

**Aus dem Department für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen
Abteilung für Toxikologie
Direktor: Professor Dr. M. Schwarz**

**Glutaminsynthetase- und Cytochrom P450-Expression in
soliden Tumoren des Kindesalters mit CTNNB1 (β -Catenin)-
Mutation**

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

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

**vorgelegt von
Andreas Schmidt
aus
Tübingen**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Mehrstufenmodell der Kanzerogenese.....	1
1.2. Der Wnt-Signalweg.....	3
1.3. β -Catenin.....	5
1.4. Glutaminsynthetase (GS).....	8
1.5. Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP).....	10
1.6. Solide Tumore des Kindesalters.....	11
1.6.1. Hepatoblastome.....	12
1.6.2. Nephroblastome (Wilms-Tumore).....	14
1.6.3. Neuroblastome.....	16
1.6.4. Weichteilsarkome.....	17
2. Fragestellung.....	18
3. Geräte.....	19
3.1. Großgeräte.....	19
3.2. Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
3.2.1. Allgemein.....	20
3.2.2. Immunfärbung.....	21
3.2.3. Mikrodissektion.....	21
3.2.4. Software.....	21
4. Materialien.....	23
4.1. Chemikalien und Biochemikalien.....	23
4.2. Lösungen und Puffer.....	25
4.2.1. Immun- und enzymhistochemische Gewebefärbung.....	25
4.2.1.1. HE-Färbung.....	25
4.2.1.2. Immunhistochemische Färbung.....	26

4.2.2. DNA-Amplifizierung.....	27
4.2.3. DNA-Isolierung und -Aufreinigung.....	29
4.2.4. Proteinisolierung.....	30
4.2.5. RNA-Isolierung und -Aufreinigung.....	30
4.2.6. Western-Blot.....	31
4.3. Größenmarker.....	33
4.4. Antikörper.....	34
4.5. Humane Tumorproben.....	35
4.6. Primer.....	38
4.6.1. PCR-Primer.....	38
4.6.2. LightCycler-Primer.....	38
4.7. Referenzsequenz.....	38
5. Methoden.....	39
5.1. Immunhistochemie.....	39
5.1.1. Anfertigung der histologischen Schnitte.....	39
5.1.1.1. Gewinnung und Aufteilung der Tumorproben.....	39
5.1.1.2. Silanisierung von Objektträgern.....	39
5.1.1.3. Anfertigung von Gefrierschnitten.....	40
5.1.2. Färben der histologischen Schnitte.....	40
5.1.2.1. Ethanolische HE-Färbung.....	40
5.1.2.2. GS-Färbung.....	41
5.1.2.3. CYP-Färbung.....	42
5.2. Mutationsanalyse.....	42
5.2.1. DNA-Gewinnung und Amplifizierung aus Tumorgewebe....	42
5.2.1.1. DNA-Isolierung aus den Tumorproben.....	42
5.2.1.2. DNA-Quantifizierung.....	44
5.2.1.3. DNA-Amplifikation mittels PCR.....	45
5.2.2. Gelelektrophorese.....	49
5.2.2.1. Gießen der Acrylamidgele.....	50

5.2.2.2.	Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese.....	51
5.2.2.3.	Entwicklung der Acrylamidgele.....	51
5.2.3.	Mutationsanalyse der amplifizierten DNA.....	51
5.2.3.1.	Aufreinigung der amplifizierten DNA.....	51
5.2.3.2.	Sequenzierung.....	52
5.2.3.3.	Bestätigung der Mutation.....	54
5.3.	LightCycler Verfahren.....	55
5.3.1.	RNA-Gewinnung aus den Tumorproben.....	55
5.3.1.1.	RNA-Isolierung aus den Tumorproben.....	55
5.3.1.2.	RNA-Aufreinigung.....	56
5.3.1.3.	RNA-Quantifizierung.....	57
5.3.2.	Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	57
5.3.3.	Real Time PCR.....	59
5.4.	Western Blot.....	61
5.4.1.	Proteinisolierung.....	63
5.4.1.1.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	64
5.4.2.	Gelelektrophorese.....	65
5.4.2.1.	Gießen der Acrylamidgele.....	65
5.4.2.2.	Probenvorbereitung und -auftragung.....	65
5.4.3.	Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran.....	66
5.4.4.	Immunoblot.....	67
5.4.5.	Entwicklung des Blots.....	68
5.4.6.	Ladekontrolle.....	69
5.5.	Mikrodissektion.....	69
5.5.1.	Mikrodissektion.....	69
5.5.2.	Verdau der mikrodissezierten Proben.....	71
5.5.3.	Amplifikation der mikrodissezierten Proben.....	72
6.	Ergebnisse.....	74
6.1.	Mutationsanalyse.....	74

6.1.1. Hepatoblastome.....	75
6.1.2. Nephroblastome.....	77
6.1.3. Neuroblastome.....	79
6.1.4. Rhabdomyosarkome.....	79
6.1.5. Weichteilsarkome.....	80
6.2. HE-Färbung und Immunhistochemie.....	80
6.2.1. Hepatoblastome.....	80
6.2.1.1. HE- und GS-Färbung der Hepatoblastome.....	81
6.2.1.2. Cytochrom P450 (CYP)-Färbungen der Hepatoblastome.....	85
6.2.2. Nephroblastome.....	91
6.2.2.1. HE- und GS-Färbung der Nephroblastome.....	91
6.2.2.2. CYP-Färbung der Nephroblastome.....	94
6.3. Western-Blot.....	96
6.3.1. β -Catenin-Western-Blot der Hepatoblastome.....	96
6.3.2. GS-Western-Blot der Hepatoblastome.....	97
6.3.3. CYP-Western-Blot der Hepatoblastome.....	98
6.4. LightCycler.....	99
6.4.1. GS-LightCycler-Verfahren.....	99
6.4.2. CYP-LightCycler-Verfahren.....	101
6.5. Mikrodissektion.....	102
7. Diskussion.....	105
8. Zusammenfassung und Ausblick.....	112
8.1. Zusammenfassung.....	112
8.2. Ausblick.....	113
9. Abbildungen und Tabellen.....	114
9.1. Abbildungen.....	114
9.2. Tabellen.....	116
10. Literaturverzeichnis.....	118

11. Danksagung.....	125
12. Lebenslauf.....	126

Abkürzungen

—	nicht bekannt
	keine Anfärbung
?	Befund fraglich
—	Mutation
(+)	leicht
+	moderat
++	stark
+++	sehr stark
<	das Normalgewebe produzierte mehr Enzym als der Tumor
=	kein Unterschied in der Expression
>	der Tumor exprimierte mehr Enzym als das Normalgewebe
Δ	Deletion
°C	Grad Celcius
∅	nicht durchgeführt
Σ	Summe
μ	Mikro
5-FU	5 Fluorouracil
A	Adenin
	Ampère
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Aminoethylcarbazol
AFP	α-Fetoprotein
Ala	Alanin
AMV	<i>Avian Myoblastosis Virus</i>
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin

Arm	<i>Armadillo</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	englisch: <i>Bovine Serum Albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
c	centi copy Konzentration
C	Cytidin
ca.	circa
CDP	CDP-Star® Chemiluminescent Substrate for Alkaline Phosphatase
CK	Casein Kinase
Cp	englisch: <i>crossing point</i>
CT	Computer-Tomographie
CTNNB1	Catenin (<i>cadherin-associated protein</i>), beta 1; humane β - Catenin-Gen
CYP	Cytochrom P 450
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dd	didesoxy
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DNA	englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
Dsh	<i>Dishevelled</i>
E	Glutaminsäure

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EES	Ewing-Sarkom
et al.	Latein: <i>et alius, et alii</i> ; deutsch: und anderer, und andere
etc.	et cetera
F	Phenylalanin
	Spezifischer Multiplikationskoeffizient
	Induktionsfaktor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
G	Guanin
	Glycin
g	Gramm
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
Glu	Glutamat
GS	Glutaminsynthetase
GSK	Glykogen Synthase Kinase
H	Wasserstoff
h	Stunde
Hb	Hepatoblastom
HCC	englisch: <i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHMTIC	5-(3-Hydroxymethyl-3-methyl-triazin-1-yl)imidazole-4- carboxamide
Hz	Hertz
I	Isoleucin
I	Innere des Tumors
Int-1	englisch: <i>integration</i>
k	kilo

Kap.	Kapitel
l	Liter
LDL	englisch: <i>Low Density Lipoproteins</i>
LEF	englisch: <i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
Leu	Leucin
log	Logarythmus
LRP	englisch: <i>LDL receptor Related Protein</i>
M	molar
m	milli
	messenger
	männlich
min	Minuten
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
Mon	Monate
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MYC	englisch: Myelocytomatosis oncogene cellular homolog
MYCN	Myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
N	Asparagin
	eine der vier Basen A, C, G oder T
n	Anzahl
NaOAc	Natriumacetat
NG	Normalgewebe
NH ₄ ⁺	Ammonium-Ion
Nr.	Nummer
NSE	Neuronspezifische Enolase
OD	Optische Dichte
P	Prolin
PBS	englisch: <i>Phosphate Buffered Saline</i>

PBS/S	PBS supplementiert mit Rinderserumalbumin und NaCl
PBS/T	PBS supplementiert mit 0,05% Tween 20 [®]
PCP	englisch: <i>planar cell polarity</i>
PCR	englisch: <i>Polymerase chain reaction</i>
P _i	Freies Phosphat
PNET	Periphere neuroektodermale Tumore
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin Rand des Tumors
RKI	Robert-Koch-Institut
RMS	Rhabdomyosarkome
RNA	englisch: <i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	englisch: <i>rotations/rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
S	Serin Stroma
s.	siehe
SDS	englisch: <i>Sodium Dodecylsulfate</i>
sec	Sekunde
Ser	Serin
β-HCG	β-Humanes Choriongonadotropin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borsäure EDTA
TCF	englisch: <i>T cell factor</i>
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TG	Tumorgewebe
Tm	Temperatur
U	Units
UV	ultraviolett
V	Valin
	Verdünnungsfaktor
	Volt
Val	Valin
VE	Vollentsalz/entmineralisiert
vgl.	vergleiche
VP-16	Etoposid
w	weiblich
WCE	englisch: <i>White Cell Extraction Buffer</i>
Wg	<i>Wingless</i>
WHO	englisch: <i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
Wt	Wilms-Tumor
x	mal
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

Krebs ist eine allgemeine Bezeichnung für einen malignen Tumor. In der ursprünglichen Definition fielen nur maligne Tumore von epithelialen Geweben (Karzinome) und mesenchymalen Geweben (Sarkome) unter den Begriff Krebs. Im weiteren Sinne werden heute aber auch maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems dazugezählt. (Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 261. Auflage, 2007)

Um neue Therapieansätze zu entwickeln und Krebserkrankungen wirkungsvoll behandeln zu können, ist es wichtig, deren Entstehungsmechanismus zu kennen und zu verstehen. Ein gängiges Konzept ist das ‚Mehrstufenmodell der Kanzerogenese‘ (Moolgavkar und Knudson, 1981; Moolgavkar, 1983). Man geht davon aus, dass mehr als ein Ereignis notwendig ist, um aus einer gesunden eine entartete Zelle entstehen zu lassen (Armitage und Doll, 1954). Das genannte Modell unterscheidet drei Phasen der Tumorentstehung: *Initiation*, *Promotion* und *maligne Progression*.

Der *Initiation* (Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumovorläuferzelle) liegt in der Regel eine Mutation zu Grunde. Für die Mutation können Kanzerogene (chemische Stoffe, Viren, Strahlung) verantwortlich sein. Der Körper besitzt Mittel, um Mutationen bzw. dadurch geschädigte Zellen zu reparieren oder zu beseitigen (z.B. *Mismatch* Reparatur, Apoptose). Bei unzureichenden Schutzmechanismen, z.B. durch eine Mutation eines Tumorsuppressor-Gens, kann die geschädigte Zelle in seltenen Fällen überleben und weiter wachsen. Dieser Schritt der *Promotion* (Proliferation der Tumovorläuferzellen) kann durch *promovierende* Substanzen (z.B. das Insektizid DDT) noch beschleunigt werden. Durch weitere Mutationen (vor allem in den so genannten Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen) kommt

es zur *Konversion* (Übergang der Tumorvorläuferzelle in eine Tumorzelle) und schließlich zur *malignen Progression* (Entstehung eines bösartigen Tumors).

