

Fakultät für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

Zielgene des Wnt-Signalwegs

Diplomarbeit von

Sonja Röhrs

angefertigt am

Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund

Abteilung Strukturelle Biologie

Prof. Dr. A. Wittinghofer

Arbeitsgruppe Tumorgenetik

Betreuer: PD Dr. O. Müller

Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
<hr/>		
I.1	Krebs	1
I.1.1	Molekulare Ursachen der Tumorentstehung	2
I.1.2	Protoonkogene und Tunorsuppressorgene	3
I.1.3	Kolorektalkarzinom	5
I.2	Der Wnt-Signalweg	7
I.2.1	Zielgene des Wnt-Signalwegs	12
I.2.2	Veränderungen im Wnt-Signalweg bei Tumoren und deren Auswirkungen beim Kolorektalkarzinom	14
II.	Zielsetzung	16
<hr/>		
III.	Material	17
<hr/>		
III.1	Laborgeräte	17
III.2	Verbrauchsmaterialien	18
III.3	Chemikalien	18
III.4	Radiochemikalien	19
III.5	Puffer und Lösungen	19
III.6	Nukleinsäure- und Protein-Standards	21
III.7	Vektoren	22
III.8	Enzyme	22
III.9	Antikörper	23
III.10	Kit-Systeme	23
III.11	Oligodesoxyribonukleotide	24
III.12	Nährmedien	25
III.13	Biologisches Material	26
IV.	Methoden	28
<hr/>		
IV.1	Molekularbiologische Methoden	28
IV.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
IV.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	29
IV.1.3	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	29
IV.1.4	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	29
IV.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
IV.1.5.1	Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion	31
IV.1.5.2	PCR-Mutagenese	32
IV.1.6	DNA-Gelelektrophorese	34

IV.1.7	Reinigung von PCR-Fragmenten	34
IV.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten – Gelelution	35
IV.1.9	TOPO-TA-Klonierung	35
IV.1.10	DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	36
IV.1.11	Dephosphorylierung von DNA-Enden	37
IV.1.12	Herstellung von glatten Enden	37
IV.1.13	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	37
IV.1.14	Transformation von <i>E. coli</i>	38
IV.1.15	Kolonie-PCR	38
IV.1.16	Herstellung von Glycerinkulturen	39
IV.1.17	DNA-Sequenzierung	39
IV.1.18	RNA-Gelelektrophorese	41
IV.1.19	Northern Blot	41
IV.1.20	Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde	42
IV.1.21	Hybridisierung einer Northern Blot-Membran	43
IV.1.22	Entfernen der hybridisierten Sonde von einer Membran („Strippen“)	45
IV.2	Zellbiologische Methoden	45
IV.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	45
IV.2.2	Bestimmung der Zellzahl	46
IV.2.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	46
IV.2.4	Reportergen-Assay	48
IV.2.5	Immuncytochemische Färbung eukaryotischer Zellen	50
IV.2.6	Zelllysate aus eukaryotischen Zellen	51
IV.2.7	Isolierung von Medien-Proteinen eukaryotischer Zellen	51
IV.3	Proteinbiochemische Methoden	52
IV.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	52
IV.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
IV.3.3	Western Blot	54
IV.3.4	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	54
V.	Ergebnisse	56
V.1	Expressionsanalyse von ausgewählten Genen in Mäusezellen mit aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg	56
V.1.1	Gnb1	58
V.1.2	MGF	58
V.1.3	Lgals8	59
V.1.4	Proliferin	60
V.1.5	Gbp3	61
V.1.6	TIS 11	61

V.1.7	14-3-3 Protein γ	62
V.1.8	Ramp3	62
V.2	Untersuchung der Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors und des Proliferin-Promotors	64
V.2.1	Klonierung des Proliferin- und des MGF-Promotors	66
V.2.2	Transkriptionsaktivität des Proliferin-Promotors	68
V.2.3	Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors	69
V.2.4	Herstellung einer Mutante des MGF-Promotors	72
V.2.5	Transkriptionsaktivität des mutierten MGF-Promotors	72
V.3	Untersuchung der Proteinexpression bei aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg	74
V.3.1	Ramp3	74
V.3.1.1	Lokalisation von Ramp3	76
V.3.2	Proliferin	78
V.3.3	MGF	79
VI.	Diskussion	81
VI.1	Expressionsanalyse durch Northern Blot-Analysen	82
VI.2	MGF	83
VI.3	Proliferin	85
VI.4	Ramp3	88
VII.	Zusammenfassung	91
VIII.	Literatur	93
IX.	Anhang	100

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
Ci	Curie (Radioaktivitätseinheit)
cpm	Counts Per Minute (Radioaktivitätseinheit)
Da	Dalton (Molekularmasse)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat (RNase-Inhibitor)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Double Strand (Doppelstrang)
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraacetic acid
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> (und Co-Autoren)
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Gbp3	Guanylate nucleotide binding protein 3
Gnb1	Guanine nucleotide binding protein beta 1
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton (Molekularmasse)
LB	Luria Bertani
Lgals8	Lectin, galactose binding soluble 8

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MGF	Mast cell growth factor
MOPS	N-Morpholinopropanesulfonic acid
Mrp	Mitogen regulated protein
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Plf	Proliferin
Ramp3	Receptor activity modifying protein 3
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotation pro Minute (Einheit der Rotationsgeschwindigkeit)
S	Svedberg-Einheit (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
SDS	Sodiumdodecylsulfate
ss	Single Strand (Einzelstrang)
SSC	Saline Sodium Chloride
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIS 11	TPA-induced sequencer 11
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp

I. Einleitung

Das Wachstum von Zellen wird sehr genau reguliert und kontrolliert. Es ist den wechselnden Bedürfnissen eines Organismus sehr genau angepasst. Durch mitogene Signale und proliferationshemmende Einflüsse wird die Teilungsaktivität einzelner Zellen im Organismus gesteuert. Diese Signale werden von speziellen Rezeptoren registriert, an intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet und enden schließlich in einem komplexen Kontrollsystem der Zelle. Je nachdem, welche Einflüsse überwiegen, kommt es zur Zellteilung oder nicht. Im adulten Organismus werden manche Zellen wie die Epithelzellen des Dünndarms regelmäßig erneuert, andere wie z.B. Nervenzellen teilen sich fast gar nicht mehr. Kommt das sensibel regulierte System aus dem Gleichgewicht, kann es zu unkontrollierter Zellteilung kommen, welche letztendlich zu Krebs führen kann.

I.1 Krebs

Krebs ist keine einheitliche Erkrankung, sondern umfasst eine große Anzahl unterschiedlicher Krankheiten mit diversen Krankheitsbildern. Man kennt heute an die 200 verschiedene Krebsarten. Was diese Krebserkrankungen gemeinsam haben, sind die biologischen Eigenschaften, die die Zellen erworben haben, die den jeweiligen Tumor bilden. Sie sind vor allem durch unreguliertes und invasives Wachstum, sowie verringerte Differenzierung gekennzeichnet. Diese Zellen haben auch das Potential zu metastasieren, das heißt ins Blut zu gelangen, in anderes Gewebe einzudringen und dort Tochtergeschwülste zu bilden. Ausgelöst werden diese Veränderungen der Zelleigenschaften durch Mutationen, die zu Anomalitäten in der Genexpression führen, welche aber im Gegensatz zu anderen genetisch bedingten Krankheiten nicht in der Keimbahn erfolgten sondern vornehmlich in somatischen Zellen. Eine Ausnahme bilden genetisch bedingte Prädispositionen für eine Krebsart durch vererbte Mutationen.

Die heutige Bedeutung von Krebserkrankungen wird in epidemiologischen Studien deutlich. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO (World Cancer Report 2003) traten im Jahr 2000 weltweit 10 Millionen neue Krebsfälle auf, davon waren 5,3 Millionen Männer und 4,7 Millionen Frauen betroffen. Insgesamt 6,2 Millionen Menschen starben an Krebs. Damit war Krebs im Jahr 2000 für 12 % aller weltweiten Todesfälle verantwortlich. In vielen westlichen Industrieländern verursacht Krebs sogar über 25 % aller Todesfälle, womit Krebs neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweit häufigste Todesursache ist. Weltweit ist Lungenkrebs mit 1,2 Millionen neuen Fällen jährlich am meisten verbreitet. An zweiter Stelle

liegt Brustkrebs mit 1 Million Neuerkrankungen jährlich, gefolgt vom Kolorektalkarzinom mit 940000 und Magenkrebs mit 870000 neuen Fällen jährlich. Als Hauptursachen für Krebserkrankungen werden Tabakkonsum, eine fett- und kalorienreiche Ernährung, sowie Infektionen durch Hepatitis Viren B und C, den humanen Papillomavirus und Helicobacter pylori angesehen. Im Jahr 2000 waren diese Ursachen nach Angaben der WHO für 43 % aller Krebsfälle verantwortlich.

I.1.1 Molekulare Ursachen der Tumorentstehung

Krebs entsteht nicht aufgrund einer einzigen Mutation, sondern in Abhängigkeit von der Krebsart nach 3 bis 20 Mutationen in Genen, deren Produkte an der Steuerung der Zellteilung beteiligt sind. Eine normale Zelle verwandelt sich nur durch einen langsam ablaufenden, mehrstufigen Prozess (multi-hit Modell), welcher meist viele Jahre benötigt, in eine Tumorzelle. Diese Entwicklung ist, ähnlich der Evolution, auch mit einem Selektionsprozess verbunden. Es setzen sich die Zellen durch, die sich aufgrund von bestimmten genetischen Veränderungen den wachstumsregulierenden Mechanismen entziehen können und dadurch gegenüber benachbarten Zellen einen Wachstumsvorteil haben. Dabei werden die genetischen Änderungen an die Tochterzellen weitergegeben, welche durch eine weitere Mutation einen zusätzlichen Wachstumsvorteil erlangen können und so weiter. Die Mutationen können einfache Substitutionen, Insertionen oder Deletionen von Basen sein, aber auch zu Inversionen oder Verdopplungen von DNA-Abschnitten führen. Statistisch gesehen können die Mutationen in allen Genen auftreten. Zu einem Wachstumsvorteil führen die Mutationen aber nur dann, wenn Gene betroffen sind, deren Produkte an Signalübertragungswegen und der Wachstumsregulation beteiligt sind. Dies sind vor allem aktivierende Mutationen in Protoonkogenen und Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen (siehe I.1.2).

In späteren Tumorstadien tritt oft eine sogenannte genetische Instabilität auf, welche ebenso Einfluss auf Wachstumsverhalten und funktionelle Leistungen der Zelle hat. Als genetische Instabilität bezeichnet man Veränderungen auf der Ebene ganzer Chromosomen, wie zum Beispiel der Verlust oder die Verdopplung eines ganzen Chromosoms. Es sind aber auch Vervielfachungen des Chromosomensatzes sowie Chromosomenaberrationen zu beobachten.

Da bei Eukaryoten das Methylierungsmuster der DNA eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulation spielt, sind auch Veränderungen des Methylierungsmusters an der Tumorentstehung beteiligt.

Aufgrund ihrer genetischen Veränderungen unterscheidet sich eine maligne (bösartige) Tumorzelle von der Normalzelle, aus der sie hervorgegangen ist, in der Wachstumsregulation, Zellmorphologie, veränderten Zell-Zell-Wechselwirkungen, der Proteinsekretion und in der Genexpression. Dennoch können maligne Tumoren nach dem Gewebe, aus dem sie hervorgegangen sind, klassifiziert werden. Entstehen sie aus dem Entoderm oder Ektoderm, spricht man von einem Karzinom. Ist der Tumor aus dem Mesoderm hervorgegangen, handelt es sich um ein Sarkom. Die Leukämie ist eine Untergruppe der Sarkome, bei der leukämische Zellen massiv proliferieren.

I.1.2 Protoonkogene und Tumorsuppressorgene

Bei der Entstehung eines Tumors spielen zwei große Gruppen von Genen, die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene eine Schlüsselrolle. Diese Gene codieren Proteine, welche an der Wachstumsregulation der Zelle beteiligt sind. Durch Mutationen in diesen Genen kann die Zelle einen Wachstumsvorteil erhalten, der zur Tumorbildung beiträgt.

Das erste Onkogen wurde bei der Suche nach dem Tumor induzierenden Prinzip des Retrovirus RSV (Rous Sarcoma Virus) von Peyton Rous bereits Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt. Identifiziert wurde das v-src-Gen, welches in Hühnern und auch Nagetieren Tumoren hervorrufen kann und deshalb als Onkogen bezeichnet wurde. Bei diesem viralen Onkogen handelt es sich um eine mutierte, konstitutiv aktive Form des zellulären c-src-Gens, welches die Src-Tyrosinkinase codiert.

Als Protoonkogene bezeichnet man heute die Gene, welche in mutierter Form Tumoren auslösen können. Mutationen, die zu einem Funktionsgewinn führen, wandeln Protoonkogene in Onkogene um. Dies kann entweder durch eine Punktmutation erfolgen, welche zu einem konstitutiv aktiven oder unregulierbaren Genprodukt führt; oder durch eine Genamplifikation, wodurch das Protoonkogen überexprimiert wird; oder durch eine chromosomale Translokation, durch welche das Protoonkogen unter die Kontrolle eines anderen Promotors gelangt und dessen Expression dadurch nicht mehr dem Bedarf der Zelle entspricht. Die Überexpression bzw. der Funktionsgewinn von Protoonkogenen wirkt dominant. Dies bedeutet, dass die Mutation in einem Allel der Zelle ausreicht, um der Zelle den Wachstumsvorteil zu verschaffen.

In 30 % aller soliden Tumoren ist das Protoonkogen ras mutiert (Krauss, 1997). Es codiert eine kleine regulatorische GTPase, welche mitogene Signale weiterleitet, die zur

Zelldifferenzierung und Zellproliferation führen. Aufgrund von Mutationen, durch die das Schalterprotein Ras konstitutiv aktiv ist, wird die Tumorprogression gefördert.

In Kolorektalkarzinomen sind Mutationen in dem Protoonkogen β -Catenin zu finden, die die zelluläre Stabilität des Proteins erhöhen. Da β -Catenin die Aktivierung von Zielgenen des Wnt-Signalwegs vermittelt, steigert die Anreicherung von β -Catenin die Aktivierung dieser Gene und so die Zellproliferation.

Zu den Tumorsuppressorproteinen gehören Proteine, die den Durchgang durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus regulieren und hemmen können, sowie die Proteine die den Zellzyklus anhalten, wenn die DNA geschädigt ist oder wenn anomale Chromosomen vorliegen. Ebenso gehören Proteine dazu, die Apoptose fördern oder an der DNA-Reparatur (Reparatur-Mutator-Proteine) beteiligt sind. Dadurch können sie die Entstehung eines Tumors verhindern oder zumindest verlangsamen. Führen Mutationen zu dem Funktionsverlust dieser Proteine, so fördert dies die Tumorprogression. Im Allgemeinen reicht die Funktion eines Tumorsuppressorgens eines Allels aus, sodass zum Funktionsverlust des Proteins beide Allele inaktiviert sein müssen. Dies bedeutet, dass Funktionsverlustmutationen in Tumorsuppressorgenen rezessiv sind. Oft geht jedoch während der Entstehung eines Tumors eines der beiden Allele verloren (loss of heterozygosity, LOH), weshalb dann eine inaktivierende Mutation in einem Allel des Tumorsuppressorgens ausreicht. Dies kann bei der mitotischen Rekombination geschehen oder aufgrund von Fehlern bei der Chromosomensegregation, wenn sich zum Beispiel die Mitosespindel nicht richtig ausbildet.

Das Retinoblastoma-Gen war das erste Tumorsuppressorgen, das beim Menschen identifiziert wurde. Das Retinoblastoma-Protein (pRb) ist ein Schalterprotein bei der Umsetzung von mitogenen und antimitogenen Signalen auf Transkriptionsebene und kann die Zellteilung hemmen. Kommt es in einer Zelle zur Fehlregulation oder Inaktivierung von pRb, können Tumore, wie zum Beispiel das Retinoblastom (ein seltener Augentumor), entstehen. Eine Inaktivierung von pRb wurde auch in anderen Tumoren beobachtet.

In über 50 % aller menschlichen Tumoren treten Mutationen in dem Tumorsuppressorgen TP53 auf (Krauss, 1997). Das TP53-Protein hat die Kontrollaufgabe, beim Vorliegen von DNA-Schäden den Zellzyklus anzuhalten und ist zudem an der Einleitung von Apoptose beteiligt. Zusätzlich kann TP53 die Transkription von Genen aktivieren, die für die DNA-Reparatur zuständig sind und es kann die Transkription von Transkriptionsaktivatoren wie c-Jun und c-Fos hemmen. Funktionsverlustmutationen in TP53 können daher zu einer Anhäufung von DNA-Schäden führen und verhindern die Apoptose der betroffenen Zelle, wodurch die Tumorentstehung vorangetrieben wird.

I.1.3 Kolorektalkarzinom

Jedes Jahr gibt es weltweit etwa 940000 neue Darmkrebsfälle. Eine halbe Million Menschen sterben jährlich an Darmkrebs. In den Entwicklungsländern ist Darmkrebs kaum verbreitet, in der westlichen Industriegesellschaft ist es hingegen die zweit häufigste Krebsart. So ist in Deutschland das Kolorektalkarzinom unter den Krebserkrankungen sogar die zweit häufigste Todesursache, bei Männern folgt sie nach dem Lungenkrebs, bei Frauen nach dem Brustkrebs. Dies ist häufig auf einen Lebensstil mit einer fett (vor allem tierische Fette)- und kohlenhydratreichen, sowie ballaststoffarmen Ernährung, in Kombination mit nur geringer körperlicher Aktivität zurückzuführen (WHO, World Cancer Report, 2003).

Ein Kolorektalkarzinom kann nicht nur durch äußere Faktoren, sondern auch aufgrund von genetischen Prädispositionen entstehen. Bei etwa 5 bis 10 % aller Darmkarzinome ist dies der Fall (Coleman und Tsongalis, 2002). Unter den erblichen Formen sind die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) und das HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) Syndrom am besten charakterisiert. Diese sind auch für den größten Teil der vererbten familiären Kolorektalkarzinome verantwortlich. Bei Personen mit FAP liegt eine Funktionsverlustmutation in dem Tumorsuppressorgen APC vor, bei Personen mit dem HNPCC Syndrom liegen Defekte in Reparatur-Mutator-Genen vor (Kinzler und Vogelstein, 1998).

Bei der Entstehung eines Kolorektalkarzinoms können die verschiedenen Stadien (Polyp, benignes Adenom und Karzinom) histologisch unterschieden werden. Die in den jeweiligen Stadien vorliegenden Mutationen konnten identifiziert werden, weshalb der molekulare Mechanismus der kolorektalen Kanzerogenese zu einem Beispiel-Modell für neoplastische Transformation und Progression auch anderer solider Tumoren wurde.

In den Darmkrypten herrscht normalerweise ein komplexes Gleichgewicht zwischen der Teilungsrate der Stammzellen im unteren Drittel der Krypten, der Differentiation und Migration der Epithelzellen sowie deren Absterben am oberen Ende der Krypten, sodass die Zellen regelmäßig erneuert werden. Eine Störung dieses Gleichgewichts, meist durch Funktionsverlust beider APC-Allele einer Zelle, führt zu einer veränderten Proliferation, und stellt nach dem Modell von Vogelstein und Kinzler (1993) den ersten Schritt der kolorektalen Kanzerogenese dar. Es bilden sich dadurch gutartige Polypen, das sind Wucherungen auf der Innenseite der Darmwand. Erfährt jedoch eine Zelle innerhalb des Polypen eine weitere Mutation, bei 50 % ist das Protoonkogen K-Ras betroffen, so entwickelt sich ein Adenom, dessen Zellen weitere Wachstumsvorteile erlangt haben. Durch weitere Mutationen in dem Tumorsuppressorgen DCC (Deleted in Colon Cancer) entsteht schließlich ein spätes Adenom. Erfolgt dann noch der Funktionsverlust von TP53, ist der Tumor zu einem

Karzinom herangereift (Vogelstein *et al.*, 1988). Durch weitere weniger bekannte Mutationen entsteht schließlich ein Tumor mit metastasierenden Eigenschaften.

Nicht alle aufgeführten Mutationen sind in jedem Kolorektalkarzinom zu finden. Jedoch wurde beobachtet, dass in allen kolorektalen Tumoren die gleichen Signalwege durch Mutationen betroffen sind. Dies sind der Wnt-, der K-Ras-, der TGF β - und der TP53-Signalweg. Die Veränderungen in diesen Signalwegen verleihen den Zellen entweder einen Wachstumsvorteil, führen zur Destabilisierung des Genoms oder verhindern die Möglichkeit eines programmierten Zelltods. Zum Beispiel wurden in Tumoren, die keine APC-Mutation aufweisen, Mutationen in dem Gen für β -Catenin gefunden (Morin *et al.*, 1997). Dies führt ebenso wie der Funktionsverlust von APC zu einem aktivierten Wnt-Signalweg.

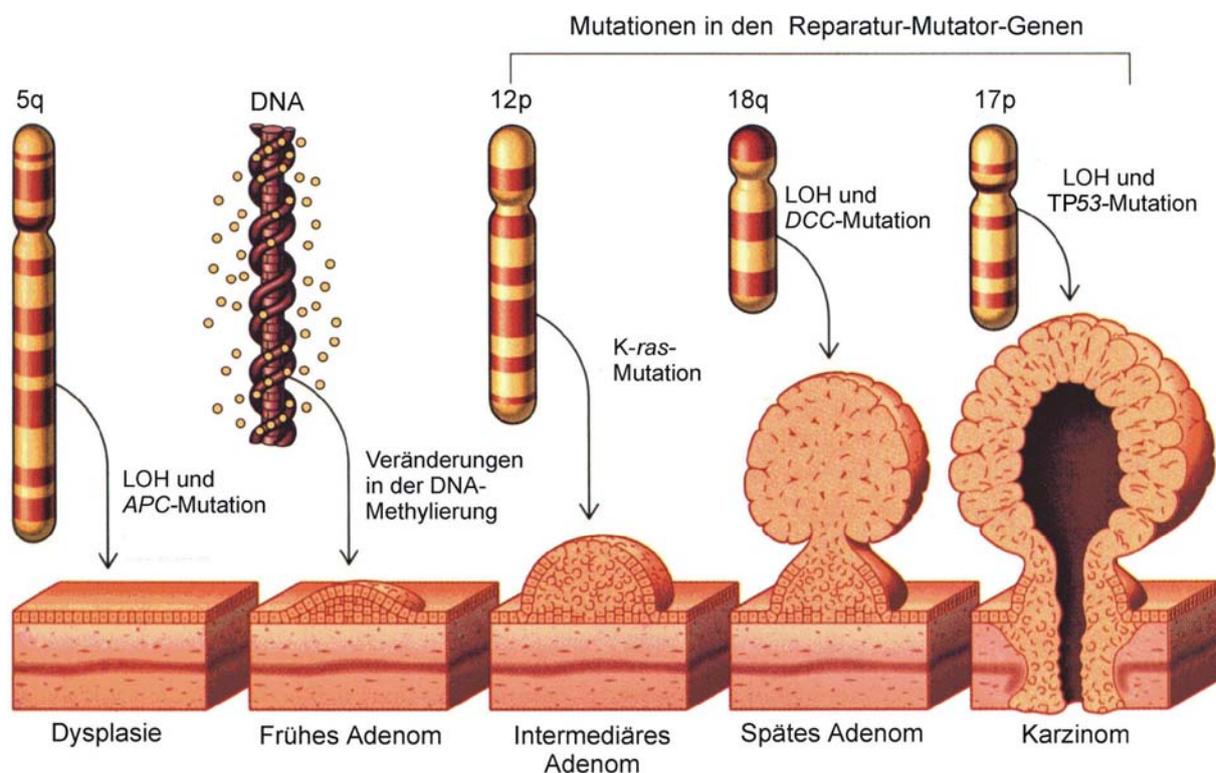


Abb. I.1: Modell der Mehrschrittkanzerogenese des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Vogelstein und Kinzler, 1993). Das normale Darmepithel entwickelt sich aufgrund von fünf genetischen Veränderungen über verschiedene Adenomstadien in ein Karzinom. LOH: Heterozygotieverlust. (Abbildung nach Weinberg und Hanahan, 1996).

Das Überleben eines Patienten mit einem Kolorektalkarzinom hängt davon ab, in welchem Stadium der Tumor und eventuell auch Metastasen entdeckt werden. Im Durchschnitt beträgt die relative 5-Jahresüberlebensrate 61 %. Wird der Tumor in einem sehr frühen Stadium entdeckt, steigt die Überlebensrate auf fast 90 %, wohingegen die Überlebensrate bei Diagnose von späten metastasierenden Stadien auf unter 8 % sinkt (Coleman und Tsongalis, 2002). Die Behandlungsmethoden beinhalten die operative Entfernung des Karzinoms sowie Radio- und Chemotherapie. In den letzten Jahren ist die Überlebensrate

von Patienten angestiegen, was aber mehr auf die frühzeitigere Diagnose der Kolorektalkarzinome zurückzuführen ist, als auf verbesserte Behandlungsmethoden. Um die Überlebensrate durch Entwicklung neuer Therapien steigern zu können, ist daher das bessere Verständnis von neoplastischen Transformationen und der Tumorprogression der Kolon- und Rektumzellen essentiell.

I.2 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg reguliert diverse Differenzierungsprozesse während der embryonalen Entwicklung, wie zum Beispiel die Bildung der Körperachse. Fehler im Wnt-Signalweg führen zu Entwicklungsanomalien. Bei Fehlregulation in adulten Organismen spielt der Signalweg eine wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren, insbesondere des Kolorektalkarzinoms. Mutationen, die zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen, sind bei mehr als 90 % aller Darmtumoren zu finden (Giles *et al.*, 2003). Am zweit häufigsten sind sie in Lebertumoren zu finden (Kolligs *et al.*, 2002). Auch an der Entwicklung von Melanomen ist der Wnt-Signalweg beteiligt. In Mäusen ist ein konstitutiv aktiver Wnt-Signalweg oft in die Kanzerogenese von Brusttumoren involviert.

Das erste in der Maus entdeckte Wnt-Gen wurde ursprünglich Int-1 genannt. Es wurde als Protoonkogen identifiziert, da es in Brusttumoren der Maus durch provirale Integration des MMT-Virus (Mouse Mammary Tumor-Virus) aktiviert wird (Nusse und Varmus, 1982). Der Name Wnt entstand später durch Kombination von Int-1 aus der Maus und seinem Drosophila-Homolog Wingless. Der Wnt-Signalweg ist zwischen verschiedenen Organismen, wie Fliegen, Fröschen und Säugetieren, stark konserviert.

Die Wnt-Proteine, die an erster Stelle des Wnt-Signalwegs stehen, sind eine große Familie von sekretierten Glykoproteinen, von denen inzwischen 19 Mitglieder beim Menschen und auch bei der Maus bekannt sind (Giles *et al.*, 2003). Die Transkription der Wnt-Gene scheint während der Entwicklung eines Organismus sowohl zeitlich als auch lokal exakt reguliert zu sein. Wnt-1 wird hauptsächlich im Zentralen Nervensystem exprimiert, aber andere Mitglieder der Familie werden auch in Brustzellen, Darmzellen und anderen Geweben exprimiert.

Der sogenannte kanonische Wnt-Signalweg, welcher bei der Entstehung von Darmtumoren eine zentrale Rolle spielt, reguliert über die Aktivität der Glykogen-Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) den Phosphorylierungsstatus des Proteins β -Catenin, und damit dessen zytoplasmatische Konzentration. Nicht phosphoryliertes β -Catenin besitzt eine längere

Halbwertszeit, reichert sich deswegen in der Zelle an und kann in den Zellkern wandern, wo es zusammen mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid-enhancer factor)-Familie die Transkription der Zielgene des Wnt-Signalwegs kontrolliert.

Die Rolle von β -Catenin im Wnt-Signalweg unterscheidet sich stark von der des „Gerüst-Proteins“ β -Catenin. Denn ursprünglich wurde β -Catenin als Komponente des E-Cadherin-Catenin Zell-Zell Adhäsionskomplexes entdeckt, in welchem es eine Brücke zwischen der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin und α -Catenin herstellt, wodurch der Adhäsionskomplex mit dem Aktin-Zytoskellet verbunden wird.

In Abwesenheit von Wnt wird freies β -Catenin stetig phosphoryliert und kann daher über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg abgebaut werden (Abbildung 1.2-A). β -Catenin ist das Homolog des Drosophila Proteins Armadillo und hat ebenso wie dieses eine zentrale Domäne mit 12 sogenannten Armadillo-Repeats (Pfeifer *et al.*, 1994), welche eine Superhelix ausbilden und über die Cadherine, APC (adenomatous polyposis coli), TCFs und Axin gebunden werden. Im N-Terminus liegt die Bindungsstelle für α -Catenin, sowie die für die Degradation des Proteins essentiellen Serin- und Threonin-Reste. Die Phosphorylierung von β -Catenin erfolgt durch die Serin/Threonin-Kinase GSK3 β in einem Multiproteinkomplex. An diesem sogenannten Zerstörungskomplex (destruction complex) sind zusätzlich Axin (oder Conductin) und APC beteiligt. Axin und APC bilden ein strukturelles Gerüst, das es der GSK3 β erlaubt, β -Catenin sowie Axin und APC zu phosphorylieren. Axin kann APC über eine N-terminale RGS-Domäne binden. Außerdem bindet es β -Catenin, GSK3 β und Dishevelled. APC bindet über seine zentrale Domäne, in der mehrere Aminosäure-Wiederholungen vorliegen, β -Catenin. Axin bindet es über drei SAMP (Serin, Alanin, Methionin, Prolin)-Motive. Bevor GSK3 β β -Catenin phosphorylieren kann, muss dieses durch die Casein Kinase I an Ser-45 phosphoryliert worden sein. Diese Phosphorylierung wird durch Diversin, welches die CKI zum Zerstörungskomplex rekrutiert, erleichtert (Schwarz-Romond *et al.*, 2002). Anschließend kann die GSK3 β β -Catenin zuerst an Thr-41, dann an Ser-37 und schließlich an Ser-33 phosphorylieren. Aufgrund dieser Phosphorylierungen entsteht das Erkennungsmotiv des F-Box Proteins β TrCP (β -Transducin repeat Containing Protein), welches dann an β -Catenin bindet und dessen Ubiquitinylierung stimuliert (Winston *et al.*, 1999). Daraufhin wird β -Catenin im Proteasom abgebaut. Folglich bleibt durch den aktiven Zerstörungskomplex die β -Catenin-Konzentration im Zytoplasma gering. Im Zellkern liegt kein β -Catenin vor, weshalb die Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie zusammen mit Transkriptionsrepressoren die Promotoren der Zielgene des Wnt-Signalwegs blockieren. Zu den Repressoren, die an TCF binden, gehören unter anderem Proteine der Groucho-Familie, in Säugetieren Grgs (Groucho-related genes) genannt, welche durch Rekrutierung von

Histon-Deacetylasen, die das Chromatin kondensieren, aktiv an der Repression beteiligt sind (Chen *et al.*, 1999). Manche TCFs können noch einen weiteren Repressor, CtBP, binden (Roose und Clevers, 1999).

