TF = Transkriptionsfaktor, MKP = *MAP Kinase Phosphatase*.

### 1.3.2 Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist nach seinem Liganden „Wnt“ (Kofferwort aus *Wg* für *Wingless* (*Drosophila melanogaster*) und *Int-1*) benannt, das Gen wurde 1982 identifiziert, als *Int-1* in Mäusen nach Einbringung des *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) aktiviert wurde (Nusse und Varmus, 1982). Später wurde die Homologie zwischen *Int-1* und *Wingless* aufgedeckt, was zur Bezeichnung *Wnt* führte (Rijsewijk *et al.*, 1987).

Der Wnt-Signalweg, der unter normalen Bedingungen in der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose wirkt und fundamental wichtig in der Embryogenese ist, spielt

auch eine Rolle in der Tumorigenese. Die Komponenten des Signalwegs sind hochkonserviert, der „kanonische Wnt-Signalweg“ ist die Bezeichnung für eine Kaskade, die die Translokation von  $\beta$ -Catenin von der Zellmembran in den Zellkern beschreibt, wo dieses als Coaktivator der Familie der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren wirkt und so spezifische Zielgene, wie c-Myc, Cyclin D und Survivin, reguliert (Villanueva *et al.*, 2007). In der Abwesenheit von Wnt liegt  $\beta$ -Catenin in einem intrazellulären Proteinkomplex gebunden vor, der u.a. aus Axin, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), GSK3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$* ) und CK1 (*Casein Kinase 1*) zusammengesetzt ist. In diesem Komplex wird  $\beta$ -Catenin in einem zweistufigen Prozess durch CK1 und GSK3 $\beta$  phosphoryliert und so für den proteasomalen Abbau markiert. Nach Bindung von Wnt und Aktivierung des Transmembranrezeptors *Frizzled*, inhibiert das cytoplasmatische Protein *Dishevelled* (Dvl) die Bildung des Proteinkomplexes, was zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führt. Dieses kann nun in den Zellkern translozieren und die Transkription seiner Zielgene vorantreiben (s. Abb. 1.4; Lustig und Behrens, 2003).



**Abbildung 1.4:** Überblick über den Wnt-Signalweg: In Abwesenheit von Wnt (-Wnt) wird  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (rechts). In Anwesenheit von Wnt oder nach Mutationen von APC, Axin oder  $\beta$ -Catenin (+Wnt or mutations) ist die Phosphorylierung und der Abbau von  $\beta$ -Catenin gestoppt, was eine Verbindung mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren im Zellkern ermöglicht. Der TCF/LEF- $\beta$ -Catenin-Komplex bindet an die DNA und aktiviert zusammen mit einer Vielzahl von Repressoren und Aktivatoren Wnt-Zielgene (links). Die gestrichelten Pfeile zeigen Verzweigungen des Signalwegs an (Abbildung entnommen aus Lustig und Behrens, 2003). Abk.: LRP = *LDL-receptor-related protein*;  $\beta$ -TrCP =  *$\beta$ -Transducin repeats-Containing Proteins* (Ubiquitin-E3-Ligase); Ub = Ubiquitin.

Die meisten Mutationen im Wnt-Signalweg die zu Krebs führen, inaktivieren entweder die Funktion von APC oder stabilisieren  $\beta$ -Catenin durch Veränderung seiner Phosphorylierungsstellen, wodurch es nicht abgebaut werden kann. Der Wnt-Signalweg wurde ausgiebig im humanen Colonkarzinom untersucht, wo 90% aller Tumore Mutationen im APC-Gen aufweisen und 50% der Tumore, die keine Mutation in APC tragen, im  $\beta$ -Catenin-Gen mutiert sind. Im menschlichen HCC sind APC-Mutationen selten, Mutationen von  $\beta$ -Catenin befinden sich in den meisten Fällen im Exon 3 des CTNNB1-Gens, der Phosphorylierungsstelle für GSK3 $\beta$ . Auch in der Mausleber finden sich solche aktivierende Mutationen im Ctnnb1-Gen (De La Coste *et al.*, 1998). Als Folge von Ctnnb1-Mutationen sind  $\beta$ -Catenin-Zielgene wie die Glutaminsynthetase (GS) in den Tumoren überexprimiert (Loeppen *et al.*, 2002; Cadoret *et al.*, 2002).

### 1.3.3 EGF-Rezeptor

Der *Epidermal Growth Factor*-Rezeptor (EGFR) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch Ligandenbindung Tyrosinkinaseaktivität erhält und infolgedessen Signaltransduktion initiiert. EGF-Rezeptoren sind Transmembranproteine, die in der Regulation eines komplexen Spektrums essentieller biologischer Prozesse beteiligt sind, wie die Zellproliferation und dem Überleben. Es gibt acht bekannte Liganden, die EGFR aktivieren können, u.a. *Transforming Growth Factor*  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) und *Epidermal Growth Factor* (EGF), was klassischerweise die MAPK/Ras/ERK-Kaskade auslöst (Kolch, 2005). Die Überexpression von EGFR in manchen bösartigen Tumoren war der Auslöser für die Entwicklung spezifischer EGFR-Antagonisten, die teilweise bereits in der klinischen Praxis zugelassen sind, wie z.B. Cetuximab beim metastasierenden kolorektalen Karzinom. Im HCC ist die Datenlage zur EGFR-Dysregulation mangelhaft und inkonsistent, die Inzidenz in den Studien erstreckt sich von 4% bis 53%, Mutationen sind unüblich (Villanueva *et al.*, 2007).

Desweiteren findet man hohe Gehalte des EGF-Rezeptors in periportalen Hepatozyten, während er in perivenösen Hepatozyten nicht vorhanden ist (Gebhardt und Marti, 1992).

### 1.3.4 Wechselwirkung von $\beta$ -Catenin- und MAPK/Ras-Signalgebung

Vorrangegangene Untersuchungen in unserem Labor zeigen, dass experimentell ausgelöste Lebertumore in Mäusen abhängig von ihrer Behandlung entweder aktivierende Mutationen im Ctnnb1- oder in den Ha-ras/B-raf-Protoonkogenen tragen (Stahl *et al.*,

2005; Hailfinger *et al.*, 2006). Die Genexpressionsprofile der beiden Tumortypen unterscheiden sich sehr: viele Markergene werden gegensätzlich reguliert, wie z.B. einige fremdstoffmetabolisierende Cytochrom P450-Enzyme (Loeppen *et al.*, 2005; Braeuning *et al.*, 2007b; Braeuning, 2009). Zudem ähneln die Expressionsprofile den vorliegenden Phänotypen in perivenösen bzw. periportalen Hepatozyten (Hailfinger *et al.*, 2006; Braeuning *et al.*, 2007a). Wir vermuten also, dass sich der  $\beta$ -Catenin- und der MAPK/Ras-Signalweg gegenseitig unterdrücken, sobald einer von ihnen durch Mutation im entsprechenden Protoonkogen aktiviert wurde. Auf dieser Grundlage wurde in unserer Arbeitsgruppe weiterhin die These aufgestellt, dass die zonale Heterogenität der Genexpression in der Leber durch die Zonenspezifität zweier antagonistischer Signalwege bestimmt wird: ein Ras-aktivierendes Signal, das durch Moleküle des Blutstromes geliefert wird, überwiegt im Periportalfeld, wohingegen ein zweites Signal, eventuell durch die Endothelzellen der Zentralvene übertragen,  $\beta$ -Catenin-abhängige Transkription in den perivenösen Hepatozyten aktiviert (Hailfinger *et al.*, 2006).

Komplexe Wechselwirkungen der  $\beta$ -Catenin- und Ras-Signalkaskaden sind oft beschrieben worden. Viele Veröffentlichungen richten ihre Aufmerksamkeit auf eine Kooperation von MAPK- und Wnt-Signalgebung, wie z.B. beim kolorektalem Karzinom (Kim *et al.*, 2007; Phelps *et al.*, 2009; Hu und Li, 2010; Jeong *et al.*, 2012). Übereinstimmend dazu finden sich auch Daten aus Versuchen mit transgenen Tieren, wie z.B. für den Gastrointestinaltrakt (D'abaco *et al.*, 1996; Sansom *et al.*, 2006), die Haut (Delmas *et al.*, 2007; Damsky *et al.*, 2011) und die Leber (Harada *et al.*, 2004). Bei letzterem wurde ein zusammenwirkendes Verhalten bei der Hepatokanzerogenese von bitransgenen Mäusen mit aktivierenden Mutationen in *Ctnnb1* und *Ha-ras* beobachtet. In einer weiteren Publikation wurden erhöhte Werte der mRNA von *Egfr* in der Leber von Mäusen mit einer Überexpression von  $\beta$ -Catenin gefunden (Tan *et al.*, 2005). Für einen ausführlichen Überblick der Konvergenz von Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung und EGFR in der Kanzerogenese siehe Hu und Li, 2010.

Im Gegensatz dazu legen andere Publikationen unabhängige Mechanismen der Tumorigenese durch Ras bzw.  $\beta$ -Catenin nahe, wie bei der Entstehung intestinaler Neoplasmen (Trobridge *et al.*, 2009) und bei Vorläufern pankreatischer Karzinome (Morris *et al.*, 2010), was den Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe näher kommt. Zudem wurde in humanem Melanom ein negativer *Crosstalk* von aktivierter MAPK-Signalgebung durch *B-raf*-Mutation auf  $\beta$ -Catenin-Signalgebung durch Stabilisierung von Axin beschrieben (Biechele *et al.*, 2012).

Erst kürzlich wurde in einem Kommentar hervorgehoben, dass die Wechselwirkung von  $\beta$ -Catenin- und MAPK/Ras-Signalgebung vom spezifischen zellulären Kontext abhängig ist (Guardavaccaro und Clevers, 2012).

Für einen ausführlichen Überblick der Ras/ $\beta$ -Catenin-Wechselwirkungen siehe Zeller *et al.*, 2013.

## 1.4 Modelle zur mechanistischen Aufklärung der Hepatokanzergenese

Verschiedenste Nagetiermodelle wurden über die letzten Jahrzehnte benutzt um die Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms zu untersuchen. Die Labormaus ist eines der besten experimentellen Systeme, aufgrund der physiologischen, molekularen und genetischen Ähnlichkeiten zum Menschen und der Züchtungskapazität, kurzen Lebensspanne und der zahlreichen Möglichkeiten, die durch gentechnische Veränderungen auf der Grundlage eines komplett sequenzierten Genoms heutzutage möglich sind (Bakiri und Wagner, 2013).

Da die Leber der primäre Zielort für hunderte von Chemikalien ist, wie u.a. Pestizide, Nahrungsmittelbestandteile und Pharmazeutika, ist die Identifizierung hepatokanzero gener Substanzen und das Verstehen der molekularen Prozesse während der kanzerogenen Transformation eine anhaltende Herausforderung. Zur Erzeugung eines konventionellen Mausmodells wird durch chemische Induktion die Entstehung von Lebertumoren angeregt. Seit den 60er Jahren (Rajewsky *et al.*, 1966) ist die am weitesten verbreitete Chemikalie für diesen Zweck Dimethylnitrosamin (DEN), welches in Hepatozyten metabolischer Aktivierung durch die fremdstoffmetabolisierenden Cytochrom P450-Enzyme unterliegt. Es wirkt als volles Kanzerogen, wenn es Mäusen die jünger als zwei Wochen sind injiziert wird, da die Hepatozyten noch aktiv proliferieren.

Für unsere Arbeitsgruppe hat sich dafür der Mausstamm C3H/N als besonders passend herausgestellt, da dieser ein hohes Auftreten spontaner Lebertumore zeigt (Buchmann *et al.*, 1991). Zudem ist es möglich, mit einer Tumorpromotion durch Phenobarbital zu erreichen, dass die Tumore überwiegend Mutationen im *Ctnnb1*-Gen tragen, welches für  $\beta$ -Catenin kodiert (Aydinlik *et al.*, 2001). Ohne Promotion durch Phenobarbital sind bis zu 70% aller Tumore nach Behandlung durch DEN in *Ha-ras* oder *B-raf* mutiert (Jaworski *et al.*, 2005a).

### 1.4.1 Gentechnische Mausmodelle

In den letzten drei Dekaden haben es technologische Fortschritte ermöglicht gentechnisch veränderte Mausmodelle zu erzeugen, die die Veränderungen nachahmen, die vielfach in humanem Krebs beobachtet wurden und mit denen die Relevanz von Kandidatengenen in der Entstehung, Entwicklung und Aufrechterhaltung von Tumoren bewertet werden kann.

Um den Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs auf die Zonierung und Hepatokanzerogenese besser zu untersuchen stehen unserer Arbeitsgruppe zwei Mausmodelle zur Verfügung. Zum einen können wir einen konditionalen Cre/*loxP*-vermittelten *knockout* von  $\beta$ -Catenin erzeugen, in dem Alb-Cre Mäuse (Jackson Laboratory), die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des hepatozytenspezifischen Albuminpromoters exprimieren mit transgenen Mäusen gekreuzt werden, die *loxP*-Seiten in den Introns enthalten, die Exon 3 und 6 des *Ctnnb1*-Gens flankieren (Huelsenken *et al.*, 2001). Zum anderen kann  $\beta$ -Catenin-Signalgebung durch den konditionalen *knockout* von *Apc* aktiviert werden, in dem *Apc<sup>loxP/loxP</sup>*-Mäuse, in denen das Exon 4 des *Apc*-Gens mit *loxP*-Seiten flankiert ist, mit TTR-Cre<sup>Tam</sup>-Mäusen gekreuzt werden, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des leberspezifischen Transthyretin-Promoters (TTR) exprimieren. Durch Injektion einer einmaligen Dosis Tamoxifen in bitransgenen Nachkommen wird der *knockout* induziert (Benhamouche *et al.*, 2006).

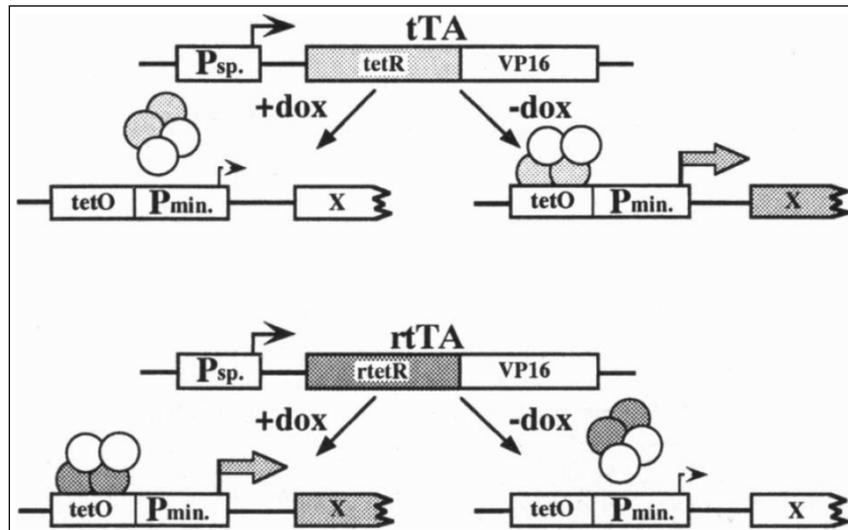
Um den Einfluss der MAPK/Ras-Signalgebung auf die Zonierung und Hepatokanzerogenese zu untersuchen, steht unserer Arbeitsgruppe kein geeignetes Mausmodell zur Verfügung. Es konnten lediglich mit überlassenen Gewebeproben von Mäusen, die eine humane aktive Form des *Ha-ras*-Gens (G12V) nach adenoviral induzierter Cre-Rekombination tragen (Harada *et al.*, 2004), einige Untersuchungen in der Vergangenheit gemacht werden (Braeuning *et al.*, 2007b).

### 1.4.2 Tet-System

Mit Hilfe des Cre/*loxP*-Systems ist es zwar möglich die genetische Veränderung des Mausmodells zeitlich zu steuern, dennoch ist diese Veränderung unumkehrbar und kann nach ihrem Einsetzen nicht mehr beeinflusst werden. Mausmodelle, die auf dem Tetracyclin-regulierten System (Tet-System) basieren, erlauben eine zeitlich definierte, quantitative und reversible Kontrolle der Transgenexpression. So wird eine Einschätzung der Bedeutung des initialen onkogenen Ereignisses für die Tumoraufrechterhaltung und

somit die therapeutische Relevanz des Angreifens bestimmter Onkogene ermöglicht (Bakiri und Wagner, 2013).

Das Tet-System wurde ursprünglich von Gossen und Bujard entwickelt (Gossen und Bujard, 1992). Dafür wird sich der Mechanismus der Tetracyclin-Resistenz in *E. coli* zunutze gemacht, wo ein Tet-Repressor Protein (TetR) die Gene des Tetracyclin-Resistenz-Operons negativ reguliert, in dem es in Abwesenheit von Tetracyclin an *tetO*-Sequenzen bindet um die Transkription zu verhindern. Gossen und Bujard entwickelten als Teil eines Zweikomponentensystems zunächst ein regulatorisches Protein auf der Grundlage von TetR, das mit einer Aktivierungsdomäne aus dem *Herpes simplex*-Virus fusioniert wird und so in einen transkriptionellen Aktivator gewandelt wird, was als „tetracyclinabhängiger Transaktivator“ (tTA) bezeichnet wird. Ähnlich wurde ein „reverser tetracyclinabhängiger Transaktivator“ (rtTA) entwickelt (Gossen *et al.*, 1995). Als zweite Komponente liegt ein gewünschtes Gen unter der Kontrolle eines minimalen *CMV*-Promoters in Abhängigkeit von Tetracyclin-responsiven Elementen (TRE), die die *tetO*-Sequenz enthalten. Die Transkription des gewünschten Gens wird durch Tetracyclin kontrolliert. Im sogenannten Tet-Off-System wird mit dem tTA gearbeitet, die Transkription erfolgt in Abwesenheit von Tetracyclin. Beim Tet-On-System liegt der reverse tetracyclinabhängiger Transaktivator (rtTA) vor, der eine Transkription erst nach Zugabe von Tetracyclin ermöglicht. Experimentell wird üblicherweise Doxycyclin (Dox) eingesetzt, ein stabileres Tetracyclin-Analogon (s. Abb. 1.5). Dieses System wird sowohl *in vitro* in Zelllinien eingesetzt, als auch zur Erzeugung gentechnisch veränderter Mausmodelle. Um Organspezifität zu erhalten, wird die Expression des tetracyclinabhängigen Transaktivators von einem entsprechenden Promoter kontrolliert, z.B. dem leberspezifischen LAP-Promoter (Kistner *et al.*, 1996). Mittlerweile gibt es viele kommerziell erhältliche Modelle, die das Tet-System beinhalten (Clontech Laboratories, Inc.). Neben den eingangs erwähnten Vorteilen, ist die einfache Verabreichung von Doxycyclin über Trinkwasser oder Futter ein klares Plus in der Regulation der Transgenexpression in gentechnischen Mausmodellen.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung des Tet-Systems. **Tet-Off (oben):** Mechanismus des tTA, der in Abwesenheit von Doxycyclin (-dox) an *tetO*-Sequenzen im Promoterbereich des Transgens (X) bindet und so dessen Transkription aktiviert, wohingegen in Anwesenheit von Doxycyclin (+dox) tTA nicht bindet und keine Transkription erfolgt. **Tet-On (unten):** Mechanismus des rtTA, der einen reversen Phänotyp im Vergleich zu tTA zeigt, Anwesenheit und Bindung von Doxycyclin (+dox) ist nötig um Transkription zu erreichen (Abbildung entnommen aus Kistner *et al.*, 1996). Abk.: P<sub>sp.</sub> = organspezifischer Promoter; VP16 = Aktivierungsdomäne des Virion Protein 16 des *Herpes Simplex Virus*; P<sub>min.</sub> = minimaler *CMV*-Promoter.

## 1.5 Fragestellung

Basierend auf den beobachteten Unterschieden in experimentell induzierten *Ctnnb1*- und *Ha-ras*-mutierten Mauslebertumoren, sowie der Zonierungshypothese, sollte der mögliche Antagonismus zwischen  $\beta$ -Catenin- und *Ha-ras*-Signalgebung in der Mausleber genauer untersucht und ein möglicher Vermittler des *Crosstalks* der beiden Signalwege aufgedeckt werden.

Da die mechanistische Rolle von *Ha-ras* in der murinen Hepatokarzinogenese und der Einfluss auf die Zonierung noch nicht in dem Maße ergründet ist, wie es für  $\beta$ -Catenin der Fall ist, sollte ein transgenes Mausmodell kreiert werden, das auf Grundlage des Tet-Systems eine schaltbare, daueraktive Form von *Ha-ras* trägt. Dazu wurde die häufigste Mutation, die in chemisch induzierten hepatozellulären Karzinomen in Mäusen auftritt, gewählt: eine Transversion von C nach A im Codon 61 des *Ha-ras*-Gens.

## 2 Material und Geräte

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Großgeräte

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau	Autoklav C
Blot-Kammer	Bio-Rad, München	Trans Blot Cell
Brutschrank	Kendro/Heraeus, Hanau	BB 220 CU
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, München	Mini Protean II
Folienschweißgerät	Krupps, Solingen	Vakupack 2
Heizblock	Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436
	Biometra, Göttingen	UNO-Thermoblock
Homogenisierer	ART, Müllheim	MICCRA D-9
Kameras	Nikon, Düsseldorf	Digital Camera Coolpix 950
	Raytest, Straubenhardt	CSC Chemoluminescence detection module
	Zeiss, Göttingen	AxioCam MRc
Kryostat-Mikrotom	Reichert-Jung, Wetzlar	Frigocut 2800
Lichtmikroskope	Leitz, Wetzlar	Labovert FS, Metallux 3 und DM IL
Magnet-Rührer	Bachofer, Reutlingen	MR 80
	Janke & Kunkel, Staufen	IKA-Combimac RCT/RET / IKA-Mag RH
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart	Bosch 600 W
Ofen	Heraeus, Hanau	VTR 5022
PCR-Geräte	Bio-Rad, München	MyCycler™ Thermal Cycler
	Perkin Elmer, Waltham, USA	GeneAmp PCR System 2400
	Roche, Penzberg	LightCycler <i>RealTime</i> PCR System
PCR-Kugel	Safetech Limited, Hongkong, China	Cleansphere CA 100
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl	HI 221
	WTW, Weilheim	pH 522
Photometer	peqlab, Erlangen	NanoDrop ND-1000
Schüttler	Braun, Melsungen	Certomat HK
	Heidolph, Kehlheim	Titramax 1000
Spannungsgeber	Desaga, Wiesloch	Desatronic 3x500/100
	Pharmacia, Uppsala	LKB EPS 500/400
	GibcoBRL, Karlsruhe	ST 305 / ST 606 T
Trockenschrank	Kendro/Heraeus, Hanau	---
UV-Illuminator	Biometra, Göttingen	TI 1
Viktor Plattenreader	Perkin Elmer, Waltham, USA	Viktor 3V
Vortexer	Bender & Hobein AG, Bruchsal	Vortex Genie 2 und L
Waage	Mettler, Giessen	Laborwaage P1200

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Waage	Sartorius, Göttingen	Analytic
Wasseraufbereitung	Millipore, Schwalbach	Milli Q Plus
Wasserbad	GF, Burgwedel	1083
Zellkulturbank	BDK, Sonnenbühl	Sterilbank UVF 6.12 S
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5410
	Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5417 R
	Heraeus, Hanau	Sepatech Biofuge 13
	Heraeus, Hanau	Sepatech Megafuge 1.0 R
	Heraeus, Hanau	Minifuge RF
	Hettich, Tuttlingen	Mikrorapid/K

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kleingeräte

Verbrauchsmaterial/Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
1,8 ml-Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden	CryoTubes™
10 cm-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen	633180
10 cm-Schalen	BD, Heidelberg	Falcon 3003
12 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen	163270
15 ml-Röhrchen	BD, Heidelberg	Falcon 2096
24-well-Platten	BD, Heidelberg	Falcon 3226
3,5 cm-Schalen	BD, Heidelberg	Falcon 3001
5 ml-Polystyren-Röhrchen	BD, Heidelberg	Falcon 2058
50 ml-Röhrchen	BD, Heidelberg	Falcon 2070
6 cm-Schalen	BD, Heidelberg	Falcon 3004
96-well-Platten transp.	Greiner, Frickenhausen	655101
96-well-Platten weiß	Nunc, Wiesbaden	F96 MicroWell Plates
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen	24x32 mm
	Menzel, Braunschweig	Ø 30 mm
Desinfektionsmittelkonzentrat	Braun, Melsungen	Helipur
Dewar-Transportgefäß	KGW-Isotherm, Karlsruhe	27 B (2 l)
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim	Peha-soft nitrile
Fettstift	Dako, Glostrup, DK	Pen No. S 2002
Filterpapier	Biometra, Göttingen	Whatman 3 mm Chr
Glasgeräte	Schott, Mainz	---
Glaspasteurpipetten	WU Mainz, Mainz	---
Glaspipetten	Brand, Wertheim	---
Glasplatten (f. Gelelektrophorese)	Biostep, Jahnsdorf	8,3/7,3 x 10,2 cm
Impföse	Greiner, Frickenhausen	731165
Käfige	Techniplast, Neumarkt	Macrolon Typ 2
Kanülen (0,45 x 13 / 0,9 x 40 mm)	BD, Heidelberg	Microlance 3
Kapillaren (f. LightCycler)	Roche, Penzberg	LightCycler Capillaries
Kolbenhubpipetten und Spitzen	Biozym, Oldendorf	---
	Eppendorf, Hamburg	---
	Greiner, Frickenhausen	---
	Sarstedt, Nümbrecht	---
	peqlab, Erlangen	---

Verbrauchsmaterial/Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Membranen (f. <i>Western Blotting</i> )	Millipore, Schwalbach	Immobilon-P (PVDF)
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, Dallas, USA	Safeskin Purple Nitrile
Objekttträger	Langenbrinck, Emmendingen	---
OP-Masken	Kimberly-Clark, Dallas, USA	The Lite One
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA	PM-996
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	peqlab, Erlangen	PCR-Tubes 0,2 ml
Pipettor (f. Glaspipetten)	Brand, Wertheim	accu-jet pro
Reaktionsgefäße	Biozym, Oldendorf	---
	Eppendorf, Hamburg	---
	Greiner, Frickenhausen	---
	Sarstedt, Nümbrecht	---
Skalpell	Braun, Melsungen	---
Spritzen	Braun, Melsungen	Injekt 10 ml
	BD, Heidelberg	Plastipak 2 ml, 10 ml
Sterilfilter 0,20 / 0,45 µm	Sartorius, Göttingen	Minisart
Sterilfilter 0,22 µm (500 ml)	Millipore, Schwalbach	Steritop 0,22 µm
Wattestäbchen	NeoLab, Heidelberg	---
Zählkammer	---	Fuchs-Rosenthal
Zellschaber	Corning Inc., NY, USA	Costar Cell Lifter
Zentrifugenadapter	Roche, Penzberg	LightCycler Centrifuge Adapters

## 2.2 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie/Biochemikalie	Hersteller
10x PCR Puffer II	PerkinElmer, Waltham, USA
10x Trypsin/EDTA	GibcoBRL, Karlsruhe
Aceton	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, 30%)	Roth, Karlsruhe
Agarose (peqGOLD universal)	peqlab, Erlangen
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma, Taufkirchen
Ampuwa (steriles H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	Fresenius-Kabi, Bad Homburg
APS	Roth, Karlsruhe
ATP	Sigma, Taufkirchen
Bacto Agar	Difco, Heidelberg
Bacto <i>Tryptone</i>	Difco, Heidelberg
Bacto <i>Yeast Extract</i>	Difco, Heidelberg
Bradford Reagenz	Bio-Rad, München
BrdU	Sigma, Taufkirchen
BSA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
CDP- <i>Star</i> , ready-to-use	Tropix, Weiterstadt
Coelenterazin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
<i>Complete Mini EDTA-free</i> (Protease-inhibitoren)	Roche, Penzberg
D-Luciferin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf
dNTP Mix (10 mM)	Promega, Mannheim

Chemikalie/Biochemikalie	Hersteller
Doxycyclin	Sigma, Taufkirchen
DTT	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid (1 mg/ml)	Serva, Heidelberg
FastRed Substrat	KemEnTec, Kopenhagen, DK
Ficoll PM Typ 400	Sigma, Taufkirchen
FKS	GibcoBRL, Karlsruhe
G418-BC (Geneticin)	Biochrom, Berlin
Genom. Maus-DNA (184 ng/μl)	Promega, Mannheim
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Taufkirchen
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin (99%)	Applichem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HEPES (Na-Salz)	Serva, Heidelberg
HEPES(Säure)	Sigma, Taufkirchen
Hoechst-33258 (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B	InvivoGen, San Diego, USA
I-Block	Tropix, Weiterstadt
Kanamycin (Monosulfat)	Sigma, Taufkirchen
LightCycler FastStart DNA Master SYBRGreen I	Roche, Penzberg
Lipofectamine 2000 (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM)	Roche, Penzberg
Milchpulver (Non-fat dry milk)	Bio-Rad, München
Oligo (dT) <sub>15</sub> Primer (100 μM)	Promega, Mannheim
Opti-MEM	GibcoBRL, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Passive Lysis Buffer (5x)	Promega, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
<i>PhosSTOP</i> (Phosphataseinhibitoren)	Roche, Penzberg
<i>Random Primers</i> (dN) <sub>6</sub> (2 mg/ml)	Roche, Penzberg
<i>Re-Blot Plus</i> Strong Solution (10x)	Millipore, Schwalbach
SAM (S-Adenosylmethionin)	NEB, Frankfurt a.M.
SB-216763	Sigma, Taufkirchen
Schweinenormalserum	Dako, Glostrup, DK
SDS-Lösung (20%)	Roth, Karlsruhe
Streptavidin, AP-konjugiert	Spa, Mailand, Italien
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tricin	Applichem, Darmstadt
Tris(Trizma)-Base	Sigma, Taufkirchen
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
Trockenmedium DMEM/F12	GibcoBRL, Karlsruhe
Trockenmedium DMEM	GibcoBRL, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasser PCR <i>grade</i>	Roche, Penzberg
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma, Taufkirchen
X-Gal	peqlab, Erlangen
Xylol Cyanol	Sigma, Taufkirchen