Mit entscheidend für das Auftreten von Mutationen in einer Zelle ist deren Teilungsrate; je höher die Zellteilungsrate, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mutation sich durch eine DNA-Replikationsrunde fixiert. Das erklärt, warum Gewebe mit hoher Zellreplikation (z.B. Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes und Epithel der Haut) besonders sensibel für kanzerogene Noxen sind. (Schwarz und Bock, 1998)

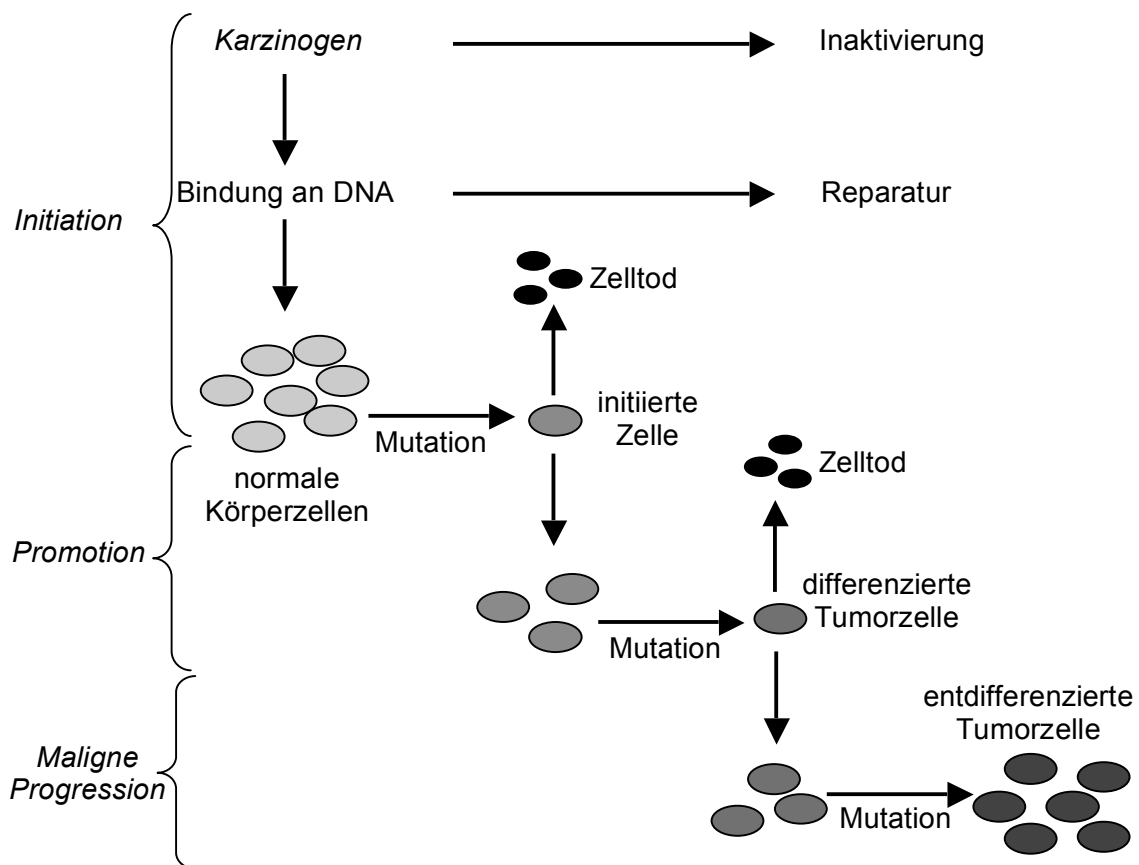


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese. *Initiierte* Zellen können proliferieren oder durch Apoptose eliminiert werden. Weitere Mutationsschritte können über das Zwischenstadium der differenzierten Tumorzelle zur entdifferenzierten Tumorzelle führen. (modifiziert nach Schwarz und Bock, 1998).

1.2. Wnt-Signalweg

Namensgeber für den Wnt-Signalweg sind seine Initiatoren, die Wnt-Proteine. Welche unterschiedlichen Zellen diese Glykoproteine bilden ist noch nicht vollständig geklärt. Bisher dazu vorliegende Untersuchungen lassen vermuten, dass sie in der Leber von Endothelzellen der Zentralvenen sezerniert werden (Gebhardt et al., 1998 und Kuo et al., 1991). Wnt ist ein Akronym für *Wingless* (*Wg*) und *Int-1*. Das *Wingless*-Gen spielt bei der Segmentpolarität der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* eine entscheidende Rolle (Siegfried und Perrimon, 1994) und hat in diesem Zusammenhang seine Namensgebung erfahren. Mutationen in diesem Gen führen zu flügellosen (engl. *wingless*) Tieren dieser Gattung. Das *Int-1* Gen führt bei Aktivierung durch MMTV (*mouse mammary tumor virus*) zur Entwicklung von Brustkrebs bei Mäusen (Morris et al., 1990).

Man unterscheidet den nicht-kanonischen und den kanonischen Wnt-Signalweg. Der nicht-kanonische Signalweg ist β -Catenin-unabhängig und wird weiter in den Wnt/ Ca^{2+} - (Kühl, 2004) und den *planar-cell-polarity* (PCP)-Signalweg (Fanto et al., 2004) unterteilt. Hier soll nur auf den kanonischen Wnt-Signalweg eingegangen werden.

Ist kein Wnt-Signal vorhanden (Abb. 2A), wird freies zytosolisches β -Catenin von zwei Tumorsuppressorproteinen gebunden – zum einen vom *Adenomatösen Polyposis Coli*-Protein (APC) und zum anderen von Axin. Dieser Komplex wird durch die Kinasen *Casein Kinase 1 α* (CK1 α) und *Glykogen Synthase Kinase-3 β* (GSK-3 β) vervollständigt. Die beiden Kinasen phosphorylieren freie Serin- und Threonin-Reste am Amino-Ende der β -Catenin-Proteine. Die Phosphorylierung der β -Catenin-Proteine führt anschließend zu deren Ubiquitinylierung. Die so prozessierten β -Catenin-Proteine werden schließlich in Proteasomen (Komplex zur Degradation von

Proteinen) abgebaut und es kommt zu keiner Ablesung der Zielgene des Wnt-Signalwegs (Übersichtsartikel: Willert und Nusse, 1998).

Durch Bindung von Wnt-Liganden mit Rezeptoren der *Frizzled*-Familie (G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine (Bhanot et al., 1996)) und *Lrp5/6* (einem Rezeptor der *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Rezeptor Familie (Pandur und Kühl, 2001)) kommt es zur Aktivierung des Wnt-Signalweges (Abb. 2B) und dadurch zu einer Unterdrückung der Aktivität der Kinasen CK1 α und GSK-3 β (Siegfried et al., 1992). Der genaue Mechanismus hierfür ist bisher noch nicht geklärt. Die direkte Interaktion von Axin mit *Lrp5/6* und/oder die Aktivität von *Dishevelled* (Dsh, ein Axin bindendes Molekül) scheint eine Rolle zu spielen (Noordermeer et al., 1994). Somit werden die β -Catenin-Proteine nicht abgebaut, sondern akkumulieren im Zytosol (Van Leeuwen et al., 1994). Das akkumulierte β -Catenin wandert daraufhin in den Zellkern (Huber et al., 1996). Die mit dem N-Terminus von sequenzspezifischen DNA-bindenden Proteinen der *T cell factor* (TCF)/*Lymphoid enhancer factor* (LEF)-Familie eingegangene Bindung der β -Catenin-Proteine führt zu einer vorübergehenden Umwandlung der TCF-/LEF-Proteine in Transkriptions-Aktivatoren. Normalerweise supprimieren diese Proteine die Zielgene des Wnt-Signalwegs. (Übersichtsartikel: Reya und Clevers, 2005)

Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt über β -Catenin zu einer Transkription der Zielgene; zu diesen gehören unter anderem c-myc-, Cyclin D1-, Cytochrom P450 (CYP)- und das Glutaminsynthetase (GS)-Gen (Cadoret et al., 2001; Loeppen et al., 2002 und 2005).

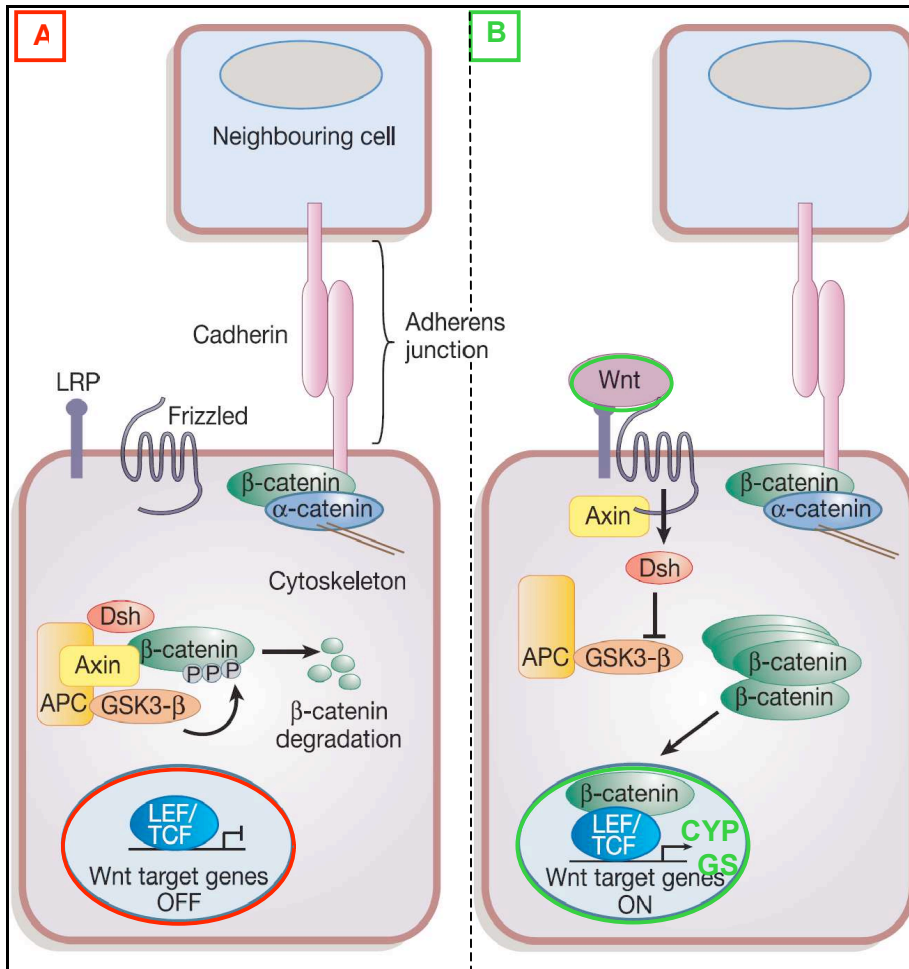


Abbildung 2: Der kanonische Wnt-Signalweg.

A) In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird freies β -Catenin durch APC und Axin gebunden. GSK-3 β phosphoryliert β -Catenin, das schließlich ubiquitinyliert und so für den proteasomalen Abbau vorbereitet wird.

B) In Anwesenheit eines Wnt-Signals verhindert Axin und/oder Dsh die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK-3 β und somit den proteasomalen Abbau von β -Catenin. Dieses akkumuliert im Zytosol und wandert in den Zellkern. Dort verbindet es sich mit den Transkriptionsfaktoren LEF und TCF und führt als Transkriptionskomplex zu einer Ablesung der Zielgene (z.B. GS, CYP) des Wnt-Signalwegs.

(modifiziert nach Reya und Clevers, Nature, 434: 843-850, 2005).

1.3. β -Catenin

β -Catenin gehört zusammen mit α - und γ -(Plakoglobin)-Catenin zu einer Reihe von Proteinen, die mit der zytosolischen Seite des Transmembran-Proteins E-Cadherin eine Verbindung eingehen (Aberle et al., 1996). Diese Catenine

regulieren so den Kontakt zwischen den E-Cadherinen benachbarter Zellen und haben daher auch ihren Namen: *catena*, lat. für Kette. Diese Beteiligung an der Regulation der Zell-Zell-Verbindungen ist eine von zwei wichtigen Aufgaben, die das β -Catenin einnimmt.

Die zweite Funktion des β -Catenins ist seine Aktivität im Wnt-Signalweg. Dort trägt es als Signaltransduktor entscheidend zur Transkription der Zielgene bei. Ob das β -Catenin seine transkriptionelle Aktivierungsfunktion übernehmen kann oder nicht, hängt von seiner Stabilität bzw. Konzentration im Zytosol ab.

Die Stabilität wird physiologischerweise bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs (s. 1.2) erhöht.