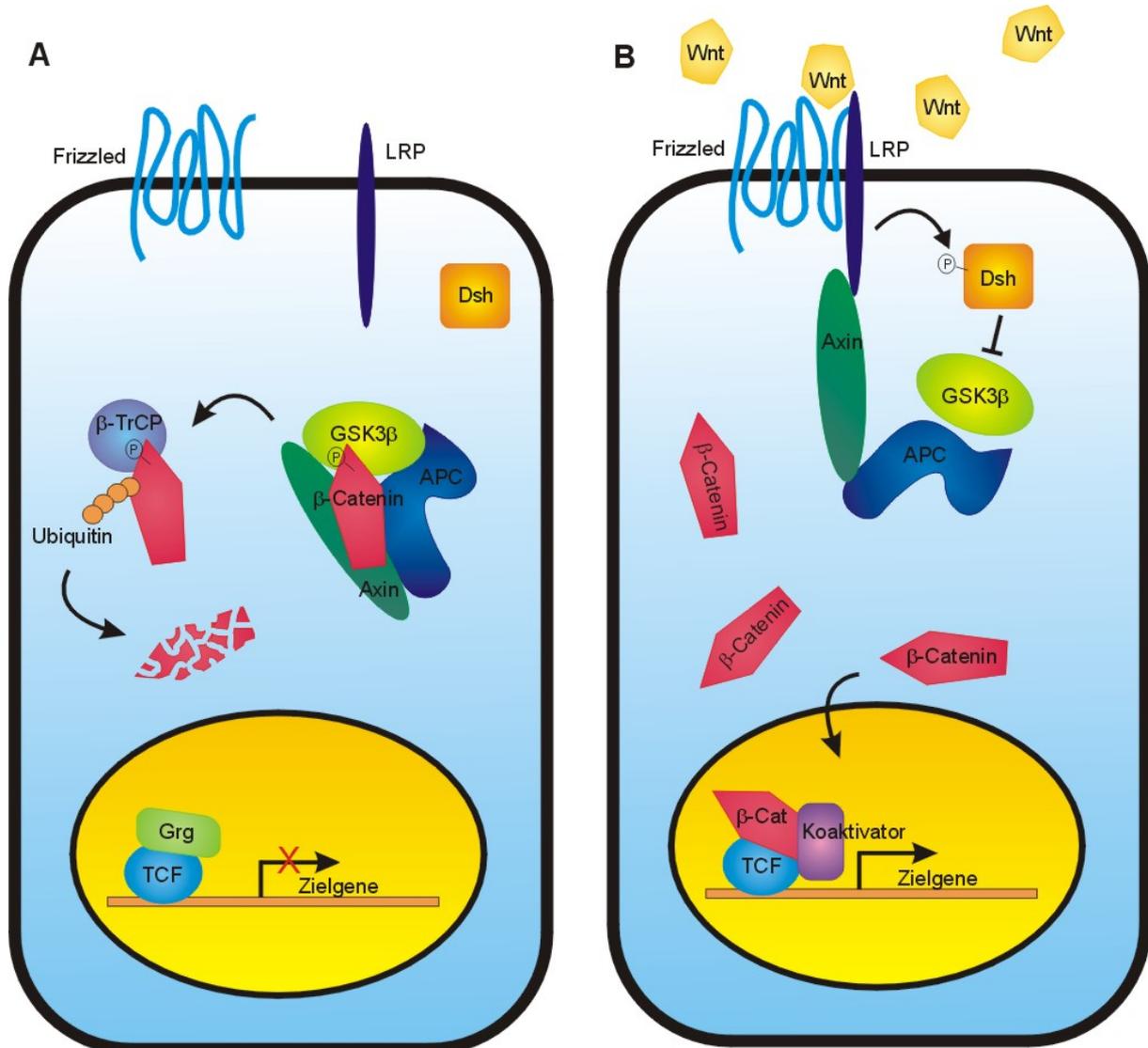


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs. A: in einer nicht stimulierten Zelle; B: in einer Wnt-stimulierten Zelle. Abbildung modifiziert nach Giles *et al.* (2003) und Lustig *et al.* (2003).

Der kanonische Wnt-Signalweg wird durch die simultane Bindung des Liganden Wnt an seinen Rezeptor Frizzled (Fz) und den Korezeptor LRP-5 oder LRP-6 (low-density lipoprotein receptor-related protein) initiiert (Tamai *et al.*, 2000; Pinson *et al.*, 2000). Frizzled ist ein 7-Transmembran-Domänen-Rezeptor mit einer extrazellulären N-terminalen Cystein-reichen Domäne, über die Wnt gebunden wird, und einer PDZ-Domäne im intrazellulären C-terminalen Abschnitt (Bhanot *et al.*, 1996). Die meisten Wnt-Proteine können an verschiedene Frizzled-Rezeptoren binden, von denen beim Menschen inzwischen 10 bekannt sind (Giles *et al.*, 2003).

Wnt-Signale können extrazellulär durch diverse sekretierte Proteine moduliert werden. Zum Beispiel kann die Interaktion von Wnt mit seinem Rezeptor durch sekretierte Proteine der Dickkopf (Dkk)-Familie inhibiert werden. Dkk-1 bindet an LRP-6 und verhindert dadurch sterisch die Bindung von Wnt (Mao *et al.*, 2001(a)). Daraufhin bindet das Transmembranprotein Kremen2 an den Dkk-LRP-6-Komplex, wodurch die Endocytose des Komplexes eingeleitet wird, und der Korezeptor LRP-6 von der Plasmamembran entfernt wird (Mao *et al.*, 2002). Andererseits können auch Frizzled-verwandte Proteine (FrzB) Wnt binden, wodurch sie antagonistisch auf dessen Funktion wirken.

Kann Wnt, wie in Abbildung 1.2 B gezeigt, an seine beiden Rezeptoren binden, wird das Protein Axin an die Membran translokiert, wo es mit der intrazellulären Domäne von LRP-5/6 interagiert. Dies führt zur Destabilisierung des Zerstörungskomplexes, in dem sonst β -Catenin phosphoryliert wird (Mao *et al.*, 2001(b)). Gleichzeitig führt die Bindung von Wnt an Frizzled durch einen noch unbekanntes Mechanismus zur Hyperphosphorylierung von Dishevelled (Dsh), welches daraufhin an die DIX-Domäne von Axin bindet und so den Zerstörungs-komplex destabilisiert (Kishida *et al.*, 1999). Dies führt dazu, dass Frat-1 (Frequently rearranged in T-cell lymphomas) an die GSK3 β binden kann, welche mit Axin um die Bindung an die Kinase kompetiert, was schließlich zur Inaktivierung der Kinase führt (Salic *et al.*, 2000).

Neben dem kanonischen Wnt-Signalweg, der über β -Catenin verläuft, gibt es zwei weitere Wnt-Signalwege. Zum einen kann das Signal von Dsh zum JNK (c-Jun N-terminal kinase)-Signalweg weitergeleitet werden, der die planare Zellpolarität reguliert. Zum anderen kann durch Wnt-5a oder Wnt-11 der Wnt/Ca²⁺-Signalweg stimuliert werden, der zur Aktivierung von Ca²⁺ abhängigen Signalproteinen führt. Es ist bisher aber noch nichts darüber bekannt, ob dieser Signalweg auch in die Kanzerogenese involviert ist. Welcher der Wnt-Signalwege aktiviert wird, hängt davon ab welches der Wnt-Proteine an welchen der Frizzled-Rezeptoren bindet. Zudem können verschiedene Proteine (z.B. Casein Kinase I) über ihre Interaktion mit Dsh die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs fördern und so die beiden nicht-kanonischen Signalwege inhibieren.

Der Wnt-stimulierte Zerfall des Zerstörungskomplexes führt dazu, dass β -Catenin nicht mehr phosphoryliert wird und sich infolgedessen in der Zelle anreichert. Im Gegensatz zu phosphoryliertem β -Catenin, wandert dephosphoryliertes β -Catenin durch einen noch nicht geklärten Mechanismus bevorzugt in den Zellkern (van Noort *et al.*, 2002). Dort bindet β -Catenin über seine Armadillo-Motive an den N-Terminus von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, wodurch Zielgene des Wnt-Signalwegs aktiviert werden.

Die TCF/LEF-Familie besteht beim Menschen aus TCF1, LEF1, TCF3 und TCF4. Diese Proteine haben eine HMG (high-mobility group) Box von etwa 80 Aminosäuren, mit der sie

als Monomer sequenzspezifisch an DNA binden (van Noort und Clevers, 2002). Ungewöhnlicherweise binden sie die DNA in der kleinen Furche, wodurch die DNA weit gebogen wird, und die Bindung weiterer Faktoren erleichtert wird (Grosschedl *et al.*, 1994; Giese *et al.*, 1995). Die Konsensussequenz des DNA-Motivs für TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren ist (A/T)(A/T)CAA(A/T)G (Roose und Clevers, 1999). LEF1 unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der Familie darin, dass es eine kontextabhängige Aktivierungsdomäne (CAD) besitzt, an die der Koaktivator ALY binden kann (Bruhn *et al.*, 1997). TCFs müssen durch Bindung von β -Catenin aktiviert werden, da sie in dessen Abwesenheit, mit Transkriptionsrepressoren assoziiert, die Promotoren der Zielgene blockieren (siehe oben). β -Catenin hat somit die Funktion eines Transkriptionsaktivators, da es die Transkriptionsrepressoren verdrängt.

Der Mechanismus, über den β -Catenin die Transkription von Zielgenen aktiviert, ist noch nicht verstanden. β -Catenin kann mit weiteren essentiellen Koaktivatoren für die Zielgenexpression interagieren. Bindungsstellen für diese Proteine sind vor allem im C-Terminus von β -Catenin lokalisiert. β -Catenin kann daher als Anker-Protein angesehen werden, das weitere essentielle Koaktivatoren für die Zielgenexpression rekrutiert (Barker *et al.*, 2001). Dazu gehört die Histon-Acetyltransferase p300/CBP (CREB binding protein), welche durch Veränderungen der Chromatinstruktur in wichtigen Promotorbereichen, die Assoziation von weiteren Transkriptionsfaktoren erleichtert (Hecht *et al.*, 2000). Auch Brg-1 (Brahma-related-gene-1), eine Komponente des SWI/SNF und Rsc Chromatin-Remodelling-Komplexes, interagiert mit β -Catenin und erleichtert vermutlich so die Umstrukturierung des Chromatins für die Transkriptionsaktivierung (Barker *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die Chromatinstruktur für die Aktivierung von TCF-Zielgenen notwendig ist (Barker *et al.*, 2001). Auch Pygopus und das Onkogen Bcl-9 (homolog zu Legless in *Drosophila*) interagieren mit dem TCF- β -Catenin-Komplex und sind an der Aktivierung von TCF beteiligt (Kramps *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002). Von Hecht *et al.* (1999) wurde beschrieben, dass β -Catenin *in vitro* mit TBP (TATA binding protein) interagieren kann, was bedeutet, dass β -Catenin direkt mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren könnte. β -Catenin kann aber auch indirekt über Pontin52 mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren, da das nukleäre Protein Pontin52 an die Armadillo-Motive von β -Catenin bindet und gleichzeitig mit TBP interagiert (Bauer *et al.*, 1998).

Schließlich führt die Bindung von β -Catenin an TCF und die zusätzliche Interaktion mit weiteren Koaktivatoren im Promotorbereich der Zielgene des Wnt-Signalwegs zur Transkription der Zielgene. Durch den Wnt-Signalweg werden aber nicht nur Gene aktiviert, sondern auch reprimiert. Wie die Gentranskription bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs gehemmt wird, ist bisher kaum verstanden (Kahler *et al.*, 2003).

I.2.1 Zielgene des Wnt-Signalwegs

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs identifiziert werden (Tabelle I.1). Es wurden überwiegend Gene charakterisiert, die durch den Signalweg aktiviert werden. Bisher konnten nur wenige Gene identifiziert werden, deren Transkription durch den Wnt-Signalweg reprimiert wird.

Gen	Organismus	Regulation	Referenz
c-myc	Mensch	hoch	He <i>et al.</i> , 1998
Cyclin D1	Mensch	hoch	Tetsu <i>et al.</i> , 1999
Tcf-1	Mensch	hoch	Roose <i>et al.</i> , 1999
c-jun	Mensch	hoch	Mann <i>et al.</i> , 1999
fra-1	Mensch	hoch	Mann <i>et al.</i> , 1999
βTrCP	Mensch	hoch	Spiegelman <i>et al.</i> , 2000
VEGF	Mensch	hoch	Zhang <i>et al.</i> , 2001
Conductin/Axin2	Mensch	hoch	Yan <i>et al.</i> , 2001 Lustig <i>et al.</i> , 2002
LEF-1	Mensch	hoch	Hovanes <i>et al.</i> , 2001 Filali <i>et al.</i> , 2002
connexin43	Maus, Xenopus	hoch	van der Heyden <i>et al.</i> , 1998
periostin	Maus	herunter	Haertel-Wiesmann <i>et al.</i> , 2000
<i>Nr4a1</i> und <i>Herpud1</i>	Maus	hoch	Chtarbova <i>et al.</i> , 2002
Osteocalcin	Maus	herunter	Kahler <i>et al.</i> , 2003

Tabelle I.1: Zielgene des Wnt-Signalwegs. Dies ist unter anderem eine Auswahl einer detaillierten Liste (Wnt-Homepage unter www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html).

Die meisten der aufgeführten menschlichen Gene wurden in kolorektalen Tumorzellen, in denen β -Catenin an TCF-4 bindet, untersucht. Die identifizierten Mäusegene wurden in unterschiedlichen Mäusezelllinien charakterisiert.

Viele der Zielgene haben Promotoren, in denen TCF/LEF-Bindungsmotive zu finden sind und es konnte in vielen Fällen nachgewiesen werden, dass sie für die Aktivierung der Gene über β -Catenin/TCF essentiell sind. Als erstes Zielgen des Wnt-Signalwegs wurde das Protoonkogen c-myc in der menschlichen Darmtumorzelllinie HT29 (Genotyp APC^{-/-}) identifiziert (He *et al.*, 1998). Im Vergleich zu APC-induzierten HT29-Zellen wurde gezeigt, dass c-myc sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene verstärkt exprimiert wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in den Wnt-aktiven Zellen β -Catenin/TCF-4 an

bestimmte Bereiche im c-myc-Promotor bindet und dadurch die Transkription aktiviert (He *et al.*, 1998).

Für Periostin wurde in C57MG-Zellen (Brustepithelzellen der Maus) gezeigt, dass dessen Transkription durch Wnt-3 reprimiert wird. Diese Reprimierung wird zwar durch die GSK3 β vermittelt, jedoch nicht durch β -Catenin ausgeführt (Haertel-Wiesmann *et al.*, 2000). Denn Überexpression von β -Catenin oder reduzierte Konzentrationen von β -Catenin in den Zellen hatte keinen Effekt auf die Transkription. Insofern bleibt offen, durch welche Faktoren die Reprimierung des Periostin-Gens erfolgt. Für den Osteocalcin-Promotor konnte gezeigt werden, dass auch eine Reprimierung über β -Catenin und LEF-1 vermittelt werden kann (Kahler *et al.*, 2003). Die Aktivierung des Osteocalcin-Promotors ist von dem Transkriptionsfaktor Runx2 abhängig. Neben der DNA-Bindungsstelle von Runx2 konnte ein LEF-Bindungsmotiv im Promotor identifiziert werden. Wie zu erwarten, konnten Kahler *et al.* (2003) zeigen, dass die Runx2-vermittelte Aktivierung des Promotors durch Bindung von LEF-1 reprimiert wird. Durch einen aktiven Wnt-Signalweg (aktive β -Catenin-Mutante) wurde diese Repression dann jedoch nicht aufgehoben, sondern noch verstärkt. Dies könnte durch Maskierung der Runx2-Bindungsstelle verursacht sein (Kahler *et al.*, 2003). Durch einen aktiven Wnt-Signalweg wird auch die Expression von LEF-1 erhöht, sodass auch über eine direkte LEF-Runx2-Interaktion die Runx2-Aktivität reguliert sein könnte (Kahler *et al.*, 2003).

Durch Aktivierung von manchen Zielgenen kreiert der Wnt Signalweg negative „Feedback“-Mechanismen, durch die er seine eigene Aktivität wieder reprimiert. Eines dieser Gene ist β TrCP (Spiegelman *et al.*, 2000). Ebenso wird eine negative „Feedback“-Schleife durch die Aktivierung von Conductin/Axin2 eingeleitet (Lustig *et al.*, 2002).

Insgesamt fördern die Aktivierungen und Reprimierungen der Wnt-Zielgene die Zellproliferation, sowie Bewegungsvermögen und Differentiation einer Zelle während der embryonalen Entwicklung. Durch Stimulation von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-myc, wird der Durchgang durch den Zellzyklus erleichtert. Die Aktivierung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, setzt auch die Zellen der Umgebung einem verstärkten Wachstumssignal aus. Aufgrund dieser Effekte hat der Wnt-Signalweg ein starkes Tumor förderndes Potential. Fehlregulationen können zur unkontrollierten Zellproliferation führen und auch das Wachstum von benachbarten Zellen stimulieren.

I.2.2 Veränderungen im Wnt-Signalweg bei Tumoren und deren Auswirkungen beim Kolorektalkarzinom

In vielen Tumoren sind Mutationen in Genen von Proteinen des Wnt-Signalwegs zu finden. Bei der Entstehung von Darmtumoren ist der Wnt-Signalweg einer der wichtigsten. Obwohl Wnt-1 in die MMTV-induzierte Tumorentstehung bei Mäusen involviert ist, spielen die Wnt-Proteine sonst meist keine Rolle in der Kanzerogenese. Meistens sind in den Tumoren Mutationen in den Tumorsuppressorgenen APC und Axin und dem Protoonkogen β -Catenin zu finden. In 80 % aller Darmtumoren ist APC in beiden Allelen mutiert (Polakis, 1999). Die Mutationen führen meistens zu einem verkürzten Protein. Etwa 50 % der Darmtumoren, die keine APC-Mutation aufweisen, tragen eine Mutation im β -Catenin-Gen (Morin *et al.*, 1997). Mutationen in APC oder Axin führen zur Destabilisierung des Zerstörungskomplexes, weshalb die GSK3 β β -Catenin nicht mehr phosphorylieren kann und es zur Akkumulation von β -Catenin in der Zelle kommt. Führen Mutationen im β -Catenin-Gen dazu, dass es nicht phosphoryliert werden kann, wird es nicht mehr in der Zelle abgebaut und es kommt ebenso zu einer Akkumulation des β -Catenins. Die Funktionsverlust-mutationen in APC oder Axin und Funktionsgewinnmutationen in β -Catenin haben somit gemeinsam, dass sie alle zur vermehrten Komplexbildung von TCF und β -Catenin führen. Dadurch werden die Zielgene des Wnt-Signalwegs in den betroffenen Zellen ununterbrochen aktiviert. Die vermehrte Transkription von c-myc und Cyclin D1 fördert den Durchgang durch den Zellzyklus und damit die Zellteilung, wodurch die Zellen einen Wachstumsvorteil erhalten. Dies führt in den Epithelzellen des Darms zu der ersten zellulären Transformation. Es kommt zur vermehrten Bildung von adenomatösen Polypen, da das Gleichgewicht in den Darmkrypten zwischen sich bildenden und absterbenden Zellen gestört ist. Von van de Wetering *et al.* (2002) wurde ein Modell aufgestellt (siehe Abbildung I.3), wie sich aufgrund von Mutationen im Wnt-Signalweg diese Polypen bilden. Im unteren Drittel der Darmkrypten befinden sich Stammzellen, in denen es aufgrund eines Wnt-Signals am Boden der Krypten zur Anreicherung von nukleärem β -Catenin kommt. Folglich führt dies zur Expression der Zielgene des Wnt-Signalwegs und zur Zellproliferation. Es wird vermutet, dass die Wnt-Proteine von mesenchymalen Zellen, die den Boden der Krypten umgeben, sekretiert werden und die Aktivierung des Wnt-Signalwegs auslösen. Wenn die Vorläuferzellen aufgrund ihrer Migration die Mitte der Krypten erreichen, liegt kein Wnt-Signal mehr vor, die Aktivität von β -Catenin/TCF verringert sich. Die Zellen teilen sich nicht mehr und beginnen zu differenzieren.

Liegen in den Zellen jedoch Mutationen in Komponenten des Wnt-Signalwegs vor, sind sie unabhängig von den physiologischen Signalen, die die β -Catenin/TCF-Aktivität im Zellkern

regulieren. Diese Zellen verhalten sich deswegen weiterhin wie Krypten-Vorläuferzellen, auch wenn sie das obere Drittel der Darmkrypten erreicht haben. Durch die vermehrte Proliferation kommt es zum Ausstülpen des intestinalen Epithels und es können sich Polypen bilden. Die Differentiation dieser Zellen wird durch die weitere Aktivität des Zielgens c-myc, welches die $p21^{CIP1/WAF1}$ Transkription reprimiert, inhibiert (van de Wetering *et al.*, 2002). Der β -Catenin/TCF-4-Aktivität scheint in den Darmkrypten somit eine Schalterfunktion zuzukommen um von der Proliferation zur Differentiation der Zelle zu wechseln (Giles *et al.*, 2003).

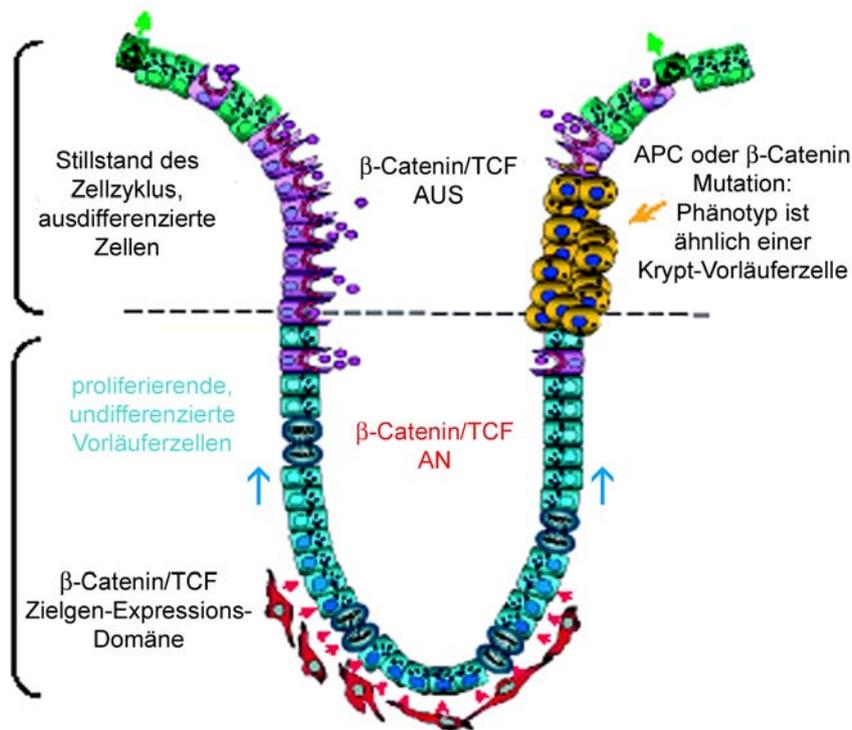


Abb. I.3: Modell der Polypen-Bildung in Darmkrypten. Schematische Darstellung einer Darmkrypte. Links ist der normale Verlauf von zunächst proliferierenden und wandernden Krypt-Vorläuferzellen gezeigt, die bei Erreichen der Mitte der Darmkrypte in verschiedene Zelltypen differenzieren und schließlich am oberen Ende der Krypte absterben. Rechts ist der Verlauf von Krypt-Zellen mit einer APC oder β -Catenin Mutation gezeigt, die aufgrund der Mutation nicht ausdifferenzieren, sondern auch im oberen Teil der Krypte weiter proliferieren. Abbildung modifiziert nach van de Wetering *et al.* (2002).

II. Zielsetzung

Die Entstehung eines Darmtumors beginnt meist mit der Polypenbildung. Dieser Schritt wird durch eine Fehlregulation des Wnt-Signalwegs initiiert. Die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die durch den Wnt-Signalweg reguliert werden, ist wichtig, um diesen Prozess der Tumorentstehung besser zu verstehen. Zudem liefert ein besseres Verständnis von Veränderungen in der Genexpression in Wnt-transformierten Zellen die Basis für neue Therapieansätze. Viele der bisher bekannten Zielgene des Wnt-Signalwegs codieren Proteine, die direkt mit dem stark transformierenden Potential des Signalwegs in Zusammenhang gebracht werden.

Das Ziel dieser Arbeit war, neue Gene zu identifizieren deren Expression in Brustepithelzellen der Maus (C57MG-Zellen) durch den Wnt-Signalweg reguliert werden. Die C57MG-Zellen können durch Wnt-1, aber auch Wnt-2 und Wnt-3A transformiert werden. Ausgangspunkt für diese Arbeit waren Daten eines DNA-Microarrays („Chip“), der mit cDNA von C57MG-Wnt-1- und C57MG-pLNCx-Zellen (Kontrollzelllinie) zur Transkriptionsanalyse hybridisiert wurde (S. Chtarbova, unveröffentlicht). Von 8 ausgewählten Genen, die auf dem Chip Unterschiede in der Expression zeigten, sollten die Ergebnisse durch Northern Blot-Analysen verifiziert werden. Dazu wurden zum einen C57MG-Zellen, die mit Wnt-1 oder dem Leervektor stabil infiziert waren, verwendet, und zum anderen auch C57MG-Zellen, in denen die GSK3 β durch Lithium inhibiert wurde, genutzt. Für den Fall, dass Unterschiede in der Genexpression auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnten, sollte überprüft werden, ob der Einfluss des Wnt-Signalwegs auch auf Proteinebene detektiert werden kann. Hierfür wurden die jeweiligen Proteinmengen in Zelllysaten von C57MG-Zellen, mit aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg, immunologisch nachgewiesen und miteinander verglichen.

Wenn zudem der Promotor des untersuchten Gens bekannt war, sollte mittels Reporteragen-Assays die Aktivität des Promotors in Zusammenhang mit einem aktiven und inaktiven Wnt-Signalweg untersucht werden. Falls TCF/LEF-Bindungsmotive in den Promotorsequenzen vorhanden sind, sollte gegebenenfalls der Einfluss dieser Motive auf die Promotoraktivität analysiert werden, da diese in vielen Promotoren von bisher bekannten Zielgenen des Wnt-Signalwegs für die Aktivierung eine Rolle spielen.

III. Material

III.1 Laborgeräte

Analysenwaage Sartorius Basic 3100 P	Sartorius AG (Göttingen)
Axiophot Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Brutschränke	Heraeus Instruments (Düsseldorf)
Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Fastblot B43 16x20 cm	Biometra (Göttingen)
Fastblot B32 12x12 cm	Biometra (Göttingen)
Feinwaage Mettler PM 480 Delta Range	Mettler-Tolodo-GmbH (Giessen)
Flüssigkeitsszintillationssystem LS 6500	Beckmann (München)
Gelscanner Bioprofil 5.0	Fröbel (Lindau)
Hybridisierungsöfen Mini-Ofen 10	MWG-BIOTECH GmbH (Ebersberg)
Inkubationsschüttler Multitron	Infors (Bottmingen, Schweiz)
Luminometer Lumat LB 9501	Berthold (Wildbad)
Mikroskop Nikon eclipse TS 100	Nikon (Tokyo, Japan)
Phosphorlimgager FLA-5000	Fuji
Netzgeräte	Biometra (Göttingen) & BioRad (München) & Amersham Pharmacia Biotec (Braunschweig)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)
pH-Meter	Orion
Pipetten	Eppendorf (Hamburg) & Glison (Abimed, Langenfeld)
Spektralphotometer BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Instruments (Düsseldorf)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
TRIO Thermoblock	Biometra (Göttingen)
Ultraschallgerät Sonifier W450	Branson
UV-Flächenstrahler NU-72	Taust
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)

Zentrifugen:

J2-HC & J2-HS	Beckmann (Palo Alto, USA)
Rotoren: JA10, JA12, JA14, JA17	Beckmann (Palo Alto, USA)
Avanti 30	Beckmann (Palo Alto, USA)
Rotoren: F0650	Beckmann (Palo Alto, USA)
Tischzentrifugen	Heraeus Instruments (Hanau)

III.2 Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Mikrotiterplatten	Becton Dickinson (Heidelberg)
Amicon Ultra 10000	Millipore (Bedford, USA)
Gewebekulturschalen (Falcon)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Halbmikroküvetten UVette	Eppendorf (Hamburg)
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotec (Braunschweig)
Nylonmembran Hybond N+	Amersham Pharmacia Biotec (Braunschweig)
Plastik-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Plastik-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
PVDF-Membran Hybond P	Amersham Pharmacia Biotec (Braunschweig)
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße („Falcon Tubes“)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Sterilfilter	Schleicher & Schüll (Dassel)
Whatman 3 MM Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Zellkulturflaschen (Falcon)	Becton Dickinson (Heidelberg)

III.3 Chemikalien

Sofern nicht in den jeweiligen Methodenbeschreibungen vermerkt, wurden Chemikalien der Firmen Amersham Pharmacia Biotec (Braunschweig), Fluka (Buchs, Schweiz), Gerbu Biotechnik (Galberg), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roche Molecular Diagnostics (Mannheim), Riedel-de-Hän (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet.

III.4 Radiochemikalien

α [³²P]-dCTP Spezifische Aktivität: ICN Pharmaceuticals (Meckenheim)
3000 Ci/mmol 10 mCi/ml in 5 mM Tris-HCl, pH 7,5

III.5 Puffer und Lösungen

10 x RNA-Auftragspuffer	50 % Glycerol 1 mM EDTA 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (mit 0,1 % DEPC autoklaviert)
10 x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS
2 x HEBES-Puffer	140 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM HEPES mit NaOH auf pH 7,05 steril filtriert
20 x SSC	0,3 M Trinatriumcitrat 3 M NaCl
5 x MOPS-Puffer	0,1 M MOPS 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA pH 7,0 (eingestellt mit NaOH)
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 50 mM EDTA pH 8,0 (eingestellt mit Essigsäure)

6 x DNA-Auftragspuffer	30 % Glycerol 0,4 % Orange G 10 mM Tris-HCl pH 7,5 25 mM EDTA
Agaroselösung für DNA-Gele	1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer
Agaroselösung für RNA-Gele	1,2 % (w/v) Agarose in 1x MOPS-Puffer
dNTP-Lösung	10 mM von jedem Deoxyribonukleotid
Luziferase-Assay-Reagenz	20 mM Tricine 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2$ 2,67 mM MgSO_4 0,1 mM EDTA, pH 8,0 33,3 mM DTT 270 μM Coenzym A 470 μM Luziferin 530 μM ATP mit 1 M Tris auf pH 7,8
PBS	80 mM Na_2HPO_4 20 mM NaH_2PO_4 0,1 M NaCl pH 7,5 für Zellkultur autoklaviert
RNA-Mix	1 ml Formamid 350 μl Formaldehyd 200 μl 10 x MOPS-Puffer
Transferpuffer	90 mM Tris 0,2 M Glycin 10 % (v/v) Methanol

Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % (w/v) Trypsin (1:250) 0,02 % (w/v) EDTA in Puck's Salzlösung A
TSS-Puffer	85 % LB-Medium (pH 6,5) 10 % (w/v) PEG 8000 50 mM MgCl ₂ 5 % (v/v) DMSO
Zell-Lysis-Puffer	25 mM Tris/H ₃ PO ₄ , pH 7,8 2 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerol 1 % (v/v) Triton X-100 2 mM DTE
Z-Puffer für β-Galactosidase-Assay	60 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 2 mM DTT 1 mg/ml ONPG pH 7,0

III.6 Nukleinsäure- und Protein-Standards

DNA-Standard

1 kb-DNA-Leiter Gibco BRL (Paisley)
(DNA-Abschnitte mit 12216, 11198, 10180, 9126, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 bp)

RNA-Standard

RNA-Marker 0,28 bis 6,6 kb Sigma (Deisenhofen)
(RNA-Abschnitte mit 6583, 4981, 3638, 2604, 1908, 1383, 955, 623, 281 Basen)

Protein-Standard

SeeBlue™Plus2 Pre-Stained Standard Invitrogen (Karlsruhe)
 (Proteine zu 250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6, 4 kDa)

III.7 Vektoren

pBluescriptSK+	Stratagene (Heidelberg)
pCI-neo	Promega (Mannheim)
pCI-neo - β -Catenin S33Y	
pCMV – APC(wt)	Kinzler & Vogelstein
pCMV	durch Restriktion des pCMV-APC
pEQ176 (Galactosidase-Expression)	Janknecht <i>et al.</i> (1993)
pKS+/Ltk80-luc	Janknecht <i>et al.</i> (1993)

III.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase (SAP) (1 U/ μ l)	Promega (Mannheim)
DNA-Polymerase (Klenow) (5 U/ μ l)	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
DNA-Polymerase I (4 U/ μ l)	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene (Heidelberg)
<i>Pfu</i> Turbo-Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene (Heidelberg)
ProofStart (2,5 U/ μ l)	Qiagen (Hilden)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
T4 DNA Ligase (400 U/ μ l)	New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ l)	Qiagen (Hilden)

III.9 Antikörper

Nicht gekoppelte Erstantikörper

Antigen	Bildungsorganismus	Hersteller
SCF	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
c-kit	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
Ramp3	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
Proliferin	Kaninchen	Fang <i>et al.</i> (1999)

Tabelle III.1: Nicht gekoppelte Erstantikörper. Alle Antikörper sind polyklonalen Ursprungs und vom Isotyp IgG.

Gekoppelte Zweitantikörper

Antigen	Bildungsorganismus	Kopplung	Hersteller
Kaninchen	Esel	HRPO	Amersham Life Science
Ziege	Rind	HRPO	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen		Cy 3	Dianova

Tabelle III.2: Gekoppelte Zweitantikörper. Alle Antikörper sind vom Isotyp IgG. HRPO: Horseradish peroxidase, Cy 3: Indocarbocyanin.

III.10 Kit-Systeme

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer (Überlingen)
DyeEx Spin Kit	Qiagen (Hilden)
JETstar Plasmid Maxiprep Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Prime-a-Gene® Labeling System	Promega (Mannheim)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Leek, Niederlande)

III.11 Oligodesoxyribonukleotide

Alle folgenden Primer wurden von der Firma MWG Biotech in Auftrag synthetisiert.