Alle nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

## 2.3 Software und Internetseiten

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
AxioVision Release 4.5 SP1	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen
Chromas Lite 2.01	Technelysium, Brisbane, Australia
Clone Manager 4.1	Sci-Ed Software, Cary, USA
CorelDRAW Graphics Suite 12	Corel Corporation, Ottawa, Canada
CSC Camera Controller 1.11	Raytest GmbH, Straubenhardt
EndNote X2	EndNote, Carlsbad, USA
LightCycler Runs 5.32	Roche Diagnostics, Mannheim
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop ND-1000 V3.2.1	PerkinElmer, Waltham, USA
OriginPro 8G	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Primer Premier 5.00	Premier Biosoft, Palo Alto, USA
TINA 2.09a	Raytest GmbH, Straubenhardt
Wallac manager 1420	Perkin Elmer, Waltham, USA

<b>Internetseite</b>
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
<a href="http://www.premierbiosoft.com">www.premierbiosoft.com</a>
<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3/">http://bioinfo.ut.ee/primer3/</a>
<a href="http://www.tools.neb.com/NEBcutter2">www.tools.neb.com/NEBcutter2</a>
<a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>
<a href="http://www.brenda-enzymes.org/">http://www.brenda-enzymes.org/</a>
<a href="http://www.graphpad.com/quickcalcs/">http://www.graphpad.com/quickcalcs/</a>
<a href="http://www.r-project.org/">http://www.r-project.org/</a>

## 2.4 Mausstämme

Stamm	Quelle	Referenz
Alb-Cre (B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA	
<i>Ctnnb1</i> <sup>loxP/loxP</sup>	J. Huelsken, Schweizer Institut für experimentelle Krebsforschung, Lausanne, Schweiz	Huelsken <i>et al.</i> , 2001
<i>Apc</i> <sup>loxP/loxP</sup> , TTR-Cre <sup>Tam</sup>	S. Colnot, Institut Cochin, Paris, Frankreich	Colnot <i>et al.</i> , 2004; Benhamouche <i>et al.</i> , 2006
tTA-LAP (B6.Cg-Tg(tTALAP)5Bjd/J)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA	Kistner <i>et al.</i> , 1996

## 2.5 Zelllinien

Name	Zelltyp	Mutationsstatus	Referenz
70.4	Maushepatom, C3H/He-Stamm	<i>Ctnnb1</i> wt/wt <i>Ha-ras</i> wt/wt	Kress <i>et al.</i> , 1992
70.4 STF	Stabil transfizierter Subklon von 70.4	<i>Ctnnb1</i> wt/wt <i>Ha-ras</i> wt/wt	Braeuning <i>et al.</i> , 2007b
70.4 Tet-On	mit pTet-On-Advanced stabil transfizierter Subklon von 70.4	<i>Ctnnb1</i> wt/wt <i>Ha-ras</i> wt/wt	Diplomarbeit Nina Stiegler, Tübingen 2009
70.4 Mo	mit pTRE-Tight-βCat <sup>S33Y</sup> stabil transfizierter Subklon von 70.4 Tet-On	<i>Ctnnb1</i> wt/wt <i>Ha-ras</i> wt/wt	Diplomarbeit Moritz Horn, Tübingen 2010 Zeller <i>et al.</i> , 2012
Hepa1c1c.7	Maushepatom, C57L/J-Stamm	<i>Ctnnb1</i> del/wt <i>Ha-ras</i> mt/mt → Q61K	Hankinson, 1979
MCF7 Tet-Off®	Humanes Mammakarzinom, mit pTet-Off stabil transfizierter Subklon		Clontech, Mountain View, USA

## 2.6 Primer

## Primer für die LightCycler-PCR

Name		Sequenz (5' – 3')	Produkt [bp]
18S rRNA	Fwd	CGGCTACCACATCCAAGGAA	187
	Rev	GCTGGAATTACCGCGGCT	
Axin2	Fwd	CGACGCACTGACCGACGATT	264
	Rev	TCCAGACTATGGCGGCTTTCC	
Dusp6	Fwd	AATAGCAGCGACTGGAATGAGAAC	455
	Rev	TCGCCCGCATTCTCAAACA	
Dusp14	Fwd	CACCGGCACACTCGATCTGAT	140
	Rev	CTCCTCCACCAGGGAATCCAA	
Egfr	Fwd	TTGGTGCCACCTGTGTGAA	68
	Rev	TCGGACACATGAGCCATGAT	
Egr1	Fwd	CGAGCGAACAACCCTATGAG	347
	Rev	CGCAGCCGAGTAGATGGGAC	
GS	Fwd	GCGAAGACTTTGGGGTGATA	158
	Rev	GTGCCTCTTGCTCAGTTTGTC	
ras-TG	Fwd	TCGGTACCCGGGGATCCACTA	109
	Rev	GCGCCACCACCACAAGCT	

Primer für die Klonierung von pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>

Name		Sequenz (5' – 3')	Produkt [bp]
mHaras1_F	Fwd	GATTGGCAGCCGCTGTAGA	742
mHaras1_R	Rev	AAATTGTCCATGCGAAGGTCT	

## Primer für die Sequenzierung

Name		Sequenz (5' – 3')
M13_rev	Rev	CAGGAAACAGCTATGAC
M13_uni	Fwd	GTAAACGACGGCCAG
pEBFP_C1 rev	Rev	TCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGG
pTRE-Tight Sequencing	Fwd	TATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA
	Rev	TATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA
Ras_61A2	Rev	GAGACATGTCTACTGGACATCTT
Ras_61B2	Fwd	GTGCGCATGTA CTGGTCCCGCAT
ras-TG_hinten	Fwd	GCGTGGAGGATGCCTTCTAT
	Rev	CAAATGTGGTATGGCTGATTATG

## Primer für die Genotypisierung

Name		Sequenz (5' – 3')	Produkt [bp]
ras-TG_hinten	Fwd	GCGTGGAGGATGCCTTCTAT	365
	Rev	CAAATGTGGTATGGCTGATTATG	
ras-TG_neu	Fwd	CGAGGTAGGCGTGTACGGT	223
	Rev	CTGGATGGTCAGGGCACTCT	
tTA-LAP	Fwd	CGCTGTGGGGCATTCTTTACTTTAG	450
	Rev	CATGTCCAGATCGAAATCGTC	

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Western Blotting

#### Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verd.	Bestell-Nr.	Hersteller	Proteingröße
DUSP6 <sup>[1]</sup>	Kaninchen	1:1.000 in <sup>[1]</sup>	LS-C50083	LifeSpan BioSciences, Seattle, USA	42 kDa
EGFR <sup>[2]</sup>	Kaninchen	1:500 in <sup>[4]</sup>	1005/ sc-03	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	170 kDa
GAPDH <sup>[1]</sup>	Maus	1:1.000 in <sup>[1]</sup>	MAB374	Chemicon, Hampshire, UK	37 kDa
p44/42 MAPK (Erk 1/2) <sup>[3]</sup>	Kaninchen	1:1.000 in <sup>[5]</sup>	9102	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	42/44 kDa
phospho- p44/42 MAPK (Erk 1/2) <sup>[3]</sup>	Kaninchen	1:1.000 in <sup>[5]</sup>	4376	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	42/44 kDa

Blockpuffer: <sup>[1]</sup>1-Block; <sup>[2]</sup>3% BSA in TBS/T; <sup>[3]</sup>Milchpulver; <sup>[4]</sup>1% BSA in TBS/T; <sup>[5]</sup>5% BSA in TBS/T

#### Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bestell-Nr.	Hersteller
Kaninchen IgG AP-konjugiert	Ziege	1:10.000 in <sup>[1],[3],[4]</sup>	AP132A	Millipore, Schwalbach
Maus IgG AP-konjugiert	Ziege	1:10.000 in <sup>[1]</sup>	AP124	Millipore, Schwalbach

### 2.7.2 Immunhistochemie

#### Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verd.	Fixierung	Bestell-Nr.	Hersteller
BrdU	Maus	1:50	Kryo Paraffin	M0744	Dako, Glostrup, Dänemark
CYP1A2	Kaninchen	1:1.000	Kryo Paraffin	---	Gabe von Dr. R. Wolf, Universität von Dundee, UK
CYP2C6					
CYP2E1					
CYP3A1					
E-Cadherin	Kaninchen	1:25	Kryo Paraffin	3194	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
EGR1 (15F7)	Kaninchen	1:100	Paraffin	4153	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
FBP1	Kaninchen	1:100	Paraffin	sc-66946	
GS	Kaninchen	1:1.000	Kryo Paraffin	G2781	Sigma, Taufkirchen

Antigen	Spezies	Verd.	Fixierung	Bestell-Nr.	Hersteller
GSTm	Kaninchen	1:500	Kryo Paraffin	---	Gabe von Dr. R. Wolf, Universität von Dundee, UK
PEPCK	Kaninchen	1:50	Paraffin	sc-32879	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
phospho-p44/42 MAPK	Kaninchen	1:100	Paraffin	4376	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

**Sekundärantikörper**

Antigen	Spezies	Verd.	Fixierung	Bestell-Nr.	Hersteller
Kaninchen IgG HRP-konjugiert	Schwein	1:20	Kryo Paraffin	P0217	Dako, Glostrup, DK
Kaninchen IgG Biotinyliert	Ziege	1:200	Paraffin	FR14-61	Spa, Mailand, Italien
Maus IgG HRP-konjugiert	Ziege	1:000	Paraffin	A-2554	Sigma, Taufkirchen

## 2.8 Plasmide

Name	Quelle	Resistenz
<b>AP-1</b>		
abgeleitet von pT81luc: enthält 11 AP-1-Bindestellen (TPA responsive Elemente), für die Reporter-gen-Untersuchung	Dr. Köhle, Tübingen	Ampicillin
<b>pCR2.1-TOPO</b>		
enthält <i>LacZ<math>\alpha</math></i> -Fragment unter der Kontrolle des T7-Promoters, Teil des TOPO TA Cloning Kits	Invitrogen, Karlsruhe	Ampicillin Kanamycin
<b>pT81luc</b>		
Expression der <i>Firefly</i> -Luciferase unter der Kontrolle eines trunkierten Herpes simplex Virus Thymidinkinase-Promoters	Dr. Gaunitz, Tübingen Nordeen, 1988	Ampicillin
<b>pRL-CMV</b>		
Expression der <i>Renilla</i> -Luciferase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalievirus-Promoters, für die Reporter-gen-Untersuchung	Promega, Mannheim	Ampicillin
<b>pTAluc/STF</b>		
Expression der <i>Firefly</i> -Luciferase unter der Kontrolle von 7 TCF/LEF-Bindestellen, für die Reporter-gen-Untersuchung	pTAluc: Clontech, Mountain View, USA	Ampicillin
<b>pTet-On-Advanced</b>		
Expression des rtTA-Proteins unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalievirus-Promoters	Clontech, Mountain View, USA	Ampicillin Kanamycin
<b>pTRE-Tight</b>		
enthält MCS unmittelbar <i>downstream</i> eines Tet-responsiven P <sub>tight</sub> -Promoters, welcher in Abwesenheit von tTA- oder rtTA-Proteinen nicht aktiv ist	Clontech, Mountain View, USA	Ampicillin

## 2.9 Kits

Name	Hersteller
High Pure PCR Cleanup Micro Kit	Roche, Penzberg
peqGOLD Cycle-Pure Kit	Peqlab, Erlangen
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit	Peqlab, Erlangen
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.10 Bakterien

Name	Hersteller
OneShot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.11 Enzyme

Name	Hersteller
AMV Rev Transkriptase (10 U/μl)	Promega, Mannheim
<i>Aat</i> II (NEBuffer 4 + SAM)	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Bam</i> HI (NEBuffer 3)	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Bpu</i> EI (NEBuffer 4 + SAM)	NEB, Frankfurt a.M.
DNase I (10 U/μl)	Roche, Penzberg
<i>Eco</i> RI ( <i>Eco</i> RI Buffer)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hind</i> III (NEBuffer 2)	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Not</i> I (NEBuffer 3)	NEB, Frankfurt a.M.
<i>PfuUltra</i> <sup>TM</sup> High-Fidelity Polymerase (2,5 U/μl)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot
SAP (SAP-Puffer)	NEB, Frankfurt a.M.
T4 DNA-Ligase (3 U/μl)	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -Polymerase (1-5 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xba</i> I	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.12 Lösungen und Puffer

### 2.12.1 Zellkultur

#### DMEM/F12 bzw. DMEM zur Zellkultur, pH 7,2

Reagenz	Menge	
Trockenmedium (GibcoBRL)	6 g	
NaHCO <sub>3</sub>	1,22 g	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 450 ml	
Sterilfiltrieren (0,22 µm), Lagerung bei 4°C		
Zugabe unmittelbar vor Verwendung:		
Reagenz	Menge	Endkonzentration
FKS, hitzeinaktiviert (30 min, 56°C)	5-50 ml	1-10%
P/S (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	5 ml	1%
20 mg/ml Genitacin (70.4 STF/Tet-On/Mo, MCF7 Tet-Off)	2,5 ml	100 µg/ml
Hygromycin B (70.4 Mo)	0,5 ml	100 µg/ml
Lagerung bei 4°C		

#### 10x PBS pH 7,4

Reagenz	Menge	Endkonzentration
NaCl	80 g	1,4 M
KCl	2 g	27 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	15 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	14,35 g	80 mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml	
Autoklavieren		

#### 100 mM HEPES Puffer pH 7,4

Reagenz	Menge
HEPES (Säure)	11,92 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

#### 20 mg/ml Genitacin-Lösung

Reagenz	Menge
G418-BC (Aktivität 759 µg/mg)	1,32 g
100 mM HEPES Puffer pH 7,4	ad 50 ml
Sterilfiltrieren (0,45 µm), Lagerung bei -20°C	

#### 10x Alamar Blue-Lösung für Zellviabilität

Reagenz	Menge
Resazurin	10 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10 ml
Sterilfiltrieren (0,45 µm), Lagerung bei 4°C	

## 2.12.2 Zellbehandlungen

Reagenz	Stammkonzentration	Lösemittel	Endkonzentration
Doxycyclin	1 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1–10 µg/ml
EGF	50 ng/µl	PBS + 0,1% BSA	50 ng/ml
FKS	---	---	10%
LiCl	1 M	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	15 mM
NaCl	1 M	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	15 mM
PD98059	10 mM	DMSO	10 µM
SB-216763	10 mM	DMSO	5 µM
U0126	10 mM	DMSO	10 µM
Sterilfiltrieren (0,45 µm), Aliquotieren, Lagerung bei 4°C (NaCl / LiCl) bzw. -20°C Doxycyclin zusätzlich lichtgeschützt			

## 2.12.3 Proteinisolierung und *Western-Blotting*

### 50 mM Natriumvanadat-Lösung pH 7,0 (Fohr *et al.*, 1989)

Reagenz	Menge
KOH-Plättchen	12 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	20 ml
Natriumvanadat	460 mg
Mit HCl <sub>conc</sub> auf pH 7,0; mehrmals aufkochen und abkühlen lassen, bis Lösung farblos ist	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 50 ml
Lagerung bei -20°C	

### WCE-Puffer pH 7,5

Reagenz	Menge	Endkonzentration
HEPES (Na-Salz)	1,3 g	50 mM
NaCl	0,88 g	150 mM
Glycerin (50%)	20 ml	10% (v/v)
Triton-X-100	1 ml	1% (v/v)
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	30 mg	1,5 mM
EGTA	38 mg	1 mM
NaF	420 mg	100 mM
Natriumpyrophosphat·10 H <sub>2</sub> O	450 mg	10 mM
Natriumvanadat-Lösung (50 mM)	400 µl	200 µM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml	
Lagerung bei 4°C Vor Gebrauch in 10 ml jew. eine Tablette <i>Complete Mini EDTA-free</i> und <i>PhosSTOP</i>		

### 1,5 M Tris/HCl pH 8,9

Reagenz	Menge
Tris-Base	181,71 g (1,5 M)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

**0,5 M Tris/HCl pH 6,8**

Reagenz	Menge
Tris-Base	60,57 g (0,5 M)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

**Acrylamid-Stammlösungen**

Reagenz	Menge		
	Trenngel 12,5%	Trenngel 8%	Sammelgel 4%
30% Acrylamid	84 ml	54 ml	26,6 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,9	50 ml	50 ml	---
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	---	---	50 ml
20% SDS	1 ml	1 ml	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 200 ml	ad 200 ml	ad 200 ml
Lagerung bei 4°C			

**10% APS**

Reagenz	Menge
Ammoniumperoxodisulfat	1,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 12 ml
Lagerung bei 4°C	

**2x Lämmli**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Tris-Base	1,51 g	125 mM
Glycerin	20 ml	20% (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 25 ml	auf pH 6,8
SDS	4 g	4% (w/v)
β-Mercaptoethanol	10 ml	10% (v/v)
Bromphenolblau	4 mg	0,004% (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml	
Lagerung bei -20°C		

**10x SDS-PAGE Laufpuffer**

Reagenz	Menge
Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
20% SDS	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

**10x Transferpuffer**

Reagenz	Menge
Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
für 1x Transferpuffer	
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
Lagerung bei 4°C	

**PBS/T pH 7,4**

Reagenz	Menge
10x PBS	100 ml
Tween 20	0,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

**10x TBS pH 7,4**

Reagenz	Menge
Tris-Base	60 g
NaCl	58 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

**TBS/T pH 7,4**

Reagenz	Menge
10x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

**I-Block**

Reagenz	Menge
1x PBS	1000 ml
Tween 20	500 µl
I-Block	6,65 g
Lösen bei 50°C, Lagerung bei 4°C	

**Milchpulver**

Reagenz	Menge
PBS/T	100 ml
Milchpulver	5 g
Lagerung bei 4°C	

**10x Assay-Puffer**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Tris-Base	24,2 g	2 M
auf pH 9,5 einstellen		
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	2,03 g	100 mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml	

2.12.4 Immunhistochemische Färbung

**Carnoy-Fixierung**

Reagenz	Menge
EtOH	60 ml
CHCl <sub>3</sub>	30 ml
Eisessig	10 ml

**10x Citratpuffer 0,1 M pH 6**

Reagenz	Menge
Zitronensäure (Na-Salz)	29,41 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**TBS/T für IHC pH 7,4**

Reagenz	Menge
Tris-Base	6 g
NaCl	5,8 g
Tween-20	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**TB-Puffer pH 8,7**

Reagenz	Menge
Tris-Base	6 g
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	406 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**PBS/S**

Reagenz	Menge
PBS	100 ml
BSA	1 g
NaCl	2,03 g

**Acetatpuffer**

Reagenz	Menge
NaAc	6,48 g
HAc	1,21 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**AEC-Färbepuffer**

Reagenz	Menge
N,N'-Dimethylformamid	1 ml
3-Amino-9-Ethylcarbazol	4 mg
Acetatpuffer	14 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) (kurz vor Gebrauch)	15 µl

**Mayer's Hämalan**

Reagenz	Menge
Hämatoxylin	1 g
NaIO <sub>3</sub>	0,2 g
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12 H <sub>2</sub> O	50 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure·1 H <sub>2</sub> O	1 g

**Tris-Maleat-Puffer 0,2 M**

Reagenz	Menge
Tris-Base	24,2 g
Maleinsäure	23,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**G-6-Pase-Inkubationspuffer**

Reagenz	Menge
Tris-Maleat-Puffer	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	133 ml
2%ige Blei(II)-nitrat Lösung	25 ml (tröpfchenweise)
Glucose-6-Phosphat (kurz vor Gebrauch)	250 mg

**Boratpuffer pH 7,6**

Reagenz	Menge
Borsäure	10,54 g
Di-Natriumtetraborat	2,87 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**DAB-Färbelösung**

Reagenz	Menge
3'-3'-Diaminobenzidin	5 mg
0,05 M Tris/HCl-Lösung	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	15 µl

2.12.5 Bakterienkultivierung

**LB-Medium zur Kultur von *E.coli*, pH 7**

Reagenz	Menge
Bacto <i>Tryptone</i>	10 g
Bacto <i>Yeast Extract</i>	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
Autoklavieren, Lagerung bei RT	

**Selektionsantibiotika für 1 l LB-Medium**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Ampicillin (100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	1 ml	100 µg/ml
Kanamycin (50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	1 ml	50 µg/ml

**Agarplatten zur Kultur von *E.coli***

Reagenz	Menge
LB-Medium	1 l
Bacto Agar	15 g
Autoklavieren, Zugabe Selektionsantibiotikum, in 10 cm-Petrischalen, Lagerung bei 4°C	

**LB-Glycerin-Medium für Bakterienstocks**

Reagenz	Menge
LB-Medium	5 ml
Glycerin (99%)	5 ml
Sterilfiltrieren (0,45 µm), Lagerung bei -20°C	

## 2.12.6 Agarose-Gelelektrophorese

**50x TAE-Puffer**

Reagenz	Menge
Tris-Base	242 g
EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml
Eisessig	57,1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**Ladepuffer**

Reagenz	Endkonzentration
Saccharose	50% (w/v)
SDS	1% (w/v)
Orange G-Farbstoff	0,5% (w/v)

**Ethidiumbromid-Lösung**

Reagenz	Menge
Ethidiumbromid	10 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1 ml
Lagerung bei 4°C	

## 2.12.7 Reporteragen-Untersuchung

**1000x Coelenterazin**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Coelenterazin	0,605 mg	1,43 mM
Methanol	1 ml	
Lagerung in 50 µl Aliquots lichtgeschützt bei -80°C		

**1 M K<sub>x</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer pH 5,1**

Reagenz	Menge
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3 H <sub>2</sub> O	22,82 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,02 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	350 ml

**Renilla-Luciferase-Puffer pH 5**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Na <sub>2</sub> EDTA (200 mM)	11 ml	2,2 mM
K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer	220 ml	220 mM
BSA	0,44 g	0,44 mg/ml
NaCl	64,3 g	110 mM
Na-Azid	0,845 g	1,3 mM
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml	
Sterilfiltrieren (0,22 µm), in 10 ml Aliquots bei -80°C lagern Vor Gebrauch 10 µl Coelenterazin (1000x) pro 10 ml zugeben		

**1 M DTT**

Reagenz	Menge
DTT	1,545 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	10 ml

**Firefly-Luciferase-Puffer pH 8**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
ATP	292 mg	530 µM
Coenzym A	207 mg	270 µM
Tricin	3,58 g	20 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	1,32 g	5,34 mM
EDTA (200 mM)	500 µl	0,1 mM
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml	
auf Eis kühlen		
D-Luciferin	132 mg	470 µM
Lagerung in 10 ml Aliquots lichtgeschützt bei -80°C Vor Gebrauch 333 µl 1 M DTT (Endkonzentration 33,3 mM) pro 10 ml zugeben		

2.12.8 Pronukleusinjektion

**Mikroinjektions-Puffer pH 7,5**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Tris-Base	0,048 g	10 mM
EDTA (10 mM)	400 µl	0,1 mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 40 ml	
Sterilfiltration (0,2 µm), Lagerung bei 4°C		

## 2.12.9 Genotypisierung und Polyacrylamid-Gelelektrophorese

**Proteinase K-Mix**

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> (steril)	17.500 µl
10x PCR Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2000 µl
Proteinase K (20 mg/ml)	500 µl
Lagerung in 1,8 ml Aliquots bei -20°C	

**5x TBE-Puffer pH 8**

Reagenz	Menge
Tris-Base	54 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA pH 8	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

**10x Ladepuffer**

Reagenz	Menge
Bromophenolblau	25 mg
Xylol Cyanol	25 mg
Ficoll PM Typ 400	1,5 g
0,5 M EDTA pH 8	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10 ml
Lagerung bei 4°C	

**10% Acrylamid-Gel**

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	16,6 ml
5x TBE-Puffer	7,2 ml
Acrylamid (30%)	12 ml
APS (10%)	200 µl
TEMED	20 µl

**Ethidiumbromid-Färbelösung**

Reagenz	Menge	Endkonzentration
Ethidiumbromid	10 mg	0,5 µg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	1 ml	

## 2.12.10 Größenmarker

Name	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler (Plus) Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pBR322 DNA- <i>Msp</i> I digest	NEB, Frankfurt a.M.

## 3 Methoden

### 3.1 Neubewertung von Genexpressionsanalysen

DNA-Microarray-Daten früherer Affymetrix-Genexpressionsanalysen unserer Gruppe werden reevaluiert und hinsichtlich der Fragestellung dieser Arbeit miteinander verglichen (Stahl *et al.*, 2005; Braeuning *et al.*, 2006; Jaworski *et al.*, 2007; Lempiainen *et al.*, 2013).

In Zusammenarbeit mit Michael Römer (AG Prof. Dr. A. Zell Abteilung Kognitive Systeme Fachbereich Informatik der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen) unter Anwendung der Software R, werden Analysen der Neubewertung in Form von Heatmaps dargestellt.

### 3.2 Zellkultur

#### 3.2.1 Allgemeines

Um Kontaminationen durch Mikroorganismen zu vermeiden, muss auf Sterilität geachtet werden. Die Arbeiten werden unter einer Sterilbank mit Umluft ausgeführt, die bei Nichtgebrauch zusätzlich mit UV-Licht ausgeleuchtet wird. Hitzestabile Geräte und Lösungen werden autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen und Zellkulturmedien werden sterilfiltriert (0,22 bzw. 0,45  $\mu\text{m}$ ). Die Zellen werden in einem feuchten, begasten Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt (für einen konstanten pH zwischen 7,2 und 7,4) und einer Luftfeuchtigkeit nahe dem Sättigungsbereich (96-98%) kultiviert.

Alle Maushepatomzellen werden mit DMEM/F12-Medium kultiviert, die MCF7-Zellen mit DMEM.

#### 3.2.2 Medienwechsel und Subkultivierung

Das Medium von Erhaltungskulturen wird jeden zweiten Tag erneuert. Dazu wird das alte mithilfe einer Pastuerpipette vorsichtig abgezogen und durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt.

Zur Subkultivierung werden die Zellen durch Verwendung von Trypsin von ihrem Untergrund abgelöst. Diese Reaktion wird durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt. Dann werden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellzahl der Suspension wird durch eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Anschließend werden die Zellen nach Bedarf verdünnt und ausplattiert.

### 3.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eingefrorene Zellen, die aus einem N<sub>2</sub>-Tank entnommen werden, werden bei Raumtemperatur schnell aufgetaut und in ein 15 ml-Röhrchen, das 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium enthält, überführt. Nach kurzer Zentrifugation (150xg, 5 min, 4°C), wird der Überstand entfernt und die sedimentierten Zellen in frischem Medium aufgenommen und ausplattiert. Zur Entfernung von toten Zellen, wird bereits nach einem Tag ein Medienwechsel durchgeführt.

Zum Einfrieren werden Zellen, die eine Konfluenz von 70-90% aufweisen trypsinisiert und zentrifugiert (150xg, 5 min, 4°C). Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellen in 1,5 ml einer Mischung aus 90% Medium und 10% DMSO resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis, werden die Röhrchen über Nacht bei -80°C eingefroren und dann in flüssigen N<sub>2</sub> zur Lagerung überführt.

### 3.2.4 Behandlung von Zellen

Das Zellkulturmedium wird durch frisches Medium ersetzt, das die Behandlungschemikalie in richtiger Konzentration enthält. Die Zellen werden dabei 24 bzw. 48 h vor ihrer Ernte oder der Luciferase-Messung behandelt. Die Substanzen und deren Konzentrationen sind 3.12.2 zu entnehmen.

Eine Ausnahme bildet die zweite Behandlung bei Zellen, die zur Proteingewinnung und für *Western Blotting* verwendet werden. Hierbei werden 1 ml FKS oder 10 µl EGF (50 ng/µl) direkt in das Medium einer 10 cm-Zellkulturschale gegeben. Die Zellen werden dann 5 bzw. 10 min später geerntet.

### 3.3 RNA-Untersuchung

#### 3.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Absorption von DNA- und RNA-Lösungen wird bei 260 und 280 nm durch ein NanoDrop-Photometer gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption bei 260 nm verwendet. Der Quotient 260/280 ist ein Indikator für die Reinheit und sollte bei DNA bei ~1,8 und bei RNA bei ~2 liegen.

#### 3.3.2 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA aus Gewebe werden gefrorene Leberstückchen mit 500 µl TRIzol versetzt und mithilfe des Homogenisierers MICCRA homogenisiert.

Zur Isolierung aus Zellkultur werden Zellen einer 12-*well*-Platte mit eiskaltem PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 500 µl TRIzol pro *well* abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Nach Angaben des Herstellers erfolgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender EtOH-Präzipitation, wobei die RNA am Ende in H<sub>2</sub>O aufgenommen wird.

#### 3.3.3 DNase-Verdau

Um Sicherzugehen, dass die gesamte genomische DNA entfernt wird, werden bis zu 100 µg RNA mit 25-50 U DNase I in einem Gesamtvolumen von 50-100 µl für 30 min bei 37°C behandelt. Es folgt erneut eine Phenol-Chloroform-Extraktion.

