

Charakterisierung des mutierten  
 $\beta$ -Catenins als Zielantigen für eine  
immuntherapeutische Intervention bei  
kolorektalen Karzinomen

**Charakterisierung des mutierten  $\beta$ -Catenins als  
Zielantigen für eine immuntherapeutische Intervention  
bei kolorektalen Karzinomen**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Margrit Airin Hans  
geboren am 6. September 1967 in Ahwaz/Iran

2003

Referentin: Frau Prof. Dr. M. Szamel

Koreferent: Herr Prof. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 23. April 2003

# Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

**“Charakterisierung des mutierten  $\beta$ -Catenins als Zielantigen für eine immuntherapeutische Intervention bei kolorektalen Karzinomen”**

selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich habe an keiner anderen Universität die Dissertation in dieser oder anderer Form vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden folgendermaßen veröffentlicht:

**Koesters<sup>1</sup> R., Hans<sup>1</sup> M. A., Benner A., Prosst R., Boehm J., Gahlen J. and von Knebel-Doeberitz M.** (2001) Predominant Mutation of Codon 41 of the  $\beta$ -Catenin Proto-oncogene in Rat Colon Tumors Induced by 1,2-Dimethylhydrazine using a Complete Carcinogenic Protocol. *Carcinogenesis*, 22; 11: 1885-1890.

<sup>1</sup> R. Koesters und M. A. Hans waren gleichermaßen an dieser Arbeit beteiligt.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	11
<b>1 Einleitung</b>	<b>14</b>
1.1 Molekulare Ursachen der Entstehung kolorektaler Karzinome . . . . .	14
1.2 Die Struktur von $\beta$ -Catenin . . . . .	16
1.3 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg . . . . .	17
1.4 Die Rolle von K-ras in der Karzinogenese . . . . .	21
1.5 Das DMH-Modell chemisch induzierter kolorektaler Tumore in der Ratte .	23
1.6 Immuntherapie von Krebs . . . . .	25
1.7 Einsatz von Vakzinen zur Therapie von Tumoren . . . . .	26
1.8 Zielsetzung . . . . .	26
<b>2 Materialien</b>	<b>28</b>
2.1 Reagentien . . . . .	28
2.2 Medien und Lösungen für Zellkultur . . . . .	30
2.3 Lösungen und Puffer . . . . .	30
2.3.1 Lösungen und Puffer für Elektrophorese . . . . .	30
2.4 Lösungen und Puffer für HPLC . . . . .	33
2.5 Allgemeine Lösungen und Puffer . . . . .	33
2.6 Zelllinien . . . . .	34
2.7 Plasmide . . . . .	34
2.8 Enzyme . . . . .	35
2.9 Proteine . . . . .	35

---

2.10	Größenmarker . . . . .	35
2.11	Antikörper . . . . .	35
2.12	Geräte . . . . .	37
2.13	Sonstige Materialien . . . . .	38
2.14	Versuchstiere . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
3.1	Zellkultur . . . . .	39
3.1.1	Kultivieren von Zelllinien . . . . .	39
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	39
3.1.3	Anlegen von Glycerinkulturen . . . . .	40
3.2	Expression des mutierten $\beta$ -Catenin-Proteins in Bakterien . . . . .	40
3.3	Herstellung von Interleukin-2 haltigen Überständen . . . . .	41
3.4	Durchflußzytometrische Untersuchungen . . . . .	42
3.5	Immunhistologische Färbungen . . . . .	43
3.6	DNA-Präparationen . . . . .	43
3.6.1	DNA-Präzipitation mit Ethanol . . . . .	43
3.6.2	DNA-Aufarbeitung aus Kulturzellen . . . . .	44
3.6.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel . . . . .	44
3.6.4	DNA-Extraktion aus Gewebegefrierschnitten . . . . .	45
3.6.5	DNA-Isolierung aus mikrodissezierten Gewebegefrierschnitten . . . . .	45
3.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	46
3.8	DNA-Ligation . . . . .	46
3.9	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen . . . . .	47
3.10	Plasmid-Minipräparation . . . . .	47
3.11	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen . . . . .	48
3.12	Elektrophoresen und Blottechnik . . . . .	48
3.12.1	Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA . . . . .	48
3.12.2	Agarosegelelektrophorese zur Trennung von RNA . . . . .	49

3.12.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Trennung von Proteinen . . . . .	49
3.12.4	Western-Blot . . . . .	50
3.12.4.1	Transfer auf Immobilonmembran . . . . .	50
3.12.4.2	Trocknen von Coomassie gefärbten Gelen . . . . .	51
3.12.4.3	Immunreaktion . . . . .	51
3.12.4.4	Nachweisreaktion von mutiertem $\beta$ -Catenin-Protein . . . . .	52
3.13	Präparation von Gesamt-RNA aus Kolonkarzinom-Zellen und der Milz von immunisierten Ratten . . . . .	53
3.14	Reverse Transkription . . . . .	54
3.15	Polymerase-Chain-Reaction (PCR) . . . . .	54
3.16	Primerdesign für PCR . . . . .	56
3.17	Primerdesign für Klonierung des vollständigen $\beta$ -Catenins . . . . .	56
3.17.1	PCR Strategie zur Detektion von Mutationen in Codon 1307, 1061 und 1554 des APC-Gens . . . . .	57
3.17.2	PCR Strategie zur Detektion von Mutationen im Exon 3 des $\beta$ - Catenin bzw. Exon 1 des K-ras Gen des Tumormaterials . . . . .	57
3.18	Sequenzierung . . . . .	58
3.18.1	Sequenzierung von doppelsträngiger DNA . . . . .	58
3.18.2	Sequenzierung von PCR Produkten . . . . .	59
3.19	Zytotoxizitätstest zum Nachweis der zellulären Immunantwort . . . . .	60
3.20	Tierversuche . . . . .	61
3.20.1	Genehmigung der Tierversuche . . . . .	61
3.20.2	Vakzinierung von Ratten . . . . .	61
3.20.3	Tumorimplantation in Ratten . . . . .	61
3.20.4	Induktion von Kolon-Karzinomen mittels 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) . . . . .	62
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
4.1	Experimentelle Strategie . . . . .	63

4.2	Mikrodissektion von Kolonkarzinomen . . . . .	64
4.3	Mutationsanalyse des APC, $\beta$ -Catenins und K-ras Gens . . . . .	65
4.3.1	Detektion von Mutationen in GSK-3 $\beta$ Phosphorylierungsstellen im $\beta$ -Catenin-Gen der Ratte . . . . .	66
4.3.2	Sequenzanalyse zur Detektion von $\beta$ -Catenin Mutationen in mikro- dissezierten Tumoren . . . . .	67
4.3.3	Mutationsanalyse im APC-Gen . . . . .	70
4.3.4	Untersuchung des Tumormaterials für K-ras Mutationen . . . . .	70
4.3.5	$\beta$ -Catenin Mutationen in CC531 Zellen . . . . .	74
4.4	Herstellung eines Vakzinierungsplasmids mit dem mutierten $\beta$ -Catenin . .	76
4.4.1	Molekulare Klonierung der vollständigen Ratten $\beta$ -Catenin-cDNA .	76
4.4.2	Funktionalitätstest von $\beta$ -Cateninplasmid in einem eukaryontischen System . . . . .	78
4.5	Einbau von mutiertem $\beta$ -Catenin cDNA in den prokaryontischen Vektor . . . . .	80
4.6	Expression von mutiertem $\beta$ -Catenin im prokaryontischen System . . . . .	80
4.6.1	Reinigung des mutierten $\beta$ -Catenin-Proteins mittels Hochleistungs- flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) . . . . .	81
4.6.2	Expression von MHC I Molekülen in CC531 Zellen . . . . .	82
4.6.3	Tumorigenität der Kolonkarzinom Zelllinie CC531 in syngenem Ratten	85
4.6.4	Vakzinierung von syngenem WAG/Rij Ratten mit $\beta$ -Catenin Plas- mid DNA . . . . .	87
4.7	Tumorchallenge in vakzinierten Ratten . . . . .	90
4.8	Untersuchung der Immunantwort . . . . .	94
4.8.1	Nachweis der zellvermittelten Immunantwort . . . . .	94
4.8.2	Untersuchung der humoralen Immunantwort . . . . .	97
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>100</b>
5.1	Untersuchung von Mutationen . . . . .	101



5.2 Etablierung eines immuntherapeutischen Ansatzes bei kolorektalen Karzi- nomen in syngenen Ratten mittels DNA-Vakzinierung . . . . .	104
<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>Summary</b>	<b>112</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>Danksagung</b>	<b>123</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Kaskade der Karzinogenese . . . . .	16
1.2	Schematische Darstellung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs . . . . .	20
1.3	K-ras Funktion als Protoonkogen . . . . .	22
1.4	Xeno-Metabolismus von 1,2-Dimethylhydrazin im Tiermodell . . . . .	24
4.1	PCR detektierte $\beta$ -Catenin Bande . . . . .	67
4.2	Identifizierung der Mutation von Codon 41 des dritten Exons im $\beta$ -Catenin Gen . . . . .	69
4.3	K-ras und mutiertes Allel . . . . .	73
4.4	Nukleotidsequenzanalyse von $\beta$ -Catenin Mutation in CC531 Zelllinie . . . . .	75
4.5	Molekulare Klonierung von vollständigem $\beta$ -Catenin . . . . .	76
4.6	Vakzinierungsplasmid . . . . .	77
4.7	Einfluß der Expression von mutiertem $\beta$ -Catenin auf die zellvermittelte Transkription . . . . .	79
4.8	Gereinigtes $\beta$ -Catenin . . . . .	82
4.9	Expression der Oberflächen Proteine bei CC531 Zelllinie . . . . .	84
4.10	Tumorwachstum nach Inokulation von CC531 Zelllinie . . . . .	86
4.11	Schematische Darstellung des <i>in vivo</i> Experiments . . . . .	89
4.12	Tumorwachstum nach Tumorchallenge bei vakzinierten Ratten . . . . .	92
4.13	Tumorwachstum nach Tumorchallenge innerhalb von drei Testgruppen . . . . .	93
4.14	Nachweis der zellulären Immunantwort . . . . .	96
4.15	Nachweis der durch die Vakzination hervorgerufenen Immunantwort gegen $\beta$ -Catenin . . . . .	99

# Tabellenverzeichnis

4.1 Mutationen im Exon 3 des $\beta$ -Catenin Gens in DMH-induzierten Ratten-Kolontumoren . . . . .	68
4.2 Mutationen im Exon 1 des K-ras Gens in DMH-induzierten Ratten-Kolontumoren . . . . .	72

# Abkürzungen

AOM	Azoxymethan
$\beta$ -Catenin	Onkogen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celcius
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
<i>Ctnnb 1</i>	Ratten $\beta$ -Catenin Gen
DCC	deleted in colorectal cancer
DCC-Gen	Tumorsuppressorgen
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GSK3- $\beta$	Serin Threonin Glycogen Synthase Kinase 3- $\beta$
h	Stunde
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma

---

IL	Interleukin
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
6x His Tag	ein Affinitätstag mit sechs aufeinanderfolgenden Histidin Resten
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körper Gewicht
K-ras	Protonkogen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lef	Lymphoid enhancer factor
LV	leerer Vektor
min	Minute
mut	mutiert
p53-Gen	kodiert für das Phosphoprotein p53, welches die Funktion eines Tumorsuppressors ausübt
PBS	Phosphate buffered solution
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Hydroniumionen-Konzentration, negativer dekadischer Logarithmus
Poly A	Poly-Adenylierungssignal
RNase	Ribonuklease
RN- $\beta$ -Catenin	Rattus Norvegicus $\beta$ -Catenin Plasmid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Tris buffered solution

Tcf	T cell factor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TWEEN	Polyoxyethylensorbitan
ÜN	über Nacht
Vol	Volumen
WT	Wildtyp

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Molekulare Ursachen der Entstehung kolorektaler Karzinome

Etwa der Hälfte aller kolorektaler Tumorerkrankungen liegt ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zugrunde, das auf Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen zurückzuführen ist (Roose J., Clevers H., 1999). Sie bewirken entweder den Verlust einer Tumorsuppressorwirkung oder Aktivierung eines Onkogeneffektes. Das Überwiegen eines dieser Effekte hat Störungen im geregelten Gleichgewicht von Proliferationen, Differenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) zur Folge, die sich als Kryptenaberrationen nachweisen lassen.

Ein Beispiel für Tumorsuppressorgendefekte sind Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gen Mutationen, die die Ursache für das Krankheitsbild der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) sind (Kinzler *et al.*, 1991). Sie kommen bei 80% der kolorektalen Adenomen und Karzinomen (Goss, 2000) vor. Diese Mutationen sind die frühesten Mutationen in der Kolon Krebs Progression (Goss, 2000). Neben den vererbbaeren kolorektalen Karzinomfällen mit Keimbahnmutationen des APC-Gens weist der Grossteil der sporadischen

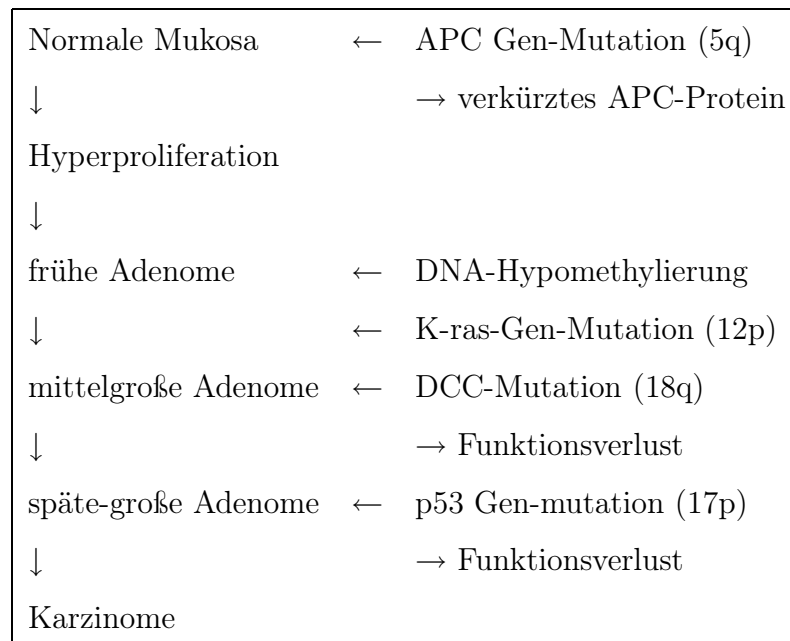
kolorektalen Tumoren somatische Mutationen in diesem Gen auf.

Ähnlich wie bei anderen Tumor Suppressor Genen sind beide APC-Allele bei Kolontumoren inaktiviert. Die funktionelle Bedeutung von APC-Veränderungen beruht auf der Dysregulation von mehreren physiologischen Prozessen, die die Homöostase der Kolon Epithel Zellen nämlich die Progressionzellzyklus, Migration, Differenzierung und die Apoptose beeinträchtigen (Goss, 2000).

Das APC Gen ist auf dem Chromosom 5 lokalisiert und weist 15 Exons auf (Grodin *et al.*, 1991; Kinzler *et al.*, 1991). Das Protein ist in kolorektalen Epithelzellen an den basolateralen Membranen nachweisbar. Seine Konzentration ist umso größer, je näher die Zellen der luminalen Oberfläche lokalisiert sind. Hier aktiviert APC die Apoptose. Wie das Protein in diesen komplexen Vorgang eingreift, ist noch unklar.

Anhand von Ergebnissen vergleichender molekulargenetischer und histologischer Untersuchungen formulieren Fearon und Vogelstein 1990 ein Model zur gerichteten Entstehung kolorektaler Karzinome (Abbildung 1.1). Für den Übergang des normalen in ein hyperproliferatives Dickdarmepithelgewebe (Vorstufe kleiner Adenome)scheinen Veränderungen des APC Gens essenziell zu sein. DNA-Hypermethylierung, die im Promoterbereich zelluläre Prozesse im Allgemeinen inaktivieren, begünstigt in diesen frühen Adenomen die Ausbildung von Mutationen in K-ras Onkogen, wodurch das Wachstum der Adenome zunimmt. In den größer werdenden Adenomen treten Mutationen in dem Tumorsuppressorgen DCC (deleted in colorectal cancer) auf, woraus eine weitere Hemmung der Apoptose folgt, so dass noch größere Adenome resultieren. Diese stellen die Vorstufe der Karzinome dar. Dieser Übergang vollzieht sich durch das Auftreten von Mutationen im Tumorsuppressorgen p53. Der Ausfall dieses Gens charakterisiert das Übergangsstadium zum kolorektalen Karzinomen. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass auch aktivierende Mutationen im  $\beta$ -Catenin Gen zur Tumorigenese im Kolon beitragen können (Sparks *et al.*, 1998; Kitaeva *et al.*, 1997).





**Abbildung 1.1: Kaskade der Karzinogenese.**

Akkumulation involvierter genetischer Änderungen kolorektaler karzinogenese. APC, Adenomatous colyposis coli; DCC, deleted in colorectal cancer (modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990).

## 1.2 Die Struktur von $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin ist ein aus 781 Aminosäuren aufgebautes Protein und gehört aufgrund seiner starken Homologie zu dem in *Drosophila melanogaster* identifizierten Segmentpolaritäts-gen Armadillo zur Familie der Armadillo-Repeat Proteine und ist ein Bestandteil der Wnt-Signalkaskade. Seine primäre Struktur lässt sich in drei Domänen einteilen: eine N-terminale, eine zentrale und eine C-terminale Domäne.

Die zentrale Domäne von  $\beta$ -Catenin ist aus 12 sogenannten Armadillo-Repeats aufgebaut und stellt damit den die Familienzugehörigkeit definierenden Bereich sowie die Bindungsstelle für E-Cadherin, APC und Lef-1/Tcf dar (Behrens *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 2000).

Die N-terminale Domäne von  $\beta$ -Catenin ist für die Regulation bzw. Stabilität des Proteins von Bedeutung. Hier liegen die GSK3- $\beta$  Phosphorylierungsstellen, an denen  $\beta$ -Catenin für

die Erkennung und den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomen System markiert wird (Aberle *et al.*, 1997; Yost *et al.*, 1998). Zudem wurde die Bindungsstelle für  $\alpha$ -Catenin im C-terminalen Bereich der N-terminalen Domäne, überlappend zum ersten Arm-Repeat, lokalisiert. Diese Domäne ist somit auch für die zelladhäsive Funktion von Bedeutung (McCrea und Gumbiner, 1991; Ozawa *et al.*, 1989).

Die C-terminale Domäne enthält die für die transkriptionfördernde Funktion von  $\beta$ -Catenin wichtigen Transkriptionsaktivierungsdomänen (Hecht *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1998). Durch die Bindung an das TATA-Box Bindeprotein TBP kann sie den Kontakt zur generellen Transkriptionsmaschinerie herstellen (Hecht *et al.*, 1999).

### 1.3 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg

In normalen Kolonepithelzellen ist  $\beta$ -Catenin hauptsächlich an der Zell-Zell Membran lokalisiert und wurde als ein Protein identifiziert, das an die cytoplasmatische Domäne des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zell-Zelladhäsionsmoleküls Cadherin bindet. Über seine Interaktion mit  $\alpha$ -Catenin vermittelt  $\beta$ -Catenin die Assoziation von Cadherin-Molekül mit dem Aktincytoskelett (Ozawa *et al.*, 1989; Huelsken *et al.*, 1994).  $\beta$ -Catenin besitzt über seine adhäsive Funktion hinaus eine zweite Rolle als Signalmolekül im Wnt-Signalweg.

Der Wnt-Signalweg stellt eine in der Evolution hochkonservierte Signaltransduktionskaskade dar, die ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben wurde. Wnts bilden eine Familie von sezernierten Glykoproteinen und aktivieren den Wnt-Signalweg durch die Bindung an Rezeptoren (seven-pass transmembrane receptors) der Frizzled-Familie (Hülsken und Behrens, 2000). Der Name “Wnt” setzt sich zusammen aus “Wingless” und “int”, den beiden als erstes identifizierten Vertretern dieser Gruppe von Genen. Die Wnt-Signale steuern während der Embryonalentwicklung Differenzierungs-, Proliferations- und Morphogeneseprozesse und sind an der Regulation der Zellmobilität sowie der Apoptose beteiligt (Wodarz und Nusse, 1998). Bei *Drosophila* transformieren Wingless-Mutationen

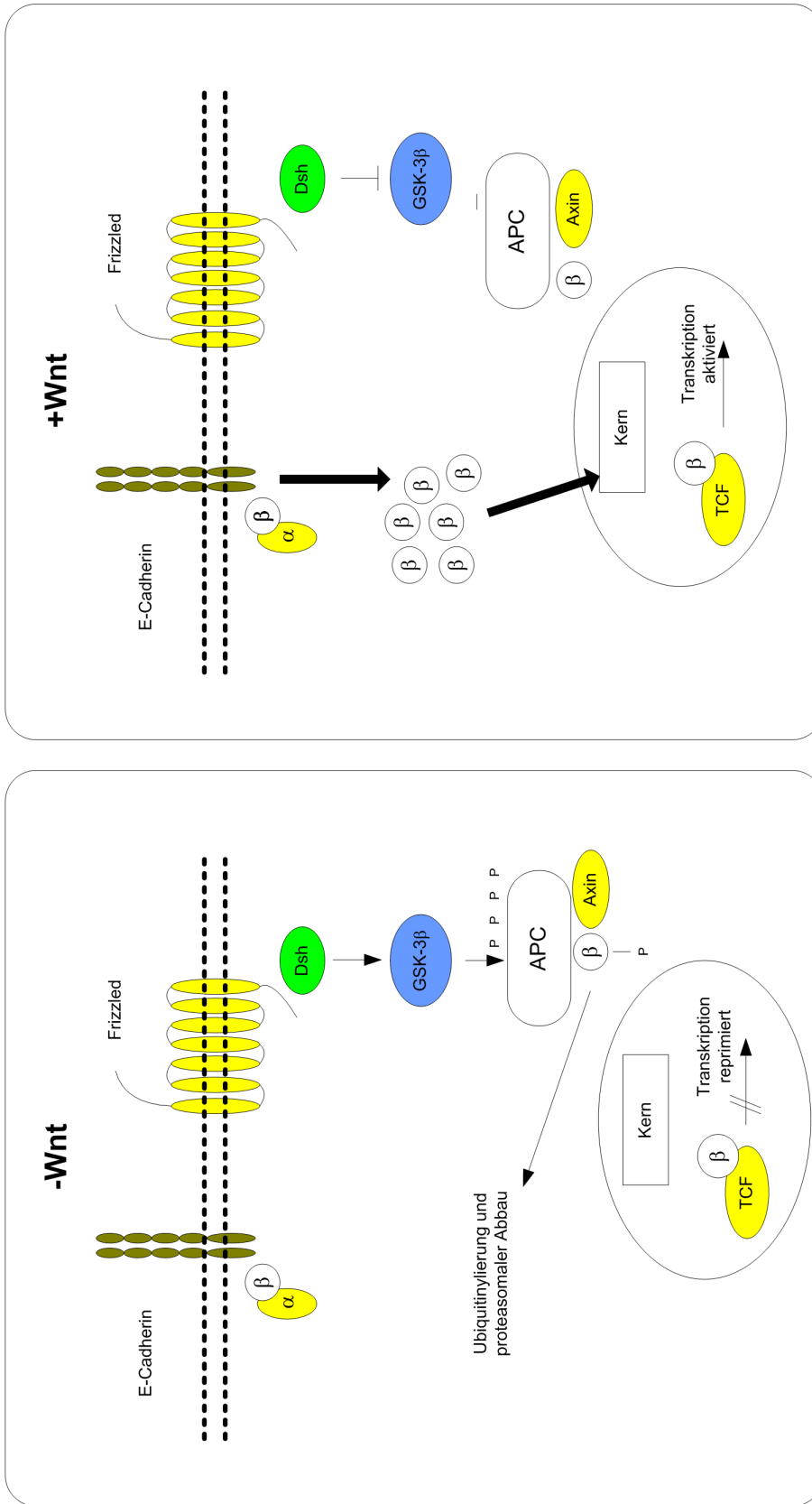
die Flügel zu einem Knoten und zerstören die Segment-Polarität (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Eine unkontrollierte Aktivierung des Wnt-Signalweges wird für die Entstehung und Progression verschiedener Tumore verantwortlich gemacht (Polakis, 2000). In 85% aller spontanen oder erblichen kolorektalen Tumoren ist die Wnt-Kaskade überaktiviert. Patienten mit erblichem Darmkrebs (familiäre adenomatöse Polyposis, FAP) entwickeln darüber hinaus auch in anderen Organen Neoplasien.

Nach Rezeptoraktivierung (Abbildung 1.2) wird das Wnt-Signal über einen bisher ungeklärten Mechanismus ins Zellinnere auf das an die Zellmembran rekrutierte cytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled (Dsh) übertragen. Aktiviertes Dishevelled führt nachfolgend zur Inhibition der Serin-Threonin-Glycogen-Synthase Kinase (GSK)-3 $\beta$  und zur Destabilisierung eines cytoplasmatischen Multiproteinkomplexes. Dieser Komplex besteht aus dem Gerüstprotein Axin, dem Tumorsuppressorprotein APC, sowie der GSK-3 $\beta$  selbst und  $\beta$ -Catenin als zentralen Komponenten. In diesem molekularen Kontext phosphoryliert GSK-3 $\beta$  kritische Serin- und Threoninreste am N-terminus von  $\beta$ -Catenin. Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin gilt als Voraussetzung für die Erkennung und den nachfolgenden Abbau von  $\beta$ -Catenin über das Ubiquitin-Proteasomen System. Nach Stimulation des Wnt-Signalwegs unterbleibt in der Folge die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und damit der Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen System.  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Cytoplasma und wandert in den Zellkern, wo es mit Transkriptionsfaktoren der Lef-1/Tcf Familie (Behrens *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 1996) interagiert und die Transkription von Wnt-Zielgenen wie z. B. c-myc (He *et al.*, 1998), Cyclin D (Tetsu und McCormick, 1999) und c-jun (Mann *et al.*, 1999), die an der Kontrolle der Zellproliferation, Apoptose und der Zellmotilität beteiligt sind, aktiviert.

In einer Vielzahl menschlicher Tumore sind genetische Veränderungen zu finden, die zu einer Wnt-unabhängigen, dauerhaften Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und Zellkern und damit zu einem konstitutiv aktiven Signalweg führen (Korinek *et al.*, 1997; Peifer, 1997). In Zellen, die nicht durch Wnt-Signale stimuliert werden, ist das Tumorsuppressor-Protein APC maßgeblich an der Proteolyse von  $\beta$ -Catenin über das Ubiquitin-Proteasomen System beteiligt. Zellen mit mutiertem APC weisen eine star-

ke cytoplasmatische Akkumulation von  $\beta$ -Catenin auf (Behrens *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1997). Unter den Mutationen des APC Gens, die zur klinischen Manifestation der familiären Polyposis (FAP) führen, dominieren Punktmutationen, aus denen entweder die Ausbildung von Stopcodon resultiert oder durch die Nukleotiddeletionen und -insertionen das Leseraster verschoben wird. In der Translation wird deshalb ein verkürztes APC-Protein gebildet. Konsequenzen für das zelluläre Signalsystem ergeben sich daraus, dass durch Verlust des C-terminalen Endes des APC-Proteins der Bindungsort für  $\beta$ -Catenin verloren geht und das  $\beta$ -Catenin in der Zelle nicht degradiert wird. Das hat zur Folge, dass sowohl Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett und der Plasmamembran über das Cadherinsystem als auch die  $\beta$ -Catenintransduktion in den Zellkern beeinträchtigt werden.

In kolorektalen Karzinomen, die keinen Funktionsverlust von APC zeigen, werden häufig Punktmutationen in  $\beta$ -Catenin gefunden (Chan *et al.*, 2002). Diese betreffen die vier regulatorischen Phosphorylierungsstellen (Codon 33, 37, 41 und 45) am N-terminalen Ende des  $\beta$ -Catenin Gens (Takahashi *et al.*, 2000). Durch Austausch bzw. Deletion nur einer dieser Aminosäuren unterbleibt die effiziente Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK-3 $\beta$  und damit dessen kontinuierlichen Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen System. Infolge dessen wird die transkriptionale Aktivität mit T cell factor bzw. Lymphoid enhancer factor konstitutiv induziert und die Genexpression ausgelöst (Vogelstein 1998; Blum, 2001). Mutationen dieser Art sind außer in Kolonkarzinomen auch in einer Reihe weiterer Tumore wie in der Haut (Chan *et al.*, 1999), der Leber (Miyoshi *et al.*, 1998), des Ovars (Fukuchi *et al.*, 1998; Palacios and Gamallo, 1998), des Gehirns und der Prostata (Gerstein *et al.*, 2002) beschrieben worden.