Als Folge von Mutationen im humanen β -Catenin-Gen (*CTNNB1*, catenin (*cadherin-associated protein*), beta 1) kommt es zu einer Konzentrationssteigerung des β -Catenins im Zytosol (Rubinfeld et al., 1997). Am Amino-Ende des Proteins befinden sich potentielle Phosphorylierungsstellen (drei Serin- und ein Threonin-Rest, jeweils durch drei andere Aminosäure-Reste getrennt). Sind diese durch Mutation des *CTNNB1*-Gens verändert, kann das Protein nicht mehr phosphoryliert werden und steht dem Abbau deshalb nicht mehr zur Verfügung (Morin et al., 1997).

Mutationen im *CTNNB1*-Gen konnten bei einer Reihe von Tumoren (Hepatoblastome, Nephroblastome, Kolon-Karzinom, Melanom, Medulloblastom, Endometrium-Karzinom nachgewiesen werden (Wnt-Homepage; Tab. 1).

Tabelle 1: Aminosäuren-Wildtyp (WT)-Sequenz des *CTNNB1*-Gens.

Es sind verschiedene bereits beschriebene Mutationen aufgeführt. Potentielle Phosphorylierungsstellen sind fett gedruckt und die Aminosäure-Reste des Ubiquitinylierungs-Motives rot unterstrichen.

(modifiziert nach Morin, BioEssays, 21: 1021 - 1030, 1999.

Mutationen der Nephroblastome: Koesters et al., 1999 und Maiti et al., 2000.

Mutationen der Hepatoblastome: Koch et al., 1999; Wei et al., 2000; Jeng et al., 2000; Udatsu et al., 2001; Takayasu et al., 2001; Taniguchi et al., 2002; Curia et al., 2008. Wnt-Homepage).

GSK-3β																	
29	33				37			41			45						
S	Y	L	D	S	G	I	H	S	G	A	T	T	T	A	P	S	WT
													A			Δ	Nephroblastom
																C	
				C			P						P			P	
																F	
			Y	F	V	S		C					A			Δ	Hepatoblastom
			N	C	E			F					I			F	
			G	P	R												

Das akkumulierte β-Catenin kann nicht nur die Zellteilung fördern, sondern auch pro-apoptotisch wirken (Kim et al., 2000). Letzteres könnte eine physiologische Funktion sein, die im Sinne einer negativen Rück-Koppelung den Organismus vor Zellen mit fehlerhaftem Wnt/β-Catenin-Signalweg und den daraus resultierenden Konsequenzen schützen soll. (Übersichtsartikel: Willert und Nusse, 1998; Morin, 1999)

Die Primärstruktur des β-Catenin-Proteins besteht am Amino-terminalen Ende aus 130 und am Carboxy-terminalen Ende aus 100 Aminosäuren. Dazwischen befinden sich 12 unvollständige Wiederholungen von 42 Aminosäuren, auch *Armadillo* (*arm*) Wiederholungen genannt. Das β-Catenin-Gen der Säugetiere ist ein Homolog zu *Armadillo*, einem Segment-Polaritäts-Gen der Fruchtfliege

Drosophila melanogaster. Dieses Gen spielt bei dem *Wingless*-Signalweg der *Drosophila* eine Rolle (McCrea et al., 1991). Am Amino-Ende sind potentielle Phosphorylierungs- und Ubiquitinylierungsstellen lokalisiert. Diese Region ist für die Stabilität und damit auch für den Abbau des Proteins wichtig. Mutationen dieser Phosphorylierungsstellen können zu Tumoren führen (Munemitsu et al., 1996). Die Transkriptions-Aktivierungs-Domäne ist am Carboxy-Ende des Proteins zu finden. Im Bereich der *arm*-Wiederholungen werden Bindungen mit anderen Proteinen (APC, TCF/LEF, E-Cadherin, u.a.) eingegangen.



Abbildung 3: Diagramm des β -Catenin-Proteins.

Schwarz dargestellt sind die so genannten ‚*arm*-Wiederholungen‘, die mit einer Reihe anderer Proteine interagieren (APC, TCF/ LEF, E-Cadherin u.a.). Am Amino-Ende (blau) des Proteins sitzt die Phosphorylierungs-/Ubiquitinylierungs-Region (gelb) für die GSK-3 β . Die Transkriptions-Aktivierungs-Domäne befindet sich am Carboxy-Ende des Proteins (grün).

(modifiziert nach Morin, BioEssays, 21: 1022 - 1030, 1999).

1.4. Glutaminsynthetase (GS)

Die GS ist ein Enzym, das im Stickstoff-Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Unter Verbrauch von Energie (Adenosintriphosphat, ATP) katalysiert es die Reaktion von Glutaminsäure (Glutamat) und Ammonium-Ionen (NH_4^+) zu Glutamin:

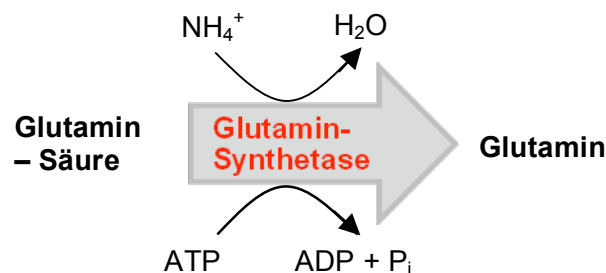


Abbildung 4: Katalyse-Reaktion der GS.

Unter Verbrauch von Energie (ATP) katalysiert die GS die Bildung von Glutamin aus Ammonium-Ionen (NH_4^+) und Glutaminsäure. Bei dieser Reaktion entstehen neben Glutamin und Wasser (H_2O) Adenosindiphosphat (ADP) und freies Phosphat (P_i).

Die GS wird vor allem in der Leber exprimiert. Charakteristisch ist die hohe GS-Expression in ein bis drei Zellschichten um die Zentralvene eines jeden Leberläppchens (Gebhardt et al., 1983). Schematisch handelt es sich beim Leberläppchen um sechseckige Gewebestrukturen. An ihren Ecken, Schnittpunkt von drei Leberläppchen, befinden sich so genannte Periportalfelder (auch bekannt als Glisson-Dreieck/Trias). Diese enthalten neben einem Ast der Leberarterie und der Pfortader auch einen Gallengang.

Die Zusammensetzung des von Trias zur Zentralvene fließenden Blutes ändert sich mit Annäherung zur Zentralvene und in Folge dessen auch die enzymatische Ausstattung der Leberzellen auf diesem Weg (Jungermann und Kietzmann, 1996). Ein möglicher Grund für die hohe Expression der GS um die Zentralvene ist die Detoxifizierung des Blutes von giftigem Ammoniak durch die GS bevor dieses durch die Zentralvene die Leber verlässt.

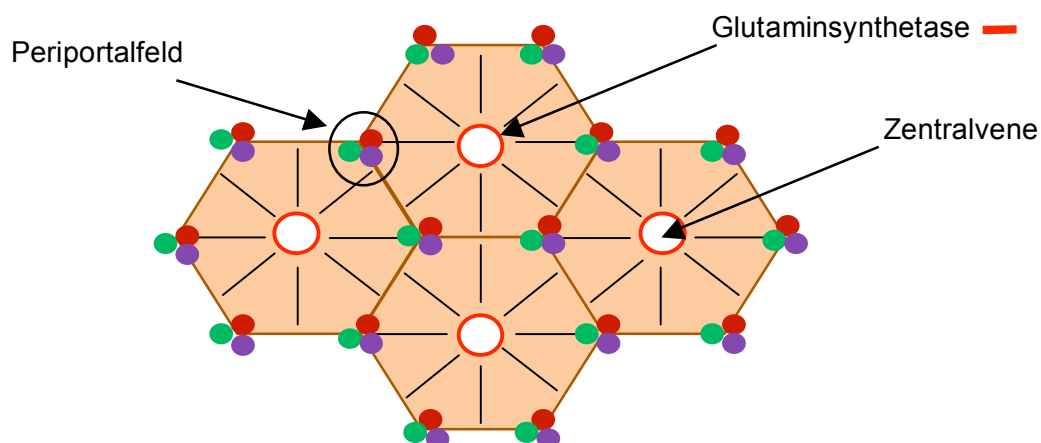


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Leberläppchen-Struktur.

Um die Zentralvene der sechseckigen Leberläppchen befindet sich in ein bis drei Zellschichten die GS. An den Schnittpunkten der Leberläppchen befinden sich die so genannten Periportalfelder mit jeweils einem Ast einer Leberarterie (rot), einer Pfortader (lila) und einem Gallengang (grün).

Glutamin ist als Stickstofflieferant ein wichtiger Bestandteil der Synthese verschiedener Moleküle (z.B. Aminosäuren, Purine und Pyrimidine) und besitzt zudem eine anabole Wirkung.

Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass in β -Catenin-mutierten Tumoren im Vergleich zu Lebernorgewebe und im Vergleich zu Tumoren ohne Mutation im β -Catenin-Gen (Wildtyp-Tumore) die GS vermehrt exprimiert wird (Loeppen et al., 2002). Dies zeigt, dass das GS-Gen ein Zielgen des Wnt-Signalwegs ist. Zudem entdeckte man eine erhöhte Aktivität dieses Enzyms in primären humanen Lebertumoren (Cadoret et al., 2001). Tumore, die eine verstärkte GS-Expression aufweisen, könnten aufgrund einer Unabhängigkeit von externer Glutaminzufuhr gegenüber GS-negativen Tumoren einen Selektionsvorteil besitzen (Gebhardt et al., 1989).

1.5. Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)

Eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus übernehmen die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP). Sie wirken entscheidend bei der Aktivierung und Inaktivierung von Medikamenten mit. Es gibt einige Medikamente, sogenannte *Prodrugs*, die erst durch diese Enzyme ihre Funktion erlangen (Tab. 2). Die CYP selbst können auch durch verschiedene Stoffe induziert, aktiviert oder inhibiert werden.

Zu finden sind die CYP hauptsächlich in der Leber als membranständige Enzyme im glatten endoplasmatischen Retikulum. Zwischen einzelnen Individuen kann es erhebliche Konzentrationsunterschiede der verschiedenen CYP in der Leber geben. Die große Familie dieser strukturell ähnlichen Isoenzyme wird anhand der Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenzen in Untergruppen unterteilt. Insgesamt sind bisher 56 humane CYP-Gene bekannt, die jeweils ein funktionierendes Enzym als Produkt haben. (Rooseboom et al., 2004; Marquardt und Schäfer, Lehrbuch der Toxikologie, 2. Auflage: 92 - 98, 2004)

Tabelle 2: *Prodrugs* von Zytostatika, die in der Therapie von soliden Tumoren des Kindesalters zum Einsatz kommen. (Rooseboom et al., Pharmacol Rev, 56: 53 - 102, 2004).

CYP	<i>Prodrug</i> → <i>Drug</i>
1A2	Ftorafur → 5 Fluoro-Uracil (5-FU)
	Dacarbazin → HHMTIC
2C6	Cyclophosphamid → Phosphoramid
2E1	Ftorafur → 5 Fluoro-Uracil (5-FU)
	Dacarbazin → HHMTIC
3A4	Cyclophosphamid → Phosphoramid
	Ifosfamid → Isophosphamid

Es konnte gezeigt werden, dass Lebertumore von Mäusen, die im β -Catenin-Gen mutiert sind, verschiedene CYP-Isoformen vermehrt exprimieren (Loeppen et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass neben der GS auch CYP-Isoformen durch einen β -Catenin abhängigen Signalweg reguliert werden.

1.6. Solide Tumore des Kindesalters

In Deutschland erkranken jährlich in etwa 1.800 Kinder unter 15 Jahren an Krebs. Das entspricht einer Inzidenz von 14 Neuerkrankungen in einer Altersgruppe von 100.000 Kindern unter 15 Jahren pro Jahr oder anders formuliert, wird bei jedem 500. Kind vor dessen 15. Lebensjahr eine Krebserkrankung diagnostiziert. (Krebs in Deutschland, 2003 – 2004, Häufigkeiten und Trends'; Eine gemeinsame Veröffentlichung des RKI und der GEKID, 2008)

Abbildung 6 zeigt den Anteil der unterschiedlichen Krebserkrankungen bei Kindern an der Gesamttumorhäufigkeit.