Primer für Promotor-Fragmente

MGF-Promoter fwd	5'-ATCCGGCCGGAATTCTCTCACTCAGCC-3'
MGF-Promoter rev	5'-TGCGGATCCGCATTGGGTAGCTCGAAC-3'
Proliferin-Promoter fwd	5'-CGCGGATCCGATATCTTTGTTAAAATAG-3'
Proliferin-Promoter rev	5'-CAACTGCAGAGGAGCATGGTTGAA-3'

PCR-Mutagenese-Primer

MGF-Promoter mut fwd	5'-GTTTTGTTTGTGTTTTTGGCAATGGCAAGTGAGC TTCTCAAACC-3'
MGF-Promoter mut rev	5'-GGTTTGAGAAGCTCACTTGCCATTGCCAAAAA CAAACAAAAC-3'

Primer für die Fragmentherstellung für DNA-Sonden

MGF fwd	5'-ATCTGCGGGAATCCTGTGAC-3'
MGF rev	5'-GCAATGCCATGGCTGTCCAT-3'
Lgals8 fwd	5'-AACCCCTCGGTTCAAAGGTC-3'
Lgals8 rev	5'-CCGGACATCACAGTAGATTA-3'
Proliferin fwd	5'-TCCAGTAAAG CATCTTCCCG-3'
Proliferin rev	5'-GTGCTCATGAGGGCATTAAAC-3'
Ramp3 fwd	5'-TGCAGAAGGTGGCTGTCTGG-3'
Ramp3 rev	5'-CAGTTGATTTCCATGCCTGG-3'
14-3-3 γ fwd	5'-TGACCGAGCTGAACGAACCA-3'
14-3-3 γ rev	5'-TCGTTCAAGAGTGTGAGGCTC-3'
GNB1 fwd	5'-ACACGAGTCTGACATCAATG-3'
GNB1 rev	5'-TGAGATCCTTCTCTTAATGG-3'
Gbp3 fwd	5'-AAGTCCTACCTCATGAATCG-3'
Gbp3 rev	5'-TACATTCTCTGGTCATGTTG-3'
TIS 11 fwd	5'-ATCAACTCCACGCGCTACAA-3'
TIS 11 rev	5'-AAGCGAAGGCGTTGTTAGCG-3'
β -Actin fwd	5'-GCGGGATCCTCGACAACGGCTCCGGCAT-3'
β -Actin rev	5'-GCGGTGACGGATCTTCATGAGGTAGTCAG-3'

Sequenzierprimer

T7 Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
MGF-Promoter Seq rev	5'-GCCTCAGGGAAATAGAACCA-3'

III.12 Nährmedien**Nährmedien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur**

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	Gibco BRL (Paisley)
MEM	Gibco BRL (Paisley)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL (Paisley)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL (Paisley)
Hygromycin	Gibco BRL (Paisley)
Pyruvat	Gibco BRL (Paisley)
nicht essentielle AS	Gibco BRL (Paisley)
L-Glutamin	Gibco BRL (Paisley)

Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Flüssigmedium	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Bacto-Trypton auf 1000 ml H ₂ O pH 7,4 nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar-Platten	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Bacto-Trypton 10 g Bacto-Agar auf 1000 ml H ₂ O 50 µg/ml Ampicillin

SOC-Medium	2 % Tryptone
	0,5 % Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

III.13 Biologisches Material

Bakterienstämme

Escherichia coli TG1

Genotyp: K12 (*lac-pro*), *thi-1*, *supE*, *hsdD5*, [F'*traD36*, *proAB+*, *lacIQ*, *lacZ*M15]

Escherichia coli Top10 (Invitrogen, Leek, Niederlande)

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Kultur-medium	Antibiotika	Zusätze
C57MG	Brustdrüsenepithelzelllinie der Maus (Vaidya <i>et al.</i> , 1978) stabil infiziert mit dem Retrovirus-Expressionsvektor pLNCx	DMEM + Glutamax	P/S	
C57MG-pLNCx	bzw. pLNCx-Wnt-1 (exprimiert Wnt-1; Shimizu <i>et al.</i> , 1997) Bezugsquelle: freundlicherweise von Jan Kitajewski, Department of Pathology, Columbia University, New York, USA überlassen	DMEM + Glutamax	P/S/H	
C57MG-Wnt-1		DMEM + Glutamax	P/S/H	

HCT116	Menschliche Kolon-Adenokarzinomzelllinie, gering differenziert (Brattain <i>et al.</i> , 1981) Bezugsquelle: American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)	DMEM	P/S	Pyruvat, L-Glutamin, nicht ess. AS
HEK293	Menschliche, embryonale transformierte Nierenepithelzelllinie (Human Embryonic Kidney) Bezugsquelle: American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)	DMEM	P/S	Pyruvat, L-Glutamin, nicht ess. AS
SW480	Menschliche Kolon-Adenokarzinomzelllinie, gering differenziert (Leibovitz <i>et al.</i> , 1976) Bezugsquelle: American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)	DMEM	P/S	Pyruvat, L-Glutamin, nicht ess. AS
RK13	Embryonale Kaninchennierenzellen (Beale <i>et al.</i> , 1963)	MEM (Eagle) + Glutamax	P/S	

Tabelle III.3: Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen. Zu allen Medien wurde FCS einer Endkonzentration von 10 % zugesetzt. AS: Aminosäuren, DMEM: Dulbecco's modified eagle medium, FCS: Fötale Kälberserum, H: Hygromycin (100 µg/ml), P/S: Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml).

IV. Methoden

IV.1 Molekularbiologische Methoden

IV.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wird mit kommerziellen Kit-Systemen durchgeführt. Je nach Verwendungszweck des zu isolierenden Plasmids wird für geringe DNA-Mengen eine Mini-Präparation und für größere DNA-Mengen, sowie bei einem Bedarf an DNA höherer Reinheit eine Maxi-Präparation durchgeführt.

Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmid-Isolierung erfolgt aus einer 4 ml Bakterienkultur, welche etwa 6 Stunden unter Schütteln bei 37°C kultiviert wurde, mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Das Reinigungsprinzip beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (*E. coli*) unter Einwirkung von SDS. Dabei werden sämtliche Nukleinsäuren und Proteine denaturiert und die RNA durch die im Puffer enthaltene RNase A verdaut. Durch Neutralisation der Lösung und Einstellung von chaotropen Hochsalzbedingungen präzipitieren die denaturierten Proteine zusammen mit der chromosomalen DNA und den bakteriellen Zellfragmenten. Die Plasmid-DNA hingegen renaturiert wegen ihrer geringen Größe und bleibt in Lösung. Sämtliche unlösliche Zellbestandteile werden durch Zentrifugation sedimentiert. Das im Überstand enthaltene Plasmid wird über eine Silicia-Gel-Membran gereinigt und schließlich mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

Plasmid-Maxi-Präparation

Die Plasmid-Isolierung erfolgt aus einer 200 ml Bakterienkultur, welche über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert wurde, mit dem „JetStar-Kit“ (Genomed) nach Angaben des Herstellers. Auch hier werden die Bakterienzellen einer alkalischen Lyse mit anschließender Neutralisation unterzogen. Nach Zentrifugation wird der Überstand mit der Plasmid-DNA auf eine equilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Die Säule wird gewaschen und dann die DNA eluiert. Zur weiteren Reinigung wird die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen-Anteilen 2-Propanol präzipitiert und nach Zentrifugation das DNA-Sediment nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen. Das gereinigte Plasmid-Präzipitat wird dann an der Luft getrocknet und in 200 µl dH₂O aufgenommen.

IV.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zelllinien wird das „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen) verwendet. Dazu werden die nahezu konfluenten Zellen aus einer 75 cm² Kulturflasche mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst (siehe IV.2.1) und die Zellen der erhaltenen Zellsuspension 3 min bei 300 g sedimentiert. Das Zellsediment wird einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend zu einem Volumen von 200 µl in PBS resuspendiert. Dazu werden 20 µl Proteinase K und SDS-Lysis-Puffer gegeben, um die Zellen aufzuschließen. Die genomische DNA aus diesen Zellen wird nun nach Angaben des Herstellers mit dem Kit isoliert. Die DNA wird schließlich mit 200 µl dH₂O von der Silicia-Gel-Membran eluiert.

IV.1.3 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Isolierung aus Zelllinien erfolgt mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die benötigten Zelllinien werden in 10 cm Ø Kulturschalen kultiviert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 500 µl RLT-Lysepuffer, welcher β-Mercaptoethanol und Guanidiniumisothiocyanat (GITC) zur sofortigen Denaturierung von RNasen enthält, lysiert. Das Lysat wird zur Homogenisierung auf eine „QIAshredder“-Säule (Qiagen) gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wird nach Zugabe von 70%igem Ethanol auf eine Säule mit einer Silicia-Gel-Membran gegeben, an die die RNA bindet. Nach dem Waschen der Säule wird die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei – 80°C gelagert.

IV.1.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wird deren Absorption bei 260 nm ermittelt, denn die aromatischen Ringe der Basen haben dort ihr Absorptionsmaximum. Dazu wird eine Verdünnung der Nukleinsäurelösung in eine Halbmikroküvette (UVette, Eppendorf) gegeben und die OD (optische Dichte) bei 260 nm in einem Spektralphotometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf) gegen eine entsprechende Referenzlösung bestimmt. Dabei liegen Werte zwischen 0,05 und 1 im linearen Bereich. Es entspricht:

1 OD = 50 µg/ml doppelsträngiger DNA

1 OD = 40 µg/ml einzelsträngiger DNA / RNA,

wobei noch die Verdünnung zu berücksichtigen ist. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über Proteinkontaminationen in der Lösung, da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Jedoch wird der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} auch von pH und Salzgehalt der Lösung beeinflusst (Wilfinger *et al.*, 1997), weshalb der Nachweis von Proteinkontaminationen durch diesen Quotienten unterschiedlich gut ausfallen kann.

IV.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist ein *in vitro*-Verfahren zur Vervielfältigung bzw. Erzeugung bestimmter DNA-Sequenzen, dessen Ursprung 1985 von Saiki *et al.* entworfen wurde. Für die PCR werden eine hitzestabile DNA-Polymerase aus einem thermophilen Organismus, eine Ausgangs-DNA (Template), sowie zwei Oligonukleotide (Primer), die die zu vervielfältigende DNA-Sequenz flankieren, und die zu je einem Strang des gewünschten DNA-Abschnitts komplementär sind (Mullis *et al.*, 1992), benötigt. Das PCR-Programm besteht aus einem dreistufigen Prozess, der 25 bis 45 mal durchlaufen wird und zu einer exponentiellen Amplifizierung der DNA führt.

Zuerst erfolgt die Trennung der beiden Stränge der zu kopierenden DNA durch Denaturierung bei 95°C. Im zweiten Schritt erfolgt bei einer durch die Schmelztemperatur der Primer festgelegten Temperatur (zwischen 50°C und 65°C) die Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotide an die jeweils komplementären Abschnitte der DNA-Einzelstränge. Durch diese Hybridisierung der Primer mit der Template-DNA existiert nun ein freies 3'-OH Ende, welches die thermostabile Polymerase für die Verlängerung der Oligonukleotide benötigt. Im dritten Schritt (Elongation) werden bei der optimalen Arbeitstemperatur der verwendeten Polymerase (72°C bei der *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) die Primer komplementär zum Matrizenstrang verlängert und so ein neuer, identischer DNA-Strang synthetisiert. Anschließend wird die DNA wieder denaturiert, wodurch ein neuer Zyklus beginnt.

Das PCR-Produkt wird durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese (siehe IV.1.6) auf seine korrekte Größe überprüft. Gibt es nur ein Produkt und hat das Fragment die richtige Größe, kann es nach Reinigung (siehe IV.1.7) weiter verwendet werden. Gibt es mehrere PCR-Produkte, kann das Fragment der richtigen Größe aus dem Gel eluiert werden (siehe IV.1.8).

Essentiell für das Gelingen einer PCR ist die korrekte Wahl der Annealing-Temperatur und die Dauer des Elongationsschrittes. Bei der Elongation ist es wichtig, dass die Polymerase ausreichend Zeit hat die komplette DNA-Sequenz zu synthetisieren, was von ihrer Kettenverlängerungsrate und der Länge des herzustellenden Fragments abhängt. Die

Annealing-Temperatur ist hingegen ein kritischer Faktor, der bestimmt, ob sich Primer und Template korrekt zusammenlagern. Wählt man sie zu niedrig, kann es zu einer Zusammenlagerung der komplementären Einzelstränge bzw. zu einer unspezifischen Bindung der Oligonukleotide an die DNA kommen. Wählt man die Anlagerungstemperatur zu hoch, wird die Hybridisierung der Primer mit der Template-Sequenz unterbunden. Die Schmelztemperatur sollte von beiden Primern ähnlich sein und zwischen 55 und 88°C liegen. Sie ist im wesentlichen abhängig von der Länge und vom G/C-Gehalt des Oligonukleotids und kann mit folgender Formel für Primer von etwa 20 Basen abgeschätzt werden:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2 \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

Für längere Primer kann die Schmelztemperatur annäherungsweise über folgende Formel von Baldino *et al.* (1989) ermittelt werden:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times (\log_{10}[J^+]) + 0,41 \times (\% \text{ G+C}) - (675/n) - 1,0 \times (\% \text{ Fehlpaarungen})$$

J = Konzentration monovalenter Kationen

n = Anzahl der Basen des Oligonukleotids

Beim Primerdesign ist auch darauf zu achten, dass die Primer keine Haarnadelstrukturen ausbilden oder untereinander Dimere bilden können.

IV.1.5.1 Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion

Soll eine mRNA-Sequenz amplifiziert werden, so muss diese zuerst durch Reverse Transkription in die komplementäre cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden, welche dann als Template für eine PCR eingesetzt werden kann. Dies kann mit zwei verschiedenen Methoden erreicht werden:

Zum einen können cDNA-Synthese und PCR nacheinander in verschiedenen Gefäßen durchgeführt werden („Two tube RT-PCR“). Für die Reverse Transkription wird dann ein Primer verwendet, der an die Poly-A⁺-Enden der mRNA bindet. Dazu werden zu 2 µg Template-mRNA ein Mix von dNTPs, Oligo-dT Primer, Rnase-Inhibitor, 10 x RT-Puffer, Wasser und die Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen) gegeben und 1 h bei 60°C inkubiert. Anschließend kann die Reverse Transcriptase durch Inkubation für 5 min bei 93°C inaktiviert werden. Die synthetisierte cDNA kann dann als Template für eine PCR eingesetzt werden und die gewünschte Sequenz mit genspezifischen Primern amplifiziert werden.

Zum anderen können Reverse Transkription und PCR auch nacheinander, aber in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Dafür wird in dieser Arbeit das „OneStep RT-PCR Kit“ (Qiagen) verwendet. In diesem Fall wird für die Reverse Transkription kein Oligo-dT Primer benötigt, sondern nur die genspezifischen Primer des Fragments, das auch amplifiziert werden soll. Es werden Enzyme verwendet, wie die Omniscript und Sensicript Reverse Transkriptasen, die bei 95°C inaktiviert werden und die HotStarTaq DNA Polymerase, die

durch Inkubation bei 95°C aktiviert wird. So ist eine direkt auf die Reverse Transkription folgende PCR möglich.

Ansatz für die OneStep RT-PCR:

Reagenzien	Volumen [μ l]
RNA-Template	2 ng
5 x RT-PCR Puffer	10
5 x Q-Solution	10
RNase-Inhibitor (10 U/ μ l)	0,25
fwd Primer (10 μ M)	3
rev Primer (10 μ M)	3
dNTPs (10 mM)	2
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2
dH ₂ O	auf 50

OneStep RT-PCR -Programm:

30 min	50°C	Reverse Transkription	
15 min	95°C	PCR Aktivierung	
30 sec	94°C	Denaturierung	} 35 bis 40 x
30 sec	50-68°C	Annealing	
1 min	68°C	Elongation	

Die korrekte Größe des RT-PCR-Produkts wird durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese (siehe IV.1.6) überprüft. Anschließend wird das PCR-Fragment mit dem „PCR-Purification Kit“ (Qiagen) gereinigt (siehe IV.1.7).

IV.1.5.2 PCR-Mutagenese

Zur *in vitro* Einführung von Punktmutationen in DNA-Sequenzen wird die Methode der Quik-Change-PCR verwendet. Mit Hilfe dieser Methode kann die gewünschte Mutation in einer Sequenz direkt im Vektor eingefügt werden, und mit Hilfe der PCR wird der gesamte Vektor amplifiziert. Der Ausgangsvektor wird nach der PCR mit dem Restriktionsenzym DpnI, welches methylierte DNA verdaut, restringiert, so dass anschließend nur noch Vektor vorhanden ist, der die Mutation trägt. Er kann nun direkt in *E. coli* transformiert werden, weshalb die Klonierung eines mutierten Fragmentes bei dieser Methode entfällt.

In dieser Arbeit wird das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) verwendet. Für die Mutagenese werden zwei Mutageneseprimer verwendet, die in ihrer Mitte die gewünschte Mutation aufweisen und zu beiden Seiten noch etwa 10 bis 15 komplementäre Basensequenzen haben, um eine Anlagerung an die Template-DNA zu gewährleisten. Mit Hilfe der *PfuTurbo* DNA Polymerase werden die Mutageneseprimer verlängert, und eine direkte Amplifikation des DNA-Fragments und seines Vektors ist möglich.

Die Mutageneseprimer sollen idealerweise eine Länge von 25 bis 45 Basen, einen G/C – Gehalt von mindestens 40 % und eine Annealing-Temperatur von mindestens 78°C haben. Sie enthalten beide die Mutation und lagern sich beide an die gleiche Sequenz, aber den verschiedenen Strängen des Vektors an. Die Annealing-Temperatur der QuikChange-Primer wird über folgende Formel abgeschätzt:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ G/C}) - 675/N - \% \text{ Fehlpaarung}$$

N = Länge der Primer in Basen

% G/C = prozentualer Gehalt an G- und C-Basen

% Fehlpaarung = prozentualer Anteil der Basen, die nicht komplementär zum Template sind

Ansatz für die Mutagenese:

Reagenzien	Volumen [µl]
DNA-Template	5 bis 25 ng
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	5
100 % DMSO	5
fwd Primer (125 ng/µl)	1
rev Primer (125 ng/µl)	1
dNTPs (10 mM)	1
<i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase	1
dH ₂ O	auf 50

QuikChange-PCR-Programm:

30 sec	95°C	Denaturierung	} 18x
30 sec	95°C	Denaturierung	
1 min	55°C	Annealing	
15 min 30 sec	68°C	Elongation	

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wird der Ansatz mit 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dies führt zum Abbau der ursprünglich eingesetzten, nicht mutierten Template-DNA, da Dpn

I die Sequenz 5'-Gm6ATC-3' erkennt, und die in der PCR-Reaktion amplifizierte DNA nicht methyliert ist. Dadurch bleibt die mutierte DNA übrig und kann sofort zur Transformation in kompetente TG1-Zellen eingesetzt werden.

IV.1.6 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wird eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Unter Einfluss eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA durch das Gelmaterial, wobei größere Fragmente durch den Molekularsiebeffekt des Agarosegels stärker in ihrer Bewegung gehindert werden als kleinere. Dabei ist die Laufstrecke von Fragmenten, die kleiner als 3 bis 8 kb sind, umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Fragmentlänge. Anhand eines DNA-Standards (1 kb Längenstandard, Gibco BRL), der mit aufgetragen wird, kann die Basenlänge linearisierter Fragmente ermittelt werden.

In dieser Arbeit werden 1%ige (w/v) Agarosegele in 1 x TAE zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten verwendet. Zur späteren Visualisierung der DNA wird der Agaroselösung 0,0002 % (w/v) Ethidiumbromid zugegeben. Die Elektrophorese erfolgt bei 120 V mit 1 x TAE als Laufpuffer. Die DNA-Proben werden mit 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt, welcher Glycerol zur Erhöhung der Dichte der DNA-Lösung enthält, um die Diffusion der Proben aus den Taschen zu unterbinden. Zusätzlich enthält der Puffer einen Farbstoff (Orange G), um die Wanderung der DNA während der Elektrophorese abschätzen zu können. Die getrennten DNA-Fragmente werden nach dem Lauf durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid bei 312 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Gelscanner (Bioprofil 5.0) dokumentiert.

IV.1.7 Reinigung von PCR-Fragmenten

Um nach einer PCR oder anderen enzymatischen Reaktionen ein DNA-Fragment von den Enzymen, den nicht verbrauchten Nukleotiden, den Oligonukleotiden und Salzen zu säubern wird in dieser Arbeit das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet. Dabei wird die DNA unter sauren Bedingungen in einem Hochsalzpuffer an eine Silicia-Gel-Membran gebunden und nach dem Waschen mit 30 µl eines Niedrigsalzpuffers oder dH₂O von der Säule eluiert. Das Protokoll wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

IV.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten – Gelelution

Die Gelelution dient der Isolierung von elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmenten. Dafür werden die gewünschten DNA-Fragmente entsprechend ihrer Laufhöhe identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus der Agarose erfolgt dann mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Isolierung aus dem Gel beruht auf einer chemischen und hitzevermittelten Auflösung der Agarose bei 55°C in einer 6 M Natriumjodidlösung. Die DNA wird nach deren Freisetzung an eine DEAE-gekoppelte Silica-Membran gebunden und durch mehrere Waschschriffe von Verunreinigungen befreit. Die Elution der DNA erfolgt dann mit 50 µl dH₂O.

IV.1.9 TOPO-TA-Klonierung

Die *Taq*-Polymerase hat eine vom Template unabhängige terminale Transferase-Aktivität mit der sie an alle PCR-Produkte am 3'-Ende noch ein zusätzliches Deoxyadenosin anhängt. Dadurch entstehen Fragmente mit überhängenden Enden (sticky ends), die gleich für eine Klonierung in einen linearisierten Vektor mit Deoxythymidin-Überhang an den 3'-Enden verwendet werden können. Für eine zeitlich unaufwendige Klonierung, die sich das eben beschriebenen Prinzip zu nutze macht, hat Invitrogen ein „TOPO TA Cloning® Kit“ entwickelt. Der darin verwendete Vektor pCR®2.1-TOPO® ist bereits linearisiert, hat an den 3'-Enden überhängende Deoxythymidine und kovalent Topoisomerase I gebunden. Über die Ligase-Aktivität dieser Topoisomerase wird das PCR-Fragment in den Vektor ligiert. Anschließend kann der Vektor in kompetente *E. coli* (TOP10-Zellen, aus dem Kit) transformiert werden, und über eine „Blau-Weiß-Selektion“ können positive Klone identifiziert werden. In den TOP10-Zellen wird das lacZ-Gen, dessen Produkt die β-Galactosidase ist, konstitutiv exprimiert. Die Klonierung des PCR-Fragments erfolgt in die Sequenz dieses Gens, so dass im Fall einer erfolgreichen Ligation keine β-Galactosidase exprimiert wird. Bei Religation des Vektors wird β-Galactosidase exprimiert und sie kann das farblose X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid) zu einem blauen Produkt umsetzen, welches die Kolonien blau färbt. Die Kolonien positiver Klone bleiben weiß. Anstelle von X-Gal kann hier auch Bluo-Gal als Substrat verwendet werden.

Für die TOPO-TA-Klonierung eines mit *Taq*-Polymerase amplifizierten Fragments erfolgt die Ligation in den Vektor für 5 min bei Raumtemperatur.

Ligationsansatz:

Reagenzien	Volumen [μ l]
PCR-Produkt	3
dH ₂ O	1
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	1

Die Reaktion wird mit 1 μ l TOPO[®]Cloning Stop Solution gestoppt und bis zur Transformation auf Eis gestellt. Mit Hilfe dieser Lösung kann die Topoisomerase I von der DNA abdissoziieren. Zwei Mikroliter des Ligationsansatzes werden dann zu 50 μ l der im Kit enthaltenen kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen gegeben und für die Transformation 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 s bei 42°C und anschließendem Abkühlen auf Eis werden zu dem Ansatz 250 μ l SOC-Medium gegeben, in welchem die Zellen 30 min bei 37°C geschüttelt werden. Für die anschließende „Blau-Weiß-Selektion“ werden auf LB-Amp-Agar-Platten zunächst das Substrat für die β -Galactosidase (40 μ l Bluo-Gal, 40 mg/ml) und dann (nach 30 min Vortrocknen bei 37°C) 50 oder 100 μ l des Transformationsansatzes ausgestrichen. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag werden nur die weißen Kolonien durch Kolonie-PCR (siehe IV.1.15) und Sequenzierung (siehe IV.1.17) analysiert.

IV.1.10 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind essentielle Werkzeuge für die DNA-Klonierung. Sie dienen der Erzeugung spezifischer überstehender (sticky ends) oder glatter Enden (blunt ends) an Vektoren und DNA-Fragmenten sowie zur analytischen Spaltung von Plasmiden. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind vom Typ II und hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA in ihren meist spezifischen Erkennungssequenzen, die kurze invertierte Sequenzmotive (Palindrome) von etwa 4 bis 8 Basenpaaren Länge sind. Die enzymatischen Spaltreaktionen werden unter den von den Herstellern (meist New England Biolabs) angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Spaltprodukte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe IV.1.6) überprüft und durch Gelelektion (siehe IV.1.8) oder mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) (siehe VI.1.7) gereinigt.

IV.1.11 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden nach einer Restriktionshydrolyse dient einer erfolgreicherer Klonierung. Insbesondere wenn ein Vektor für eine Klonierung mit nur einem Restriktionsenzym hydrolysiert wurde, sind die beiden Enden kompatibel und können leicht wieder miteinander ligieren. Durch Dephosphorylierung der Vektor-DNA an ihren 5'-Enden mit einer alkalischen Phosphatase wird die Religationsrate stark vermindert, da die für die Ligation nötigen Phosphatreste entfernt wurden. Eine Ligation ist danach nur noch mit Fragmenten, die ein 5'-Phosphatrest tragen, möglich.

Die Dephosphorylierung erfolgt direkt nach der Restriktionshydrolyse mit dem Restriktionsansatz, der mit SAP (Shrimp alkaline phosphatase, Promega) (0,5 U pro µg DNA) 30 min bei 37°C in SAP-Puffer inkubiert wird. Anschließend wird die DNA mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) (siehe VI.1.7) gereinigt.

IV.1.12 Herstellung von glatten Enden

Manchmal ist es nicht möglich Restriktionsenzyme zu finden, die sowohl im Vektor, als auch im Fragment nur einmal schneiden. Alternativ werden in solchen Fällen überhängende Enden nach einer Restriktionshydrolyse mit einer Polymerase aufgefüllt, so dass glatte Enden entstehen, über die kloniert werden kann. Als Enzym dient hier das Klenow Fragment (das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*), welches die 5'-Überhänge auffüllt und mit Hilfe seiner 3'-5'-Exonucleaseaktivität die 3'-Überhänge hydrolysiert.

Für die Reaktion werden zum Restriktionsansatz 1 µl 10 mM dNTPs und 10 U DNA Polymerase I Klenow Fragment hinzugefügt, sowie gegebenenfalls BSA, falls dieses nicht schon für die Restriktion hinzugegeben wurde. Die Reaktion erfolgt für 15 min bei Raumtemperatur und wird dann durch Inaktivierung des Enzyms bei 75°C für 20 min beendet.

IV.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wird die DNA-Ligase des T4-Phagen verwendet. Die Ligase katalysiert in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der DNA. So können entweder glatte Enden oder überhängende Enden, die mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, ligiert werden.

Im Ligationsansatz wird das Fragment in etwa 5fachem Überschuss zum Vektor zugegeben. Die einzusetzenden DNA-Mengen können über folgende Formel ermittelt werden:

$$m_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \text{Verhältnis}^{\text{Insert}/\text{Vektor}} \times (m_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{bp}_{\text{Insert}}) / \text{bp}_{\text{Vektor}}$$

m = Masse

Es werden 10 µl Ligationsansätze mit 50 bis 100 ng Vektor, einer entsprechenden Menge Insert, 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 0,7 µl T4-Ligase (entspricht 280 U) sowie ein Kontrollansatz ohne Insert für 2 bis 4 h bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht inkubiert. Danach wird jeweils der ganze Ansatz in kompetente Bakterien transformiert (siehe IV.1.14).

IV.1.14 Transformation von *E. coli*

Für das Einschleusen exogener DNA in ein Bakterium muss dieses zuvor einer speziellen Behandlung mit TSS-Lösung unterzogen werden. Das Vermögen der behandelten Bakterien fremde DNA aufzunehmen bezeichnet man als Kompetenz. Zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen, welche bei – 80°C gelagert werden, werden diese schonend auf Eis aufgetaut. Neunzig Mikroliter kompetente Bakterien werden dann mit 10 µl Ligationsansatz oder anderer zu transformierender Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C, wonach der Ansatz wieder kurze Zeit auf Eis abgekühlt wird. Dann werden 900 µl LB-Medium zu dem Transformationsansatz pipettiert und man lässt die Zellsuspension bei 37°C 30 bis 60 min unter Schütteln inkubieren. Hundert Mikroliter dieser Zellsuspension werden dann auf einer LB-Agar-Platte mit den entsprechenden Antibiotika (Plasmid- und Bakterienstamm-spezifisch) unter sterilen Bedingungen ausgestrichen. Die Bakterien der restlichen 900 µl werden durch Zentrifugation für 2 min bei 5500 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird bis auf ein Restvolumen von ungefähr 100 µl verworfen und die Zellen darin resuspendiert. Diese Zellsuspension wird dann ebenfalls auf einer LB-Agar-Platte mit den entsprechenden Antibiotika unter sterilen Bedingungen ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgt über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank. Aufgrund des im transformierten Plasmid enthaltenen Resistenzgens können auf den Agar-Platten nur die Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben.

IV.1.15 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR (auch Fast-PCR genannt) wird die Vervielfältigung einer DNA-Sequenz dazu genutzt, die Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor (siehe IV.1.13) und

dessen Inkorporation in einem Bakterien-Klon nach Transformation (siehe IV.1.14) zu überprüfen. Als Primer dienen hier die das DNA-Fragment flankierenden Oligonukleotide, die auch schon zur Herstellung des Fragments zum Einsatz kamen. Als Template wird ein Klon von der Kulturplatte verwendet. Im Falle einer erfolgreichen Klonierung sollte die PCR ein Produkt mit der Länge des Fragmentes liefern. Bei fehlgeschlagener Klonierung kann ein solches Produkt nicht entstehen.

Bei der Kolonie-PCR wird ein Einzelklon mit der Pipettenspitze gepickt und in einem 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß abgestreift. Zum Animpfen einer Mini-Kultur wird die Pipettenspitze dann in ein Reagenzglas mit 5 ml Medium gegeben und die Kultur etwa 6 h bei 37°C geschüttelt. Zu dem Klonabstrich im Reaktionsgefäß werden die entsprechenden Primer, dNTPs, 10 x *Taq*-Puffer, gegebenenfalls Q-Solution und *Taq*-Polymerase gegeben. Für die PCR wird dann das gleiche Programm wie für die Fragmentherstellung, unter Umständen mit weniger Zyklen, verwendet. Das Produkt wird mittels Gelelektrophorese (siehe IV.1.6) analysiert und positive Klone können identifiziert werden.

IV.1.16 Herstellung von Glycerolkulturen

Soll von einem als positiv bestätigten Klon eine Glycerolkultur hergestellt werden, so wird das gewünschte Plasmid erneut in TG1-Zellen transformiert, wobei anschließend alle Bakterien auf einer Platte ausgestrichen werden. Die über Nacht bei 37°C gewachsenen Kolonien werden in 1 ml LB-Ampicillin-Medium resuspendiert und 500 µl davon zusammen mit 500 µl 100% Glycerol in ein Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Die Glycerolkultur wird dann bei – 80°C gelagert.

IV.1.17 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA basiert auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) und wird in dieser Arbeit mit dem „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wird hierbei von einer thermostabilen DNA-Polymerase unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotiden mittels PCR amplifiziert. Die Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) haben basenspezifische Fluoreszenzmarkierungen und führen aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Strangabbruch. Sie sind für die PCR mit normalen Desoxyribonukleotiden im Verhältnis von 1 zu 200 gemischt. Der Startpunkt der Polymerase und somit der Sequenzierung wird durch einen zugegebenen

fragmentspezifischen Primer definiert. So entstehen in der PCR DNA-Fragmente, die sich in ihrer Länge unterscheiden und jeweils mit einer fluoreszierenden Base enden. Durch Größenauftrennung der gebildeten DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese kann dann die Basensequenz anhand der Fluoreszenzmarkierung ermittelt werden.

Für die Sequenzier-PCR wird ein Terminator-Mix des Sequenzier-Kits eingesetzt, in dem die Polymerase AmpliTaq[®]FS, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs schon enthalten sind.

Ansatz für eine Sequenzier-PCR:

Reagenzien	Volumen [µl]
DNA-Template	1 bis 5
Terminator Mix	4
Primer (3,5 µM)	1
dH ₂ O	auf 10

Sequenzierprogramm:

30 sec	96°C	Denaturierung	} 25x
30 sec	96°C	Denaturierung	
15 sec	50°C	Annealing	
4 min	60°C	Elongation	

Nach Abschluss der PCR-Reaktion muss die amplifizierte DNA zur Reinigung von nicht eingebauten ddNTPs und Salzen gefällt werden. Hierzu werden zum PCR-Ansatz 90 µl dH₂O, 1 µl Dextran Blau, 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl absoluter Ethanol gegeben. Nach vortexen wird die DNA durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge gefällt. Zur Entfernung von Acetatsalzen wird das Präzipitat dann noch zweimal mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wird die gefällte DNA an der Luft getrocknet. Zur Sequenzierung wird die DNA in Formamid aufgenommen und nach Denaturierung auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Von dort erfolgt die Analyse der DNA automatisch durch einen Sequenzer der Firma Applied Biosystems (Modell: 3100 Genetic Analyser). Die elektro-phoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt in 50 cm langen Kapillaren. Sobald die DNA-Fragmente das Detektionsfenster am Ende der Kapillare erreichen, werden sie mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt und diese über eine CCD-Kamera detektiert. Die Fluoreszenzdaten werden von einer Software gelesen, interpretiert und als Elektropherogramm ausgegeben. Die Arbeitsschritte vom Lösen des gefällten DNA-Präzipitats bis zur Erstellung des Elektropherogramms werden von der zentralen Einrichtung „Biotechnologie“ des MPI Dortmund durchgeführt.