#### 3.3.4 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription werden 375 ng RNA mit 4 U AMV reverse Transkriptase, Oligo d(T)<sub>15</sub> und *Random* d(N)<sub>6</sub> Primern versetzt. Die Reaktion erfolgt für 1 h bei 42°C und wird durch eine anschließende Hitzeinaktivierung bei 95°C für 15 min gestoppt.

### 3.3.5 LightCycler-*RealTime*-PCR

Zur Expressionsanalyse wird ein Kapillar-basiertes LightCycler-System von Roche verwendet. Die Amplifikation wird dabei durch Fluoreszenz des eingesetzten FastStart DNA Master SYBR Green I Kit gemessen.

Die PCR-Temperaturprogramme sind der folgenden Tabelle (3.1) zu entnehmen:

**Tabelle 3.1: LightCycler-*RealTime*-PCR**

Primer	Aktivierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zykluszahl
18S rRNA	95°C, 10 min	95°C, 5 s	68°C, 5 s	72°C, 8 s	35
Axin2	95°C, 10 min	95°C, 8 s	62°C, 8 s	72°C, 11 s	50
Dusp6	95°C, 10 min	95°C, 10 s	68°C, 5 s	72°C, 20 s	50
Dusp14	95°C, 10 min	95°C, 10 s	65°C, 4 s	72°C, 5 s	50
Egfr	95°C, 10 min	95°C, 5 s	60°C, 5 s	72°C, 6 s	55
Egr1	95°C, 10 min	95°C, 7 s	62°C, 7 s	72°C, 13 s	50
GS	95°C, 10 min	95°C, 0 s	60°C, 5 s	72°C, 10 s	35
ras-TG	95°C, 10 min	95°C, 10 s	65°C, 5 s	72°C, 4 s	50

## 3.4 Proteinuntersuchung

### 3.4.1 Isolierung von Proteinen

Zur Isolierung von Protein aus Gewebe werden gefrorene Leberstückchen mit 500 µl WCE-Puffer versetzt und homogenisiert.

Kultivierte Zellen werden mit eiskaltem PBS gewaschen, von ihrer Zellkulturschale heruntergeschabt, durch Zentrifugation (150xg, 5 min, 4°C) pelletiert und dann werden 50 µl WCE-Puffer zugegeben.

Die Zellyse erfolgt für 30 min bei 4°C, wobei die Lysate alle 5 min stark geschüttelt werden um eine optimale Suspension der membrangebundenen Proteine zu erhalten.

### 3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationen werden durch den Bradford-Test bestimmt. In der Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 465 zu 595 nm. Der Proteingehalt von Proben kann durch den Vergleich zu einer BSA-Standardreihe ermittelt werden.

### 3.4.3 *Western Blotting*

Die Proteinlösungen werden 1:1 mit 2x Lämmli versetzt und für 15 min bei 95°C denaturiert. Anschließend werden die Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel mit entsprechender Acrylamidkonzentration aufgetrennt. Die Proteine werden durch ein Tank-*Blotting*-Verfahren bei 400 mA für 150 min auf PVDF-Membranen übertragen.

Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch einen geeigneten Blockpuffer werden die gewünschten Proteine durch Bindung eines Antigen-spezifischen Primäantikörpers (4°C, ÜN) und einem geeigneten AP-konjugierten Sekundäantiköpers (RT, 2 h) mit CDP-Star als Substrat (RT, 45 min) sichtbar gemacht. Die entstehenden Chemielumineszenz-Signale werden mit einem CSC-Kamerasystem erfasst.

Zur Bestimmung einer Ladekontrolle, können Membranen wiederverwendet werden, nachdem sie für 20 min mit 1x *Re-Blot Plus Strong*-Lösung bei RT behandelt worden sind.

## 3.5 Immunhistochemie

### 3.5.1 Kryo-Schnittpräparate

Aus gefrorenen Leberlappen werden mit einem Kryo-Mikrotom 10 µm-dicke Schnittpräparate erstellt und auf Objektträger übertragen. Diese werden in 3%iger Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt.

### 3.5.2 Carnoy-Fixierung

Lebergewebe wird über Nacht in Carnoy-Fixierungslösung inkubiert. Es folgt eine Dehydratisierung in Isopropanol über Nacht und schließlich eine Einbettung in Paraffin. Davon werden 5 µm-dicke Schnittpräparate angefertigt und auf silanisierte Objektträger übertragen. Vor Färbung werden diese in Xylol entparaffiniert und in 100-50% EtOH rehydratisiert.

### 3.5.3 HE-Färbung

Kryo-Schnittpräparate werden für 5 min in Mayer's Hämalaun inkubiert und dann in einer alkoholischen Lösung von Eosin für 3 min gefärbt. Durch weitere Spülschritte über

Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration (50-100%) wird das Wasser aus dem Gewebeschnitt verdrängt. Schließlich wird der entwässerte Schnitt in Xylol geklärt, in Kaisers Glyceringelatine eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt.

#### 3.5.4 G-6-Pase-Färbung

Kryo-Schnittpräparate werden in Glutaraldehyd fixiert und anschließend in G-6-Pase-Inkubationspuffer für 20-30 min inkubiert. Das Reaktionsprodukt wird durch Behandlung mit 1%iger  $(\text{NH}_4)_2$ -Lösung ausgefällt, gefolgt von einem zweiten Glutaraldehyd-Fixierungsschritt (Wachstein und Meisel, 1957).

#### 3.5.5 GS-Färbung

Die endogenen Peroxidase-Aktivitäten in formaldehydfixierten Kryo-Schnittpräparaten bzw. Paraffin-eingebetteten Carnoy-fixierten Schnitten werden durch 15-minütige Inkubation mit Methanol/0,15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  inaktiviert. Nachdem unspezifische Bindungen mit Schweinenormalserum (1:30 in PBS/S) geblockt werden, bindet der Primärantikörper (in PBS/S) bei 4°C über Nacht. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (in PBS/S) bindet für 30 min bei RT. Nach kurzer Behandlung mit Acetatpuffer, gefolgt von 30-minütiger Inkubation in AEC-Färbepuffer wird das farbige HRP-Endprodukt nachweisbar gebildet. Die Zellkerne werden durch Mayer's Hämalaun gegengefärbt. Zum Schluss werden die Schnitte in Kaisers Glyceringelatine eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt.

#### 3.5.6 CYP1A1/2C6/2E1/3A1-, E-Cadherin-, EGR1-, FBP1-, GSTm-, PEPCCK- und phospho-MAPK-Färbung

Entparaffinierte Paraffinschnitte werden in 0,01 M Citratpuffer für 25 min in der Mikrowelle gekocht und nach Abkühlen mit 3% BSA in TBS/T für 60 min bei RT versetzt um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der Primärantikörper (in 3% BSA in TBS/T) bindet bei 4°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wird mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (in 3% BSA in TBS/T) für 1 h bei RT inkubiert. Nach kurzen Waschschritten mit PBS/T werden die Schnittpräparate mit Streptavidin-AP-Komplexen (1:200 in 3% BSA in TBS/T) für 30 min bei RT inkubiert. Die AP-Enzymaktivität wird nach 15-minütiger Inkubation mit FastRed detektiert. Die Zellkerne werden durch Mayer's Hämalaun gegengefärbt und die Schnitte in Kaisers Glyceringelatine eingebettet.

### 3.5.7 BrdU-Färbung

Entparaffinierte Paraffinschnitte werden in 0,01 M Citratpuffer für 25 min in der Mikrowelle gekocht und nach Abkühlen die Zellkerne durch Mayer's Hämalaun gefärbt. Es folgt eine 3-minütige Behandlung mit 0,01% Trypsin in Boratpuffer und dann eine Blockierung mit Schweinenormalserum (1:30 in PBS/S). Der Primärantikörper (in PBS) bindet bei 4°C über Nacht. Es folgt eine Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (in PBS/S) für 30 min bei RT und eine 5-minütige Inkubation mit DAB-Färbelösung. Die Zellkerne werden durch Mayer's Hämalaun gegengefärbt und durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylolbehandlung entwässert. Zum Schluss werden die Schnitte in Entellan eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt.

## 3.6 Analyse und Design von Plasmiden

### 3.6.1 Bakterienkultivierung zur Plasmidgewinnung

Die Transformation von *E. coli* mit den gewünschten Plasmiden erfolgt durch einen 30-sekündigen Hitzeschock bei 42°C gemäß den Angaben der Hersteller. Die transformierten Bakterien werden dann auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum bzw. –antibiotika enthalten, ausplattiert und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C herangezüchtet. Einzelklone werden gepickt und in LB-Medium, das wieder das entsprechende Selektionsantibiotikum bzw. –antibiotika enthält, auf einem Schüttler über Nacht bei 37°C kultiviert.

Für längerfristige Aufbewahrung von transformierten Bakterienstämmen werden 5 ml einer LB-Übernacht-Kultur pelletiert (5000xg, 5 min, 4°C) und in 500 µl einer 1:1 Mischung von LB-Medium und Glycerol bei -80°C eingefroren.

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen werden 200 ml LB-Übernacht-Kulturen mit entsprechendem Selektionsantibiotikum nach Pelletierung (5000xg, 15 min, 4°C) mithilfe des QIAfilter Plasmid Midi Kit aufgearbeitet. Die Isolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse.

### 3.6.2 Restriktionsanalyse

Plasmid-DNA wird mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II und dem vom Hersteller vorgegebenen Puffer (s. 2.11) bei 37°C für 60 min inkubiert. Die spezifisch hydrolysierte DNA wird anschließend weiter analysiert oder verwendet.

### 3.6.3 Elektrophorese

#### 3.6.3.1 Agarose- Gelelektrophorese

Agarose wird in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wird Ethidiumbromid (0,03% v/v) zugegeben und die Lösung in eine Gelapparatur gegossen. Nach Polymerisation wird 1x TAE-Puffer zugegeben, die DNA-Proben werden mit Ladepuffer gemischt und zusammen mit einem Größenmarker aufgetragen. Nach Auftrennung der DNA durch Anlegen einer Spannung von 80-120 V für 30-60 min können die Proben unter UV-Licht (254 nm) identifiziert werden.

#### 3.6.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Lösung für ein 10%-iges Acrylamid-Gel wird hergestellt und in eine Glasapparatur eingegossen. Nach Polymerisation wird das Gel in eine Halterung, die 1x TBE-Puffer enthält, eingespannt. Die DNA-Proben werden mit Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt durch eine Spannung von 300 V für ca. 75 min. Anschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromidfärbelösung für 10-15 min gefärbt und die DNA unter UV-Licht (254 nm) visualisiert.

### 3.6.4 Klonierung mithilfe des TOPO TA Cloning Kits

Durch eine *Taq*-Polymerase wird einem zu klonierenden PCR-Produkt ein einzelnes Desoxyadenosinmonophosphat an das 3'-Ende angefügt. Über ein einzelnes überhängendes Desoxythymidinmonophosphat des linearisierte Vektors pCR2.1-TOPO, das mit einer Topoisomerase I gekoppelt ist, erlaubt dies eine effiziente Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor. Anschließend wird der Ansatz in OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* transformiert und auf X-Gal-haltigem Nährboden ausplattiert. Durch Blau-Weiß-Selektion werden erfolgreich ligierte Plasmide ausgewählt.

### 3.6.5 Herstellung des Plasmids pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>

Die TOPO TA Klonierung wird angewendet um ein Plasmid herzustellen, das eine punktmutierte und somit daueraktive Form von *Ha-ras* unter der Kontrolle des Tet-responsiven P<sub>tight</sub>-Promoters trägt. Mithilfe des Tet-Systems (s. 1.4.2) kann die Transkription des *Ha-ras*-Gens so durch Tetracyclin kontrolliert werden.

Die gewünschte *Ha-ras*-Sequenz wird über NCBI ermittelt, wobei als Referenz das mRNA-Transkript 1 (NM\_008284.2) ausgewählt wird. Mittels PCR und geeigneten Primern wird das *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Produkt aus cDNA der Zelllinie Hepa1c1c.7 amplifiziert, da Hepa1c1c.7-Zellen die gewünschte Mutation in Codon 61 von *Ha-ras* tragen. Durch Verwendung von cDNA muss die gebildete mRNA außerdem nicht mehr prozessiert werden.

Das erhaltene *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-PCR-Produkt wird nun über TOPO TA Klonierung in pCR2.1-TOPO eingebracht. Zur weiteren Übertragung des *Inserts* in den Zielvektor pTRE-Tight, werden beide Plasmide mit Restriktionsendonukleasen (*Bam*HI, *Not*I) inkubiert, pTRE-Tight wird anschließend dephosphoryliert. Das so erhaltene *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Insert aus pCR2.1-TOPO wird nun mit dem linearisierten pTRE-Tight mittels T4 DNA-Ligase zum fertigen Plasmid verknüpft.

### 3.6.6 Sequenzierung

Zur Überprüfung der klonierten Plasmide werden diese mit geeigneten Primern (s. 2.6) von 4base lab GmbH, Reutlingen sequenziert. Die so erhaltenen Sequenzen werden mithilfe von BLAST mit der erwarteten Sequenz abgeglichen.

## 3.7 Reporter-gen-Untersuchung

### 3.7.1 Transfektion

Zellen werden durch den Einsatz von Lipofectamine 2000 nach Angaben des Herstellers transient transfiziert.

Hierzu werden 150.000 Zellen pro *well* in einer 24-*well*-Platte der 70.4 Tet-On-Zellen ausgesät und für 24 h kultiviert bzw. 400.00 Zellen pro *well* der MCF7 Tet-Off-Zellen für

48 h. Das verwendete Zellkulturmedium enthält dabei 1% FKS und keine Antibiotika. Die Lipofecatmine-Ansätze werden dabei in Opti-MEM gemischt. Die eingesetzten Mengen Lipofectamine und DNA sind folgender Tabelle (3.2) zu entnehmen:

**Tabelle 3.2: Transfektionsansätze pro well**

Zelllinie	LFA	AP-1	pTRE-Tight-Ha-ras <sup>Q61K</sup>	pRL-CMV
MCF7	2 µg	0,5 µg	0,5 µg	0,05 µg
70.4 Tet-On	1,6 µg	0,675 µg	0,075 µg	0,05 µg

### 3.7.2 Luciferase-Messung

Reporterplasmide exprimieren die *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle von Signalweg-spezifischen *Enhancer*-Elementen. Zur Reporter-gen-Untersuchung werden die Aktivitäten der Luciferasen durch Messung der entstehenden Biolumineszenz detektiert. Dazu werden mit Reporterplasmiden transfizierte Zellen nach ihrer Behandlung lysiert und die Lysate mit den entsprechenden Substraten der Luciferasen versetzt.

In transienten Experimenten wird die durch den co-transfizierten pRL-CMV-Vektor konstitutiv exprimierte *Renilla*-Luciferase als interne Kontrolle verwendet. Die Werte der *Firefly*-Luciferase von stabilen Transfektanten werden auf ihre Zellviabilität (s. 3.7.3) bezogen.

### 3.7.3 Zellviabilitäts-Assay

Resazurin (7-Hydroxy-3*H*-phenoxazin-3-on-10-oxid) wird in metabolisch aktiven Zellen zu einem Fluoreszenz-Farbstoff reduziert, welcher photometrisch (590 nm) gemessen werden kann. Dazu wird die *Alamar Blue*-Lösung zwei Stunden vor der Zelllyse zugegeben. Die Messung erfolgt direkt in der Zellkulturplatte und stört die nachfolgende Lyse und Messung der Luciferase nicht.

## 3.8 Generierung einer transgenen Maus

Mit Hilfe der Pronukleusinjektion können klonierte DNA-Sequenzen in das Mausgenom eingeschleust werden. Dabei findet die Integration der Fremd-DNA an einer nicht

vorhersehbaren Stelle des Genoms statt. Für die Mikroinjektion werden Donormäuse (B6D2F1-Hybride) superovuliert und das DNA-Konstrukt in den Pronukleus der fertilisierten Oozyten injiziert. Die Embryonen werden dann in scheinchwangere Ammenmütter übertragen. Die geborenen Jungtiere können anschließend mittels PCR genotypisiert und auf das Vorhandensein der eingebrachten Fremd-DNA überprüft werden.

### 3.8.1 Vorbereitung des Plasmids pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>

Es soll eine Maus generiert werden, die *Ha-ras*<sup>Q61K</sup> unter der Kontrolle des Tet-responsiven P<sub>tight</sub>-Promoters trägt.

Dazu wird aus dem Plasmid pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> (s. 3.6.5) ein Konstrukt isoliert, das den Tet-responsiven P<sub>tight</sub>-Promoter, die codierende Sequenz von *Ha-ras*<sup>Q61K</sup> sowie den Poly(A)-Schwanz enthält. Dies geschieht durch eine ÜN-Inkubation mit den Restriktionsendonukleasen *Aat*II und *Bpu*EI, einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Aufreinigung der ausgeschnittenen Gelbände mittels QIAquick Gel Extraction Kit. Die Aufnahme der DNA erfolgt in Mikroinjektionspuffer. Das erhaltene Konstrukt wird durch Behandlung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen überprüft und kann dann zur Pronukleusinjektion verwendet werden.

### 3.8.2 Durchführung Pronukleusinjektion

Die Erzeugung der transgenen Mäuse durch Pronukleusinjektion wird von der Serviceeinrichtung Transgene Tiere des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) Tübingen unter der Leitung von Dr. Thomas Ott durchgeführt. Die so erhaltenen Foundertiere werden unter SPF-Bedingungen an die Tierhaltungsfacility der Wilhelmstraße 56/2 übergeben.

## 3.9 Tierversuche

### 3.9.1 Tierhaltung

Der Tierraum wird in einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus beleuchtet, die Tiere erhalten Futter und Trinkwasser *ad libitum*. Die Mäuse werden nach Geschlechtern getrennt in Makrolon-Käfigen mit Streu, Nistmaterial und Holzröhren bevorzugt in Gruppen gehalten, Männchen teilweise einzeln. Sie erhalten dabei Pflege durch Fachpersonal gemäß dem Tierschutzgesetz.

### 3.9.2 Tierzucht

Zur Erzeugung einer bitransgenen Linie werden die aus 3.8 erhaltenen Tiere, die das TRE-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-Transgenkonstrukt nachweislich tragen, mit den käuflich erworbenen tTA-LAP-Mäusen verpaart. Die tTA-LAP-Mäuse tragen ein tetracyclinabhängiges Transaktivatorprotein (tTA) unter der Kontrolle des LAP-Promoters und exprimieren so tTA spezifisch nur in der Leber (Kistner *et al.*, 1996).

Zur Unterdrückung einer möglichen Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens in der Nachfolgeneration, erhalten die Mäuse ab Verpaarung spezielles Doxycyclin-haltiges Futter (200 mg/kg; Sniff, Soest). Da Doxycyclin plazentagängig und in der Muttermilch verfügbar ist, ist zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung eine Unterdrückung des Tet-Systems gewährleistet.

### 3.9.3 Isolierung von genomischer DNA

In einer mit Isofluran gesättigten Kammer werden die Tiere betäubt und mit Hilfe einer scharfen Schere wird ein kleines Stückchen von ihrem Ohr abgeschnitten. Dieses Gewebematerial wird mit 80 µl Proteinase K-Mix für mindestens 4 h bei 56°C inkubiert. Nach einer Hitzeinaktivierung für 15 min bei 95°C folgt eine kurze Zentrifugation (13.000xg, 5 min) um Schwebteile zu sedimentieren. Der DNA-haltige Überstand kann direkt für weitere Untersuchungen verwendet werden.

### 3.9.4 Genotypisierungs-PCR

Zur Genotypisierung wird eine PCR mit der genomischen DNA durchgeführt, die dafür verwendeten Primer sind in 2.6 aufgelistet. Die Zusammensetzung und Bedingungen sind der Tabelle 3.3 zu entnehmen. Im Anschluss werden die PCR-Proben durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

**Tabelle 3.3: PCR für Genotypisierung**

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	29 µl
10x <i>Taq</i> -Puffer + MgCl <sub>2</sub>	5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Primer forward (10 µM)	2,5 µl
Primer reverse (10 µM)	2,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	1 µl
Genomische DNA	5 µl

Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zykluszahl
ras-TG_hinten	96°C, 30 s	62°C, 60 s	72°C, 60 s	40
ras-TG_neu	96°C, 30 s	62°C, 60 s	72°C, 60 s	40
tTA-LAP	96°C, 30 s	62°C, 60 s	72°C, 60 s	30

### 3.9.5 Sequenzierung

Da durch die Genotypisierung lediglich ein Teil des Transgens nachgewiesen wird, werden weitere PCRs durchgeführt um das ganze Konstrukt abzudecken und die erhaltenen Amplikone anschließend sequenziert (s. Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4: PCR für Sequenzierung**

Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zykluszahl
ras-TG_hinten fwd + ras-TG_hinten rev	96°C, 30 s	62°C, 60 s	72°C, 60 s	40
pTRE-Tight Sequencing fwd + Ras_61B2	96°C, 30 s	71°C, 60 s	72°C, 60 s	40
pTRE-Tight Sequencing rev + Ras_61A2	96°C, 30 s	62°C, 60 s	72°C, 60 s	40

Die Sequenzierung wird von 4base lab GmbH, Reutlingen durchgeführt.

### 3.9.6 Leberspezifische Aktivierung von *Ha-ras*<sup>Q61K</sup> in transgenen Mäusen

In bitransgenen Mäusen, die *Ha-ras*<sup>Q61K</sup> unter der Kontrolle des TRE-Promoters tragen und das tTA-Protein leberspezifisch exprimieren, wird durch Entfernung von Doxycyclin nach dem Tet-Off-Prinzip die Expression von *Ha-ras*<sup>Q61K</sup> induziert.

Die Entfernung von Doxycyclin erfolgt durch Gabe von Doxycyclin-freiem Futter. Das tTA bindet nun an das TRE, was die Genexpression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens zur Folge hat.

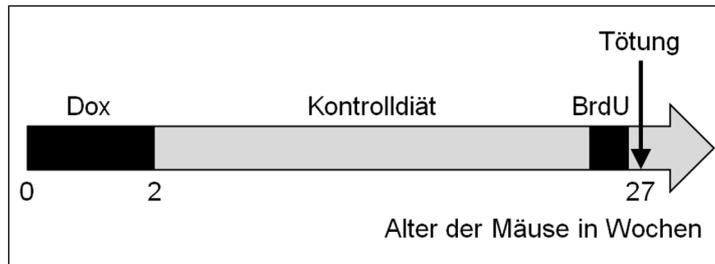
#### 3.9.6.1 Kurzzeitversuch

In einem Kurzzeitversuch wird Tieren im Alter von ca. 28 Wochen für 72 h bzw. 7 Tage Doxycyclin entzogen. Danach werden die Tiere getötet und die Lebern zur Analyse entnommen (s. 3.9.7).

#### 3.9.6.2 Langzeitversuch

Zur Langzeit-Aktivierung des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens erfolgt bei den Versuchstieren ein Absetzen der kontinuierlichen Doxycyclinbehandlung ca. 14 Tage nach Geburt. Anschließend werden diese Tiere für weitere 25 Wochen auf Kontrolldiät gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Tiere getötet und die Lebern zur Analyse entnommen (s. Abb. 3.1).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus vorangegangenen Experimenten zur chemischen Induktion von Maus-Lebertumoren der Arbeitsgruppe (Moennikes *et al.*, 2000) wird als Arbeitshypothese angenommen, dass die Expression von mutiertem daueraktiven Ha-ras zur Bildung von Leberadenomen führt. Bei Moennikes *et al.* wurde in einem vergleichbaren Experiment durch eine einmalige Injektion mit Diethylnitrosamin im Alter von 2 Wochen eine Tumorausbeute von 15,6% Volumenanteil der Leber erzielt; diese Adenome waren überwiegend *Ha-ras*-mutiert.



**Abbildung 3.1:** Versuchsablauf Aktivierung *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgenen

### 3.9.7 Organentnahme

Um zu überprüfen ob Änderungen in der Proliferation vorliegen wird den Tieren 3 Tage lang vor ihrer Tötung BrdU (0,8 mg/ml, jeden Tag frisch) über das Trinkwasser verabreicht. Zur Tötung werden die Mäuse in einer mit 95% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> gesättigten geschlossenen Kammer betäubt und anschließend gestreckt. Nachdem die Tiere gewogen werden, wird das Abdomen geöffnet und durch Durchtrennung der *Vena cava inferior* die Leber entblutet. Nach Entnahme und kurzem Waschen in eiskaltem PBS wird das Lebergewicht bestimmt und die Leber nach äußerlichen Auffälligkeiten hin kurz untersucht. Für spätere immunhistochemische Färbungen wird je ein Leberlappen auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert bzw. in Carnoy-Fixierungslösung eingelegt. Die restliche Leber wird in kleine Stück zerteilt und in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Schraubdeckeln sofort in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren, um später bei -80°C gelagert zu werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von $\beta$ -Catenin und Ha-ras auf die globale Genexpression in der Leber der Maus

Datensätze aus vorangegangenen Genexpressionsanalysen, die mittels DNA-Microarray-Technik gewonnen wurden, wurden in Hinblick auf bestimmte Gengruppen miteinander verglichen und die Ergebnisse als Heatmap dargestellt. Dabei zeigt grün reduzierte Expression an, während rot für eine verstärkte Expression steht (s. Abb. 4.1).

Es wurden *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierte Tumore, sowie Lebergewebe aus Tieren mit konditionalem *knockout* von *Ctnnb1* relativ zu Normalgewebe, wie auch perivenöse mit periportal Hepatozyten miteinander verglichen. Als dargestellte Gengruppen wurden Gene gewählt, die bekanntermaßen perivenös bzw. periportal zoniert sind (Braeuning *et al.*, 2006; Braeuning *et al.*, 2007a; Braeuning *et al.*, 2007b), sowie Gene des Aminosäurestoffwechsels und Harnstoffzyklus, die durch kürzlich durchgeführte ChIP-Seq-Analysen von Geweben mit aktiviertem bzw. inhibiertem  $\beta$ -Catenin als direkte  $\beta$ -Catenin/TCF-Ziele identifiziert wurden (Gougelet *et al.*, 2014; Unterberger *et al.*, 2014 Table S8). Zusätzlich wurden die bekannten negativen MAPK-Regulatoren Dusps (Owens und Keyse, 2007) abgebildet, um einer These nachzugehen, dass diese während der durch onkogenes Ras verursachten zellulären Umwandlung eine wichtige Rolle bei der Gestaltung der Aktivität des MAPK-Signalwegs spielen (Bluthgen *et al.*, 2009).

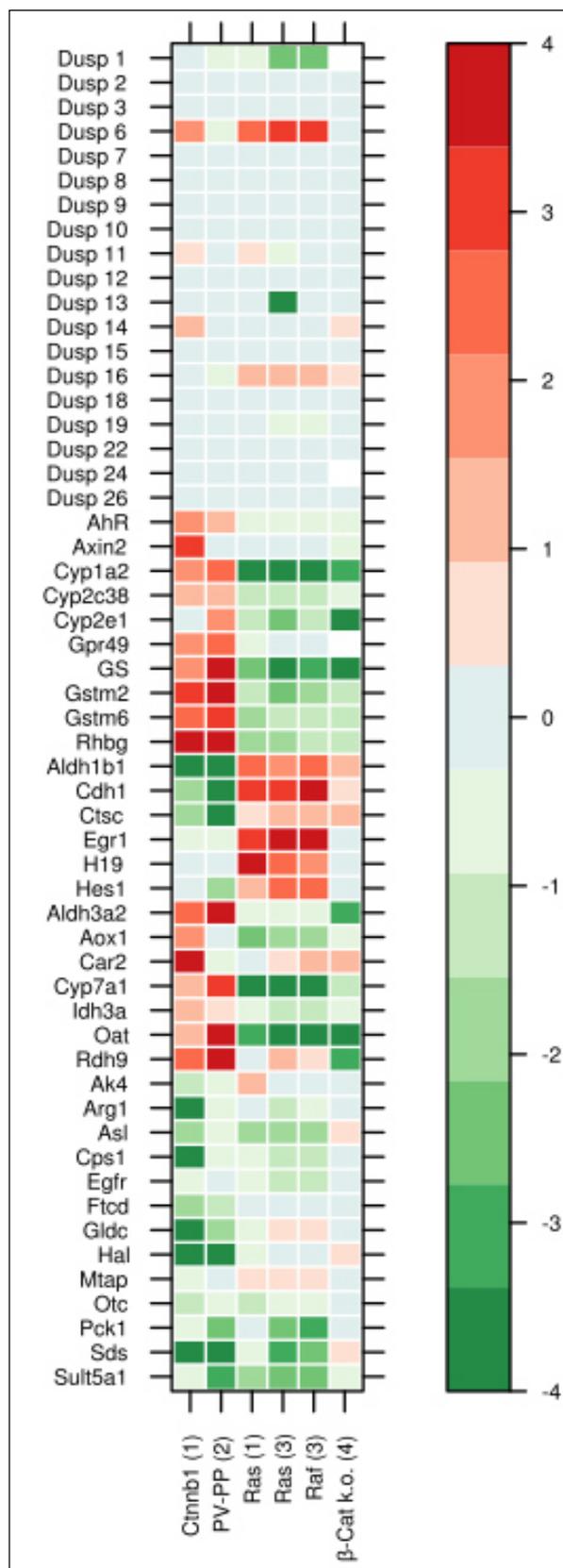
Unter den Dusp-Isoformen fielen Dusp6 und Dusp14 auf; diese waren in *Ctnnb1*-mutiertem Gewebe stärker exprimiert und in *Ctnnb1-knockout*-Gewebe unverändert. Während Dusp14 in *Ha-ras*- und *B-raf*-mutiertem Gewebe unverändert war, war Dusp6 in diesen ebenfalls verstärkt exprimiert. Dies entsprach der Erwartung, da Dusp6 als spezifische ERK1/2-Phosphatase ein bekannter negativer *Feedback*-Regulator der MAPK-Aktivität ist (Ekerot *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010) und in diversen Arten von Tumoren, die Mutationen in *Ras*-Genen trugen, bereits als überexprimiert detektiert wurde (Keyse, 2008).