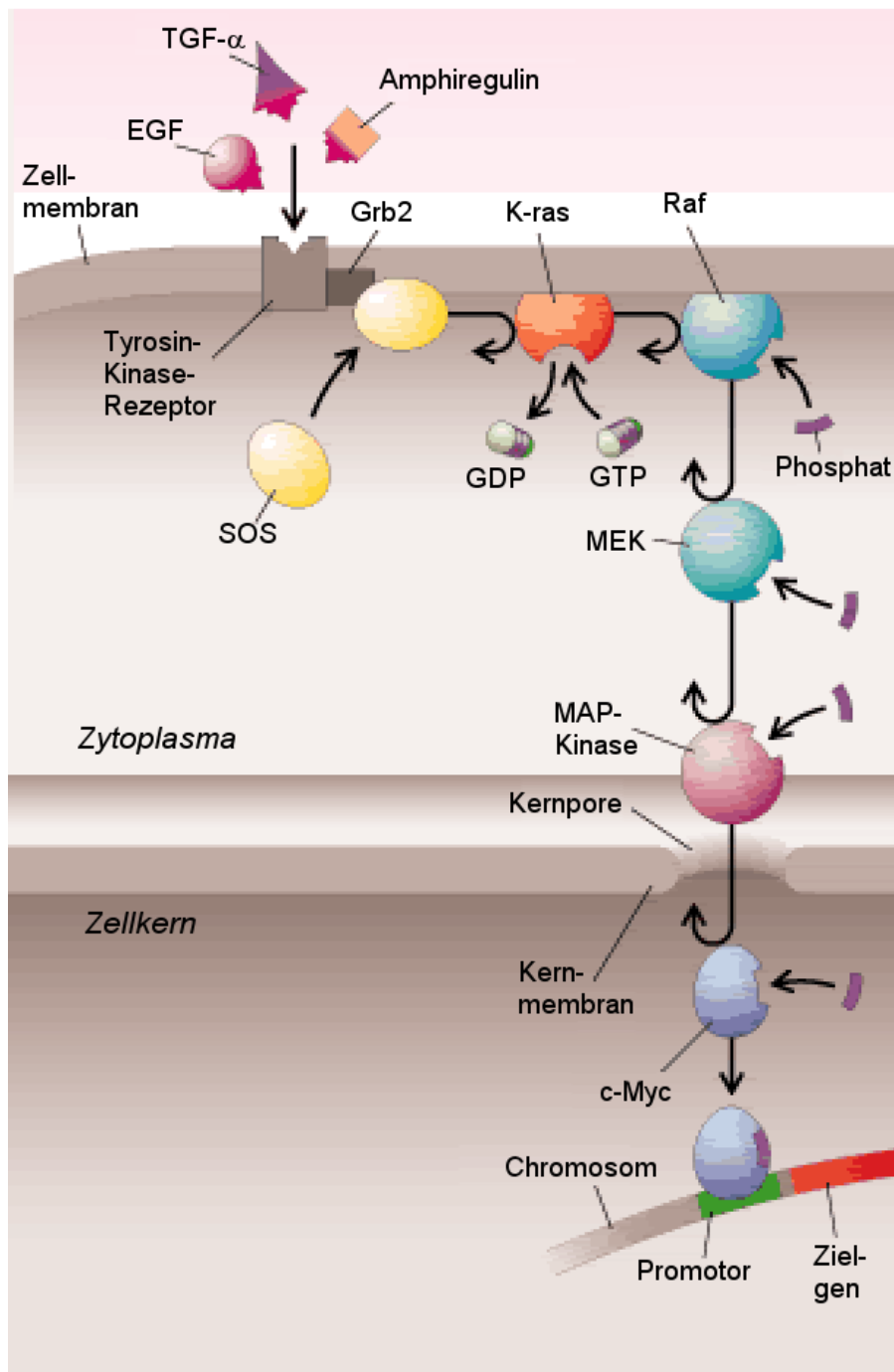
**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs**  
 Dsh, Dishevelled;  $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin; APC, adenomatöses Polyposis Coli Protein; GSK3 $\beta$ -Catenin, Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ -Catenin; Tcf, Transcriptionsfactor (modifiziert nach Hülsken und Behrens, 2000).

## 1.4 Die Rolle von K-ras in der Karzinogenese

Das Protoonkogen spielt eine wichtige Rolle in einer intrazellulären Signaltransduktions-Kaskade, die für die Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung kritisch ist (Barbacid, 1987). K-ras codiert für ein 21 KDa großes Guanin-Nukleotid bindendes Protein (G Protein), welches sich an die Innenseite der Zellmembran bindet und dort die Guanosinriphosphat (GTP) Hydrolyse verursacht. Wird GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert, kommt es zur Inaktivierung des K-ras Proteins. Inaktiviertes K-ras bindet im Zytoplasma Guanosindiphosphat (GDP). Durch Nutzung einer Effektordomäne wird K-ras aktiviert und ein intrazelluläres Signal ausgelöst. Die Identität des Rezeptors ist noch unklar. Es wird vermutet, dass der Rezeptor auf eine Vielzahl von extrazellulären epidermalen Wachstumsfaktoren sowie Transformationswachstumsfaktoren wie Alpha, Amphiregulin und andere reagiert und Signale in den Zellkern abgibt.

In Antwort auf die Signale folgt die Hydrolyse von GTP zu GDP, die K-ras inaktiviert und den Zyklus abschließt. Punktmutationen im Exon 1, Codon 12 und 13 führen zu einem Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität der Proteine, d. h. GTP wird nicht mehr zu GDP hydrolysiert. Folge ist eine konstitutive Aktivierung des Ras-Proteins. K-ras Mutationen sind als Ursache für die Stufe der Adenome in der Karzinogenese bekannt (Fearon und Vogelstein, 1990). Sie beteiligen sich ebenfalls an der Resistenz gegen Apoptose sowie den Übergang von Adenomen zu Karzinomen (Bedi *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 1997).

In kolorektalen Tumoren bei Ratten, die mit 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) bzw. dessen Stoffwechselmetaboliten Azoxymethan (AOM) behandelt wurden, treten die K-ras Mutationen häufig auf (Erdman *et al.*, 1997). Kolontumore bei Menschen, die Mutationen an Codon 12 des K-ras Gens tragen, werden von Transitionen begleitet, bei denen Guanin durch Adenin ersetzt wurde. Infolge dessen wird die Aminosäure Glutamin durch Asparagin ersetzt. Guerrero *et al.* (2000), berichten über die Rolle der Mutation an Codon 12 des K-ras Gens. Transformationen dieses Gens führen zu Veränderungen in der Morphologie sowie zur Inhibition der Apoptose. Sie sind möglicherweise die Ursache für die Zell-Zell-Deregulation und Zell-Adhäsion-Interaktion.



### Abbildung 1.3: K-ras Funktion als Protoonkogen

Guanin-Nukleotid-Bindungsprotein (G-Protein) assoziiert mit dem speziellen Rezeptor für extrazelluläre Wachstumssignale. Nach Aktivierung des Rezeptors wird durch K-ras GDP zu GTP phosphoryliert und das Protein aktiviert. In Antwort auf andere Signale wird GTP zu GDP hydrolysiert und K-ras inaktiviert. Durch Mutationen des K-ras Gens geht die GTPase Aktivität des Proteins verloren. In aktiviertem Zustand findet keine Bindung am Guanidinnukleotid statt. Es folgt eine kontinuierliche Signaltransduktion (Boland, C.R. 1997).

## 1.5 Das DMH-Modell chemisch induzierter kolorektaler Tumore in der Ratte

Kolorektale Tumoren können zuverlässig und in hoher Ausbeute in Ratten induziert werden, und zwar durch die regelmässige subkutane Verabreichung des chemischen Karzinogens 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) bzw. dessen Stoffwechselmetaboliten Azoxymethan (AOM) (Reddy and Maeura, 1984).

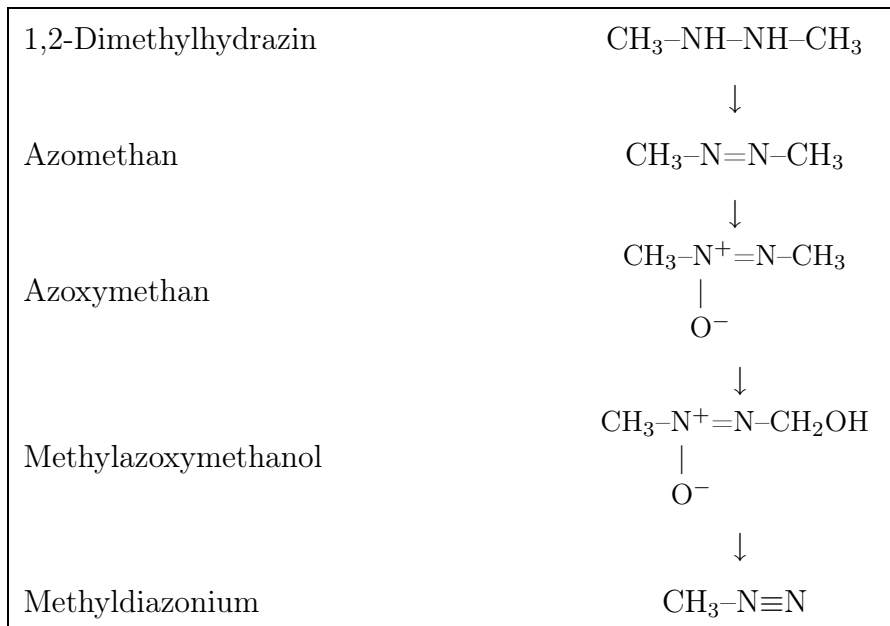
Druckrey *et al.*, 1967, berichteten über die Entstehung von genetischen Läsionen in DMH behandelten syngeneten Ratten. Wird 1,2-Dimethylhydrazin zur Methylazoxymethanol verstoffwechselt, so entsteht das stark methylierende Agens, Methyldiazonium in mehreren oxidativen Schritten (Abbildung 1.3). Durch die Oxidation von 1,2-Dimethylhydrazin wird Azomethan gebildet. Dieses wird zu Azoxymethan oxidiert. Durch die N-Hydroxylation wird Azoxymethan zu Methylazoxymethanol und letztlich zu Methyldiazonium umgesetzt. Das stark methylierende Agens Methyldiazonium führt zur Veränderungen der DNA-Methylierung in Kolonepithelzellen und damit zu Störungen in der Proliferation dieser Zellen.

Infolge einer wöchentlichen Injektion von 20 mg/kg Körpergewicht des Karzinogens DMH über 20 Wochen wurden histologische Veränderungen im Kolon der Ratten beobachtet. Die ersten Veränderungen in der Zellproliferation kommen in der Entstehung der Neoplasien bei den Versuchstieren zu Erscheinung. Wie bei Patienten mit kolorektalem Krebs, wurden in den ersten 12 Wochen der Behandlung die ersten Anzeichen der Tumorigenese, die Reduktion der Goblet-Zellpopulation und ein hyperproliferatives Epithel (10. Woche) gefolgt vom Auftreten adenomatöser Polypen (12. bis 14. Woche) berichtet. In der 14. bis 16. Behandlungswoche das Auftreten von Carcinoma *in situ* und in der 18. bis 20. Woche die Entstehung von Adenokarzinomen (Fisher, 1981).

Untersuchungen von tumorassoziierten Antigenen im DMH Ratten Modell weisen auf charakteristische Ähnlichkeiten zwischen Ratten-Kolonkrebs-Antigenen und kolorektalem



Krebs bei Menschen (Abeyounis and Milgrom, 1976). Auf molekularer Ebene ist dieses System sehr gut charakterisiert. Mutationen des K-ras (Jacoby *et al.*, 1991) und  $\beta$ -Catenin Protoonkogens (Takahashi *et al.*, 1998) treten häufig in DMH-induzierten Kolontumoren auf. Mutationen des  $\beta$ -Catenin Gens resultieren in Aminosäuresubstitutionen an den regulatorischen Phosphorylierungsstellen der Glycogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  an Codon 33, 37, 41 und 45, welche bei Patienten mit kolorektalem Krebs ebenfalls vorkommen (Takahashi *et al.*, 2000). Ähnliche Mutationen werden in mit AOM induzierten Tumoren bei Mäusen und Ratten berichtet. Häufiges Auftreten dieser Mutationen in Kolontumoren bei Mäusen deuten auf konsequente Veränderungen in der Stabilität und Lokalisation des Proteins, welche eine wichtige Rolle in diesem Kolonkarzinogenese Modell spielen (Takahashi *et al.*, 2000). Folgende Abbildung zeigt den Xeno-Metabolismus von DMH bei Ratten.



**Abbildung 1.4: Xeno-Metabolismus von 1,2-Dimethylhydrazin im Tiermodell.** 1,2-Dimethylhydrazin wird durch Oxidation über Zwischenstufen zu Azomethan und schließlich zu Methyldiazonium metabolisiert. Das Endprodukt Methyldiazonium führt zur Entwicklung von Tumoren in Tieren.

## 1.6 Immuntherapie von Krebs

Unter Immuntherapie versteht man die therapeutische Beeinflussung der Immunreaktion, d. h. der Abwehrbereitschaft des Organismus. Die Idee, die der Immuntherapie bei Krebserkrankungen zugrundeliegt ist, die Aufmerksamkeit des Immunsystems gegenüber Krebszellen und damit die Abwehrreaktion so zu beeinflussen, dass der Tumor vom Körper selbst bekämpft wird.

Zu den Immuntherapieformen bei Krebs gehören einige Ansätze der Immuntherapie bei bösartigen Tumoren in der Verabreichung von Substanzen, die als Immunmodulatoren (biological response modifiers) bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um Substanzen, die die Immunantwort beeinflussen und mit denen sich die Abwehrzellen im Körper untereinander verständigen und aktivieren, sogenannte Botenstoffe oder auch Zytokine. Einige können bereits auf gentechnischen Wegen hergestellt werden und sind somit für die Anwendung in reiner Form verfügbar, andere müssen aus Zellkulturen oder aus dem Blut gewonnen werden. Die bekanntesten Beispiele sind die Interferone und Interleukine. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von monoklonalen Antikörpern. Diese werden *in vitro* hergestellt, indem eine einzelne B-Zelle dauerhaft teilungsfähig gemacht wird. Alle von einem solchen einzelnen "Zellklon" gebildeten Antikörper sind demnach baugleich, die spezifisch gegen Tumorantigene auf Krebszellen gerichtet sind. Dadurch werden Krebszellen entweder direkt angegriffen oder andere Zellen und Funktionen der Immunabwehr aktiviert. Sie können auch mit Zellgiften oder radioaktiven Stoffen gekoppelt werden, um diese Substanzen an die Krebszellen heranzubringen.

Durch die aktive spezifische Immuntherapie wird die körpereigene Abwehr zur gezielten Bekämpfung von Krebszellen angeregt, indem den Abwehrzellen Merkmale des jeweiligen Tumors so präsentiert werden, dass sie diese Merkmale als fremd erkennen und solche Zellen, die diese Merkmale tragen, angreifen.

## 1.7 Einsatz von Vakzinen zur Therapie von Tumoren

Bei einer Vakzintherapie bietet man dem Immunsystem ein oder mehrere tumorspezifische Antigene an, um so eine gezielte und damit spezifische Immunreaktion und protektive Immunität gegen den Tumor auszulösen (Mor *et al.*, 2001). Gegenüber Peptidvakzine, die in der Lage sind die Produktion von spezifischen Antikörpern aus den B-Lymphozyten hervorzurufen (humorale Immunreaktion), charakterisieren zwei Haupteigenschaften die DNA-Vakzine; erstens die niedrige Menge an intrazellulär exprimiertem Antigen und die Langzeitexpression, welche vermutlich ein Mechanismus für deren Effizienz wäre (Moelling, 1997) und zweitens die Stimulation von T-Lymphozyten und damit die Auslösung der zellulären Immunantwort. Neben diesen Vorteilen sind die Konsequenzen einer Langzeitexpression wie z. B. Einwirkung von Toleranz, Autoimmunität, Hyperimmunität und Autoaggression als Nachteil einer Vakzinierung zu erwähnen. Ein weiterer Nachteil besteht in der DNA-Integration ins Wirtsgenom. Dazu gehört die Insertion von aktiven Onkogenen oder auch die Deaktivierung von Onkogen-Suppressor-Genen.

## 1.8 Zielsetzung

Ziel dieses Projektes war die Evaluierung mutierten  $\beta$ -Catenins als möglichen Angriffspunkt für eine gezielte immuntherapeutische Intervention.

Um eine therapeutische Strategie gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin bei kolorektalen Tumoren in einem syngenem Rattenmodell (WAG/Rij) zu entwickeln, sollten zuerst durch die karzinogene Behandlung von WAG/Rij Ratten kolorektale Tumore induziert und anschließend aus den induzierten Tumoren DNA-Proben zur Untersuchung von  $\beta$ -Catenin Mutationen gewonnen werden. Durch die Mutationsanalyse in diesem Tiermodell sollte die Rolle des  $\beta$ -Catenins in induzierten Kolontumoren untersucht werden. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob  $\beta$ -Catenin ein geeignetes Zielantigen darstellt.

Um Voraussetzungen für die Untersuchung der Immunigenität des  $\beta$ -Catenin als tumo-rassoziertes Antigen zu schaffen, sollte die vollständige cDNA des Ratten  $\beta$ -Catenins kloniert und eine Plasmid-DNA hergestellt werden.

Die Plasmid-DNA, die eine gezielte Expression mutierten  $\beta$ -Catenins in eukaryontischen Zellen ermöglicht, sollte als DNA-Vakzine zu einer  $\beta$ -Catenin spezifischen Immunisierung eingesetzt werden.

Zuerst sollte in einem Funktionalitätstest die Einsatzbarkeit der Plasmid-DNA geprüft werden.

Durch die Immunisierung der Ratten sollte das Immunsystem gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin aktiviert werden. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Ist infolge der Vakzinierung eine spezifische humorale Immunantwort induziert?
- Ist eine zelluläre Immunantwort bei den vakzinierten Ratten gegen die Tumorzelllinie CC531 nachzuweisen?

CC531 Zellen sollten zur Tumorimplantation bei den immunisierten Ratten mit dem mu-tierten  $\beta$ -Catenin dienen. Dadurch sollte die Frage beantwortet werden, ob infolge dieser Vakzinierung eine Tumorprotektion hervorgerufen wurde.

# Kapitel 2

## Materialien

### 2.1 Reagentien

**Salze:**

Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth

**Säuren und Basen:**

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Natronlauge	Merck
Salzsäure	Merck
Schwefelsäure	Merck
Tris-hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Sigma, Darmstadt

**Organische Lösungen und Chemikalien:**

Acrylamid-Stammlösung (40%)	Merck
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant Blue	Gerben
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiubromid	Merck
Formaldehyd	Merck
Glycin	Roth
Glycerin	Merck
Isopropanol	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu, Heidelberg
Phenol-Ultrapur	Biorad, München
Polyoxyethylensorbitan	Biorad
Ponceau S	Merck
Triton X-100	Merck

## 2.2 Medien und Lösungen für Zellkultur

### Vollmedium:

RPMI-1640, Gibco, Eggenstein versetzt mit 100 U/ml Penicilin (Gibco), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin (Gibco) sowie 10% FKS (Gibco), das durch 30 minütige Inkubation bei 56°C inaktiviert wurde.

### Einfriermedium:

90%	FKS	Gibco, Eggenstein
10%	DMSO	Merck, Darmstadt

Trypsinlösung-Gebrauchlösung (1x)	Gibco
-----------------------------------	-------

## 2.3 Lösungen und Puffer

### 2.3.1 Lösungen und Puffer für Elektrophorese

#### Auftragpuffer für die SDS-PAGE (2x):

62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8	Roth, Karlsruhe
2%	SDS	Gerbu, Heidelberg
5%	$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
10%	Glycerin	Merck
0,05%	Bromphenolblau	Merck

**Coomassie-Färbelösung:**

0,25% Coomassie blue R Serva, Heidelberg  
50% Methanol Merck, Darmstadt  
7% Eisessig Merck

**Coomassie-Entfärbelösung:**

7% Eisessig Merck  
20% Methanol Merck  
3% Glycerin Merck  
70% ddH<sub>2</sub>O

**Elektrodenpuffer für Agarosegele (50x TAE):**

242 g Tris Roth, Karlsruhe  
5,71% Eisessig Merck  
10% 0,5 M EDTA, pH 8 Roth  
Ad 1 l H<sub>2</sub>O

**Elektrodenpuffer für SDS-PAGE:**

248 mM Tris/HCl, pH 8,6 Roth, Karlsruhe  
192 mM Glycin Roth  
0,05% SDS Gerbu, Heidelberg

**Westernblott-Puffer:**

248 mM Tris Roth  
192 mM Glycin Roth  
10% Methanol Merck



**Sammelgelpuffer:**

500 mM Tris/HCl, pH 6,8 Roth

**Trenngelpuffer:**

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 Roth

**MOPS-Puffer (20x) pH 7:**

0,83% MOPS Merck, Darmstadt

0,82% Na-Acetat Merck

0,74% EDTA, pH 8 Roth

Ad 1 l Aqua bidest

**RNA-Ladepuffer:**

50% Glycerin Merck

0,6% 0,5 M EDTA, pH 8 Roth

0,25% Bromphenolblau Merck

0,25% Xylen Cyanol Merck

Ad 3 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

**Lysepuffer:**

500 mM Tris Roth

1,0% SDS Gerbu, Heidelberg

20 mM EDTA Roth

10 mM NaCl Merck, Darmstadt

## 2.4 Lösungen und Puffer für HPLC

Harnstoff: 8 M

48 g Urea ad 100 ml Aqua bidest

### Laufpuffer, pH 8,0:

480,5 g	Harnstoff	Merck, Darmstadt
17,5 g	NaCl	Merck
50 mM	NaHPO <sub>4</sub> , pH 8	Roth, Karlsruhe

ad 100 ml dd H<sub>2</sub>O

### Elutionspuffer:

68,08 g	Imidazol	Merck
250 ml 50 mM	NaPO <sub>4</sub> , pH 8	Roth, Karlsruhe

## 2.5 Allgemeine Lösungen und Puffer

### PBS, pH 7,2:

136,9 mM	NaCl	Merck
2,7 mM	KCl	Merck
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
1,15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck

ad 1 l dd H<sub>2</sub>O

**TBS (10x) pH 7,4:**

87,8 g            NaCl   Merck  
12,1 g            Tris    Roth  
ad 1 l dd H<sub>2</sub>O

**Sequenzierungs-Gel (ALF-EXPRESS):**

60 ml                    40% Acrylamid-Stammlösung   Merck  
300  $\mu$ l                10% APS                                Merck  
30  $\mu$ l                    TEMED                                Merck  
10 ml                    10x TBE  
ad 29,67 ml dd H<sub>2</sub>O

## 2.6 Zelllinien

**CC531:** Die Ratten Kolon Karzinom Zelllinie, die aus einem durch Dimethylhydrazin (DMH) induzierten kolorektalen Tumor stammt, ist genetisch identisch mit WAG/Rij Ratten (Marquet *et al.*, 1984). Diese Zelllinie wurde von Dr. Johannes Gahlen (Chirurgische Klinik Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

**SW948:** Diese Zelllinie stammt aus einem humanen Kolon-Karzinom und wurde von Dr. Susanne Dihlmann (Chirurgische Klinik Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

## 2.7 Plasmide

pExlink RN- $\beta$ -Catenin

pTOPFLASH von H. Clevers, Utrecht, Niederlande



Peroxydase-konjugierter Kaninchen-anti-Ratte IgG, DAKO, Hamburg

Maus-anti-Ratte MHC I, Dianova, Hamburg

Maus-anti-Ratte MHC II, Dianova, Hamburg

FITC-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus IgG, Dianova, Hamburg

## 2.12 Geräte

ALF-EXPRESS	Pharmacia-Biotech, Erlangen
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer	Counter Electronicx, Hialeah, USA
Eagle-Eye-Kamera	Stratagene, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Biorad, München
Eppendorfszentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Leitz, Wetzlar
<sup>137</sup> Gamma-Cell 1000	Atomic Energy of Canada
Gamma-Counter	Hamden, USA
Geltrockner	Biorad, München
Kühlzentrifuge	Sigma, München
Laborwaage	Kern, Balingen
Licht-Mikroskop	Leica, Nußloch
Magnetrührer	Heidolph, Kelkheim
Naßblotkammer	Biorad, München
Peltier-Thermal-Cycler	Pharmacia-Biotech, Erlangen
Quick-Guide ABI	Pharmacia-Biotech
Sterile Werkbank	Labotech, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turax	Junkel & Kunkel
UV-Transilluminator KW 254 nm	Faust, Schaffhausen, Schweiz
Wasserbäder	Julabo, Seelbach
Westernblotkammer	Biorad, München

## 2.13 Sonstige Materialien

Agarose	Gibco, Eggenstein
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Kreuzlingen, Schweiz
Steriles Einmalskalpell	Romed, Niederland
Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Immobilon Membranfilter	Millipore, Eschborn
Hyper Film <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup>	Amersham, Braunschweig
Ultra-Turax	Junkel & Kunkel, Staufen

## 2.14 Versuchstiere

### **Herkunft und Haltung**

Als Versuchstiere dienten weibliche Ratten aus dem Wistar Albino Glaxo (WAG) Stamm. Es handelt sich um einen speziellen Inzuchtstamm, der ursprünglich von Bacharach 1924 in den Glaxo-Laboratorien, Großbritannien gezüchtet und schließlich seit 1960 in Rijswijk (Rij), Niederlande weiter entwickelt wurde. Die verwendeten Tiere für diese Arbeit wurden von der Harlan-Winckelmann GmbH, Borcheln bezogen und gelangten bei einer Körpermasse von 250-300 g in den Versuch. Die Ratten wurden in Gruppen zu je 3 Tieren in Makrolonkäfigen (ca. 55x32 cm, Höhe: ca. 20 cm) auf Holzgranulat (Firma Altromin, Lage, Deutschland) bei einer Raumtemperatur von 22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 55% und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie erhielten als Futter Altromin Standard Diät (1324Nff) für Ratten sowie Wasser ad libitum.

# Kapitel 3

## Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Kultivieren von Zelllinien

Die Zelllinie CC531 wurde in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Heraeus Inkubator propagiert.

#### 3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und 5 min bei 1000 rpm, 4°C zentrifugiert (Heraeus, Hanau). Die Zellzahl wurde auf  $1 \cdot 10^6$  pro 1 ml Einfriermedium (vgl. 2.2) eingestellt und in vorgekühlten 2 ml Einfriergefäße aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen zuerst 1 h bei –20°C und später bei –80°C eingefroren. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff bei –196°C für längere Zeit gelagert.



Zum Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm, 20°C zentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen. Das Pellet wurde in 20 ml Vollmedium aufgenommen und unter Routinebedingungen inkubiert.

### 3.1.3 Anlegen von Glycerinkulturen

Um Bakterienstämme zu konservieren, wurden 800  $\mu$ l einer Überachtkultur mit 300  $\mu$ l Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## 3.2 Expression des mutierten $\beta$ -Catenin-Proteins in Bakterien

### Induktion:

Es wurden 100 ml LB-Medium 1:1000 mit einem Glycerolstock von Bakterien, die mutiertes  $\beta$ -Catenin Gen exprimierten, angeimpft und für 14 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 4 l LB-Medium mit der Überachtkultur angeimpft und auf einem Schüttler bei 220 rpm und 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen von 30 min wurden aus der Bakterienkultur Proben entnommen und die optische Dichte (OD) mit Hilfe eines Spektrometers (Biorad, München) gemessen. Die Bakterieninkubation wurde so lange fortgesetzt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Die Bakteriensuspension wurde dann mit IPTG 1 mM/ml für 4 h induziert. Diese wurde dann bei 4000 rpm und 4°C für 30 min abzentrifugiert und das Pellet bei -80°C eingefroren.

### Bakterienlyse:

Zuerst wurde eine Proteasen-Inhibitoren-Tablette EDTA-frei (Roche, Mannheim) in 50 ml Extraktionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0) gelöst und 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Pellet von induzierten Bakterien in 20 ml Gemisch resuspendiert.

Um nun die DNA zu scheren, sollte das im eiskalten Natriumphosphatpuffer aufgenommene Pellet mit Ultraschall behandelt werden. Die Ultraschallbehandlung erfolgte im Kühlraum mit einem Branson Sonifier (Ultraschall & Labortechnik) 6 mal jeweils für 1 min. Zwischen zwei aufeinander folgenden Sonifikationen wurde 1–2 min gewartet. Durch Zugabe von 0,3 M NaCl sollte die Aktivität von Proteasen unterdrückt werden.