VI.1.18 RNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA nach dem Molekulargewicht wird eine RNA-Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Um die Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren, wird den RNA-Proben Formamid und Formaldehyd beigefügt. Das Formamid zerstört dabei die Basenpaarung der RNA und das Formaldehyd bildet mit den Aminogruppen der Basen Adenin, Guanin und Cytosin Schiffsbasen, wodurch diese keine Wasserstoffbrücken mehr ausbilden können. Zusätzlich wird auch der Agarosegellösung Formaldehyd beigefügt. Um einer Degradation der RNA durch RNasen vorzubeugen, werden alle Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und alle Geräte müssen RNase-frei sein.

Jeweils 10 µg der RNA-Proben werden mit 15 µl RNA-Mix, welcher das Formamid und Formaldehyd enthält, versetzt und 5 min bei 65°C denaturiert. Danach werden die Proben auf Eis abgekühlt und dazu jeweils 2 µl RNA-Auftragspuffer, der 5 % Ethidiumbromid enthält, gegeben. Zusammen mit einem Längenstandard werden die Proben auf das 1,2%ige Agarosegel in 1 x MOPS-Puffer (mit 0,66 M Formaldehyd) in einer horizontalen Gelkammer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für 3 bis 5 h mit 1 x MOPS als Laufpuffer bei einer Spannung von 50 V, wobei die Kammer in einem Eisbad unter dem Abzug steht. Nach dem Lauf werden die RNA-Banden durch das in die RNA interkalierende Ethidiumbromid bei 312 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Gelscanner (Bioprofil 5.0) dokumentiert.

IV.1.19 Northern Blot

Unter *Blotting* versteht man den Transfer von Makromolekülen aus einem Gel auf eine Membran. Der Transfer von zuvor elektrophoretisch aufgetrennter RNA wird Northern Blot genannt. Der Name entstand in Anlehnung an die von Ed M. Southern 1975 entwickelte Methode DNA auf eine Membran zu transferieren, dem Southern Blot.

Für den Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wird in dieser Arbeit die Kapillarblot-Methode verwendet, bei der die Nukleinsäuren durch Kapillarkräfte auf die Membran übertragen werden, indem der Blot-Puffer durch das Gel und die Membran hindurch von einer Schicht Papiertüchern angesaugt wird.

Für den Transfer der RNA wird nach der RNA-Gelelektrophorese (siehe IV.1.18) zunächst das Formaldehyd entfernt, indem das Gel 15 min in DEPC-H₂O äquilibriert und anschließend 15 min in 50 mM Natronlauge geschwenkt wird. Durch die Natronlauge wird die RNA zudem partiell hydrolysiert, wodurch sie sich leichter blotten lässt. Dann wird das RNA-Gel etwa 10

min in 10 x SSC (Blot-Puffer) geschwenkt. Für den RNA-Transfer wird nun ein in Blot-Puffer getränktes langes, rechteckiges Filterpapier über ein Blot-Brett gelegt, so dass die beiden kurzen Enden im Transfer-Puffer einer darunter liegenden Wanne hängen. Auf dieses Filterpapier wird ein ebenfalls in Blot-Puffer getränktes Filterpapier in der Größe des Gels gelegt und darauf dann das RNA-Gel plaziert. Die Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech) wird nun luftblasenfrei auf das Gel gelegt und darauf wieder zwei in Puffer getränkte Filterpapiere. Jetzt wird eine dicke Lage trockener Papiertücher und darauf ein Gewicht auf den Stapel gelegt. Der Blot-Vorgang dauert nun etwa 15 bis 18 Stunden, danach wird die Membran bei 90°C für ein bis zwei Stunden gebacken und dann für 5 min mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die RNA auf der Nylonmembran fixiert wird. Die Membran kann dann bei 4°C bis zur Hybridisierung (siehe IV.1.21) aufbewahrt werden.

IV.1.20 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Zum Aufspüren einer bestimmten mRNA nach dem Northern Blot (siehe IV.1.19) wird eine detektierbare Sonde benötigt, mit der die entsprechende mRNA auf der Nylonmembran hybridisieren kann. In dieser Arbeit werden dafür radioaktiv markierte DNA-Fragmente für die sequenzspezifische Hybridisierung eingesetzt. Die Sensitivität dieser Nachweismethode ist sehr hoch. Dazu wird die Sonde mit α [³²P] dCTP markiert, wofür das „Prime-a-Gene® Labeling System“ (Promega) verwendet wird. Hierbei werden zu einer denaturierten, also einzelsträngigen Template-DNA ein Gemisch von verschiedenen Hexanukleotiden (random primers) gegeben, die nach Hybridisierung mit dem Matrizenstrang durch das Klenow Fragment der DNA-Polymerase I verlängert werden. Es entstehen dabei verschiedene Teilfragmente der Template-DNA, in die anstelle von dCTP radioaktives α [³²P] dCTP eingebaut ist.

Für den Ansatz werden 40 ng des durch PCR hergestellten DNA-Fragments zunächst 2 min bei 96°C denaturiert und anschließend die nun einzelsträngige DNA auf Eis gestellt. Dann wird folgender Ansatz zusammen pipettiert:

Markierungs-Ansatz:

Reagenzien	Volumen [μ l]
5 x Puffer	10
dNTPs (-dCTP)	2
denaturiertes DNA-Template	40 ng
Nuklease-freies BSA	2
α [32 P] dCTP	5
DNA-Polymerase I, Klenow Fragment	1
dH ₂ O	auf 50

Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Reaktion durch Inkubation bei 75°C für 15 min beendet. Danach wird die markierte Sonde mit dem „DyeEx Spin Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers über eine Gelfiltrationssäule, in der die Nukleotide zurück bleiben, gereinigt.

Radioaktivitätsbestimmung

Vor und nach Reinigung der radioaktiv markierten Sonde werden jeweils 1 μ l vom Ansatz abgenommen und 1:100 mit dH₂O verdünnt, um die spezifische Aktivität der Sonde zu bestimmen. Von den Verdünnungen werden dann 3 μ l zu 3 ml Szintillationslösung gegeben und die Strahlung der Proben im Szintillationszähler (LS 6500, Beckmann) ermittelt. Dieser bestimmt die Zahl oder Energie von radioaktiver Strahlung, indem er die von einem geeigneten Szintillator ausgesendeten Lichtblitze mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert. Szintillatoren sind Leuchtstoffe, bei denen die radioaktive Strahlung (hier die β -Strahlung) kurze Lichtblitze (Szintillationen) hervorruft.

IV.1.21 Hybridisierung eines Northern Blots

Die durch einen Northern Blot auf eine Nylonmembran transferierte RNA (siehe IV.1.19) soll mit einer der radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe IV.1.20) hybridisieren, das heißt komplementäre Stränge sollen sich aneinander anlagern. Dazu müssen zunächst freie Bindungsstellen durch Prähybridisierung der Membran für 30 min bei 68°C mit ExpressHyb (Clontech) blockiert werden. Anschließend wird die Membran 2 h mit der gereinigten und denaturierten Sonde in 5 bis 7 ml ExpressHyb unter Rotieren im Hybridisierungs-Ofen (Hybaid Mini 10, MWG-Biotech) bei 68°C inkubiert. Nach der Hybridisierung muss die Membran zuerst 3 mal 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % SDS unter Schwenken bei Raumtemperatur

gewaschen werden und dann 2 mal 15 min in 0,1 % SSC, 0,1 % SDS bei 60,5°C geschwenkt werden. Anschließend wird die Membran in eine Folie eingeschweißt und unter Lichtausschluss ein Film (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) aufgelegt. Die Exposition mit dem Film erfolgt zwischen 2 h und 4 Tagen bei – 80°C. Bei sehr schwacher Strahlung wird mit Hilfe des „Molecular Imaging“ detektiert.

Detektion

Die für die Autoradiographie verwendeten Röntgenfilme bestehen aus einer mit Silberbromidkristallen beschichteten Plastikfolie. Licht, β - oder γ -Strahlung können diese Kristalle in einen aktivierten Zustand überführen. Durch Entwicklung des Films werden die aktivierten Kristalle dann zu schwarzen Silberkörnern reduziert. Da der aktivierte Zustand relativ instabil ist, wird auf den Film zusätzlich eine Verstärkerfolie (Hyperscreen, Amersham Biosciences) gelegt und der Film bei – 80°C exponiert. Durch die tiefe Temperatur wird die Stabilität des aktivierten Zustands erhöht, und durch die Folie wird die Strahlung absorbiert und in Form von Licht wieder abgegeben, welches dann wieder auf den Film trifft und dort die Kristalle anregen kann.

Eine empfindlichere Detektionsmethode ist das „Molecular Imaging“. Dazu wird die hybridisierte Membran unter Lichtausschluss für 1 h bis 3 Tage mit einem Schirm (Fujifilm Imaging Plate BAS-MS), der mit Bariumfluorohalogenid-Phosphor Kristallen (BaF(Br,I):Eu-Kristallen) beschichtet ist, inkubiert. Durch die radioaktive Strahlung werden die Kristalle in einen angeregten, stabilen Zustand ($\text{Eu} \rightarrow \text{Eu}^{2+}$) versetzt. Nach Exposition mit der hybridisierten Membran wird der Schirm mit einem Laserstrahl (He-Ne-Laser mit 633 nm) abgetastet, wodurch die angeregten Kristalle in einen noch energiereicheren, aber instabilen Zustand ($\text{Eu}^{2+} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$) überführt werden. Daraufhin fallen die Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurück und geben dabei die Energiedifferenz in Form von Licht der Wellenlänge 400 nm ab, das dann gemessen werden kann. Dieser Prozess wird auch als Photo-stimulierte Lumineszenz bezeichnet. Die Daten des Abbilds von der hybridisierten Membran werden mit einer Software (AIDA, Raytest) erfasst und ausgewertet.

IV.1.22 Entfernen der hybridisierten Sonde von einer Membran („Strippen“)

Mit Hilfe des „Strippens“ können die Northern Blot Membranen mehrmals für Hybridisierungen eingesetzt werden, indem die Sonde von der Membran wieder entfernt wird. Dazu wird auf die Membran eine gerade noch kochende 0,5%ige SDS-Lösung gegossen und die Membran darin solange geschwenkt, bis die Lösung wieder Raumtemperatur erreicht hat. Die Membran kann dann wieder eingeschweißt, bei – 20°C gelagert und nochmals verwendet werden.

IV.2 Zellbiologische Methoden

IV.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der verschiedenen eukaryotischen Zelllinien erfolgt je nach Bedarf in 75 cm² oder 175 cm² Kulturflaschen im CO₂-Inkubator (7,5 % CO₂) bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Die Kulturmedien und Zusätze für die verschiedenen Zelllinien sind in Tabelle III.3 aufgeführt. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen wird dem Medium Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) beigemischt. Bei den stabil transfizierten Zellen wird dem Medium zusätzlich Hygromycin (100 µg/ml) zugefügt, um einen Selektionsdruck zu erzeugen.

Die verschiedenen Zelllinien können als Zellsuspension in 10 % DMSO (v/v) in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Zur Rekultivierung wird die Suspension in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut und dann unter der sterilen Werkbank in eine Kulturflasche mit 0,2 ml Medium pro cm² überführt. Am darauf folgenden Tag wird das Medium gewechselt, um das toxische DMSO und nicht angeheftete Zellen zu entfernen.

Das Wachstum der Zellen wird regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sind die Zellen nahezu konfluent gewachsen, müssen sie passagiert, d.h. verdünnt und in ein neues Kulturgefäß überführt werden. Die Verdünnung richtet sich dabei danach, wie schnell wieder konfluente Zellen benötigt werden. Zur Passage wird das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 oder 2,5 ml Trypsin-EDTA (je nach Größe der Kulturflasche) bis zu deren Ablösung vom Boden im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 9 bzw. 22,5 ml frischem Medium resuspendiert und aneinanderhaftende Zellen durch pipettieren vereinzelt. Durch Zugabe des Mediums, welches FCS und die darin vorhandenen

Protease-Inhibitoren enthält, wird auch das Trypsin inaktiviert. Abschließend wird ein Teil der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt. Für die verschiedenen Experimente kann ein Teil der Zellen für Immunfärbungen auf Deckgläschen in 4 cm Gewebekulturschalen, für das Kultivieren von Zellen für Zelllysate oder der Isolierung von RNA in 10 cm Gewebekulturschalen ausgesät werden.

IV.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl abgelöster Zellen im Medium wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dabei wird ein Tropfen Medium unter das Deckgläschen der Zählkammer gegeben und die Anzahl der Zellen im Bereich der 16 größeren äußeren Quadrate gezählt. Dieser Bereich ist viermal identisch auf einer Hälfte der Zählkammer vorhanden, wodurch die Zahl der Zellen viermal ermittelt werden kann und ein Mittelwert gebildet wird. Über das gegebene Volumen dieses Bereichs kann die Zellzahl im Medium durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 [Zellen / ml] errechnet werden.

IV.2.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eine tierische Zelle. Wird sie dabei in die chromosomale DNA integriert, und bleibt über viele Passagen hinweg erhalten, so spricht man von einer stabilen Transfektion. Werden die Gene der Fremd-DNA jedoch nur einige Tage exprimiert, ist die Transfektion transient.

In dieser Arbeit wurde die Calciumphosphat-Methode (Jordan *et al.*, 1996) für transiente Transfektionen verwendet, bei welcher die DNA mit Calciumchlorid und einem phosphathaltigen Puffer (HEBES) gemischt wird. Die sich dabei bildenden DNA-Calciumphosphat-Kristalle werden von der Zelle durch Endocytose aufgenommen.

Die Transfektionen erfolgten in dieser Arbeit zur Untersuchung des MGF-Promotors und des Proliferin-Promotors mit Hilfe eines Reporter-Gen-Assays. Je nach Zelllinie wurde entsprechend ihrer Zellteilungsgeschwindigkeit eine definierte Anzahl von Zellen in 6 cm Gewebekulturschalen mit 4 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden unter den oben genannten Bedingungen kultiviert und am nächsten Tag mit 10 µg DNA je Schale transfiziert, wobei je Konstrukt ein Doppelansatz erfolgte:

Transfektion von RK13-Zellen

Jeweils $5,5 \times 10^5$ Zellen pro Schale.

Zusammensetzung der DNA-Transfektionslösung zur Untersuchung der Promotoraktivität:

zu untersuchender Promotor in pKS+/Ltk80-luc	3 µg
pCI-neo oder β-Catenin S33Y in pCI-neo	3 µg
pEQ176 (β-Galactosidase)	0,5 µg
pBS SK+	auf 10 µg DNA
2,5 M CaCl ₂	20 µl
dH ₂ O	auf 200 µl

Zusammensetzung der DNA-Transfektionslösung zur Untersuchung der Promotoraktivität unter Einfluss von Lithium:

zu untersuchender Promotor in pKS+/Ltk80-luc	3 µg
pEQ176 (β-Galactosidase)	0,5 µg
pBS SK+	auf 10 µg DNA
2,5 M CaCl ₂	20 µl
dH ₂ O	auf 200 µl

Transfektion von HEK293-Zellen

Jeweils 5×10^5 Zellen pro Schale.

Zusammensetzung der DNA-Transfektionslösung zur Untersuchung der Promotoraktivität:

zu untersuchender Promotor in pKS+/Ltk80-luc	3 µg
pCI-neo oder β-Catenin S33Y in pCI-neo	3 µg
pEQ176 (β-Galactosidase)	0,5 µg
pBS SK+	auf 10 µg DNA
2,5 M CaCl ₂	20 µl
dH ₂ O	auf 200 µl

Transfektion von SW480-Zellen

Jeweils $1,1 \times 10^6$ Zellen pro Schale.

Zusammensetzung der DNA-Transfektionslösung zur Untersuchung der Promotoraktivität:

zu untersuchender Promotor in pKS+/Ltk80-luc	3 µg
pCMV oder APC in pCMV	3 µg
pEQ176 (β-Galactosidase)	0,5 µg
pBS SK+	auf 10 µg DNA
2,5 M CaCl ₂	20 µl
dH ₂ O	auf 200 µl

Zu jeweils 200 µl 2 x HEBES-Puffer wird die DNA-Lösung unter sterilen Bedingungen hinzugegeben und etwa 20 s geschüttelt. Nach 2 min wird das DNA-Calciumphosphat-Präzipitat auf die Zellen gegeben und die Schale vorsichtig geschwenkt. Nach 5 Stunden Inkubation der Transfektionsansätze bei 37°C, 7,5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und erhalten anschließend frisches Medium. Die Zellen werden zwei Tage unter den eben genannten Bedingungen weiter kultiviert und dann für den Reporteragen-Assay lysiert.

Bei den Transfektionsansätzen, in denen der Einfluss von Lithium auf die Promotoraktivität untersucht werden soll, wird 24 Stunden nach der Transfektion das Medium abgesaugt und durch Medium mit 20 mM LiCl (steril filtriert) oder 20 mM KCl (steril filtriert) ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen ebenfalls lysiert.

IV.2.4 Reporteragen-Assay

Um Promotoren *in vivo* in Säugerzellen zu analysieren kann das zu untersuchende Promotorelement vor ein sogenanntes Reporteragen kloniert werden. So steht die Expression des Reporteragenprodukts unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors. Die Aktivität des Promotors kann dann biochemisch über die Syntheserate des Reporteragens nachgewiesen werden. Es ist also sinnvoll Reporterogene zu verwenden, deren Genprodukte sich leicht biochemisch detektieren lassen. Hier dient das Luziferase-Gen als Reporter, so dass die Promotoraktivität über die Luziferase-Aktivität ermittelt werden kann.

Die Aktivität des MGF-Promotors, des mutierten MGF-Promotors und des Proliferin-Promotors wurde mit Hilfe des Reportergen-Assays in RK13-, HEK293- und SW480-Zellen untersucht.

Die wie unter IV.2.3 beschriebenen transfizierten Zellen werden nach 48 Stunden einmal mit PBS gewaschen und dann jeweils für 10 min in 300 µl Zell-Lysis-Puffer inkubiert. Das Zelllysate wird aus der Gewebeschale heraus geschabt, in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Die Lysate werden anschließend für Luziferase- und β -Galactosidase-Messungen eingesetzt.

Luziferase-Assay

Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit wird das Luziferase-Gen aus Glühwürmchen (*Photinus pyralis*; firefly) hier als Reportergen eingesetzt. Das Luziferase-Enzym wandelt D-Luziferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} in Oxyluziferin und CO_2 um. Dabei wird Licht einer Wellenlänge von 562 nm emittiert. In den Zelllysaten der transfizierten Zellen kann also die Aktivität des Enzyms durch eine Biolumineszenzreaktion in einem Luminometer gemessen werden. Dabei ist die Lichtemission proportional zur Luziferase-Menge im Zelllysate, und man kann indirekt auf die Transkriptionsrate des Reportergens und damit auf die Aktivität des zu untersuchenden Promotors schließen.

Die Aktivität der Luziferase wird in jedem Ansatz mit einer Doppelbestimmung ermittelt. Dafür werden 20 µl des Zelllysats in ein 5 ml Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt) vorgelegt. Automatisch werden im Luminometer 100 µl Luziferase-Assay-Reagenz, welches Luziferin, Mg^{2+} und ATP enthält, dazu injiziert. Die entstehende Lumineszenz wird in den folgenden 15 s gemessen.

β -Galactosidase-Assay

Die β -Galactosidase-Aktivität dient in dieser Arbeit als interner Standard für den Luziferase-Nachweis, um die Signifikanz von Schwankungen der Luziferase-Aktivität festzustellen. Dazu wurde ein entsprechendes Reportergenkonstrukt (pEQ176) kotransfiziert, in welchem das β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. Die Enzymaktivität wird kolorimetrisch durch die Umsetzung von nicht-physiologischem ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-galactosid) nachgewiesen. Mit Hilfe der β -Galactosidase-Werte werden dann die Luziferase-Werte normiert.

Auch die β -Galactosidase-Aktivität wird mit einer Doppelbestimmung ermittelt. Dafür werden jeweils 20 μ l der Zellysate in die Löcher einer 96-Mikrotiterplatte (Becton Dickinson) gegeben und bei 4°C 200 μ l Z-Puffer hinzupipettiert. Je nach Zelllinie wird nach 10 min bis 3 Stunden die Absorption bei 405 nm in einem ELISA-Photometer (MR 5000, Dynatech) gemessen und in einigen Zeitabständen wiederholt.

IV.2.5 Immuncytochemische Färbung eukaryotischer Zellen

Mit Hilfe dieser Methode kann die Lokalisation bestimmter Proteine innerhalb einer Zelle untersucht werden. Zur immuncytochemischen Markierung von Zellen werden diese auf Deckgläschen fixiert und mit einem gegen das interessierende Protein gerichteten Erstantikörper behandelt. Anschließend werden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper inkubiert, der den ersten Antikörper spezifisch erkennt. Zusätzlich werden die Zellen mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) behandelt, welches die Zellkerne durch spezifische DNA-Bindung markiert.

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen werden mit PBS gewaschen und zur Fixierung mit einem 1:1 Gemisch Methanol/Aceton für 10 min bei – 20°C inkubiert. Danach wird das Gemisch abgenommen, und die Zellen auf den Deckgläschen werden bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Verhinderung von unspezifischen Antikörper-Bindungen wird mit einer 2%igen BSA-Lösung in PBS für 10 min blockiert. Danach werden die Zellen für eine Stunde mit dem mit der Blockierlösung verdünnten Erstantikörper inkubiert. Die Kontrolle wird eine Stunde in der reinen Blockierlösung inkubiert. Darauf folgt ein zweimaliges Waschen mit PBS. Für die immuncytochemische Markierung wird nun der Cy3 (Indocarbocyanin)-gekoppelte Zweitantikörper mit der Blockierlösung verdünnt (1:100) und für eine Stunde unter Lichtausschluss auf die Zellen gegeben. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen 10 min mit DAPI (0,05 μ g/ml in PBS) inkubiert. Danach werden die Zellen wieder mit PBS gewaschen. Jetzt werden die Zellen auf den Deckgläschen mit Moviol auf einem Objektträger eingedeckt und können unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot von Zeiss, Oberkochen) analysiert werden. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Tabelle aufgeführt. Die Dokumentation erfolgt durch digitale Fotografie und Verwendung einer Software (AxioVision 2.0).

Fluoreszenzmarker	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Cy3	553 nm	575 nm
DAPI	360 nm	450 nm

Tabelle IV.1: Anregungs und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen

IV.2.6 Zelllysate aus eukaryotischen Zellen

Für die Herstellung von Zelllysaten werden die in vier bis fünf 10 cm Gewebekulturschalen kultivierten Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und die Zellsuspension in ein 50 ml Probenröhrchen überführt. Nach Sedimentation der Zellen bei 400 g für 3 min werden sie einmal mit 10 ml PBS gewaschen und wieder sedimentiert. Das Zellsediment wird in 1 ml PBS + Protease-Inhibitoren (Complete, EDTA-free, Roche) resuspendiert und die Zellen mit Ultraschall (Branson Sonifier 450) auf Eis aufgeschlossen. Die lysierten Zellen werden 10 min bei 13000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Vom Überstand wird die Proteinkonzentration ermittelt. Damit für Western Blot Analysen in allen Proben die gleiche Proteinkonzentration vorliegt, werden sie entsprechend mit PBS verdünnt. Anschließend wird das Lysat mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Probe wird bei 95°C für 5 min denaturiert und kann anschließend für die Gelelektrophorese eingesetzt werden.

IV.2.7 Isolierung von Medien-Proteinen eukaryotischer Zellen

Zur Isolierung von Proteinen, die von den Zellen in ihr Kulturmedium abgegeben wurden, werden die eukaryotischen Zelllinien in 175 cm² Kulturflaschen kultiviert. Die Zellen erhalten 24 Stunden vor der Medium-Entnahme ein Medium ohne FCS, denn die Anwesenheit von Serumproteinen würde die nachfolgenden Analysen stören.

Das Kulturmedium (ca. 25 ml) wird abgenommen, mit 200 µl Protease-Inhibitoren (Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics) versetzt und 30 min bei 7000 g und 4°C zentrifugiert, um nicht adhärente Zellen aus dem Medium zu entfernen. Der Überstand wird in Amicon Ultra 10,000 MWCO Röhrchen (Millipore) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa bei 4000 rpm und 4°C auf etwa 500 µl eingengt. Von den Medienproteinen wird die Konzentration ermittelt. Damit für Western Blot Analysen in allen Proben die gleiche Proteinkonzentration vorliegt, werden sie entsprechend mit Medium verdünnt. Anschließend werden die Mediumproteine mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Probe wird bei 95°C für 5 min denaturiert und kann anschließend für die Gelelektrophorese eingesetzt werden.

IV.3 Proteinbiochemische Methoden

IV.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration einer Lösung erfolgt durch Farbreaktion mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 in Phosphorsäure (Bradford, 1976). Insbesondere durch die Interaktion mit den Seitenketten von Arginin, aber auch von Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin (Compton & Jones, 1985) wird der Farbstoff in seiner anionischen Form stabilisiert. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (rot-braun) nach 595 nm (blau). Die Proteinkonzentration wird anhand einer Kalibriergeraden bestimmt, die mit einer BSA- (Rinderserumalbumin) Lösung bekannter Konzentration erstellt wird.

Zu einem halben Milliliter der gebrauchsfertigen Bradford-Lösung werden 1 bis 5 µl der zu untersuchenden Proteinlösung pipettiert und nach 5 min die Extinktion bei 595 nm gegen die Bradford-Lösung mit Puffer ohne Protein gemessen. Nur Extinktionswerte zwischen 0,2 und 0,8 liegen im linearen Bereich und werden anhand der Kalibrierung ausgewertet.

IV.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wird eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Shapiro *et al.*, 1967) mit diskontinuierlichem Puffersystem verwendet.

Die durch den Probenpuffer garantierten denaturierenden Bedingungen bewirken, dass sämtliche Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbunden werden, indem Quartärstrukturen der Proteine aufgebrochen werden. Durch eine Behandlung der Proben bei 95°C für 5 min werden zudem Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung von Wasserstoffbrücken und Streckung der Moleküle aufgelöst. Während das im Puffer enthaltene Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) an die Proteine bindet und die Aufhebung der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen erzwingt, bewirkt β-Mercaptoethanol die reduktive Spaltung der Disulfidbindungen. Das negativ geladene SDS hat zudem die Eigenschaft in konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis an Proteine zu binden (1,4 g SDS pro g Protein), wodurch es zur Bildung von negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen kommt. Diese hochmolekularen Anionenkomplexe zeichnen sich dadurch aus, dass bei definierter Gel-Porengröße die relativen Mobilitäten in einem bestimmten Bereich (dieser ist abhängig von der Gelkonzentration) linear von dem Logarithmus des Molekulargewichtes der Proteine

abhängen. Trägt man ein Proteingemisch auf ein solches Gel auf, werden die Eigenladungen der Proteine durch die negativ geladenen Kopfgruppen des SDS maskiert, wodurch sie alle zur Anode wandern und dabei nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

Zur Schärfung der Proteinbanden wird dem Trenngel ein grobporigeres Sammelgel vorgeschaltet (sog. diskontinuierliche SDS-PAGE). Das Prinzip der Bandenschärfung beruht dabei auf der Anwesenheit von Folge- und Leitonen in der Probe (Pingoud & Urbanke, 1997). Als Folgeion dient Glycinat, das aufgrund des niedrigeren pH-Werts (pH 6,8 im Sammelgel) im Gleichgewicht mit dem ungeladenen Glycin liegt und demzufolge eine geringe Mobilität aufweist. Als Leition führt Chlorid die Probenfront an. In der Schicht des Folgeions herrscht durch die geringe Konzentration an Ladungsträgern eine hohe lokale Feldstärke, wodurch die SDS-Protein-Micellen beschleunigt werden. Kommen diese in die Schicht des Leitons, so werden sie durch die lokale hohe Ionenstärke und die somit geringe Feldstärke abgebremst. Dadurch konzentrieren sich die SDS-Protein-Komplexe in einem schmalen Streifen dicht hinter den Leitonen. Wird das Trenngel erreicht, können die Folgeionen die SDS-Protein-Komplexe überholen, da nun das Glycin bei dem vorherrschenden höheren pH-Wert (pH 8,6) vollständig dissoziiert vorliegt (als Glycinat). Die Proteinstapel hingegen werden von dem engporigen Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Polyacrylamidgele entstehen durch Kopolymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Hierbei handelt es sich um eine radikalische Kettenreaktion, initiiert durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) als Katalysator.

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele und für die Elektrophorese wurde ein von BioRad entwickeltes System mit vertikalen Gelkammern eingesetzt. Um eine optimale Trennung zu erreichen, richtet sich die Polyacrylamidkonzentration im Trenngel nach dem Molekulargewicht der zu trennenden Proteine. Trenn- und Sammelgel werden entsprechend den Angaben in der Tabelle hergestellt. Die mit Probenpuffer versetzten Proben werden vor dem Auftragen 5 min bei 95°C vollständig denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt dann bei 200 Volt.

Zusammensetzung Trenngel:

	15 %	12,5 %	7,5 %
Acrylamid 30 %	3,75 ml	3,125 ml	1,875 ml
Trenngelpuffer	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml
Wasser	1,875 ml	2,475 ml	3,7 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
APS 10 %	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Zusammensetzung Sammelgel:

Acrylamid 30 %	0,65 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml
Wasser	3,1 ml
TEMED	0,01 ml
APS 10 %	0,1 ml

IV.3.3 Western Blot

Der Transfer von zuvor elektrophoretisch getrennten Proteinen wird Western-Blot genannt (Renart *et al.*, 1979) und erlaubt spezifische Nachweisreaktionen von auf der Membran immobilisierten Proteinen. Im Gegensatz zum Gel, liegen die Proteine auf einer Membran freier vor, und man kann sie leicht anfärben, mit Antikörpern reagieren lassen oder mit Enzymen umsetzen. Die Membranen bestehen aus Nitrocellulose, aus Polyvinylidenfluorid (wie in dieser Arbeit) oder Nylon.

Der Transfer wird nach dem Elektrotblotverfahren in einer Halbtrockenzelle (semi-dry-Apparatur) der Firma Biometra durchgeführt. Auf die Anodenplatte werden zunächst zwei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Die auf Gelgröße geschnittene PVDF-Membran (von Amersham Biosciences) wird zur Aktivierung für 5 min in Methanol getränkt und dann luftblasenfrei auf die Whatmanpapiere gelegt. Auf die Membran wird dann das in Transferpuffer angefeuchtete Gel gelegt und darauf wiederum zwei in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere geschichtet. Die abschließende Kathodenplatte wird während des 30-minütigen Elektrotransfers mit einem Kühlakku bedeckt. Pro cm² Gel wird eine Stromstärke von 5 mA eingestellt. Der Erfolg des Proteintransfers auf die Membran wird durch den SeeBlue Protein-Standard sichtbar, welcher vorgefärbt ist und sich nun statt im Gel auf der Membran befinden sollte.

IV.3.4 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der spezifische Nachweis von Proteinen auf der PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe polyklonaler Antikörper. Dieser primäre Antikörper wird in einem zweiten Schritt von einem sekundären Antikörper, welcher gegen die konstante Domäne der Antikörper des Organismus des primären Antikörpers gerichtet ist, gebunden. An den sekundären Antikörper ist kovalent Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelt, so dass durch die Enzymaktivität der Peroxidase das Vorhandensein des Proteins nachgewiesen werden kann.

Nach dem Proteintransfer auf die Membran müssen alle freien Bindungsstellen durch Inkubation mit einer Blockierlösung, dies ist 5 % Magermilch oder BSA in PBS/T oder TBS/T, eine halbe Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln abgesättigt werden. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper in der jeweiligen Blockierlösung für eine Stunde in einer für den Antikörper speziellen Verdünnung. Die Membran wird danach dreimal für 10 min mit dem verwendeten Puffer (PBS/T oder TBS/T) gewaschen. Dann erfolgt die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper in dem bisher verwendeten Puffer (PBS/T oder TBS/T) für eine weitere Stunde bei leichtem Schwenken. Schließlich wird die Membran erneut dreimal für 10 min mit dem Puffer gewaschen.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wird das ECL Plus Western Blotting Detection Kit von Amersham Biosciences benutzt. Dabei wird ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) mit Wasserstoffperoxid durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Das Reaktionsprodukt befindet sich in einem elektronisch angeregten Zustand, der seine Energie durch Emission von Licht wieder abgibt. Diese Chemilumineszenz wird dabei durch die Anwesenheit von sogenannten Enhancern (Verstärker) noch verstärkt. Das Maximum der Lichtemission liegt bei 428 nm, welche zur Belichtung von Röntgenfilmen benutzt werden kann.