In der Übersicht ist gut zu erkennen, dass die perivenösen Marker, wie zum Beispiel Glutaminsynthetase (GS) (Cadoret *et al.*, 2002; Loeppen *et al.*, 2002) oder die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme Cyp1a2 und Gstm2, in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren und perivenösen Subpopulationen höher exprimiert waren, wohingegen diese in *Ha-ras*-

und *B-raf*-mutiertem sowie *Ctnnb1-knockout* Gewebe erniedrigt waren. Das umgekehrte Bild war bei periportalen Markern zu erkennen; in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren und perivenösen Subpopulationen waren diese erniedrigt oder unverändert und in *Ha-ras*- und *B-raf*-mutiertem sowie *Ctnnb1-knockout* Gewebe erhöht bzw. unverändert. Beispielfähig war dies bei *Cdh1* zu sehen, welches für E-Cadherin kodiert, ein transmembranäres Adhäsionsprotein, das negativ durch  $\beta$ -Catenin-Signalgebung reguliert wird (Jamora *et al.*, 2003). Der MAPK-abhängige Transkriptionsfaktor *Egr1* (Gregg und Fraizer, 2011) zeigte unter  $\beta$ -Catenin-Einfluss eine schwache Reduktion, unter *Ha-ras* und *B-raf* eine sehr starke Induktion.

Die von Gougelet *et al.* identifizierten Zielgene, die positiv durch  $\beta$ -Catenin reguliert werden, konnten auch als überexprimiert in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren und perivenösen Subpopulationen bestimmt werden. In *Ha-ras*- und *B-raf*-mutiertem sowie *Ctnnb1-knockout* Gewebe waren die Expressionsraten verglichen dazu geringer, zum Teil stark erniedrigt, wie es bei *Cyp7a1*, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensäurebiosynthese aus Cholesterin katalysiert, zu sehen war (s. auch Unterberger *et al.*, 2014). Ebenso wurde eine verminderte Expression der negativ regulierten  $\beta$ -Catenin-Zielgene in *Ctnnb1*-mutiertem Gewebe und perivenösen Hepatozyten beobachtet. Diese waren in *Ha-ras*- und *B-raf*-mutiertem Gewebe nur wenig stärker exprimiert, eine erhöhte Expression konnte nur vereinzelt, wie z.B. bei dem am Aminosäurestoffwechsel beteiligten *Gldc* beobachtet werden.

Insgesamt stellte die Heatmap dar, dass Gene die positiv durch  $\beta$ -Catenin reguliert werden in *Ha-ras*- und *B-raf*-mutiertem Gewebe sowie nach Verlust von *Ctnnb1* eine erniedrigte Expression zeigen und *vice versa*.



**Abbildung 4.1:** Heatmap, die die Änderungen der mRNA-Expression relativ zum Normalgewebe in *Ctnnb1* (*Ctnnb1*-), *Ha-ras* (*Ras*-) und *B-raf* (*Raf*-) mutierten Tumoren und *Ctnnb1*-k.o.-Gewebe ( $\beta$ -Cat k.o.), sowie in perivenösen verglichen zu periportal Hepatozyten (PV-PP) anzeigt. Die Daten sind früheren Studien der Gruppe entnommen: (1) Stahl *et al.*, 2005; (2) Braeuning *et al.*, 2006; (3) Jaworski *et al.*, 2007; (4) Lempiainen *et al.*, 2013.

## 4.2 Einfluss von $\beta$ -Catenin und Ha-ras auf die mRNA-Expression von Dusp6, Dusp14 und Egfr

Nach Untersuchung des Datensatzes der globalen Genexpression in Hepatomen mit aktiviertem  $\beta$ -Catenin (Stahl *et al.*, 2005) in Hinblick auf potenziellen Gene, die bei der Vermittlung des *Crosstalks* zwischen  $\beta$ -Catenin- und Ha-ras-Signalgebung beteiligt sein könnten, wurden die mRNAs, die für Dusp6 und Dusp14 kodieren, welche bekannte negative Regulatoren des MAPK-Signalwegs sind, als überexprimiert identifiziert (s. Abb. 4.1). Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Expression und Regulation von Dusp6 und Dusp14 genauer untersucht.

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von Egfr analysiert, da in einer Studie (Tan *et al.*, 2005) behauptet wurde, dass Egfr durch  $\beta$ -Catenin-Signalgebung hochreguliert wird, was unserer Hypothese der antagonistischen Wechselwirkung zwischen  $\beta$ -Catenin- und Ha-ras-Signalgebung widersprechen würde. In unserem Datensatz der Hepatome mit aktiviertem  $\beta$ -Catenin (Stahl *et al.*, 2005) war die Egfr-mRNA leicht, aber nicht signifikant, erniedrigt.

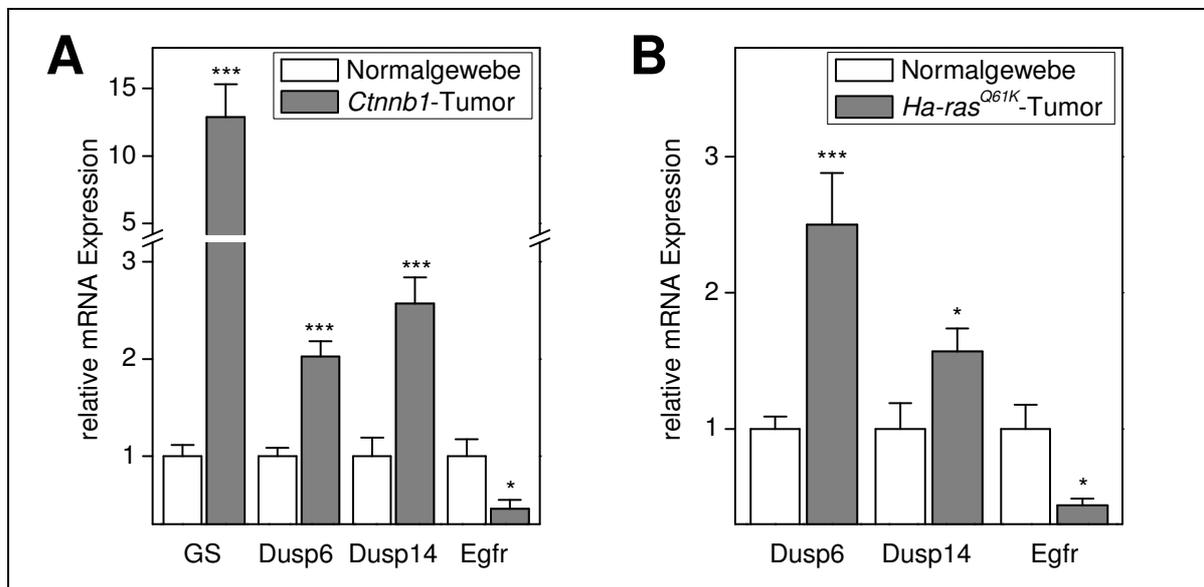
### 4.2.1 Einfluss von $\beta$ -Catenin- und Ha-ras auf die mRNA-Expression von Dusp6, Dusp14 und Egfr *in vivo*

Aus *Ctnnb1*- und *Ha-ras*-mutierten Tumoren und Normalgewebe aus Mauslebern wurde die RNA aufgearbeitet und durch anschließende LightCycler-RealTime-PCR die Expressionsmengen des  $\beta$ -Catenin-Zielgens GS sowie von Dusp6, Dusp14 und Egfr bestimmt (s. 3.3).

Die mRNA-Mengen von Dusp6 und Dusp14 waren in *Ctnnb1*-mutiertem Tumorgewebe signifikant um das zwei- bzw. 2,6-fache erhöht im Vergleich zu Normalgewebe. Die Egfr-mRNA war hingegen um die Hälfte signifikant erniedrigt. Zum Vergleich war das  $\beta$ -Catenin-Zielgen GS stark erhöht (s. Abb. 4.2A).

In *Ha-ras*-mutiertem Tumorgewebe waren die Mengen von Dusp6 und Dusp14 signifikant um das 2,5- bzw. 1,6-fache erhöht, was zu erwarten war. Die Egfr-mRNA war dabei über die Hälfte signifikant erniedrigt (s. Abb. 4.2B). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass durch die dauerhafte *downstream*-Aktivierung des MAPK-Signalwegs der EGF-Rezeptor nicht mehr benötigt und die Genexpression infolgedessen runterreguliert wird.

Die Überexpression von Dusp6 und Dusp14, sowie die Repression von Egfr in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren, lassen auf die möglichen Vermittler der Inhibierung von Ha-ras-Signalgebung durch  $\beta$ -Catenin schließen.



**Abbildung 4.2:** Relative mRNA-Expression von GS, Dusp6, Dusp14 und Egfr mittels LightCycler-*RealTime*-PCR in (A) *Ctnnb1*-mutierten Tumoren (n=12) und (B) *Ha-ras*-mutierten Tumoren (n=9) jeweils im Vergleich zu Normalgewebe (n=11). Mittelwerte +SEM werden gezeigt; statistische Signifikanz nach Students t-Test: \*p<0,05, \*\*\*p<0,001. Das Gewebematerial war verfügbar aus früheren Versuchen in unserem Labor (Marx-Stoelting *et al.*, 2008).

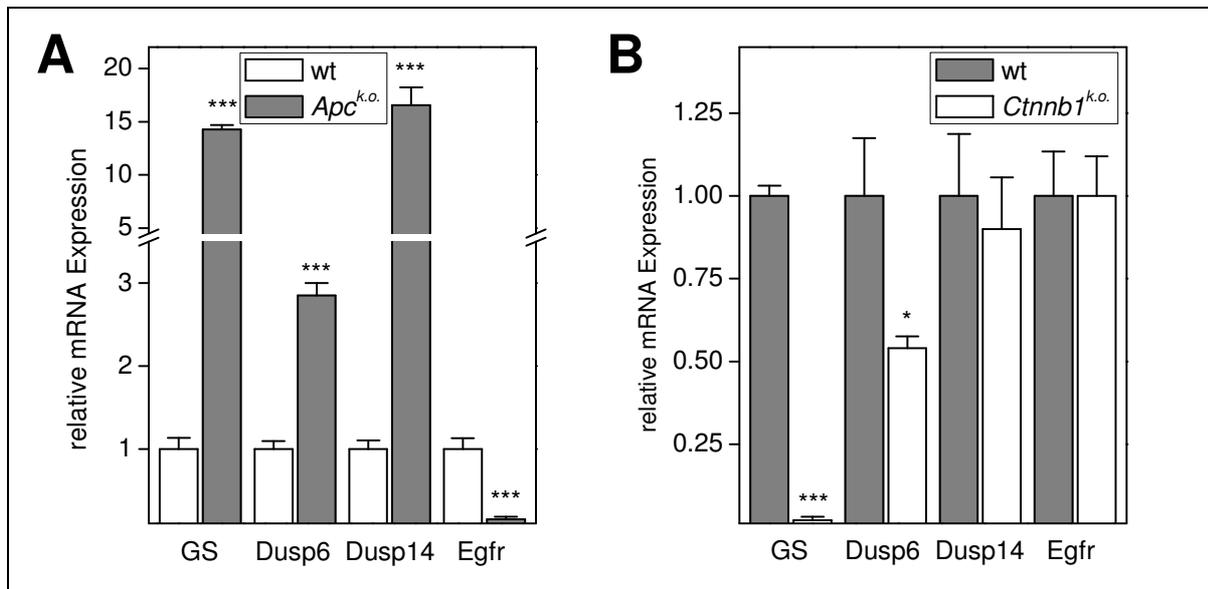
Um nachzuweisen, dass die deregulierte Expression von Dusp6, Dusp14 und Egfr nicht tumorspezifisch war, wurden die mRNA-Mengen in normalen Hepatozyten, in denen die Aktivität von  $\beta$ -Catenin verändert war, untersucht. Dazu wurden Gewebeproben von Mäusen mit hepatozytenspezifischem *knockout* von *Apc* (Benhamouche *et al.*, 2006), einem negativen Regulator von  $\beta$ -Catenin, und Mäusen mit hepatozytenspezifischem *knockout* von *Ctnnb1* analysiert.

Nach  $\beta$ -Catenin-Aktivierung durch *knockout* von *Apc*, waren die mRNA-Mengen von Dusp6 und Dusp14 stark signifikant erhöht. Die Expression von Dusp6 war fast dreifach höher, von Dusp14 sogar fast 17-fach, was in etwa der Expressionsmenge des Kontrollgens GS entsprach. Die Egfr-Menge war hingegen signifikant erniedrigt um fast 90% im Vergleich zu Normalgewebe (s. Abb. 4.3A).

Nach konditionalem *knockout* von *Ctnnb1* war die Dusp6-Menge um die Hälfte signifikant reduziert. Die mRNA-Mengen von Dusp14 und Egfr zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen (s. Abb. 4.3B).

Die Ergebnisse waren also vergleichbar mit denen aus den Untersuchungen mit Tumormaterial.

Da geeignete Tiermodelle fehlen, in denen die Aktivität von Ha-ras verändert ist, konnten die Effekte von Ha-ras-Signalgebung in normalen Hepatozyten nicht untersucht werden.



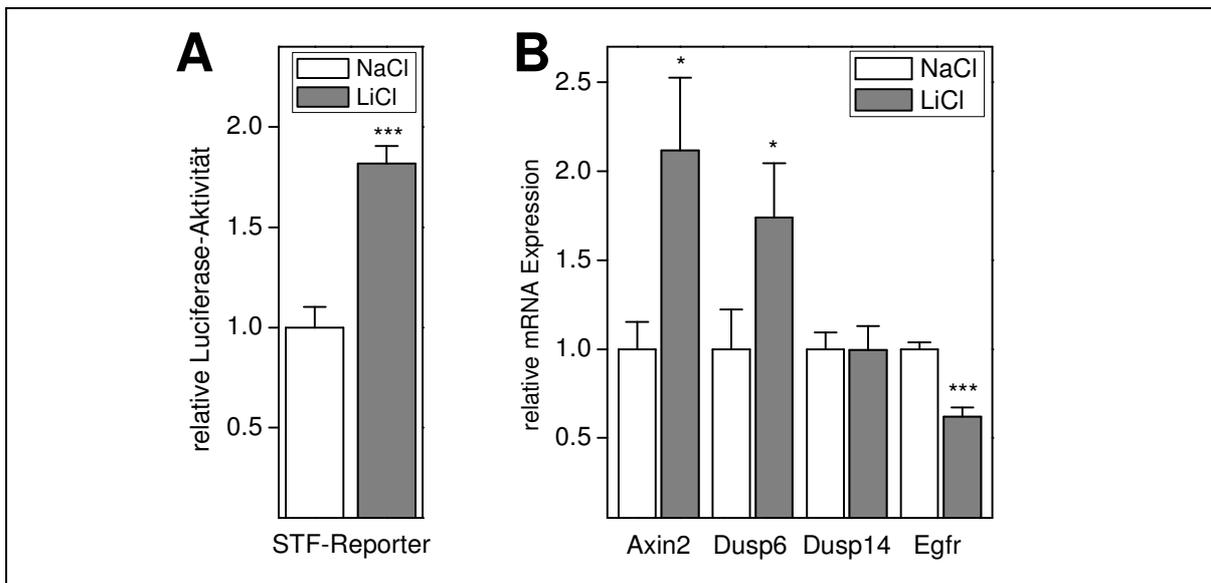
**Abbildung 4.3:** Relative mRNA-Expression von GS, Dusp6, Dusp14 und Egfr mittels LightCycler-*RealTime*-PCR in (A) *Apc*-k.o.-Gewebe (n=7) und (B) *Ctnnb1*-k.o.-Gewebe (n=5) jeweils im Vergleich zu Wildtypgewebe. Mittelwerte +SEM werden gezeigt; statistische Signifikanz nach Students t-Test: \*p<0,05, \*\*\*p<0,001. Das Gewebematerial war verfügbar aus früheren Versuchen (Torre *et al.*, 2011; Braeuning *et al.*, 2010).

#### 4.2.2 Einfluss von $\beta$ -Catenin auf die mRNA-Expression von Dusp6, Dusp14 und Egfr *in vitro*

Die relativen mRNA-Mengen von Dusp6, Dusp14 und Egfr wurden zusätzlich in Maushepatomzellen gemessen. Dafür wurden 70.4 Zellen (Kress *et al.*, 1992) eingesetzt, die in *Ctnnb1* und *Ha-ras* nicht mutiert sind und somit sowohl auf  $\beta$ -Catenin- als auch auf MAPK-Stimuli ansprechen. Diese Zellen wurden bereits benutzt, um den Einfluss von Serum-vermittelten Signalen auf den  $\beta$ -Catenin-Signalweg zu analysieren (Braeuning *et al.*, 2007b). Da GS in 70.4 Zellen kaum exprimiert wird, wurde zur Darstellung der Aktivierung von  $\beta$ -Catenin Axin2 verwendet, ein weiteres geläufiges  $\beta$ -Catenin-Zielgen (Yan *et al.*, 2001). Induktion von  $\beta$ -Catenin wurde durch Behandlung mit 15 mM LiCl für 24 h (bzw. NaCl zur Kontrolle) erreicht, welches durch Inhibierung der GSK3 $\beta$  den Abbau

von  $\beta$ -Catenin verhindert (Klein und Melton, 1996; Jope, 2003). Zusätzlich wurde mittels Reportergen-Untersuchung (s. 3.7) die  $\beta$ -Catenin-Induktion durch transiente Transfektion des STF-Reporterplasmids, der die *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle von 7 TCF/LEF-Bindestellen trägt, kontrolliert (s. Abb. 4.4A).

Die mRNA-Menge von Dusp6 wurde dabei durch  $\beta$ -Catenin-Signalgebung signifikant um das 1,7-fache induziert, wohingegen die Menge von Dusp14 nicht verändert war. Die mRNA von Egfr wurde um ca. 40% stark signifikant runterreguliert (s. Abb. 4.4B), vergleichbar mit der Situation *in vivo*.

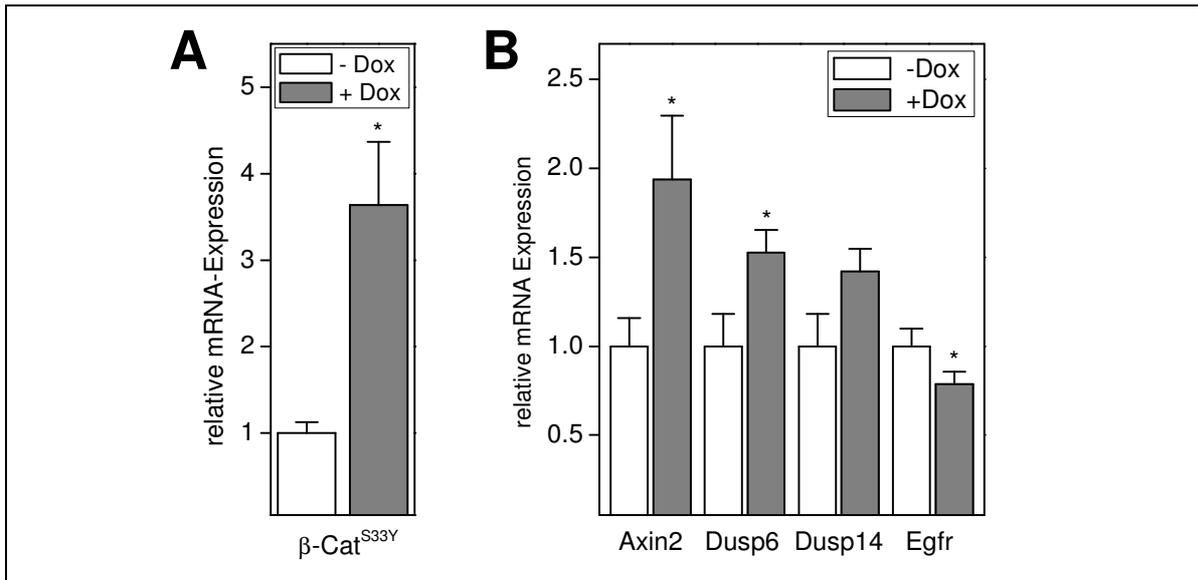


**Abbildung 4.4:** (A) Aktivierung von  $\beta$ -Catenin in 70.4 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit dem  $\beta$ -Catenin Aktivator LiCl (15 mM) bzw. NaCl (15 mM) als Kontrolle, dargestellt durch Induktion des  $\beta$ -Catenin-abhängigen STF-Luciferase-Reportersystems (n=4 unabhängige Experimente in Triplikaten). (B) Relative mRNA-Expression von Axin2, Dusp6, Dusp14 und Egfr mittels LightCycler-*RealTime*-PCR in 70.4 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit LiCl bzw. NaCl. Jeweils n=6 unabhängige Experimente in Triplikaten, Mittelwerte +SEM werden gezeigt; statistische Signifikanz nach Students t-Test: \*p<0,05, \*\*\*p<0,001. Durchführung der Versuche durch Eva Zeller.

Um nicht- $\beta$ -Catenin-vermittelte Effekte der Inhibierung von GSK3 $\beta$  auszuschließen, wurden zusätzliche Untersuchungen mit einem 70.4 Tet-On-Subklon durchgeführt, der mittels Tet-On-System nach Induktion durch Doxycyclin konstitutiv aktives humanes  $\beta$ -Catenin<sup>S33Y</sup> exprimiert, genannt „70.4 Mo“ (s. 2.5). Die Aktivierung der  $\beta$ -Catenin-Signalgebung wurde durch die Messung der transgenen  $\beta$ -Catenin<sup>S33Y</sup>-mRNA dargestellt (s. Abb. 4.5A), sowie durch die Induktion der STF-Luciferaseaktivität (Daten nicht gezeigt). Die mRNA-Mengen von Axin2 und Dusp6 waren signifikant erhöht, um ca. 100%

bzw. 50%. Eine beobachtete Induktion von Dusp14 war hingegen nicht signifikant. Die Egfr-mRNA war signifikant um ca. 20% reduziert (s. Abb. 4.5B).

Auch *in vitro* konnte eine Induktion von Dusp6 und eine Repression von Egfr durch  $\beta$ -Catenin auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Die in Tumormaterial beobachteten Effekte auf Dusp14 konnten jedoch *in vitro*, ebenso wie in dem Mausmodell nach konditionalem *knockout* von *Ctnnb1*, nicht festgestellt werden.



**Abbildung 4.5:** (A) Induktion der mRNA-Expression des Transgens, das eine konsitutiv aktive Form des humanen  $\beta$ -Catenin<sup>S33Y</sup> trägt, durch Doxycyclin (10  $\mu$ g/ml) in 70.4 Mo Zellen (n=3, in Triplikaten). (B) Relative mRNA-Expression von Axin2, Dusp6, Dusp14 und Egfr mittels LightCycler-RealTime-PCR in 70.4 Mo Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Doxycyclin. Jeweils n=6 unabhängige Experimente in Triplikaten, Mittelwerte +SEM werden gezeigt; statistische Signifikanz nach Students t-Test: \*p<0,05, \*\*\*p<0,001. Durchführung der Versuche durch Eva Zeller.

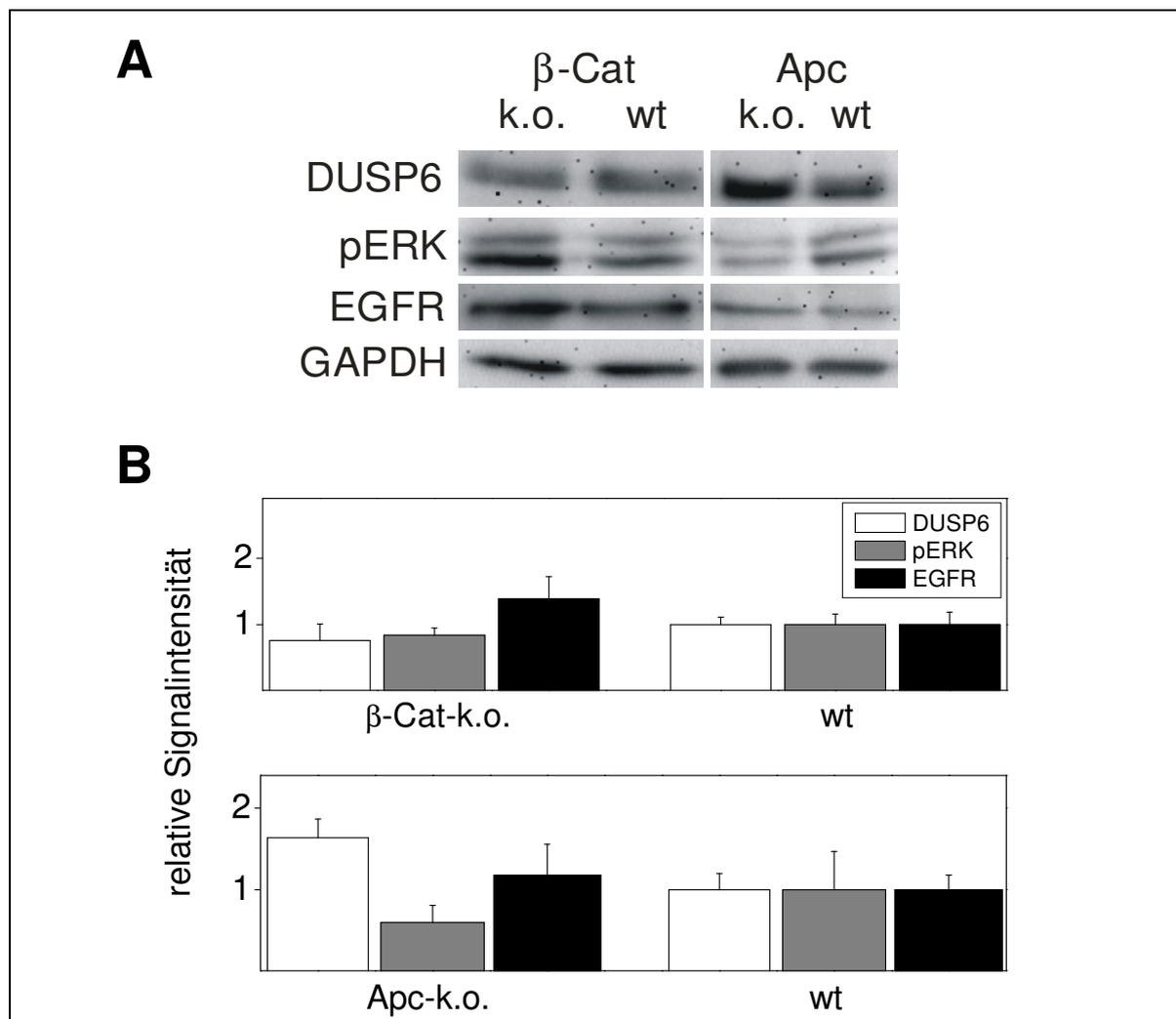
## 4.3 Einfluss von $\beta$ -Catenin und Ha-ras auf die Proteinexpression

### 4.3.1 Einfluss von $\beta$ -Catenin auf die Proteinexpression *in vivo*

Mithilfe der schon in 4.2.1 verwendeten transgenen Tiermodelle, wurde der Einfluss veränderter  $\beta$ -Catenin-Aktivität auf die Proteinexpression analysiert. Dazu wurden Gewebeproben von Mäusen mit hepatozytenspezifischem *knockout* von *Apc* und *Ctnnb1* erschlossen und mittels *Western Blot* analysiert (s. 3.4).

Neben DUSP6 und EGFR wurde die Expression von aktiviertem und somit phosphoryliertem ERK1/2 (pERK) als Ziel der MAPK-Signalgebung dargestellt. Für DUSP14 standen keine geeigneten Antikörper zur Verfügung.

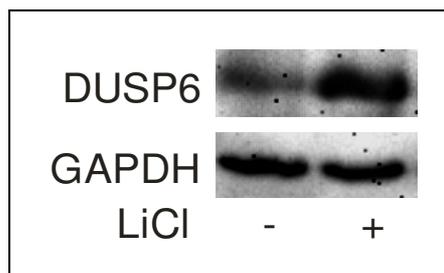
Nach konditionalem *knockout* von *Ctnnb1* schien die Proteinmenge von DUSP6 unverändert, bei Aktivierung von  $\beta$ -Catenin durch *knockout* von *Apc* war sie hingegen erhöht im Vergleich zu normalem Gewebe (s. Abb. 4.6A). Dieser Effekt war in der densitometrischen Auswertung von *Western Blots* dreier Tiere bei *Ctnnb1-k.o.* leicht und bei *Apc-k.o.* stark zu erkennen (s. Abb. 4.6B). Die Menge von pERK schien in Übereinstimmung mit unserer Hypothese bei Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin erhöht und bei Aktivierung erniedrigt zu sein. Diese Beobachtung konnte densitometrisch nur im *knockout* von *Apc* verifiziert werden. Die Expression von EGFR war nach Inaktivierung von *Ctnnb1* ähnlich wie pERK erhöht, was densitometrisch gut zu sehen war. Nach Aktivierung von  $\beta$ -Catenin war die Proteinmenge von EGFR jedoch unverändert. Der zuvor beobachtete Einfluss von  $\beta$ -Catenin auf *Dusp6* und *Egfr* auf mRNA-Ebene in diesen transgenen Tiermodellen (s. Abb. 4.3) war auf Proteinebene nicht so stark ausgeprägt, aber tendenziell vergleichbar.