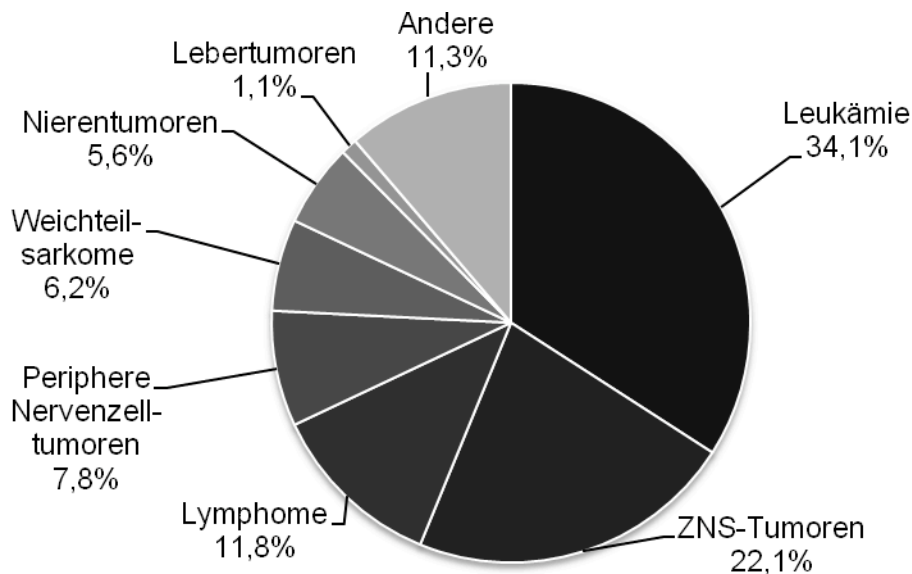


Abbildung 6:

Anteil (%) der verschiedenen Krebserkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren ermittelt aus den Jahren 1997 bis 2006 an der Gesamttumorhäufigkeit.

(modifiziert nach ‚Krebs in Deutschland, 2003 – 2004, Häufigkeiten und Trends‘; Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID); 6. überarbeitete Auflage, 2008).

1.6.1. Hepatoblastom

Hepatoblastome sind die am häufigsten vorkommenden Lebertumore im Kindesalter. Insgesamt machen sie 0,8 % bis 1,0 % aller malignen Tumore bei Kindern aus. Die Inzidenz beträgt 0,6 auf 100.000 Kinder, wobei vor allem Kinder im Alter zwischen $\frac{1}{2}$ und 3 Jahren erkranken. Es besteht eine leichte Prädisposition für das männliche Geschlecht im Verhältnis von 3:2. Hepatoblastome treten auch in Zusammenhang mit verschiedenen anderen Erkrankungen auf, so z.B. mit dem Wiedemann-Beckwith-Syndrom (Großwuchs-Syndrom) und der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), und bei sehr Frühgeborenen. Lymphknoten- und Fernmetastasen sind meist erst in späteren Stadien dieser Erkrankung zu beobachten. (AWMF online, Hepatoblastome, 05/2008)

Histologisch wird das Hepatoblastom in drei verschiedene Subtypen unterteilt: epitheliale, mesenchymale oder gemischte Hepatoblastome. Die epithelialen Zellen können wiederum embryonalen oder fetalen Ursprungs sein und der fetale Subtyp selbst kann in einen hellzelligen und dunkelzelligen Typ klassifiziert werden. Das fetale Hepatoblastom als eine Differenzierungsrichtung der epithelialen Hepatoblastome besteht aus schmalen Trabekeln von überwiegend kubischen Tumorzellen, die den Hepatozyten der fetalen Leber ähneln. Die Kerne sind klein, gering pleomorph und weisen ein feines Chromatin auf. Das Zytoplasma kann durch einen unterschiedlich hohen Gehalt an Lipid und Fett fein granulär oder hell sein. So können bei schwächerer Vergrößerung in fetalen Hepatoblastomen helle (hoher Gehalt an Glykogen oder Fett) und dunkle (geringer Gehalt an Glykogen oder Fett) Areale entstehen. (Ruck, 2009; Stocker und Schmidt, 2000).

Folgende Symptome können zur Verdachtsdiagnose eines Hepatoblastoms führen: tastbarer Tumor im rechten Oberbauch, Fieber, Störung im Ess- und Trinkverhalten, Pubertas praecox (verfrühtes Einsetzen der Pubertät), Thrombozytose und andere. Die Diagnose muss anhand laborchemischer Parameter und bildgebender Verfahren gesichert werden. Zu ersteren gehören das Alpha-Fetoprotein (AFP, physiologisch in der Schwangerschaft und beim Säugling erhöht) und das Beta-humane Choriongonadotropin (β -HCG, physiologisch während der Schwangerschaft gebildet). Diese beiden Proteine sind bei anfänglicher Erhöhung auch als Verlaufsp Parameter einsetzbar. Zur visuellen Darstellung des Tumors werden Sonographie und Computertomographie (CT) bzw. Magnet-Resonanztomographie (MRT) verwendet. Röntgen oder CT des Thorax dient zur Überprüfung unter Umständen bereits vorhandener Metastasen.

Je nach Histologie und Stadium wird vor der eigentlichen Operation eine Chemotherapie angesetzt – eine so genannte neoadjuvante Chemotherapie. Zu den verwendeten Chemotherapeutika zählen Cisplatin, Adriamycin und Ifosfamid. Je nach verwendetem Protokoll und Stadium des Hepatoblastoms können aber auch noch Carboplatin, Etoposid (VP 16), 5-Fluorouracil und Vincristin zum Einsatz kommen. Von Schweinitz et al. (1997) konnten in einer Studie nachweisen, dass epitheliale Hepatoblastome vom embryonalen Subtyp eine im Vergleich zu den Tumoren des fetalen Subtyps vermehrte Chemoresistenz aufweisen. Die Art der Operation richtet sich nach Ausdehnung des Tumors und Befall angrenzender Nachbarstrukturen. Ziel ist es aber immer, den Tumor *in toto* zu resezieren. Üblicherweise schließen sich nach der Operation Chemotherapie-Zyklen an. Als *ultima ratio* ist eine Lebertransplantation in Betracht zu ziehen.

Die Prognose ist unter anderem von der Größe des Tumors, Metastasen und Infiltration in Nachbarstrukturen (vor allem Gefäße) abhängig. Die ereignisfreie 5-Jahresüberlebensrate betrug in einer prospektiven Studie im Stadium 1 und 2 noch 96 bis 100 %, wohingegen im Stadium 4 nur noch ca. 36 % der Patienten 5 Jahre überlebten (Fuchs et al., 2002). Zur Früherkennung eines möglichen Rezidivs bzw. von Langzeitfolgen der Chemotherapie ist eine regelmäßige Tumornachsorge mit Bildgebung und Laborwertkontrollen unerlässlich. (AWMF (Arbeitsgemeinschaften der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften) online - www.awmf-leitlinien.de, Hepatoblastom, 05/2008)

1.6.2. Nephroblastom (Wilms-Tumor)

Mit einer Inzidenz von 1 auf 100.000 Kindern ist das Nephroblastom (nach seinem Entdecker, dem Chirurgen Dr. Max Wilms auch als Wilms-Tumor bezeichnet) der häufigste Nierentumor im Kindes- und Jugendalter. Diese Tumorerkrankung betrifft vor allem Kinder im Alter zwischen 1 und 4 Jahren, hierunter mehr Mädchen als Jungen. Zudem erkranken mehr Kinder in Europa

und den USA als in Asien. Das Nephroblastom kommt gehäuft mit anderen Fehlbildungen vor (urogenitale Fehlbildungen, Hemihypertrophie (Halbseitenriesenwuchs), Aniridie (teilweises oder vollständiges Fehlen der Iris) u.a.). Es gehört zu den Tumoren embryonalen Ursprungs und kann histologisch in drei Subtypen mit niedriger, intermediärer und hoher Malignität differenziert werden.

Anhand von Größe und Ausbreitung des Tumors, ein- oder zweiseitigem Befall der Niere und Vorhandensein von Metastasen erfolgen weitere Stadieneinteilungen. Symptome des Nephroblastoms sind schmerzlose Schwellung im Oberbauch, Schmerzen, Hämaturie, Hypertonus u.a.. 10 % der Kinder mit dieser Erkrankung sind bei Diagnosestellung symptomlos. Ein weiterer Hinweis kann durch bestehende Fehlbildungen, die bekanntermaßen mit Nephroblastomen einhergehen, gegeben werden. Zur Diagnosesicherung stehen keine spezifischen Tumormarker zur Verfügung. Der Tumor wird mittels Sonographie, MRT oder in Ausnahmefällen CT dargestellt.

Therapie der Wahl ist die Tumornephrektomie, die komplette Entnahme der betroffenen Niere. Zusätzlich kommen Chemotherapie (prä- und/ oder postoperativ; Actinomycin-D, Vincristin, Adriamycin, Carboplatin, VP16 und Ifosfamid) und Radiotherapie (je nach Histologie und lokalem Stadium des Tumors zum Zeitpunkt der Operation) zum Einsatz.

Erkrankungsstadium und Histologie des Tumors bestimmen die Prognose. Im Allgemeinen ist sie aber gut (90 % werden auf lange Sicht geheilt, ohne Berücksichtigung der Prognosefaktoren). Vor allem in den ersten zwei Jahren nach Beendigung der Therapie ist auf eine engmaschige Kontrolle zu achten, da dies der Zeitraum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs ist. (AWMF online, Nephroblastom, 01/2008)

1.6.3. Neuroblastome

Genau wie das Nephroblastom gehört das Neuroblastom zu den Tumoren embryonalen Ursprungs. Es ist eine Erkrankung des sympathischen Nervensystems und mit einer Inzidenz von 1/100.000 Kinder pro Jahr der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter. Auftreten kann das Neuroblastome überall dort, wo sich sympathisches Gewebe befindet (Nebennieren, zervikaler, thorakaler und abdomineller Grenzstrang, Paraganglien). Es manifestiert sich zu 40 % im 1. Lebensjahr.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist bereits die Hälfte aller Neuroblastome metastasiert (vor allem in Lymphknoten, Knochenmark, Knochen, Leber oder Haut). Die Symptome variieren ja nach Lokalisation des Tumors bzw. seiner Metastasen, und können von Luftnot bis hin zu Querschnitts-Symptomatik reichen. Katecholamin-Metabolite (Homovanillin-/ Vanillinmandelsäure) und neuronspezifische Enolase (NSE) im Blut-Serum und Urin werden zur Diagnosefindung herangezogen. Knochenmarkspunktionen sind obligat. Außerdem werden Sonographie und MRT zur Darstellung des Tumors verwendet.

Die Therapie des Neuroblastoms reicht von beobachtendem Abwarten bis hin zur Maximaltherapie mit Chemotherapie, Operation, Radiotherapie und ggf. konsolidierender Therapie (mit Retinsäure). Säuglinge mit lokalem Stadium oder Stadium 4S (lokalisierter Primärtumor, Fernmetastasen limitiert auf Leber, Haut und/oder Knochenmark, wobei der Knochenmarksbefall minimal sein sollte) benötigen z.T. keine oder nur eine milde Therapie, da sich der Tumor in diesen Stadien spontan selbst zurückbilden kann.

Zu den prognostischen Faktoren gehört das Erkrankungs-Stadium, sowie molekulargenetische Faktoren (u.a. MYCN (*myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*; Onkogen) und Veränderungen an

Chromosom 1p). Die Gesamt-5-Jahresüberlebensrate für alle Stadien beträgt 65 %. (AWMF online, Neuroblastom, 05/2008)

1.6.4. Weichteilsarkome

Zu den Weichteilsarkomen gehört eine Gruppe verschiedenster Tumore, die, wie der Name wiedergibt, vor allem in den Weichteilen entstehen und ihren Ursprung meist im Mesenchym haben. Diese Gruppe der 4. häufigsten soliden Tumoren im Kindesalter hat ein bevorzugtes Auftreten von 3:2 beim männlichen Geschlecht. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel Rhabdomyosarkome (RMS, 61 % aller Weichteilsarkome), extraossäre Ewing-Sarkome (EES) und periphere neuroektodermale Tumore (PNET, 8 %). RMS befinden sich überwiegend in Kopf-/Hals- und Urogenital-Bereich. Die RMS können anhand ihrer Zellen nochmals in embryonale (gute Prognose) und alveoläre (schlechte Prognose) Subtypen unterteilt werden.

Ähnlich wie bei den Neuroblastomen hängen die Symptome der Erkrankten von Ursprungort und Ausdehnung des Tumors ab. Die Bandbreite reicht von schmerzlosen Schwellungen bis zum Ausfall von Hirnnerven. Bei Verdacht auf ein Weichteilsarkom ist die Bildgebung (z.B. mit MRT) unerlässlich. Ebenso ist die Durchführung einer Biopsie immer erforderlich. Die vollständige Diagnostik bedarf noch der Molekulargenetik.