Es folgte die Ultrazentrifugation des Gemisches bei 55000 rpm und 4°C für 1 h. Der Überstand wurde bei –80°C eingefroren und das Pellet in 20 ml 8M Harnstoff, 0,3 M NaCl, 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8) resuspendiert und mit Hilfe eines Douncers (Braun, Melsungen) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 3 h bei 10°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Diese Inkubationszeit sollte die Löslichkeit des Proteins erhöhen. Erneut wurde die Ultrazentrifugation unter oben genannten Bedingungen durchgeführt. Dieser Überstand wurde ebenfalls bei –80°C gelagert.

Zum Schluß wurde ein 8%iges SDS-Gel gegossen. Proben aus aufeinander folgenden Schritten wurden auf das Gel aufgetragen, um eine Aussage über die Löslichkeit des Proteins im betreffenden Überstand bzw. nicht gelöstes Protein im Pellet zu machen. Die Probe mit der höchsten Proteinmenge sollte dann mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gereinigt werden.

### 3.3 Herstellung von Interleukin-2 haltigen Überständen

Aus einer WAG/Rij Ratte, die vorher unter CO<sub>2</sub>-Begasung getötet worden war, wurde die Milz herauspräpariert und durch ein steriles Nylon-Sieb (100 µm, Falcon) passiert. Die Zellen wurden 2 mal im RPMI 1640 Medium gewaschen und die Zellzahl auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml in 200 ml zusammen mit 1 µg/ml Concanvalin A (Pharmacia-Biotech, Erlangen) in einer großen Kulturflasche eingestellt und für 48 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um den Überstand zu gewinnen, wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 1800 rpm pelletiert.

In einem neuen Gefäß wurde der Überstand (200 ml) mit 4 g Alpha-Methyl-D-Mannoside versetzt, steril filtriert (0.22  $\mu\text{m}$  Filter) und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.4 Durchflußzytometrische Untersuchungen

Zur Untersuchung verschiedener Zellpopulationen wurden Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichtet sind, markiert. Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an den Antikörpern gekoppelt sind, können die gebundenen Antikörper durch Anregung der Fluoreszenz mit einem Laser sichtbar gemacht werden. Die durchflußzytometrische Analyse erfolgt mit Hilfe des FACScan (FACS für engl. Fluorescent Activated Cell Sorting). Bei der Durchflußzytometrie werden die physikalischen Eigenschaften von Zellen gemessen. Die Zellen passieren einzeln verschiedene Detektoren, die die Lichtstreuung der Zellen und das Fluoreszenzlicht messen. Man unterscheidet zwischen einer Streuung in der Vorwärtsrichtung (Aufwärtsstreulicht) und einer Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl (Orthogonalstreulicht). Die Lichtstreuung einer Zelle ist abhängig von der Größe und der Oberflächen- und Zytoplasmabeschaffenheit. Das Aufwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der gemessenen Zellen, während das Orthogonalstreulicht die Granularität der Zellen mißt. Die Fluoreszenz des bei den Experimenten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Fluoreszein (FITC) wird mit einem Argonlaser angeregt. Der Farbstoff emittiert bei einer Wellenlänge von 510 nm. In einem Koordinatensystem lassen sich die verschieden gefärbten Zellen darstellen. Durch Verwendung eines anderen Fluoreszenzfarbstoffes (Propidiumjodid) können tote Zellen angefärbt werden. Propidiumjodid gelangt durch die Kernmembran und lagert sich dort in die DNA ein. Diese Methode wurde verwendet, um die Expression von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Ratten Zelllinie CC531 zu untersuchen.

Pro Probe wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen eingesetzt. Alle Schritte wurden, soweit nicht anderes angegeben, bei  $4^\circ\text{C}$  und mit eiskalten Lösungen durchgeführt. Für den Nachweis von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und direkt mit dem monoklona-

len Erstantikörper Maus-anti-Ratte MHC I und Maus-anti-Ratte MHC II (Dianova, Hamburg) inkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper bzw. mit dem FITC-markierten Kaninchen-anti-Maus IgG als Zweitantikörper (1:10), in Kulturmedium verdünnt, erfolgte jeweils 30 min. Vor jeder Zugabe von Antikörpern wurden die Zellen einmal mit Kulturmedium, nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper einmal mit PBS gewaschen, bevor sie zur Fixierung der gebundenen Antikörper in 200  $\mu$ l 1% Formaldehyd/PBS aufgenommen wurden.

Die Analyse der Proben erfolgte im Durchflußzytometer (Counter Electronicx, Hialeah, USA). Bei der Auswertung wurde der "mean"-Wert, d. h. das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität der Probe zu der entsprechenden Negativkontrolle, angegeben.

## 3.5 Immunhistologische Färbungen

### Hämalaun und Eosin Färbung (HE-Färbung):

Die Gefrierschnitten wurden auf einem Objektträger mit Aceton für 10 min fixiert. Die Proben wurden luftgetrocknet und 5 min mit Hämalaun behandelt, wodurch die Zellkerne blau gefärbt werden. Nach dem die Objektträger 10 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen wurden, wurde das Zytoplasma 10 sec mit Eosin nachgefärbt (rot). Anschließend wurden die Proben mit Aqua bidest erneut gewaschen und luftgetrocknet.

## 3.6 DNA-Präparationen

### 3.6.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Um Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen zu fällen, muß ihnen die Hydrathülle entzogen werden. Dazu wurde die Lösung mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5,2 versetzt, mit dem 2,5 fachen Volumen 96% Ethanol vermischt und 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifu-

giert. Das Pellet wurde zur Entfernung von Salzen mit 70% Ethanol gewaschen (5 min, 15000 rpm), kurz luftgetrocknet und im sterilem Aqua bidest. resuspendiert. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 2  $\mu$ l DNA in 1 ml destillierten Wasser (steril) aufgenommen und anschliessend die Konzentration an einem Spektralphotometer (Biorad, München) gemessen (vgl. 3.7).

### 3.6.2 DNA-Aufarbeitung aus Kulturzellen

CC531 Zellen wurden aus einer großen Kulturflasche abtrypsiniert, in 20 ml PBS aufgenommen und bei 1000 rpm, 4°C gewaschen und auf  $10^6$  Zellen pro ml eingestellt, anschließend in 10 ml Lysepuffer lysiert und zur Degradation der Proteine mit Proteinase K (100  $\mu$ g/ $\mu$ l Endkonzentration) über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Extraktion der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 Vol Phenol. Die DNA wurde 1 h bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Drehmischers mit dem Extraktionsmittel vermischt. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation (Heraeuszentrifuge, Hanau) bei 3000 rpm und 20°C.

Die obere wässrige Phase (DNA) wurde erneut mit 1 Vol Phenol und 1 Vol Chloroform in gleicher Weise vermischt und abzentrifugiert. Schließlich wurde die obere Phase mit 1 Vol Chloroform gemischt und abzentrifugiert. Zur Entfernung restlicher Extraktionsmittel, wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert, in sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert und die DNA-Konzentration gemessen (vgl. 3.7).

### 3.6.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Die DNA Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde mit langwelligem UV-Licht identifiziert und mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Das Fragment wurde nun kurz im flüssigen Stickstoff einge-

froren und in einem für die Gelextraktion vorgesehenen Sieb, in vorgekühlter Zentrifuge (4°C) von Gelresten befreit. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mit dem PCR Purifikation Kit nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim). Die präzipitierte DNA wird im Wasser resuspendiert.

### 3.6.4 DNA-Extraktion aus Gewebegefrierschnitten

Mit Hilfe eines Kryotoms wurden zehn 10  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden diese Schnitte in 150  $\mu\text{l}$  Lysepuffer überführt und nach Zugabe von Proteinase K (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Endkonzentration) übernacht bei 56°C inkubiert (Heizblock, Eppendorf). Die Extraktion der DNA erfolgte wie im 3.6.2 beschrieben. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, im sterilen Wasser aufgenommen und photometrisch gemessen (vgl. 3.7).

### 3.6.5 DNA-Isolierung aus mikrodisezierten Gewebegefrierschnitten

Es wurden 10  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte (vgl. 3.6.4) aus Kolontumoren von DMH behandelten Ratten vorbereitet und auf Objektträgern nach HE-Färbemethode gefärbt. Nach einer mikroskopischen Untersuchung wurden Gewebeareale, bei denen es sich um Adenomen und Karzinomen handelte, mit Hilfe einer Nadelspitze abgekratzt und das Material in einem Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt. Die DNA wurde unter Verwendung von QIAMP TISSUE KIT (QIAGEN, Hilden) isoliert und im sterilen Aqua bidest resuspendiert.

### 3.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem Spektralphotometer (Biorad, München) durchgeführt. In 1-cm-Quartzküvetten gilt folgende Beziehung von optischer Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) und der Konzentration von Nukleinsäuren (Sambrook *et al.*, 1989, Applied Biosystems Manual für DNA-Synthesizer 380 A):

1 $OD_{260}$ doppelsträngiger DNA entspricht	50 $\mu\text{g/ml}$
1 $OD_{260}$ RNA entspricht	40 $\mu\text{g/ml}$
1 $OD_{260}$ einzelsträngiger Oligonukleotid entspricht	30 $\mu\text{g/ml}$

Das Verhältnis der  $OD_{260}/OD_{280}$  ermittelt die Reinheit der entsprechenden Nukleinsäure; Nukleinsäure-Präparationen ohne kontaminierende Proteine oder Phenolreste haben  $OD_{260}/OD_{280}$ -Werte von 1,8-2,0.

### 3.8 DNA-Ligation

Die DNA wurde mittels Polymerase Chain Reaction amplifiziert. Nach Aufreinigung der jeweiligen DNA-Fragmenten erfolgte die Ligation mit T4 Ligase nach dem Protokoll des Herstellers. Die T4 Ligase katalysiert die kovalenten Verknüpfungen von nebeneinander liegenden 3'-Hydroxy und 5'-Phosphat Enden. Der Ligationsansatz beinhaltete 10 ng des PCR-Produktes, pCR<sup>®</sup> Vektor 25 ng/ $\mu\text{l}$  (TA Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen) unter Zugabe vom 10x Ligationspuffer, sterilen  $\text{H}_2\text{O}$ , und der Ligationsenzym T4 DNA Ligase (1U) in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$ . Das molare Verhältnis zwischen Vektorfragment und zu inserierendem DNA-Fragment beträgt 1:1 bis 1:3. Der Reaktionsansatz wurde in einem Wasserbad übernacht bei 14°C inkubiert.

### 3.9 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Die Transformation von Bakterienzellen erfolgt durch die Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz zu den One Shot Bakterien Zellen (Invitrogen). Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis gestellt, um ihn anschließend einem 30 sec dauernden Hitzeschock bei 42°C auszusetzen. Die Zellen wurden 2 min auf Eis gelagert, mit 250  $\mu\text{l}$  SOC Medium (TA Cloningkit, Invitrogen) aufgefüllt und eine Stunde auf einem Eppendorfschüttler bei 37°C, 225 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf Eis gestellt. Danach wurden 100  $\mu\text{l}$  auf einer LB-Agarplatte mit dem Selektionsantibiotikum (Kanamycin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ausplattiert und übernacht bei 37°C inkubiert.

### 3.10 Plasmid-Minipräparation

Aus einer Bakterienplatte, die mit Kolonien bewachsen war, wurde eine Übernachtskultur vorbereitet, in dem eine Kolonie mit aus der Platte mit einer Pipettenspitze isoliert und 3 ml LB-Medium angeimpft wurde. Die Bakterienkultur wurde mit Kanamycin (50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Endkonzentration) versetzt, da die Plasmide ein Resistenzgen für Kanamycin enthielten, und übernacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Bakterien aus 2 ml Übernachtskultur wurden bei 14000 rpm, 1 min bei RT zentrifugiert und das Pellet mit dem Plasmid-Minipräparationskit (Biorad, München) behandelt. Die Bakterien wurden zuerst in 200  $\mu\text{l}$  Zellresuspensionslösung aufgenommen, mit 250  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer vorsichtig gemischt, wobei eine klare Lösung nach Lyse der Bakterien entsteht. Anschließend wurde sie mit 250  $\mu\text{l}$  Neutralisationslösung versetzt. Nach der Neutralisation bildet die chromosomale DNA zusammen mit den zellulären Proteinen einen Klumpen, der durch die Zentrifugation entfernt werden kann. Die Plasmid DNA verbleibt im Überstand.

Die Plasmid DNA wurde mit 200  $\mu\text{l}$  Matrix-Suspension vermischt und auf eine Biorad-



Säule gegeben. Die Matrix-Suspension dient der Bindung der DNA an das Säulenmaterial. Das Gemisch wurde dann 30 sec bei RT und 14000 rpm zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die DNA 2x mit 500  $\mu$ l Waschlösung (Roche, Mannheim) zuerst gewaschen und in 200  $\mu$ l sterilen Wasser eluiert.

Um die DNA-Lösung zu konzentrieren, wurde sie mit Ethanol präzipitiert (vgl. 3.6.1) und in sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert.

### 3.11 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

(Fuchs und Blakesly, 1983)

Für den Restriktionsverdau wurden 1–10  $\mu$ g Plasmid-DNA in einem Standardansatz mit 2  $\mu$ l 10x Puffer und 1  $\mu$ l Restriktionsenzym (10 u/ $\mu$ l, Biorad, München) KpsI bzw. XbaI versetzt und mit Aqua bidest auf 20  $\mu$ l Endvolumen aufgefüllt. Der Verdau erfolgte für 1,5 h bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt und die DNA-Spaltung auf einem 2%igen Agarosegel kontrolliert (vgl. 3.12.1).

### 3.12 Elektrophoresen und Blottechnik

#### 3.12.1 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA

(McDonell *et al.*, 1977)

Die Auftrennungen erfolgten über Horizontalgele, die je nach Größe der auftrennenden DNA mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen (1,2–2%) vorbereitet und verwendet wurden. Die Agarose wurde in 1x TAE in einem Mikrowellenherd aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt, mit 0,01 Vol Ethidiumbromid versetzt (0,5  $\mu$ g/ml Endkonzentration) und in den entsprechenden Gelschlitten gegossen. Die DNA wurde mit 2x DNA-Auftragpuffer versetzt und in die Taschen des Gels getragen. Als Längenstandard wird eine 100 bp

Leiter verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Gelkammer (Biorad, München) bei einer Stromstärke von 80 mA für 30 min. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einer digitalen Kamera (Stratagene, Heidelberg) fotografiert.

### 3.12.2 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1,2% Agarose-Gel. Das Gel wird mit 1x MOPS-Puffer angesetzt. Die Agarose wurde in 1x MOPS-Puffer (vgl. 2.3.1) aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) versetzt. 2 µl RNA wurde mit RNA-Probenpuffer (3x) vermischt und für 10 min bei 65°C auf einem Heizblock (Eppendorf, Hamburg) erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese verlief unter Standard-Bedingungen (vgl. 3.12.1).

### 3.12.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Trennung von Proteinen

Es wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) verwendet.

Ein 6%iges Trenngel (vgl. 2.3.1) wurde zwischen zwei Glasplatten eines Minigel-Apparates (Biorad, München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde die Isopropanol Schicht abgegossen, 2x mit Aqua bidest gewaschen und mit Sammelgel übergossen.

Um nun Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen, wurden sie in einem Laemmli-Probenpuffer (2x) mit dem Detergenz SDS (sodium dodecyl sulfate) und dem Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Die Denaturierung erfolgte durch 10 minütige Erhitzung bei 95°C auf einem Schüttler (Eppendorf, Hamburg).

SDS bewirkt die Solubilisierung und stark negative Aufladung der Proteine, so dass sie

sich im elektrischen Feld bezüglich ihrer Gesamtladung gleich verhalten. Mercaptoethanol bewirkt durch die Reduktion von Schwefelbrücken zu Sulfhydrylgruppen eine Zerstörung der Quartär- und Tertiärstruktur und damit eine ausschließliche Trennung nach dem Molekulargewicht und nicht nach der räumlichen Struktur.

Durch eine rasche Zentrifugation von 5 sec bei 14000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) wurden die unlöslichen Teile abgetrennt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt. Auf das 12%ige Sammel-Gel wurden pro Tasche 30 ng Protein geladen und eine Spannung von 90 V bzw. 120 V zur Auftrennung der Proben im Sammelgel bzw. im Trenngel angelegt.

### 3.12.4 Western-Blot

Western-Blot ist eine Methode bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter, z. B. Nitrocellulose oder Nylon übertragen werden. Die immobilisierten Proteine auf dem Filter können mit Hilfe von Antikörpern oder Enzymsubstraten qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

Die Western-Blot-Technik wurde verwendet, um die Spezifität der Immunsereen, entnommen aus den gegen  $\beta$ -Catenin vakzinierten Ratten, zu testen.

Die SDS-Gelelektrophorese verlief unter gleichen Bedingungen wie im 3.12.3 beschrieben.

#### 3.12.4.1 Transfer auf Immobilonmembran

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte durch das konventionelle Naßblotting-Verfahren.

Als Trägerfilter diente eine Polyvinylidenfluorid Membran (Immobilon<sup>®</sup>, Millipore). Der Membranfilter wurde zuerst 10 sec im Methanol getränkt, 2 min in destilliertem Wasser aquilibriert und 5 min im Western-Blot-Puffer (vgl. 2.3.1) gelegt.

Das Gel, welches für 15 min im Western-Blot-Puffer vorbehandelt war, wurde auf zwei bereits mit Puffer getränkte Filterpapierschichten gelegt. Über dem Gel wurde die Transfermembran gelegt, auf die wiederum eine dicke zweischichtige Lage von Filterpapier zu liegen kam. Das Blotgerät (Biorad, München) wurde mit ca. 800 ml Blotpuffer gefüllt.

Der Transfer erfolgte in 1,5 h bei einer Stromstärke von 300 mA bei 4°C.

Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese wurde das Blot abgebaut und die Membran für 1 min in Ponceau S gefärbt. Dieser Vorgang diente der Effizienzüberprüfung des Blots. Nach dem Waschen mit destilliertem Wasser konnten quantitative Aussagen über den Blot gemacht werden.

Das Gel wurde mit Coomassie Blue für 30 min bei RT auf dem Schüttler zur Kontrolle des Transfers gefärbt und übernacht mit 7% Essigsäure (vgl. 2.3.1) entfärbt.

#### **3.12.4.2 Trocknen von Coomassie gefärbten Gelen**

Das übernacht entfärbte Coomassie-Gel wurde für 1 h im ddH<sub>2</sub>O gelegt. Zwei Geltrocknerfolien wurden im Wasser eingeweicht. Das SDS-Gel wurde zwischen den Folien auf einem Geltrockner (Biorad, München) für 2 h unter Vakuum getrocknet.

#### **3.12.4.3 Immunreaktion**

Die Membran wurde mit 1x TBST (0,1% Tween 20) gewaschen und übernacht im Kühlraum mit 5% Trockenmilch, 1% BSA in TBST geblockt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Daraufhin folgten vier Waschschrte mit TBST jeweils 10 min bei RT.

Das Antiserum wurde 1:200 in 5% Trockenmilch, 1% BSA und TBST verdünnt. Die erste Immunreaktion erfolgte durch die Inkubation der einzelnen Blotstreifen mit dem

Antikörper, übernacht bei 4°C.

Das Auswaschen vom nicht gebundenen Antikörper geschah durch viermalige Behandlung der Membran mit TBST. Jeder Waschgang wurde 10 min durchgeführt.

Der Peroxidase-konjugierte Ziegen-Anti-Ratte Antikörper, 1:1000 verdünnt in TBST, 5% Trockenmilch (1% BSA) diente als Zweit-Antikörper, mit welchem die Membran weitere 60 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran 6 mal, jeweils 15 min lang mit TBST gewaschen.

#### **3.12.4.4 Nachweisreaktion von mutiertem $\beta$ -Catenin-Protein**

Die Enhanced Chemiluminescence (ECL) sollte der Identifikation der WAG-Ratten Immunseren mit dem zu untersuchenden Protein (mutierten  $\beta$ -Catenin) dienen. Bei dieser Nachweismethode handelt es sich um ein hochempfindliches nicht-radioaktives Verfahren. Die Substrate sind hierbei Substanzen, die bei einer enzymatischen Reaktion unter Lichtentwicklung zerfallen. Bei dem hier von der Firma Amersham verwendeten Western Blot ECL-Kit wird durch die Meerrettich-Peroxidase die Oxidation des Farbstoffes Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert. Dadurch wird das Luminol in einen angeregten Zustand gebracht. Durch Lichtemission erreicht das Luminol wieder seinen Grundzustand und damit ein niedrigeres Energieniveau. Die Lichtemission führt zu einer Schwärzung auf dem Röntgenfilm. Die Blotstreifen wurden nach dem letzten Waschschrift 1 min im ECL-Puffer (Amersham, Braunschweig) inkubiert. Die bei der Peroxidase-Reaktion entstehenden Lichtblitze wurden bei einer Expositionszeit von 1 sec mit dem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### 3.13 Präparation von Gesamt-RNA aus Kolonkarzinom-Zellen und der Milz von immunisierten Ratten

Zur RNA Extraktion wurden CC531 Zellen aus einer Zellkulturflasche trypsiniert. Die Zellen wurden erneut in 20 ml Vollmedium aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Zum Pelletieren von Zellen, wurden sie bei 1000 rpm und Raumtemperatur, 10 min zentrifugiert (Heraeus, Hanau). Unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Extraktion der RNA verlief unter Homogenisierung der Zellen (Zellpellet) bzw. der Milz mit Hilfe eines Positrons 30 sec in 800  $\mu$ l bzw. 4 ml Lösung D.

Die RNA-Extraktion verlief unter Zugabe von 0,1 Vol 2M Natriumacetat\* (pH 4), 1 Vol Phenol und 0,25 Vol Chloroform zu den homogenisierten Zellen bzw. der Milz. Das Gemisch wurde 15 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmannzentrifuge), um die RNA (Oberphase) von DNA und Proteinen (Interphase) abzutrennen. Die RNA in der Oberphase wurde mit 1 Vol Isopropanol mindestens 1 h bei -20°C präzipitiert und anschließend 30 min bei 10000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das feuchte Pellet wurde in 1,5 ml Lösung D\* aufgenommen und mit 175  $\mu$ l 2 M Natriumacetat\* (pH 5,5), 500  $\mu$ l Phenol und 500  $\mu$ l Chloroform nochmal extrahiert und gefällt. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 70% Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen und in 500  $\mu$ l DEPC-Wasser resuspendiert. Die Qualität der RNA wurde auf ein MOPS-Agarosegel überprüft und die Konzentration der RNA mit einem Spektralphotometer ermittelt (vgl. 3.7).

\*) Diese Lösungen wurden mit sterilem DEPC-Wasser angesetzt.

**Lösung D:**

50 g	Guanidiniumthiocyanat (GTC)
58,5 ml	DEPC-Wasser
3,52 ml	Natriumacetat* 0,75 M, pH 7,0
5,28 ml	Sarcosyl
0,1 M	$\beta$ -Mercaptoethanol (Zugabe kurz vor dem Gebrauch)

### 3.14 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wurde die Superscript<sup>TM</sup> II (Gibco) verwendet, um einzelsträngige cDNA herzustellen.

Die RNA stammte aus Rattentumorzellen bzw. Rattenmilz (vgl. 3.13). Der Reaktionsansatz erfolgte gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung von 1  $\mu$ l Oligo dT (500  $\mu$ g/ml) und 1  $\mu$ g Gesamt-RNA.

### 3.15 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wird zur Amplifikation von definierten DNA-Bereichen benutzt. Das Grundprinzip der PCR ist die enzymatische Duplikation einer DNA-Sequenz. Hierzu benötigt werden zwei Oligonukleotide, die Primer, die jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region sind. Nach Hitze-Denaturierung der DNA können sich die Primer bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern. Eine hitzestabile Polymerase, z. B. Taq-Polymerase, erstellt — ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers — durch Primer-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Die Primer müssen so orientiert sein, dass die Synthesen der DNA-Moleküle aufeinander zu-

laufen. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeinwirkung voneinander getrennt. Durch erneute schnelle Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der Primer an die entstandenen DNA-Stücke ermöglicht. Durch Primerverlängerung wird dann wieder eine neue Kopie der Template-DNA erstellt.

Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen dieses Zyklus wird eine vieltausendfache Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern erreicht.

Für die Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde die Taq DNA Polymerase von der Firma Gibco verwendet. Der Reaktionsansatz erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Als Probe diente die mikrodisezierte DNA (vgl. 3.6.5) aus den Gefrierschnitten von Kolonadenomen bzw. Karzinomen der DMH behandelten Ratten.



### 3.16 Primerdesign für PCR

Anhand der folgenden Primerpaare wurde die Amplifikation von bestimmten Bereichen im APC,  $\beta$ -Catenin und K-ras Gen durchgeführt.

Die Sequenz für die verwendeten Primer wurde aus der publizierten Ratten-cDNA Sequenz, die in der Datenbank HUSAR des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg enthalten ist, abgeleitet.

Untersuchtes Gen	Exon	Codon	Oligonukleotidsequenz
APC	15	1061	5'-AGCAGCTGAACTCAGGAAGG- ACTGGTTCACAATTTTGATTAA-3'
APC	15	1307	5'-CCCCAATATGTTTCTCAAGG- GCTTTTGGAGGGAGACTTGG-3'
APC	15	1554	5'-GCCTAAGTGCTCTGAGTCTGG- TGCGTGATGACTTTGTTGG-3'
$\beta$ -Catenin	3	41	5'-GCTGACCTGATGGAGTTGGA- GCTACTTGCTCTTGCGTGAA-3'
K-ras	1	12, 13	5'-CCTGCTGAAAATGACTGAGTA- CTATCGTAGGATCATATTCA-3'

### 3.17 Primerdesign für Klonierung des vollständigen

#### $\beta$ -Catenins

RN $\beta$ catfwd1	5'-CCCCAAGGGTATCTGAAG-3'
RN $\beta$ catfwd2	5'-AAACCGCGGAAACCATGGCTACTCAAGCTGACCTC-3'
RN $\beta$ catrev1	5'-TTRACTCCTCGACCAAAAAGG-3'
RN $\beta$ catrev2	5'-GGGTCTAGAAAGTTTACTTCGACTGTTCC-3'

### 3.17.1 PCR Strategie zur Detektion von Mutationen in Codon 1307, 1061 und 1554 des APC-Gens

Die Polymerase-Ketten-Reaktion für Codon 1307 und 1061 verlief unter Verwendung von Taq DNA Polymerase nach folgendem Programm:

- Die einmalige Denaturierung der DNA-Stränge, 3 min bei 95°C
- 45 sec wurden kurze DNA-Stücke bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden für 45 sec bei 50°C abgekühlt, um die Anlagerung der Primer an die Matrize zu ermöglichen. Eine einminütige Erhitzung der Proben auf 72°C diente der DNA-Synthese. Diese Schritte wurden in weiteren 34 Zyklen wiederholt. Anschließend wurde zur Elongation der DNA nach Beendigung der Zyklen, die Temperatur 7 min bei 72°C beibehalten.
- Die PCR verlief für das Codon 1554 im APC Gen unter oben genannten Bedingungen. Die Primer-Anlagerungstemperatur (Annealing Temperatur) wurde bezüglich des Primers auf 55°C erhöht.

### 3.17.2 PCR Strategie zur Detektion von Mutationen im Exon 3 des $\beta$ -Catenin bzw. Exon 1 des K-ras Gen des Tumormaterials

Der Polymerase Ketten Reaktionansatz (50  $\mu$ l) erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Gibco, Eggenstein). Das PCR-Programm begann mit dem Denaturierungsschritt der Proben 3 min bei 95°C. Die PCR Zyklen verliefen unter drei aufeinander folgenden Schritte:

- Erhitzen der kurzen DNA-Stücke, 45 sec bei 95°C
- Anlagerung der Primer 45 sec bei 50°C

- Die DNA-Synthese 1 min bei 72°C

Diese Zyklen wurden 35 mal wiederholt. Anschließend folgte die Elongation, 7 min bei 72°C.

## 3.18 Sequenzierung

### 3.18.1 Sequenzierung von doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung von Plasmid DNA wurde am ALF EXPRESS nach dem EMBO Protokoll durchgeführt.

10  $\mu$ l DNA (ca. 5  $\mu$ g) wurden mit 2  $\mu$ l vorgefärbtem Primer (10  $\mu$ M) versetzt. Eine dreiminütige Inkubation bei 65°C nach Zugabe von 1  $\mu$ l 1 M NaOH sollte zur alkalischen Denaturierung der DNA führen. Das Gemisch wurde anschließend für 15 min bei 37°C abgekühlt. Danach erfolgte die Neutralisation des Gemisches durch Zugabe von 1  $\mu$ l 1 M HCl. Für die Termination wurden 2  $\mu$ l Primer-Anlagerungspuffer hinzugefügt und 10 min bei 37°C gelagert.

In jedes Reaktionsgefäß wurden 1  $\mu$ l Extensionspuffer und 0,5  $\mu$ l T7 DNA Polymerase hinzugegeben.