**Abbildung 4.6:** (A) *Western Blots*, die die Proteinexpression von DUSP6, phosphoryliertem ERK1/2 (pERK) und EGFR in *Ctnnb1-k.o.*-Gewebe ( $\beta$ -Cat-k.o.) und *Apc-k.o.*-Gewebe (Apc-k.o.) jeweils im Vergleich zu Wildtypgewebe (wt) zeigen; GAPDH als Ladekontrolle. (B) Densitometrische Analyse von DUSP6-, EGFR- und pERK-*Western Blots* aus *Ctnnb1-k.o.*-Gewebe ( $\beta$ -Cat-k.o.) und *Apc-k.o.*-Gewebe (Apc-k.o.) jeweils im Vergleich zu Wildtypgewebe (wt). Mittelwerte  $\pm$ SEM (n=3) im Vergleich zur GAPDH-Expression werden gezeigt.

#### 4.3.2 Einfluss von $\beta$ -Catenin und Ha-ras auf die Proteinexpression *in vitro* und Darstellung des *Crosstalks*

Desweiteren wurde die Proteinexpression *in vitro* in 70.4 Maushepatomzellen untersucht. Nach Induktion von  $\beta$ -Catenin durch LiCl waren im *Western Blot* erhöhte Mengen von DUSP6 zu erkennen (s. Abb. 4.7). Die erhöhte mRNA-Expression spiegelte sich also auch im Proteingehalt wieder. Diese Erkenntnis war eine Voraussetzung um den *Crosstalk* von  $\beta$ -Catenin und Ha-ras in dieser Zelllinie zu untersuchen, weil DUSP6 der mögliche Vermittler der Schwächung von Ha-ras-Signalgebung durch  $\beta$ -Catenin ist.



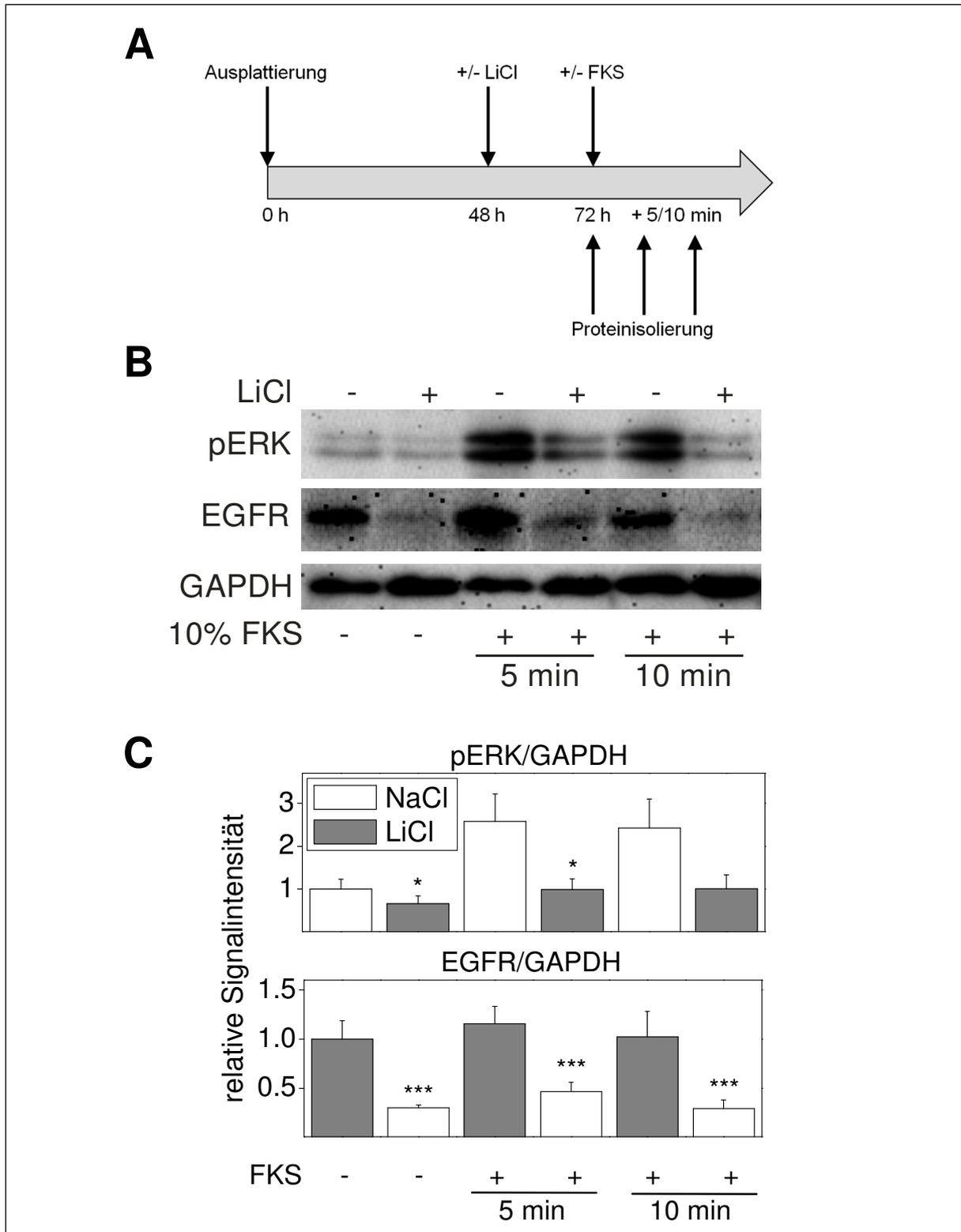
**Abbildung 4.7:** *Western Blot*, der die DUSP6-Proteinexpression in 70.4 Zellen in Abwesenheit oder Gegenwart von 15 mM LiCl zeigt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Durchführung von Eva Zeller.

Aktivierung des MAPK-Signalweges kann in 70.4 Zellen durch Serum oder EGF ermöglicht werden (Braeuning *et al.*, 2007b). Um zu prüfen, ob die Aktivierung von  $\beta$ -Catenin die Aktivierung des MAPK-Signalweges hemmen kann, wurden 70.4 Zellen nacheinander mit den entsprechenden Stimulantien beider Signalwege behandelt.

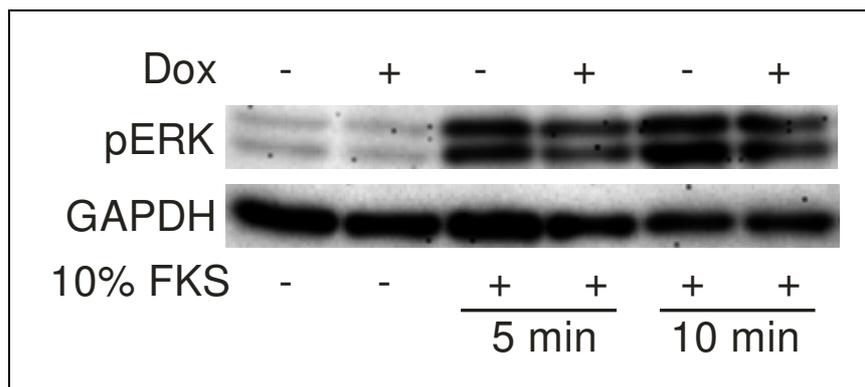
Zunächst wurden die Zellen für 24 h mit LiCl zur  $\beta$ -Catenin-Aktivierung behandelt und dabei in einem Medium mit niedriger Serumkonzentration kultiviert (1% FKS). Anschließend wurde 10% FKS zugegeben, um den MAPK-Signalweg zu stimulieren. Nach 5 bzw. 10 min wurden die Zellen geerntet und die Aktivität von MAPK-Signalgebung mittels *Western Blot* untersucht (s. Abb. 4.8A).

Neben der Phosphorylierung von ERK1/2 wurden die Mengen von EGFR und GAPDH analysiert, letztere als Ladekontrolle. Nach Stimulation durch hohe Serumkonzentration konnten große Mengen von phosphoryliertem ERK detektiert werden. Eine vorherige Aktivierung von  $\beta$ -Catenin inhibierte diese Phosphorylierung von ERK. Auch die Proteinmenge von EGFR wurde durch Aktivierung von  $\beta$ -Catenin deutlich reduziert (s. Abb. 4.8B). Diese Effekte wurden durch densometrische Analyse der *Western Blots* als signifikant bestätigt (s. Abb. 4.8C). Die Verringerung von EGFR war dabei stark signifikant. Ähnliche Ergebnisse wurden beim Einsatz des spezifischen kommerziell verfügbaren GSK3 $\beta$ -Inhibitors SB-216763 zur  $\beta$ -Catenin-Induktion (Coghlan *et al.*, 2000) sowie EGF zur MAPK-Stimulation erzielt (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde das Experiment mit 70.4 Mo Zellen durchgeführt. Die Effekte des durch Doxycyclin-induzierten  $\beta$ -Catenin<sup>S33Y</sup> waren vergleichbar wie nach Stimulation durch LiCl (s. Abb. 4.9). In der densometrischen Auswertung waren die Effekte statistisch nicht signifikant, was vermutlich daran lag, dass in diesem Tet-System die  $\beta$ -Catenin-Aktivierung nicht so stark war.



**Abbildung 4.8:** (A) Schematische Darstellung der Zellbehandlung in 70.4 Zellen: 48 h nach Ausplattierung Kultivierung der Zellen für 24 h in einem Medium, das 1% FKS und 15 mM LiCl ( $\beta$ -Catenin-Induktion) bzw. NaCl (Kontrolle) enthält. Anschließend Umstellung der Zellen auf 10% FKS und Ernte 5 bzw. 10 min später. (B) Repräsentative *Western Blots* von phosphoryliertem aktiviertem ERK1/2 (pERK) und EGFR; GAPDH als Ladekontrolle. (C) Densitometrische Analyse von pERK- und EGFR-*Western Blots*. Mittelwerte  $\pm$ SEM (n=5) im Vergleich zur GAPDH-Expression; statistische Signifikanz nach Students t-Test: \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.



**Abbildung 4.9:** Repräsentativer *Western Blot*, der den Effekt Doxycyclin-vermittelter Aktivierung von  $\beta$ -Catenin<sup>S33Y</sup> auf die Serum-induzierte ERK-Phosphorylierung in 70.4 Mo Zellen zeigt; GAPDH als Ladekontrolle.

Dies alles zeigte, dass es eine funktionelle Inhibition der Serum-induzierten Aktivierung der MAPK-Signalgebung durch  $\beta$ -Catenin-Signalgebung gibt.

#### 4.4 Effekte von $\beta$ -Catenin und Ha-ras auf die Expression von zonierten Markerproteinen

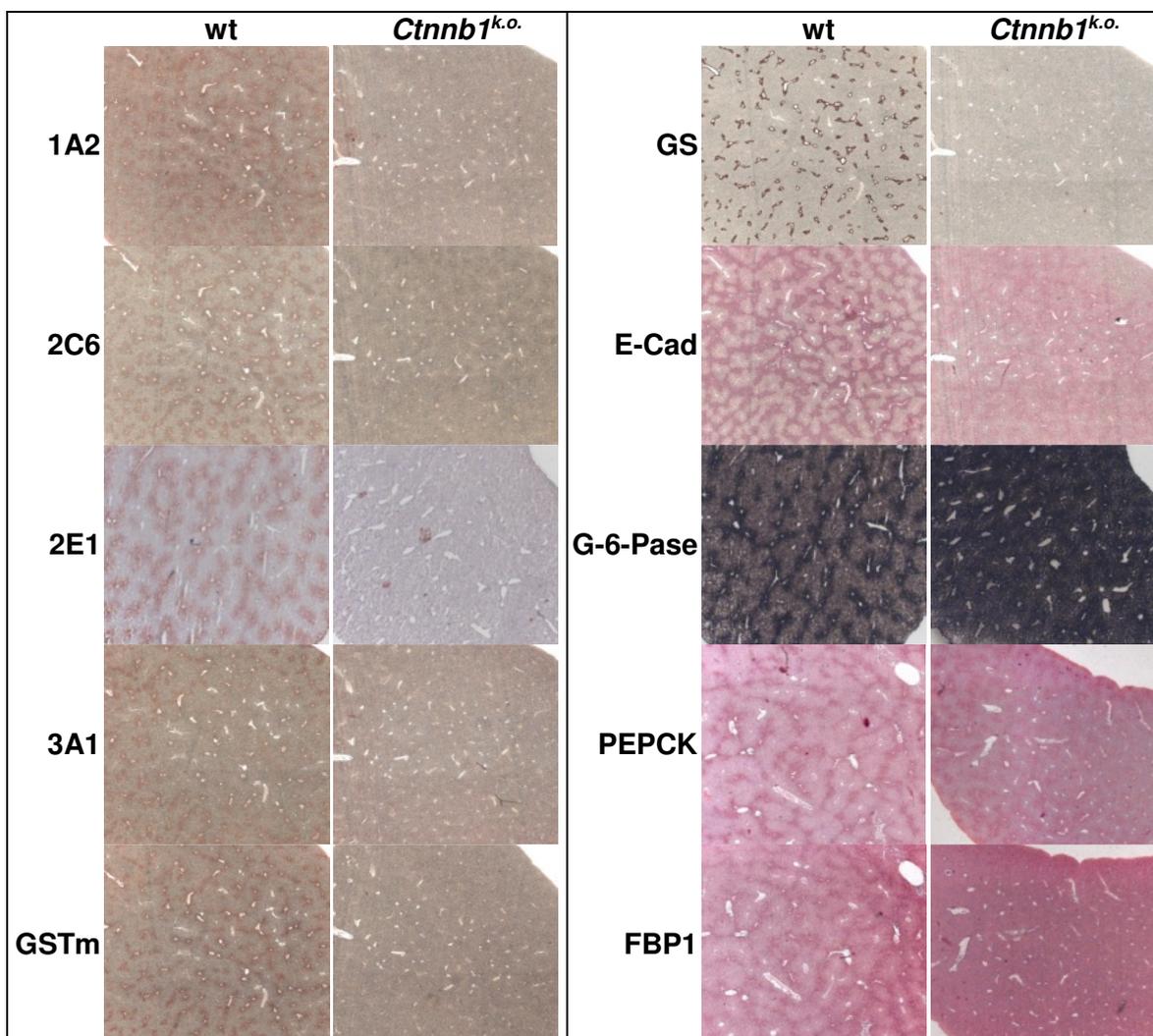
Bestimmte Markerproteine unterscheiden sich in ihrer Expression in perivenösen und periportalen Hepatozyten (s. 1.1.2). Durch immunhistochemische Färbungen derselben lässt sich so die Zonierung der Leber wiedergeben.

Der perivenöse Bereich in der Leber wird durch Färbung des  $\beta$ -Catenin-Zielgens Glutaminsynthetase (GS) dargestellt (Cadoret *et al.*, 2002; Loeppen *et al.*, 2002). Auch diverse fremdstoffmetabolisierende Enzyme, wie die Cytochrom P450-Enzyme (CYP) 1A2, 2C6, 2E1 und 3A1 oder Glutathion-S-Transferase m (GSTm) sind in perivenösen Hepatozyten und *Ctnnb1*-mutierten Tumoren höher exprimiert (Loeppen *et al.*, 2005, Stahl *et al.*, 2005, Hailfinger *et al.*, 2006). Periportale Bereiche in der Leber werden durch E-Cadherin (E-Cad) dargestellt (Stahl *et al.*, 2005; Hailfinger *et al.*, 2006). MAPK-Signalgebung bewirkt Aktivierung und somit Phosphorylierung von ERK1/2. In Folge davon ist auch die Menge von EGR1 erhöht (Gregg und Fraizer, 2011, Unterberger *et al.*, 2014). Diese periportalen Marker sind in *Ha-ras*-mutierten Tumoren höher exprimiert, hingegen in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren unterdrückt (Stahl *et al.*, 2005). In der normalen Leber werden PEPCK, FBP1 und G-6-Pase in periportalen Hepatozyten exprimiert (Jungermann und Kietzmann, 1996). Die mRNA-Menge von PEPCK, welches das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gluconeogenese Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodiert, ist in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren herabgesetzt. Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1), ein weiteres Schlüsselenzym der Gluconeogenese, wird ebenso in der Leber negativ durch  $\beta$ -Catenin reguliert (Chafey *et al.*, 2009; Unterberger *et al.*, 2014). Die Aktivität von Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase), die den letzten Schritt der Gluconeogenese katalysiert, ist in Leber-Tumoren reduziert. In *Ha-ras*-mutierten Tumoren ist die mRNA-Expression im Vergleich zum Normalgewebe verringert (Unterberger *et al.*, 2014).

Im Folgenden werden Lebergewebeschnitte dargestellt, die eine Veränderung in der Zonierung von Markerproteinen durch den Einfluss von  $\beta$ -Catenin und Ha-ras zeigen.

In der Leber von Tieren mit konditionalem *knockout* von *Ctnnb1* war sehr schön der Verlust des perivenösen Markers GS und diverser fremdstoffmetabolisierender Enzyme zu sehen. Die im Wildtyp klar periportal zonierten Marker E-Cadherin, G-6-Pase, PEPCK und FBP1 zeigten im *Ctnnb1-knockout* kaum bzw. keine Zonierung mehr, da durch die

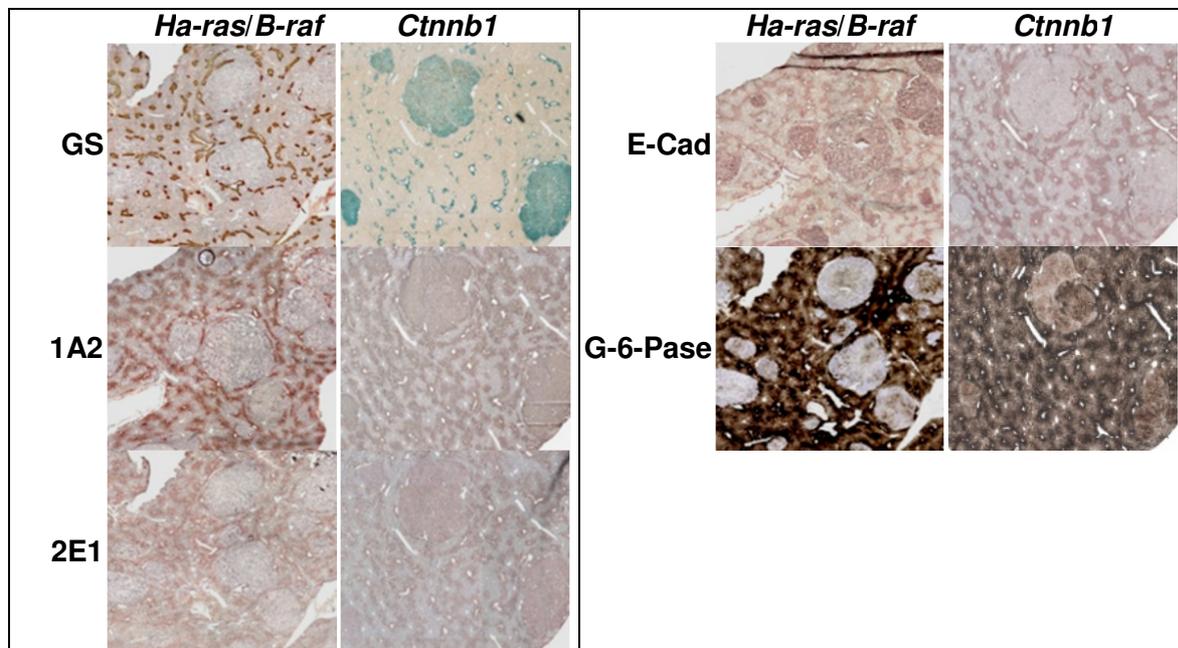
fehlende Hemmung von  $\beta$ -Catenin die Expression bis in die perivenöse Zone hineinreicht (s. Abb. 4.10).



**Abbildung 4.10:** Verlust der Zonierung von Markerproteinen in immunhistochemischen Färbungen in Lebergewebeschnitten von *Ctnnb1-k.o.*- im Vergleich zu Wildtyp-Tieren; dargestellt durch die perivenösen Marker GS, CYP1A2, CYP2C6, CYP2E1, CYP3A1, GSTm und die periportalen Marker E-Cadherin (E-Cad), G-6-Pase, PEPCK und Fbp1. Gewebeschnitte aus vorangegangenen Versuchen der Gruppe (Braeuning *et al.*, 2009).

In *Ha-ras*- bzw. *B-raf*-mutierten Tumoren wurden die perivenösen Marker GS, CYP1A2 und CYP2E1 nicht exprimiert. E-Cadherin war hingegen stark überexprimiert. Das Gegenteil lag bei *Ctnnb1*-mutierten Tumoren vor: GS, CYP1A2 und CYP2E1 waren stark überexprimiert, wohingegen E-Cadherin nicht exprimiert wurde.

Die Aktivität von Glucose-6-Phosphatase war in beiden Tumortypen reduziert. Im tumorumgebenden Normalgewebe waren die Markerproteine wie in Wildtyp-Tieren zoniert (s. Abb. 4.11).



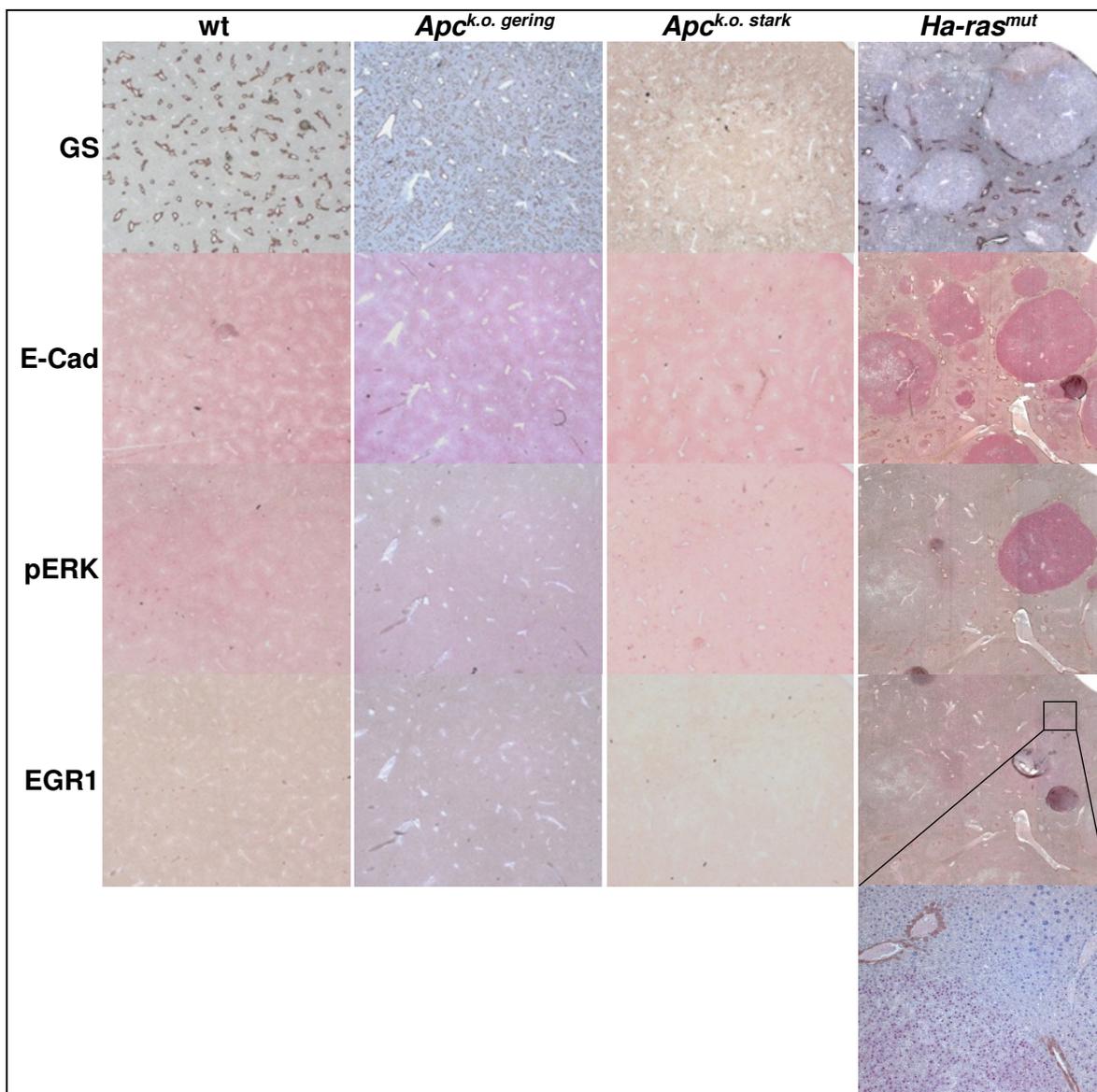
**Abbildung 4.11:** Markerproteine in immunohistochemischen Färbungen in Lebergewebeschnitten mit *Ha-ras*- bzw. *B-Raf*-mutierten Tumoren im Vergleich zu *Ctnnb1*-mutierten Tumoren; dargestellt durch die perivenösen Marker Glutaminsynthetase (GS), CYP1A2, CYP2E1 und die periportalen Marker E-Cadherin (E-Cad) und G-6-Pase. Gewebeschnitte aus vorangegangenen Versuchen der Gruppe (Jaworski *et al.*, 2005b; Singh *et al.*, 2013).

In einem früheren Versuch der Gruppe wurde  $\beta$ -Catenin durch *knockout* von *Apc* in der Leber aktiviert. Dabei stieg die Anzahl von GS-positiven Zellen in der gesamten Leber stark an, unabhängig von perivenösen Bereichen. Bei starker Aktivierung von  $\beta$ -Catenin war fast die komplette Leber GS-positiv.

Die Zonierung von E-Cadherin blieb zwar erhalten, was aber auf die relativ lange Halbwertszeit des Proteins zurückzuführen war. Die Organe wurden bereits 12 Tage nach *knockout* von *Apc* durch Injektion einer hohen Dosis Tamoxifen entnommen (Benhamouche *et al.*, 2006), dabei litten die Tiere an einer starken Hepatomegalie. Phosphoryliertes ERK sowie EGR1 waren nach *knockout* von *Apc* nicht mehr detektierbar.

Im Vergleich dazu sind Lebergewebeschnitte mit *Ha-ras*- bzw. *B-raf*-mutierten Tumoren dargestellt, die einen Verlust von GS sowie eine Überexpression von E-Cadherin zeigten. *Ha-ras*-mutierte Tumore zeigten im Gegensatz zu *B-raf*-mutierten Tumoren zusätzlich eine starke Phosphorylierung von ERK (s. auch Rignall *et al.*, 2009).

Die immunhistochemische Darstellung von EGR1 war meist nur in *Ha-ras*- bzw. *B-raf*-mutierten Tumoren zuverlässig möglich. In der Vergrößerung waren nach Doppelfärbung von GS und EGR1 *Ha-ras*-mutierte Tumore gut zu erkennen (s. Abb. 4.12).



**Abbildung 4.12:** Veränderung der Zonierung von Markerproteinen in immunhistochemischen Färbungen in Lebergewebeschnitten von *Apc-k.o.*-Tieren nach unterschiedlich starkem *k.o.* (gering, stark) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und *Ha-ras*-mutierten Tumoren (*Ha-ras<sup>mut</sup>*); dargestellt durch den perivenösen Marker Glutaminsynthetase (GS) und die periportalen Marker E-Cadherin (E-Cad), phosphoryliertes ERK (pERK) und EGR1. *Ha-ras*-mutierter Tumor ist positiv in pERK und EGR1; Vergrößerung: Kombinationsfärbung GS und EGR1. *Apc-k.o.*-Gewebe aus vorrangegangen Versuchen der Gruppe (Braeuning); für *Apc k.o.* Injektion von 1,5 mg Tamoxifen pro 25 g Maus, Organentnahme 12 Tage später; vgl. Benhamouche *et al.*, 2006. Gewebsschnitte mit *Ha-ras*-mutierten Tumoren aus vorrangegangen Versuchen der Gruppe (Jaworski *et al.*, 2005b).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin und Ha-ras entgegengesetzt die Expression und Zonierung bestimmter Proteine in der Leber regulieren:

Perivenöse Marker wurden nach Aktivierung von  $\beta$ -Catenin durch *knockout* von *Apc* oder nach chemisch induzierter Mutation von *Ctnnb1* überexprimiert. In *Ha-ras*- bzw. *B-raf*-mutierten Tumoren waren sie hingegen nicht detektierbar, ebenso nach Verlust von  $\beta$ -Catenin durch konditionalen *knockout* von *Ctnnb1*.

Periportale Marker waren in *Ha-ras*- bzw. *B-raf*-mutierten Tumoren überexprimiert. Nach Aktivierung von  $\beta$ -Catenin und in *Ctnnb1*-Tumoren waren diese im Gegenzug verringert exprimiert. Nach *knockout* von *Ctnnb1* war die Zonierung aufgehoben bzw. stark verändert.

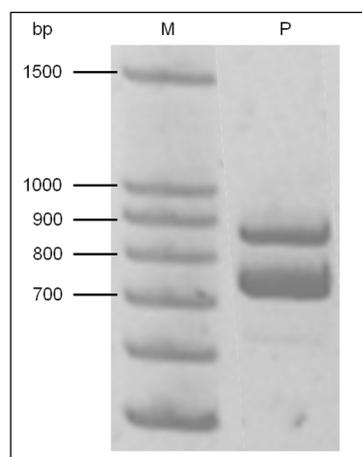
Um den Einfluss von Ha-ras auf die Zonierung in der Leber sowie die Hepatokanzergenese genauer untersuchen zu können, fehlten entsprechende Ha-ras-Mausmodelle, wie sie für  $\beta$ -Catenin vorlagen. So wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Maus generiert, die leberspezifisch eine aktive Form von Ha-ras trägt (s. 4.5).