Zur Erzeugung der Lumineszenz wird die Membran nach den Angaben des Herstellers mit dem ECL Chemilumineszenz-Kit behandelt. Danach wird sie vorsichtig abgetupft und in Folie gelegt. Auf diese Folie wird ein Film (Hyperfilm ECL von Amersham Pharmacia Biotech) gelegt und je nach Intensität des Signals entsprechend lange abgedeckt belichtet. Der Film wird in eine Entwicklerlösung getaucht, bis die belichteten Stellen sichtbar werden, mit Wasser gespült, und dann einige Minuten in Fixierer gelegt und abschließend in Wasser gewaschen.

V. Ergebnisse

V.1 Expressionsanalyse von ausgewählten Genen in Mäusezellen mit aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg

Ein Ziel der Arbeit war die Identifizierung von Genen, deren Expression durch den Wnt-Signalweg in Mäusezellen beeinflusst wird. Ausgangspunkt für die Expressionsanalysen waren Daten aus der Arbeitsgruppe von einem DNA-Microarray (GeneChip® Murine Genome U74v2, Affymetrix) (S. Chtarbova, unveröffentlicht), der zur Transkriptionsanalyse durchgeführt wurde. Auf dem Array waren 30000 bekannte Mäusegene und 6000 ESTs (EST = expressed sequence tag) als immobilisierte Oligosonden repräsentiert, die mit fluoreszenzmarkierter cDNA aus C57MG-Wnt-1-Zellen und C57MG-pLNCx-Zellen hybridisiert wurden. Die verwendeten C57MG-Zellen sind Brustepithelzellen der Maus (Vaidya *et al.*, 1978), die mit einem retroviralen Vektor, der Wnt-1 exprimiert, oder dem Leervektor pLNCx stabil infiziert wurden. Letztere Zellen sind die Kontrollzelllinie, in denen kein Wnt-1-Signal vorhanden ist, wohingegen in den C57MG-Wnt-1-Zellen der Wnt-Signalweg aktiviert ist (Shimizu *et al.*, 1997). Die Expressionsmuster der beiden Zelllinien wurden miteinander verglichen und von den so erhaltenen Daten wurden für diese Arbeit verschiedene Gene ausgewählt (siehe Tabelle V.1), die auf dem Chip unterschiedliche Expressionslevel zeigten. Da die Daten eines einzigen DNA-Microarrays nicht signifikant sind, und nur Hinweise auf potentielle Zielgene des Wnt-Signalwegs geben, sollten die Ergebnisse für die ausgewählten Gene mittels Northern Blot-Analyse verifiziert werden.

Für die Expressionsanalysen wurden die Mäusezelllinien verwendet, die auch für den DNA-Microarray genutzt wurden. So wurde die mRNA-Transkriptmenge der ausgewählten Gene zwischen C57MG-Wnt-1-Zellen, in denen der Wnt-1-Signalweg aktiviert ist, mit C57MG-pLNCx-Zellen, in denen der Signalweg inaktiv ist, verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss von Lithium auf die Expression der ausgewählten Gene untersucht, indem C57MG-Zellen 24 h mit 20 mM Lithiumchlorid behandelt wurden. Lithium inhibiert die GSK3 β (Klein *et al.*, 1996), wodurch die Kinase β -Catenin nicht mehr phosphorylieren kann. Da nur phosphoryliertes β -Catenin von β TrCP erkannt wird und dann über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg abgebaut wird, akkumuliert unphosphoryliertes β -Catenin im Zytoplasma und wandert vermehrt in den Zellkern. Dort aktiviert es zusammen mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie die Transkription der Wnt-kontrollierten Zielgene. Als Kontrolle zu den LiCl behandelten Zellen dienten C57MG-Zellen, die 24 h mit 20 mM Kaliumchlorid behandelt wurden, das keinen Einfluss auf den Wnt-Signalweg hat.

Für die Northern Blot-Analysen der Gene wurde die Gesamt-RNA aus den verschiedenen Zelllinien (C57MG-pLNCx, C57MG-Wnt-1, C57MG + KCl, C57MG + LiCl) mit dem „RNeasy Mini Kit“ (siehe IV.1.3) isoliert, und nach Konzentrationsbestimmung (siehe IV.1.4) gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen (siehe IV.1.18) der Größe nach getrennt. Dabei wurden von jeder RNA-Probe genau 10 µg eingesetzt, was durch Färbung der RNA mit Ethidiumbromid und Dokumentation mit einem Gelscanner überprüft wurde. Wenn die RNA intakt war und die Banden der großen (28S) und kleinen (18S) ribosomalen Untereinheit zu sehen waren, die zudem bei allen aufgetragenen Proben etwa gleiche Intensität hatten, wurde das RNA-Gel für einen Northern Blot eingesetzt. Nach dem Transfer der RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran (siehe IV.1.19), wurde diese mit genspezifischen $\alpha^{[32P]}$ dCTP markierten DNA-Sonden hybridisiert (siehe IV.1.21). Die DNA-Templates für die radioaktive Markierung der Sonden wurden mit cDNA-spezifischen Primern mittels PCR aus cDNA (von Mäusezellen) oder durch „one-step“ RT-PCR (siehe IV.1.5.1) aus Gesamt-RNA (von Mäusezellen) hergestellt. Sie hatten eine Länge zwischen 550 und 640 bp.

Bezeichnung	Datenbank-Nr. des Gens vom Chip	relativer Aktivierungsfaktor	Homologie
Gnb1, Exon 12	AI845935	8	98 % (zu gi:11275549)
MGF	M57647	- 2,7	
Lgals8	AA760613	- 3,2	100 % (zu gi:25955478)
Proliferin 1 (plf1)	K02245	- 3,4	
Gbp3	AW047476	- 4,1	99 % (zu gi:17512479)
TIS 11	M58564	- 4,2	
14-3-3 γ	AF058799	- 4,4	
Proliferin 2	K03235	- 4,8	
Mrp/plf3, Exon 1	X16009	- 5,9	
Ramp3	AJ250491	- 13,4	

Tabelle V.1: Ausgewählte Daten des DNA-Microarrays, welcher mit cDNA aus C57MG-Wnt-1- und C57MG-pLNCx-Zellen hybridisiert wurde. Quelle: S. Chtarbova. Gnb1: Guanine nucleotide binding protein beta 1, MGF: Mast cell growth factor, Lgals8: Lectin, galactose binding soluble 8, Gbp3: Guanylate nucleotide binding protein 3, TIS 11: TPA-induced sequencer 11, Mrp/plf3: Mitogen regulated protein / Proliferin 3, Ramp3: Receptor activity modifying protein 3.

V.1.1 Gnb1

Die mRNA Sequenz von Gnb1 (Guanine nucleotide binding protein beta 1 bzw. GTP-binding protein beta 1) ist der auf dem verwendeten DNA-Chip immobilisierten Sequenz AI845935 zu 98 % homolog. Die Hybridisierung dieser Sequenz mit der cDNA aus den C57MG-Wnt-1-Zellen zeigte auf dem DNA-Microarray ein 8fach stärkeres Signal als mit der cDNA der C57MG-pLNCx-Zellen. Es sollte mittels Northern Blot-Hybridisierung mit einer für Gnb1 spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonde überprüft werden, ob die Expression von Gnb1 in den Mäusezellen mit aktiviertem Wnt-Signalweg tatsächlich erhöht ist. Wie in Abbildung V.1 zu sehen ist, lag keine erhöhte Transkriptmenge des aus 3210 Basen bestehenden mRNA-Fragments in den C57MG-Wnt-1-Zellen im Vergleich zu den C57MG-pLNCx-Zellen vor. Ebenso waren keine Unterschiede in der Expression von Gnb1 zwischen den mit KCl und LiCl behandelten Zellen zu detektieren. In den verwendeten C57MG-Zellen hat die Aktivierung des Wnt-Signalwegs folglich keinen Einfluss auf die Transkription von Gnb1.

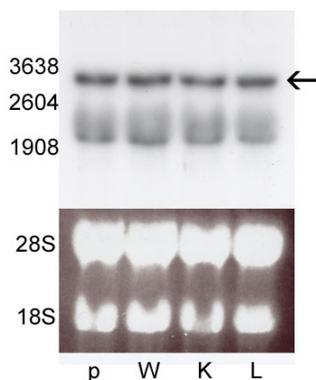


Abb. V.1: Autoradiographische Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Sonde des Gnb1-Gens. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.1.2 MGF

Die Expression von MGF (Mast cell growth factor oder SCF für Stem cell factor) ist nach den Ergebnissen des DNA-Microarrays in den Wnt-aktivierten C57MG-Wnt-1-Zellen 2,7fach geringer als in den Kontrollzellen mit inaktivem Wnt-Signalweg. Diese Daten sollten mit einer MGF spezifischen, radioaktiv markierten Sonde mittels Northern Blot-Hybridisierung überprüft werden (Abbildung V.2). Es war, entgegengesetzt zu den Daten des DNA-Microarrays, eine etwas intensivere Bande in den C57MG-Wnt-1-Zellen zu detektieren. Die mit LiCl behandelten Zellen zeigten wiederum eine etwas schwächere Bande als die mit KCl behandelten Zellen, was der Tendenz des DNA-Chips entsprechen würde.

Aufgrund der schwachen Unterschiede wurde zusätzlich eine Hybridisierung der Membran mit einer β -Actin-Sonde durchgeführt. Die mRNA-Transkriptmenge von β -Actin ist in der Regel konstant und dient daher als interne Kontrolle für die RNA-Beladung des Gels. Nach Vergleich der Bandenintensitäten kann offenbar von keinen signifikanten Unterschieden der MGF-Transkriptmengen gesprochen werden.

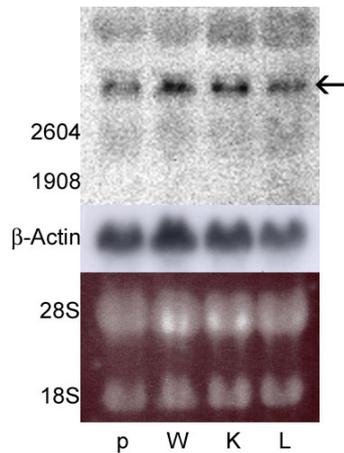


Abb. V.2: Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Sonde des MGF-Gens mittels Phospho-Imaging. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. Im mittleren Bild ist zur weiteren Kontrolle der RNA-Beladung die Hybridisierung der immobilisierten RNA mit einer β -Actin-Sonde zu sehen. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.1.3 Lgals8

Die mRNA Sequenz von Lgals8 (Lectin, galactose binding soluble 8) der Maus ist mit der auf dem verwendeten DNA-Chip immobilisierten Sequenz AA760613 zu 100 % identisch und zeigte auf dem DNA-Microarray ein 3,2fach geringeres Signal bei Hybridisierung mit der cDNA aus den C57MG-Wnt-1-Zellen als bei Hybridisierung mit der cDNA aus den C57MG-pLNCx-Zellen. Diese Reprimierung der Expression in den Wnt-1-aktivierten Zellen sollte mit einer Lgals8 spezifischen, radioaktiv markierten Sonde durch Hybridisierung mit der RNA auf einer Northern Blot-Membran überprüft werden. Die Hybridisierung der Lgals8-Sonde mit der RNA aus den Mäusezellen (C57MG-pLNCx, C57MG-Wnt-1, C57MG + KCl, C57MG + LiCl) ist in Abbildung V.3 zu sehen und zeigte eine intensive Bande bei etwa 2440 Basen. Auch das längere Transkript von 2650 Basen, welches ebenso in der Literatur (Levy *et al.*, 2003) beschrieben ist, und dem kürzeren Fragment zu 100 % homolog ist, konnte detektiert werden. Entgegengesetzt zum DNA-Microarray waren keine Unterschiede zwischen den Transkriptmengen von Zellen mit inaktivem oder aktivem Wnt-Signalweg zu beobachten. Hiernach gibt es keinen Unterschied in der Expression von Lgals8 zwischen C57MG-Wnt-1- und C57MG-pLNCx-Zellen. Ebenso hat die Inhibition der GSK3 β durch LiCl in den C57MG-Zellen, verglichen mit den KCl behandelten Zellen, keinen Effekt auf die Transkription von Lgals8.

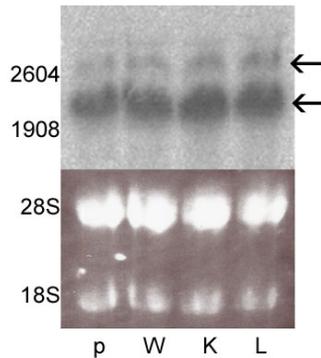


Abb. V.3: Autoradiographische Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Sonde des Lgals8-Gens. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.1.4 Proliferin

Auf dem verwendeten DNA-Chip waren drei verschiedene Sequenzen (X16009, K02245 und K03235) von Proliferin immobilisiert, wobei die Sequenzen von K02245 und K03235 nahezu identisch sind und X16009 an einem Ende mit den anderen beiden Sequenzen überlappt (Sequenzvergleich im Anhang). Alle drei Gene zeigten ein geringeres Signal (- 5,9, - 3,4 und - 4,8) in den Wnt-1-aktivierten Proben der C57MG-Wnt-1-Zellen verglichen mit den Wnt-1-inaktiven Kontrollproben. Mit einer radioaktiv markierten Sonde, welche spezifisch für alle vier Proliferine (plf1, plf2, mrp3 und mrp4; mrp für mitogen-regulated protein) ist, sollte das Ergebnis des DNA-Microarrays mittels Northern Blot-Analyse überprüft werden. Es waren deutliche Unterschiede in der Proliferin-Expression zu sehen (Abbildung V.4). In den C57MG-pLNCx-Zellen wurden die Proliferine deutlich stärker transkribiert als in den C57MG-Wnt-1-Zellen. Dies bestätigte die Daten des DNA-Microarrays und war ein weiterer Hinweis darauf, dass die Proliferin-Transkription durch den Wnt-Signalweg in Mäusezellen gehemmt wird. In den mit KCl und LiCl behandelten C57MG-Zellen war jedoch der umgekehrte Effekt zu beobachten. Die Proliferin-Transkriptmenge war in den mit LiCl behandelten Zellen deutlich höher als in denen, die mit KCl behandelt wurden und deutet auf eine Aktivierung der Transkription durch LiCl hin.

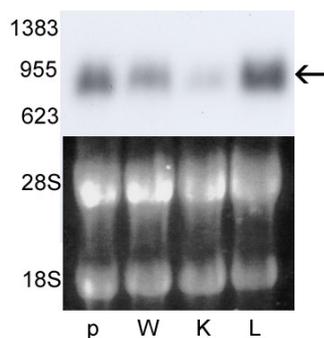


Abb. V.4: Autoradiographische Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Proliferin-Sonde. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.1.5 Gbp3

Die mRNA Sequenz von Gbp3 (Guanylate nucleotide binding protein 3) ist der auf dem verwendeten DNA-Chip immobilisierten Sequenz AW047476 zu 99 % homolog. Die Sequenz auf dem DNA-Microarray zeigte ein 4,1fach geringeres Signal nach Hybridisierung mit der cDNA aus den C57MG-Wnt-1-Zellen als mit der cDNA aus den C57MG-pLNCx-Zellen. Es sollte mit einer für Gbp3 spezifischen und radioaktiv markierten Sonde mittels Northern Blot-Analyse überprüft werden, ob die Genexpression von Gbp3 in den Wnt-aktivierten Zellen tatsächlich reprimiert ist. Die Hybridisierung mit der Gbp3-Sonde zeigte eine intensive Bande bei etwa 2460 Basen (Abbildung V.5), welche der Größe der Gbp3-mRNA entspricht (Han *et al.*, 1998). Das Ergebnis des DNA-Microarrays konnte nicht bestätigt werden. Die Expression von Gbp3 zeigte, verglichen mit den Mengen der ribosomalen RNA und der β -Actin-Hybridisierung, keine signifikanten Unterschiede. Folglich wird in den verwendeten Zellen die Transkription von Gbp3 durch einen aktiven Wnt-Signalweg nicht beeinflusst.

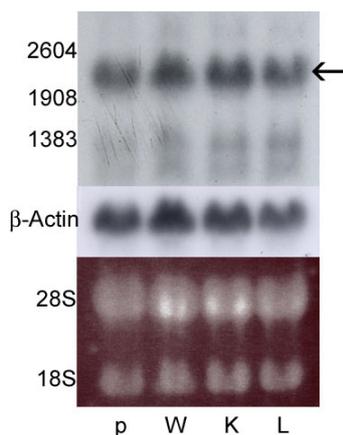


Abb. V.5: Autoradiographische Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Sonde des Gbp3-Gens. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. Im mittleren Bild ist zur weiteren Kontrolle der RNA-Beladung die Hybridisierung der immobilisierten RNA mit einer β -Actin-Sonde zu sehen. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.1.6 TIS 11

Die Expression von TIS 11 (TPA-induced sequencer 11) ist nach den Daten des DNA-Microarrays in den Wnt-aktivierten C57MG-Wnt-1-Zellen um das 4,2fache reprimiert, verglichen mit den C57MG-pLNCx-Zellen. Mit Hilfe einer für TIS 11 spezifischen, radioaktiv markierten Sonde sollte dieser Hinweis in einer Northern Blot-Analyse überprüft werden. Im Northern Blot konnten keine Unterschiede in der Expression von TIS 11 aufgrund von aktivem oder inaktivem Wnt-Signalweg nachgewiesen werden (Abbildung V.6). Folglich hat der Wnt-Signalweg in den untersuchten Zellen (C57MG-pLNCx, C57MG-Wnt-1, C57MG + KCl, C57MG + LiCl) keinen Einfluss auf die Transkription von TIS 11.

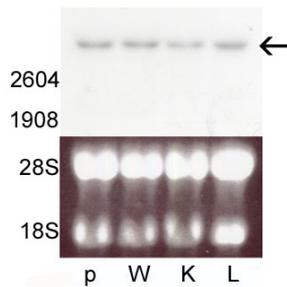


Abb. V.6: Autoradiographische Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Sonde des TIS11-Gens. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.1.7 14-3-3 Protein γ

Die Genexpression des Gens für das 14-3-3 Protein γ ist nach den Daten des DNA-Microarrays in den C57MG-Wnt-1-Zellen 4,4fach geringer als in den C57MG-pLNCx-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Expression dieses Gens durch den Wnt-Signalweg reprimiert werden könnte. Mit einer für das 14-3-3 γ -Gen spezifischen, radioaktiv markierten Sonde sollte dies mittels Hybridisierung mit der auf einer Nylonmembran fixierten Gesamt-RNA aus den verschiedenen Brustepithelzellen der Maus (C57MG-pLNCx, C57MG-Wnt-1, C57MG + KCl, C57MG + LiCl). überprüft werden (Abbildung V.7). Es war eine intensive Bande entsprechend der 14-3-3 γ -mRNA-Größe von 3510 Basen zu beobachten. Unterschiede in der mRNA-Transkriptmenge wurden aber nicht detektiert, weshalb die Hinweise des DNA-Chips nicht bestätigt wurden.

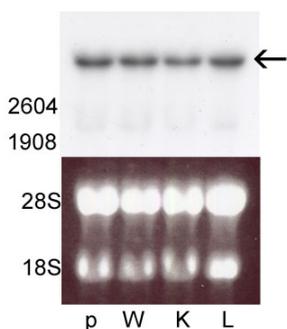


Abb. V.7: Autoradiographische Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Sonde des 14-3-3 γ -Gens. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.1.8 Ramp3

Für Ramp3 (Receptor activity modifying protein 3) zeigte die Hybridisierung der cDNA aus den Wnt-1-aktivierten C57MG-Wnt-1-Zellen eine 13,4fach geringere Expression verglichen mit den C57MG-pLNCx-Zellen. Diese Hemmung der Ramp3-Expression in den C57MG-Wnt-1-Zellen sollte durch Northern Blot-Analysen mit einer für Ramp3 spezifischen, radioaktiv

markierten Sonde überprüft werden. Die Expression von Ramp3 war in den C57MG-pLNCx-Zellen deutlich stärker als in den C57MG-Wnt-1-Zellen (Abbildung V.8). Ebenso war die Expression von Ramp3 in den mit LiCl behandelten Zellen etwas geringer als in den zur Kontrolle mit KCl behandelten Zellen, was die Reprimierung verifiziert. Diese Expressionsanalysen bestätigten folglich die Hinweise der Daten des DNA-Microarrays: In den Mäusezellen mit aktiviertem Wnt-1-Signalweg findet eine verringerte Expression von Ramp3 statt.

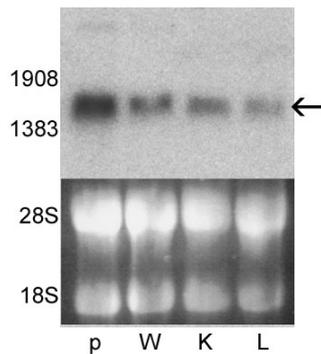


Abb. V.8: Detektion der Hybridisierung der RNA aus C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen mit einer Sonde des Ramp3-Gens mittels Phospho-Imaging. Im unteren Bild ist das mit Ethidiumbromid gefärbte RNA-Agarosegel gezeigt, um die vergleichbaren RNA-Mengen zu demonstrieren. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.2 Untersuchung der Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors und des Proliferin-Promotors

In den Expressionsanalysen (siehe V.1) konnten Ramp3 und Proliferin als potentielle Zielgene des Wnt-Signalwegs in Mäusezellen identifiziert werden. Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte daher die Aktivität der Promotoren dieser Gene in Zusammenhang mit einem aktivierten Wnt-Signalweg untersucht werden. Der Promotor des Ramp3-Gens ist jedoch noch nicht bekannt, weshalb er im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

Die MGF-Transkription zeigte ein leicht erhöhtes Expressionslevel in Northern Blot-Analysen der C57MG-Wnt-1-Zellen (siehe Abbildung V.2). Diese Tendenz stand im Gegensatz zu den Daten des DNA-Microarrays. Zusätzlich gaben die Daten eines DNA-Microarrays von van de Wetering *et al.* (2002) einen Hinweis darauf, dass die MGF-Expression durch eine β -Catenin-Mutante in menschlichen Darmtumorzellen aktiviert ist. Nach diesen Daten kann die Expression von MGF (SCF) in menschlichen Ls174T CRC-Zellen (welche eine aktive β -Catenin-Mutante haben) durch Expression einer dominant negativen Mutante von TCF-4 um das 2,6 bis 5,5fache gehemmt werden. Aufgrund dieser verschiedenen Hinweise wurde auch der MGF-Promotor der Maus weiter untersucht.

Für die Analyse der Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors und des Proliferin-Promotors wurden Reporteragen-Assays in verschiedenen Zelllinien (SW480, RK13, HEK293) durchgeführt (siehe IV.2.4). Durch Kotransfektionen oder durch Behandlung der Zellen mit LiCl bzw. KCl wurden Bedingungen mit aktiviertem und inaktiviertem Wnt-Signalweg hergestellt, zwischen denen die Promotoraktivität verglichen werden konnte.

Die verwendeten SW480-Zellen sind menschliche Kolon-Adenokarzinomzellen (Leibovitz *et al.*, 1976) und tragen eine monoallelische Mutation im APC-Gen, die zu einem C-terminal verkürzten APC-Protein in diesen Zellen führt. Das zweite APC-Allel fehlt aufgrund LOH (loss of heterocycosity). Daher kommt es zu einer Anreicherung von β -Catenin im Cytosol, welches dann vermehrt in den Zellkern gelangt. Dies entspricht einem aktiven Wnt-Signalweg. Durch Kotransfektion des wt APC-Gens kann jedoch die fehlende Funktion des verkürzten APCs in den SW480-Zellen kompensiert werden, β -Catenin kann wieder phosphoryliert und damit abgebaut werden, wodurch kein Signal mehr in den Zellkern gelangt (Korinek *et al.*, 1997).

In RK13- und HEK293-Zellen ist der Wnt-Signalweg inaktiv. Durch Kotransfektion einer dominant positiven Mutante des β -Catenin-Gens, der S33Y-Mutante, konnte der Wnt-Signalweg ab β -Catenin aktiviert werden. Die transfizierte Mutante kann nicht mehr an Serin 33 von der GSK3 β phosphoryliert werden, wodurch sie nicht mehr über den Ubiquitin-

Proteasomen-Weg abgebaut werden kann, im Cytosol akkumuliert und vermehrt in den Zellkern wandert. Eine andere Möglichkeit ist die Behandlung der RK13- oder HEK293-Zellen mit LiCl. Zur Kontrolle wurden in den Reporter-Gen-Assays die mit LiCl behandelten Ansätze mit KCl behandelten Ansätzen verglichen. Von KCl ist nicht bekannt, dass es einen Einfluss auf Elemente des Wnt-Signalwegs hat. Die Daten aus Reporter-Gen-Assays mit LiCl behandelten Ansätzen sind jedoch nicht spezifisch für den Wnt-Signalweg, da LiCl in der Zelle nicht allein auf die GSK3 β Einfluss hat, sondern z.B. auch die Inositol-Monophosphatase (IMP) hemmt (Phiel und Klein, 2001). Daher können Ergebnisse aus diesen Assays nur als Bestätigung für andere Reporter-Gen-Assays, in denen der Wnt-Signalweg spezifisch an und ausgeschaltet wurde, gesehen werden.

In allen Reporter-Gen-Assays wurde das Topflash-Konstrukt, welches drei Kopien des optimalen TCF/LEF-Motivs enthält (Korinek *et al.*, 1997), und der Cyclin D1-Promotor als positive Kontrollen eingesetzt. Von Cyclin D1 wurde 1999 von Tetsu & McCormick gezeigt, dass β -Catenin die Transkription über TCF-Bindungsstellen im Promotor aktiviert und es ein Zielgen des Wnt-Signalwegs ist.

V.2.1 Klonierung des Proliferin- und des MGF-Promotors

Für die Reporter-Gen-Assays zur Untersuchung des MGF-Promotors aus der Maus und des Proliferin-Promotors (des Plf1-Gens) aus der Maus mussten zunächst die beiden Promotor-Sequenzen aus genomischer Mäuse-DNA amplifiziert werden, um sie dann in den pKS+/Ltk80-luc Vektor ligieren zu können. Der Proliferin-Promotor (PLF149 bzw. Proliferin 1-Promotor) ist 676 bp lang (Linzer *et al.*, 1987) und hat bei 215 bp und 656 bp jeweils eine Sequenz (5'-²²¹TTCAATG²¹⁵-3' und 5'-⁶⁶²ATCAAAG⁶⁵⁶-3'), die der eines TCF/LEF-Motivs entspricht und bei 431 bp eine Sequenz (5'-⁴³⁷TTCTAAG⁴³¹-3') die diesem Motiv sehr ähnlich ist (siehe Promotor-Sequenz im Anhang). Der MGF-Promotor von 1721 bp (Bedell *et al.*, 1996) hat bei 210 bp ein Sequenzmotiv (5'-²¹⁰AACAATG²¹⁶-3'), welches der Konsensussequenz von TCF/LEF-Bindungsstellen entspricht (siehe Promotor-Sequenz im Anhang). Bei der Amplifizierung der Promotoren war es wichtig, dass keine Fehler, also Mutationen in der Sequenz auftreten. Deshalb wurde die PCR nach Möglichkeit mit einer Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease- (sogenannter proofreading-) Aktivität durchgeführt.

Proliferin Promotor

Der Proliferin-Promotor von 676 bp Länge wurde mit der Proof Start DNA-Polymerase aus genomischer DNA amplifiziert. Die verwendeten Primer fügten zudem Restriktions-

schnittstellen für *Bam*HI am 5'-Ende und *Pst*I am 3'-Ende an. Im PCR-Programm wurden zunächst 7 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von nur 40°C durchlaufen, damit beide Primer, trotz Schnittstellenüberhangs, an die Template-DNA binden konnten. Darauf folgten 34 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 57°C, die sich nach der Schmelztemperatur der gesamten Primerlänge richtete. Nach Restriktionshydrolyse des PCR-Produkts und des pKS+/Ltk80-luc Vektors mit *Bam*HI und *Pst*I (siehe IV.1.10), sowie Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors (siehe IV.1.11), wurde das restringierte Promotor-Fragment in den pKS+/Ltk80-luc Vektor ligiert (siehe IV.1.13) und in kompetente TG1-Zellen transformiert (siehe IV.1.14). Das Vorhandensein des Fragments im Vektor wurde durch Kolonie-PCR (siehe IV.1.15) überprüft und von den positiven Klonen eine Plasmid-Mini-Präparation (siehe IV.1.1) durchgeführt. Die Fragmente in diesen Plasmiden wurden schließlich sequenziert (siehe IV.1.17), um die Sequenz des amplifizierten Proliferin-Promotors zu überprüfen.

MGF-Promotor

Die Amplifizierung des MGF-Promotors von Base 1 bis 1600 war hingegen einzig mit der *Taq*-Polymerase möglich, welche keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt und daher eine höhere Fehlerrate hat. Die verwendeten Primer sollten an den beiden Enden des Fragments Restriktionsschnittstellen anfügen, über die das Fragment kloniert werden sollte. Da die PCR jedoch nur mit der *Taq*-Polymerase erfolgreich war, wurden diese Schnittstellen nicht genutzt und statt dessen eine TOPO-TA-Klonierung durchgeführt. In der PCR wurden zunächst 10 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von nur 51°C durchlaufen, damit beide Primer, trotz Schnittstellenüberhangs, an die Template-DNA binden konnten. Darauf folgten 35 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 64°C, die sich nach der Schmelztemperatur der gesamten Primerlänge richtete. Das PCR-Produkt wurde anschließend direkt in den pCR2.1-TOPO-Vektor mit Hilfe des „TOPO TA Cloning Kit“ ligiert und in TOP10-Zellen transformiert (siehe IV.1.9). Durch Kolonie-PCR (siehe IV.1.15) wurde die Existenz des Fragments im Vektor überprüft und von positiven Klonen eine Plasmid-Mini-Präparation (siehe IV.1.1) durchgeführt. Zur Umklonierung des MGF-Promotors aus dem pCR2.1-TOPO-Vektor in den pKS+/Ltk80-luc Vektor wurden beide Vektoren mit *Sac*I und *Not*I hydrolysiert (siehe IV.1.10). Der MGF-Promotor wurde dann in den geschnittenen pKS+/Ltk80-luc Vektor ligiert (siehe IV.1.13) und in kompetente TG1-Zellen transformiert (siehe IV.1.14). Durch Kolonie-PCR wurden positive Klone identifiziert und von diesen eine Plasmid-Mini-Präparation durchgeführt. Schließlich wurde der MGF-Promotor im Vektor sequenziert (siehe IV.1.17) und identifiziert. Aufgrund der Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase waren in der Sequenz einige Mutationen vorhanden, sie lagen aber nicht im Bereich des potentiellen TCF/LEF-Motivs.

V.2.2 Transkriptionsaktivität des Proliferin-Promotors

Für die Untersuchung des Proliferin-Promotors in Reporter-Gen-Assays wurde der in den pKS+/Ltk80-luc Vektor klonierte Promotor zunächst mittels Plasmid-Maxi-Präparation isoliert (siehe IV.1.1) und anschließend in verschiedene Zelllinien (RK13, SW480, HEK293) transfiziert (siehe IV.2.3). Außerdem wurden jeweils Ansätze mit dem Leervektor und den beiden positiv-Kontrollen Topflash und Cyclin D1-Promotor transfiziert. Bei allen Ansätzen wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein Reporterplasmid, welches das β -Galactosidase-Gen trägt, kotransfiziert. Zur Normierung der Reporter-Gen-Assays wurde die Luziferase-Aktivität des Leervektors auf 1 gesetzt.

Abbildung V.9 zeigt den Einfluss von kotransfiziertem wt APC auf die Aktivität des Proliferin-Promotors in SW480-Zellen. Die Reprimierung der Promotor-Aktivität der beiden positiv-Kontrollen durch Kotransfektion von wt APC war deutlich zu beobachten. Die absoluten Werte der Luziferase-Aktivität des Proliferin-Promotors waren aber so gering, dass keine Aussage über den Effekt von wt APC auf die Transkriptionsaktivität des Promotors gemacht werden konnte.

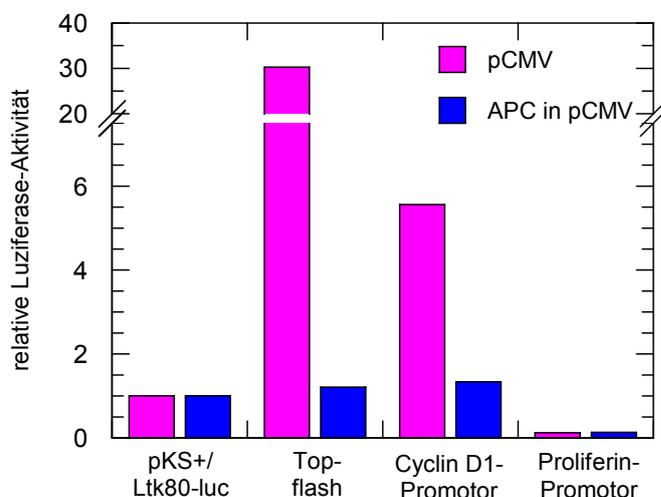


Abb. V.9: Effekt von wt APC auf die Aktivität des Proliferin-Promotors nach Transfektion in SW480-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Reporter-Gen-Assays.