3,5  $\mu$ l Reaktionsgemisch wurden auf die einzelnen Nukleotide gegeben und die Reaktion nach 5 min mit 4  $\mu$ l Stop-Puffer gestoppt.

Unmittelbar bevor die Proben auf das ALF-GEL (vgl. 2.5) aufgetragen wurden, erfolgte eine Denaturierung der Proben 3 min bei 85°C.

### 3.18.2 Sequenzierung von PCR Produkten

Die PCR-Produkten wurden zuerst mit dem PCR-Purification Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt und die Sequenzierungsreaktion mit dem Ampli Taq<sup>®</sup> FS Big Dye Terminator Kit mit einem Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l angesetzt.

**Reaktionsansatz:**

3  $\mu$ l Prämix, 20-100 ng PCR-Produkt (je nach Größe des Produktes), 1  $\mu$ l Primer 10 pmol wurden zusammen pipettiert und mit HPLC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l aufgefüllt.

**Sequenzierungsprogramm:**

Die Proben wurden an einem Thermal Cycler (Perkin Elmer) mit folgendem Programm sequenziert. Vor Beginn der Zyklen erfolgte die vollständige Denaturierung der DNA bei 95°C für 5 min.

Reaktionsschritte im Einzelnen:

- Trennung der doppelsträngigen Matrizen-DNA (95°C, 30 sec)
- Anlagerung der Primer an homologen Bereichen der Proben-DNA (52°C, 15 sec)
- DNA-Synthese (60°C, 4 min)

Durch eine 25 faches Wiederholen dieses Zyklus wurde die Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primers erreicht.

Die sequenzierten Proben wurden mit Ethanol präzipitiert und das luftgetrocknete Pellet in 25  $\mu$ l TCR Puffer aufgenommen. Nach einer 2 minütigen Denaturierung der Proben bei 95°C wurden sie auf ein ABI 310 DNA Sequenzer (Perkin Elmer) analysiert.

Die anschließende Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Sequenz-Analyse-Programm HUSAR (DKFZ, Heidelberg).

### 3.19 Zytotoxizitätstest zum Nachweis der zellulären Immunantwort

Zur Untersuchung einer vorhandenen zellulären Immunantwort wurde der Zytotoxizitätstest mit Hilfe des  $^{51}\text{Cr}$  release assay durchgeführt. Dieser Test dient als Funktionstest zur Untersuchung von zytotoxischen Effektorzellen. Zuerst sollten die aus dem Blut und der Milz von vakzinierten Ratten die T-Lymphozyten isoliert werden. Die isolierten T-Lymphozyten wurden im Stimulations-Medium (Vollmedium, 10% Interleukon-2 haltigem Überstand) aufgenommen und für 5 Tage durch Coinkubation mit  $\gamma$ -bestrahlten (200 Gy,  $\gamma$ -Tron  $^{60}\text{Co}$ ) Tumorzellen (CC531) bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  vorstimuliert.

Es wurden  $10^6$  Tumorzellen mit  $100\ \mu\text{Ci}$   $^{51}\text{Cr}$  radioaktiv markiert und 1 h bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit eiskaltem Vollmedium 10 min bei 1000 rpm, und  $4^\circ\text{C}$  gewaschen und in einer Konzentration von 5000 Zellen in  $100\ \mu\text{l}$  pro Loch in die Löcher einer Mikrotiterplatte hineinpipettiert. Die Effektoren (vorstimulierte T-Lymphozyten) wurden in Effektor:Target Verhältnissen von 3:1, 10:1, 30:1 und 100:1 zu den Tumorzellen gegeben und für 6 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 1200 rpm pelletiert,  $100\ \mu\text{l}$  von dem Überstand entnommen, in dafür vorgesehenen Plastikröhrchen hineinpipettiert, mit heißem Paraffin verschlossen und die freigesetzte Radioaktivität mit einem  $\gamma$ -Counter (Hamden, USA) in Dreifachwerten gemessen. Die freigesetzte Aktivität sollte ein Maß für die Erkennung und die Lyse der Tumorzellen durch T-Lymphozyten sein. Die Bestimmung der spontanen Freisetzung erfolgte durch Zugabe von reinem Medium statt der Effektoren, die maximale Freisetzung durch Inkubation der Targetzellen mit 1% Triton-X-100.

Die spezifische Lyse wurde wie folgt errechnet:

$$\frac{\text{spezifische Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}}{\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}} \cdot 100 = \text{spezifische Lyse}$$

## 3.20 Tierversuche

### 3.20.1 Genehmigung der Tierversuche

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt. Die Kurzbezeichnung des Versuchsantrages lautet “Vakzinierung beim chemisch induzierten Ratten-Kolonkarzinom” und trägt die Genehmigungsnummer 072/98.

### 3.20.2 Vakzinierung von Ratten

Zur Stimulation der T-Zellantwort wurden 16 weibliche 10–12 Wochen alte Wag/Rij Ratten jeweils mit 200  $\mu\text{g}$  rekombinantem  $\beta$ -Catenin Plasmid (Abbildung 4.5), in 300  $\mu\text{l}$  PBS vakziniert. Die Immunisierung der Ratten erfolgte durch eine viermalige, im Abstand von 10 Tagen erfolgende intradermale Injektion des Vakzinierungsplasmids. Die Applikation des Plasmids wurde mit Hilfe einer 0,6 mm Kanüle an mehreren Stellen unter die Haut im Nackenbereich durchgeführt.

### 3.20.3 Tumorimplantation in Ratten

Im flüssigen Stickstoff eingefrorene CC531 Zellen wurden aufgetaut (vgl. 3.1.2), im PBS gewaschen, im Vollmedium aufgenommen und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zwei Tage nach Kultivierung wurden die Zellen mit Trypsin (Gibco, Eggstein) abgelöst, im Vollmedium gewaschen und mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt. Die Tumorimplantation erfolgte durch die subkutane Injektion von jeweils  $5 \cdot 10^6/200 \mu\text{l}$  PBS in die rechte Flanke der Ratte.

### 3.20.4 Induktion von Kolon-Karzinomen mittels 1,2-Dimethylhydrazin (DMH)

Die Tumorinduktion der Kolonkarzinome erfolgte im WAG/Rij Rattentumormodell mit dem chemischen Karzinogen 1,2-Dimethylhydrazin (Ducrey *et al.*, 1967). Es wurden 44 weibliche sechs bis acht Wochen alte WAG/Rij Ratten (Harlan, Deutschland) mit dem DMH behandelt. Die Verabreichung von DMH erfolgte durch die subkutane Injektion der Tiere mit 20 mg/kg Körpergewicht, einmal wöchentlich über 20 Wochen. Die behandelten Ratten wurden eine Woche nach der letzten Injektion mittels CO<sub>2</sub> getötet, und die Karzinome aus dem Kolon zur Gewinnung von Tumormaterial entfernt. 42 von 44 (95%) der Ratten trugen Kolon Tumore mit einer Häufigkeit von eins bis vier Tumoren pro Tier.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Experimentelle Strategie

Genetische Veränderungen führen im Rahmen der Entstehung eines malignen Tumors zur Expression von veränderten Peptiden und Proteinen, welche vom Immunsystem als fremd erkannt werden können. Das Immunsystem ist in der Lage, gegen tumorassoziierte Antigene sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Reaktivität zu entwickeln (Robbins *et al.*, 1996). Trotz der Möglichkeit, immunologisch gegen Tumorzellen reagieren zu können, scheint das Immunsystem in der klinischen Situation zu versagen. Daher ist es von besonderer Bedeutung, das Immunsystem mit Hilfe spezifischer Stimulation durch Immunisierung gezielt vorzubereiten, um eine Tumorregression zu erzielen. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Immuntherapie für kolorektale Karzinome. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob durch die Vakzinierung mit dem rekombinanten  $\beta$ -Catenin in Form eines DNA-Plasmids eine Tumorprotektion in Ratten erreicht werden kann. Vorher sollte untersucht werden, ob  $\beta$ -Catenin ein geeignetes Zielmolekül für die Vakzinierung darstellt. Die Entwicklung einer effizienten Vakzinierungsstrategie gegen kolorektale Tumore mit dem mutierten  $\beta$ -Catenin als Zielantigen ist von großer klinischer Relevanz, da Mutationen des  $\beta$ -Catenin-Gens eine wichtige Rolle in der humanen Kolon-Karzinogenese



spielen (Chan *et al.*, 2002). Das mutierte  $\beta$ -Catenin ist bereits als tumorspezifisches Antigen bei malignen Melanomen (Robbins *et al.*, 1996) identifiziert worden. Dies bedeutet, dass mutiertes  $\beta$ -Catenin beim Menschen immunogen ist. Eine Folge der  $\beta$ -Catenin Mutationen ist der Austausch von Aminosäuren. Dies führt zu tumorspezifisch exprimierten neuen Epitopen. Das mutierte  $\beta$ -Catenin kann daher ein geeignetes Vakzinierungstarget gegen kolorektale Tumore darstellen.

$\beta$ -Catenin Mutationen treten sowohl bei Menschen als auch in experimentell induzierten kolorektalen Tumoren bei Mäusen und Ratten auf. Die Untersuchungen von tumorassoziierten Antigenen im Ratten Modell zeigten charakteristische Ähnlichkeiten zwischen Ratte und Mensch (Abeyounis und Milgrom, 1976). Zur Charakterisierung des  $\beta$ -Catenins und Untersuchung der Frage, ob  $\beta$ -Catenin ein geeignetes Antigen für die Vakzinierung darstellt, wurden Mutationsanalysen in DMH induzierten Ratten-Kolontumoren durchgeführt.

Eine DNA-Vakzine (mutiertes  $\beta$ -Catenin) sollte hergestellt und nach Funktionalitätsprüfung zur Impfung von WAG/Rij Ratten eingesetzt werden. Die Vakzinierung sollte gezielt die Expression des mutierten  $\beta$ -Catenins in Rattenzellen ermöglichen und zur Detektion einer  $\beta$ -Catenin spezifischen humoralen Immunantwort herangezogen werden. Die aus einem DMH induzierten kolorektalen Tumor stammenden CC531 Zellen sollten in einem Tumorchallenge-Experiment als Zielzellen der Auslösung einer  $\beta$ -Catenin spezifischen zellulären Immunantwort dienen. Dabei sollte der immunologische Effekt der hervorgerufenen Immunantwort auf das Wachstum der transplantierten Tumore in Ratten analysiert werden.

## 4.2 Mikrodissektion von Kolonkarzinomen

Für die Untersuchung von  $\beta$ -Catenin Mutationen im Tiermodell mußte zuerst Tumormaterial aus DMH induzierten Kolontumoren gewonnen werden. Um reines Tumormaterial

aus Ratten-Kolon-Karzinomen auf mögliche Mutationen zu untersuchen, wurden die Tumore mikrodissiziert. Zur Isolierung von DNA aus Tumormaterial wurden mit Hilfe eines Cryostates 10  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte aus Rattenkolontumoren angefertigt. Das Material wurde mit Aceton 10 min fixiert, luftgetrocknet und anschließend mit Hämalaun und Eosin gefärbt (vgl. 3.5) Nach einer mikroskopischen Untersuchung wurden die Arealen, bei denen es sich um Karzinome handelte, markiert und mit einer Nadelspitze abgekratzt.

### 4.3 Mutationsanalyse des APC, $\beta$ -Catenins und K-ras Gens

Um die Frage zu beantworten, ob mutiertes  $\beta$ -Catenin ein relevantes Zielmolekül für eine Immunisierung darstellt, sollten Mutationsanalysen in karzinogeninduzierten Ratten-Kolontumoren durchgeführt werden.

Mutationen im  $\beta$ -Catenin Gen (*CTNNb1*) sind bislang in Tumoren des Kolons (Chan *et al.*, 2002), der Haut (Chan *et al.*, 1999), der Leber (Miyoshi *et al.*, 1998), des Ovars (Wright *et al.*, 1999), der Prostata (Gerstein *et al.*, 2002) sowie in Wilmstumoren (Koesters *et al.*, 1999) beschrieben worden. Sie treten ebenfalls in experimentell mit Azoxymethan (AOM) und 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) induzierten kolorektalen Tumoren bei Mäusen und Ratten auf. Mutationen des  $\beta$ -Catenin Gens kommen häufig an der regulatorischen Phosphorylierungsstelle der Serin Threonin Glycogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) an Codon 31, 33, 41 und 45 im Exon 3 des  $\beta$ -Catenins vor. Die Unterphosphorylierung schützt das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein vor dem Abbau im Proteasomalen System und führt damit zur Erhöhung der intrazellulären  $\beta$ -Catenin Mengen. Aus diesem Grund wird mutiertes  $\beta$ -Catenin tumorspezifisch überexprimiert.

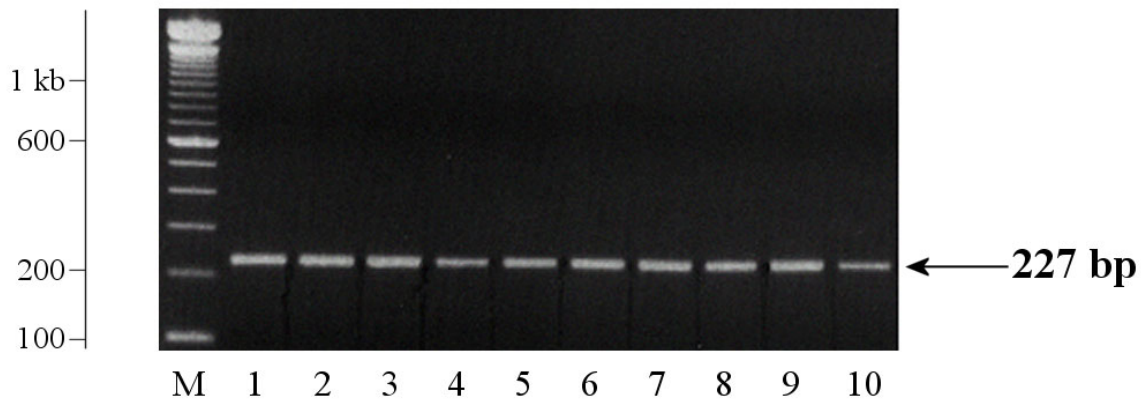
Eine Stabilisierung des  $\beta$ -Catenin-Proteins kann, außer durch  $\beta$ -Catenin-Mutationen, auch durch Inaktivierung des APC Genproduktes zustande kommen (vgl. 1.3). Das Wildtyp APC ist für die Degradation des phosphorylierten  $\beta$ -Catenins in der Zelle verant-

wortlich (Korinek *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997). Mutiertes APC führt daher zur Akkumulation des  $\beta$ -Catenin-Proteins. Tumore mit APC Gen Mutationen weisen damit auf eine tumorspezifische Überexpression des  $\beta$ -Catenin-Proteins auf. Hinsichtlich dieser Befunde könnte das  $\beta$ -Catenin ein interessantes Zielantigen für eine immuntherapeutische Intervention darstellen.

Mutationen des K-ras Gens sind ebenfalls an der Pathogenese von Kolontumoren sowohl bei Menschen als auch bei Nagern beteiligt (Schramm *et al.*, 2000). Sie treten häufig in DMH induzierten Kolontumoren auf (Takahashi *et al.*, 1998). Nun sollten die chemisch induzierten Kolontumore bei Ratten an Mutationen in den APC,  $\beta$ -Catenin und K-ras Genen untersucht und ein möglicher Zusammenhang dieser Mutationen analysiert werden.

#### 4.3.1 Detektion von Mutationen in GSK-3 $\beta$ Phosphorylierungsstellen im $\beta$ -Catenin-Gen der Ratte

Mutationen, die das  $\beta$ -Catenin-Gen aktivieren, betreffen die aminoterminalen Region des Proteins und führen zum definierten Austausch von Aminosäuren. Dieser Austausch betrifft vier regulatorischen Phosphorylierungsstellen (Codon 33, 37, 41, 45) im Exon 3 des  $\beta$ -Catenins.  $\beta$ -Catenin, zusammen mit APC, bilden einen Komplex, der die Transkription vorrangig beeinflusst, in dem er die komplexe Signalübertragung in den Zellkern vermittelt (Tcf-Komplex). Durch Mutationen in Phosphorylierungsstellen kommt es zu Unterphosphorylierung des  $\beta$ -Catenin Proteins. Dies hat zur Folge, dass  $\beta$ -Catenin nicht abgebaut, sondern sich in der Zelle anhäuft und überexprimiert wird. Durch die Ansammlung von  $\beta$ -Catenin kommt es zu Störungen in der Signalübertragung und Auslösung der Genexpression, welche die Entstehung von kolorektalen Karzinomen zur Folge haben könnte. Zur Analyse von Mutationen wurde die bereits extrahierte DNA aus den DMH induzierten Kolontumoren verwendet. Die Primer wurden aus der publizierten cDNA Sequenz der Ratte abgeleitet (vgl. 3.16) und die GSK-3 $\beta$  Phosphorylierungsstelle von  $\beta$ -Catenin-Gen amplifiziert. Die folgende Abbildung zeigt die erwartete Größe von dem DNA Fragment mit 227 bp.



**Abbildung 4.1: PCR detektierte  $\beta$ -Catenin Bande.**

Die mittels PCR detektierte  $\beta$ -Catenin Bande (1–10) hat eine Fragmentlänge von 227 bp. 100 ng mikrodisezierte DNA aus verschiedenen DMH induzierten Kolontumoren wurden als Probe für die PCR eingesetzt. 5  $\mu$ l wurden aus dem PCR Ansatz (50  $\mu$ l) entnommen und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte 30 min unter einer Spannung von 80 V. M, DNA-Leiter (Gibco, Eggenstein).

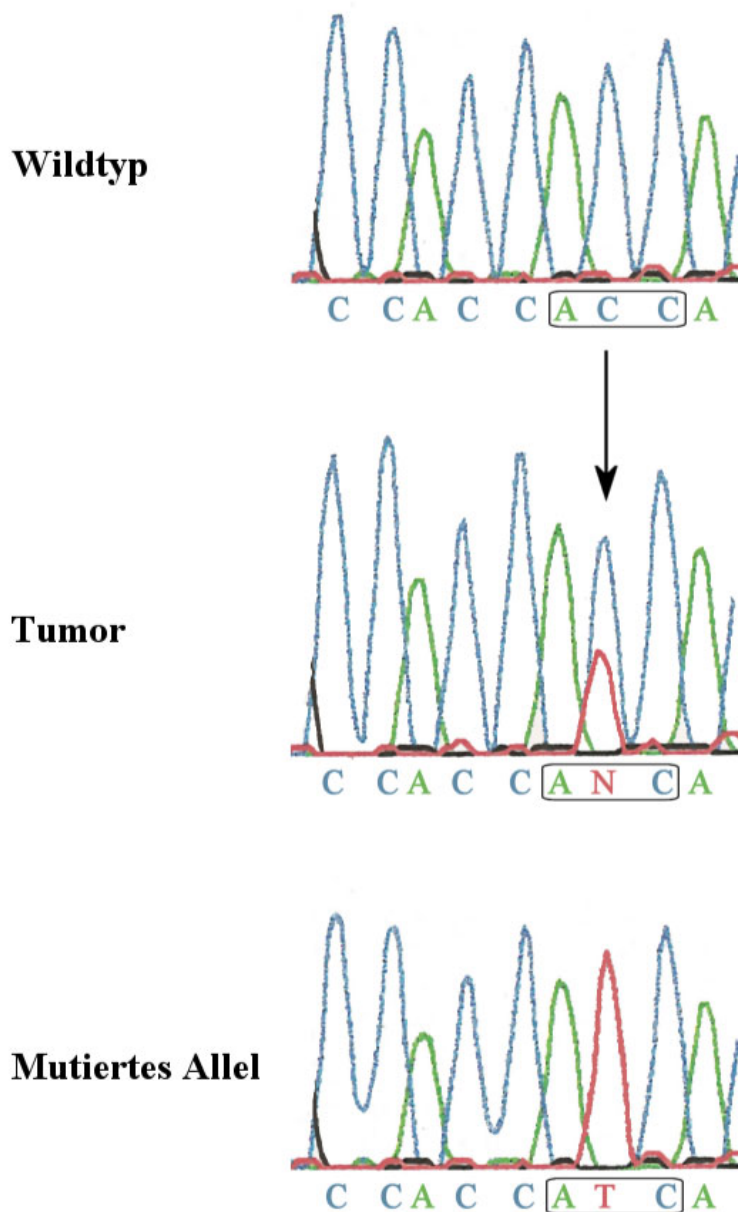
### 4.3.2 Sequenzanalyse zur Detektion von $\beta$ -Catenin Mutationen in mikrodisezierten Tumoren

Die PCR-Fragmente von Ratten DNA Proben wurden direkt sequenziert. Unter den 33 untersuchten Proben konnten in 12 Fällen (36%) Mutationen an Codon 41 und in einem Fall an Codon 32 des  $\beta$ -Catenin Gens identifiziert werden. Diese Mutationen kommen als Folge eines Nukleotidaustauschs C  $\rightarrow$  T bzw. G  $\rightarrow$  A im Exon 3 dieses Gens vor. Der Nukleotidaustausch führt dazu, dass die Aminosäure Threonin (ACC) durch Isoleucin (ATC) bzw. Asparaginsäure (GAT) durch Asparagin (AAT) ersetzt wird. Diese Mutationen führen intrazellulär zu einer Stabilisierung und damit zur onkogenen Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Proteins.

Folgende Tabelle zeigt die Mutationsanalyse der untersuchten DNA-Proben aus den Kolontumoren.

Proben Nr.	Codon	Basenaustausch	Resultat
T1	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T2		WT	
T3		WT	
T4		WT	
T5	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T6		WT	
T7		WT	
T8		WT	
T9		WT	
T10		WT	
T11		WT	
T12		WT	
T13		WT	
T14	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T15	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T16	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T17		WT	
T18		WT	
T19		WT	
T20		WT	
T21	32	GAT → AAT	Asp → Asn
T22		WT	
T23		WT	
T24		WT	
T25		WT	
T26	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T27	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T28		WT	
T29		WT	
T30	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T31	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T32	41	ACC → ATC	Thr → Ile
T33	41	ACC → ATC	Thr → Ile

Tabelle 4.1: Mutationen im Exon 3 des  $\beta$ -Catenin Gens in DMH-induzierten Ratten-Kolontumoren.



**Abbildung 4.2: Identifizierung der Mutation von Codon 41 des dritten Exons im  $\beta$ -Catenin Gen.**

Die Wildtyp- und Mutierte-Sequenz eines DMH induzierten Tumors sind in der Abbildung dargestellt worden. Die Transition des Nukleotides Cytosin zu Thymin ( $C \rightarrow T$ ) führt dazu, dass die Aminosäure Threonin durch Isoleucin ersetzt wird ( $ACC \rightarrow ATC$ ). Wildtyp-Sequenz (Normalgewebe des Rattenkolons), Tumor-Sequenz (Ratten-Kolontumor), mutiertes Allel (subkloniertes Ratten-Kolontumor). Betroffene Nukleotide bzw. Codons sind in der Abbildung markiert.

### 4.3.3 Mutationsanalyse im APC-Gen

Die Mehrheit der Mutationen im Tumorsuppressorgen APC (Adenomatous Polyposis Coli) kommen im Exon 15 vor. Die am häufigsten vorkommende Mutation in sporadischen Tumoren bei Menschen innerhalb dieses Exons beruht sich auf einen Verlust von Nukleotiden in Codon 1309 (Glu<sub>GAA</sub>→<sub>Stop</sub>). Dieses Codon entspricht dem Codon 1307 in der Aminosäuresequenz der Ratte. Eben so kommt diese Art der Mutation mit geringerer Häufigkeit in der Position des Codon 1061 (Lys<sub>AAA</sub>→<sub>Stop</sub>) vor. Ca. 10% aller APC-Gendefekte entfallen auf Insertionen. Unter ihnen dominiert der Einschub eines Adeninnukleotides in Codon 1554 (Glu<sub>GAA</sub>→<sub>GAAA</sub>). Zur Untersuchung des Tumormaterials für vorhandenen Mutationen wurde zuerst die Ratten-DNA amplifiziert (vgl. 3.15). Dies erfolgte unter Verwendung von drei Primerpaaren für die Codon 1307, 1061 und 1554, die innerhalb Exon 15 aus dem Ratten APC Gen ausgewählt wurden (vgl. 3.16). Alle PCR Fragmente wurden zuerst mit dem PCR-Purification Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Ampli Taq<sup>®</sup> FS Big Dye Terminator Kit (Pharmacia, Erlangen) angesetzt. Anschließend wurden die Proben auf einem ABI 310 DNA Sequenzer (Pharmacia, Erlangen) analysiert. Nach Auswertung der Sequenzen mit dem Sequenz-Analyse-Programm HUSAR (DKFZ, Heidelberg), konnten keine Mutationen innerhalb der drei genannten Codons des APC-Gens (1307, 1061 und 1554) festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die genetischen Veränderungen in untersuchten Tumoren nicht durch APC-Gen Mutationen resultieren, sondern vermutlich auf die unkontrollierte Aktivierung des Wnt-Signalweges (vgl. 1.3) aber auch auf eine Wnt-unabhängige infolge von  $\beta$ -Catenin Mutationen verursachte, dauerhafte Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und Zellkern (Korinek, *et al.*, 1997; Pfeifer, 1997) zurückzuführen sind .

### 4.3.4 Untersuchung des Tumormaterials für K-ras Mutationen

Mutationen in K-ras Onkogen kommen in großer Anzahl in kolorektalen Karzinomen bei Menschen vor (Takayama, *et al.*, 2001). Ein interessantes Modell zur Untersuchung von

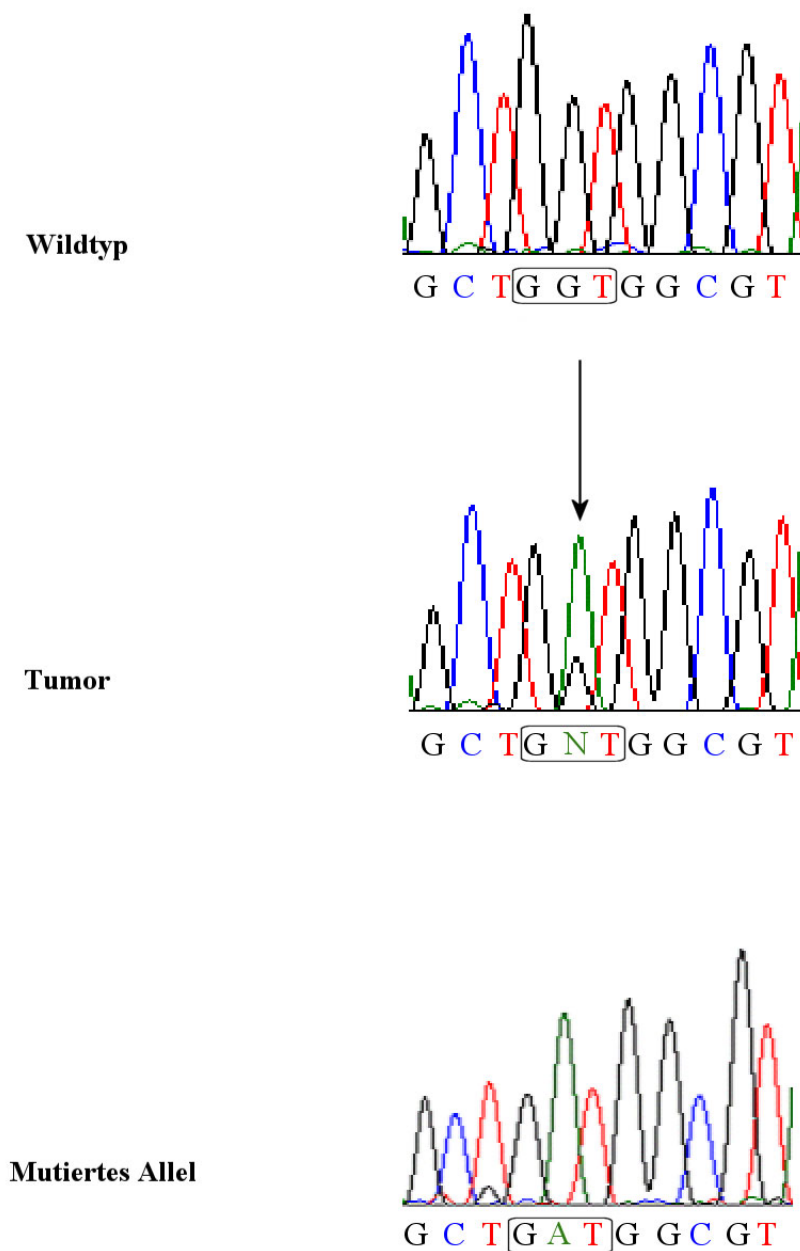
K-ras Mutationen stellt das syngene DMH Rattenmodell dar. Bei diesen Ratten werden die Kolonkarzinome chemisch und durch die Behandlung der Tiere mit dem Karzinogen DMH induziert. Es wurden bereits in mehr als 60% der Karzinogen behandelten Ratten Mutationen im Exon 1 des K-ras Gens berichtet (Erdmann *et al.*, 1997).