## 4.5 Generierung einer transgenen Maus mit leberspezifischer tetracyclinabhängiger Expression von *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>

Um eine transgene Maus zu generieren, die leberspezifisch eine punktmutierte und somit daueraktive Form des Maus-Ha-ras-Gens in Tetracyclinabhängigkeit trägt, wurde zunächst mithilfe des Tet-Systems (s. 1.4.2) ein entsprechendes Expressionsplasmid kloniert, das später zur Erzeugung transgener Mäuse mittels Pronukleusinjektion verwendet wurde. Zur Erreichung der leberspezifischen Expression, wurden die erhaltenen Mäuse anschließend mit käuflich erworbenen tTA-LAP-Mäusen (Kistner *et al.*, 1996) gekreuzt.

### 4.5.1 Konstruktion des Plasmids pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>

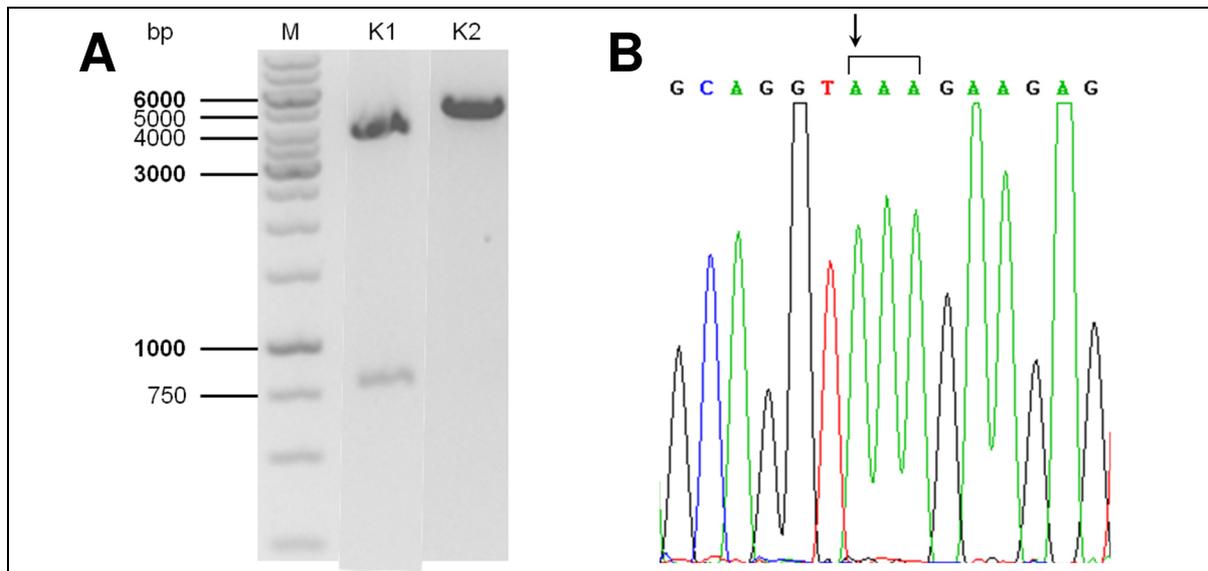
Zur Herstellung eines Plasmids, das eine punktmutierte und somit daueraktive Form von *Ha-ras* unter der Kontrolle des Tet-responsiven P<sub>tight</sub>-Promoters trägt, wurde zunächst die entsprechende Nukleotidsequenz des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transkripts aus cDNA der Zelllinie Hepa1c1c.7 mittels PCR (*PfuUltra*<sup>TM</sup> High-Fidelity Polymerase, Primer: mHaras1) amplifiziert. Es bildeten sich zwei Produkte (s. Abb. 4.13), wobei die dickere Bande das gewünschte Produkt von 742 bp Länge zeigte. Bei der dünneren, hochmolekularen Bande handelte es sich um eine Transkriptvariante, die ein zusätzliches Exon enthielt. Da im späteren Verlauf der Klonierung die genaue Nukleotidsequenz überprüft wurde, konnte mit dem Produktgemisch weitergearbeitet werden.



**Abbildung 4.13:** Amplifiziertes *Ha-Ras*<sup>Q61K</sup>-PCR-Produkt (P) aus cDNA der Zelllinie Hepa1c1c.7 mittels *PfuUltra*<sup>TM</sup> High-Fidelity Polymerase; 10%-iges Acrylamid-Gel; M = Marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder).

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mithilfe des TOPO TA Cloning Kit in den Vektor pCR2.1-TOPO übertragen. Verschiedene Vektor-Insert-Konstrukte wurden nach Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal-haltigem Nährboden ausgewählt und durch Restriktionsanalyse überprüft (s. Abb. 4.14A). So konnte ein Vektor-Insert-Konstrukt identifiziert werden, das das *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-PCR-Produkt in richtiger Orientierung in der MCS des pCR2.1-TOPO-Vektors enthielt.

Bevor dieser erhaltene *Entry*-Vektor weiter verwendet wurde, wurde er zusätzlich per Sequenzierung mit spezifischen Primern (u.a. M13\_rev) analysiert. Diese zeigte die erfolgreiche Integration des gewünschten 742 bp *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transkripts in der richtigen Orientierung in intakter Umgebung des pCR2.1-TOPO. Ein Ausschnitt dieser Sequenzierung ist in Abbildung 4.14B gezeigt, auf der die Basensubstitutionsmutation des Codon 61 (CAA → AAA) zu sehen ist.



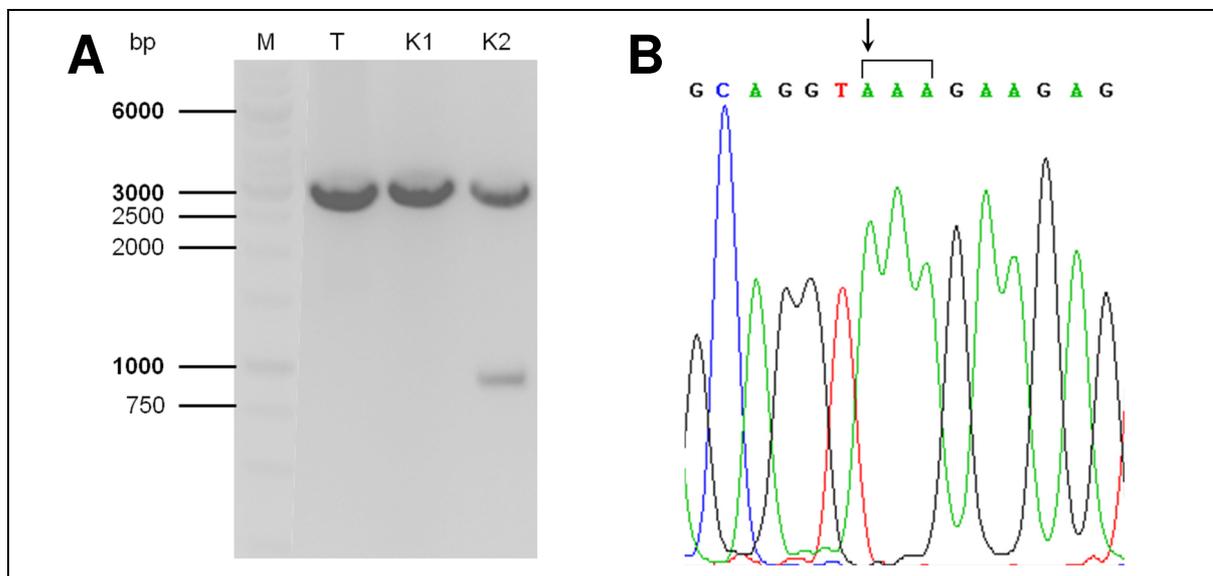
**Abbildung 4.14:** (A) Restriktionsanalyse durch Inkubation mit *Hind*III nach TOPO TA Cloning von pCR2.1-TOPO mit *Ha-Ras*<sup>Q61K</sup>-PCR-Produkt: Konstrukt mit falscher Orientierung des *Inserts* ergibt Fragmente von 3911 bp und 762 bp (K1), Konstrukt mit richtiger Orientierung des *Inserts* ergibt Fragmente von 4577 bp und 96 bp (K2); 1%-iges Agarose-Gel; M = Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). (B) Ausschnitt aus Sequenzierungsdaten des *Entry*-Vektors pCR2.1-TOPO-*Ha-Ras*<sup>Q61K</sup> (K2). Der Pfeil kennzeichnet die Basensubstitutionsmutation des Codon 61.

Der Zielvektor pTRE-Tight wurde durch Inkubation mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I linearisiert, anschließend mit SAP dephosphoryliert und durch peqGOLD Cycle-Pure Kit aufgereinigt. Der *Entry*-Vektor pCR2.1-TOPO-*Ha-Ras*<sup>Q61K</sup> wurde ebenfalls mit *Bam*HI und *Not*I inkubiert und das *Insert* mittels präparativem Agarose-Gel (0,8%) und peqGOLD Gel Extraction Kit aufgereinigt (ohne Abbildung).

Im Anschluss wurde der linearisierte Zielvektor mit dem aufgereinigten *Insert* durch Verwendung einer T4 DNA-Ligase vereinigt. Die entstandenen Konstrukte wurden mit *EcoRI* zur Analyse inkubiert (s. Abb. 4.15A). So konnte ein Vektor-*Insert*-Konstrukt identifiziert werden, das das *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-PCR-Produkt in richtiger Orientierung enthielt.

Dieses Konstrukt wurde per Sequenzierung mit spezifischen Primern (u.a. pEBFP\_C1 rev) weiter analysiert, was eine erfolgreiche Integration des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transkripts in der richtigen Orientierung belegte, ebenso wie das Intaktsein der P<sub>tight</sub>-Promoterregion und des Poly(A)-Schwanzes des pTRE-Tight-Rückgrates.

Ein Ausschnitt dieser Sequenzierung ist in Abbildung 4.15B gezeigt, auf der die Basensubstitutionsmutation des Codon 61 (CAA → AAA) zu sehen ist.



**Abbildung 4.15:** (A) Restriktionsanalyse durch Inkubation mit *EcoRI* der Ligation von dephosphoryliertem pTRE-Tight und des *Ha-Ras*<sup>Q61K</sup>-Inserts: Konstrukt ohne *Insert* ergibt ein Fragment von 2574 bp (K1), Konstrukt mit *Insert* in richtiger Orientierung ergibt Fragmente von 2580 bp, 760 bp und 52 bp (K2); pTRE-Tight (T) dient als Kontrolle; 1%-iges Agarose-Gel; M = Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). (B) Ausschnitt aus Sequenzierungsdaten des fertigen Vektors pTRE-Tight-*Ha-Ras*<sup>Q61K</sup> (K2). Der Pfeil kennzeichnet die Basensubstitutionsmutation des Codon 61.

#### 4.5.2 Testung von pTRE-Tight-*Ha-ras*<sup>Q61K</sup> *in vitro*

Bevor das Plasmid zur Pronukleusinjektion eingesetzt werden konnte, wurde dessen Funktionalität *in vitro* getestet. Dies geschah zum einem durch Analyse der mRNA-Expression in Tet-On-Zellen, die konstitutiv das rtTA-Protein exprimieren, und zum anderen durch Überprüfen der möglichen Aktivierung des MAPK-Signalwegs mittels Reporter-gen-Untersuchung.

#### 4.5.2.1 Einfluss auf die mRNA-Expression von pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> in einem Tet-On-System *in vitro*

Zur Erzeugung eines *in vitro*-Tet-On-Systems, wurde das Plasmid pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> transient in 70.4 Tet-On-Zellen transfiziert. Nach anschließender Behandlung mit Doxycyclin (1 µg/ml) für 24 h bzw. 48 h wurde die RNA aus den Zellen aufgearbeitet und durch LightCycler-*RealTime*-PCR die Expressionsmengen des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens und des MAPK-Signalweg-Zielgens *Egr1* bestimmt.

Bei Transfektion von pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> in 70.4 Tet-On-Zellen wurde nach 24 h eine sehr hohe mRNA-Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens gemessen (Abb. 4.16A). Ohne Zusatz von Doxycyclin ergab sich eine fast 150.000-fache Steigerung im Vergleich zur Expression bei Transfektion des Kontrollplasmids pTRE-Tight. Durch Gabe von Doxycyclin wurde diese auf über 2,1 Millionen gesteigert, was einer fast 15-fachen Erhöhung des Transgens entsprach.

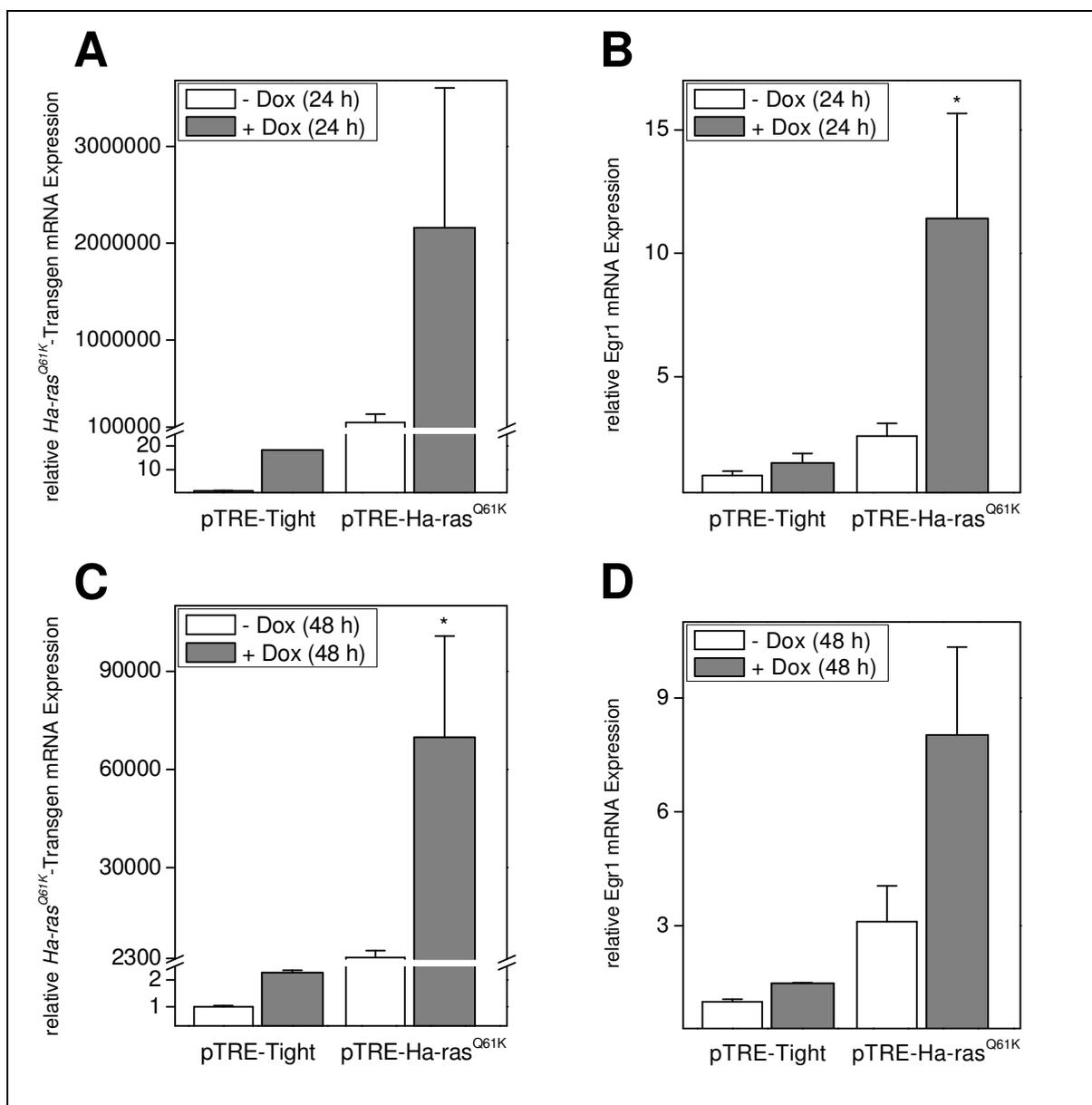
Nach 48 h fielen die Raten auf eine 2500-fache bzw. 70.000-fache Expression des Transgens ab (Abb. 4.16C). Dabei war im Vergleich zur Expression ohne Doxycyclin die mRNA-Menge in Anwesenheit von Doxycyclin signifikant um etwa den Faktor 27 erhöht.

In den mit pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-transfizierten 70.4 Tet-On-Zellen wurde nach 24 h ebenso eine Erhöhung der mRNA-Expression von *Egr1* gemessen (Abb. 4.16B). Im Vergleich zur Expression bei Transfektion des Kontrollplasmids pTRE-Tight waren die Mengen um 2,6-fach ohne Doxycyclin bzw. etwa 8-fach mit Doxycyclin erhöht. Dies entsprach einer 4,4-fachen signifikanten Erhöhung von *Egr1* durch Doxycyclin im Tet-On-System.

Nach 48 h war die Expression der *Egr1*-mRNA in Anwesenheit von pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> und Doxycyclin nur noch etwa 5,4-fach erhöht im Vergleich zum Kontrollplasmid (Abb. 4.16D). Dies entsprach dann nur noch einer nicht-signifikanten Erhöhung um den Faktor 2,6 durch Doxycyclin in mit pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-transfizierten Zellen.

Im vorliegenden *in vitro* Tet-On-System konnte die Funktionsfähigkeit des pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-Plasmids auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Das *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgen wurde exprimiert, was durch Gabe von Doxycyclin signifikant steigerbar war. Eine Grundaktivität auch in Abwesenheit von Doxycyclin kann auf eine geringe Undichtigkeit des Tet-Systems zurückgeführt werden, die nicht gänzlich zu vermeiden und für die vorliegende Zwecke nicht störend war.

Das exprimierte *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgen war in der Lage den MAPK-Signalweg zu aktivieren, was in einer signifikanten Expressionssteigerung von Egr1-mRNA ersichtlich war.



**Abbildung 4.16:** Induktion der mRNA Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens (**A, C**) und von Egr1 (**B, D**) durch Doxycyclin (1 µg/ml) in 70.4 Tet-On-Zellen nach transienter Transfektion mit pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> (pTRE-Ha-ras<sup>Q61K</sup>) bzw. pTRE-Tight zur Kontrolle nach 24 h (**A, B**) und 48 h (**C, D**). n=3 unabhängige Experimente in Triplikaten, Mittelwerte +SEM; statistische Signifikanz nach Students t-Test: \*p<0,05.

#### 4.5.2.2 Reporter-Untersuchung von pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> in Tet-On- und Tet-Off-Systemen *in vitro*

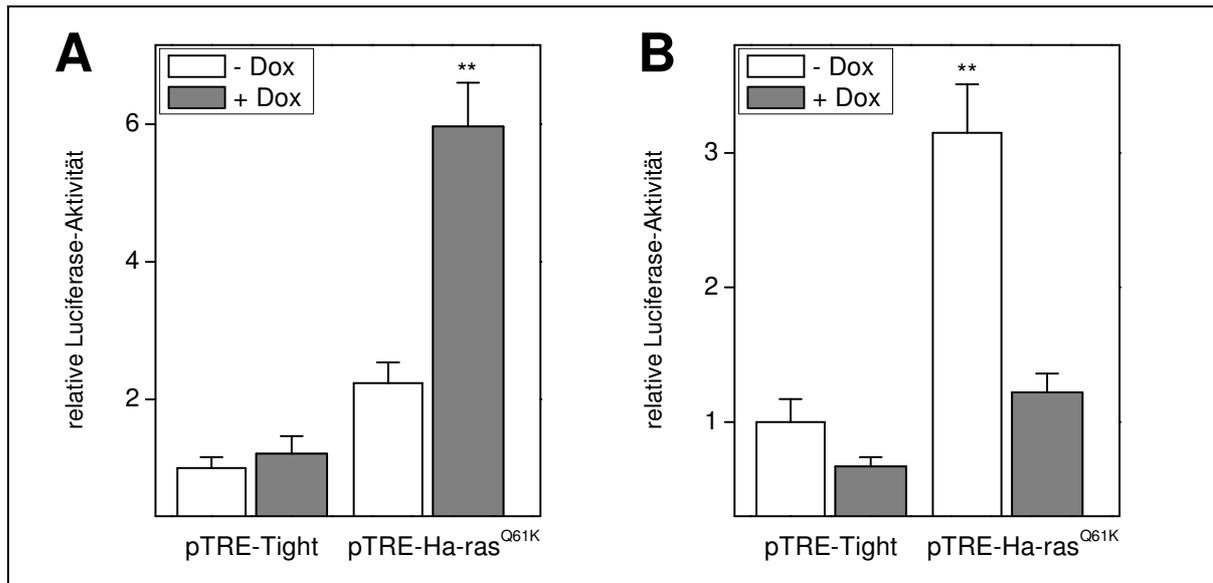
Zur weiteren Analyse der Funktionalität des pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-Plasmids und seines exprimierten Transgens, wurde eine Reporter-Untersuchung mit dem Reporterplasmid AP-1 durchgeführt, welches TPA responsive Elemente enthält, deren Aktivität u.a. durch MAP-Kinasen reguliert wird (s. 1.3.1; Karin, 1995). Bei Verwendung der spezifischen MEK-Inhibitoren PD98059 (Alessi *et al.*, 1995) und U0126 (Favata *et al.*, 1998) wurde die Aktivität des Reporterplasmids erniedrigt, durch Stimulierung des MAPK-Signalwegs durch EGF bzw. hohe Serumkonzentrationen (Braeuning *et al.*, 2007b) wurde sie hingegen erhöht (Daten nicht gezeigt).

70.4 Tet-On-Zellen wurden transient mit pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> und dem AP-1-Luciferase-Reporter transfiziert, um mögliche Änderungen in der MAPK-abhängigen Genexpression durch Gabe von Doxycyclin zu messen. Die Doxycyclin-vermittelte Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens führte dabei zu einer fast 2,7-fachen signifikanten Erhöhung der relativen Luciferase-Aktivität (Abb. 4.17A).

Zur Erzeugung eines Tet-Off-Systems wurden MCF7 Tet-Off-Zellen eingesetzt, die konstitutiv das tTA-Protein exprimieren. Hier wurde die Expression des Gens, das unter der Kontrolle des TRE-Promoters liegt, durch Entfernung von Doxycyclin aus dem System erreicht. MCF 7 Tet-Off-Zellen wurden analog zu 70.4 Tet-On-Zellen transient mit pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> und AP-1-Reporter transfiziert. In Zellen ohne Doxycyclin erfolgte eine Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens, die eine signifikante Steigerung der relativen Luciferase-Aktivität um etwa den Faktor 2,5 ergab (Abb. 4.17B).

Die Luciferase-Aktivitäten wurden jeweils auf Zellen normiert, die mit pTRE-Tight transfiziert wurden. Doxycyclin hatte in diesen Zellen keinen Effekt auf die relative Luciferase-Expression.

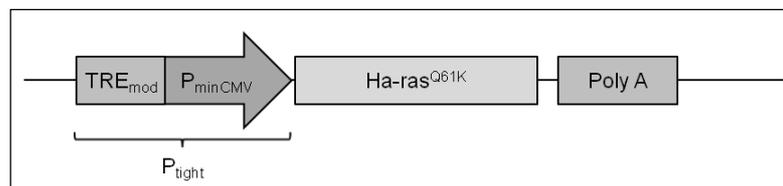
Die Funktionsfähigkeit des exprimierten *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens konnte *in vitro* sowohl in einem Tet-On- als auch in einem Tet-Off-System nachgewiesen werden. In beiden Systemen wurde eine signifikante Steigerung der MAPK-abhängigen Genexpression erreicht. Das Plasmid pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> konnte also verwendet werden, um ein transgene Maus zu generieren.



**Abbildung 4.17:** Aktivierung von MAPK-Signalgebung durch Doxycyclin-Gabe (1  $\mu\text{g/ml}$ , 24 h) in 70.4 Tet-On-Zellen (**A**) bzw. Doxycyclin-Entfernung in MCF7 Tet-Off-Zellen (**B**) nach transienter Transfektion mit pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup> (pTRE-Ha-ras<sup>Q61K</sup>) bzw. pTRE-Tight zur Kontrolle, dargestellt durch Induktion des MAPK-abhängigen AP-1-Luciferase-Reportersystems. n=3 unabhängige Experimente in 6 (A) bzw. 4-8 (B) technischen Replikaten, Mittelwerte +SEM; statistische Signifikanz nach Students t-Test: \*\*p<0,01.

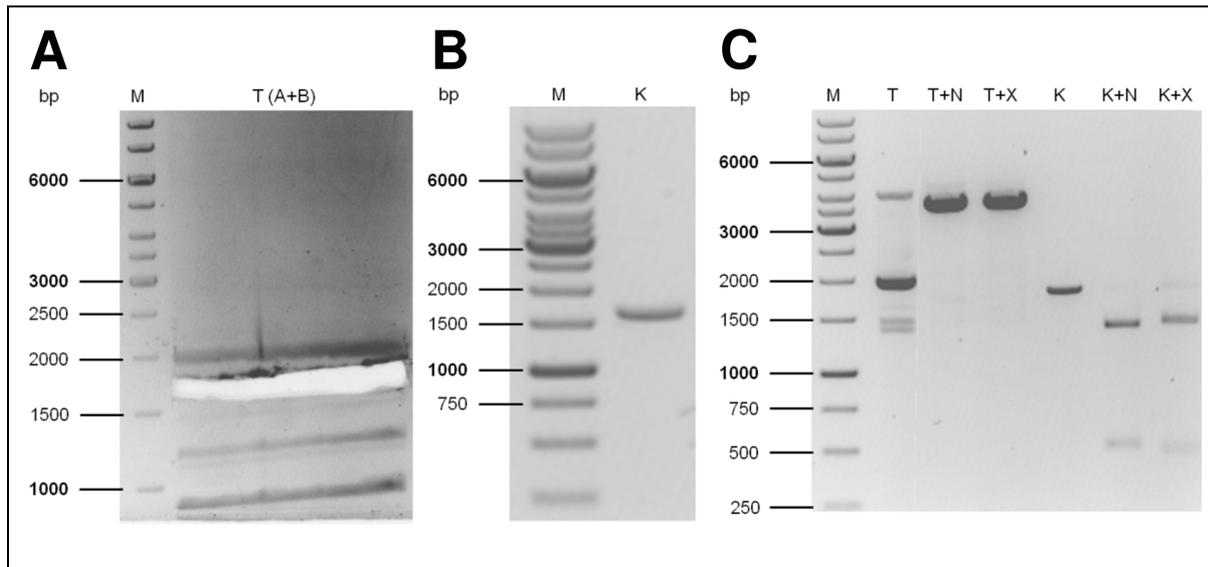
#### 4.5.3 Pronukleusinjektion zur Erzeugung transgener Mäuse

Aus dem erfolgreich getesteten pTRE-Tight-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-Plasmid wurde ein Konstrukt mithilfe von Restriktionsendonukleasen und präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert (Abb. 4.19A), welches den Tet-responsiven P<sub>tight</sub>-Promoter, die codierende Sequenz von Ha-ras<sup>Q61K</sup> sowie den Poly(A)-Schwanz enthält (s. Abb. 4.18). Nach Aufreinigung der DNA durch das QIAquick Gel Extraction Kit wurde diese mittels Restriktionsanalyse überprüft (s. Abb. 4.19B,C).



**Abbildung 4.18:** Schematische Darstellung des TRE-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-Poly(A)-Transgenkonstrukt. Einzelne Elemente: P<sub>tight</sub>-Promoter ist 316 bp lang, Ha-ras<sup>Q61K</sup>-Transgen ist 820 bp lang und SV 40 Poly(A)-Schwanz ist 200 bp lang. Gesamtlänge des isolierten Konstrukts beträgt 1688 bp.

Anschließend wurde das DNA-Konstrukt an die Serviceeinrichtung Transgene Tiere des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) zur Durchführung der Pronukleusinjektion übergeben (s. 3.8.2).



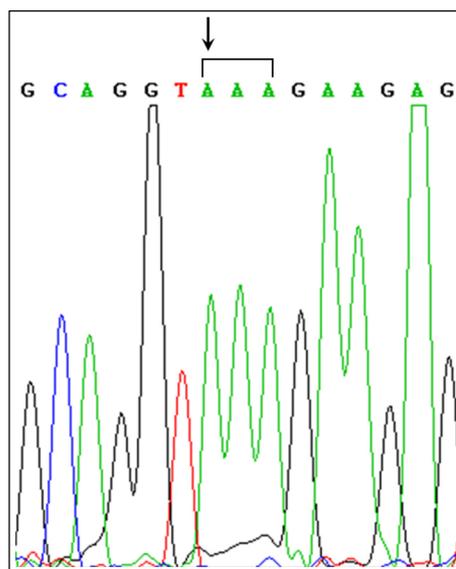
**Abbildung 4.19:** (A) Präparative Agarose-Gelelektrophorese nach Behandlung von pTRE-Tight-Ha-Ras<sup>Q61K</sup> (T) mit Restriktionsendonukleasen *AatII* (A) und *BpuEI* (B). (B) Das ausgeschnittene Fragment der Größe 1688 bp entspricht dem gewünschten Konstrukt TRE-Ha-Ras<sup>Q61K</sup>-Poly(A) (K). (C) Restriktionsanalyse von pTRE-Tight-Ha-Ras<sup>Q61K</sup> (T) und des isolierten Konstrukts (K) durch Inkubation mit *NotI* (N) bzw. *XbaI* (X): (T) wird linearisiert, (K) ergibt mit (N) Fragmente von ca. 1230 bp und 440 bp, mit (X) Fragmente von ca. 1260 bp und 410 bp. 0,9%-iges Agarose-Gel; M = Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder).