Um zu prüfen, ob die schwache Luziferase-Aktivität nur ein Effekt in SW480-Zellen ist, wurde ein Reporter-Gen-Assay mit dem Proliferin-Promotor in einer anderen Zelllinie durchgeführt. Dazu wurden RK13-Zellen, bei denen die β -Catenin S33Y-Mutante kotransfiziert wurde, verwendet. Die Transkriptionsaktivität der beiden positiv-Kontrollen wurde durch die kotransfizierte β -Catenin-Mutante gesteigert (Abbildung V.10). Die Luziferase-Aktivität des Proliferin-Promotors war aber auch in dieser Zelllinie zu gering, um eine Aussage über die Transkriptionsaktivität des Promotors treffen zu können.

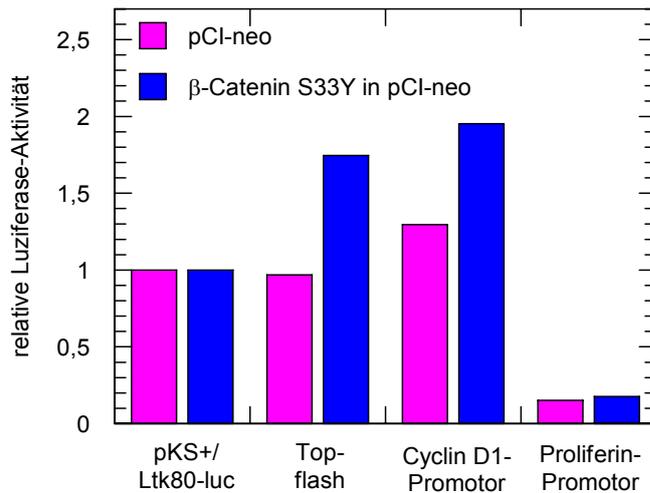


Abb. V.10: Effekt von β-Catenin S33Y auf die Aktivität des Proliferin-Promotors nach Transfektion in RK13-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Reporter-Gen-Assays.

Eine Mutation oder Deletion im Reporter-Gen des pKS+/Ltk80-luc-Proliferin-Promotor-Plasmids könnte ein Grund für diese geringe Luciferase-Aktivität sein. Daher wurde das Proliferin-Promotor-Fragment in einen pKS+/Ltk80-luc Vektor umkloniert, von dem die Luciferase-Aktivität zuvor durch Reporter-Gen-Assays bestätigt wurde. Dafür wurde das Promotor-Fragment, wie in V.2.1 beschrieben, kloniert aber in einen überprüften pKS+/Ltk80-luc Vektor ligiert (siehe IV.1.13) und in TG1-Zellen transformiert (siehe IV.1.14). Durch Kolonie-PCR wurden positive Klone identifiziert und nach einer Plasmid-Mini-Präparation durch Sequenzierung bestätigt.

Der durch Plasmid-Maxi-Präparation erhaltene umklonierte Proliferin-Promotor wurde anschließend in SW480- und HEK293-Zellen für Reporter-Gen-Assays transfiziert. Bei den SW480-Zellen wurde, wie oben beschrieben wt APC kotransfiziert, bei den HEK293-Zellen die β-Catenin S33Y Mutante. In den Abbildungen V.11 und V.12 ist zu sehen, dass auch der neu klonierte Proliferin-Promotor keine stärkere Luciferase-Aktivität zeigte.

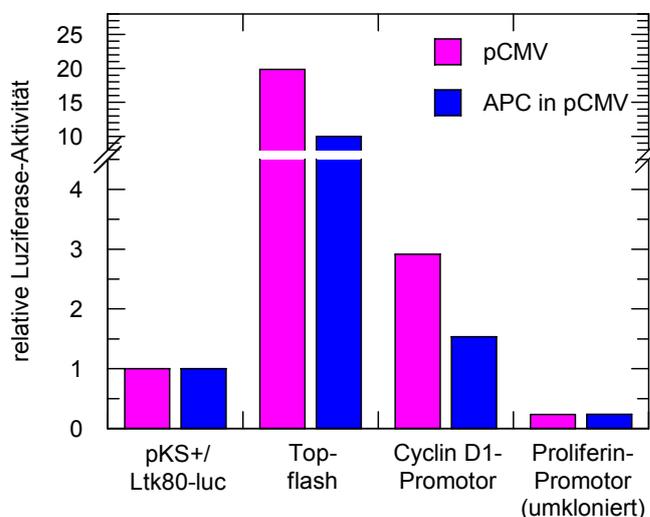


Abb. V.11: Effekt von wt APC auf die Aktivität des neu klonierten Proliferin-Promotors nach Transfektion in SW480-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Reporter-Gen-Assays.

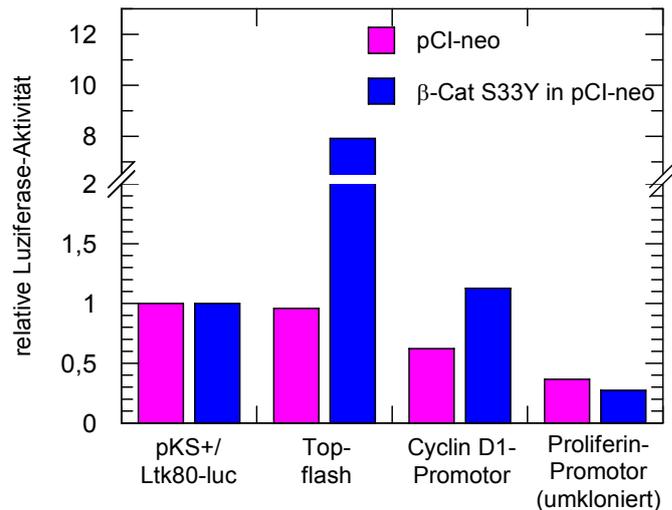


Abb. V.12: Effekt von β -Catenin S33Y auf die Aktivität des neu klonierten Proliferin-Promotors nach Transfektion in HEK293-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Reporter-Gen-Assays.

Es waren aus zeitlichen Gründen keine weiteren Untersuchungen möglich, sodass keine Aussage über die Transkriptionsaktivität des Proliferin-Promotors bei aktivem oder inaktivem Wnt-Signalweg getroffen werden konnte.

V.2.3 Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors

Zur Untersuchung des MGF-Promotors in Reporter-Gen-Assays wurde der in den pKS+/Ltk80-luc Vektor klonierte Promotor mittels Plasmid-Maxi-Präparation isoliert (siehe IV.1.1) und in verschiedene Zelllinien transfiziert (RK13, SW480, HEK293) (siehe IV.2.3). Außerdem wurden jeweils Ansätze mit dem Leervektor und den beiden positiv-Kontrollen Topflash und Cyclin D1-Promotor transfiziert. Zusätzlich wurde überall ein Kontroll-Reporterplasmid, welches das β -Galactosidase-Gen trägt, kotransfiziert. Zur Normierung der Reporter-Gen-Assays wurde die Luciferase-Aktivität des Leervektors auf 1 gesetzt.

In Abbildung V.13 ist der Einfluss von kotransfiziertem wt APC auf die Aktivität des MGF-Promotors nach Transfektion in SW480-Zellen dargestellt. Bei Kotransfektion des Leervektors pCMV war die Luciferase-Aktivität des MGF-Promotors im Durchschnitt 1,5mal stärker als bei Kotransfektion von wt APC. Die Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors war in den Zellen mit aktiviertem Wnt-Signalweg also um etwa 1/3 erhöht.

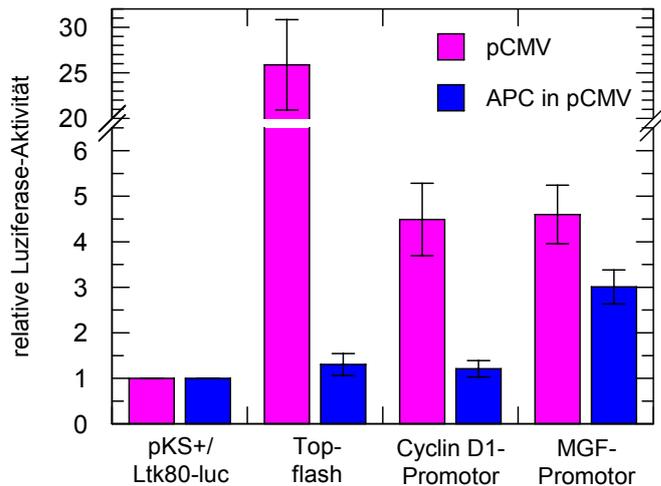


Abb. V.13: Effekt von wt APC auf die Aktivität des MGF-Promotors nach Transfektion in SW480-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte vierer unabhängig voneinander durchgeführter Reporteragen-Assays.

Des Weiteren wurde der Einfluss der β -Catenin S33Y Mutante auf die Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors in RK13-Zellen und in HEK293-Zellen untersucht (Abbildungen V.14 und V.15). In beiden Fällen war eine leichte Aktivierung der Reporter-Genexpression bei Kotransfektion von β -Catenin S33Y zu beobachten. Diese war mit den Faktoren 1,29 (RK13) und 1,23 (HEK293) für Reporteragen-Assays aber nicht signifikant. Jedoch zeigten die positiv-Kontrollen im Reporteragen-Assay mit RK13-Zellen auch nicht die erwartete signifikante Aktivitätssteigerung.

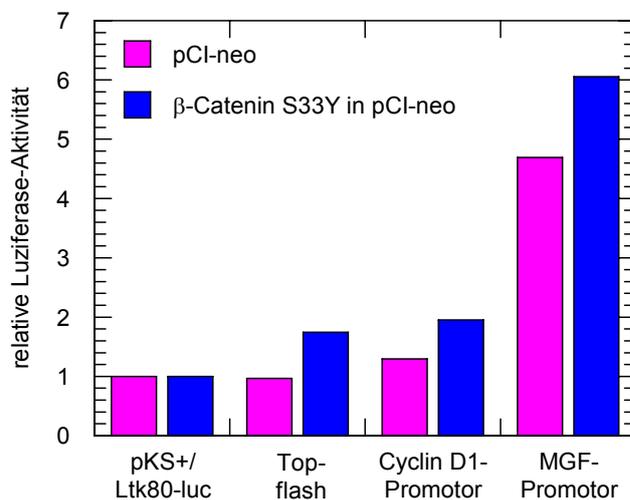


Abb. V.14: Effekt von β -Catenin S33Y auf die Aktivität des MGF-Promotors nach Transfektion in RK13-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Reporteragen-Assays.

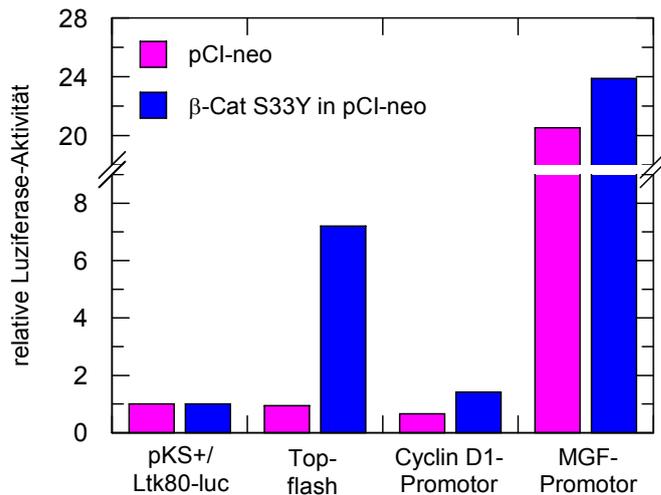


Abb. V.15: Effekt von β -Catenin S33Y auf die Aktivität des MGF-Promotors bei Transfektion in HEK293-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Reporter-Gen-Assays.

Schließlich sollte der Einfluss von Lithium auf die Aktivität des MGF-Promotors untersucht werden. Die Behandlung von, wie in IV.2.3 beschrieben, transfizierten RK13-Zellen mit 20 mM LiCl für 24 h führte zu einer 2fachen Transkriptionsaktivierung des MGF-Promotors verglichen mit Ansätzen, die mit 20 mM KCl behandelt wurden (siehe Abbildung V.16).

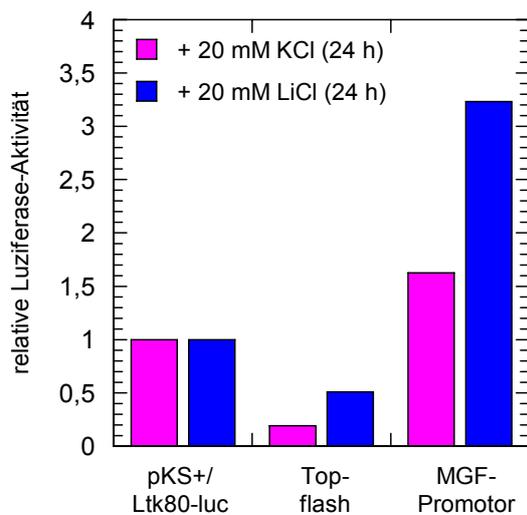


Abb. V.16: Einfluss von Lithium auf die Aktivität des MGF-Promotors nach Transfektion in RK13-Zellen. Gezeigt sind die Daten eines Reporter-Gen-Assays.

Insgesamt liefern diese Reporter-Gen-Studien Hinweise darauf, dass die Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors unter Bedingungen mit aktivem Wnt-Signalweg leicht erhöht sein könnte.

V.2.4 Herstellung einer Mutante des MGF-Promotors

Um zu untersuchen, ob die in den Reporteragen-Assays beobachtete schwach erhöhte Luziferase-Aktivität des MGF-Promotors (siehe V.2.3) signifikant war und ob das potentielle TCF/LEF-Motiv in der Promotor-Sequenz eine Rolle spielt, wurde eine Mutante des Promotors hergestellt. Hierbei wurde das TCF/LEF-Motiv in der MGF-Promotor-Sequenz von 5'-²¹⁰AACAATG²¹⁶-3' zu 5'-GGCAATG-3' mutiert, wie es auch in Analysen von He *et al.* (1998) zur Untersuchung des c-myc-Promotors erfolgte. Durch diese Mutation wird das klassische Erkennungsmotiv für Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie zerstört. Sollte die Sequenz für die geringe Aktivierung von Bedeutung sein, so sollte es in Reporteragen-Assays mit dem mutierten Promotor zu keiner Veränderung der Aktivität aufgrund eines aktiven Wnt-Signalwegs kommen. Die Mutation wurde, wie in IV.1.5.2 beschrieben, mittels QuikChange-PCR in die Promotorsequenz eingefügt. Dazu wurden zwei Mutageneseprimer von 43 bp Länge verwendet, in denen die beiden Adenin-Basen zu zwei Guanin-Basen ausgetauscht wurden. Als Template für die PCR diente der pKS+/Ltk80-luc-MGF-Promotor. Nach der QuikChange-PCR wurde das Template mit *DpnI* hydrolysiert und der amplifizierte Vektor in TG1-Zellen transformiert (siehe IV.1.14). Anschließend wurden die durch Mini-Präparation isolierten Plasmide sequenziert (siehe IV.1.17) und positive Klone, die die Mutation tragen, bestimmt.

V.2.5 Transkriptionsaktivität des mutierten MGF-Promotors

Zur Untersuchung des MGF-Promotors mit mutiertem TCF/LEF-Motiv in Reporteragen-Assays wurde der in den pKS+/Ltk80-luc Vektor klonierte Promotor mittels Plasmid-Maxi-Präparation isoliert (siehe IV.1.1) und anschließend in SW480- und HEK293-Zellen transfiziert (siehe IV.2.3). Zusätzlich wurden jeweils Ansätze mit dem Leervektor und den beiden positiv-Kontrollen Topflash und Cyclin D1-Promotor transfiziert.

Abbildung V.17 zeigt den Einfluss der Kotransfektion von wt APC in SW480-Zellen auf den mutierten MGF-Promotor und Abbildung V.18 den Einfluss von β -Catenin S33Y in HEK293-Zellen. In beiden Reporteragen-Assays war die absolute Luziferase-Aktivität jedoch zu gering um eine Aussage über den Effekt der Mutation im Promotor treffen zu können. Die geringe Luziferase-Aktivität könnte durch Mutationen im Vektor, z.B. im Luziferase-Gen, die während der QuikChange-PCR aufgetreten sind, verursacht sein. Die Luziferase-Aktivität des mutierten MGF-Promotors müsste in einer ähnlichen Größenordnung sein, wie bei der Wildtyp-Sequenz, um etwas über die Relevanz des mutierten TCF/LEF-Motivs auf die

Transkriptionsaktivität aussagen zu können. Daher ist es auch nicht von Bedeutung, dass diese beiden Assays nicht mehrmals durchgeführt wurden.

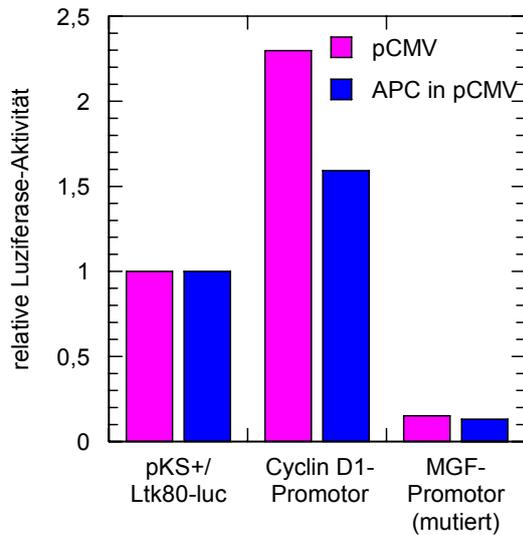


Abb. V.17: Effekt von wt APC auf die Aktivität des mutierten MGF-Promotors nach Transfektion in SW480-Zellen. Gezeigt sind die Daten eines Reporteragen-Assays.

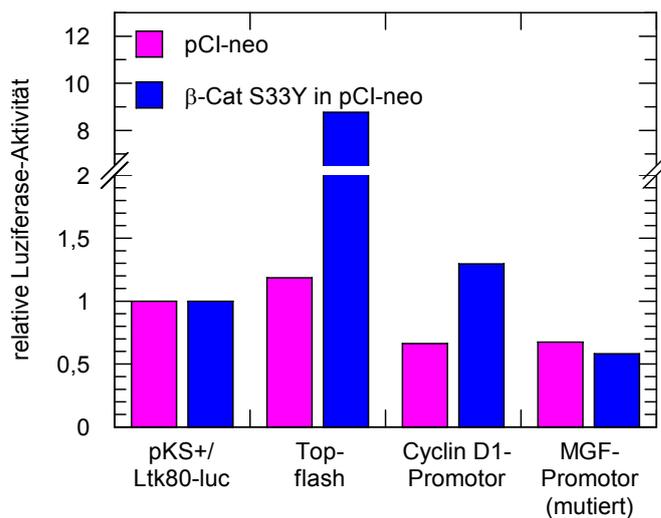


Abb. V.18: Effekt von beta-Catenin S33Y auf die Aktivität des mutierten MGF-Promotors nach Transfektion in HEK293-Zellen. Gezeigt sind die Daten eines Reporteragen-Assays.

V.3 Untersuchung der Proteinexpression bei aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg

In diesem Teil der Arbeit sollte durch immunologischen Nachweis analysiert werden, ob neben der verringerten mRNA-Menge von Ramp3 und Proliferin in C57MG-Wnt-1-Zellen (siehe V.1.8 und V.1.4) auch die Proteinmenge in diesen Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg reprimiert ist. Außerdem wurde untersucht, ob die Ergebnisse der Reporteragen-Assays zur Analyse des MGF-Promotors signifikant waren und die Hinweise des DNA-Microarrays von van de Wetering *et al.* (2002) zutreffen könnten. Dafür wurde die Proteinmenge von MGF in Brustepithelzellen der Maus mit aktiviertem und inaktiviertem Wnt-Signalweg analysiert.

Die Analyse der Proteinexpression in verschiedenen Mäusezelllinien mit aktivem oder inaktivem Wnt-Signalweg (C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen) und menschlichen Darmtumorzelllinien (HCT116 und SW480) erfolgte mittels Western Blot (siehe IV.3.3). Auf der Membran konnten die gefragten Proteine mit entsprechenden Antikörpern immunologisch nachgewiesen werden (siehe IV.3.4) und die Proteinmengen der verschiedenen Proben über die Intensität der Banden miteinander verglichen werden. Zur Kontrolle einer identischen Probenbeladung wurden die Proteine auf den Membranen anschließend mit Ponceau-S gefärbt.

V.3.1 Ramp3

Ramp3 ist ein Protein von 147 Aminosäuren und gehört zusammen mit Ramp1 und Ramp2 zu einer neuen Gruppe von Typ I Transmembranproteinen (McLatchie *et al.*, 1998). Sie werden „receptor activity modifying proteins“ (Rezeptoraktivität modifizierende Proteine) genannt, da sie den Phänotyp von Typ II G-Protein gekoppelten Rezeptoren (bisher sind der Calcitonin-Rezeptor und der Calcitonin-Rezeptor-like-Rezeptor bekannt, McLatchie *et al.*, 1998), vermutlich durch direkten oder indirekten Effekt auf die Liganden-Bindungsstelle, verändern können. Ramps kommen in stabilen Komplexen mit einem Rezeptor auf der Zelloberfläche vor. Außerdem sind sie für den Transport einiger Rezeptoren von intrazellulären Kompartimenten an die Plasmamembran der Zelloberfläche nötig (Sexton *et al.*, 2001). Die Aminosäuresequenzen der Ramps sind nur zu ungefähr 30 % zueinander homolog, aber alle drei Proteine haben einen ähnlichen Aufbau. Sie durchspannen einmal die Plasmamembran, haben extrazellulär eine N-terminale Domäne und eine sehr kurze zytoplasmatische C-terminale Domäne. Zusätzlich sind sie heterogen glykosyliert. Ramp3 ist

von den drei Mitgliedern der Ramp-Familie am höchsten zwischen verschiedenen Spezies konserviert. Maus Ramp3 ist zu 84 % der menschlichen Variante identisch (Derst *et al.*, 2000 und Sexton *et al.*, 2001). Ramp-mRNAs kommen in vielen verschiedenen Geweben vor, was darauf hindeutet, dass noch nicht alle Interaktionspartner dieser Transmembranproteine gefunden wurden. Auch über die Promotoren der Ramp-Gene ist noch nichts bekannt.

Für den immunologischen Nachweis von Ramp3 in den Lysaten verschiedener Mäusezelllinien wurden die Lysate in einem 15%igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde mit einer 5%igen BSA-Lösung in PBS/T blockiert und dann 1 h mit 0,4 µg/ml Ramp3-Antikörper (Santa Cruz) inkubiert. Der sekundäre Anti-Kaninchen-Antikörper wurde 1:10000 in PBS/T eingesetzt.

Der Western Blot zeigt, dass sowohl in den C57MG-Wnt-1-Zellen, als auch in den für 24 h mit LiCl behandelten C57MG-Zellen weniger Ramp3 exprimiert wurde als in den entsprechenden Zellen mit inaktivem Wnt-Signalweg (Abbildung V.19). Wie in den Northern Blot-Analysen auf mRNA-Ebene eine Reprimierung gezeigt wurde (siehe V.1.8), konnte in diesem Western Blot auch eine Reprimierung auf Protein-Ebene bei aktiviertem Wnt-Signalweg gezeigt werden.

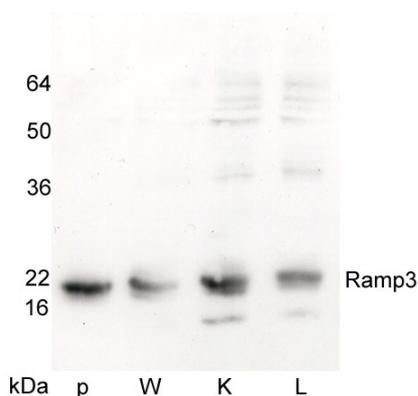


Abb. V.19: Immunologischer Nachweis von Ramp3 in C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen im Western Blot. Der Ramp3-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 0,4 µg/ml eingesetzt. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

Die bisherigen Daten zum Einfluss des Wnt-Signalwegs auf Ramp3 wurden in Mäusezellen erhalten. Aufgrund der Bedeutung des Wnt-Signalwegs in Darmtumoren wurde die Ramp3-Expression zusätzlich in zwei menschlichen Darmtumorzelllinien, den HCT116-Zellen mit β -Catenin Mutation und den SW480-Zellen mit APC-Mutation untersucht. In Abbildung V.20 ist zu sehen, dass Ramp3 in SW480-Zellen stärker exprimiert wurde als in HCT116-Zellen. Interessant wäre es zu analysieren, ob die Ramp3-Expression nach Transfektion von wt APC in die SW480-Zellen zunimmt. Ramp3 könnte in den menschlichen Zellen aber auch keiner oder einer anderen Regulation durch den Wnt-Signalweg unterliegen.

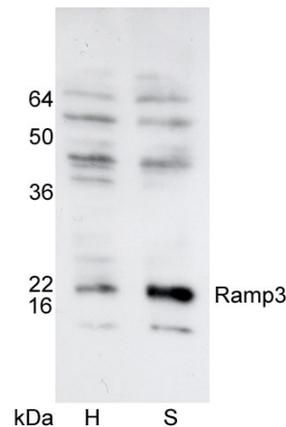


Abb. V.20: Immunologischer Nachweis von Ramp3 in HCT116- und SW480-Zellen im Western Blot. Der Ramp3-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 0,4 µg/ml eingesetzt. H: HCT116, S: SW480.

Ramp3 bildet, wie auch Ramp1, stabile Homodimere, die auch unter den reduzierenden und denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE stabil bleiben (Sexton *et al.*, 2001). Die Homodimere sind in den Lysaten der mit KCl und LiCl behandelten Zellen als auch in den HCT116 und SW480 Zellen bei unter 50 kDa zu sehen (Abbildungen V.19 und V.20). Die Bedeutung dieser Dimerisierung ist noch nicht vollständig geklärt, aber sie spielt vermutlich eine Rolle in der dynamischen Regulation an verfügbarem Ramp3, welches nur als Monomer mit Rezeptoren interagieren kann (Sexton *et al.*, 2001).

V.3.1.1 Lokalisation von Ramp3

Schließlich wurde die zelluläre Lokalisation von Ramp3 in den verschiedenen Mäusezelllinien untersucht. Dazu wurde Ramp3 immunocytochemisch, wie in IV.2.5 beschrieben, in den auf Deckgläschen gewachsenen Zellen (C57MG-pLNCx, C57MG-Wnt-1, C57MG + KCl und C57MG + LiCl) nachgewiesen. Der Ramp3-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 2 µg/ml in Blockierlösung eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente ein Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper. Die Zellkerne wurden zur Orientierung mit DAPI gefärbt.

Ramp3 (orange) ist in allen Ansätzen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Abbildung V.21). In Kontrollansätzen, die nicht mit dem ersten Antikörper inkubiert wurden, war keine nennenswerte orange Färbung zu sehen. Es konnte somit eine ähnliche Lokalisation von Ramp3 detektiert werden, wie sie von Sexton *et al.* (2001) für Ramp1 gezeigt wurde.

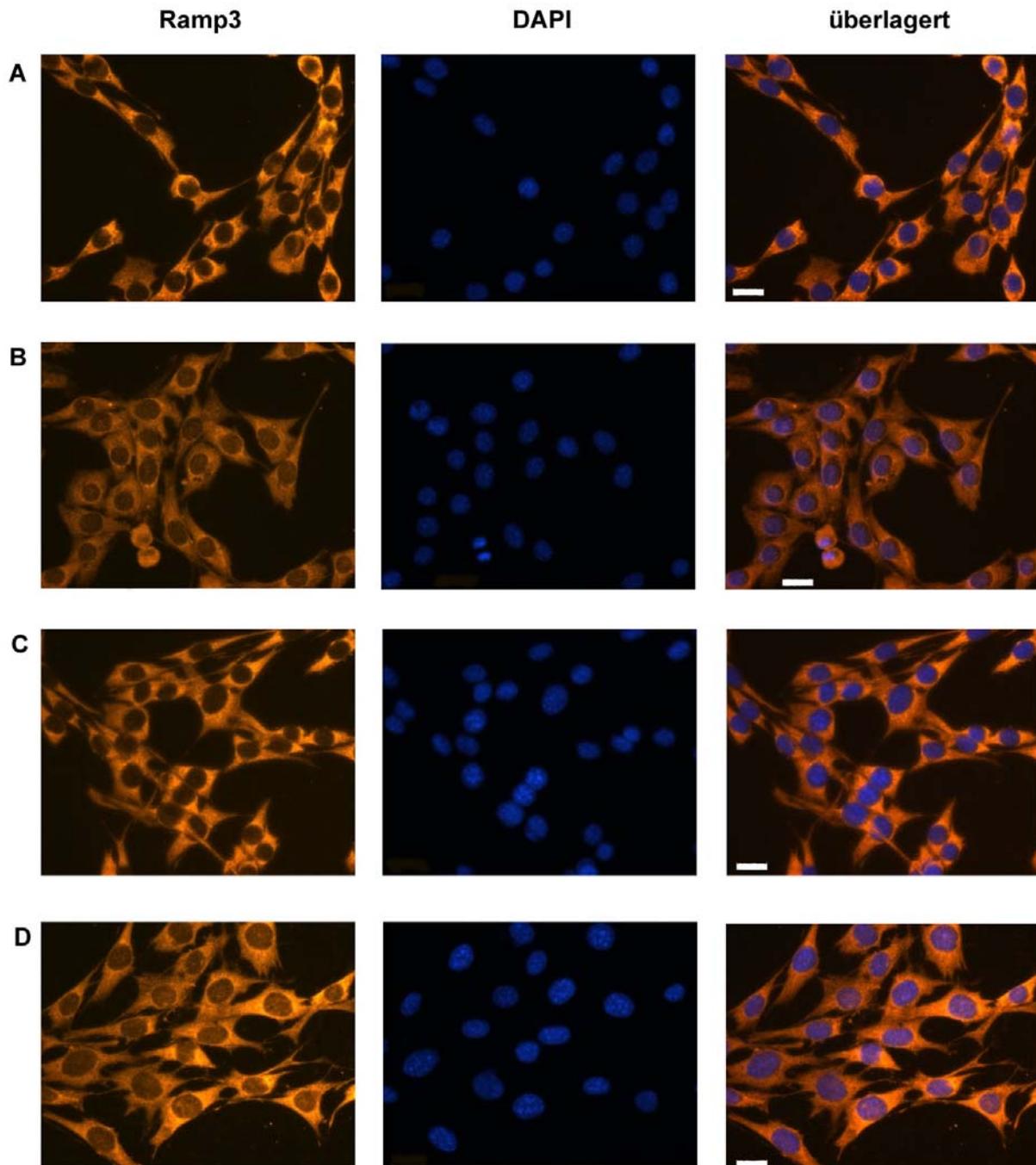


Abb. V.21: Lokalisation von Ramp3. Immuncytochemische Färbung von Ramp3 in A: C57MG-pLNCx-Zellen, B: C57MG-Wnt-1-Zellen, C: C57MG-Zellen + KCl und D: C57MG-Zellen + LiCl. Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung. Der Maßbalken in den überlagerten Bildern entspricht 20 μm . Blau: Zellkerne, orange: Ramp3.

V.3.2 Proliferin

Proliferine (PLFs), auch Mitogen-regulierte Proteine (MRPs) genannt, gehören zu einer Familie von Polypeptid-Hormonen der Maus-PRL/GH Familie (PRL = Prolactin, GH = Growth Hormone) (Nielsen-Hamilton *et al.*, 1980). Zu den Proliferinen gehören 4 homologe Proteine (PLF1, PLF2, MRP3, MRP4), die von vier verschiedenen Genen codiert werden und fast gleiche Aminosäuresequenzen haben. Sie unterscheiden sich im Glykosylierungsgrad. Die Proliferine sind angiogen wirkende Plazenta-Hormone, die während der Schwangerschaft die Proliferation des Uterus und die Vaskularisation in der Plazenta stimulieren (Fang *et al.*, 1999). Zusätzlich haben die Proliferine wahrscheinlich noch andere Aufgaben während der Entwicklung des Fötus, da sie auch die Migration von Endothelzellen stimulieren können, was die Angiogenese in der Entwicklung des fötalen Gewebes fördert (Corbacho *et al.*, 2002). In Endothelzellen bindet Proliferin an den IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (IGFII-R = Insulin-like growth factor II receptor), wodurch ein G-Protein aktiviert wird, was wiederum zur Aktivierung von MAP (mitogen activated protein) Kinasen führt (Groskopf *et al.*, 1997). Der spezifische Rezeptor, an den Proliferin im Uterus bindet und der die Zellproliferation vermittelt, ist noch unbekannt. Außerhalb der Plazenta der Maus werden Proliferine nennenswert nur in der Haut von Schwanz und Ohr, Haar-Follikeln und Haut-Keratinocyten während der Wundheilung exprimiert (Fassett *et al.*, 2000; Fassett & Nielsen-Hamilton, 2001). Dies deutet darauf hin, dass Proliferine auch eine Rolle in der normalen Angiogenese bei adulten Tieren haben können. Von Toft *et al.* (2001) wurde an einem Zellkultur-Modell von Maus-Fibrosarkomen gezeigt, dass Proliferine aber auch eine elementare Rolle in der Angiogenese bei Tumoren spielen. Im invasiven Stadium der Fibrosarkome ist die Proliferin-Genexpression in den Zellen stark erhöht. Dies fällt direkt mit dem Stadium zusammen, in dem der Tumor hoch angiogen wird. Toft *et al.* konnte zeigen, dass die erhöhte Sekretion von Proliferin funktionell wichtig für die angiogene Aktivität dieser Tumorzellen ist. Proliferin kann also auch als pro-angiogener Faktor von Tumoren sekretiert werden.