Zur Therapie der Weichteilsarkome stehen Chemotherapie und lokale Verfahren wie Operation und Bestrahlung zur Verfügung. Was und wann was zum Einsatz kommt, bestimmen Tumorgöße, Tumorausdehnung, histologische Differenzierung, Lokalisation und Alter des Patienten. Für primär lokalisierte RMS konnte so eine 5-Jahres-Überlebensrate von 70 % und für EES/PNET von ca. 50 % erzielt werden. (AWMF online, Weichteilsarkome, 05/2008)

2. Fragestellung

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte für Mäuselebertumoren gezeigt werden, dass Mutationen im β -Catenin-Gen zu einer verstärkten GS-Expression (Loeppen et al., 2002) und auch zu einer erhöhten Expression verschiedener CYP-Isoformen führen (Loeppen et al., 2005). Das GS-Gen und Gene von CYP-Isoformen wurden damit als Zielgene des Wnt-Signalwegs identifiziert, die von dem Protein β -Catenin moduliert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob bei soliden Tumoren des Kindesalters eine mit einer *CTNNB1*-Mutation einhergehende veränderte Expression von GS und CYP zu beobachten ist. An Hepatoblastomen, Wilms-Tumoren, Neuroblastomen, Rhabdomyosarkomen und anderen Weichteilsarkomen sollte zuerst überprüft werden, ob Mutationen im *CTNNB1*-Gen vorliegen.

Bei Vorhandensein einer *CTNNB1*-Mutation sollte an immunhistochemischen Schnitten überprüft werden, ob eine verstärkte GS- und CYP-Expression vorliegt und zudem die Frage geklärt werden, ob die GS- und CYP-Expression eine spezifische Gewebeverteilung aufweist.

Untersuchungen an Homogenaten mit Western-Blot und Light Cycler sollten abklären, ob die immunhistochemisch gefundenen Ergebnisse sich bei diesen Nachweismethoden ebenfalls zeigen.

3. Geräte

3.1. Großgeräte

Abzug	Weseman	
Autoklav	Webeco	Autoklav C
Cleansphere	Safetech Limited	CA-100
Föhn	Moulinex	
Gefrierschrank	Liebherr	
Heizschrank	Techne (Labtech int.)	Hybridiser HB-1D
Kamera	CSC Kamera	TI 1
	CF 20 DXC	Kappa
Kühlschrank	CommerÇon	
LightCycler	Roche	Light Cycler
Lichtmikroskope	Leitz	Labovert FS
	Leitz	Metallux 3
Magnet-Rührer	RCT	IKA-Combimac
Kugelmühle	Braun	Mikrodis- membrator II
Microtom	Frigocut 2800 E	Reichert Jung
Mikrodissektionsgerät	Arcturus	Laser Capture Mikro- dissektion System
Mikrowelle	Bosch	Bosch 600 W
PCR-Gerät	Biometra	Uno Thermoblock
	Perkin Elmer	GeneAmp PCR System
pH-Meter	Beckmann	Φ 200 pH-Meter
	Fischerbrand	Hydrus 300
Photometer	Shimadzu	UV-160 A
Plattenreader, Victor	Perkin Elmer	Victor 3V
Spannungsgeber	Biotech Fischer	Phero Stab 500
	Consort	E 143
	Pharmacia	LBK EPS 500/40

Spectrophotometer	Peqlab	Nanodrop®, ND-1000
Thermoblock	Biotherm	BT-11
Trockenschrank	Kendro/Heraeus	
Ultraschall-Gerät	Braun	Labsonic 2000
Vortexer	Bender & Hobein AG	Vortex Genie 2™ und L
Wärmeschrank	Heraeus	
Waagen	Sartorius	Analytic
	Methler	Laborwaage P 1200
	Bosch	PE 632
Wasseraufbereitung	Milipore	Mili Q Plus
Wasserbad	GFL	
Zellkulturbank	BDK	Sterilbank CVF6.12S
Zentrifugen	Beckmann	J2-21 Centrifuge
	Eppendorf	Centrifuge 5417 R
	Eppendorf	Centrifuge 5417
	Eppendorf	Centrifuge 5804
	Heraeus Sepatech	Biofuge 13
	Heraeus Sepatech	Biofuge Fresco
	Heraeus Sepatech	Megafuge 1.0 R
	Heraeus Sepatech	Minifuge RF und T

3.2. Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

3.2.1. Allgemein

15 ml Röhrchen (RNA)	Greiner	
15 ml Röhrchen	Becton Dickison	Falcon # 2096
50 ml Röhrchen	Becton Dickison	Falcon # 2070
50 ml Standfuß-Röhrchen	Greiner	Typ 210.261
Einmalküvette	Sarstedt	
Gelelektrophoresekammer	EMBL	

Glasgeräte	Schott	
Glaspasteurpipetten	WCU	
Handschuhe	Ansell	DermaClean®
Kolbenhubpipetten und Spitzen	Eppendorf, Gilson, Biozym	
LightCycler Centrifuge Adapters	Roche	
LightCycler Kapillaren mit Deckel	Roche	
Mikrotiterplatten, 96-well	NUNC Denmark	
Plastikpasteurpipetten	Brand	
Reaktionsgefäße (0,5/1,5 ml)	Eppendorf, Biozym	
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Peqlab	
Stahlkugel	Braun	
Teflongefäß	Braun	
Quarzglas Präzisionsküvette	Helma	# 105.202 QS
Wattestäbchen, steril	MSP Schmeiser GmbH	

3.2.2. Immunfärbung

Deckgläschen 24 x 32 mm	R. Langenbrinck
Färbekasten mit Färbegestell	Zentrallager
Feuchtkammer	Multimed
Fettstift	DAKO-Pen
Objektträger mit Mattrand	R. Langenbrinck

3.2.3. Mikrodissektion

Folie	American National Can™	Parafiilm®
Gefäße	Arcturus	Capsure™ LCM Caps

3.2.4. Software

Camera Controler V.1.1	CSC
Chromas	Technelysium Pty Ltd.

Image Base V.2.2	Kappa opto-electronic GmbH
LightCycler Software V.3.5	Roche
Office 2000	Microsoft
Photoshop 5.0	Adobe
TINA 2.09	raytest GmbH
Victor Workout 1.5	Perkin Elmer

4. Materialien

4.1. Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth
Agarose	Life-Technologies
Aminoethylcarbazol	Sigma
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi
Borsäure	Merck
BSA	Serva, Fermentas
CDP Star ready to use	Tropix
Chloroform	Merck
Complete Tablette	Roche
Eis	Scotsman, AF-20
Entellan	Merck
Eosin Y	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Farbreagenz, Bradford	Bio Rad
Hämatoxilin	Merck
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaisers Glyceringelantine	Merck
Kalialaun	Merck

Tabelle 3: DNA- und Protein-Marker

Marker	
pBR322 DNA-MspI Digest	New England BioLabs
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	MBI-Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI-Fermentas

Mayers Hämalaun	Merck
-----------------	-------

Methanol	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin TEMED	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Merck
Natriumacetat	Merck
Paraformaldehyd	Sigma

Tabelle 4: Reagenzien für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

PCR-Reagenzien

10x PCR Puffer + Magnesiumchlorid [15 mM]	MBI-Fermentas
dNTP-Mix [2 mM]	MBI-Fermentas
TAQ-Polymerase, native, 5 U/μl	MBI-Fermentas
BSA	MBI-Fermentas
Primer: <i>CTNNB-1</i>	s. 4.6.1

Tabelle 5: Reagenzien für die LightCycler-PCR

PCR-Reagenzien LightCycler

LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green (10x)	Roche
LightCycler FastStart Enzyme	Roche
Magnesiumchlorid Stammlösung [25 mM]	Roche
Wasser PCR grade	Roche
Primer	s. 4.6.2

Phenol	Roth
Proteinase K	Roche

Tabelle 6: Reagenzien für die Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Reverse Transkriptase Reagenzien

AMV Reverse Transkriptase 10 U/μl	Promega
Random (N) ₆ [500 ng/μl]	Roche
Oligo d(T) ₁₅₋₁₈	Roche
dNTP-Mix [10 mM]	MBI-Fermentas
Magnesiumchlorid [25 mM]	Roche
10x RT-Puffer II ohne MgCl ₂	Roche
Schweinenormalserum	Dako
SDS-Lösung 20 %	Roth
Stickstoff, flüssig	UKT
Stripping-Solution-Strong	Chemikon
Temed	Roth, Biorad
TRIzol Reagenz Ultra Pure	GibcoBRL
Wasser DNase-frei	Ampuwa
Wasser für Infusionszwecke	Glaxo Smith Kline
Wasserstoffperoxid	Sigma
Xylol	Fluka, VWR

4.2. Lösungen und Puffer

4.2.1. Immun- und enzymhistochemische Gewebefärbung

4.2.1.1. HE Färbung

0,4 % Eosin-Lösung (alkoholisch)	0,8 g	Eosin G
	200 ml	Ethanol 60 %
<i>lösen, vor Gebrauch filtrieren</i>		

Mayers Hämalaun-Lösung	1 g	Hämatoxilin
	1,2 g	Natriumiodat
	50 g	Aluminium-Kalium-Sulfat
		<i>bei Raumtemperatur unter Rühren vollständig lösen</i>
	50 g	Chloralhydrat
	1 g	Zitronensäure
	ad 1 l	H ₂ O bidest. <i>vor Gebrauch filtrieren</i>

4.2.1.2. Immunhistochemische Färbung

Acetatpuffer pH 5,2	6,48 g	Natriumacetat
	790 ml	H ₂ O bidest. <i>vollständig lösen</i>
	1,21 ml	Eisessig
	ad 1 l	H ₂ O bidest.

Färbelösung	4 mg	Aminoethylcarbazol (AEC)
	1 ml	N,N'-Dimethylformamid
	14 ml	Acetatpuffer
	15 µl	H ₂ O ₂

Methanol/H ₂ O ₂ -Lösung	200 ml	Methanol
	667 µl	H ₂ O ₂

Paraformaldehydlösung 3 %	6 g	Paraformaldehyd
	200 ml	PBS pH 7,4; heiß

PBS pH 7,4	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	8 g	NaCl
	1,435 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	ad 1 l	H ₂ O bidest.

PBS/S	100 ml	PBS pH 7,4
	1 g	BSA
	2,03 g	NaCl

4.2.2. DNA-Amplifizierung

Acrylamid-Lösung 4 %	26,6 ml	Rotiphorese Gel 30
	50 ml	Tris-HCl pH 6,8 [500 mM]
	1 ml	SDS 20 %
	ad 200 ml	H ₂ O bidest.

APS 10 %	1 g	Ammoniumpersulfat
	10 ml	H ₂ O bidest.

Materialien

EDTA 0,5 M, pH 8,0	186,1 g	Ethylendinitrilotetra- essigsäure Di-Na-Salz
	800 ml	H ₂ O bidest.
	20 g	NaOH-Pellets <i>mit konz. NaOH auf pH 8,0 einstellen</i>
	ad 1 l	H ₂ O bidest.
Elektrophorese-Laufpuffer	1 x	TBE <i>kann bis zu 3x wieder verwendet werden</i>
Ethidiumbromid-Lösung	0,5 mg	Ethidiumbromid
	1 l	H ₂ O bidest.
Ladepuffer -	25 mg	Xylene-Cyanol
	1,5 g	Ficoll Typ 405
	1 ml	EDTA 0,5 M, pH 8,0
	ad 10 ml	H ₂ O bidest.
Ladepuffer +	25 mg	Bromphenol Blau
	25 mg	Xylene-Cyanol
	1,5 g	Ficoll Typ 405
	1 ml	EDTA 0,5 M, pH 8,0
	ad 10 ml	H ₂ O bidest.
pBR 322 DNA-Marker [0,2 µg/µl]	10 µl	pBR 322 DNA-MspI Digest 1 µg/µl
	30 µl	H ₂ O bidest.
	10 µl	Ladepuffer +

TBE-Puffer (5x)	56 g	Borsäure
	109 g	Trizma Base
	50 ml	EDTA 0,5 M, pH 8,0
	800 ml	H ₂ O bidest.
		<i>lösen mit konz. HCl auf pH 8,3 einstellen</i>
	ad 2 l	H ₂ O bidest.