#### 4.5.4 Identifizierung von Nachkommen mit verändertem Erbgut und Erzeugung einer bitransgenen Mauslinie

Nach Durchführung mehrerer Pronukleusinjektionen des Transgen-Konstrukts und Übertragung der mikroinjizierten Zygoten in Ammenmütter wurden insgesamt 115 Foundertiere erhalten. Diese wurden durch Entnahme von Gewebeproben (Ohrblatt) und mittels Genotypisierungs-PCR daraufhin untersucht, ob die injizierte fremde DNA in das Erbgut der Tiere aufgenommen wurde. Dabei konnten 23 Tiere positiv identifiziert werden. Zur genaueren Kontrolle, ob das DNA-Konstrukt komplett und intakt in das Genom eingebaut wurde, wurden mehrere Sequenzierungen mit genomischer DNA von positiv-identifizierten Mäusen durchgeführt.

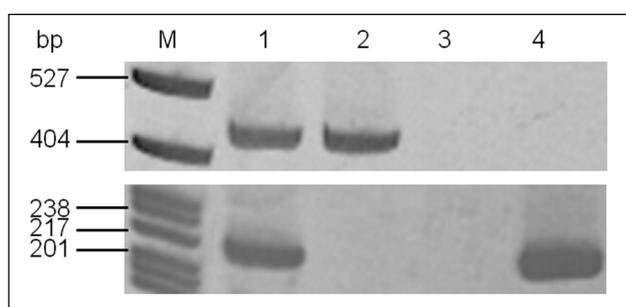
Die Sequenzierungen ergaben, dass das TRE-Ha-ras<sup>Q61K</sup>-Poly(A)-Transgenkonstrukt vollständig und intakt (s. Abb. 4.18) ins Genom der transgenen Mäuse integriert wurde.

Ein Ausschnitt einer Sequenzierung ist in Abbildung 4.20 gezeigt, auf der die Basensubstitutionsmutation des Codon 61 (CAA → AAA) zu sehen ist.



**Abbildung 4.20:** Ausschnitt aus Sequenzierungsdaten (Primer: pTRE-Tight Sequencing fwd, Ras\_61B2) des Genoms einer bitransgenen Maus. Der Pfeil kennzeichnet die Basensubstitutionsmutation des Codon 61.

Um ein vollständiges Tet-System zu erhalten, wurden diese TRE-Ras-Mäuse mit tTA-LAP-Tieren verpaart, die das tTA-Protein unter der Kontrolle des leberspezifischen Promoters LAP exprimieren. Durch Gabe von Doxycyclin-haltigem Futter ab Verpaarung der Elterntiere wurde eine mögliche Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens nach dem Tet-Off-Prinzip unterdrückt. Die Nachkommen wurden mittels Genotypisierungs-PCR analysiert (s. Abb. 4.21) und nach Vorhandensein beider Transgene für die folgenden Versuche selektiert, um *in vivo* leberspezifisch eine Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens zu erreichen. Das *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgen wurde dabei nur in geringem Maße von den 23 Foundertieren weitervererbt; es konnten lediglich die Nachkommen eines Muttertiers für die weitere Zucht verwendet werden.



**Abbildung 4.21:** Ergebnis Genotypisierungs-PCR aus genomischer Maus-DNA von vier exemplarischen Mäusen (1-4): tTA-LAP ergibt Produkt von 450 bp, TRE-Ras ergibt Produkt von 223 bp; bitransgene Maus (1), tTA-LAP-Maus (2), Wildtyp-Maus (3), TRE-Ras-Maus (4). 10%-iges Acrylamid-Gel; M = Marker (pBR322 DNA-*MspI* digest).

#### 4.5.5 Charakterisierung von bitransgenen Mäusen nach leberspezifischer Aktivierung des tetracyclinabhängigen *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens

In den erhaltenen bitransgenen Mäusen wurde geprüft, ob das Transgen exprimiert wurde und das vom Transgen codierte Protein Veränderungen im Expressionsmuster der Leber hervorrufen konnte.

Zur Aktivierung des Tet-Systems, als Voraussetzung für eine mögliche Expression des Transgens, wurde Doxycyclin entfernt, was durch Gabe von Doxycyclin-freiem Futter geschah. Die Tiere zeigten eine normale Entwicklung und schienen durch ihre Transgenität nicht belastet zu sein.

In einem Kurzzeitversuch wurde Tieren im Alter von ca. 28 Wochen für 72 h bzw. 7 Tage Doxycyclin entzogen. In einer Langzeitaktivierung vergleichbar mit Moennikes *et al.*, 2000, erfolgte bei den Versuchstieren ein Absetzen der kontinuierlichen Doxycyclinbehandlung etwa 14 Tage nach Geburt für eine Dauer von 25 Wochen (s. 3.9.6.2).

Im Anschluss wurden die Tiere getötet und die Lebern zur Analyse entnommen. Die untersuchten Lebern unterschieden sich optisch nicht von denen von Wildtyp-Tieren. Auch das Lebergewicht wies keine Auffälligkeiten auf.

##### 4.5.5.1 Analyse der mRNA-Expression in Lebergewebe

Aus gefrorenen Lebergewebestücken wurde RNA aufgearbeitet und anschließend durch LightCycler-*RealTime*-PCR die Expressionsmengen des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens und des MAPK-Signalweg-Zielgens *Egr1* bestimmt.

Es konnte dabei keine Expression des Transgens gemessen werden. Die mRNA-Expression von *Egr1* war im Vergleich zur Expression aus Wildtyp-Kontrolltieren und einfach transgenen Mäusen (tTA-LAP bzw. TRE-Ras) unverändert (Daten nicht gezeigt).

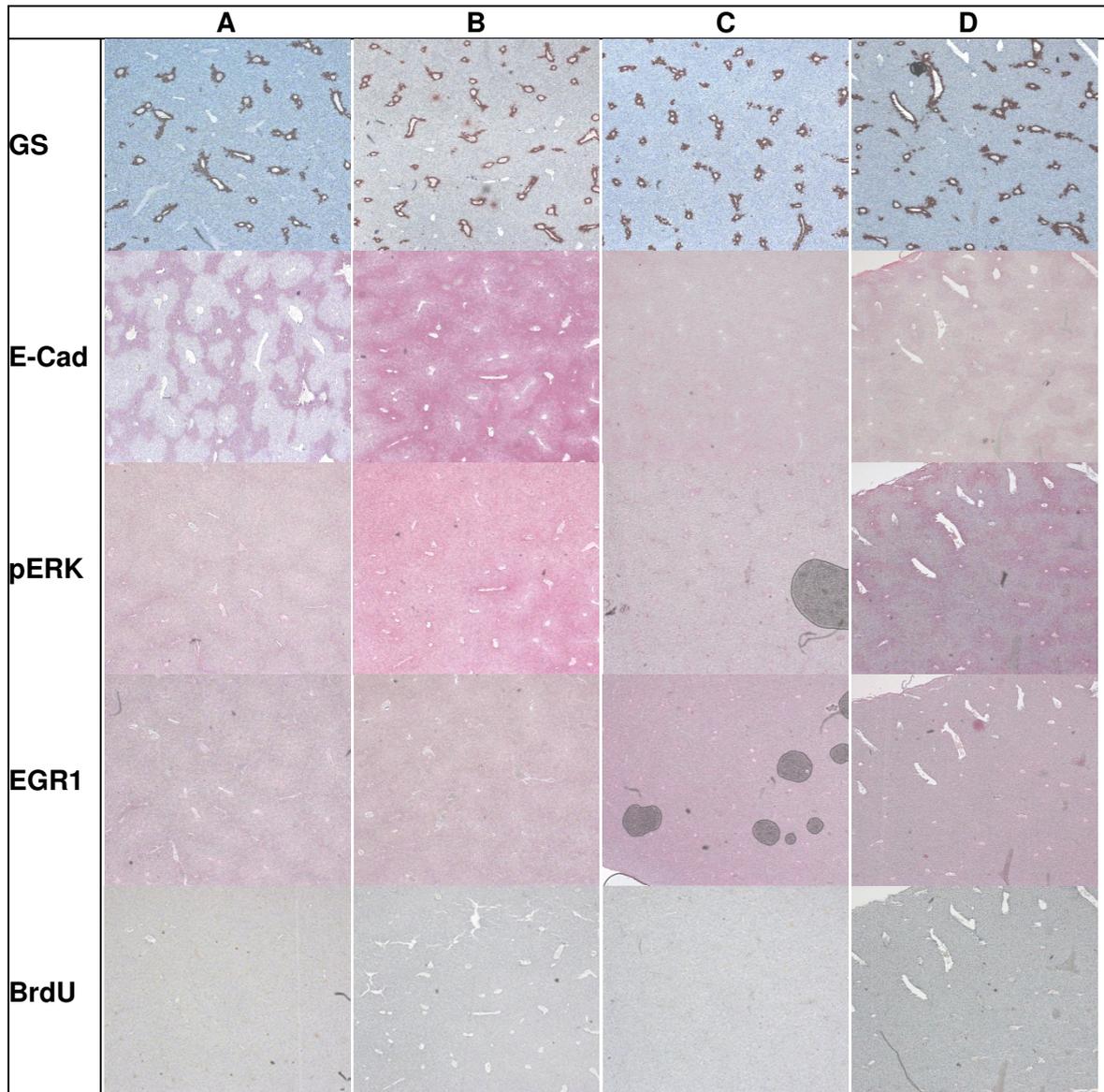
Dies könnte daran liegen, dass eventuell nur eine geringe Zahl Transgen-exprimierender Hepatozyten im Lebergewebe vorlag. Dieser sogenannte „Einzelzell-Phänotyp“ wurde bereits bei der Generierung einer transgenen Maus, die induzierbar eine aktivierte Form des humanen  $\beta$ -Catenins trug, beobachtet (Schreiber *et al.*, 2011). In einem solchen Fall sind Änderungen der mRNA-Mengen exprimierender Zellen im Vergleich zur Gesamtleber zu gering um detektiert zu werden.

#### 4.5.5.2 Immunhistochemische Untersuchungen des Lebergewebes

Um zu untersuchen, ob eine eventuelle Expression des Transgens in einzelnen Hepatozyten vorlag, wurden mittels immunhistochemischer Färbungen Gewebeschnitte auf Veränderungen im Expressionsmuster analysiert.

*Ha-ras*-mutierte Lebertumore und somit auch Einzelzellen, die mutiertes *Ha-ras* exprimieren, können durch Detektion von aktiviertem und somit phosphoryliertem ERK1/2 dargestellt werden. Ebenso werden E-Cadherin (E-Cad) und EGR1 höher exprimiert. Sind solche positiven Zellen außerhalb der periportal Zone zu finden, sind sie ein Hinweis für die Expression des *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgens. Im Gegenzug müssten Transgen-exprimierende Zellen im perivenösen Bereich den dort vorherrschenden  $\beta$ -Catenin-Phänotyp verlieren, was durch Färbung des  $\beta$ -Catenin-Zielgens GS dargestellt wurde. Zur Beurteilung der hepatischen Proliferation wurde zusätzlich BrdU gefärbt, welches den Tieren drei Tage vor Tötung durch das Trinkwasser verabreicht wurde. Eine enzymhistochemische Färbung von Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase) diente zur Identifizierung eventuell auftretender Tumore.

Bei Kurzzeitaktivierung des Tet-Off-Systems in bitransgenen Mäusen waren keine Veränderungen in der metabolischen Zonierung der Leber im Vergleich zu Kontrolltieren sehen (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchungen nach 4 und 25 Wochen ließen ebenso keine Veränderungen in der Leber im Vergleich zu Kontrolltieren erkennen (s. Abb. 4.22). Es wurden auch keine Einzelzellen detektiert, die erhöhte E-Cad-, pERK- oder EGR1-Gehalte außerhalb der periportal Zone aufwiesen. Die GS-positiven Hepatozyten und somit die  $\beta$ -Catenin-Signalgebung im perivenösen Bereich waren unbeeinflusst. Das Fehlen von BrdU-positiven Zellen zeigte, dass keine Proliferation in der Leber der bitransgenen Mäuse auftrat. Die G-6-Pase-Aktivität in den untersuchten Lebergewebeschnitten war einheitlich, es traten keine Tumore auf (Daten nicht gezeigt). Offenbar wurde das *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Transgen in den Hepatozyten der bistransgenen Mäuse nach Induktion durch Absetzen von Doxycyclin nicht exprimiert.



**Abbildung 4.22:** Immunhistochemische Färbungen der Protein-Expression in Lebergewebschnitten von *Wildtyp*-Tieren (**A**) im Vergleich zu nicht-induzierten bitransgenen Mäusen (**B**) und für 4 Wochen (**C**) bzw. 25 Wochen (**D**) induzierte Tiere; dargestellt durch den perivenösen Marker GS, Marker für aktive Ras-Signalgebung (phosphoryliertes ERK1/2 (pERK), E-Cadherin (E-Cad), EGR1) und den Proliferationsmarker BrdU.

## 5 Diskussion

Basierend auf einigen Beobachtungen unserer Gruppe wurde die Hypothese entwickelt, dass der  $\beta$ -Catenin- und der Ha-ras-Signalweg die Möglichkeit haben sich gegenseitig in Mausleberzellen zu unterdrücken (Stahl *et al.*, 2005; Hailfinger *et al.*, 2006; Braeuning *et al.*, 2007b). In der Literatur finden sich aber viele Daten, die darauf hinweisen, dass die beiden Signalwege in anderen Spezies oder Geweben zusammenarbeiten (z.B. Kim *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2012). Höchstwahrscheinlich haben gewebe- und speziesspezifische Faktoren Auswirkungen auf die Art und Weise wie die beiden Signalkaskaden sich gegenseitig beeinflussen, was auch kürzlich in einem Kommentar in *Science Signaling* betont wurde (Guardavaccaro und Clevers, 2012). Neben inhibitorischen Effekten von aktivierter MAPK-Signalgebung auf den  $\beta$ -Catenin-Signalweg in u.a. humanen Melanomen (Biechele *et al.*, 2012), wurde dies auch in hepatozellulären Systemen beschrieben (Braeuning *et al.*, 2007b). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ebenso ein reverser *Crosstalk* auftreten kann. In Maushepatomzellen konnte  $\beta$ -Catenin die Induzierbarkeit von MAPK-Signalgebung inhibieren, was durch Phosphorylierung und Aktivierung von ERK dargestellt wurde.

Im Gegensatz dazu berichteten Harada und Kollegen (Harada *et al.*, 2004) von einer Kooperation von  $\beta$ -Catenin und Ha-ras bei der murinen Hepatokanzerogenese. Eine mögliche Erklärung für diese Unstimmigkeiten könnte sein, dass Harada und Kollegen in ihrem Mausmodell eine adenoviral vermittelte Koexpression von aktiviertem Ha-ras und aktiviertem  $\beta$ -Catenin angewendet haben. Diese Herangehensweise führt zu hohen Mengen an mutierten und somit konstitutiv aktiven Proteinen, was die physiologisch-regulatorischen Mechanismen der Signalwegwechselwirkungen überlastet haben könnte. Eine ausführliche Diskussion dazu findet sich in Braeuning *et al.*, 2007b. Der Grad der Bösartigkeit des Tumors könnte auch ein kritischer Bestimmungsfaktor der Art der Wechselwirkung von  $\beta$ -Catenin und Ras in der Mausleber sein (Zeller *et al.*, 2013).

Die Ergebnisse der Herunterregulierung der Egfr-Expression als Antwort auf Aktivierung von  $\beta$ -Catenin in Lebern von transgenen Mäusen, in Mauslebertumoren und Maushepatomzellen *in vitro* scheint in Konflikt zu stehen mit einer früheren Veröffentlichung, die eine Induktion von Egfr durch  $\beta$ -Catenin beschreibt (Tan *et al.*, 2005). In dieser Studie beobachteten Tan und Kollegen erhöhte Expression von Egfr in einem transgenen Mausmodell mit Überexpression von Wildtyp- $\beta$ -Catenin. Es ist allerdings unklar ob und in welchem Ausmaß das Wildtyp- $\beta$ -Catenin in diesem Modell aktiviert wurde, da der Veröffentlichung Daten der einhergehenden Induktion „klassischer“

hepatischer  $\beta$ -Catenin-Zielgene fehlen, wie z.B. GS und andere Enzyme des Stickstoffmetabolismus (Cadoret *et al.*, 2002; Loeppen *et al.*, 2002; s. Abb. 4.12) oder fremdstoffmetabolisierender Enzyme (Braeuning, 2009; Braeuning und Schwarz, 2010; s. Abb. 4.11). Aufgrund dieses Missstandes ist es unklar, ob die Egfr-Überexpression in diesem Mausmodell tatsächlich spezifisch von  $\beta$ -Catenin verursacht wurde oder nicht. Zusätzlich zeigten Tan und Kollegen, dass Egfr in humanen Hepatoblastomen, die *CTNNB1*-Mutationen trugen, überexprimiert war. Dies steht nicht notwendigerweise im Widerspruch mit unseren Daten, da die Regulation von Egfr in Menschen sich von der Regulation in Mäusen unterscheiden könnte. Zudem könnten andere Genveränderungen in den humanen Tumorproben die Egfr-Expression beeinflussen. So zeigten auch nicht alle der Hepatoblastomproben erhöhte Egfr-Expression, ungeachtet der Zunahme von aktiviertem  $\beta$ -Catenin (Tan *et al.*, 2005). Die Herangehensweise der vorliegenden Arbeit in verschiedenen fest etablierten Modellen der  $\beta$ -Catenin-Aktivierung stellt einen einfacheren und direkteren Zugang dar, als es Tan und Kollegen präsentierten. Somit scheint die Verringerung der Expression von Egfr durch Aktivierung von  $\beta$ -Catenin zusammen mit entsprechenden Zielgenen in der Mausleber die physiologische Situation besser zu beschreiben. Interessanterweise war die Reduktion der Proteinmenge von EGFR in Maushepatomzellen stärker ausgeprägt als die Reduktion der entsprechenden mRNA. Dies könnte darauf hinweisen, dass zusätzliche Mechanismen auf Proteinebene den Gehalt an EGFR als Antwort auf Aktivierung von  $\beta$ -Catenin beeinflussen.

Eine neue Studie (Mutoh *et al.*, 2013) hat eine Wechselwirkung zwischen EGFR und der Phenobarbital-vermittelten Induktion des nukleären Rezeptors CAR gezeigt. CAR ist ein Transkriptionsfaktor, der durch verschiedene Fremdstoffe indirekt aktiviert wird und so den Fremdstoffmetabolismus in der Leber vorantreibt. CAR ist bevorzugt in perivenösen Hepatozyten angesiedelt, spielt eine positiv-regulatorische Rolle in der  $\beta$ -Catenin-vermittelten Signalgebung und viele Hinweise deuten darauf hin, dass CAR ein direktes  $\beta$ -Catenin-Zielgen ist (Braeuning, 2012). Mutoh und Kollegen zeigten, dass die Phenobarbital-vermittelte Aktivierung von CAR durch Inhibition von EGFR vermittelt wird. Dies könnte also ein weiterer Hinweis für eine antagonistische Wechselwirkung zwischen  $\beta$ -Catenin- und MAPK-Signalgebung sein.

Neben den Effekten auf Egfr, konnte deutlich eine Überexpression von Dusp6 im Zusammenhang mit  $\beta$ -Catenin-Aktivierung gezeigt werden, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Eva Zeller (Zeller *et al.*, 2012) konnte darüber hinaus zeigen, dass Dusp6 ein direktes Zielgen von  $\beta$ -Catenin ist. Die Promoterregionen des Dusp6-Gens in Hepatozyten aus transgenen Mausmodellen, mit entweder einem konditionalen *knockout* des *Apc*- oder des *Ctnnb1*-Gens, wurden mittels ChIP-Seq-Analyse unter Verwendung

von Antikörpern gegen TCF4 oder  $\beta$ -Catenin untersucht. Durch Reporter-genuntersuchungen und gezielte Mutagenese der dabei ermittelten TCF-Konsensussequenzen konnte so gezeigt werden, dass Dusp6 ein direktes transkriptionelles Ziel von  $\beta$ -Catenin-Signalgebung ist (Zeller *et al.*, 2012). Der Dusp6-Promoter ist in vielen Spezies gut konserviert wie z.B. in Maus, Ratte, Hund und Orang-Utan, aber nicht im Menschen.

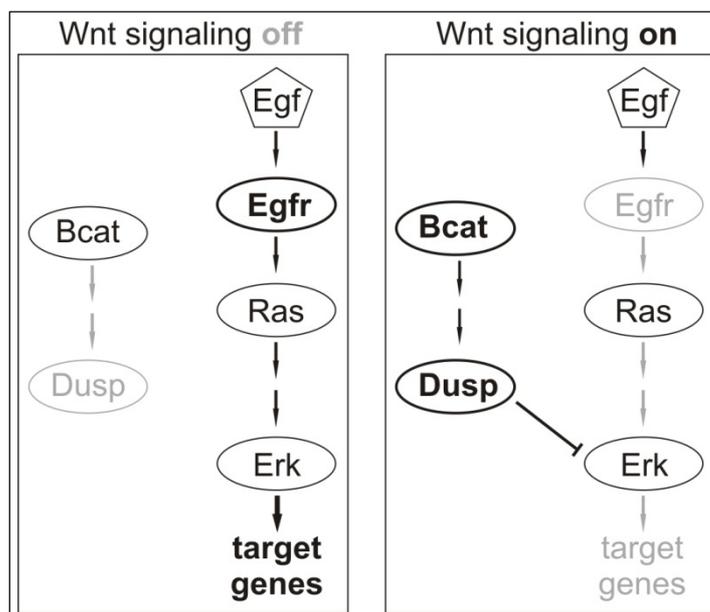
Nach aktivierender Mutation von *Ha-ras* konnte erhöhte Expression von Dusp6 beobachtet werden, was schon in früheren Studien mit verschiedenen Zelllinien, die aktivierte Ras- und Raf-Mutationen tragen, gezeigt wurde (Überblick s. Keyse, 2008). DUSP6 ist die am besten studierte und charakterisierte der cytoplasmatischen DUSPs, die eine hohe Selektivität gegenüber ERK1/2 zeigen und keine oder kaum Aktivität in Bezug auf JNK oder p38. DUSP6 ist verantwortlich für die Regulation der ERK-Aktivität als Reaktion auf FGF-Signalgebung während der frühen Entwicklung in der Maus (Li *et al.*, 2007). Die Überexpression von Dusp6 als Antwort auf aktiviertes Ras stellt vermutlich eine Kompensation desselben durch negative *Feedback*-Kontrolle dar. Dass Dusp6 eine wichtige Rolle im onkogenen Prozess spielt, zeigten u.a. Untersuchungen von Pankreastumoren und entsprechenden Zelllinien. Ein Verlust der Dusp6-Expression zusammen mit Aktivierung von K-Ras führte hier zu einem malignen und invasiven Phänotyp, wohingegen Aktivierung von Dusp6 in pankreatischen Krebszelllinien eine Unterdrückung des Zellwachstums und Erhöhung der Apoptose verursachte (Furukawa *et al.*, 2003). Allerdings zeigen sich auch hier unterschiedliche Bilder: obwohl DUSPs logischerweise Tumorsuppressoren darstellen sollten und in einigen Tumortypen ein Verlust ihrer Expression beobachtet wurde, ist eine Expressionssteigerung von Dusps häufig mit Krebsprogression, Arzneimittelresistenz und schlechter Prognose verbunden (Keyse, 2008; Caunt und Keyse, 2013). Die gesteigerte Expression von Dusps könnte zwar eine einfache Folge einer erhöhten MAPK-Aktivität sein, das scheint aber ungewöhnlich unter dem Selektionsdruck, dem Tumorzellen bezüglich ihres Expressionsprofils ausgesetzt sind. Die Unterschiede der Dusp-Expression hängen vermutlich vom Krebstyp und der Natur der treibenden Onkogene ab.

Abgesehen von ihrer Rolle als negative *Feedback*-Regulatoren, gibt es zahlreiche Beispiele, wo verschiedene Signale den DUSP-Umsatz und posttranslationale Modifikationen beeinflussen, um dynamische Kontrolle über MAPK-Substrate und *Crosstalk* auszuüben, was in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen steht (Überblick s. Caunt und Keyse, 2013).

Es fand sich zwar auch eine Überexpression von Dusp14 in Tumoren, die Mutationen in *Ctnnb1* oder *Ha-ras* trugen, sowie in transgenen Mäusen nach  $\beta$ -Catenin-Aktivierung,

diese Beobachtungen konnten aber *in vitro* nicht gemacht werden. Eine Regulation durch  $\beta$ -Catenin konnte hier also nicht hinreichend gezeigt werden. Dusp14 ist bislang kaum untersucht. Es dephosphoryliert *in vitro* ERK, JNK und p38 (Marti *et al.*, 2001). Eine dominant-negative Mutation verstärkt die Proliferation von  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch Erhöhung der ERK-Aktivität (Klinger *et al.*, 2008). Überexpression von Dusp14 inhibiert die TNF- und IL-1-induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung (Zheng *et al.*, 2013). Die Funktionen von Dusp14 *in vivo* sind immer noch unklar.

Egfr und Dusp6, eventuell auch Dusp14, wurden also als Kandidaten identifiziert, die die Inhibition des MAPK/Ras-Signalwegs durch Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung vermitteln können (s. Abb. 5.1).

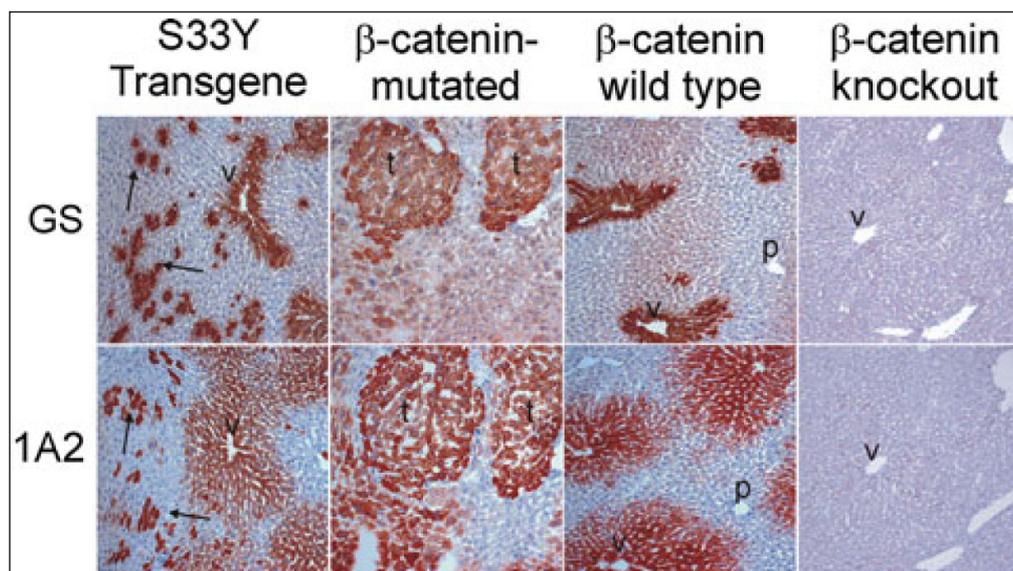


**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung der Wechselwirkung von  $\beta$ -Catenin- und MAPK/Ras-Signalgebung in der Mausleber. Aktivierung von Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung führt zu einer Reduktion der Egfr-Menge und einer erhöhten Expression von Dusp6 und Dusp14, negativen Regulatoren der MAPK-Kaskade. So ist  $\beta$ -Catenin in der Lage MAPK/Ras-Signalgebung durch zwei unabhängige Mechanismen zu inhibieren. (Abbildung entnommen aus Zeller *et al.*, 2012).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, ein transgenes Mausmodell mit einer induzierbaren Form von aktiviertem *Ha-ras* zu entwickeln. Mithilfe des Tet-Systems wurde ein Expressionsvektor hergestellt, der eine tetracyclinabhängige Induktion einer punktmutierten Version von *Ha-ras* ermöglicht. Dieser Vektor war *in vitro* voll funktionsfähig. Die Generierung transgener Mäuse durch Mikroinjektion eines linearen Konstrukts aus diesem Expressionsvektor war insoweit erfolgreich, dass das Transgenkonstrukt völlig intakt nachgewiesen werden konnte. Sowohl der

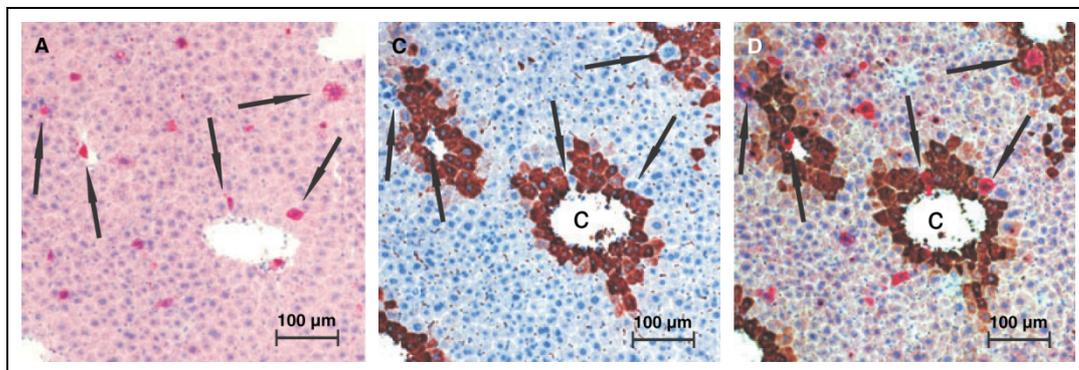
tetracyclinspezifische  $P_{\text{tight}}$ -Promoter, das  $Ha\text{-ras}^{Q61K}$ -Transgen mit aktivierender Basensubstitutionsmutation, als auch der SV 40 Poly(A)-Schwanz waren laut Sequenzierung vollständig. Durch die Verpaarung mit Tieren, die den tetracyclinabhängigen Transaktivator tTA unter dem leberspezifischen Promoter LAP exprimieren, wurden bitransgene Mäuse erhalten, die eine Induktion des  $Ha\text{-ras}^{Q61K}$ -Transgens in Abwesenheit von Doxycyclin ermöglichen sollten. Eine Expression des Transgens und somit eine Transkription von Zielgenen oder posttranslationale Modifikationen konnten jedoch in der Leber der transgenen Mäuse selbst nach Induktion des Tet-Systems für 25 Wochen nicht nachgewiesen werden.