Nachdem die Ratten-Kolontumore auf APC bzw.  $\beta$ -Catenin Mutationen untersucht worden waren, wurden die Mutationsanalyse mit den gleichen DNA-Proben im Exon 1, Codon 12 und 13 des K-ras Gens durchgeführt. In 21 von 33 (63%) der untersuchten Ratten DNA-Proben wurden Mutationen im Exon 1 des K-ras Gens identifiziert. Dabei handelt es sich um einen Nukleotidaustausch von G zu A an Codon 12 bzw. Codon 13. Dies hat zur Folge, dass die Aminosäure Asparagin an Stelle des Glycins (GGT  $\rightarrow$  GAT bzw. GGC  $\rightarrow$  GAC) auftritt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der K-ras Mutationsanalyse von 33 Rattenkolon-Tumoren aufgelistet.



Proben Nr.	Codon	Basenaustausch	Resultat
T1	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T2	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T3	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T4		WT	
T5		WT	
T6	13	GGC → GAC	Gly → Asp
T7		WT	
T8	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T9		WT	
T10		WT	
T11		WT	
T12	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T13	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T14	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T15	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T16	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T17	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T18	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T19		WT	
T20	13	GGC → GAC	Gly → Asp
T21	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T22		WT	
T23	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T24	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T25	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T26		WT	
T27	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T28	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T29	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T30		WT	
T31		WT	
T32	12	GGT → GAT	Gly → Asp
T33		WT	

Tabelle 4.2: Mutationen im Exon 1 des K-ras Gens in DMH-induzierten Ratten-Kolontumoren.



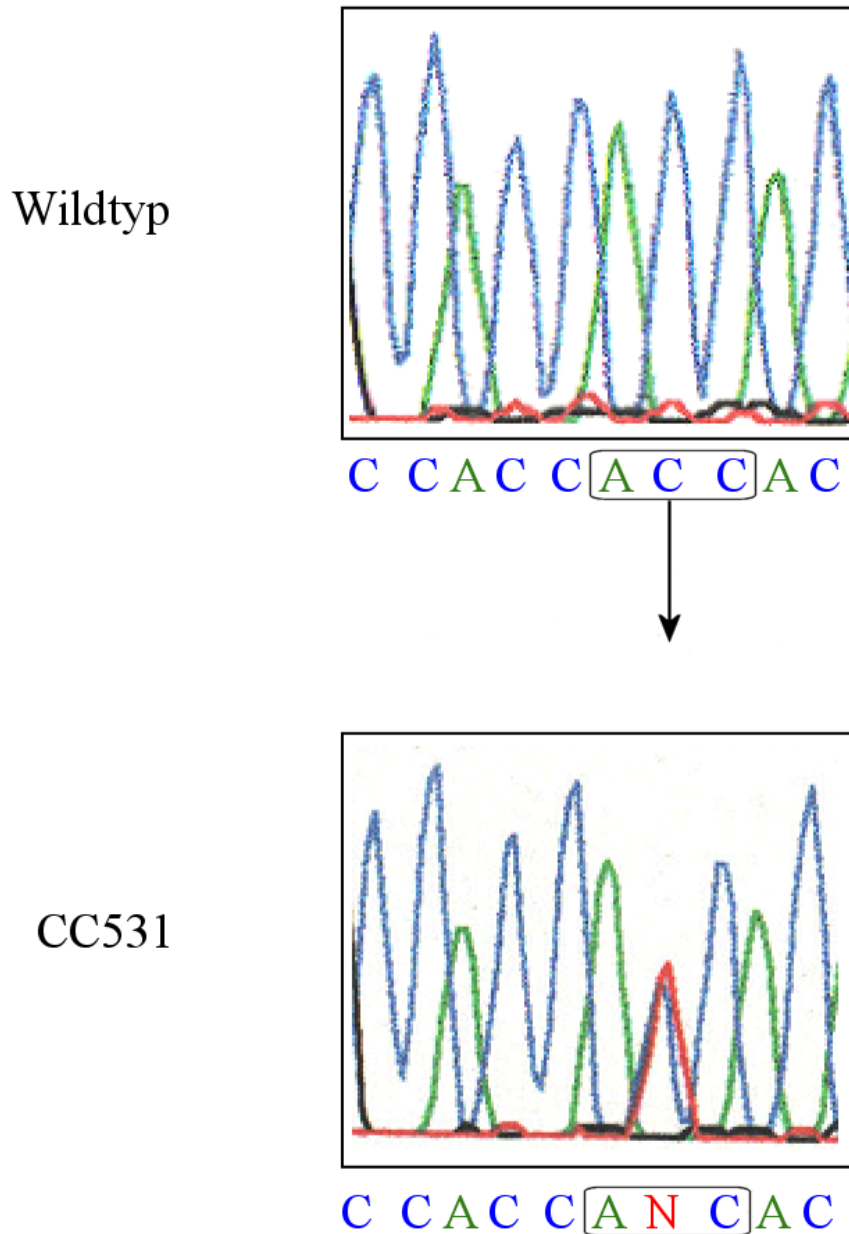
**Abbildung 4.3: K-ras Wildtyp und mutiertes Allel.**

Infolge eines Nukleotidaustauschs an Codon 12 im Exon 1 des K-ras Gens wird GGT durch GAT ersetzt. Die Wildtyp- und Mutierte-Sequenz eines DMH induzierten Tumors sind in der Abbildung dargestellt worden. Die Transition des Nukleotides G  $\rightarrow$  A führt dazu, dass die Aminosäure Glycin durch Asparagin ersetzt wird (GGT  $\rightarrow$  GAT). Wildtyp-Sequenz (Normalgewebe des Rattenkolons), Tumor-Sequenz (Ratten-Kolontumor), mutiertes Allel (subkloniertes Ratten-Kolontumor). Betroffene Nukleotide bzw. Codons sind in der Abbildung markiert.

### 4.3.5 $\beta$ -Catenin Mutationen in CC531 Zellen

Die CC531 Zelllinie (vgl. 2.6) stammt aus einem weiteren, unabhängig induzierten Tumor einer WAG/Rij Ratte. Diese Zellen sollten bei immunisierten Ratten zur Tumorimplantation verwendet werden. Anschließend sollte die  $\beta$ -Catenin spezifische zelluläre Immunantwort gegen diese Kolonkarzinomzellen untersucht werden. Daher war es von besonderer Bedeutung, sie auf möglichen Mutationen des  $\beta$ -Catenin Gens zu untersuchen.

Genomische DNA wurde wie in 3.6.2 beschrieben, extrahiert. Zur Mutationsanalyse wurde zuerst die PCR durchgeführt (vgl. 3.15). Das PCR-Produkt wurde bei 227 bp auf einem 2%igen Agarosegel identifiziert, das PCR-Fragment aufgereinigt und anschließend sequenziert. Bei dieser Zelllinie konnte an Codon 41 im Exon 3 der Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin in Folge einer Transition des Nukleotids Cytosin zu Thymin identifiziert werden.



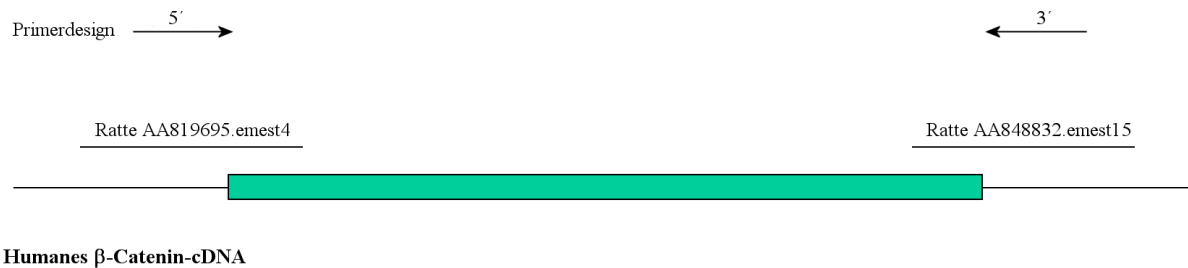
**Abbildung 4.4: Nukleotidsequenzanalyse von  $\beta$ -Catenin Mutation in CC531 Zelllinie.**

Die Sequenzen stammen aus der direkte Sequenzierung von PCR-Fragmenten. Die Wildtypsequenz stammt aus dem Normalgewebe des Rattenkolons. In Folge der Mutation wird an Codon 41 des dritten Exons das Nukleotid C durch T ersetzt und die Aminosäure Threonin durch Isoleucin (ACC  $\rightarrow$  ATC) ausgetauscht. Der Buchstabe N zeigt die Mutationsstelle in der Aminosäuresequenz, an der das Nukleotid T zu sehen ist.

## 4.4 Herstellung eines Vakzinierungsplasmids mit dem mutierten $\beta$ -Catenin

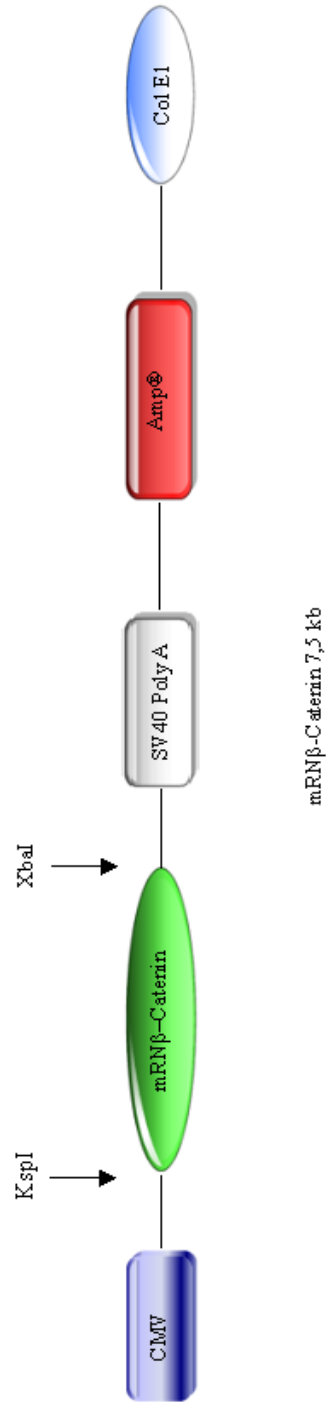
### 4.4.1 Molekulare Klonierung der vollständigen Ratten $\beta$ -Catenin-cDNA

Für die Herstellung der Plasmid-DNA (DNA-Vakzine) wurde die vollständige  $\beta$ -Catenin cDNA kloniert. Zur Klonierung der vollständigen  $\beta$ -Catenin cDNA wurde zuerst die Gesamt-mRNA aus CC531 Zellen gewonnen (vgl. 3.13), welche dann anhand einer RT-PCR Reaktion zur Herstellung der cDNA (vgl. 3.14) diente. Die cDNA mit einer Größe von 2,8 Kb wurde amplifiziert (Abbildung 4.5). Die Primer (vgl. 3.17) wurden identisch zu Ratten-ESTs (expressed sequence tags) abgeleitet und mit einer KspI und XbaI Schnittstelle ausgestattet. Anschließend wurde das PCR-Fragment über die KspI/XbaI Stelle in den eukaryontischen Expressionsvektor pExlink3 überführt (Abbildung 4.6).



#### Abbildung 4.5: Molekulare Klonierung von vollständigem $\beta$ -Catenin.

Für die RT-PCR wurden  $1 \mu\text{g}$  RNA, die aus Ratten Tumor-Zelllinie (CC531) stammt, eingesetzt. Die Primer wurden identisch zu Ratten-ESTs (expressed sequence tags) abgeleitet.



**Abbildung 4.6: Vakzinierungsplasmid.**

CMV, Promotor des Cytomegalievirus; mRN̄β-Catenin, dieses Gen codiert für das mutierte β-Catenin; SV40-PolyA, Polyadenylierungssignal des SV40-Virus; ColE1, Startpunkt der DNA-Replikation; Amp<sup>R</sup>, Ampicillinresistenz-Gen.

#### 4.4.2 Funktionalitätstest von $\beta$ -Cateninplasmid in einem eukaryontischen System

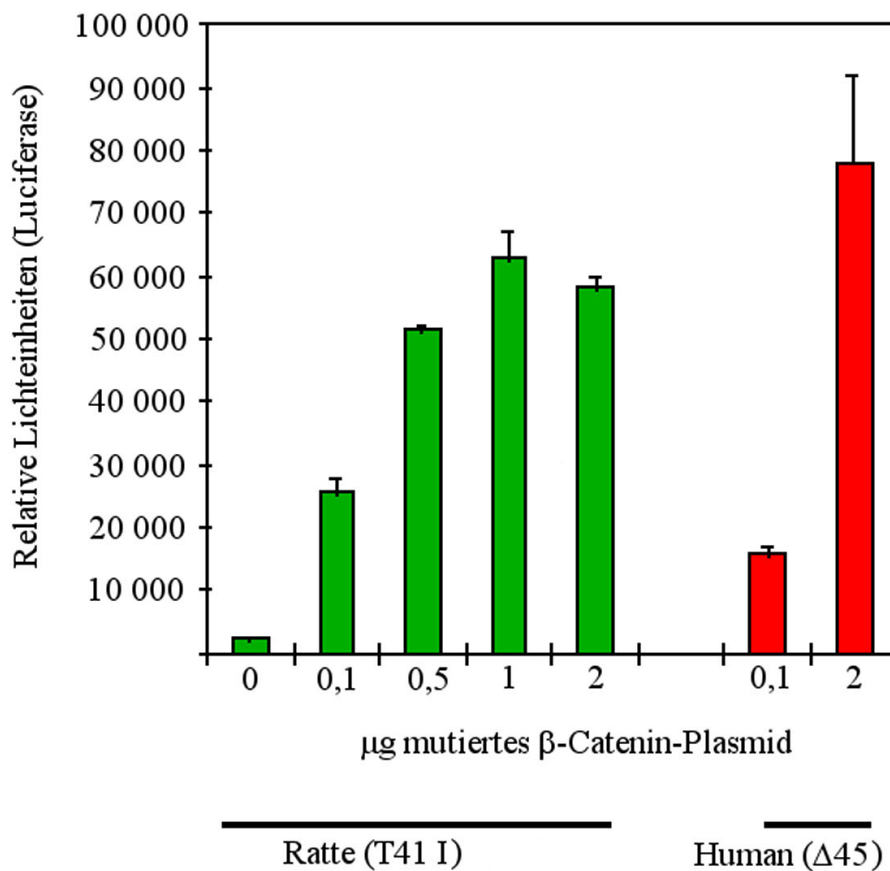
Nach Klonierung der vollständigen  $\beta$ -Catenin cDNA sollte nun die Funktionalität und Einsatzbarkeit des Vakzinierungsplasmids für *in vivo* Versuche überprüft werden. Anhand eines Luciferase-Assays sollte die Fähigkeit des rekombinanten  $\beta$ -Catenin Plasmids (mRN $\beta$ -Catenin) zur Transaktivierung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden SW948 Zellen mit dem  $\beta$ -Catenin Expressionsplasmid und einem Reporterplasmid transfiziert, welches Luciferase unter der Kontrolle von pTOPFLASH exprimiert.

Die humane aus kolorektalen Karzinomen stammende SW948 Zelllinie besitzt ein intaktes APC-Gen, so dass  $\beta$ -Catenin in der Zelle degradiert wird. Wenn  $\beta$ -Catenin mutiert ist, kommt es zur Anhäufung des  $\beta$ -Catenins in der Zelle, welches an Lef-1/Tcf Proteine im Zellkern bindet und die Expression spezifischer Zielgene wie z. B. c-myc, Cyclin D, Tcf, PRAPdelta, c-jun, fra1 (Tetsu, 1999; Bissonnette *et al.*, 2000; Roose, 1999; He T. C. *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2001) auslöst.

In diesem Test wurden  $10^6$  SW948 Zellen mit verschiedenen Mengen von mutiertem Ratten  $\beta$ -Catenin-Plasmid (0.1, 0.5, 2)  $\mu$ g bzw. einem humanen  $\beta$ -Catenin Plasmid mit einer Deletion von Codon 45 als Kontrollplasmid zusammen mit dem Reporterplasmid pTOPFLASH (H. Clevers, Utrecht, Niederlande) cotransfiziert. Die Luciferase cDNA im Reporterplasmid steht unter Kontrolle eines minimalen c-fos-Promotors und beinhaltet vier repeats der optimalen Erkennungssequenz für Lef-1/Tcf. In der Zelle wirkt der  $\beta$ -Catenin-Tcf-Komplex als Transkriptionsaktivator und führt zur Promotoraktivität des Luciferase-Gens und fördert die Expression der Luciferase.

Das Enzym Luciferase katalysiert im Gegenwart von ATP und  $Mg^{2+}$  die oxidative Decarboxylierung von Luciferin. Dabei entstehen AMP, Kohlendioxid und Licht. Zum Nachweis von Luciferase werden die Zellen lysiert und das Zellhomogen mit Luciferin und ATP gemischt. Das auftretende Lumineszenz zeigt die Expression von Luciferase an. Die Lichtemission wurde mit Hilfe eines Luminometers (Berthold, Wildbad) gemessen. Die

Ergebnisse des zu diesem Zweck durchgeführten Luciferasetests sind in der Abbildung 4.5 dargestellt. Das Diagramm zeigt die Genexpression von Luciferase in transfizierten Zellen. Alle in diesem Test eingesetzten Plasmidkonzentrationen deuten auf einen positiven Einfluß des  $\beta$ -Cateninplasmids auf die Auslösung der Transkription und damit die Expression der Luciferase. Durch diesen Test konnte die Promotoraktivität von mRN $\beta$ -Catenin und damit die Funktionalität des Konstrukts nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.7: Einfluß der Expression von mutiertem  $\beta$ -Catenin auf die zellvermittelte Transkription.**

Die Funktionalität des klonierten Ratten  $\beta$ -Catenin-Plasmids bei der Mutation von Codon 41 wurde mit verschiedenen Konzentrationen (0.1, 0.5, 2)  $\mu$ g des Plasmids in Luciferase Assay getestet. Zur Kontrolle wurde humanes  $\beta$ -Catenin mit Deletion von Codon 45 verwendet. Die Luciferase Aktivität wurde in relative Lichteinheiten pro 10 sec angegeben. Alle Transfektionsansätze wurden zweimal durchgeführt, deren Mittelwert mit Standardabweichungen dargestellt ist.



## 4.5 Einbau von mutiertem $\beta$ -Catenin cDNA in den prokaryontischen Vektor

Zur Expression von  $\beta$ -Catenin-Protein in Bakterienzellen und Gewinnung großer Protein Mengen sollte zuerst die cDNA in einen prokaryontischen Expressionsvektor eingebracht werden. Die klonierte  $\beta$ -Catenin cDNA wurde wie im 4.4.1 beschrieben gewonnen, amplifiziert und anschließend in den prokaryontischen Expressionsvektor pTrcHis über die Schnittstelle BamHI und EcoRI überführt. Der Expressionsvektor enthält den *trc* Promotor von *E. coli* unter der Kontrolle des lac-Repressors und -Operators. Die cDNA wurde über die Schnittstelle BamHI und EcoRI eingebaut. Bakterienzellen (TOP 10) wurden mit dem Plasmid transformiert.

## 4.6 Expression von mutiertem $\beta$ -Catenin im prokaryontischen System

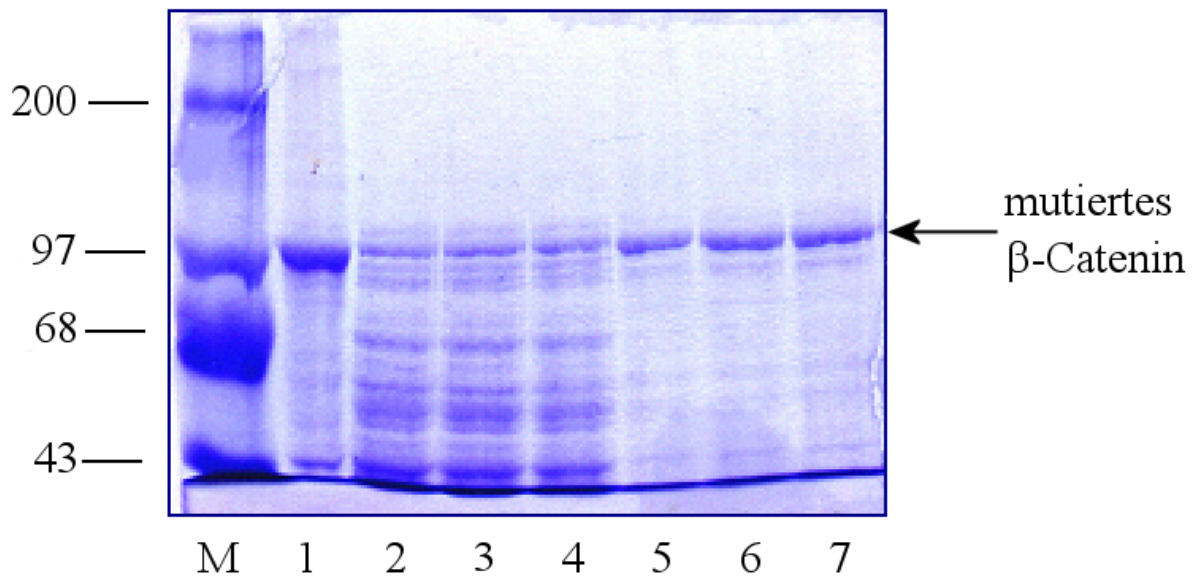
Um ausreichende Mengen von  $\beta$ -Catenin-Proteinen zu gewinnen, wurden große Mengen von Bakterienkulturen angezüchtet und mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Durch die IPTG Induktion sollte eine effiziente Proteinsynthese erreicht werden. Das anschließend gewonnene und gereinigte Protein sollte zur Analyse und zum Nachweis der humoralen Immunantwort bei vakzinierten Ratten dienen.

Die Expression von  $\beta$ -Catenin-Plasmid im prokaryontischen System (vgl. 3.2) konnte mit Hilfe von 6% Polyacrylamid Gelen nachgewiesen werden. Auf den Gelen wurden Proben aus unterschiedlichen IPTG-Induktionszeiten (0, 1, 2, 10, 24) h aufgetragen. Bereits nach 4 h Induktion mit IPTG war die Expression des  $\beta$ -Catenins deutlich auf dem Commassie gefärbten Gel nachzuweisen. Das  $\beta$ -Catenin ist in Höhe der 100 kDa Markerbande zu erkennen.

#### 4.6.1 Reinigung des mutierten $\beta$ -Catenin-Proteins mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Zur Reinigung des mutierten  $\beta$ -Catenin-Proteins mit dem 6x His Tag am C-terminalen Ende wurde eine nitrilotriacetische (Ni-NTA Agarose) Nickel Säule (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Ni-NTA Agarose Säule ermöglicht Stabilität und hervorragenden Durchfluß mit hoher dynamischer Bindefähigkeit. Das Harz erlaubt Reinigung der 6x His-tagged Proteine unter hoher Durchflußgeschwindigkeit.

Die Ni-NTA Agarose wurde an ein HPLC-System mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 ml/min angeschlossen. Nach Auftragung der Probe (vgl. 3.2), wurde die Säule mit dem 10 ml Laufpuffer (0,5 M Imidazol in 8 M Urea) gewaschen und mit dem Eluierungspuffer (1 M Imidazol in 50 mM Natriumphosphatpuffer) eluiert. Verschiedene Fraktionen wurden während des Reinigungsvorgangs gesammelt. Das Protein aus unterschiedlichen Proben wurde auf ein 6%iges SDS-Gel aufgetragen, um die Reinheit der Proben zu kontrollieren. Abbildung 4.7 zeigt einige Fraktionen aus dem HPLC-Lauf. Das gereinigte  $\beta$ -Catenin-Protein ist bei ca. 100 kDa zu erkennen.



#### Abbildung 4.8: Gereinigtes $\beta$ -Catenin-Protein

Das hergestellte, mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein (ca. 100 kDa) wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie gereinigt. 10  $\mu$ l von jeder Proteinprobe wurden auf ein 6%iges SDS-Gel aufgetragen.

M: Größenmarker (Gibco, Eggenstein)

Spur 1: Kontrolle, mutiertes  $\beta$ -Catenin-Protein

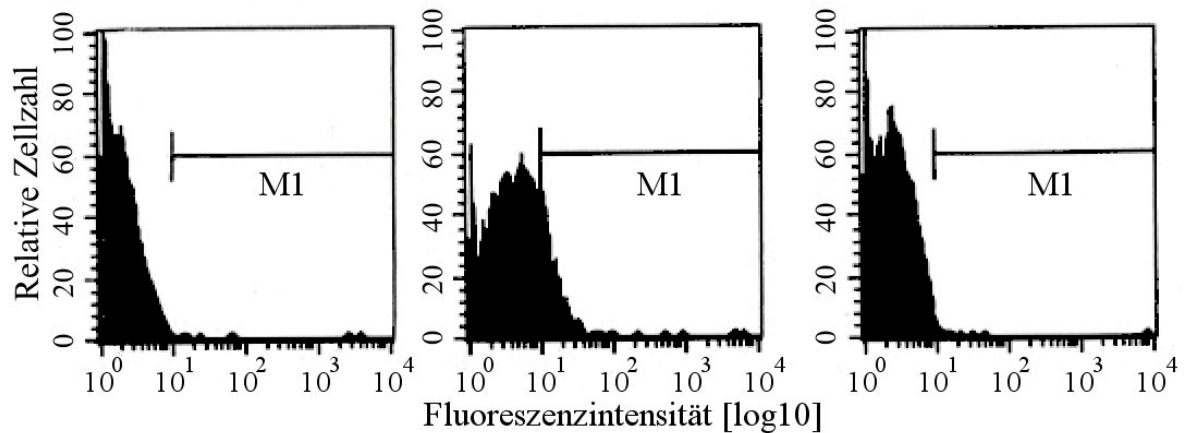
Spur 2–7: Zu unterschiedlichen Zeiten gesammelte Fraktionen der HPCL

#### 4.6.2 Expression von MHC I Molekülen in CC531 Zellen

Die Durchflußzytometrie (FACS; Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren.

T-Zellen erkennen Antigene, die von Zellen auf ihren Oberflächen präsentiert werden. Gene der MHC (major histocompatibility complex) Klasse I codieren die klassischen Transplantati-

onsantigene, die man auf fast allen Zellen findet. Das sind jene Moleküle, die zytotoxische T-Zellen in Verbindung mit Fremdanthigenen erkennen. Die Gene der MHC II codieren Oberflächenproteine, die sich hauptsächlich auf B-Zellen und Makrophagen nachweisen lassen. Zytotoxische T-Zellen erkennen jedoch keine intakten Proteinantigene, sondern Peptide aus intrazellulären Molekülen (z. B. tumorassoziierte Antigene, virale Proteine). T-Zell-Antigene sind Peptide aus 7-9 Aminosäuren, die im Komplex mit der MHC I $\alpha$ -Kette und  $\beta$ 2-Mikroglobulin vorliegen. Hierzu werden intrazelluläre Proteine zunächst durch das Proteasom, einem zytosolischen Proteasekomplex, in Peptidfragmente geschnitten. Aus dem Zytosol werden diese Peptide über den TAP-Transporter (TAP, transporter associated with antigen presentation) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo sie über Tapasin an MHC I Molekülen übergeben werden. Im ER-Lumen binden die antigenen Peptidfragmente an die schwere MHC-Klasse-I-Kette. Der Komplex aus der MHC I $\alpha$ -Kette und  $\beta$ 2-Mikroglobulin wird bis zur Bindung eines Peptides durch zwei Hitzeschockproteine Calnexin und Calreticulin stabilisiert. Der vollständige Komplex aus MHC I $\alpha$ -Kette,  $\beta$ 2-Mikroglobulin und Peptid wird über das Golgi-Apparat auf die Zellmembran transportiert und dient dort als Erkennungssignal für zytotoxische T-Zellen. Nach erfolgreicher Peptidbeladung verlassen MHC I Moleküle das ER zur Zelloberfläche. Für die *in vivo* Experimente war es von besonderer Bedeutung die Expression von MHC I Molekülen auf der Oberfläche von CC531 Tumorzellen zu untersuchen, da für eine erfolgreiche antitumorale Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen die spezifische Erkennung des Antigens notwendig ist. Die Expression von MHC I Molekülen auf der Oberfläche von CC531 Zellen konnte mit Hilfe des Maus-anti-Ratte MHC I Antikörpers (Dianova, Hamburg) und eines fluoreszenz markierten Zweitantikörpers, FITC-konjugiertes Kaninchen-anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg) nachgewiesen werden. Bei der Auswertung wurde der "mean"-Wert, d. h. das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität der Probe zu der entsprechenden Negativkontrolle (CC531 Zellen behandelt mit dem 2. Antikörper) angegeben und abzüglich der Negativkontrolle berechnet. Für die Expression von MHC I ergab sich einen "mean"-Wert von 4,69, während der "mean"-Wert für die MHC II bei 0,88 lag. Diese Ergebnisse zeigten eine ausreichende Expression von MHC I Molekülen auf der Oberfläche von CC531 Zellen.