4.2.3. DNA-Isolierung und –Aufreinigung

Chloroform/Isoamylalkohol (25:1)	24 ml	Chloroform
	1 ml	Isoamylalkohol

NaOAc-Lösung	10 ml	NaOAc 3 M, pH 7,5
	2,5 ml	SDS 20 %
	1 ml	EDTA 0,5 M, pH 8,0
	ad 100 ml	H ₂ O bidest.
		<i>Wasser vorlegen sonst fällt SDS aus</i>

QIAquick PCR Purifikation Kit		Firma Quiagen (Artikel-Nr.: 28106)
-------------------------------	--	---------------------------------------

4.2.4. Proteinisolierung

WCE-Puffer, pH 7,5	1,3 g	Hepes Na Salz, 50 mM
	0,88 g	NaCl, 150 mM
	10 ml	Glycerol, 100 %
	1 ml	Triton X-100, 1 %
	30 mg	MgCl ₂ x 6H ₂ O ,1,5 mM
	38 mg	EGTA, 1 mM
	420 mg	NaF, 100 mM
	450 mg	Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O, 10 mM (Natriumpyrophosphat)
	400 µl	Na ₃ VO ₄ , 50 mM (Natriumvanadat-Lösung) <i>lösen in H₂O bidest.;</i> <i>mit konz. HCl auf pH 7,5</i> <i>einstellen</i>
	ad 100 ml	H ₂ O bidest.
Vor Gebrauch:	1 Tabl./10ml	Complete Protease- Inhibitor

4.2.5. RNA-Isolierung und –Aufreinigung

TAE-Puffer 1x	4,84 g	Trizma Base
	2 ml	EDTA [500 mM] <i>mit Eisessig auf pH 8,5</i>
	ad 1 l	H ₂ O bidest.

Ladepuffer 6x (Agarosegel)	50 g	Saccharose
	1 g	SDS
	0,5 g	Orange G-Farbstoff
	ad 100 ml	H ₂ O bidest.

4.2.6. Western-Blot

Assay Puffer pH 9,5,	2,42 g	Trizma Base
	20 ml	H ₂ O bidest.
		<i>mit konz. HCl auf pH 9,5 einstellen</i>
	0,2 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	ad 100 ml	H ₂ O bidest.

Acrylamid-Lösung (10 %)	66 ml	Acrylamid 30 %
	50 ml	TrisHCl pH 8,9
	1 ml	SDS 20 %
	ad 200 ml	H ₂ O bidest.

Acrylamid-Lösung (4 %)	26,6 ml	Acrylamid 30 %
	50 ml	TrisHCl pH 6,8
	1 ml	SDS 20 %
	ad 200 ml	H ₂ O bidest.

I-Block	0,5 ml	Tween 20
	6,65 g	I-Block
	0,2 g	Na
	ad 1 l	PBS
		<i>auf 60 °C im Wasserbad erwärmen</i>

Materialien

Lämmli-Puffer (2x)	1,51 g	Trizma Base
	20 ml	Glycerin 20 %
	25 ml	H ₂ O bidest.
		<i>mit konz. HCl auf pH 6,8 einstellen</i>
	4 g	SDS 4 %
	10 ml	2-Mercaptoethanol 10 %
	4 mg	Bromphenolblau
	ad 100 ml	H ₂ O bidest.
<hr/>		
Laufpuffer, SDS-Page	3 g	Trizma Base
	14,4 g	Glycin
	1 g	SDS
	ad 1 l	H ₂ O bidest.
<hr/>		
PBS/T	1 l	PBS 10x
	0,5 ml	Tween 20
<hr/>		
Transferpuffer	3 g	Trizma Base
	14,4 g	Glycin
	200 ml	Methanol
	ad 1 l	H ₂ O bidest.
<hr/>		
Tris HCl, pH 8,9 [1,5 M]	181,71 g	Trizma Base
		<i>lösen in H₂O bidest.; mit konz. HCl pH 8,9 einstellen</i>
	ad 1 l	H ₂ O bidest.

4.3. Größenmarker

pBR322

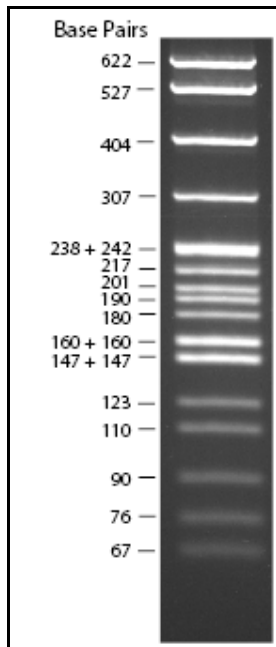


Abbildung 7:
DNA-Marker pBR322
DNA-MspI Digest

100 bp Plus

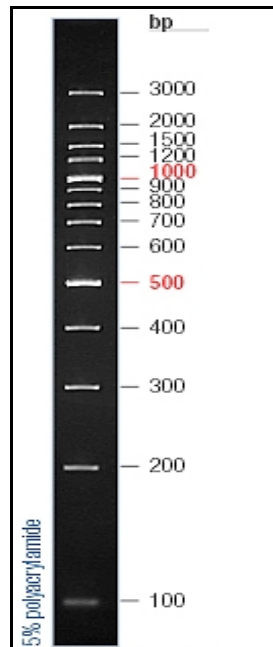


Abbildung 8:
DNA-Marker 100bp
Plus

Protein-Marker

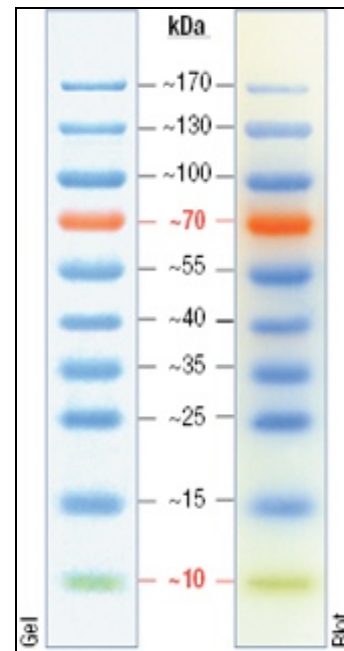


Abbildung 9:
Protein-Marker
Prestained Protein Ladder

4.4. Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Hersteller
Anti-Cytochrom P450	Erstantikörper gegen Cytochrom P450 1A2 aus Kaninchen	Dr. Wolf
Anti-Cytochrom P450	Erstantikörper gegen Cytochrom P450 2B1 aus Kaninchen	Dr. Wolf
Anti-Cytochrom P450	Erstantikörper gegen Cytochrom P450 2C6 aus Kaninchen	Dr. Wolf
Anti-Cytochrom P450	Erstantikörper gegen Cytochrom P450 2D6 aus Kaninchen	Chemicon
Anti-Cytochrom P450	Erstantikörper gegen Cytochrom P450 2E1 aus Kaninchen	Stressgen
Anti-Cytochrom P450	Erstantikörper gegen Cytochrom P450 3A4 aus Kaninchen	Chemicon
Anti-GAPDH	Erstantikörper gegen GAPDH aus Maus	Chemicon
Anti-Glutamin-synthetase	Erstantikörper gegen GS aus Kaninchen	Sigma
β -Catenin	Erstantikörper gegen β -Catenin aus Maus	BD Transduction Laboratories
Anti-Kaninchen	Zweitantikörper HRP-konjugiert aus Schwein	Dako
	Zweitantikörper AP-konjugiert	Applied Biosys.
Anti-Maus	Zweitantikörper AP-konjugiert	Applied Biosys.
	Zweitantikörper HRP-konjugiert aus Ziege	Sigma

4.5. Humane Tumorproben

Tabelle 8:
Humane Tumorproben

Tumorspezifität	Anzahl
Hepatoblastom	10
Nephroblastom	12
Neuroblastom	35
Rhabdomyosarkom	16
Weichteilsarkom	12
	<hr/> Σ 85

Die humanen Tumorproben wurden alle in der Abteilung Kinderchirurgie der Universitätskinderklinik Tübingen (PD Dr. Warmann, Prof. Fuchs) intraoperativ gewonnen und gleich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Verwendung bei den verschiedenen Untersuchungen wurden sie bei -80 °C aufbewahrt. Alle Untersuchungen fanden unter Zustimmung der Ethikkommission statt.

Die Kontroll-/Referenzgewebe zu den einzelnen Tumorproben entstammen aus Bereichen von normalem Gewebe der jeweiligen resezierten Organanteile. So wird z.B. bei Befall der rechten Seite der Leber mit einem Hepatoblastom eine komplette Hemihepatektomie rechts durchgeführt.

Die histologische Differenzierung der Hepatoblastome wurde von Herrn Prof. Ruck, Pathologie Leonberg, vorgenommen.

Tabelle 9: Histologie der Nephroblastome, Alter und Geschlecht der Patienten zum Zeitpunkt der OP

Tumor	Histologie	Alter bei OP [Mon.]/ Geschlecht
Wt3	Stromareiches Nephroblastom von intermediäre Malignität	136/ m
Wt4	Gemischtes Nephroblastom, intermediäre Malignität	21/ w
Wt5	Stromareich, fetal-rhabdomyomatös	13/ m
Wt7	Epitheliales Nephroblastom	110/ m
Wt8	Nephroblastom Mischtyp (Stadium I)	83/ m
Wt9	Nephroblastom Mischtyp (Stadium I)	20/ m
Wt10	Stromareich, fetal-rhabdomyomatös, teils zystisch, intermediäre Malignität	40/ m
Wt11	Regressiv verändertes Nephrobl. (Stadium I)	52/ w
Wt12	Nephroblastom vom regressiven Typ	48/ w
Wt14	Triphasisches Nephroblastom, v.a. epithelial	23/ w
Wt15	Intermediäres Risiko Nephroblastom (Stadium II)	83/ m
Wt16	Triphasisches Nephroblastom, keine Anaplasie, Stromakomponente (Stadium II)	5/ m

In den Tabellen 9 und 10 sind die untersuchten Wilms-Tumoren bzw. Hepatoblastome aufgelistet. Aufgrund der Nachvollziehbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit dem Labormanual wurde die ursprüngliche Nummerierung beibehalten und auf eine durchgängige Nummerierung verzichtet.

Tabelle 10: Histologie der Hepatoblastome (HB) und klinische Daten der HB-Patienten (– nicht bekannt, ? Befund fraglich, AFP Alpha-Fetoprotein)

Tumor	Histologie	Alter bei OP [Mon.]/Geschl.	Chemo	AFP [prä-/ post-Chemo]	Outcome
Hb1	Epithelial, überw. Fetal	20/ m	ja	321.810/ 11.091 [kU/l]	in Remission, beschwerdefrei
Hb2	Epithelial-embryonal	5/ m	–	–	–
Hb3	Epithelial, überw. Fetal	8/ w	ja	225.703/ 26.160 [kU/l]	in Remission, beschwerdefrei
Hb4	Epithelial, überw. embryonal	61/ m	–	–	gestorben
Hb5	Gemischt, überw. Epithelial-embryonal	32/ m	ja	154/ 259 [IU/ml]	–
Hb6	Epithelial-embryonal	18/ w	ja	357.000/ 91.275 [kU/l]	Remission?
Hb7	Epithelial, teils embryonal, teils fetal	24/ m	ja	4.781/ 1.560 [µg/l]	in Remission
Hb9	Epithelial, fetaler Subtyp	8/ m	ja	-/ 22.780 [kU/l]	Remission?
Hb10	Gemischt, epithelial/ mesenchymal	33/ m	ja	-/ 400.000 [µg/l]	Remission?
Hb12	Epithelial, überw. embryonal	4/ w	ja	1.457.407/ - [µg/l]	in Remission

4.6. Primer

4.6.1. PCR-Primer

Tabelle 11: PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Hersteller
A2_Hu	ACGCACTGCCATTTTAGCTCCT	Metabion
B2_Hu	AGAACGCATGATAGCGTGTCTG	Metabion
C2	TCTCAGGGAACATGGCAGCTC	Metabion
Hu1	AGCTGATTTGATGGAGTTGGA	Metabion
Hu2	ACCAGCTACTTGTTCTTGAGT	Metabion
P1A	GCGTGGACAATGGCTACTCAAG	Metabion

4.6.2. LightCycler-Primer

Tabelle 12: LightCycler-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Tm [°C]	Hersteller
18S RNA forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA	60,7	Premier
18S RNA reverse	GCTGGAATTACCGCCGCT	60,9	Biosoft
hGS forward	CGTCGCCTACTCTGTGAACT	55,2	Premier
hGS reverse	ACACCTGCTTGATGCCTTTA	55,8	Biosoft
CYP 1A1 forward	GTCTTTCTCTTCCTGGCTATC	54,4	Premier
CYP 1A1 reverse	TACCTGTTGTCTCTGGAGGGT	57,7	Biosoft

4.7. Referenzsequenz

Homo sapiens CTNNB-1, NM_001904, Exon 3: Position 282-509

5. Methoden

5.1. Immunhistochemie

5.1.1. Anfertigung der histologischen Schnitte

5.1.1.1. Gewinnung und Aufteilung der Tumorproben

Die hier verwendeten Tumorproben wurden alle in der Abteilung Kinderchirurgie der Universitätskinderklinik Tübingen (PD Dr. Warmann, Prof. Fuchs) intraoperativ gewonnen. Von dem resezierten Tumor wurde sofort eine kleine Menge abgeschnitten, in ein 2 ml Plastikgefäß überführt und dann in flüssigen Stickstoff getaucht. Die so schockgefrorenen Tumorproben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die ca. 2 ml Tumorproben sind so zu groß und vor allem zu kostbar, um sie so weiter zu analysieren. Deshalb wurde die Tumorprobe nochmals aufgeteilt. Dazu wurde die -80°C kalte Probe samt Plastikgefäß in Alufolie eingewickelt und vorsichtig mit einem Hammer zerbrochen. Die so gewonnenen kleineren Tumorstücke können bei Bedarf in einem durch flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser manuell noch weiter zerkleinert werden. Die Proben wurden anschließend sofort in einem neuen Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, um letztendlich wieder bei -80°C tiefgefroren zu werden.