In einem früheren transgenen Mausmodell unserer Arbeitsgruppe wurde eine hepatozytenspezifische Expression einer aktivierten punktmutierten Form des humanen  $\beta$ -Catenin (S33Y) mittels Cre/loxP-vermittelter Rekombination erreicht (Schreiber *et al.*, 2011). Dabei wurde  $\beta$ -Catenin nur in einzelnen verstreuten Hepatozyten aktiviert, was durch immunhistochemische Färbungen der  $\beta$ -Catenin-Zielgene GS und CYP1A2 gezeigt wurde. Die verstreuten Einzelzellen fanden sich innerhalb des gesamten normalen Leberparenchyms, unabhängig von der Leberzonierung. Das Genexpressionsprofil dieser Einzelzellen ähnelte dabei dem von *Ctnnb1*-mutierten Lebertumoren (s. Abb. 5.2).



**Abbildung 5.2:** Immunhistochemische Färbungen in Lebergewebeschnitten von Mäusen mit einer aktivierten Form von  $\beta$ -Catenin (*S33Y Transgene*), Wildtyp-Mäusen mit *Ctnnb1*-mutierten Tumoren (*beta-catenin mutated*) und ohne Tumore (*beta-catenin wild type*) und nach konditionalem *knockout* von *Ctnnb1* (*beta-catenin knockout*); dargestellt durch die perivenösen Marker und bekannte Zielgene von  $\beta$ -Catenin: GS und CYP1A2.  $\beta$ -Catenin<sup>S33Y</sup>-Expression erhöht die Proteinmenge von GS und CYP1A2 in Hepatozyten in abnormaler Lokalisation innerhalb des Leberläppchens. Abk.: t = Tumor, v = Zentralvene, p = Pfortader. (Abbildung entnommen aus Schreiber *et al.*, 2011).

Harada und Kollegen entwickelten eine transgene Maus, die eine humane aktive Form des *Ha-ras*-Gens (G12V) nach adenoviral induzierter Cre-Rekombination trugen (Harada *et al.*, 2004). Dabei detektierten sie fehlgebildete, vergrößerte Hepatozyten eine Woche nach Aktivierung des Transgens. Diese fehlgebildeten Zellen traten weitestgehend als isolierte Einzelzellen auf, vermutlich weil nur ein geringer Teil der Hepatozyten mit dem Adenovirus infiziert wurde. Diese Einzelzellen ließen sich einfach durch immunhistochemische Färbungen von phosphoryliertem ERK, einem *downstream* Ziel der Ras-Signalgebung, darstellen. Zudem wurden einzelne Zellen um die Zentralvene gefunden, die keine GS-Expression zeigten, dafür aber ERK-Aktivierung (Braeuning *et al.*, 2007b; s. Abb. 5.3).



**Abbildung 5.3:** Immunhistochemische Färbungen in Lebergewebeschnitten von transgenen Mäusen mit einer aktivierten Form von *Ha-ras*<sup>G12V</sup>: **(A)** vereinzelte Hepatozyten, die Aktivierung von ERK1/2 zeigen; **(B)** einzelne Hepatozyten um die Zentralvene, die keine GS-Expression zeigen; **(C)** Doppelfärbung von GS (braun) und phosphoryliertem ERK (rot) offenbart, dass die GS-negativen perivenösen Einzelzellen Aktivierung von ERK1/2 aufweisen. Abk.: c = Zentralvene. (Abbildung entnommen aus Braeuning *et al.*, 2007b).

Kang und Kollegen generierten ein Ras-Mausmodell durch hydrodynamische Injektion von Transposons, die onkogenes *N-ras* (G12V) in Hepatozyten exprimieren (Kang *et al.*, 2011). Dabei wird ein großes Volumen DNA in kurzer Zeit in große Gefäße injiziert. Durch den entstehenden hydrodynamischen Druck werden die kleineren Gefäße durchlässig und die Zellen in der Nähe der Blutgefäße bilden Poren, in die die DNA eindringen kann. Sie konnten dabei aktivierte MAPK-Signalgebung durch immunhistochemische Färbung von phosphoryliertem ERK in Einzelzellen und nach stabiler Integration des onkogenen *N-ras*<sup>G12V</sup> in Langzeituntersuchen die Entwicklung von HCCs detektieren.

Um mögliche Einzelzellen im *Ha-ras*<sup>Q61K</sup>-Modell dieser Arbeit nachzuweisen in denen eine Transgen-Aktivierung stattgefunden haben könnte, wurden immunhistochemische Färbungen von E-Cadherin und phosphoryliertem ERK durchgeführt und nach abnormaler

Lokalisation positiv-gefärbter Hepatozyten gesucht. Solche Einzelzellen konnten jedoch nicht gefunden werden.

Alles deutete darauf hin, dass das Transgen *in vivo* nicht exprimiert wurde, obwohl das Transgenkonstrukt intakt und *in vitro* funktionsfähig war.

Die Generierung der transgenen Tiere wurde durch die erfahrene Serviceeinrichtung Transgene Tiere des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) Tübingen durchgeführt. Technische Unstimmigkeiten, wie die Wahl des genetischen Hintergrunds, die DNA-Reinheit, -Konzentration und -Menge, sowie der Aufbau des Transgenkonstrukts konnten ausgeschlossen werden. So wurden aus 115 Foundertieren 23 positiv für das eingebrachte Transgen identifiziert, was innerhalb der erwarteten statistischen Rate von 10-20% lag (Auerbach, 2004). Allerdings vererbte nur ein einziges Foundertier das Transgen weiter, auf dem die komplette Nachkommenschaft der bitransgenen Mäuse basierte. Viele Studien haben dramatische Unterschiede in der Expression des gleichen Transgens zwischen einzelnen Foundertieren aufgrund verschiedener Orte der Integration in das Genom gefunden. Deshalb ist es wichtig verschiedene unabhängige Linien desselben Transgenkonstrukts zu generieren und zu züchten, was hier nicht möglich war. Wichtig ist vor allem die Position im Genom, in die das Transgen integriert wird. Fehlende Expression kann darauf zurückgeführt werden, dass das Transgen in eine transkriptionell inaktive Region eingefügt wurde oder spezifischen Genstilllegungsprozessen unterlag (Auerbach, 2004).

Der große Nachteil der Technik der Pronukleusinjektion liegt in der zufälligen Integration der DNA in das Genom. Wegen der etablierten Handhabung und des relativ geringen finanziellen Aufwandes, ist sie aber immer noch der vorherrschende Standard bei der Erzeugung transgener Mausmodelle. Neuere Techniken ermöglichen eine gezieltere Integration ins Genom. So kann eine Koinjektion von Transgen und wirtsgenomsequenz-spezifischen Nukleasen, wie Zinkfinger-Nukleasen oder *Transcription activator-like effector*-Nukleasen, zur gezielten Transgenintegration über den Mechanismus des *non-homologous end joining* (NHEJ) führen (Carbery *et al.*, 2010). Mit Hilfe von *Targeting*-Vektoren ist ein gezielter Genaustausch (engl. *gene targeting*) mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen möglich (Capecchi, 2005). Auch bei der homologen Rekombination können Zinkfinger-Nukleasen zum Einsatz kommen (Cui *et al.*, 2011).

Eine neue Strategie zum Schutz vor Genstilllegung beruht auf der Transgenkonstruktion mit Verwendung von sogenannten *anti-silencing regions*, die das Transgen im Konstrukt flankieren (Kishimoto *et al.*, 2013).

## 6 Zusammenfassung

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war den Antagonismus zwischen  $\beta$ -Catenin- und Ha-ras-Signalgebung in der Mausleber genauer zu untersuchen und einen möglichen Mechanismus des *Crosstalks* der beiden Signalwege aufzudecken.

In Maushepatomzellen wurde ein inhibitorischer Effekt von  $\beta$ -Catenin auf die Induzierbarkeit von MAPK-Signalgebung gezeigt. Dabei wurden Egfr, Dusp6 und eventuell auch Dusp14 als Kandidaten identifiziert, die die Inhibition des MAPK/Ras-Signalwegs vermitteln. Nach Aktivierung von  $\beta$ -Catenin sowohl *in vivo* als auch *in vitro* war die Expression von Egfr verringert, von Dusp jedoch erhöht. Nach Inhibition von  $\beta$ -Catenin zeigte sich das Gegenteil.

Für weitere Untersuchungen der Zonierung in der Leber und der Wechselwirkungen von  $\beta$ -Catenin und Ha-ras wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das schaltbar eine aktivierte Form des *Ha-ras*-Gens trägt. Das Transgen wurde jedoch *in vivo* nicht exprimiert, vermutlich aufgrund von Integration im Genom in transkriptionell inaktive Regionen oder durch Genstilllegungsprozesse. Somit konnten keine weiterführenden Untersuchungen mit diesem Mausmodell durchgeführt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. and Saltiel, A. R. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270(46): 27489-94.
- Auerbach, A. B. 2004. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol* 51(1): 9-31.
- Aydinlik, H., Nguyen, T. D., Moennikes, O., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2001. Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene* 20(53): 7812-6.
- Bakiri, L. and Wagner, E. F. 2013. Mouse models for liver cancer. *Mol Oncol* 7(2): 206-23.
- Barrett, J. C. and Wiseman, R. W. 1987. Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 76: 65-70.
- 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(1): 60-7.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D. S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C. J., Kahn, A., Perret, C. and Colnot, S. 2006. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 10(6): 759-70.
- Biechele, T. L., Kulikauskas, R. M., Toroni, R. A., Lucero, O. M., Swift, R. D., James, R. G., Robin, N. C., Dawson, D. W., Moon, R. T. and Chien, A. J. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAFV600E in human melanoma. *Sci Signal* 5(206): ra3.
- Bluthgen, N., Legewie, S., Kielbasa, S. M., Schramme, A., Tchernitsa, O., Keil, J., Solf, A., Vingron, M., Schafer, R., Herzel, H. and Sers, C. 2009. A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts. *FEBS J* 276(4): 1024-35.
- Braeuning, A. 2009. Regulation of cytochrome P450 expression by Ras- and beta-catenin-dependent signaling. *Curr Drug Metab* 10(2): 138-58.
- Braeuning, A. 2012. Interplay of beta-catenin with xenobiotic-sensing receptors and its role in glutathione S-transferase expression. *Curr Drug Metab* 13(2): 203-14.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Kohle, C., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2007a. Zonal gene expression in mouse liver resembles expression patterns of Ha-ras and beta-catenin mutated hepatomas. *Drug Metab Dispos* 35(4): 503-7.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Kohle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2006. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J* 273(22): 5051-61.
- Braeuning, A., Menzel, M., Kleinschnitz, E. M., Harada, N., Tamai, Y., Kohle, C., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2007b. Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes. *FEBS J* 274(18): 4766-77.
- Braeuning, A., Sanna, R., Huelsken, J. and Schwarz, M. 2009. Inducibility of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics in mice with liver-specific knockout of Ctnnb1. *Drug Metab Dispos* 37(5): 1138-45.
- Braeuning, A. and Schwarz, M. 2010. Zonation of heme synthesis enzymes in mouse liver and their regulation by beta-catenin and Ha-ras. *Biol Chem*.

- Braeuning, A., Singh, Y., Rignall, B., Buchmann, A., Hammad, S., Othman, A., von Recklinghausen, I., Godoy, P., Hoehme, S., Drasdo, D., Hengstler, J. G. and Schwarz, M. 2010. Phenotype and growth behavior of residual beta-catenin-positive hepatocytes in livers of beta-catenin-deficient mice. *Histochem Cell Biol.*
- 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(3): 911-5.
- Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Levy, L., Lamers, W. H., Kitajewski, J., Kahn, A. and Perret, C. 2002. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21(54): 8293-301.
- Calvisi, D. F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E. A., Lee, J. S., Factor, V. M. and Thorgeirsson, S. S. 2006. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 130(4): 1117-28.
- Capecchi, M. R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6(6): 507-12.
- Carbery, I. D., Ji, D., Harrington, A., Brown, V., Weinstein, E. J., Liaw, L. and Cui, X. 2010. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 186(2): 451-9.
- Caunt, C. J. and Keyse, S. M. 2013. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J* 280(2): 489-504.
- Chafey, P., Finzi, L., Boisgard, R., Cauzac, M., Clary, G., Broussard, C., Pegorier, J. P., Guillonnet, F., Mayeux, P., Camoin, L., Tavitian, B., Colnot, S. and Perret, C. 2009. Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics* 9(15): 3889-900.
- Coghlan, M. P., Culbert, A. A., Cross, D. A., Corcoran, S. L., Yates, J. W., Pearce, N. J., Rausch, O. L., Murphy, G. J., Carter, P. S., Roxbee Cox, L., Mills, D., Brown, M. J., Haigh, D., Ward, R. W., Smith, D. G., Murray, K. J., Reith, A. D. and Holder, J. C. 2000. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 7(10): 793-803.
- Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M. and Perret, C. 2004. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17216-21.
- Cui, X., Ji, D., Fisher, D. A., Wu, Y., Briner, D. M. and Weinstein, E. J. 2011. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 29(1): 64-7.
- D'Abaco, G. M., Whitehead, R. H. and Burgess, A. W. 1996. Synergy between Apc min and an activated ras mutation is sufficient to induce colon carcinomas. *Mol Cell Biol* 16(3): 884-91.
- Damsky, W. E., Curley, D. P., Santhanakrishnan, M., Rosenbaum, L. E., Platt, J. T., Gould Rothberg, B. E., Taketo, M. M., Dankort, D., Rimm, D. L., McMahon, M. and Bosenberg, M. 2011. beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* 20(6): 741-54.
- 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. 1998. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8847-51.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., Demirkan, N., Bastian, B. C., Goding, C. R. and Larue, L. 2007. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes

- by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 21(22): 2923-35.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. and Kolch, W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26(22): 3279-90.
- Ekerot, M., Stavridis, M. P., Delavaine, L., Mitchell, M. P., Staples, C., Owens, D. M., Keenan, I. D., Dickinson, R. J., Storey, K. G. and Keyse, S. M. 2008. Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem J* 412(2): 287-98.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feese, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. and Trzaskos, J. M. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273(29): 18623-32.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127(12): 2893-917.
- Fohr, K. J., Scott, J., Ahnert-Hilger, G. and Gratzl, M. 1989. Characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release from permeabilized endocrine cells and its inhibition by decavanadate and p-hydroxymercuribenzoate. *Biochem J* 262(1): 83-9.
- Forner, A., Llovet, J. M. and Bruix, J. 2012. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379(9822): 1245-55.
- Furukawa, T., Sunamura, M., Motoi, F., Matsuno, S. and Horii, A. 2003. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol* 162(6): 1807-15.
- Gebhardt, R. 1992. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 53(3): 275-354.
- Gebhardt, R. and Gaunitz, F. 1997. Cell-cell interactions in the regulation of the expression of hepatic enzymes. *Cell Biol Toxicol* 13(4-5): 263-73.
- Gebhardt, R. and Marti, U. 1992. Heterogeneous distribution of the epidermal growth factor receptor in rat liver parenchyma. *Prog Histochem Cytochem* 26(1-4): 164-8.
- Gossen, M. and Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547-51.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268(5218): 1766-9.
- Gougelet, A., Torre, C., Veber, P., Sartor, C., Bachelot, L., Denechaud, P. D., Godard, C., Moldes, M., Burnol, A. F., Dubuquoy, C., Terris, B., Guillonnet, F., Ye, T., Schwarz, M., Braeuning, A., Perret, C. and Colnot, S. 2014. T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. *Hepatology* 59(6): 2344-57.
- Gregg, J. and Fraizer, G. 2011. Transcriptional Regulation of EGR1 by EGF and the ERK Signaling Pathway in Prostate Cancer Cells. *Genes Cancer* 2(9): 900-9.
- Guardavaccaro, D. and Clevers, H. 2012. Wnt/beta-catenin and MAPK signaling: allies and enemies in different battlefields. *Sci Signal* 5(219): pe15.
- Hailfinger, S., Jaworski, M., Braeuning, A., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2006. Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology* 43(3): 407-14.
- Hankinson, O. 1979. Single-step selection of clones of a mouse hepatoma line deficient in aryl hydrocarbon hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(1): 373-6.
- 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(1): 48-54.

- Hu, T. and Li, C. 2010. Convergence between Wnt-beta-catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol Cancer* 9: 236.
- Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. and Birchmeier, W. 2001. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105(4): 533-45.
- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P. and Fuchs, E. 2003. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422(6929): 317-22.
- Jaworski, M., Buchmann, A., Bauer, P., Riess, O. and Schwarz, M. 2005a. B-raf and Ha-ras mutations in chemically induced mouse liver tumors. *Oncogene* 24(7): 1290-5.
- Jaworski, M., Hailfinger, S., Buchmann, A., Hergenbahn, M., Hollstein, M., Ittrich, C. and Schwarz, M. 2005b. Human p53 knock-in (hupki) mice do not differ in liver tumor response from their counterparts with murine p53. *Carcinogenesis* 26(10): 1829-34.
- Jaworski, M., Ittrich, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A., Schwarz, M. and Kohle, C. 2007. Global gene expression in Ha-ras and B-raf mutated mouse liver tumors. *Int J Cancer* 121(6): 1382-5.
- Jeong, W. J., Yoon, J., Park, J. C., Lee, S. H., Kaduwal, S., Kim, H., Yoon, J. B. and Choi, K. Y. 2012. Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/beta-catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis. *Sci Signal* 5(219): ra30.
- Jope, R. S. 2003. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci* 24(9): 441-3.
- Jungermann, K. 1995. Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* 103(2): 81-91.
- Jungermann, K. and Katz, N. 1989. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* 69(3): 708-64.
- Jungermann, K. and Kietzmann, T. 1996. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16: 179-203.
- Kang, T. W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., Ott, M., Luedde, T., Longerich, T., Kubicka, S. and Zender, L. 2011. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479(7374): 547-51.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270(28): 16483-6.
- Keyse, S. M. 2008. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27(2): 253-61.
- Kim, D., Rath, O., Kolch, W. and Cho, K. H. 2007. A hidden oncogenic positive feedback loop caused by crosstalk between Wnt and ERK pathways. *Oncogene* 26(31): 4571-9.
- Kishimoto, N., Nagai, J., Kinoshita, T., Ueno, K., Ohashi, Y. and Mitsuhara, I. 2013. DNA elements reducing transcriptional gene silencing revealed by a novel screening strategy. *PLoS One* 8(1): e54670.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jeretic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. and Bujard, H. 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20): 10933-8.
- Klein, P. S. and Melton, D. A. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8455-9.
- Klinger, S., Poussin, C., Debril, M. B., Dolci, W., Halban, P. A. and Thorens, B. 2008. Increasing GLP-1-induced beta-cell proliferation by silencing the negative regulators of signaling cAMP response element modulator-alpha and DUSP14. *Diabetes* 57(3): 584-93.

- Kohle, C., Schwarz, M. and Bock, K. W. 2008. Promotion of hepatocarcinogenesis in humans and animal models. *Arch Toxicol* 82(9): 623-31.
- Kolch, W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11): 827-37.
- Kress, S., Konig, J., Schweizer, J., Lohrke, H., Bauer-Hofmann, R. and Schwarz, M. 1992. p53 mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors. *Mol Carcinog* 6(2): 148-58.
- Kuo, F. C. and Darnell, J. E., Jr. 1991. Evidence that interaction of hepatocytes with the collecting (hepatic) veins triggers position-specific transcription of the glutamine synthetase and ornithine aminotransferase genes in the mouse liver. *Mol Cell Biol* 11(12): 6050-8.
- Lempiainen, H., Couttet, P., Bolognani, F., Muller, A., Dubost, V., Luisier, R., Del Rio Espinola, A., Vitry, V., Unterberger, E. B., Thomson, J. P., Treindl, F., Metzger, U., Wrzodek, C., Hahne, F., Zollinger, T., Brasa, S., Kalteis, M., Marcellin, M., Giudicelli, F., Braeuning, A., Morawiec, L., Zamurovic, N., Langle, U., Scheer, N., Schubeler, D., Goodman, J., Chibout, S. D., Marlowe, J., Theil, D., Heard, D. J., Grenet, O., Zell, A., Templin, M. F., Meehan, R. R., Wolf, R. C., Elcombe, C. R., Schwarz, M., Moulin, P., Terranova, R. and Moggs, J. G. 2013. Identification of Dlk1-Dio3 imprinted gene cluster noncoding RNAs as novel candidate biomarkers for liver tumor promotion. *Toxicol Sci* 131(2): 375-86.
- Li, C., Scott, D. A., Hatch, E., Tian, X. and Mansour, S. L. 2007. Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development* 134(1): 167-76.
- Loeppen, S., Koehle, C., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2005. A beta-catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors. *Carcinogenesis* 26(1): 239-48.
- Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Kurek, R., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2002. Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital. *Cancer Res* 62(20): 5685-8.
- Lustig, B. and Behrens, J. 2003. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 129(4): 199-221.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3(6): 459-65.
- Marshall, C. J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 4(1): 82-9.
- Marti, F., Krause, A., Post, N. H., Lyddane, C., Dupont, B., Sadelain, M. and King, P. D. 2001. Negative-feedback regulation of CD28 costimulation by a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP6. *J Immunol* 166(1): 197-206.
- Marx-Stoelting, P., Mahr, J., Knorpp, T., Schreiber, S., Templin, M. F., Ott, T., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2008. Tumor promotion in liver of mice with a conditional Cx26 knockout. *Toxicol Sci* 103(2): 260-7.
- Moennikes, O., Buchmann, A., Romualdi, A., Ott, T., Werringloer, J., Willecke, K. and Schwarz, M. 2000. Lack of phenobarbital-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in connexin32-null mice. *Cancer Res* 60(18): 5087-91.
- Morgan, E. T. 2001. Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* 29(3): 207-12.
- Morris, J. P. t., Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C. and Hebrok, M. 2010. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* 120(2): 508-20.
- Mutoh, S., Sobhany, M., Moore, R., Perera, L., Pedersen, L., Sueyoshi, T. and Negishi, M. 2013. Phenobarbital Indirectly Activates the Constitutive Active Androstane Receptor (CAR) by Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Sci Signal* 6(274): ra31.

- Newell, P., Toffanin, S., Villanueva, A., Chiang, D. Y., Minguez, B., Cabellos, L., Savic, R., Hoshida, Y., Lim, K. H., Melgar-Lesmes, P., Yea, S., Peix, J., Deniz, K., Fiel, M. I., Thung, S., Alsinet, C., Tovar, V., Mazzaferro, V., Bruix, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Friedman, S. L. and Llovet, J. M. 2009. Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. *J Hepatol* 51(4): 725-33.
- Nusse, R. and Varmus, H. E. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31(1): 99-109.
- Ogata, N., Kamimura, T. and Asakura, H. 1991. Point mutation, allelic loss and increased methylation of c-Ha-ras gene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 13(1): 31-7.
- Oinonen, T., Nikkola, E. and Lindros, K. O. 1993. Growth hormone mediates zone-specific gene expression in liver. *FEBS Lett* 327(2): 237-40.
- Oinonen, T., Ronis, M., Wigell, T., Tohmo, K., Badger, T. and Lindros, K. O. 2000. Growth hormone-regulated periportal expression of CYP2C7 in rat liver. *Biochem Pharmacol* 59(5): 583-9.
- Owens, D. M. and Keyse, S. M. 2007. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26(22): 3203-13.
- Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W. and Jones, D. A. 2009. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 137(4): 623-34.
- Qureshi, S. A., Cao, X. M., Sukhatme, V. P. and Foster, D. A. 1991. v-Src activates mitogen-responsive transcription factor Egr-1 via serum response elements. *J Biol Chem* 266(17): 10802-6.
- Rajewsky, M. F., Dauber, W. and Frankenberg, H. 1966. Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. *Science* 152(3718): 83-5.
- Rignall, B., Ittrich, C., Krause, E., Appel, K. E., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2009. Comparative transcriptome and proteome analysis of Ha-ras and B-raf mutated mouse liver tumors. *J Proteome Res* 8(8): 3987-94.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R. 1987. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50(4): 649-57.
- Sansom, O. J., Meniel, V., Wilkins, J. A., Cole, A. M., Oien, K. A., Marsh, V., Jamieson, T. J., Guerra, C., Ashton, G. H., Barbacid, M. and Clarke, A. R. 2006. Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(38): 14122-7.
- Schreiber, S., Rignall, B., Braeuning, A., Marx-Stoelting, P., Ott, T., Buchmann, A., Hammad, S., Hengstler, J. G., Schwarz, M. and Kohle, C. 2011. Phenotype of single hepatocytes expressing an activated version of beta-catenin in liver of transgenic mice. *J Mol Histol* 42(5): 393-400.
- Sekine, S., Lan, B. Y., Bedolli, M., Feng, S. and Hebrok, M. 2006. Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology* 43(4): 817-25.
- Singh, Y., Braeuning, A., Schmid, A., Pichler, B. J. and Schwarz, M. 2013. Selective poisoning of Ctnnb1-mutated hepatoma cells in mouse liver tumors by a single application of acetaminophen. *Arch Toxicol* 87(8): 1595-607.
- Stahl, S., Ittrich, C., Marx-Stoelting, P., Kohle, C., Altug-Teber, O., Riess, O., Bonin, M., Jobst, J., Kaiser, S., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2005. Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology* 42(2): 353-61.
- Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrelis, E., Luo, J. H., Ranganathan, S., Monga, D. K., Bell, A., Michalopoulos, G. K. and Monga, S. P. 2005. Epidermal growth factor

- receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology* 129(1): 285-302.
- Tan, X., Behari, J., Cieply, B., Michalopoulos, G. K. and Monga, S. P. 2006. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 131(5): 1561-72.
- Torre, C., Benhamouche, S., Mitchell, C., Godard, C., Veber, P., Letourneur, F., Cagnard, N., Jacques, S., Finzi, L., Perret, C. and Colnot, S. 2011. The transforming growth factor-alpha and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation. *J Hepatol* 55(1): 86-95.
- Trobridge, P., Knoblauch, S., Washington, M. K., Munoz, N. M., Tsuchiya, K. D., Rojas, A., Song, X., Ulrich, C. M., Sasazuki, T., Shirasawa, S. and Grady, W. M. 2009. TGF-beta receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a beta-catenin-independent pathway. *Gastroenterology* 136(5): 1680-8 e7.
- Unterberger, E. B., Eichner, J., Wrzodek, C., Lempiainen, H., Luisier, R., Terranova, R., Metzger, U., Plummer, S., Knorpp, T., Braeuning, A., Moggs, J., Templin, M. F., Honndorf, V., Piotto, M., Zell, A. and Schwarz, M. 2014. Ha-ras and beta-catenin oncoproteins orchestrate metabolic programs in mouse liver tumors. *Int J Cancer*.
- Villanueva, A., Newell, P., Chiang, D. Y., Friedman, S. L. and Llovet, J. M. 2007. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27(1): 55-76.
- Wachstein, M. and Meisel, E. 1957. Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH; with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am J Clin Pathol* 27(1): 13-23.
- Weihrauch, M., Benick, M., Lehner, G., Wittekind, M., Bader, M., Wrbitzk, R. and Tannapfel, A. 2001. High prevalence of K-ras-2 mutations in hepatocellular carcinomas in workers exposed to vinyl chloride. *Int Arch Occup Environ Health* 74(6): 405-10.
- Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A. B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R. H., Fuller, J. H., Reinhard, C., Garcia, P. D., Randazzo, F. M., Escobedo, J., Fantl, W. J. and Williams, L. T. 2001. Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/beta-catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 14973-8.
- Zeller, E., Hammer, K., Kirschnick, M. and Braeuning, A. 2013. Mechanisms of RAS/beta-catenin interactions. *Arch Toxicol* 87(4): 611-32.
- Zeller, E., Mock, K., Horn, M., Colnot, S., Schwarz, M. and Braeuning, A. 2012. Dual-specificity phosphatases are targets of the Wnt/beta-catenin pathway and candidate mediators of beta-catenin/Ras signaling interactions. *Biol Chem* 393(10): 1183-91.
- Zhang, Z., Kobayashi, S., Borczuk, A. C., Leidner, R. S., Laframboise, T., Levine, A. D. and Halmos, B. 2010. Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis* 31(4): 577-86.
- Zheng, H., Li, Q., Chen, R., Zhang, J., Ran, Y., He, X., Li, S. and Shu, H. B. 2013. The dual-specificity phosphatase DUSP14 negatively regulates tumor necrosis factor- and interleukin-1-induced nuclear factor-kappaB activation by dephosphorylating the protein kinase TAK1. *J Biol Chem* 288(2): 819-25.