	Maus Ig FITC	MHC I FITC	MHC II FITC
Mean	2,78	7,47	3,62

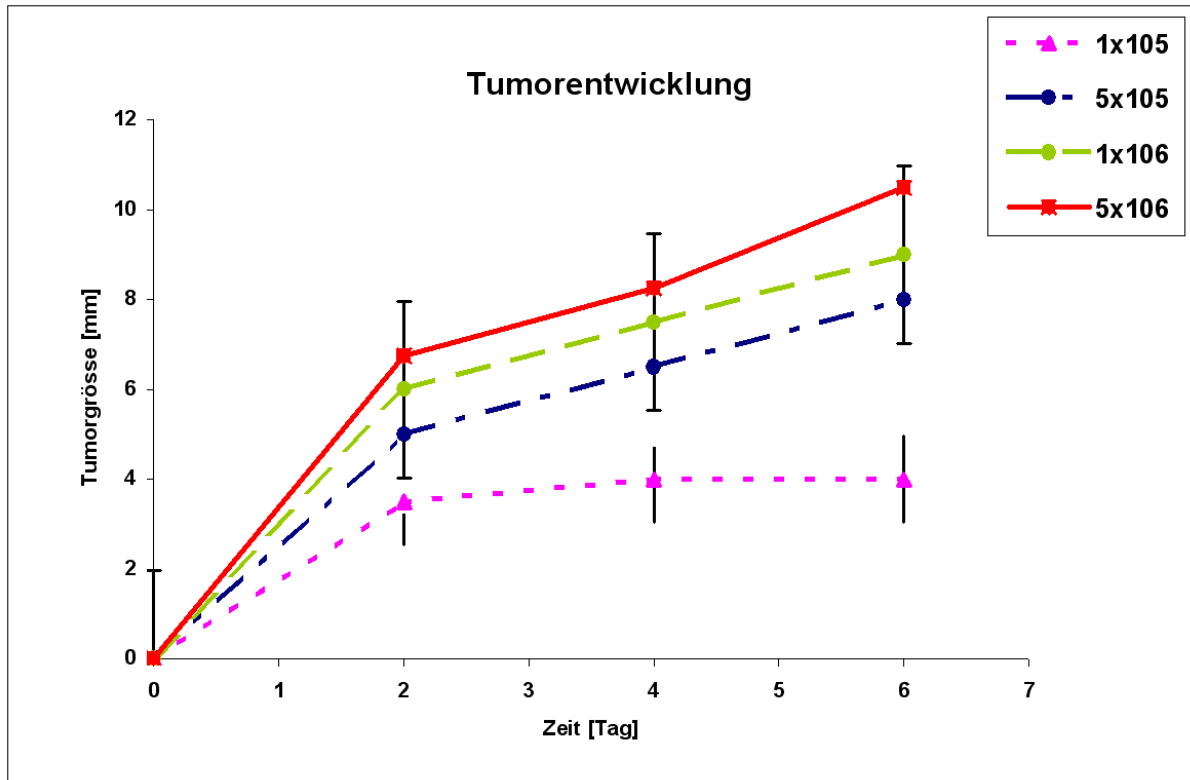
**Abbildung 4.9: Expression der Oberflächen Proteine bei CC531 Zelllinie.**

Die Tumorzelllinie wurde in der Durchflußzytometrie analysiert. Die relative Zellzahl ist auf der Ordinate gegen den Logarithmus der Fluoreszenzintensität dargestellt. Mit Hilfe des Antikörpers Maus-anti-Ratte MHC I bzw. MHC II (Dianova, Hamburg) und eines fluoreszenz markierten Zweitantikörpers, FITC-konjugiertes Kaninchen-anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg) wurde die Expression von MHC-Molekülen nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten CC531 Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurden.

### 4.6.3 Tumorigenität der Kolonkarzinom Zelllinie CC531 in syngen Ratten

In einem Tumorigenitätstest wurde das Tumorwachstum von CC531 Zellen nach Tumorzellinokulation in syngenen WAG/Rij Ratten untersucht. Dieses Experiment sollte als Vorversuch für das bevorstehende Tumorchallenge mit Hilfe von CC531 Zellen dienen.

Zur Untersuchung der Tumorigenität wurden CC531 Zellen in unterschiedlichen Mengen ( $1 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$ ) in WAG/Rij Ratten injiziert. Die Inokulation erfolgte durch subkutane Injektion in die rechte Flanke von 8–10 Wochen alte Ratten. Die Ansätze wurden mit jeweils zwei Tieren pro Gruppe durchgeführt. Schon ein Tag nach der Inokulation waren die Tumorzellen bei allen behandelten Tieren zu Tumoren angewachsen. Das Tumorwachstum bei den Ratten wurde jede zwei Tage kontrolliert und die Tumorgröße gemessen. Ratten, die mit  $5 \cdot 10^6$  Zellen injiziert wurden, entwickelten im Vergleich zu den drei anderen Versuchsgruppen ( $1 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^6$ ) größere Tumore. Die Tumore erreichten bei einer Menge von  $5 \cdot 10^6$  Zellen eine Größe von 10,5 mm innerhalb von sieben Tagen (Abbildung 4.10). Dadurch konnte die optimale Zellzahl, die ein maximales Tumorwachstum bei den Tieren für nachfolgende Tumorchallenge-Experimente erlaubte, bestimmt werden.



**Abbildung 4.10: Tumorstadium nach Inokulation von CC531 Zelllinie.**

8–10 Wochen alte WAG/Rij Ratten wurden mit drei verschiedenen Zellkonzentrationen von  $1 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^6$  und  $5 \cdot 10^6$  in  $200 \mu\text{l}$  PBS inokuliert. Mittelwert der Tumorgröße von zwei Tieren wurde gegen die Versuchsdauer nach Tumorzellinokulation aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern.

#### 4.6.4 Vakzinierung von syngenem WAG/Rij Ratten mit $\beta$ -Catenin Plasmid DNA

Eine neue Impfstrategie ist die DNA-Vakzinierung, mit der eine protektive Immunantwort erreicht werden kann. Bei einer DNA-Immunisierung können neue Antigene und minimale antigene Sequenzen, die als cDNA vorliegen, als rekombinante DNA injiziert werden. Diese Antigensequenzen werden für die Expression des betreffenden Tumorantigens in der Zelle benötigt. Die DNA-Vakzine wird durch die Zelle aufgenommen. Im Zellkern wird die Expression des Antigens gestartet. Die dort synthetisierten Peptide können im Komplex mit MHC (major histocompatibility complex) Klasse I bzw. MHC Klasse II Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden und eine zelluläre wie eine humorale Immunantwort induzieren.

Zur Untersuchung der Frage, ob  $\beta$ -Catenin ein geeignetes Zielantigen für die immuntherapeutische Intervention bei kolorektalen Tumoren darstellt, und die Immunisierung mit mutiertem  $\beta$ -Catenin einen wirksamen antitumoralen Effekt hervorruft, wurden 10–12 Wochen alte WAG/Rij Ratten einer Vakzinierung unterzogen. Das *in vivo* Experiment gliederte sich in fünf Abschnitten (Abbildung 4.11). In diesem Versuch sollten die Tiere in drei Gruppen (Test-, 1. - und 2. Kontrollgruppe) aufgeteilt und miteinander verglichen werden. Bei der Testgruppe handelte es sich um Ratten, die mit der Plasmid-DNA (mutiertes Ratten  $\beta$ -Catenin (200  $\mu$ g/300  $\mu$ l PBS) inokuliert wurden, während die 1. Kontrollgruppe mit dem leeren Vektor und die 2. Kontrollgruppe mit PBS (300  $\mu$ l) behandelt wurde. Diese Gruppe diente in einem anschließenden Tumorchallenge-Experiment zur Kontrolle des normalen Tumorwachstums.

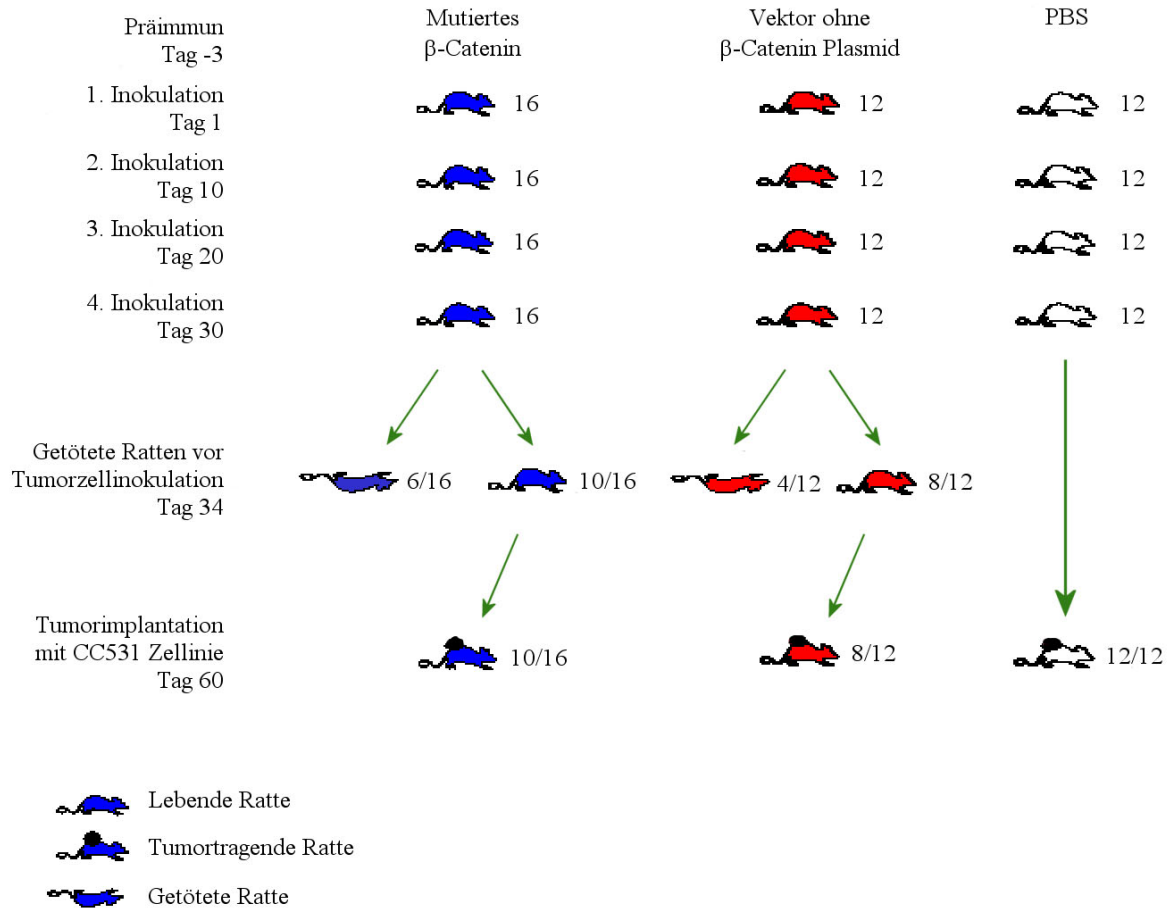
Die Immunisierung der Ratten erfolgte durch intradermale Verabreichung des Vakzinierungsplasmids (Abbildung 4.6). Der Grund einer intradermalen Vakzinierung mit dem rekombinanten mRN $\beta$ -Catenin Plasmid war, die Dendritischen Zellen (Langerhanszellen der Haut) zu treffen. Diese Zellen sind in der Lage das Antigen aufzunehmen und in die lymphatische Organe zu transportieren und dort die ruhende, für die Abwehr in



Bereitschaft stehende T-Lymphozyten effizient zu aktivieren. Dabei können sie sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen induzieren. Sie steuern aus diesem Grund gleichermaßen die humorale, sowie die zelluläre Immunantwort.

Die Vakzinierung von Ratten wurde viermal in einem Zeitintervall von jeweils 10 Tagen zwischen zwei aufeinander folgenden Immunisierungen wiederholt. Drei Tage nach der zweiten bzw. vierten Vakzination wurden pro Ratte  $500 \mu\text{l}$  Serum entnommen. Vier Wochen nach der letzten Immunisierung wurde das Tumorchallenge durch die subkutane Verabreichung von  $5 \cdot 10^6$  Kolon-Karzinom-Zellen CC531 pro Ratte durchgeführt. Infolge des Tumorchallenge sollte nun untersucht werden, ob durch die Vakzinierung der Ratten mit dem rekombinanten  $\beta$ -Catenin Plasmid einen protektiven Effekt gegen implantierte Tumore erreicht werden konnte.

Abbildung 4.11 stellt das gesamte *in vivo* Experiment im Überblick dar.



**Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des *in vivo* Experiments.**

Drei Tage vor der Vakzination wurde bei allen Ratten Blut entnommen (Präimmunsrum). Die Inokulation erfolgte intradermal und wurde 4 Mal in 10 tägigen Abständen wiederholt. 16 Ratten wurden mit mutiertem  $\beta$ -Catenin ( $200 \mu\text{g}$ ) vakziniert (blau). 12 Ratten wurden nur mit dem Expressionsvektor ( $200 \mu\text{g}$ ) inokuliert (rot). Kontrollgruppe (weiß) wurde mit PBS ( $200 \mu\text{l}$ ) behandelt. Vier Tage nach der letzten Inokulation wurden sechs Tiere aus der  $\beta$ -Catenin-Gruppe und vier aus der Vektorgruppe getötet. Das Antiserum von getöteten Tieren sollte mit dem in Tumorchallenge bezogenen Tieren verglichen werden. Gleichzeitig wurde bei der Kontrollgruppe (weiß) Blut entnommen. 30 Tage nach der vierten Inokulation wurden die restlichen Tiere mit der Kolonkarzinom-Zelllinie CC531 ( $5 \cdot 10^6 \text{ Z}/200 \mu\text{l PBS}$ ) s.c. injiziert. Die Anzahl der Tiere ist rechts neben dem Tiersymbol angegeben.

## 4.7 Tumorchallenge in vakzinierten Ratten

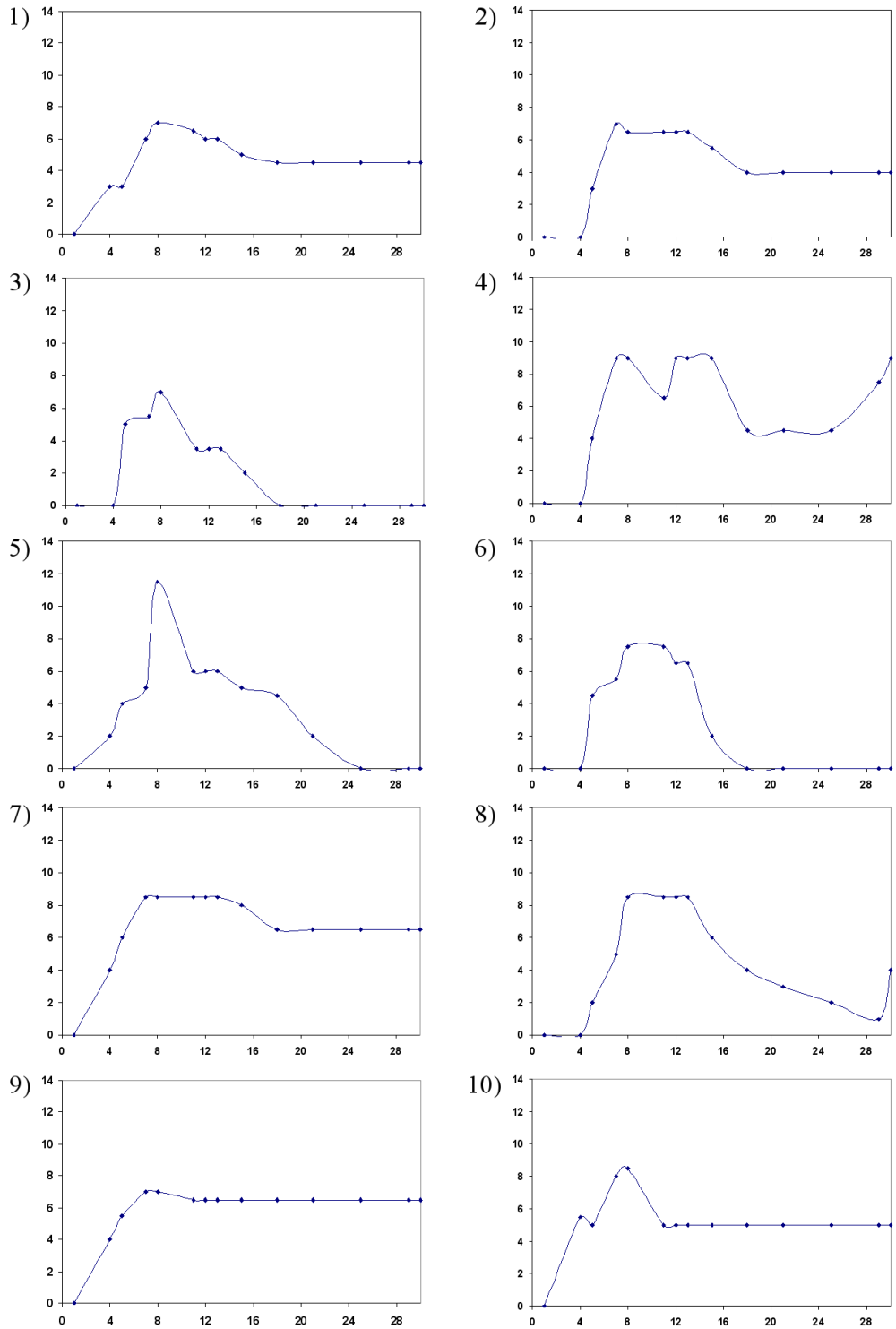
In Folge der Immunisierung von Versuchstieren mit dem rekombinanten  $\beta$ -Catenin Plasmid sollte nun durch ein Tumorimplantationsexperiment (Tumorchallenge) der protektive Effekt dieser Impfstrategie in vakzinierten gegenüber ungeimpften Ratten verglichen und analysiert werden.

Wie zuvor in der Beschreibung des gesamten Experimentes geschildert, wurden die vakzinierten Ratten mit der getesteten Tumorzellzahl ( $5 \cdot 10^6$  Zellen) in PBS ( $200 \mu\text{l}$ ) subkutan inokuliert (Abbildung 4.12). Bei fünf von zehn (50%) Versuchstieren innerhalb der  $\beta$ -Catenin-Gruppe wuchsen die Tumore erst ab dem vierten Tag nach der Tumorimplantation an. Bei zwei von diesen fünf Tieren gingen die Tumore ab dem 18. Tag (Ratte 3 und 6) vollständig zurück. Die weiteren fünf entwickelten ab dem ersten Tag Tumore, die ihre maximale Größe bis zum Tag sieben nach der Tumorimplantation erreichten. Ab diesem Zeitpunkt kam es zur Reduktion der Tumorgöße bis zu einem bestimmten Tag, nämlich den 18. Tag. Danach blieben die Tumore bei drei Ratten in ihrem Wachstum konstant, während bei zwei Ratten (Ratte 4 und 8) ab der vierten Woche nach der Injektion von Tumorzellen ein erneutes Tumorstadium beobachtet wurde.

In Abbildung 4.12 ist das Tumorstadium von allen mit  $\beta$ -Catenin vakzinierten Ratten, die nach der Vakzinierung einer Tumorchallenge unterzogen waren, grafisch dargestellt. Trotz unterschiedlichem Verhalten der Tiere ist in der Abbildung deutlich zu erkennen, dass nach einem raschen Tumorstadium innerhalb der ersten Woche nach Tumorchallenge zwar eine Tumorstadiumsreduktion, jedoch keine Tumorelimination erreicht wird. Bei der Kontrollgruppe kommt es im Vergleich zur  $\beta$ -Catenin-Gruppe zu einem früheren und stärkeren Tumorstadium. Nach einer leichten Abnahme der Tumorstadiums nahmen die Tumore verstärkt in ihrer Größe zu, so dass 40% der Tiere aufgrund der Tumorstadiums ( $>1 \text{ cm}$ ) vorzeitig getötet werden mussten. Der Vergleich der  $\beta$ -Catenin-Gruppe mit den Kontrollgruppen zeigt einen deutlichen Effekt der Vakzinierung gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin (Abbildung 4.13). Der Unterschied in der Tumorstadiums zwischen der  $\beta$ -Catenin-Gruppe

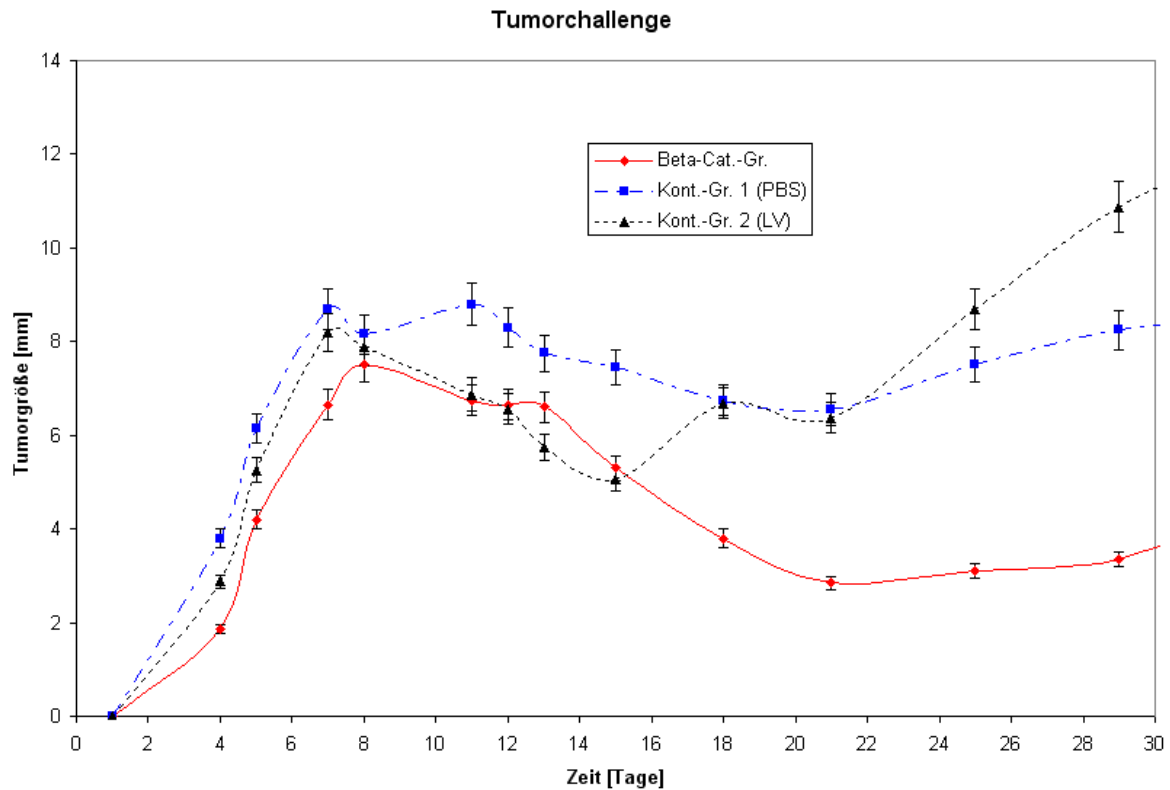
und den Kontrollratten war ab dem 21. Tag nach Tumorzellinokulation statistisch signifikant ( $p$ -Wert  $< 0.05$ ). In Abbildung 4.13 ist die Mittelwert-Kurve von jeweils 10 Tieren der entsprechenden Gruppe grafisch dargestellt worden, die den Einfluß der Vakzinierung gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin zeigt und damit einen Vergleich des Tumorwachstums von beteiligten Gruppen ermöglicht. In dem Diagramm sind die durchschnittlichen Abweichungen vom Mittelwert als Standardabweichung angegeben worden.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, dass trotz einer Vakzinierung gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin zwar keine totale Tumorprotektion, jedoch eine reduzierte Tumorgröße bei den meisten vakzinierten Ratten erreicht werden konnte.



**Abbildung 4.12: Tumorwachstum nach Tumorchallenge bei vakzinierten Ratten.**

Die Abbildung zeigt das Tumorwachstum nach der Tumorzellinokulation bei zehn Ratten. Die Tumorgöße (y-Achse [mm]) ist gegen die Versuchsdauer (x-Achse [Tage]) dargestellt.



**Abbildung 4.13: Tumorwachstum nach Tumorchallenge innerhalb drei Testgruppen.** Diese Abbildung zeigt den Effekt der Vakzinierung auf das Tumorwachstum nach einem Tumorchallenge. In der  $\beta$ -Catenin-Gruppe ist das Tumorwachstum im Vergleich zu Kontrollgruppen durch die Vakzinierung beeinflusst. Die Tumore erreichen ihre maximale Größe von 7 mm am Tag 8, während bei Kontrollgruppen eine Tumorgöße von 8,5 mm (LV-Gruppe) und 9 mm (PBS-Gruppe) erreicht wird. Die Tumorgöße (Mittelwert aus 10 Tieren) wurde gegen die Versuchsdauer (Tage) nach Tumorinokulation aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen, die die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert zeigen. Der Unterschied in der Tumorgöße zwischen der  $\beta$ -Catenin-Gruppe und den Kontrollgruppen ist ab Tag 21 statistisch signifikant ( $p$ -Wert  $< 0.05$ ).

## 4.8 Untersuchung der Immunantwort

Die spezifischen Effektormechanismen des erworbenen Immunsystems lassen sich in zwei Hauptkategorien einteilen. Die zellulären Effektoren werden durch CD4 Helfer T-Zellen und CD8 zytotoxische T-Zellen repräsentiert. Antikörper dagegen stellen die Effektormoleküle der humoralen Immunantwort dar. Während Antikörper natives Antigen binden, können T-Zellen das Antigen mit ihrem Rezeptor nur erkennen, wenn es von antigenpräsentierenden Zellen (APC) prozessiert, d. h. proteolytisch verdaut und anschließend, gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), auf der Zelloberfläche der APC präsentiert wird.

### 4.8.1 Nachweis der zellvermittelten Immunantwort

Die im Rahmen dieses Versuchsteils zu untersuchende Immunität beruht auf der antikörperunabhängigen Zytotoxizität. Spezifisch sensibilisierte Effektorzellen (zytotoxische T-Lymphozyten) können in Abwesenheit von Antiserum und Komplement zytotoxisch wirken und lebende Zielzellen (Tumorzellen) zerstören.