5.1.1.2. Silanisierung von Objektträgern

Um eine optimale Haftung sowohl der Gefrier- als auch der Paraffinschnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden die Objektträger vor Aufzug der Gewebeprobe durch Silanisierung adhäsiver gemacht. Beim Silanisieren werden die Objektträger für 5 Minuten in eine Beschichtungslösung gestellt, anschließend zweimal kurz in Aceton geschwenkt und dann getrocknet.

5.1.1.3. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Arbeitsfläche des Gefrier-Mikrotoms ist auf -20 °C gekühlt, um ein vollständiges Auftauen der zu schneidenden Proben zu verhindern. Die bei -80 °C gelagerten Tumorproben tauen dann nur so weit auf, dass sie leichter geschnitten werden können. Das vor dem Schneiden zerkleinerte Probenstück wurde mittels OCT Tissue-Tek auf eine Haltevorrichtung gefroren und in die Schneideapparatur eingespannt. Die zuvor manuell flach angeschnittene Oberfläche konnte anschließend mit dem Automatikmodus in bis zu 5 µm Dicke Scheiben geschnitten werden. Die Schnitte wurden dann auf die silanisierten Objektträger gezogen und eine Stunde bei 37 – 45°C im Brutschrank getrocknet.

5.1.2. Färben der histologischen Schnitte

5.1.2.1. Ethanolische HE-Färbung

Morphologische Auffälligkeiten lassen sich am besten in der Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) darstellen und beurteilen.

Zur Färbung der Gefrierschnitte wurden diese für 5 Minuten in Mayers Hämalaun gestellt. Anschließend wurden sie 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser „gebläut“. Unter „Bläuen“ versteht man die Erhöhung des pH-Wertes, die durch Behandlung mit Leitungswasser erreicht wird. Hierdurch kommt es zu einem Farbumschlag in einen blauvioletten Ton. Bevor die Schnitte anschließend 3 Minuten in Eosin gefärbt wurden, wurden sie kurz – für 30 Sekunden – in 50 %iges Ethanol getaucht. Zur Differenzierung der Eosin-Färbung folgte eine kurze Behandlung mit 80 %igem Ethanol. Für 30 Sekunden wurde der Gefrierschnitt dann in 96 %igem Ethanol und für 1 Minute in 100 %igem Ethanol gewaschen. Es schlossen sich zur weiteren Entwässerung eine zweimalige Phase von je 5 Minuten in Xylol an. Die jetzt fertig gefärbten Schnitte wurden mit Entellan eingedeckelt.

5.1.2.2. GS-Färbung

Um die Gefrierschnitte wurde mit einem Fettstift ein Kreis gezogen, um ein Ablaufen der (Antikörper-) Lösungen von den Objektträgern zu verhindern. 5 Minuten wurden die Schnitte in 4 °C kalter 3 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach dem anschließenden Waschen – wieder für 5 Minuten, erfolgte durch eine aufsteigende Methanolreihe (50, 70, 90 %) für je 1 Minute die Entwässerung. Da eventuell vorhandene Peroxidasen durch Reaktion mit dem 2. Antikörper, der selbst an eine Peroxidase gebunden ist, in den Schnitten beim Färben eine unspezifische Reaktion hervorrufen würden, wurden diese durch 15-minütiges Inkubieren der Schnitte in Methanol/H₂O₂ geblockt. Dann folgte eine absteigende Methanolreihe (90, 70, 50 %), auch wieder für jeweils 1 Minute. Die Schnitte wurden durch zweimalige Behandlung mit PBS - 5 Minuten - und einmalig mit PBS/S – 5 Minuten – gewaschen.

Das jetzt für 5 Minuten auf die Schnitte gegebene Schweinenormalserum (Verdünnung 1:30 in PBS/S) sollte unspezifische Bindungsstellen für den 1. Antikörper blockieren. Es folgte die Behandlung mit dem 1. Antikörper (Verdünnung 1:1000 in PBS/S), der spezifisch an die GS bindet. Abhängig von der Größe der Schnitte wurden zwischen 150 µl und 200 µl Schweinenormalserum bzw. Antikörper-Lösung direkt auf die einzelnen Schnitte pipettiert. Diese wurden zur Inkubation über Nacht im Kühlschrank auf nassem Whatman-Papier in einem eckigen Plastikgefäß aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS/S für 5 Minuten gewaschen. Dann nochmals mit Schweinenormalserum (1:30 verdünnt in PBS/S) 5 Minuten lang inkubiert. Der dann auf die Schnitte pipettierte 2. Antikörper (Verdünnung 1:20 in PBS/S; 150 - 200 µl) bindet spezifisch an den 1. Antikörper. Nach der Inkubationszeit von 1 Stunde wurden die Schnitte 5 Minuten in PBS und anschließend 5 Minuten in Acetatpuffer gewaschen. Je nach Schnittgröße wurden zum Ablauf der enzymatischen Färbereaktion für ca. 15 Minuten 150 µl

bis 200 µl Reaktionslösung (Amino-Ethylcarbazol/ H_2O_2) auf die Schnitte gegeben. Nach den je 5-minütigen Waschschrinen mit Acetatpuffer und PBS, und kurzem Schwenken in H_2O bidest., folgte die Gegenfärbung (Darstellung vor allem der Kerne) mit Hämalaun (siehe 5.1.2.1.). Die Schnitte wurden abschließend mit 45°C warmer Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

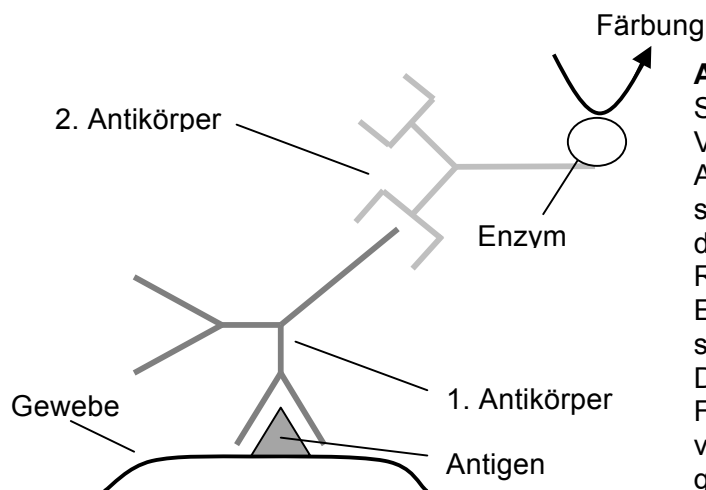


Abbildung 10:

Schematische Darstellung der Visualisierung der Antigene. Als erstes reagiert der protein-spezifische 1. Antikörper mit dem Antigen. In einer zweiten Reaktion bindet der mit einem Enzym gekoppelte 2. Antikörper spezifisch an den 1. Antikörper. Dieses Enzym katalysiert eine Farbreaktion und führt so zur visuellen Darstellung der gewünschten Struktur.

5.1.2.3. CYP-Färbung

Die Färbung der Gefrierschnitte zur Darstellung der Cytochrom P450 Enzyme folgte dem Protokoll der GS-Färbung (siehe 5.1.2.2.) mit dem Unterschied, dass der 1. Antikörper spezifisch für das jeweilige Cytochrom war.

5.2. Mutationsanalyse

5.2.1. DNA-Gewinnung und Amplifizierung aus Tumorgewebe

5.2.1.1. DNA-Isolierung aus den Tumorproben

(Denaturierte) Proteine und DNA lösen sich in verschiedenen Lösungen unterschiedlich gut. Diese Tatsache macht man sich bei der DNA-Isolierung zu Nutze. Durch Phenol und Chloroform denaturierte Proteine, befinden sich nach Mischen mit der Stammlösung und Phasentrennung zum größten Teil in der sogenannten Interphase. Die DNA befindet sich in der wässrigen, oberen

Phase. Chloroform hat zudem eine stabilisierende Wirkung auf die Grenze zwischen wässriger DNA-Lösung und Phenolphase. Um den Proteinanteil in der Lösung möglichst vollständig zu entfernen, ist es sinnvoll, so oft Phenol hinzu zu geben, bis keine Interphase mehr auftritt. Da sich Phenol z.T. auch in der wässrigen Phase befindet, muss dieses durch Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol entfernt werden. Wird ein Gemisch aus Phenol und Chloroform bei der DNA-Extraktion verwendet, kann die Menge an isolierter DNA erhöht werden. Isoamylalkohol, ein Methyl-Alkohol wirkt außerdem einem Schäumen der Lösung beim Mischen entgegen. Nachdem die Lösung von Proteinen gereinigt ist, muss die DNA gefällt und schließlich gereinigt werden. Bei Vorhandensein von monovalenten Kationen kommt es nach Zusatz von Ethanol zu einem unlöslichen Niederschlag der DNA. Durch Verwendung von Natriumacetat werden die notwendigen monovalenten Kationen zur Verfügung gestellt. Nach der Fällung der DNA wird durch anschließendes Waschen mit 70 %igem Ethanol noch vorhandenes Salz zum großen Teil entfernt, da sich die meisten Salze in 70 %igem Ethanol gut lösen.

In der praktischen Durchführung wurde vor der eigentlichen DNA-Isolierung das zu untersuchende Gewebestück zerkleinert. Hierzu wurden 0,5 ml NaOAc (Natriumacetat)-Puffer in ein in flüssigem Stickstoff gekühltes Teflongefäß vorgelegt, eine Stahlkugel und schließlich ein kleines Gewebestück hinzugefügt. Das Teflongefäß wurde dann in den Mikrodismembrator® eingespannt und das Gewebe durch die Stahlkugel fein zermörsert. Das so entstandene Pulver wurde in eine Lösung von 2,5 ml Phenol und 2 ml NaOAc-Puffer gegeben und für 5 Minuten manuell geschüttelt. Anschließend wurden 2,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:1) dazugegeben und wieder für 5 Minuten geschüttelt. Zur Beschleunigung der Phasen-Trennung wurde die Lösung bei 2.500 rpm (rounds per minute) 5 Minuten zentrifugiert. Die untere organische Phase kann abpipettiert und dann verworfen werden.

Es folgte ein zweiter Schritt mit Zugabe von 2,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol, Schütteln (5 Minuten) und Zentrifugation (5 Minuten, 2.500 rpm). Dieses Mal wurde die obere wässrige Phase, in der die DNA gelöst ist, in ein neues Röhrchen überführt, 2,5 ml reines Chloroform hinzugegeben, wieder für 5 Minuten gemischt und anschließend zentrifugiert (5 Minuten, 2.500 rpm). Die wässrige, obere Phase wurde jetzt in einem neuen Röhrchen mit 5 ml eiskaltem 100 %igem Ethanol versetzt und die DNA durch langsames Schwenken der Lösung ausgefällt. Die so entstandenen DNA-Fäden wurden mit einer gebogenen Glas-Pasteurpipette aufgewickelt und in 70 %igem Ethanol gereinigt. Nach kurzem Trocknen an Raumluft, wurde die DNA in TE (Tris/EDTA-Puffer) gelöst und anschließend quantitativ bestimmt.