Für den immunologischen Nachweis von sekretiertem Proliferin wurde Serum-freies Kulturmedium (siehe IV.2.7) von den verschiedenen Mäusezelllinien (C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen) mit aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg verwendet. Die Medienproteine und auch Lysate der Mäusezellen wurden in einem 12,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran transferiert. Diese wurde in einer 5%igen Magermilch-Lösung in PBS/T blockiert und dann 1 h mit dem Proliferin-Antikörper (Serum 89Rb13, Verdünnung 1:1000) inkubiert. Der sekundäre Anti-Kaninchen-Antikörper wurde 1:10000 in PBS/T eingesetzt.

Aufgrund der hohen Homologie der einzelnen Proliferine untereinander kann der Antikörper nicht zwischen den verschiedenen Formen unterscheiden. In Abbildung V.22 sind die 38 kDa und 27 kDa Proliferin-Proteinbanden mit Pfeilen markiert. Die 27 kDa Bande ist MRP4 zuzuordnen, wobei in der 38 kDa Bande PLF1 und MRP3 zu finden sind (Fang *et al.*, 1999). Von den C57MG-Wnt-1-Zellen wurde bedeutend mehr Proliferin sekretiert als von den C57MG-pLNCx-Zellen mit inaktivem Wnt-1-Signalweg. Auch von den mit 20 mM LiCl behandelten C57MG-Zellen wurde mehr Proliferin ins Medium abgegeben als von den mit KCl inkubierten Zellen. Das heißt, es wurde jeweils mehr Proliferin in den Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg exprimiert. Dieses Ergebnis stimmt mit den Northern Blot-Analysen (siehe V.1.4) nur teilweise überein, nämlich für die mit KCl und LiCl behandelten Zellen. Bei den C57MG-Wnt-1-Zellen war die mRNA-Trankriptmenge geringer als in C57MG-pLNCx-Zellen. In den Lysaten der Mäusezellen konnte im Western Blot nur in den mit LiCl behandelten Zellen Proliferin detektiert werden. Es ist zu vermuten, dass es noch sekretiert werden soll und die Behandlungszeit mit LiCl eventuell noch nicht lang genug war. Dieses könnte durch Herstellung von Zelllysaten nach verschiedenen Inkubationszeiten mit LiCl und anschließende Western Blot-Analysen untersucht werden.

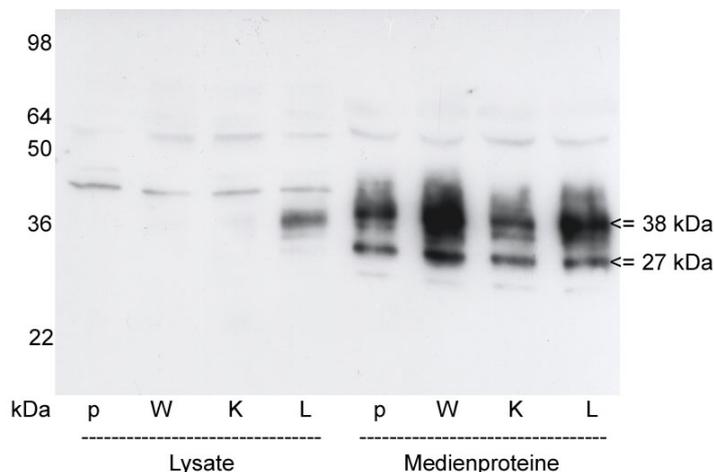


Abb. V.22: Immunologischer Nachweis von Proliferin in den Lysaten und dem Medium von C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen im Western Blot. Der Proliferin-Antikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

V.3.3 MGF

MGF (Mast cell growth factor), auch SCF (Stem cell factor), Steel factor oder c-kit Ligand genannt, wird als membrangebundenes Protein mit einer zytoplasmatischen, Transmembran- und extrazellulären Domäne produziert. MGF ist der Ligand für den Rezeptor KIT, das Proteinprodukt des c-kit Protoonkogens. MGF spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und Keimzell-Entwicklung. Außerdem stimuliert MGF die Entwicklung von Mastzellen und Melanozyten (Galli *et al.*, 1994). MGF kann extrazellulär nahe der Membran proteolytisch gespalten werden, wobei die freie aus 165 Aminosäuren bestehende Form von

MGF entsteht (Arakawa *et al.*, 1991). Die hierfür notwendigen Proteasen sind bis auf Mastzellen Chymase (Longley *et al.*, 1997) noch weitestgehend unbekannt. Aber sowohl membrangebundenes als auch freies MGF können die Rezeptor-Tyrosin-Kinase KIT aktivieren, welche zu den Typ III Rezeptor Tyrosin Kinasen gehört. In Lösung kann MGF nichtkovalente Homodimere bilden (Arakawa *et al.*, 1991), obwohl es unter physiologischen Bedingungen mehr als Monomer vorkommt. Auch der Rezeptor KIT kann proteolytisch gespalten werden und auch in löslicher Form noch MGF binden. Dadurch hat er wahrscheinlich einen antagonistischen Effekt auf die biologische Wirkung von MGF (Broudy *et al.*, 2001).

Für den Nachweis von MGF im Western Blot wurden die Zelllysate von C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen in einem 12,5%igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde in einer 5%igen BSA-Lösung in TBS/T blockiert und 1 h mit 0,2 µg/ml MGF-Antikörper inkubiert. Der sekundäre Anti-Ziege-Antikörper wurde 1:25000 in TBS/T eingesetzt.

Es waren keine signifikanten Unterschiede in der MGF-Expression zwischen den C57MG-Zellen mit aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg zu beobachten (Abbildung V.23). Auch die Behandlung mit LiCl hatte keinen Effekt auf die MGF-Expression. Es wurden auch die von den Mäusezellen sekretierten Proteine mittels Western Blot auf MGF untersucht. Es konnte jedoch kein MGF detektiert werden, was bedeutet, dass es von den Zellen nicht freigesetzt wurde.

Zusammenfassend kann also von keinen signifikanten Änderungen der mRNA-Transkriptmenge und der MGF-Proteinmenge aufgrund eines aktiven Wnt-Signalwegs in den verwendeten C57MG-Zellen gesprochen werden.

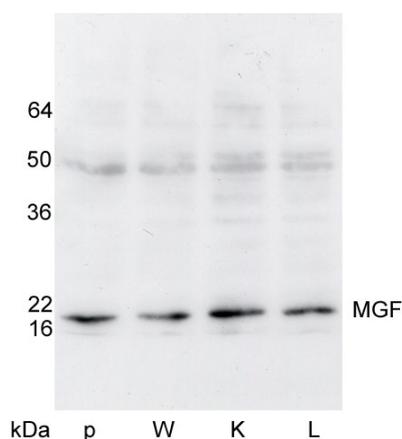


Abb. V.23: Immunologischer Nachweis von MGF in C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen im Western Blot. Der MGF-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 0,2 µg/ml eingesetzt. p: C57MG-pLNCx, W: C57MG-Wnt-1, K: C57MG + KCl, L: C57MG + LiCl.

VI. Diskussion

Der Wnt-Signalweg ist für die embryonale Entwicklung von großer Bedeutung und in adulten Organismen häufig in die Tumorentstehung involviert. Bei der Entstehung eines Kolorektalkarzinoms ist die Fehlregulation des Wnt-Signalwegs vermutlich für den primären Schritt der Tumorentwicklung, den der Polypenbildung, verantwortlich (van de Wetering *et al.*, 2002). Um die Folgen eines aktivierten Wnt-Signalwegs in der Tumorentstehung besser zu verstehen, ist die Kenntnis der Zielgene des Wnt-Signalwegs von großer Bedeutung. Viele der bis heute bekannten Zielgene codieren Proteine, die mit der Bedeutung des Wnt-Signalwegs in der Kanzerogenese in Zusammenhang gebracht werden können (siehe I.2.1). Dies betrifft vor allem manche Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren, deren Transkription durch β -Catenin/TCF aktiviert werden kann. Gene, deren Transkription durch einen aktiven Wnt-Signalweg reprimiert wird, sind bisher wenig charakterisiert worden. Die vermehrte Untersuchung der Genexpressionsmuster in Wnt-aktivierten Zellen mittels DNA-Microarrays deutet darauf hin, dass der Wnt-Signalweg auch hemmend auf die Transkription vieler Gene wirken kann. Über Mechanismen der Genrepression durch den Wnt-Signalweg ist allerdings nur wenig bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue Gene zu identifizieren, die durch den Wnt-Signalweg in Mäusezellen reguliert sind. Ausgehend von Daten eines DNA-Microarrays wurden 8 Gene (Gnb1, MGF, Lgals8, Proliferin, Gbp3, TIS 11, 14-3-3 γ und Ramp3) ausgewählt, die Unterschiede in der Genexpression in den C57MG-Wnt-1-Zellen zeigten, wobei 7 dieser Gene gehemmt und eines aktiviert waren. Diese Regulation sollte für jedes einzelne Gen in Northern Blot-Analysen mit RNA aus Mäusezelllinien mit aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg untersucht werden (siehe V.1). Für Gene, bei denen Unterschiede in der Genexpression zu beobachten waren, wurde überprüft, ob der Einfluss des Wnt-Signalwegs nicht nur auf mRNA-Ebene zu detektieren ist, sondern sich auch in der Proteinexpression widerspiegelt (siehe V.3). Des Weiteren wurde, falls der Promotor des regulierten Gens bekannt war, dessen Transkriptionsaktivität in Reportergen-Assays in Zusammenhang mit einem aktiven und einem inaktiven Wnt-Signalweg analysiert (siehe V.2).

VI.1 Expressionsanalysen

Von den 8 untersuchten Mäusegenen, für die es aufgrund der Daten des DNA-Microarrays Hinweise auf eine Regulation durch den Wnt-Signalweg gab, war das Gnb1-Gen in C57MG-Wnt-1-Zellen aktiviert. Alle anderen ausgewählten Gene (MGF, Lgals8, Proliferin, Gbp3, TIS 11, 14-3-3 γ und Ramp3) zeigten in der Transkriptionsanalyse mittels DNA-Microarrays eine Hemmung in den Mäusezellen mit aktivem Wnt-Signalweg (C57MG-Wnt-1). In dieser Arbeit wurde die Regulation dieser 8 Gene in Wnt-aktivierten Mäusezelllinien in Northern Blot-Analysen untersucht (Zusammenfassung in Tabelle VI.1). Dazu wurden zum einen die mRNA-Transkriptmengen zwischen C57MG-pLNCx-Zellen und C57MG-Wnt-1-Zellen, in denen der Wnt-Signalweg permanent aktiv ist verglichen. Zum anderen wurden C57MG-Zellen, die mit KCl oder LiCl für 24 h inkubiert wurden, miteinander verglichen. Lithium inhibiert die GSK3 β , wodurch in den so behandelten Zellen der Wnt-Signalweg unterhalb der Kinase aktiviert ist.

Gen	Aktivierung in C57MG- Wnt-1 auf Microarray	Regulation in Northern Blot-Analyse		Regulation in Western Blot-Analyse	
		C57MG- pLNCx vs C57MG-Wnt-1	C57MG + KCl vs C57MG + LiCl	C57MG- pLNCx vs C57MG-Wnt-1	C57MG + KCl vs C57MG + LiCl
Gnb1	+ 8	keine	keine		
MGF	- 2,7	(+)	(-)	keine	keine
Lgals8	- 3,2	keine	keine		
Proliferin	- 3,4 - 4,8 - 5,9	--	+++	+++	++
Gbp3	- 4,1	keine	keine		
TIS 11	- 4,2	keine	keine		
14-3-3 γ	- 4,4	keine	keine		
Ramp3	- 13,4	--	--	--	--

Tabelle VI.1: Ergebnisse der Transkriptionsanalysen mittels Northern Blot und der Analysen der Proteinexpression im Western Blot. -/---: in den Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg schwächer exprimiert, +/+/++: in den Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg stärker exprimiert.

Für Gnb1 konnte in der Northern Blot-Analyse keine Regulation durch den Wnt-Signalweg in den miteinander verglichenen Zelllinien beobachtet werden, obwohl neben dem Ergebnis des DNA-Microarrays auch eine im Promotor des Gens vorhandene potentielle TCF/LEF-Bindungsstelle einen Hinweis auf eine mögliche Regulation durch β -Catenin/TCF gab.

Ebenso ergaben die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen mittels Northern Blot von Lgals8, Gbp3, TIS 11 und dem 14-3-3 Protein γ , dass der Wnt-Signalweg auf die Transkription dieser vier Gene in den untersuchten Mäusezellen keinen Einfluss hat. Es ist anzunehmen, dass geringe Signalunterschiede im DNA-Microarray nicht signifikant sind und es deswegen weiterer DNA-Microarray-Hybridisierungen bedarf, um sicherere Hinweise auf Expressionsunterschiede zu bekommen. Der mögliche Fehlerbereich wird zum Beispiel durch die DNA-Microarray-Daten der drei verschiedenen Proliferin-Sequenzen deutlich. Die Werte lagen hier zwischen – 3,4 und – 5,9, obwohl sich zwei der immobilisierten Sequenzen (K02245 und K03235) nahezu gleichen (siehe Sequenzvergleich im Anhang).

Bei MGF waren sehr geringe Unterschiede und bei Proliferin und Ramp3 starke Unterschiede in den Transkriptmengen von Proben mit aktivem bzw. inaktivem Wnt-Signalweg im Northern Blot zu detektieren. Die Regulation dieser Gene soll in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

VI.2 MGF

Bei Untersuchung der MGF-Transkription mittels Northern Blot waren leichte Unterschiede in der mRNA-Menge zwischen C57MG-pLNCx- und C57MG-Wnt-1-Zellen sowie zwischen C57MG-Zellen, die mit KCl bzw. LiCl inkubiert wurden, zu detektieren. Diese waren aber, verglichen mit der β -Actin-Transkription, offenbar nicht signifikant. Dass das MGF-Gen in den untersuchten Mäusezellen keiner Regulation unterliegt, konnte auch bei Analyse der Proteinexpression im Western Blot beobachtet werden. In allen Lysaten von C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen waren identische MGF-Mengen nachweisbar (siehe Abbildung V.23 und Tabelle VI.1). Im Medium dieser Zelllinien war kein MGF detektierbar. Offensichtlich wird MGF, welches als Transmembran-Protein in der äußeren Zellmembran eingelagert ist und durch extrazelluläre Proteasen durch Trennung von der Transmembran-Domäne freigesetzt werden kann, von den C57MG-Zellen nicht proteolytisch freigesetzt.

Für die Untersuchung des MGF-Promotors im Zusammenhang mit einem aktivierten Wnt-Signalweg wurde der Promotor aus genomischer Mäuse-DNA amplifiziert und in den Vektor pKS+/Ltk80-luc kloniert, sodass das Luziferase-Gen unter der Kontrolle dieses Promotors stand. Bei Analyse der Transkriptionsaktivität des MGF-Promotors, welcher ein potentiell TCF/LEF-Motiv enthält, waren in Reporter-Gen-Assays geringe Aktivierungen in den Ansätzen mit aktivem Wnt-Signalweg gegenüber denen mit inaktivem Signalweg zu beobachten (siehe V.2.3). Es wurde der Effekt von wt APC auf die Promotor-Aktivität nach Transfektion in

SW480-Zellen und der Einfluss von β -Catenin S33Y nach Transfektion in RK13- sowie HEK293-Zellen untersucht. In diesen Assays war eine 1,5fache Aktivierung des MGF-Promotors in den Wnt-aktivierten Ansätzen zu erkennen. Aktivierungen dieser Größenordnung sind für Reporter-Gen-Assays aber nicht signifikant. Die Inkubation transfizierter RK13-Zellen mit Lithium führte im Reporter-Gen-Assay zu einer 2fachen und damit etwas stärkeren Transkriptionsaktivierung des MGF-Promotors in den Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg. Dieser Assay wurde jedoch nicht mehrfach durchgeführt, weshalb dessen Aussagekraft mit Vorsicht zu betrachten ist.

Um den Einfluss des potentiellen TCF/LEF-Motivs in der Promotor-Sequenz auf die beobachtete schwache Aktivierung in den verschiedenen Assays zu untersuchen, wurde das Motiv mittels QuikChange-PCR so mutiert, dass das Erkennungsmotiv für TCF zerstört wurde. Dabei wurde die Sequenz von 5'-AACAAATG-3' zu 5'-GGCAATG-3' verändert, analog der Analyse des c-myc-Promotors von He *et al.* (1998). Jedoch zeigte der mutierte Promotor anschließend in den Reporter-Gen-Assays keine signifikante Luziferase-Aktivität mehr (siehe V.2.5), weshalb zur Bedeutung des TCF/LEF-Motivs keine Aussage getroffen werden kann. Es könnte sein, dass während der QuikChange-PCR Mutationen im Vektor, z.B. im Luziferase-Gen, aufgetreten sind. Durch eine Umklonierung des mutierten Promotor-Fragments in einen auf seine Funktion überprüften pKS+/Ltk80-luc Vektor könnte dieser Grund für die geringe Luziferase-Aktivität ausgeschlossen werden.

Die Analysen der MGF-Transkription und der MGF-Expression deuten darauf hin, dass der Wnt-Signalweg in den untersuchten Mäusezellen keinen Einfluss auf die Regulation von MGF hat. Der MGF-Promotor zeigte in Reporter-Gen-Assays eine geringe Aktivierung in Wnt-aktivierten Ansätzen, die in ihrer Größenordnung aber für Reporter-Gen-Assays nicht signifikant war. Durch diese Untersuchungen konnten die Daten der DNA-Microarray-Analyse auf eine verringerte MGF-Transkription in C57MG-Wnt-1-Zellen nicht bestätigt werden. Die Daten einer DNA-Microarray-Hybridisierung von van de Wetering *et al.* (2002) geben Hinweise auf eine Aktivierung der MGF-Transkription in menschlichen Darmtumor-zellen mit dominant positiver β -Catenin-Mutation. Diese Hinweise konnten aber nicht auf das untersuchte Mäuse-Homolog übertragen werden. In den untersuchten C57MG-Zellen scheint MGF nicht durch den Wnt-Signalweg reguliert zu werden.

Der Rezeptor von MGF (KIT) ist ein Protoonkogen, weshalb eine veränderte Expression von MGF oder seinem Rezeptor in der Kanzerogenese durchaus eine Rolle spielen könnte. Somit wäre eine Analyse des Einflusses des Wnt-Signalwegs auf die Transkription des menschlichen MGFs und seines Rezeptors KIT in Zukunft durchaus interessant.

VI.3 Proliferin

Die Hinweise der DNA-Microarray-Analyse auf eine Hemmung der Transkription von Proliferin in C57MG-Wnt-1-Zellen konnten in dieser Arbeit mittels Northern Blot-Analyse bestätigt werden. Die mRNA-Transkription von Proliferin war in den C57MG-Wnt-1-Zellen deutlich geringer als in den C57MG-pLNCx-Zellen. Zwischen den mit KCl und LiCl behandelten C57MG-Zellen war hingegen der umgekehrte Effekt zu beobachten (siehe Tabelle VI.1 und Abbildung V.22). Die Proliferin-Transkription war in den mit LiCl inkubierten Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg viel stärker als in Zellen mit inaktivem Wnt-Signalweg. Erstaunlicherweise war jedoch die Proliferin-Expression in Western Blot-Analysen in beiden Wnt-aktivierten Proben erhöht: Nicht nur in den mit LiCl behandelten Zellen war mit dem Antikörper mehr Proliferin zu detektieren als in den mit KCl behandelten C57MG-Zellen, sondern auch in den C57MG-Wnt-1-Zellen wurde deutlich mehr Protein exprimiert als in den C57MG-pLNCx-Zellen mit inaktivem Wnt-Signalweg. Dabei wäre eigentlich entsprechend der mRNA-Menge eine verringerte Proteinmenge in den C57MG-Wnt-1-Zellen zu erwarten gewesen.

Auf Transkriptionsebene erfolgt offensichtlich eine andere Regulation der Proliferin-Gene durch Lithium als in den C57MG-Wnt-1-Zellen. Da Lithium neben der GSK3 β auch andere Proteine, zum Beispiel die Inositol-Monophosphatase hemmt, ist dies wahrscheinlich.

Es ist anzunehmen, dass die in den Transkriptions-Analysen verwendete Proliferin-Sonde alle vier Proliferine detektiert, da die Sonde zu allen vier Genen zu mindestens 92 % homolog ist. Folglich kann keine Aussage darüber getroffen werden, welches der vier Proliferin-Gene auf Transkriptionsebene in den C57MG-Wnt-1-Zellen reprimiert wird oder ob alle Gene gleichermaßen betroffen sind. Die Transkription der verschiedenen Proliferine könnte durch den Wnt-Signalweg jeweils unterschiedlich beeinflusst sein. Ebenso ist unklar, welche der Proliferin-Gene in den mit LiCl behandelten Zellen aktiviert werden.

Aufgrund der hohen Homologie der vier Proliferine untereinander kann der verwendete Proliferin-Antikörper ebenso nicht zwischen den vier Proteinen unterscheiden und detektiert in den Western Blot-Analysen alle vier Proliferine, sofern sie in der Zelle exprimiert werden.

Geht man davon aus, dass mit der Sonde und dem Antikörper die gleichen Proliferin-Isoformen detektiert wurden, sollte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene in der Regel die gleiche Regulation zu erkennen sein. Für die C57MG-pLNCx- und C57MG-Wnt-1-Zellen war das aber nicht der Fall und könnte daher ein Hinweis auf eine Regulation der Proliferin-Expression auf Translationsebene sein. Es könnte für das beobachtete Phänomen aber auch ein sogenannter negativer „Feedback“-Mechanismus verantwortlich sein, wie er zum Beispiel für β TrCP (Spiegelman *et al.*, 2000) gezeigt wurde. Dies bedeutet,

dass Proliferin in hohen Konzentrationen seine eigene Transkriptionsaktivierung inhibiert. Da Proliferin im Zellkulturmedium vermutlich nicht schnell abgebaut wird, kann es sich dort nach jedem Mediumwechsel mit der Zeit anreichern und es kommt zu keiner Verringerung der Proteinmenge, auch wenn nach einiger Zeit kein Proliferin mehr sekretiert wird. Daher war im Western Blot eine große Proliferin-Proteinmenge im Medium der C57MG-Wnt-1-Zellen zu detektieren. Die Proliferin-Transkription wurde jedoch gehemmt, wie im Northern Blot zu sehen war.

In den mit LiCl behandelten C57MG-Zellen war keine Hemmung der Transkription, sondern eine Aktivierung zu sehen. Daher ist zu vermuten, dass durch die von Proliferin möglicherweise ausgehende „Feedback“-Schleife entweder eine Komponente oberhalb der GSK3 β im Signalweg gehemmt wird, oder aber die Inkubationszeit mit LiCl noch nicht ausreichte, um den „Feedback“-Mechanismus beobachten zu können. Sonst wäre der „Feedback“-Effekt auch in den mit LiCl behandelten Zellen zu detektieren. Der „Feedback“-Mechanismus muss aber nicht über den Wnt-Signalweg greifen. Er kann auch über andere Wege und Komponenten erfolgen. Diese könnten zufällig auch durch Lithium inhibiert werden, sodass in den mit LiCl behandelten Zellen keine Inhibition der Proliferin-Transkription durch eine hohe Proliferinkonzentration erfolgt.

Ein Nachteil der verwendeten C57MG-Wnt-1-Zellen besteht darin, dass Wnt-1 ständig und ununterbrochen auf die Zellen wirkt. Der Wnt-Signalweg ist in diesen Zellen also permanent aktiv. Um den Verlauf einer Regulation durch den Wnt-Signalweg besser beobachten zu können, wäre gerade im Fall einer möglichen „Feedback“-Schleife eine nach der Zeit aufgelöste Analyse der Wnt-Aktivierung sinnvoll. Diese Analyse ist mit dem Medium einer Maus-Fibroblastenzelllinie (L-Zellen) realisierbar, die funktionelles Wnt-3A ins Medium sekretiert. Mit diesem Medium könnte man C57MG-Zellen unterschiedlich lange stimulieren und die Regulation von Proliferin durch den Wnt-Signalweg zeitaufgelöst untersuchen, denn genau wie Wnt-1 kann auch Wnt-3A diese Zellen transformieren. Durch Beobachtung der Proliferin-Transkriptmenge wäre feststellbar, ob die mRNA-Menge zuerst ansteigt und dann wieder abfällt, was einen „Feedback“-Mechanismus bestätigen würde.

Es gibt ferner die Möglichkeit, die Proliferin-mRNAs in den verwendeten Zelllinien genauer zu analysieren, um die Proliferin-Isoformen zu identifizieren, die in den verschiedenen Zelllinien exprimiert werden und zu untersuchen, ob darin Unterschiede vorliegen. Aufgrund kleiner Differenzen in den cDNAs der Proliferine ergeben sich unterschiedliche Restriktionsschnittstellen. Durch Restriktionshydrolyse nach RT-PCR ist dann eine Unterscheidung der Proliferine möglich (Fang *et al.*, 1999).

Außerdem wurde in dieser Arbeit der Promotor von Proliferin 1 untersucht. Der Promotor enthält zwei Sequenzen, die der eines TCF/LEF-Motivs gleichen, sowie eine Sequenz, die dieser fast identisch ist. Das Vorhandensein dieser potentiellen TCF/LEF-Motive gibt einen Hinweis darauf, dass Proliferin durch den Wnt-Signalweg über β -Catenin/TCF reguliert sein könnte. Um die Transkriptionsaktivität des Proliferin-Promotors zu analysieren, wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt, in denen das Luziferase-Gen unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt wurde. Es wurde der Effekt von wt APC auf die Promotor-Aktivität nach Transfektion in SW480-Zellen und der Einfluss von β -Catenin S33Y nach Transfektion in RK13-Zellen untersucht. In beiden Assays war die absolute Luziferase-Aktivität des untersuchten Proliferin-Promotors jedoch zu gering, um eine Aussage über dessen Regulation durch den Wnt-Signalweg treffen zu können. Um auszuschließen, dass dies an einem Defekt im pKS+/Ltk80-luc-Vektor lag, zum Beispiel an einer Mutation im Luziferase-Gen, wurde das Promotor-Fragment in einen auf seine Funktion überprüften Reporter-Genvektor kloniert. Aber auch die Reporter-Gen-Assays mit diesem umklonierten Promotor zeigten keine stärkere Luziferase-Aktivität (siehe V.2.2). In dem Promotor scheinen Sequenzen zu existieren, die die Analysen mit einem Reporter-Gen-Assay stören. Es könnten zum Beispiel inhibierende Faktoren an den Promotor binden, oder es fehlen essentielle zusätzliche Koaktivatoren, sodass eine Transkription nicht möglich ist.

Dass weitere Faktoren eine Rolle spielen, zeigen auch Experimente von Linzer *et al.* (1987). Sie untersuchten den Proliferin 1-Promotor (PLF149) und einen anderen Proliferin-Promotor (PLF42), dem sie kein bestimmtes Proliferin-Gen zuordnen konnten, auf ihre durch Serum induzierbare Transkriptionsaktivität. Die beiden Promotoren sind zu 97 % homolog. Trotzdem war einer der beiden Promotoren (PLF42) um das 10- bis 15fache stärker durch Serum aktivierbar als der andere. Dies zeigt, dass die Regulation der verschiedenen Proliferin-Promotoren trotz der extremen Homologie untereinander stark variiert und von weiteren Faktoren abhängig ist. Diese können auch gewebetypisch sein, da die Proliferine sehr gewebespezifisch exprimiert werden.

Letztlich kann keine Aussage über die Transkriptionsaktivität des Proliferin 1-Promotors im Rahmen dieser Arbeit getroffen werden. Um dem beobachteten inhibierenden Effekt auszuweichen, besteht die Möglichkeit einzelne Fragmente des Promotors, die die potentiellen TCF/LEF-Motive enthalten, in Reporter-Gen-Assays zu untersuchen, um deren Bedeutung für die Regulation durch den Wnt-Signalweg zu analysieren. Dieses Verfahren wurde auch zur Untersuchung des Cyclin D1-Promotors von Tetsu und McCormick (1999) angewendet.

Eine weitere Möglichkeit, um zu analysieren, ob die Regulation der Proliferin-Transkription über den β -Catenin/TCF-Komplex erfolgt, ist der EMSA (Electrophoretic mobility-shift-assay).

Mit dieser Methode könnte untersucht werden, ob dieser Komplex die Fähigkeit besitzt, an den Promotor zu binden, und damit für die Regulation eine Rolle spielt.

Des Weiteren könnten auch andere der Proliferin-Promotoren, welche dem Proliferin 1-Promotor zu 97 % homolog sind, auf ihre Aktivität in Zusammenhang mit einem aktiven Wnt-Signalweg untersucht werden. Aufgrund der Beobachtungen in den Northern Blot- und Western Blot-Analysen besteht die Möglichkeit, dass sie alle unterschiedlich durch den Wnt-Signalweg beeinflusst werden.

Proliferine wirken angiogen. Toft *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Proliferine eine essentielle Rolle in der Angiogenese von Maus-Fibrosarkomen spielen und damit von Bedeutung bei der Tumorprogression sind. In den Western Blot-Analysen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Proliferine in Mäusezellen mit aktivem Wnt-Signalweg vermehrt exprimiert werden. Die vermehrte Proliferin-Expression könnte einen Wachstums-vorteil für eine Tumorzelle bedeuten und folglich in der Tumorentstehung eine Rolle spielen. Somit wäre auch eine Untersuchung der Regulation der menschlichen Proliferin-Homologe durch den Wnt-Signalweg sehr interessant. Sollte ein aktiver Wnt-Signalweg in menschlichen Zellen ebenso wie in den untersuchten Mäuseepithelzellen zu einer erhöhten Expression von Proliferin führen, könnte dies für die kolorektale Kanzerogenese von Bedeutung sein. Die angiogene Wirkung der Proliferine wird über den IGFII-Rezeptor vermittelt (Volpert *et al.*, 1996). Der IGFII-Rezeptor wird sowohl in normalen Darmepithelzellen als auch in Darmtumorzellen exprimiert. Eine Aktivierung von Proliferin durch den Wnt-Signalweg könnte somit die Angiogenese bei kolorektalen Tumoren fördern.

VI.4 Ramp3

Die Hybridisierung des DNA-Microarrays zeigte, dass die Ramp3-Transkriptmenge in den C57MG-Wnt-1-Zellen sehr stark gehemmt war. Dieser Hinweis auf eine Regulation durch den Wnt-Signalweg konnte in dieser Arbeit sowohl in Northern Blot-Analysen als auch auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt werden (siehe Tabelle VI.1). Die mRNA-Transkriptmenge war in den C57MG-Wnt-1-Zellen deutlich geringer als in den C57MG-pLNCx-Zellen. Ebenso war die Ramp3-Proteinmenge in den Wnt-1-aktivierten Zellen vermindert gegenüber der Kontrollzelllinie. Diese Regulation konnte auch in C57MG-Zellen beobachtet werden, in denen der Wnt-Signalweg durch Inhibierung der GSK3 β mit Lithium aktiviert wurde: In den mit LiCl behandelten Zellen war sowohl die mRNA-Transkriptmenge als auch die Proteinmenge an Ramp3 geringer als in den mit KCl behandelten Zellen. Es konnte folglich gezeigt werden, dass die Transkription von Ramp3 durch einen aktiven Wnt-

Signalweg negativ beeinflusst wird. Ob die Reprimierung der Transkription über β -Catenin und TCF vermittelt wird, kann aus den durchgeführten Experimenten nicht geschlossen werden.

Durch Stimulation von C57MG-Zellen mit Wnt-3A aus dem Medium einer Maus-Fibroblastenzelllinie (L-Zellen), die Wnt-3A exprimiert, könnte untersucht werden, ob die Repression von Ramp3 durch Wnt-1 auch bei Wnt-3A zu beobachten ist, was die Regulation bestätigen würde.

Zusätzlich wurde die Lokalisation von Ramp3 in den für die Experimente verwendeten Zelllinien durch immunocytochemische Färbung untersucht. Es war in den C57MG-pLNCx-, C57MG-Wnt-1-, C57MG + KCl- und C57MG + LiCl-Zellen vorwiegend im Zytoplasma zu detektieren. Signifikante Unterschiede waren zwischen den verschiedenen C57MG-Zellen nicht zu beobachten. Damit konnte für Ramp3 eine ähnliche zytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden, wie sie von Sexton *et al.* (2001) für Ramp1 gezeigt wurde.