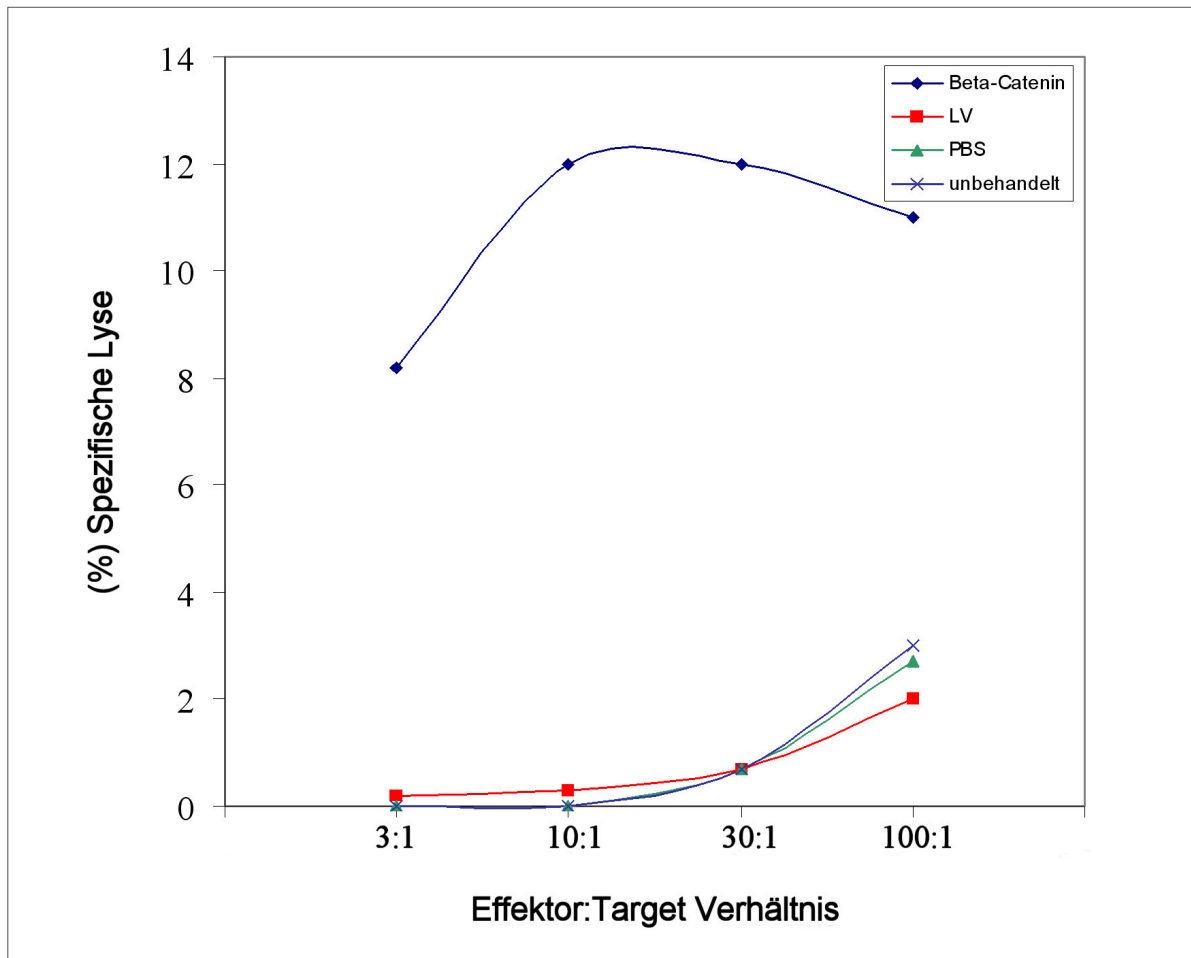
In diesem *in vitro* Experiment sollten die isolierten T-Lymphozyten aus 6 mit dem Vakzinierungsplasmid immunisierten Ratten, die dem Tumorchallenge Experiment nicht unterzogen wurden zur Analyse einer spezifischen T-Zell Antwort gegen die Tumorzelllinie CC531 (Zielzellen) verwendet werden.

Zur Quantifizierung der lymphozytotoxischen Reaktion wurden die CC531 Tumorzellen mit  $^{51}\text{Cr}$  radioaktiv markiert und anschließend mit den Lymphozyten der vakzinierten Ratten inkubiert. Werden die Tumorzellen von Effektorzellen erkannt, kommt es zur lymphozytotoxischen Reaktion mit Tumorzelluntergang, deren Ausmaß indirekt über die freigesetzte Radioaktivität aus den zerstörten Zellen im Überstand ermittelt werden kann.

Das Experiment wurde wie im 3.19 beschrieben an einem  $\gamma$ -Counter durchgeführt, um

die freigesetzte Radioaktivität zu messen. Dabei wurde das Verhältniss zwischen Effektor- und Zielzellen (E:T-ratios) in verschiedenen Titrationsstufen von 3:1, 10:1, 30:1, 100:1 (vgl. 3.19) untersucht, um eine Linearität bzw. das Vorhandensein einer Killer-suppressiven Komponente abschätzen zu können. Nach Durchführung mehrerer  $^{51}\text{Cr}$  Release Assays mit zytotoxischen T-Lymphozyten aus verschiedenen Versuchsratten und wiederholten Experimenten, konnte bei zwei von sechs Tieren (33%) eine spezifische Lyse der CC531 Zellen von ca. 11% gemessen werden, während bei 4 weiteren Ratten der  $\beta$ -Catenin-Gruppe trotz einer geringen spontanen Lyse und hoher Sensitivität des Assays keine spezifische Lyse gemessen werden konnte. Die drei Kontrollratten PBS, LV und unbehandelt (Abbildung 4.14) zeigten eine nicht signifikante 3%ige Lyse der Zielzellen. Diese Daten deuten auf eine verminderte T-Zellaktivierung, bei der die Antigenpräsentation eine entscheidende Rolle spielt. Diese könnte durch eine nicht ausreichende Applikationsdosis der Vakzine geklärt werden, welche zu einer ineffizienten Präsentation des verabreichten Antigens führt.





**Abbildung 4.14: Nachweis der zellulären Immunantwort.**

Zytotoxizität von isolierten Rattenlymphozyten gegen CC531 Zellen angegeben in Effektor:Target Verhältniss (3:1, 10:1, 30:1, 100:1). 33% von  $\beta$ -Catenin Ratten zeigen eine spezifische Lyse von 11% bei einem E:T Verhältniss von 100:1, während bei den Kontrolltieren eine 3%ige spezifische Lyse gemessen wurde.

### 4.8.2 Untersuchung der humoralen Immunantwort

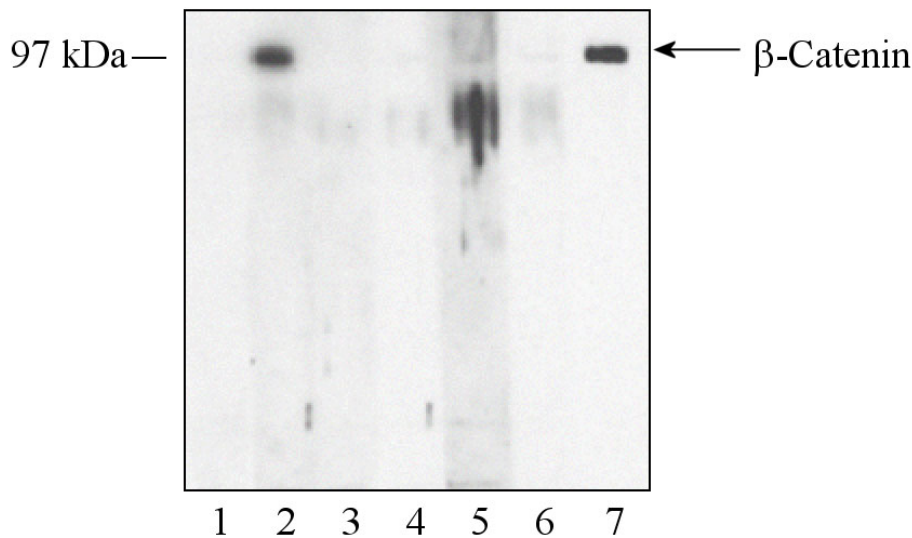
Humorale Immunität wird durch Antikörpermoleküle ermittelt, die nach dem ersten Kontakt des Immunsystems mit einem körperfremden Antigen von B-Lymphozyten produziert werden.

Infolge der Vakzinierung mit dem mutierten  $\beta$ -Catenin sollte die B-Zell vermittelte Immunantwort in den Ratten nachgewiesen werden. Um die immunisierten Ratten auf die humorale Immunantwort zu untersuchen, wurden die aus diesen Tieren stammenden Antiseren gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein mittels Western Blot (Abbildung 4.15) getestet. Präimmunsereen wurden vier Tage vor Vakzinationsbeginn entnommen und neben den Antiseren gegen das gereinigte  $\beta$ -Catenin-Protein untersucht. Die Blutentnahme erfolgte durch die Punktion des retrobulbären Venenplexus. Als Positivkontrolle diente der spezifische Maus-anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper (Transduction Laboratories, USA). In Abbildung 4.15 konnte die Spezifität der Antiseren für das getestete Protein (mutierte  $\beta$ -Catenin) gezeigt werden.

Die aus der Versuchsgruppe ( $\beta$ -Catenin) stammenden Immunsereen erkennen das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein. Die starken Signale bei ca. 100 kDa sind der Nachweis für die B-Zellantwort, die infolge der Überexpression von mutiertem  $\beta$ -Catenin-Protein induziert und zur Sezernierung von spezifischen Antikörpern ins Blut führte.

Neben dem Antiserum dient das Präimmunsereum von dem jeweiligen Versuchstier als Negativkontrolle. Bei den Präimmunsereen sollte keine Spezifität gegenüber dem Protein nachweisbar sein. Die Blutseren aus den PBS behandelten Tieren dienten ebenfalls als Negativkontrolle. Alle Antiseren wurden auf ihre Spezifität gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein geprüft. Die ersten zwei Spuren in Abbildung 4.15 zeigen die Reaktion von Präimmun- bzw. Antiserum des vakzinierten Tieres, gegen das gereinigte  $\beta$ -Catenin-Protein. Das Antiserum erkennt das  $\beta$ -Catenin-Protein bei der erwarteten Größe von ca. 100 kDa, während das Präimmunsereum das  $\beta$ -Catenin-Protein nicht erkennt. In den Spuren 3 bis 6 sind die Präimmun- und Antiseren der Kontrollgruppen getestet worden. Sie

zeigten keine spezifische Reaktion mit dem  $\beta$ -Catenin-Protein. Der Maus-anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper (Transduction Laboratories, USA, 1:500) wurde als Positivkontrolle verwendet.



**Abbildung 4.15: Nachweis der durch die Vakzination hervorgerufene Immunantwort gegen  $\beta$ -Catenin.**

Je 50 ng des gereinigten  $\beta$ -Catenin-Proteins wurden pro Spur auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die Membran wurde in gleichmäßigen Streifen geschnitten. Daraufhin wurden die Blotstreifen vereinzelt je mit einem Serum (1:100) bzw. Maus-anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper 1:500 (Positivkontrolle) über Nacht bei 4°C inkubiert. Als 2. Antikörper gegen Rattenantisera diente der Kaninchen-anti-Ratte Antikörper (1:1000 DAKO, Hamburg), 1 h bei RT. Der Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:5000, Hamburg) wurde als Zweitantikörper gegen Maus-anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper, 1 h bei RT verwendet.

Spur 1: Präimmun der  $\beta$ -Catenin-Gruppe;

Spur 2: Antiserum der  $\beta$ -Catenin-Gruppe;

Spur 3: Präimmun der nur mit leerem Vektor behandelten Gruppe;

Spur 4: Antiserum der nur mit leerem Vektor behandelten Gruppe;

Spur 5: Präimmun der PBS-Gruppe (Negativkontrolle);

Spur 6: Antiserum der PBS-Gruppe (Negativkontrolle);

Spur 7: Maus-anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper (Positivkontrolle)

# Kapitel 5

## Diskussion

Mutationen im  $\beta$ -Catenin Gen sind bislang in Tumoren des Kolons (Chan *et al.*, 2002), der Haut (Chan *et al.*, 1999), der Leber (Miyoshi *et al.*, 1998), des Ovars (Fukuchi *et al.*, 1998; Palacios and Gamallo, 1998), des Gehirns und der Prostata (Gerstein *et al.*, 2002) beschrieben worden. Sie sind ein kritischer Schritt in der Progression dieser Krebsarten in dem sie eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielen. Mutiertes  $\beta$ -Catenin wurde bereits als tumorassoziiertes Antigen bei malignen Melanomen identifiziert (Robbins *et al.*, 1996).

Mutationen, die das  $\beta$ -Catenin Gen aktivieren, führen zum definierten Austausch von verschiedenen Aminosäuren. Durch Austausch bzw. Deletion nur einer dieser Aminosäuren unterbleibt die effiziente Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK-3 $\beta$  und damit dessen kontinuierlichen Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen System. Infolge dessen wird die transkriptionale Aktivität mit T cell factor bzw. Lymphoid enhancer factor konstitutiv induziert und die Genexpression ausgelöst (Vogelstein 1998; Blum, 2001).

Durch Mutationen des  $\beta$ -Catenins in Tumorzellen kommt es zur Expression neuer Epitope, die hauptsächlich auf Tumoren vorkommen und damit dem Immunsystem eine Möglichkeit geben, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Aufgrund dieser tumorspezifischen

Expression stellt das mutierte  $\beta$ -Catenin ein geeignetes Zielantigen für eine immuntherapeutische Intervention und damit ein interessantes Targetmolekül für eine Vakzinierung dar.

In dieser Arbeit sollte in einem tierexperimentellen Ansatz die Frage geklärt werden, ob sich das mutierte  $\beta$ -Catenin tatsächlich als Zielantigen für eine Vakzinierung gegen kolorektalen Tumore eignet.

## 5.1 Untersuchung von Mutationen

In Anbetracht der wichtigen Rolle von Mutationen des  $\beta$ -Catenins in der Karzinogenese und kolorektalem Krebs wurden im Rahmen dieser Arbeit in 33 aus WAG/Rij stammenden DMH induzierten Kolonkarzinomen Mutationsanalysen durchgeführt. Die Tumorinduktion geschah durch kontinuierliche Verabreichung von 20 mg/kg Körpergewicht DMH einmal wöchentlich über 20 Wochen. Dabei wurden in 6–8 Wochen alten WAG/Rij Ratten Kolontumore induziert. Die Tiere wurden eine Woche nach der letzten Injektion getötet und die Tumoren zur Gewinnung des Tumormaterials entfernt.

Um reines Tumormaterial zur Untersuchung von Mutationen zu gewinnen, wurden Tumorgefrierschnitte angefertigt und das Tumormaterial zur DNA-Gewinnung mikrodissiziert. Die isolierte DNA wurde anschließend amplifiziert. Durch die Sequenzanalyse der PCR-Fragmente konnte die Mutation an der Phosphorylierungsstelle hauptsächlich an Codon 41 im Exon 3 des *Ctnnb1* Gens in 12 von 33 (36%) Fällen identifiziert werden. Durch diese Mutation wird infolge einer Substitution die Aminosäure Threonin (ACC) durch Isoleucin (ATC) ersetzt. Auf der Nukleotidebene entspricht dieser Mutation eine C  $\rightarrow$  T Transition, die durch die karzinogene DMH Behandlung bei Ratten bevorzugt vorkommt.

In der Tumorzelllinie CC531, bei der es sich histomorphologisch um ein mit DMH induziertes Adenokarzinom des Kolons handelt (Thomas *et al.*, 1993) und häufig für die Therapie

unterschiedlicher Krebsarten als Target verwendet wird (Marinelli *et al.* 1991; Oldenburg *et al.*, 1994; Veenhuizen *et al.*, 1996; Griffini *et al.*, 1997), konnte ebenso die Mutation an Codon 41 des dritten Exons im  $\beta$ -Catenin Gen identifiziert werden.

Die Identifizierung einer spezifischen Mutationsstelle innerhalb des Codon 41 bei Kolontumoren wird den Ergebnissen zwei letztlich beschriebenen Studien gegenübergestellt. Diese Studien berichten über eine  $\beta$ -Catenin Mutation an Codon 33, die bevorzugt infolge einer Kurzzeit- (2–5 Wochen) und Langzeitbehandlung (36–52 Wochen) durch AOM oder DMH bei Ratten resultiert (Takahashi *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 2001).

In der Kurzzeitbehandlung mit DMH werden Mutationen deutlich mehr an Codon 32 und 34 induziert, während sie an Codon 41 vereinzelt vorkommen. Dieses Mutationsspektrum spiegelt die wesentlich mutagene Fähigkeit von DMH bzw. AOM, welche häufig die Ursache für die Mutationen besonders in CTGGA Motifs darstellt. Diese Mutationen betreffen auch das Codon 32 und 34 in *Ctnnb1* (Takahashi *et al.*, 1998; Suzui *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2001). Erst wenn bei der Kurzzeitbehandlung zusätzliche genetische Läsionen bei betroffenen Zellen erworben werden, wird die kritische Schwelle von Mutationen in diesen Zellen erreicht, die notwendig ist, um das autonome Tumorwachstum zu erlauben. Unter diesen Umständen kommen nur häufig induzierte Mutationen wie z. B. an Codon 32 und 34 in höherer Wahrscheinlichkeit in Tumoren vor, während gewöhnliche Mutationen (Codon 41) verloren gehen.

In dieser Arbeit wurde unter Verwendung eines 20 wöchigen Behandlungsprotokolls (kompletten Protokolls) bei den Ratten praktisch das gleiche Mutationsspektrum induziert, da diese Mutationen durch DMH induziert und unter einer gleichbleibenden karzinogenen Behandlung zu einer hohen Häufigkeit und Multiplizität von Tumorinduktion führen. Neben den induzierten Tumoren kommt es zusätzlich zu induzierten genetischen Defekten in anderen Onkogenen sowie Tumorsuppressorgenen, so dass die Zellen mit allen möglichen *Ctnnb1* Mutationsarten sofort die notwendige Schwelle erreichen. Unter diesen Umständen findet gleichzeitig Tumorwachstum statt und der Wettbewerb zwischen benachbarten Zellklonen wird kritisch, so dass die stärkere Mutation (Mutation an Codon 41) mit hö-

herem onkogenen Potential dominiert und sich ausbreitet.

Hinsichtlich der wichtigen Rolle des Tumorsuppressor-Proteins APC in der Degradation des  $\beta$ -Catenins und die Rolle von APC-Gen Mutationen auf die Stabilisierung des Proteins in der Zelle (Morin *et al.*, 1997; Ilyas *et al.*, 1997), sollte untersucht werden, ob in den zu untersuchenden Tumoren Veränderungen des APC Gens (Rubinfeld, 1996) zur onkogenen Aktivierung des  $\beta$ -Catenins beitragen. Zur Untersuchung von Mutationen wurden Sequenzanalysen im Exon 15 des APC Gens, an Codon 1061, 1307 und 1554 in den Tumorproben durchgeführt. Unter den untersuchten Tumoren konnten keine Mutationen im APC Gen festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die genetischen Veränderungen in untersuchten Tumoren nicht durch APC-Gen Mutationen resultieren, sondern vermutlich auf die unkontrollierte Aktivierung des Wnt-Signalweges beruhen (vgl. 1.3). Sie können ebenfalls durch eine Wnt-unabhängige infolge von  $\beta$ -Catenin Mutationen verursachte, dauerhafte Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und Zellkern (Korinek, *et al.*, 1997; Pfeifer, 1997) entstehen.

Die Mutationen des K-ras Gens spielen ebenso eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Tumore bei Menschen und Nagetieren (Jackson, 1999). Sie kommen mit einer Häufigkeit von 50% in kolorektalen Tumoren bei Menschen (Schramm *et al.*, 2000) und 60% bei Ratten (Erdmann *et al.*, 1997) vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde die isolierte DNA aus DMH induzierten Kolontumoren bei WAG/Rij Ratten auf spezifische Nukleotidsubstitutionen im Exon 1 des K-ras Gens an Codon 12 und 13 analysiert. Eine Nukleotidtransition von G zu C an Codon 12 bzw. G zu A an Codon 13 des Exon 1 führt zu einem Aminosäureaustausch, nämlich dem Ersatz von Glycin durch Asparaginsäure.

In 21 von 33 (64%) der zu untersuchenden Tumore konnte die Mutation an Codon 12 und Codon 13 identifiziert werden. 1997 berichtete Erdmann, dass in mehr als 60% der Karzinogen behandelten Ratten Mutationen im Exon 1 des K-ras Gens auftreten.

Die Charakterisierung von  $\beta$ -Catenin und K-ras Mutationen in Rattentumoren induziert



nach dem kompletten DMH Protokoll zeigte, dass es sich in beiden Fällen um die typische Mutation des DMH-Modells handelt. Alle gefundenen Mutationen sind jeweils Punktmutationen, die in heterozygotem Zustand in den Tumoren und nie im angrenzenden Normalgewebe vorkommen. Die auftretenden Mutationen betreffen die gleichen Codons, die auch bei humanen kolorektalen Tumoren vorzugsweise betroffen sind. Von besonderer Bedeutung ist der Befund, dass 11 von 12  $\beta$ -Catenin Mutationen identische C zu T Transitionen an Codon 41 und 19 von 21 K-ras Mutationen identische G zu A Transitionen an Codon 12 darstellen (Abb. 4.2 bzw. 4.3). 7 von 33 (21%) Tumore tragen beide ( $\beta$ -Catenin und K-ras) Mutationen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die  $\beta$ -Catenin Mutationen sowohl in An- als auch Abwesenheit von K-ras Mutationen stattfinden. Dies bedeutet, dass Wnt-Signalweg (vgl. 1.3) und K-ras Pathway (vgl. 1.4) unabhängig von einander agieren, jedoch die vorhandenen Mutationen in beiden Signalwegen in einer synergistischen Weise zur Ratten-Kolonkarzinogenese beitragen.

## 5.2 Etablierung eines immuntherapeutischen Ansatzes bei kolorektalen Karzinomen in syngenen Ratten mittels DNA-Vakzinierung

Nach dem letztlich untersucht wurde, dass das DMH Modell ein geeignetes Modellsystem für  $\beta$ -Catenin spezifische Immunisierung darstellt, sollte getestet werden, ob eine Vakzinierung mit dem mutierten  $\beta$ -Catenin Plasmid (vgl. 4.4) als Zielantigen eine wirksame tumorgerichtete Immunantwort auslöst. Robbins *et al.*, 1996, berichten über melanospezifischen tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL), die in der Lage sind, mutiertes  $\beta$ -Catenin zu erkennen. Hinsichtlich dieses Befundes, dass mutiertes  $\beta$ -Catenin ein tumorassoziiertes Antigen darstellt, wurden in dieser Arbeit Ratten mit dem hergestellten  $\beta$ -Catenin Plasmid zur Induktion einer spezifischen Immunantwort vakziniert.

Um eine protektive Immunität bei den Versuchstieren zu induzieren, wurden die Ratten

mit dem mRN $\beta$ -Catenin Plasmid vakziniert. Für die Vakzinherstellung wurde die vollständige cDNA des mutierten  $\beta$ -Catenins aus mRNA mittels RT-PCR amplifiziert. Die Gesamt-mRNA entstamm der CC531 Zelllinie, bei der bereits die  $\beta$ -Catenin Mutation an Codon 41 des dritten Exons identifiziert wurde. Die Primer wurden identisch zu Ratten-ESTs (rat expressed sequence tags) abgeleitet. Der 5'-Primer wurde mit einer KspI und der 3'-Primer mit einer XbaI Schnittstelle ausgestattet. Anschließend wurde die DNA über die KspI/XbaI Schnittstelle in den eukaryontischen Expressionsvektor pExlink3 einkloniert. Das mRN $\beta$ -Catenin Plasmid steht unter der Kontrolle des konstitutiven Cytomegalievirus Promoters. Der Konstrukt beträgt eine Größe von 7,5 kb.

Bevor das hergestellte DNA-Plasmid für die Vakzinierungsexperimente verwendet wurde, sollte anhand eines Luciferase-Assays (Gossen und Bujard, 1992) die Funktionalität des mRN $\beta$ -Catenin Plasmids überprüft werden. In diesem Test wurde die humane aus kolorektalen Tumoren stammende SW948 Zelllinie, die ein intaktes APC Gen besitzt, verwendet. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0.1, 0.5, 1.0, 2.0)  $\mu$ g von mRN $\beta$ -Catenin Plasmid transfiziert. Humanes  $\beta$ -Catenin mit Deletion von Codon 45 diente als Kontrollplasmid.

Das Reporterplasmid pTOPFLASH wurde zusammen mit dem Ratten bzw. humanen  $\beta$ -Catenin Plasmid in die SW948 Zellen cotransfiziert. Das Plasmid steht unter Kontrolle eines minimalen c-fos-Promotors und beinhaltet vier Repeats der optimalen Erkennungssequenz für Lef-1/Tcf (H.Clevers, Utrecht, Niederlande). In diesem Test konnte die Promotoraktivität von mRN $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden, in dem die Luciferase-Aktivität gemessen wurde. Die Enzym-Aktivität beruht auf der Umsetzung des Luciferins unter Freisetzung von Lichtquanten, die als relative light units dargestellt sind (Abbildung 4.7). Unter Einsatz der oben genannten Plasmidkonzentrationen konnte die Transaktivierung des c-fos Promotors durch mutiertes RN $\beta$ -Catenins gezeigt werden. Das mutierte  $\beta$ -Catenin bindet an Lef-1/Tcf Proteine im Zellkern, bildet den  $\beta$ -Catenin-Lef-1/Tcf-Komplex und führt zur Promotoraktivierung des Zielgens (Luciferase). Bei zunehmender Plasmidkonzentration wird das Luciferase Gen verstärkt exprimiert. Ein Vergleich der Ergebnisse von mRN $\beta$ -Catenin und mutiertem humanem  $\beta$ -Catenin (Positivkontrolle) unter Berücksich-

tigung der Standardabweichung (Abbildung 4.7) zeigt die Funktionalität des mutierten Ratten  $\beta$ -Catenin Plasmids.

CC531 Zellen mit der identifizierten  $\beta$ -Catenin Mutation an Codon 41 des dritten Exons sollten als Zielzellen einer  $\beta$ -Catenin spezifischen zellulären Immunantwort dienen. Daher war es von besonderer Bedeutung, die Expression von MHC I Molekülen in diesen Zellen zu untersuchen. Für eine erfolgreiche Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen ist die spezifische Erkennung eines Antigens notwendig. Zytotoxische T-Zellen erkennen Peptide aus intrazellulären Molekülen (z. B. tumorassoziierte Antigene, virale Proteine), die von Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I Molekülen (MHC I) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Durch eine FACS-Analyse konnte die Expression der MHC I Moleküle auf der Oberfläche dieser Zellen nachgewiesen werden. Der Mean-Wert, d. h. das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität der Probe zu der entsprechenden Negativkontrolle lag bei 4,69, der auf eine ausreichende Expression von MHC I Molekülen deutete.

Um eine Immunantwort gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin in Ratten zu induzieren, wurden die Tiere mit dem mutierten  $\beta$ -Catenin Plasmid intradermal vakziniert. Der Grund einer intradermalen Vakzinierung mit dem rekombinanten mRN $\beta$ -Catenin Plasmid war die Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen wie z. B. die dendritischen Zellen (Langerhanszellen). Diese Zellen sind in der Lage, ruhende, für die Abwehr in Bereitschaft stehende T-Lymphozyten effizient zu aktivieren. Dabei können sie T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen induzieren und infolge dessen eine spezifische antitumorale Immunantwort gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin generieren.

Sechzehn syngenen WAG/Rij Ratten wurden mit dem hergestellten DNA Plasmid vakziniert (Abbildung 4.11). Nach viermaliger Immunisierung, die in zehntägigen Abständen stattfand, wurden in 10 von 16 Ratten durch die s. c. Inokulation von  $5 \cdot 10^6$  CC531 Zellen pro Ratte Tumore implantiert (Tumorchallenge). Sechs Ratten wurden unmittelbar nach der Vakzinierung getötet und die Antiseren und Lymphozyten zur *in vitro* Untersuchung der zellulären Immunantwort gewonnen.

Eine PBS und eine mit pEXlink3 (leerem Vektor) behandelte Kontrollgruppe wurden mit der Testgruppe verglichen. In den Kontrollgruppen kam es bereits ein Tag nach Injektion der Zellen zur Tumorentwicklung, während 50% von Ratten der  $\beta$ -Catenin-Gruppe erst vier Tage nach Tumorchallenge meßbare Tumore entwickelten. Aus den Kontrollgruppen mussten einige Tiere aufgrund der Tumorgröße getötet werden. Die Tumore der  $\beta$ -Catenin-Gruppe erreichten bis zum Tag sieben nach der Tumorimplantation ihre maximale Größe (Abbildung 4.12). Unter den 5 Tieren, die eine verspätete Tumorentwicklung aufwiesen, wurden bei 3 Ratten die Tumore zwischen Tag 17 und 30 vollständig zurückgebildet. Das verzögerte Auftreten von Tumoren und deren Regression zeigen, dass in drei von insgesamt zehn der immunisierten Tiere eine antitumorale Immunantwort induziert wurde. Bei 2 Tieren kam es nach der Tumorgößenreduktion zum erneuten Wachstum und Progression des Tumors. Bei 3 Ratten der Testgruppe ( $\beta$ -Catenin) wuchsen die Tumore trotz der Vakzinierung bis Tag 7 zwar an, blieben jedoch in ihrer Größe konstant.

Abbildung 4.13 zeigt die Mittelwert-Kurve von allen an Tumorchallenge beteiligten Tieren. Dadurch läßt sich schließen, dass die Immunisierung mit dem  $\beta$ -Catenin Plasmid das Tumorstadium in den vakzinierten Ratten beeinflusst, während die Tumorgröße bei den Kontrollgruppen weiter zunimmt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Ratten eine schwache immunologische Reaktion gegen Tumore entwickeln, die ab einem bestimmten Zeitpunkt zur Stabilisierung von Tumoren führt, jedoch keine Tumorelimination hervorruft.

Neben zellulärer Immunantwort sollte die B-Zellantwort in nicht an Tumorchallenge beteiligten Tieren analysiert werden. Aus diesem Grund wurde das mutiere  $\beta$ -Catenin-Protein zur Untersuchung der Spezifität von Rattenantisera gegen dieses Protein hergestellt. Das Plasmid wurde in Bakterienzellen (E.Coli) transformiert und die Expression von  $\beta$ -Catenin-Protein mit Isopropyl-Thiogalactosid (IPTG) induziert. Die Proteinexpression wurde in verschiedenen Induktionszeiten von 1, 2, 4, 10 und 24 Stunden untersucht. Nach einer zehnstündigen Induktion exprimierten die Bakterien große Mengen an mRNA- $\beta$ -Catenin-Protein. Mittels Western Blot konnte die Expression dieses Proteins in den Zellen auf einem 6%igem SDS-Gel nachgewiesen werden. Das Protein wurde mittels

Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gereinigt. Zur Reinigung des mutierten  $\beta$ -Catenin-Proteins, das 6x His Tag am C-terminalen Ende trug, wurde eine nitrilotriacetisches (Ni-NTA) Harz Nickel Säule (QIAGEN, Hilden) verwendet.

Mittels Western Blot wurde die humorale Immunantwort untersucht. Die Antiseren von 6 intradermal vakzinierten Ratten, die des Tumorchallenge nicht unterzogen waren, wurden gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein auf eine humorale Immunantwort getestet. Als Kontrolle wurden Präimmunsereen aus den jeweiligen Tieren mit den Antiseren der Testgruppe verglichen. Durch die Untersuchung von Antiseren vakzinierter Ratten gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein konnte eine spezifische B-Zell Antwort nachgewiesen werden, in dem die Antiseren das Protein detektierten. Die starken Signale des  $\beta$ -Catenins sind bei einer Größe von 92 KDa zu erkennen, während die Präimmunsereen das Protein nicht detektieren. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass durch die DNA Impfung die Induktion der spezifischen B-Zellantwort gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein hervorgerufen wurde.

Unter 6 von 16 geimpften Ratten, die nicht am Tumorchallenge beteiligt waren, wurden die Lymphozyten zur Untersuchung der T-Zell Antwort isoliert und die zellvermittelte Immunität gegen CC531 Zellen mittels  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assay analysiert. Die isolierten zytotoxischen T-Zellen (CTL) aus dem Blut, der Milz und Lymphknoten von vakzinierten Ratten wurden gegen  $^{51}\text{Cr}$ -markierte CC531 Zellen getestet. Eine schwache zelluläre Immunantwort von 11% bei 33% von Ratten zeigte, dass das Immunsystem der Tiere nur schwach gegen Tumorzellen reagiert. Die Daten der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen, die zum Nachweis einer spezifischen zellulären Immunantwort dienten, deuten auf eine verminderte T-Zellaktivierung. Für die Ineffizienz immunologischer Effektoren bei der Unterdrückung der Tumorzellen gibt es verschiedene Erklärungen:

1. Die schwache Immunogenität von Tumorzellen (CC531) sowie die ineffiziente Präsentation des verabreichten Antigens, die diese Zellen die Fähigkeit verleiht das Immunsystem zu entgehen.

2. Die wahrscheinlich verminderte Antigen-Präsentation, die einen negativen Effekt auf den immunstimulatorischen Kontext ausübt.
3. Tumorzellen setzen bestimmte Faktoren frei, die eine Immunantwort gegen sie supprimieren, z. B. TGF- $\beta$  und die CTL in ihrer Funktion verhindern.

Die Expression von Fas-Ligand durch Tumorzellen könnte darüber hinaus ein Mechanismus sein, der durch Aktivierung der Fas-Apoptosekaskade in der benachbarten immunkompetenten Zelle Apoptose auslösen und somit die Immunantwort auf den Tumor verhindern.

### Perspektive

In Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal in einem syngenem Ratten Model eine Vakzinierung mit dem mutierten  $\beta$ -Catenin zur Entwicklung einer immuntherapeutischen Intervention gegen kolorektale Karzinome durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die gezielte Vakzinierung gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin zur Induktion einer spezifischen humoralen jedoch nicht zu einer ausreichenden zytotoxischen T-Zellantwort oder Tumorprotektion führt. In weiterführenden Experimenten könnte durch eine erneute und stärkere Vakzinierung eine Verstärkung der T-Zellantwort und eine antitumorale Immunantwort erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin durch die Beladung der dendritischen Zellen mit dem Tumorantigen eine Vakzine herzustellen, die zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort führen könnte.

Eine antitumorale Wirkung könnte durch das Einbringen von Zytokinen (z. B. IL-2, IL-7, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) in Tumorzellen zur verstärkten Antigenpräsentation der Tumorzellen erreicht werden. Diese Behandlung führte bei Melanomen zu interessanten klinischen Effekten mit einer 25%igen Krankheitsstabilisierung über 6 Monate (Belli, *et al.*, 1998).

Mit Hilfe von viralen Vektoren wie z. B. rekombinante Adenoviren könnte eine stärkere immunogene Wirkung erzeugt werden. Ebenso könnten kombinationstherapeutische Strategien gegen weitere bereits identifizierte tumorassoziierte Antigene der CC531 Zelllinie wie z. B. mutiertes ras, bnp cycE u. a. zum Einsatz kommen.

# Zusammenfassung

Schlagworte:  $\beta$ -Catenin, Kolonkarzinom, Vakzination

In Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle des mutierten  $\beta$ -Catenins als mögliches Zielantigen für eine immuntherapeutische Intervention in Kolonkarzinomen untersucht werden. Um diese Frage zu beantworten, sollten zuerst in dem syngenem Rattenmodell (WAG/Rij) durch die kontinuierliche Verabreichung von 20 mg/KG des chemischen Karzinogens 1,2-Dimethylhydrazin über 20 Wochen Kolontumore induziert werden. Daraufhin wurde das Tumormaterial sowie die Tumorzelllinie CC531 einer Mutationsanalyse unterzogen. In 12 von 33 (36%) der Tumore wurde eine  $\beta$ -Catenin-Mutation an Codon 41 des dritten Exons identifiziert. Dabei handelt es sich in 11 von 12 (>90%) der Mutationen um die identischen C  $\rightarrow$  T (T41I) Transitionen. Nur in einem einzigen Fall wurde die Mutation G  $\rightarrow$  A an Codon 32 (D32N) identifiziert. Die  $\beta$ -Catenin-Mutationen führen zur Stabilisierung und damit die onkogene Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Proteins. Infolgedessen kommt es zur tumorspezifischen Expression von neuen Epitopen, die grundsätzlich einer immunologischen Intervention zugänglich sein können. In dieser Arbeit sollte in dem syngenem Rattenmodell untersucht werden, ob eine Vakzinierung mit dem mutierten  $\beta$ -Catenin-Plasmid als Zielantigen eine tumorgerichtete Immunantwort auslöst. Zur Herstellung der DNA-Plasmid wurde zuerst die gesamte mRNA aus CC531 Zellen gewonnen und das vollständige Allel der mutierten  $\beta$ -Catenin cDNA mit einer Größe von 2,8 Kb amplifiziert und in das eukaryontische Expressionsplasmid pExlink3, das unter der Kontrolle eines vollständigen CMV-Promotors steht, inkloniert. Anhand eines Luciferase-Assays und mit Hilfe eines Reportergens konnte die Funktionalität des Konstruktes überprüft werden. Es wurden 16, 10–12 Wochen alte WAG/Rij Ratten jeweils mit 200  $\mu$ g mutiertem  $\beta$ -Cateninplasmid intradermal vakziniert. Zwei weitere Gruppen dienten als Kontrolle (PBS und leerer Vektor). Die PBS Gruppe diente zur Beobachtung des normalen Tumorstwachstums infolge des Tumorchallenges. Vier Wochen nach der Immunisierung wurde die Tumoringokulation durch die subkutane Verabreichung von  $5 \cdot 10^6$  Kolon Karzinom Zellen CC531 pro Ratte durchgeführt. Innerhalb der  $\beta$ -Catenin-Gruppe wuchsen die Tumore bei allen Tieren an.

In 30% der Ratten gingen die Tumore, nachdem sie anfänglich anwuchsen, vollständig zurück. In restlichen 70% blieb die Tumorgroße ab einem bestimmten Zeitpunkt konstant. Obwohl nach der Vakzinierung mit dem mutierten  $\beta$ -Catenin keine Tumorprotektion erreicht wurde, konnte jedoch eine Tumorgroßenreduktion verglichen mit den Kontrollgruppen festgestellt werden. Durch die Untersuchung der Antiseren von immunisierten Ratten gegen das gereinigte  $\beta$ -Catenin-Protein mittels Western-Blot konnte die Spezifität dieser Antiseren gegen das mutierte  $\beta$ -Catenin-Protein gezeigt werden. Mit Hilfe des Zytotoxizitätstests konnte eine T-Zell Antwort von 11% bei 33% der Tiere gegen die Zielzellen CC531 nachgewiesen werden.



# Summary

Keywords:  $\beta$ -Catenin, Colon Carcinoma, Vaccination

The main challenge of this work was to answer the question if  $\beta$ -catenin is a suitable target antigen for immunotherapeutic intervention in colon carcinoma. The mutational spectrum of  $\beta$ -catenin was investigated in a panel of rat colon tumors induced by long-term (20 weeks) DMH treatment.  $\beta$ -catenin mutations were detected in 12 of 33 (36%) tumors. 11 of 12 (>90%) mutations represented identical C  $\rightarrow$  T transitions within exon 3 codon 41, resulting in the common replacement of threonine by isoleucine. Only one of the  $\beta$ -catenin mutations found affected the previously implicated codon 32 cluster region (Asp32Asn). Using the same samples for mutational analysis of the  $\beta$ -catenin gene, 21 of 33 (64%) tumors were found to harbor k-ras mutations. 19 of the 21 were G  $\rightarrow$  A transitions at codon 12, and the remaining two at codon 13. This mutation leads to stabilization of the  $\beta$ -catenin protein and hence to oncogenic activation. This in turn causes tumor-specific expression of new epitopes, which basically could be available for an immunological intervention. In this work the task was to examine if vaccination with the mutated  $\beta$ -catenin plasmid as target antigen in a syngeneic rat model leads to tumor protection. To produce the DNA plasmid the total mRNA from CC531 cells was extracted. The resulting full-length allele, with a size of 2.8 Kb, from the mutated  $\beta$ -catenin cDNA was amplified and cloned into the eucaryotic expression plasmid pExlink3, which is controlled by a CMV promotor. By immunization of WAG/Rij rats with recombinant  $\beta$ -catenin, an anti-tumor immune response should be induced. At first, the tumors grew in all animals of the  $\beta$ -catenin group. However, after this initial growth, the tumors disappeared in 30% of the rats. In 70% of the animals, the tumor size remained constant after a certain period of time. Further, the cellular and humoral immune response of the vaccinated animals was examined. The anti-sera from the immunized rats recognized the mutated  $\beta$ -catenin protein. Following the tumor challenge, only a weak T-cell response against the CC531 cell line could be determined. The results showed that a B-cell response could be generated by vaccination aimed at the mutated  $\beta$ -catenin. It could also be shown, even though no

tumor protection was achieved, that the tumors in the  $\beta$ -catenin group remained constant in their size, while the tumors in the control group further grew.

# Literaturverzeichnis

- [1] **Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A., Kemler R.** (1997) Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797-3804
- [2] **Abeyounis C.J., Milgrom F.** (1976) A thermostable antigen characteristic for carcinogen-induced rat intestinal tumors. *J Immunol.* 116(1):30-4
- [3] **Akbari O., Panjwani N., Garcia S., Tascon R., Lwrie D., Stockinger B.** (1999) DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med.* 189(1):169-177
- [4] **Bhanot P., Brink M., Samos C.H., Hsieh J.C., Wang Y., Macke J.P., Andrew D., Nathans J., Nusse R** (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* 382(6588):225-30
- [5] **Barbacid M.** (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem.* 56:779-827
- [6] **Bedi A., Pasricha P.J., Akhtar A.J., Barber J.P., Bedi G.C., Giardiello F.M., Zehnbauser B.A., Hamilton S.R., Jones R.J.** (1995) Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res.* 55(9):1811-6
- [7] **Behrens J.** (2000) Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann N Y Acad Sci.* 910:21-35
- [8] **Behrens J., von Kries J.P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W.** (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor Lef-1. *Nature.* 382(6592):638-42
- [9] **Belli F., Mascheroni L., Gallino G., Lenisa L., Arienti F., Melani C., Colombo M.P., Parmiani G., Cascinelli N.** (1998) Active immunization of metastatic melanoma patients with IL-2 or IL-4 gene transfected, allogeneic melanoma cells. *Adv Exp Med Biol.* 451:543-5
- [10] **Bissonnette M., Khare S., von Lintig F.C., Wali R.K., Nguyen L., Zhang Y., Hart J., Skarosi S., Varki N., Boss G.R., Brasitus T.A.** (2000) Mutational and nonmutational activation of p21ras in rat colonic azoxymethane-induced tumors: effects on mitogen-activated protein kinase, cyclooxygenase-2, and cyclin D1. *Cancer Res.* 60(16):4602-9

- [11] **Brancolini C., Lazarevic D., Rodriguez J., Schneider C.** (1997) Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *J Cell Biol.* 139(3):759-71
- [12] **Blum C.A., Xu M., Orner G.A., Fong A.T., Bailey G.S., Stoner G.D., Horio D.T., Dashwood R.H.** (2001) Beta-catenin mutation in rat colon tumors initiated by 1,2-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis.* 22(2):315-20
- [13] **Boland C.R.** (1997) Genetic pathways to colorectal cancer. *Hops Pract* 32(11):79-84, 87-96
- [14] **Brabletz T., Jung A., Reu S., Porzner M., Hlubek F., Kunz-Schughart L.A., Knuechel R., Kirchner T.** (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci.* 28;98(18):10356-61
- [15] **Brunner E., Brunner D., Fu W., Hafen E., Basler K.** (1999) The dominant mutation Glazed is a gain-of-function allele of wingless that, similar to loss of APC, interferes with normal eye development. *Dev Biol.* 206(2):178-88
- [16] **Chan E.F., Gat U., McNiff J.M., Fuchs E.** (1999) A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet.* 21(4):410-3
- [17] **Chan T.A., Saito T., Oda Y., Tanaka K., Matsuda S., Tamiya S., Iwamoto Y., Tsuneyoshi M.** (2001) Beta-catenin nuclear expression correlates with cyclin D1 overexpression in sporadic desmoid tumours. *Pathol.* 195(2):222-8
- [18] **Chan T.A., Wang Z., Dang L.H., Vogelstein B., Kinzler K.W.** (2002) Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of beta-catenin mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(12):8265-70
- [19] **De Plaen E., Lurquin C., Van Pel A., Mariame B., Szikora J.P., Wolfel T., Sibille C., Chomez P., Boon T.** (1988) *Proc Natl Acad Sci.* 85(7):2274-8
- [20] **Devereux J., Haeberli P., Smithies O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12(1 Pt 1):387-95
- [21] **Druckrey H., Preussmann R., Matzkies F., Ivankovic S.** (1967) Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Naturwissenschaften.* 54(11):285-6
- [22] **Erdmann S.H., Wu H.D., Hixson L.J., Ahnen D.J., Gerner E.W.** (1997) Assessment of Mutations in Ki-ras And p53 in Colon Cancer from Azoxy methane and Dimethylhydrazine treated rats. *Molecular Carcinogenesis.* 19:137-144
- [23] **Fearon E.R., Vogelstein B.** (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61(5):759-67

- [24] **Federick L., Greene M.D., Lawrence S., Bamb R.N., Barwick B.S.** (1987) Colorectal cancer in animal models. *J Sur Res.* 43:476-87
- [25] **Fisher E.R., Paulson J.D., McCoy M.M.** (1981) Genesis of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. A light and electron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med.* 105(1):29-37
- [26] **Fuchs R., Blakesley R.** (1983) Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* 100:3-38
- [27] **Fukuchi T., Sakamoto M., Tsuda H., Maruyama K., Nozawa S., Hirohashi S.** (1998) Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.* 58(16):3526-8
- [28] **Gamallo C., Palacios J., Moreno G., Calvo de Mora J., Suarez A., Armas A.** (1999) Beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol.* 155(2):527-36
- [29] **Gerstein A.V., Almeida T.A., Zhao G., Chess E., Shih I.M., Buhler K., Pienta K., Rubin M.A., Vessella R., Papadopoulos N.** (2002) APC/CTNNB1 (beta-catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 34(1):9-16
- [30] **Goss K.H., Groden J.** (2000) Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol.* 18(9):1967-79
- [31] **Gossen and Bujard** (1992) High control of expression in mammalian cells by tetracycline-responsiv promotors. *Proc Natl Acad Sci.* 89: 5547-5551
- [32] **Graham T.A., Weaver C., Mao F., Kimelman D., Xu W.** (2000) Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell.* 103, 885-896
- [33] **Griffini P., Smorenburg S.M., Verbeek F.J., van Noorden C.J.** (1997) Three-dimensional reconstruction of colon carcinoma metastases in liver. *J Microsc.* 187 (pt 1):12-21
- [34] **Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M., et al.** (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 66(3):589-600
- [35] **Guerrero S., Casanova I., Farre L., Mazo A., Capella G., Mangués R.** (2000) K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorageindependent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res.* 60(23):6750-6
- [36] **Hao X.P., Pretlow T.G., Rao J.S., Pretlow T.P.** (2001) Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res.* 61(22):8085-8

- [37] **He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler, K.W.** (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281, 1509-1512
- [38] **Hecht A., Litterst C.M., Huber O., Kemler R.** (1999) Functional Characterization of Multiple Transactivating Elements in Beta-Catenin, Some of Which Interact with the TATA-binding Protein in Vitro. *J. Biol. Chem.* 274( 25) 18017-18025
- [39] **Heiser A., Dahm P., Yancey D.R., Maurice M.A., Boczkowski D., Nair S.K., Gilboa E., Vieweg J.** (2000) Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J Immunol.* 164: 5508-5514
- [40] **Hoerr I., Obst R., Rammensee H.G., Jung G.** (2000) In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol.* 30:1-7
- [41] **Hsu W., Zeng L., Costantini F.** (1999) Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J. Biol. Chem.* 274, 3439-3445
- [42] **Huelsken J., Birchmeier W., Behrens J.** (1994) E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 127, 2061-2069
- [43] **Hugh T.J., Dillon S.A., O'Dowd G., Getty B., Pignatelli M., Poston G.J., Kinsella A.R.** (1999) Beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 12;82(4):504-11
- [44] **Ilyas M., Tomlinson I.P.** (1997) The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol.* 182(2):128-37
- [45] **Jackson P.E., Cooper D.P., O'Connor P.J., Povey A.C.** (1999) The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. *Carcinogenesis.* 20(3):509-13
- [46] **Jacoby R.F., Lior X., Teng B.B., Davidson N.O., Brasitus T.A.** (1991) Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest.* 87(2):624-30
- [47] **Jeng Y., Wu M., Mao T., Chang M., Hsu H.** (2000) Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Lett.* 152: 45-51
- [48] **Kikuchi Y., Dinjens W.N., Bosman F.T.** (1997) Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch.* 431(2):111-7

- [49] Kinzler K.W., Nilbert M.C., Su L.K., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hedge P., McKechnie D., *et al.* (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 253(5020):661-5
- [50] Kitaeva M.N., Grogan L., Williams J.P., Dimond E., Nakahara K., Hausner P., DeNobile J.W., Soballe P.W., Kirsch I.R. (1997) Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res*. 57, 4478-4481
- [51] Koch A., Denkhaus D., Albrecht S., Leuschner I., von Schweinitz D., Pietsch T. (1999) Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res*. 59: 269-273
- [52] Koesters R., Ridder R., Kopp-Schneider A., Betts D., Adams V., Niggli F., Briner J., von Knebel Doeberitz M. (1999) Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res*. 1999. 59(16):3880-2
- [53] Kondo Y., Kanai Y., Sakamoto M., Genda T., Mizokami M., Ryuzo U., Hirohashi S. (1999) Beta-catenin accumulation and mutation of exon 3 of the beta-catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res*. 90:1301-1309
- [54] 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 beta-catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science*. 275(5307):1784-7
- [55] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
- [56] Laurent-Puig P., Blons H., Cugnenc P.H. (1999) Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev Suppl*. 1:S39-47
- [57] Lohmann S., Galle K., Knop J., Enk A.H. (2000) CD83+ human dendritic cells transfected with tumor peptide cDNA by electroporation induce specific T-cell responses: a potential tool for genetic immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*. 7(4): 605-614
- [58] Lucceri C., De Filippo C., Caderni G., Gambacciani L., Salvadori M., Giannini A., Dolara P. (2000) Detection of somatic DNA alterations in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis*. 21(9):1753-6
- [59] 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 beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(4):1603-8

- [60] **Marinelli A., Dijkstra F.R., van Dierendonck J.H., Kuppen P.J., Cornelisse C.J., van de Velde C.J.** (1991) Effectiveness of isolated liver perfusion with mitomycin C in the treatment of liver tumours of rat colorectal cancer. *Br J Cancer*. 64(1):74-8
- [61] **Marquet R.L., Westbroek D.L., Jeekel J.** (1984) Interferon treatment of a transplantable rat colon adenocarcinoma: importance of tumor site. *Int J Cancer*. 33(5):689-92
- [62] **McCrea and B.M. Gumbiner** (1991) Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J. Biol. Chem.* 266(7):4514-4520
- [63] **McDonell M.W., Simon M.N., Studier F.W.** (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol.* 110(1):119-46
- [64] **Miyaki M., Iijima T., Kimura J., Yasuno M., Mori T., Hayashi Y., Koike M., Shitara N., Iwama T., Kuroki T.** (1999) Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* 59(18):4506-9
- [65] **Miyoshi Y., Iwao K., Nagasawa Y., Aihara T., Sasaki Y., Imaoka S., Murata M., Shimano T., Nakamura Y.** (1998) Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res.* 58(12):2524-7
- [66] **Miyoshi Y., Iwao K., Nawa G., Yoshikawa H., Ochi T., Nakamura Y.** (1998) Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis. *Oncol Res.* 10(11-12):591-4
- [67] **Moelling K.** (1997) DNA for genetic vaccination and therapy. *Cytokines Cell Mol Ther.* 3(2):127-35
- [68] **Mor G., Eliza M.** (2001) Plasmid DNA vaccines. Immunology, tolerance, and autoimmunity. *Mol Biotechnol.* 19(3):245-50
- [69] **Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., Kinzler K.W.** (1997) Activation of beta-Catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutation in Beta-Catenin or APC. *Science.* 275 (5307):1787-90
- [70] **Norris A.L., Bailey A., Askham J., Whitehouse A., Clissold P.M., Markham A.F., Meredith D.M.** (1996) Characterization of the human beta-catenin gene. *Mamm Genome.* 7(2):160-2
- [71] **Nüsslein-Volhard and Wieschaus** (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801



- [72] Oldenburg J., Begg A.C., van Vugt M.J., Ruevekamp M., Schornagel J.H., Pinedo H.M., Los G. (1994) Characterization of resistance mechanisms to cis-diamminedichloroplatinum(II) in three sublines of the CC531 colon adenocarcinoma cell line in vitro. *Cancer Res.* 54(2):487-93
- [73] Ozawa M., Baribault H., Kemler R. (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8, 1711-1717
- [74] Palacios J., Gamallo C. (1998) Mutation in the Beta-catenin gene (CTNNB1) in Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* 58(7):1344-7
- [75] Pfeifer M. (1997) Beta-catenin as Oncogene: The smoking gun. *Science.* 275(21):1752-53
- [76] Polakis P. (1997) The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta.* 1332(3):F127-47
- [77] Polakis P. (1999) The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev.* 9(1):15-21
- [78] Polakis P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes & Development.* 14(15): 1837-51
- [79] Reddy B.S., Maeura Y. (1984) Tumor promotion by dietary fat in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats: influence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst.* 72(3):745-50
- [80] Robbins P.F., El-Gamil M., Li Y.F., Kawakami Y., Loftus D., Appella E., Rosenberg S.A. (1996) A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* 183(3):1185-92
- [81] Roose J., Clevers H. (1999) Tcf transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1424(2-3):M23-37
- [82] Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S., Polakis P. (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 272(5264):1023-6
- [83] Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Munemitsu S., Polakis P. (1997) Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res.* 57(20):4624-30
- [84] Rubinfeld B., Robbins P., El Gamil M., Albert I., Porfiri E., Polakis P. (1997) Stabilization of Beta-Catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science.* 275(21):1790-92
- [85] Rubinfeld B., Souza B., Albert I., Müller O., Chamberlin S.H., Masiarz F.R., Munemitsu S., Polakis P. (1993) Association of the APC gene product with  $\beta$ -Catenin. *Science.* 272 : 1731-33

- [86] **Schramm K., Krause K., Bittroff-Leben A., Goldin-Lang P., Thiel E., Kreuser E.D.** (2000) Activated K-ras is involved in regulation of integrin expression in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 87(2):155-64
- [87] **Sheng H., Shao J., Williams C.S., Pereira M.A., Taketo M.M., Oshima M., Reynolds A.B., Washington M.K., DuBois R.N., Beauchamp R.D.** (1998) Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis*. 19(4):543-9
- [88] **Sparks A.B., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W.** (1998) Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 58(6):1130-34
- [89] **Suzui M., Ushijima T., Dashwood R.H., Yoshimi N., Sugimura T., Mori H., Nagao M.** (1999) Frequent mutations of the rat beta-catenin gene in colon cancers induced by methylazoxymethanol acetate plus 1-hydroxyanthraquinone. *Mol Carcinog*. 24(3):232-7
- [90] **Suzui M., Okuno M., Tanaka T., Nakagama H., Moriwaki H.** (2002) Enhanced colon carcinogenesis induced by azoxymethane in min mice occurs via a mechanism independent of beta-catenin mutation. *Cancer Lett*. 183(1):31-41
- [91] **Takahashi M., Fukuda K., Sugimura T., Wakabayashi K.** (1998) Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res*. 58(1):42-6
- [92] **Takahashi M., Mutoh M., Kawamori T., Sugimura T., Wakabayashi K.** (2000) Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 21(7):1319-27
- [93] **Takahashi M., Nakatsugi S., Sugimura T., Wakabayashi K.** (2000) Frequent mutations of the beta-catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis*. 21(6):1117-20
- [94] **Takayama T., Ohi M., Hayashi T., Miyanishi K., Nobuoka A., Nakajima T., Satoh T., Takimoto R., Kato J., Sakamaki S., Niitsu Y.** (2001) Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 121(3):599-611
- [95] **Tetsu O., McCormick F.** (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 398(6726):422-6
- [96] **Thomas C., Nijenhuis A.M., Timens W., Kuppen P.J., Daemen T., Scherphof G.L.** (1993) Liver metastasis model of colon cancer in the rat: immunohistochemical characterization. *Invasion Metastasis*. 13(2):102-12
- [97] **Tomlinson I., Ilyas M., Novelli M.** (1997) Molecular genetics of colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 16(1-2):67-79

- 
- [98] **Veenhuizen R.B., Marijnissen J.P., Kenemans P., Ruevekamp-Helmers M.C., Mannetje L.W., Helmerhorst T.J., Stewart F.A.** (1996) Intraperitoneal photodynamic therapy of the rat CC531 adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 73(11):1387-92
- [99] **Vivona A.A., Shpitz B., Medline A., Bruce W.R., Hay K., Ward M.A., Stern H.S., Gallinger S.** (1999) K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 14(9):1777-81
- [100] **Voeller H.J., Truica C.I., Gelmann E.P.** (1998) Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res*. 58(12):2520-3
- [101] **Wei Y., Fabre M., Branchereau S., Gauthier F., Perilongo G., Buendia M.A.** (2000) Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene*. 19: 498-504
- [102] **Wodarz A. & Nusse R.** (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59-88
- [103] **Wright K., Wilson P., Morland S., Campbell I., Walsh M., Hurst T., Ward B., Cummings M., Chenevix-Trench G.** (1999) Beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int J Cancer*. 82(5):625-9
- [104] **Yamada Y., Yoshimi N., Hirose Y., Kawabata K., Matsunaga K., Shimizu M., Hara A., Mori H.** (2000) Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 60(13):3323-7
- [105] **Yost C., Farr G.H. III, Pierce S.B., Ferkey D.M., Chen M.M., Kimelman D.** (1998) GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell*. 93, 1031-1041

# Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem lieben Ehemann Thomas Andersson, der mir immer liebevoll zur Seite stand und mich seelisch unterstützte.

Frau Prof. Dr. Marta Szamel möchte ich herzlich für ihre Unterstützung durch hilfreiche Ratschläge und die Begutachtung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich besonders für seine Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Andres Freytag und Frau Dr. Regula Freytag, dass sie die Mühen des Korrekturlesens auf sich genommen haben.

Herrn Priv. Doz. Dr. Jan-Heiner Küpper danke ich für seine freundliche Unterstützung und guten Ratschläge.

Herrn Dr. Gerd Moldenhauer danke ich ganz besonders für seine stete Hilfsbereitschaft sowie für die guten Tipps.