In dieser Arbeit waren keine Analysen des Ramp3-Promotors möglich, da dieser noch nicht beschrieben ist. Daher ist auch nichts über potentielle TCF/LEF-Motive in der Promotor-Sequenz bekannt. Über welche Komponenten die Regulation vermittelt wird, könnte zum Beispiel durch Überexpression von β -Catenin in den Mäusezellen untersucht werden. Führt dies zu einer Verringerung der Ramp3-Transkriptmenge und Ramp3-Expression, ist β -Catenin an der Signalübertragung beteiligt. Eine andere Möglichkeit wäre die Transfektion einer dominant positiven β -Catenin-Mutante (z.B. β -Catenin S33Y), sodass in den Zellen der Wnt-Signalweg unterhalb von β -Catenin aktiviert ist. In Northern Blot-Analysen dieser Zellen sollte weniger Ramp3-mRNA zu detektieren sein als in Zellen, die zur Kontrolle mit dem Leervektor transfiziert wurden, wenn die Repression des Gens über β -Catenin vermittelt wird. Außerdem könnte untersucht werden, ob die Transfektion von dominant negativem TCF in Zellen mit aktivem Wnt-Signalweg wieder zur Aufhebung der Hemmung führt. Mit Hilfe dieser Analysen könnte dann gezeigt werden, ob die Verringerung der Ramp3-Transkription über β -Catenin/TCF vermittelt wird.

Bisher wurden nur wenige Gene charakterisiert, die durch einen aktiven Wnt-Signalweg in ihrer Transkription inhibiert werden. Es gibt auch die Möglichkeit, dass die Repression nicht über β -Catenin/TCF sondern über andere noch unbekannte Faktoren vermittelt wird, wie es zum Beispiel bei der Regulation des Periostin-Gens beobachtet wurde (Haertel-Wiesmann *et al.*, 2000). Die Ramp3-Transkription könnte zum Beispiel auch über die Aktivierung eines anderen Zielgens des Wnt-Signalwegs indirekt reguliert werden.

Da in dieser Arbeit ein Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Ramp3-Transkription in Mäusezellen gezeigt werden konnte, wäre die Frage interessant, ob dieser Effekt auch in menschlichen Zellen zu beobachten ist. In einem Western Blot konnte gezeigt werden, dass Ramp3 auch in menschlichen Darmtumorzelllinien (SW480 und HCT116) exprimiert wird (siehe V.3.1). Es fehlt jedoch der Vergleich zu normalen Darmzellen. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob durch Transfektion von wt APC in SW480-Zellen die Ramp3-Expression ansteigt.

Schließlich stellt sich die Frage, welche Veränderungen eine verringerte Ramp3-Expression in einer Zelle hervorruft. Da es für den Transport mancher Rezeptoren von inneren Zellkompartimenten an die Plasmamembran benötigt wird, könnte sich die verringerte Ramp3-Expression durch eine Veränderung in den auf der Zelle präsentierten Membranrezeptoren bemerkbar machen. Außerdem modifizieren die Ramp-Proteine die Spezifität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren für ihre Liganden. Beide Effekte würden also zu einer Veränderung in der Transduktion von extrazellulären Signalen führen.

VII. Zusammenfassung

Der Wnt-Signalweg spielt sowohl in der Embryogenese als auch bei der Entwicklung von Tumoren, wie zum Beispiel in der kolorektalen Kanzerogenese eine wichtige Rolle. Eine permanente Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Mutationen in APC, β -Catenin oder Axin führt im Darm aufgrund der damit verbundenen Änderung der Genexpression zur Polypenbildung und damit zum ersten Schritt in der Entwicklung eines Kolorektalkarzinoms. In Brusttumoren von Mäusen kommt es durch die provirale Integration des MMT-Virus zur Aktivierung von Wnt-1. Die Identifizierung und Charakterisierung von Zielgenen des Wnt-Signalwegs ist somit von großer Bedeutung, um die Prozesse der Tumorentstehung besser verstehen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Transkription von 8 verschiedenen Mäusegenen in Brustepithelzellen der Maus (C57MG-Zellen) untersucht. Hierbei handelte es sich um Gnb1, MGF, Lgals8, Proliferin, Gbp3, TIS 11, 14-3-3 γ und Ramp3. Ausgewählt wurden diese Gene aufgrund der Ergebnisse eines DNA-Microarrays, der mit cDNA aus C57MG-Wnt-1-Zellen und C57MG-pLNCx-Zellen (Kontrollzelllinie) hybridisiert wurde und Hinweise auf eine Regulation dieser Gene durch den Wnt-Signalweg gab.

Die Expression dieser Gene wurde in Northern Blot-Analysen untersucht. Es wurden jeweils die mRNA-Transkriptmengen zwischen C57MG-Wnt-1-Zellen, in denen der Wnt-Signalweg aktiviert ist, mit der Kontrollzelllinie C57MG-pLNCx verglichen. Da Lithium durch Inhibition der GSK3 β den Wnt-Signalweg unterhalb dieser Kinase aktiviert, wurde auch der Einfluss von Lithium auf die Transkription in C57MG-Zellen untersucht.

Für die Gene von Gnb1, Lgals8, Gbp3, TIS 11 und 14-3-3 γ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mRNA-Transkriptmengen von Zellen mit aktivem oder inaktivem Wnt-Signalweg detektiert werden. Der Wnt-Signalweg hat in den untersuchten Mäusezellen keinen Einfluss auf die Transkription dieser Gene.

Für das MGF-Gen wurden in Northern Blot-Analysen geringe Unterschiede in der Genexpression detektiert. Nach zusätzlicher Analyse der Proteinexpression in den oben genannten Mäusezellen mit aktivem und inaktivem Wnt-Signalweg und der Untersuchung der MGF-Promotoraktivität in Reporteragen-Assays kann jedoch ein signifikanter Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die MGF-Genexpression in den C57MG-Zellen ausgeschlossen werden.

Die Proliferin-Expression zeigte große Unterschiede in den Northern Blot-Analysen. In C57MG-pLNCx-Zellen wurde Proliferin deutlich stärker transkribiert als in C57MG-Wnt-1-Zellen. Im Gegensatz dazu war die Transkription in LiCl behandelten Zellen gegenüber KCl behandelten Zellen stark erhöht. Erstaunlicherweise war die Proliferin-Proteinexpression aber sowohl in den stabil Wnt-1 infizierten Zellen als auch in den mit LiCl behandelten Zellen stärker als in den jeweiligen Kontrollzellen mit inaktivem Wnt-Signalweg. Daher besteht die Möglichkeit eines negativen „Feedback“-Mechanismus, in dem Proliferin ab einer bestimmten Proteinkonzentration seine eigene Transkription wieder reprimiert.

Im Proliferin-Promotor sind mehrere potentielle TCF/LEF-Bindungsmotive enthalten. Diese spielen bei zahlreichen Zielgenen des Wnt-Signalwegs eine wichtige Rolle. Eine Untersuchung des Proliferin-Promotors in Reporteragen-Assays führte aufgrund zu geringer Reporteragenaktivität zu keinen auswertbaren Ergebnissen. Es ist anzunehmen, dass inhibierende Elemente den Assay störten oder wichtige zusätzliche Koaktivatoren in den Zellen fehlten.

Für Ramp3 wurde sowohl in den C57MG-Wnt-1-Zellen als auch in den mit LiCl behandelten Zellen eine Hemmung der Transkription gegenüber den Kontrollzellen mit inaktivem Wnt-Signalweg beobachtet. Diese Repression durch einen aktiven Wnt-Signalweg konnte in den Mäusezellen auch auf Proteinebene in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden. Folglich hat ein aktiver Wnt-Signalweg in den Mäusezellen einen negativen Einfluss auf die Ramp3-Expression. Durch immunocytochemische Färbungen wurde die zelluläre Lokalisation von Ramp3 in den oben genannten Mäusezellen untersucht. Es konnte eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Gene identifiziert werden, deren Expression durch einen aktiven Wnt-Signalweg in Brustepithelzellen der Maus beeinflusst wird. Ob der Einfluss durch β -Catenin/TCF erfolgt und ob Ramp3 und Proliferin damit direkte Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs sind, muss in Zukunft durch weitere Experimente geklärt werden.

VIII. Literatur

- Arakawa,T., Yphantis,D.A., Lary,J.W., Narhi,L.O., Lu,H.S., Prestrelski,S.J., Clogston,C.L., Zsebo,K.M., Mendiaz,E.A., Wypych,J. und Langley,K.E. (1991) Glycosylated and unglycosylated recombinant derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 18942.
- Baldino,F., Chesselet,M-F., Lewis,M.,E. (1989) High-resolution in situ hybridisation histochemistry. *Meth. Enzymol.*, **168**, 768-777.
- Barker,N., Hurlstone,A., Musisi,H., Miles,A., Bienz,M., Clevers,H. (2001) The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -catenin to promote target gene activation. *EMBO Journal*, **20**, 4935-4943.
- Battle,E., Henderson,J.T., Beghtel,H., van den Born,M.M.W., Sancho,E., Huls,G., Meeldijk,J., Robertson,J., van de Wetering,M., Pawson,T., Clevers,H. (2002) β -Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell*, **111**, 251-263.
- Bauer,A., Huber,O., Kemler,R. (1998) Pontin52, an interaction partner of β -catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 14787-14792.
- Bauer,A., Chauvet,S., Huber,O., Usseglio,F., Rothbächer,U., Aragnol,D., Kemler,R., Pradel,J. (2000) Pontin52 and Reptin52 function as antagonistic regulators of β -catenin signalling activity. *EMBO Journal*, **19**, 6121-6130.
- Beale,A.J. (1963) *Lancet*, **2**, 640.
- Bedell,M.A., Copeland,N.G., Jenkins,N.A. (1996) Multiple pathways for *steel* regulation suggested by genomic and sequence analysis of the murine *steel* gene. *Genetics*, **142**, 927-934.
- Bhanot,P., Brink,M., Samos,C.H., Hsieh,J.C., Wang,Y., Macke,J.P., Andrew,D., Nathans,J. und Nusse,R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, **382**, 225-230.
- Bienz,M. (1998) TCF: transcriptional activator or repressor?. *Current Biology*, **10**, 366-372.
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brantjes,H., Barker,N., van Es,J., Clevers,H. (2002) TCF: Lady justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol. Chem.*, **383**, 255-261.
- Brantjes,H., Roose,J., van de Wetering,M., Clevers,H. (2001) All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Research*, **29**, 1410-1419.
- Brattain,M.G., Fine,W.D., Khaled,F.M., Thompson,J. und Brattain,D.E. (1981) Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Resarch*, **41**, 1751-1756.
- Broudy,V.C., Lin,N.L., Sabath,D.F. (2001) The fifth immunoglobulin-like domain of the KIT receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine*, **15**, 188-195.
- Bruhn,L., Munnerlyn,A. und Grosschedl,R. (1997) ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR α enhancer function. *Genes Dev*, **11**, 640-653.

- Chen,G., Fernandez,J., Mische,S. und Courey,A.J. (1999) A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev*, **13**, 2218-2230.
- Chtarbova,S., Nimmrich,I., Erdmann,S., Herter,P., Renner,M., Kitajewski,J. und Müller,O. (2002) Murine Nr4a1 and Herpud1 are up-regulated by Wnt-1, but the homologous human genes are independent from beta-catenin activation. *Biochemical Journal*, **367**, 723-728.
- Clevers,H., van de Wetering,M. (1997) TCF/LEF factors earn their wings. *Trends in Genetics*, **13**, 485-489.
- Coleman,W.B. und Tsongalis,G.J. (2002) *The Molecular Basis of Human Cancer*. Humana Press, Totowa, New York.
- Compton,S.J. und Jones,C.G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, **151**, 369-374.
- Corbacho,A.M., de la Escalera,G.M., Clapp,C. (2002) Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology*, **173**, 219-238.
- Derst,C., Engel,H., Grzeschik,K.H., Daut,J. (2000) Genomic structure and chromosome mapping of human and mouse RAMP genes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **90**, 115-118.
- Fang,Y., Lepont,P., Fasset,J.T., Ford,S.P., Mubaidin,A., Hamilton,R.T., Nilsen-Hamilton,M. (1999) Signaling between the Placenta and the Uterus involving the mitogen-regulated Protein/Proliferins. *Endocrinology*, **140**, 5239-5249.
- Fassett,J.T. und Nielsen-Hamilton,M. (2001) Mrp3, a new mitogen-regulated protein/proliferin gene expressed in wound healing and in hair follicles. *Endocrinology*, **142**, 2129-2137.
- Fassett,J.T. Hamilton,R.T. und Nielsen-Hamilton,M. (2000) Mrp4, a new mitogen-regulated protein/proliferin gene: unique in this gene family for its expression in adult mouse tail and ear. *Endocrinology*, **141**, 1863-1871.
- Fearnhead,N.S., Britton,M.P., Bodmer,W.F. (2001) The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, **10**, 721-733.
- Filali,M., Cheng,N., Abbott,D., Leontiev,V., Engelhardt,J.F. (2002) Wnt-3a/ β -catenin signalling induces transcription from the LEF-1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33398-33410.
- Fischer,J.A., Muff,R., Born,W. (2002) Functional relevance of G-protein-coupled-receptor-associated proteins, exemplified by receptor-activity-modifying proteins (RAMPs). *Biochemical Society Transactions*, **30**, 455-460.
- Galli,S.J., Zsebo,K.M. und Geissler,E.N. (1994) The kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunology*, **55**, 1-96.
- Giese,K., Kingsley,C., Kirshner,J. und Grosschedl,R. (1995) Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev*, **9**, 995-1008.
- Giles,R.H., van Es,J.H. und Clevers,H. (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signalling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1653**, 1-24.
- Groskopf,J.C., Syu,L.-J., Saltiel,A.R. und Linzer,D.I.H. (1997) Proliferin induces endothelial cell chemotaxis through a G Protein-coupled, Mitogen-activated Protein Kinase-dependent pathway. *Endocrinology*, **138**, 2835-2840.
- Grosschedl,R., Giese,K. und Pagel,J. (1994) HMG domain proteins: Architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends in Genetics*, **10**, 94-100.

- Haertel-Wiesmann, M., Liang, Y., Fantl, W.J. und Williams, L.T. (2000) Regulation of Cyclooxygenase-2 and Periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 32046-32051.
- Han, B.H., Park, D.J., Lim, R.W., Im, J.H. und Kim, H.D. (1998) Cloning, expression, and characterization of a novel guanylate-binding protein, GBP3 in murine erythroid progenitor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1384**, 373-386.
- He, T.-C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *EMBO Journal*, **20**, 4935-4943.
- Hecht, A., Litterst, C.M., Huber, O. und Kemler, R. (1999) Functional characterization of multiple transactivating elements in β -catenin, some of which interact with the TATA-binding protein *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 18017-18025.
- Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F. und Kemler, R. (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of β -catenin in vertebrates. *EMBO Journal*, **19**, 1839-1850.
- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F. und Waterman, M.L. (2001) Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature Genetics*, **28**, 53-57.
- Jordan, M., Schallhorn, A. und Wurm, F.M. (1996) Transfection mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research*, **24**, 596-601.
- Kahler, R.A. und Westendorf, J.J. (2003) Lymphoid Enhancer Factor-1 and β -Catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the Osteocalcin promoter. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 11937-11944.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1998) Landscaping the Cancer Terrain. *Science*, **280**, 1036-1037.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S., Ikeda, S., Kishida, M. und Kikuchi, A. (1999) DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Molecular & Cellular Biology*, **19**, 4414-4422.
- Klein, P.S., Melton, D.A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 8455-8459.
- Kolligs, F.T., Bommer, G., Göke, B. (2002) Wnt/Beta-Catenin/TCF signalling: A critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, **66**, 131-144.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Clevers, H. (1997) Constitutive transcriptional activation by a β -Catenin-Tcf complex in APC^{-/-} Colon Carcinoma. *Science*, **275**, 1784-1787.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Züllig, S., Basler, K. (2002) Wnt/Wingless signaling requires BCL9/Legless-mediated recruitment of Pygopus to the nuclear β -catenin-TCF complex. *Cell*, **109**, 47-60.
- Krauss, G. (1997) Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Wiley-VCH, Weinheim.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leibovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., McCoy, C.E., Mazur, K.C. und Mabry, N.D. (1976) Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Research*, **36**, 4562-4569.

- Levy, Y., Ronen, D., Bershadsky, A.D. und Zick, Y. (2003) Sustained induction of ERK, Protein Kinase B, and p70 S6 Kinase regulates cell spreading and formation of F-actin Mikrospeikes upon ligation of Integrins by Galectin-8, a mammalian Lectin. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 14533-14542.
- Linzer, D.I.H., Mordacq, J.C. (1987) Transcriptional regulation of proliferin gene expression in response to serum in transfected mouse cells. *EMBO Journal*, **6**, 2281-2288.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J.E. (2001) Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Longley, B.J., Tyrrell, L., Ma, Y., Williams, D.A., Halaban, R., Langley, K., Lu, H.S., Schechter, N.M. (1997) Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 9017-9021.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (Hrsg.) (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lustig, B., Behrens, J. (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.*, **129**, 199-221.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., Behrens, J. (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of Conductin/Axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 1184-1193.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M-L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., Hanski, C. (1999) Target genes of the β -catenin-T cell factor/lymphoid-enhancer-factor signalling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 1603-1608.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A. und Niehrs, C. (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-Catenin signalling. *Nature*, **417**, 664-667.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. und Niehrs, C. (2001(a)) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, **411**, 321-325.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., Wu, D. (2001(b)) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular Cell*, **7**, 801-809.
- McLatchie, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G. und Ford, S.M. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, **393**, 333-339.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1997) Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC. *Science*, **275**, 1787-1790.
- Mülhardt, C. (2000) Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986 [classical article]. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Nilsen-Hamilton, M., Shapiro, J.M., Massoglia, S.L. und Hamilton, R.T. (1980) Selective stimulation by mitogens of incorporation of ^{35}S -methionine into a family of proteins released into the medium by 3T3 cells. *Cell*, **20**, 19-28.
- Nusse, R. und 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**, 99-109.

- Pfeifer, M., Berg, S. und Reynolds, A.B. (1994) A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, **76**, 789-791.
- Phiel, C.J. und Klein, P.S. (2001) Molecular Targets of Lithium Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 789-813.
- Pingoud, A. und Urbanke, C. (1997) Elektrophorese. Arbeitsmethoden der Biochemie (ed. by A. Pingoud & C. Urbanke), pp. 101-131. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J. und Skarnes, W.C. (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, **407**, 535-538.
- Polakis, P. (1999) The oncogenic activation of β -catenin. *Current Opinion in Genetics & Development*, **9**, 15-21.
- Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes and Development*, **14**, 1837-1851.
- Rehm, H. (2000) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Renart, J., Reiser, J. und Stark, G.R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 3116-3120.
- Roose, J. und Clevers, H. (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **87456**, M23-M37.
- Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T. und Clevers, H. (1999) Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*, **285**, 1923-1926.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destrée, O., Clevers, H. (1998) The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, **395**, 608-612.
- Saiki, R.K., Faloona, F., Mullis, K., Horn, C., Erlich, H., und Arnheim, N. (1985) Emzymatik amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Salic, A., Lee, E., Mayer, L. und Kirschner, M.W. (2000) Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts. *Molecular Cell*, **5**, 523-532.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5463-5467.
- Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kuhl, M., Schaeffer, H.J., Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M. und Birchmeyer, W. (2002) The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev*, **16**, 2073-2084.
- Sexton, P.M., Albiston, A., Morfis, M., Tilakaratne, N. (2001) Receptor activity modifying proteins. *Cellular Signalling*, **13**, 73-83.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. und Maizel, J.V., Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **28**, 815-820.
- Shimizu, A.B., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M. und Kitajewski, J. (1997) Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of β -Catenin. *Cell Growth and Differentiation*, **8**, 1349-1358.
- Spiegelman, V.S., Slaga, T.J., Pagano, M., Minamoto, T., Ronai, Z., Fuchs, S.Y. (2000) Wnt/ β -Catenin signaling induces the expression and activity of β TrCP Ubiquitin Ligase Receptor. *Molecular Cell*, **5**, 877-882.

- Tamai,K., Semenov,M., Kato,Y., Spokony,R., Liu,C., Katsuyama,Y., Hess,F., Saint-Jeannet,J.P., He,X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, **407**, 530-535.
- Tetsu,O., McCormick,F. (1999) β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, **398**, 422-426.
- Thompson,B., Townsley,F., Rosin-Arbesfeld,R., Muisi,H. und Bienz,M. (2002). A nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nature Cell Biology*, **4**, 367-373.
- Toft,D.J., Rosenberg,S.B., Bergers,G., Volpert,O., Linzer,D.I.H. (2001) Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 13055-13059.
- Vaidya,A.B., Lasfargues,E.Y., Sheffield,J.B. und Coutinho,W.G. (1978) Murine mammary tumor virus (MuMTV) infection of an epithelial cell line established from C57BL/6 mouse mammary glands. *Virology*, **90**, 12-22.
- van der Heyden,M.A., Rook,M.B., Hermans,M.M., Rijksen,G., Boonstra,J., Defize,L.H. und Destree,O.H. (1998). Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *Journal of Cell Sci*, **111**, 1741-1749.
- van de Wetering,M., Sancho,E., Verweij,C., de Lau,W., Oving,I., Hurstone,A., van der Horn,K., Battle,E., Coudreuse,D., Haramis,A.-P., Tjong-Pon-Fong,M., Moerer,P., van den Born,M., Soete,G., Pals,S., Eilers,M., Medema,R., Clevers,H. (2002) The β -Catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, **111**, 241-250.
- van Noort,M. und Clevers,H. (2002) TCF Transcription Factors, Mediators of Wnt-Signaling in Development and Cancer. *Developmental Biology*, **244**, 1-8.
- van Noort,M. Meeldijk,J., van der Zee,R., Destree,O. und Clevers,H. (2002) Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 17901-17905.
- Vogelstein,B., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Preisinger,A.C., Leppert,M., Nakamura,Y., White,R., Smits,A.M. und Bos,J.L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*, **319**, 525-532.
- Vogelstein,B., Kinzler,K.W. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, **9**, 138-141.
- Volpert,O., Jackson,D., Bouck,N., Linzer,D.I.H. (1996) The Insulin-Like Growth Factor II/Mannose 6-Phosphate Receptor is required for proliferin-induced Angiogenesis. *Endocrinology*, **137**, 3871-3876.
- Weinberg,R.A. und Hanahan, D. (1996) The Molecular Pathogenesis of Cancer. In: Scientific American Molecular Oncology, Editors: Bishop,J.M. und Weinberg,R.A., Scientific American.
- Wilfinger,W.W., Mackey,K., Chomczynski,P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, **22**, 474-481.
- Winston,J.T., Strack,P., Beer-Romero,P., Chu,C.Y., Elledge,S.J. und Harper,J.W. (1999) The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and beta-catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev*, **13**, 270-283.
- 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. und 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.*, **98**, 14973-14978.

- Zhang,X., Gaspard,J.P., Chung,D.C. (2001) Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-ras pathways in Colonic Neoplasia. *Cancer Research*, **61**, 6050-6054.
- Zhang,Z., Zhang,R., Joachimiak,A., Schlessinger,J., Kong,X.-P. (2000) Crystal structure of human stem cell factor: Implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 7732-7737.

IX. Anhang

Sequenz des MGF-Promotors (mus musculus):

```

1 gaattctctc actcagcctg cggagaggaa tgcagtcttg gcaacagctg gttttccctc
61 aacaatagcc attttggact tttgaccctc aacagtaaga tgaacatgtg accatttaca
121 acattttattc tgagttaaata tctcgcagca caagtaggca actagcaaag ggagtttggc
181 atattaactt tttgttttgt ttgttttttA ACAATGgcaa gtgagcttct caaaccaaat
241 ttggaatact cctctcttat aagaatgact ggacagcata cttgttccaa aaaattactg
301 atggggattt gagggctaata ttttccttat aaaaataaca aaatgccttt tcgttttcct
361 caattacctt taaaaatatt gaagggcttc gagaaaaaga acattcttat ttggcatatt
421 attttttttt tagggcagta tgtccaaggt tctggatttg aatcacaact ctcggggttt
481 ttttgggggg ggggaattaac ctcttgaggc tcatttctta atctataaca tggaaaacac
541 acacacacac acacacacac acacacacac atgcacgcgc gcgcacacac acacacatac
601 tcaactcactc accaggcaca cactaggcct atggggcaaaa gagataattt atgaatagtt
661 cttgcacaac acctactacg taataaaaaga tccatcacat aatggtatga gatgtgttac
721 tatggccatt gttcgctttc tgatttttac aaactttcct aatctgaaag tggacctttc
781 aaaacccttt ctgtgagaac aaccgcagc tagtaagcta tctttttcct tcaattttgt
841 tttccaaagg ctctgtagta aactgttgaa aacagcatct ctttagtac catttaatcc
901 tgagtcactt gttttctcac taaagtaact gaggagaaac aaaaggaaaa aggaaagggg
961 ggaaggaaga aggaaggaaa gaaagaagag aaaggaacgg aacagaaagg aaaagaaaag
1021 caaaagagaa aagaagagaa gagaaaaact agctaagaca atgggattgt aattaaactt
1081 ttttggttgt tggttctatt tcctgaggc gaggtagggg aaagaaccaa gtgaagtcta
1141 tccgaccacg cggctcctga gccaggacc tctccactgt gcgcggtgca acgagggtag
1201 ccggacagtg ctggtgagct tgctgcggac tggggagccg ggcacagggc agctactgca
1261 ggttgctcag cggcatccga gactcccggc gcctcagggg ctctggccag taccagaca
1321 ggggacgcac caggctcgat cggccaacc tctgggaaga tccccgccct tcagcgcgct
1381 cccgggtctc ccagcctgga ctcggtgcgc ggctctctc cccgaggctc cggaaagggaa
1441 ggagggcgtg ccggagctgg cgggcgggcg ggagggagct gTATAAAaag cgctggcggc
1501 gcagcagccg gggcttcatt tgctgtctgt caccgggacc gagagtgccg cgggaaagca
1561 acggccaagg acggggcgct gcgttcgagc tacccaatgc

```

Abb. IX.1: Sequenz des MGF-Promotors. rot: potentielles TCF/LEF-Bindungsmotiv, blau: TATA-Box.

Sequenz des Proliferin 1-Promotors (*mus musculus*):

```

1  gatatctttg ttaaaatagc cttcaagaca tctgtatttg aatgttcaat tgtcactctt
61 atgtgcctaa tatgaaaaat caagcaactc acaatgttcc ttgggtggtg tcaaagactc
121 atgaggataa aactcaatat gggtgacttt tactgaggct ttaagtccca acgggtctaaa
181 gacgatgaaa tatatatgac cttcatctac gtgtcattga aaattttaga atatataaaa
241 tcctgaaggt aaaaaggctt atggcatagc tatttactta aagcaagtaa tttctatcag
301 tctttatgag gaagacatag ttgtggctac tcacagtatg atttgtttta gtcagagcat
361 gaacatgaga tgaaccacgt acatagaact gactataaca gtgaacctaa aaaataagat
421 aaaccatgaa cttagaaacta tattagtgtt catggtatct aggctactta acctgaggg
481 aaaataacag gaattaacac gtccttttct tcctgccagt gtgtaacctc agggttactg
541 ggaaagacTA TATAAgaggt agaaaataag gacatagaag gcttccaact ccagtgaaga
601 atctttctgg aatccacagc taagcctggg taggactctg cagagatgct cccttctttg
661 atcaacat gctcct

```

Abb. IX.2: Sequenz des Proliferin 1-Promotors. rot: potentielle TCF/LEF-Bindungsmotive, blau: TATA-Box.

Sequenzvergleich der Proliferin-Gene vom DNA-Microarray:

```

1 100
k02245 ~~~~~
k03235 ggcttccaac tccagtaaag catcttcccg gaatccacag ctaagcctgg
x16009fin ~~~ttccaac tccagtaaag catcttcccg gaatccacag ctaagcctgg

51 100
k02245 ~~~~~ ~agagatgc tcccttcttt gattcaacca tgctcctgga
k03235 gtaggactct gcagagatgc tcccttcttc gattcaacca tgctcctgga
x16009fin gtaggactct gcagagatgc tcccttcttc gattcaacca tgctcctgta

101 150
k02245 tactgctcct actactggtg aacagctcgt tattgtggaa gaatggtgcc
k03235 tactgctcct actactggtg aacagctcgt tattgtggaa gaatggtgcc
x16009fin ag~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

151 200
k02245 tcatttccca tgtgtgcaat gaggaatggt cgttgcttta tgcctttga
k03235 tcatttccca tgtgtgcaat gaggaatggt cgttgcttta tgcctttga
x16009fin ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

201 250
k02245 agacacattt gaattagccg gcagtttgtc tcataatatac agtatagaag
k03235 agacacattt gaattagccg gcagtttgtc tcataatatac agtatagaag
x16009fin ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

251 300
k02245 tttcagaact gttcactgaa tttgaaaaac attattctaa cgtgtctggg
k03235 tttcggaaact gttcaatgaa tttgaaaaac attattctaa cgtgtctggg
x16009fin ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~

301 350

```

```

k02245   ctcagagaca aaagcccat gagatgcaat acttctttcc ttccaactcc
k03235   ctcagagaca aaagcccat gagatgcaat acttctttcc ttccaactcc
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          351                                     400
k02245   agaaaacaag gaacaagcca ggctcacaca ctattcagct cttctgaaat
k03235   agaaaacaag gaacaagcca ggctcacaca ctatgcagct cttctgaaat
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          401                                     450
k02245   caggagccat gatthttggat gcctgggaaa gccctctgga cgatctagtg
k03235   caggagccat gatthtcggat gcctgggaaa gccctctgga cgatctagtg
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          451                                     500
k02245   agtgaattat ctaccataaa aatgttcctt gatataatca tctccaaagc
k03235   agtgaattat ctaccataaa aatgttcctt gatataatca tctccaaagc
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          501                                     550
k02245   cacagacata aagaaaaaga tcaacgcagt ccggaacggg gttaatgccc
k03235   cacagacata aagaaaaaga tcaacgcagt ccggaacggg gttaatgccc
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          551                                     600
k02245   tcatgagcac catgcttcag aatggagatg aagaaaagaa gaaccctgcc
k03235   tcatgagcac catgcttcag aatggagatg aagaaaagaa gaaccctgcc
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          601                                     650
k02245   tggttcttgc aatctgacaa tgaagatgct cgcattcatt ctttatatgg
k03235   tggttcttgc aatctgacaa tgaagatgct cgcattcatt ctttatatgg
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          651                                     700
k02245   catgatcagc tgcctagaca atgactttaa gaaggttgat atttatctca
k03235   catgatcagc tgcctagaca atgactttaa gaaggttgat atttatctca
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          701                                     750
k02245   acgtcctgaa gtgttacatg ttaaaaatag ataactgctg atatthcttt
k03235   acgtcctgaa gtgttacatg ttaaaaatag ataactgctg atatthcttt
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          751                                     800
k02245   catgtgctct gcttctgaaa tatcatgtaa tatkctttca atttgtatct
k03235   catgtgctct gcttctgaaa tatcatgtaa tatkctttca atttgtatct
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          801                                     850
k02245   tttgaatttg ttgttgactc atthaaaaat aaaaagtagc tctcagaaat
k03235   tttgaatttg ttgttgactc atthaaaaat aaaaagtagc tctcagaaat
x16009fin ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~

          851
k02245   at
k03235   ~
x16009fin ~

```

Abb. IX.3: Sequenzvergleich von K02245, K03235 und X16009. Von X16009 sind nur die letzten 99 Basen des 3'-Endes mit dargestellt.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mir beim Gelingen dieser Arbeit geholfen haben:

An erster Stelle bei Prof. Dr. Wittinghofer, der mir die Arbeit in seiner hervorragenden Abteilung ermöglicht hat und durch seine Art so eine Freude an der Wissenschaft verbreitet.

Bei PD Dr. Oliver Müller möchte ich mich ganz besonders für das interessante Thema, die Unterstützung, Diskussionen und die schöne Arbeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken.

Ganz, ganz herzlich möchte ich mich auch bei Slava Chtarbova für die gute Einarbeitung in das Thema und die Methoden, die vielen Erklärungen und die viele Zeit und Geduld, die sie für mich geopfert hat bedanken. Es war bestimmt nicht immer leicht mit mir, aber sie war immer für mich da!

Ein besonderer Dank auch an alle anderen der AG Müller: Ingrid, Nadine, Christina, Christian, Thomas und Eva für die Unterstützung und ohne die die Zeit und Arbeit im Labor längst nicht so nett gewesen wäre!

Danke auch dem Labor A 2.14 dafür, dass meine Besuche immer willkommen waren und für die netten Unterhaltungen zwischendurch, auch wenn Alex mal nicht da war!

Bei allen der Abteilung für Strukturelle Biologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft bedanken.

Alex möchte ganz besonders danken. Dafür, dass er immer da war, jede Menge Geduld und Verständnis für alles hatte und sich in stressigen Zeiten immer ganz besonders um mich gekümmert hat.

Zuletzt und eigentlich am meisten muss ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium erst ermöglicht haben, mich die ganze Zeit unterstützt und nie an mir gezweifelt haben! Die mir immer mit Rat und Tat bei Seite standen, wenn es nötig war. Das gilt natürlich auch für meine Geschwister, die ich hier nicht vergessen möchte.