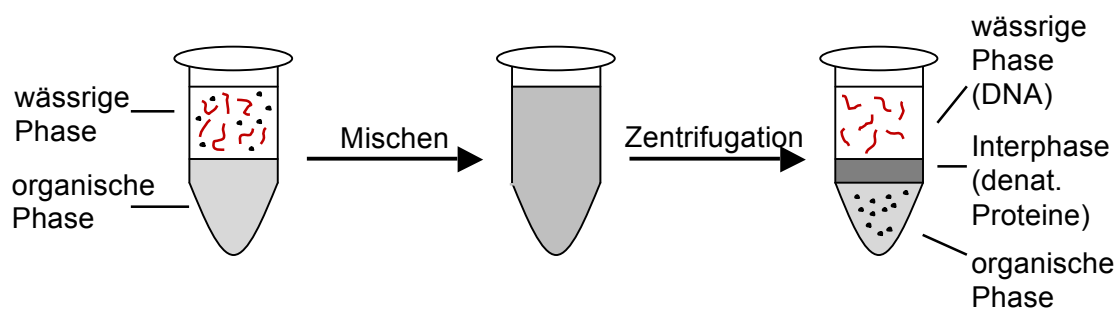


Abbildung 11: Phenolextraktion wässriger DNA-Lösungen.

Die proteinhaltigen Verunreinigungen werden durch Extraktion mit gepuffertem Phenol entfernt. Die untere organische Phase ist eine Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol. Nach der Phasentrennung befinden sich die denaturierten Proteine hauptsächlich in der so genannten Interphase. Ein geringer Teil wird auch in Phenol gelöst. Die DNA ist in der wässrigen Phase zu finden.

(modifiziert nach Lottspeich, Bioanalytik, 2. Auflage: 634, 2006).

5.2.1.2. DNA-Quantifizierung

Die Bestimmung der Menge an DNA in der isolierten Probe wurde nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Zum einen wurde die DNA Menge über das unterschiedliche Absorptionsverhalten von Proteinen und DNA bestimmt. Gemessen wird dies über die optische Dichte (OD) in einem Photometer. DNA enthält aromatische Basen, Proteine aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan). Diese absorbieren Licht bei unterschiedlicher

Wellenlänge maximal – die arom. Basen bei 260 nm, die arom. Aminosäuren bei 280 nm. Der Quotient aus diesen beiden Maxima lässt auf den Grad der Verunreinigung der isolierten DNA-Probe mit Proteinen schließen. Vor der Messung wurde die Probe verdünnt – die optische Dichte sollte zwischen 0,1 und 1,0 liegen, entsprechend einer DNA-Konzentration von 5 ng/µl bis maximal 500 ng/µl. Die Konzentration der DNA-Lösung erhält man nach Verrechnung des gemessenen OD-Wertes mit einem DNA-spezifischen Faktor.

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times V \times F \times 1000$$

Legende: c Konzentration, OD_{260} optische Dichte bei 260 nm, V Verdünnungsfaktor, F spezifischer Multiplikationskoeffizient: DNA 50; RNA 40

Eine korrekte Bestimmung der DNA-Konzentration kann allgemeingesehen nur dann erfolgen, wenn auszuschließen ist, dass keine RNA in der Lösung vorhanden ist.

Zum anderen wurde in dieser Arbeit die NanoDrop-Methode zur DNA-Quantifizierung verwendet. Dazu wurde ein Tropfen - ca. 2 µl – der isolierten DNA-Probe auf die Meßstelle des Geräts aufgetragen. Durch die Oberflächenspannung zwischen zwei Flächen wird dieser Tropfen fixiert. Die Strecke, die das Licht – hier einer Xenon-Blitzlampe - zurücklegen muss, misst nur 1 mm. Die Konzentration der DNA-Probe wird über ein Software-Programm des Geräts berechnet. Die maximale Konzentration die gemessen werden kann liegt bei 3700 ng/µl.

5.2.1.3. DNA-Amplifikation mittels PCR

Die Methode der Polymerasen-Ketten-Reaktion (engl. *Polymerase-Chain-Reaktion*, PCR) wurde 1983 von Kary Mullis erneut erfunden, nachdem in den 70'er Jahren der norwegische Postdoc Kjell Kleppe schon die Idee hatte DNA durch zwei flankierende Primer zu vervielfältigen. Mullis entwickelte ein

Verfahren, das mit Hilfe eines Enzyms (DNA-Polymerase) DNA durch repetitive Verdoppelungen in mehreren Zyklen vermehren konnte. 1993 erhielt er für dieses Verfahren den Nobelpreis in Chemie.

Die damals noch eingesetzten DNA-Polymerasen mussten bei jedem Zyklus erneut hinzugefügt werden, da sie den notwendigen hohen Temperaturen nicht standhielten. Heutzutage werden thermostabile DNA-Polymerasen von thermophilen-Bakterien verwendet, die Temperaturen von bis zu 110°C überleben. Eines dieser ersten thermostabilen Enzyme war aus *Thermus aquaticus* (ein thermophiles, gramnegatives Bakterium) – daher auch der Name *Taq*-Polymerasen - isoliert worden.

Die einzelnen Schritte eines einzelnen PCR-Zyklus sehen wie folgt aus:

Als erstes erfolgt die Denaturierung der DNA, d.h. das Trennen der beiden komplementären Einzelstränge der doppelsträngig vorliegenden DNA (dsDNA). Hierzu wird der PCR-Ansatz auf 95°C erhitzt. Bei dieser Temperatur werden die für das Zusammenhalten der dsDNA verantwortlichen Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen.

An die Einzelstränge der DNA können sich dann die Primer anlagern (Primer annealing). Damit dies geschieht, muss die Temperatur wieder gesenkt werden. Die optimale Temperatur für das Anlagern ist von Primer zu Primer unterschiedlich. Üblicherweise liegt diese Temperatur 2 – 3°C unter dem Schmelzpunkt des jeweiligen Primers (ca. 50 – 60°C). Wird die Temperatur zu hoch gewählt, lagern sich die Primer nicht an die DNA an, ist sie zu niedrig, kommt es zu unspezifischen Bindungen an den falschen Stellen der DNA.

Haben sich die Primer an der richtigen Stelle des DNA-Stranges angelagert, kann die sogenannte Elongation (Polymerisation) erfolgen. Dabei werden von der DNA-Polymerase freie Nukleotide am 3'-Ende des Primers beginnend und

dem DNA-Einzelstrang folgend angefügt. Die hier notwendige Temperatur und Zeit hängt von der zum Einsatz kommenden Taq-Polymerase und der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Fragments ab.

Die jetzt wieder doppelsträngig vorliegende DNA wird zur Auftrennung wieder auf 95°C erhitzt und der Zyklus beginnt von vorne. Jeder Zyklus besteht aus den oben genannten drei Schritten (Denaturierung, Primer Annealing und Elongation). Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA, so dass es bei den üblichen 25 – 50 Zyklen zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA kommt. Durch die Verwendung von so genannten Thermocyclern erfolgt der Ablauf der

PCR, nachdem alle notwendigen Chemikalien zusammen pipettiert wurden, automatisch.

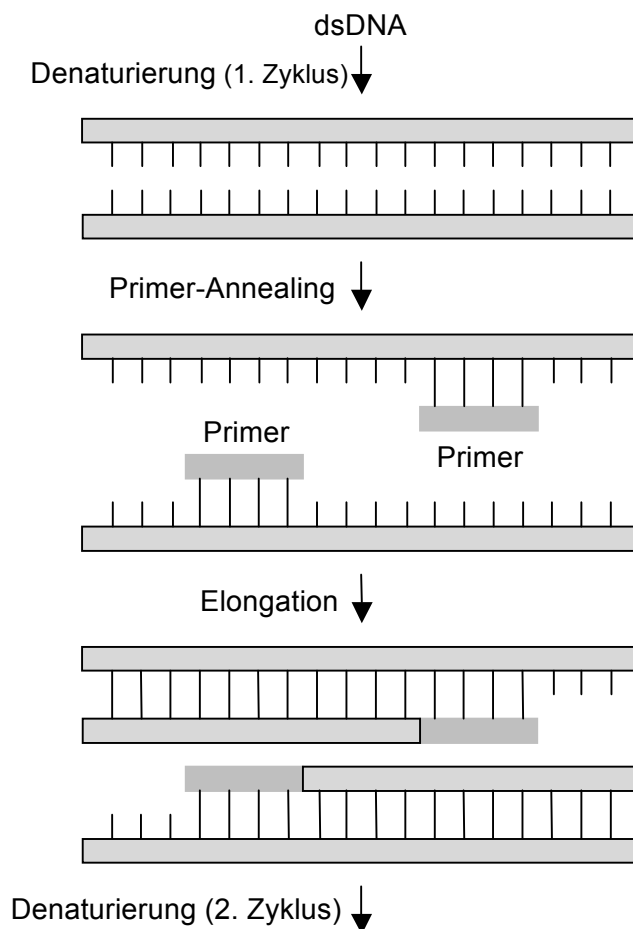


Abbildung 12:

Schematische Darstellung der PCR. In einem zyklischen Prozess aus Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation verdoppelt sich die Zahl der DNA-Abschnitte theoretisch mit jedem Zyklus. Beschrieben ist der erste Zyklus. Die Zahl der Kopien wächst exponentiell mit jeder weiteren Runde.

(modifiziert nach Lottspeich, Bioanalytik, 2. Auflage: 745, 2006).

Folgende Komponenten wurden für die PCR der isolierten DNA hinzugegeben:

	29,0	µl H ₂ O
	5,0	µl 10x Taq-Puffer
	5,0	µl dNTPs [2 mM]
	2,5	µl 5'-Primer [10 µM]
	2,5	µl 3'-Primer [10 µM]
	1,0	µl native Taq-DNA-Polymerase [1U/µl]
	<hr/>	
Σ	45,0	µl
	<hr/>	
+	5,0	µl isolierte DNA [0,1 mg/ml]

Alle diese Komponenten wurden der isolierten DNA auf Eis hinzugegeben und nach vorsichtigem Mischen in das PCR-Gerät gestellt sobald dieses eine Temperatur von 95°C erreicht hat. Die hier zum Einsatz gekommene Taq-Polmerase braucht keine vorzeitige Hitzeaktivierung und würde deshalb beim erstmaligen Hochheizen des PCR-Gerätes auf 95°C oder auch schon bei Raumtemperatur unerwünschte Nebenprodukte erzeugen.

Um verschiedene Mutationen bzw. bestimmte Bereiche des vervielfältigten DNA-Fragments genauer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Primerpaare verwendet. Wie bereits oben erwähnt, müssen hierfür unterschiedliche Annealing-Temperaturen und somit auch unterschiedliche PCR-Programme verwendet werden:

Tabelle 13: PCR-Programme zur Amplifikation der isolierten genomischen DNA. (Programme 1 und 2 für Untersuchungen auf Deletionen, Programme 3 und 4 für Untersuchungen auf Punktmutationen, bp Basenpaare).

Programm	1	2	3	4
5'-Primer	P1A	P1A	Hu1	Hu1
3'-Primer	A2_Hu	B2_Hu	Hu2	C2
95°C, 5 min. 45 sec.				
Denaturierung	95°C, 1 min.	95°C, 1 min.	95°C, 1 min.	95°C, 1 min.
Annealing	65°C, 45 sec.	65°C, 45sec.	60°C, 45 sec.	65°C, 45 sec.
Elongation	72°C, 2 min.	72°C, 2 min.	72°C, 1 min.	72°C, 2 min.
	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.
Länge PCR-Amplifikat	1688 bp	1352 bp	232 bp	493 bp

5.2.2. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung verschiedener Arten von Molekülen. Die entscheidenden Faktoren für die Auftrennung sind zum einen die Molekülgröße, zum anderen die Ladung des Moleküls. Negativ geladene Moleküle wandern zur positiv geladenen Anode, positiv geladenen Moleküle zur negativ geladenen Kathode. Eine Proportionalität zwischen elektrischer Ladung und Größe eines Moleküls vorausgesetzt, lassen sich die Moleküle in einer Matrix mit bestimmter Porengröße durch ein elektrisches Feld nach ihrer Größe auftrennen. Das DNA-Molekül besitzt eine Vielzahl an Phosphatgruppen und ist deswegen proportional zu seiner Größe negativ geladen. Kurze DNA-Fragmente wandern schneller durch die Poren des Acrylamidgels, als lange DNA-Fragmente. Zur Auftrennung der PCR-Produkte eignen sich aufgrund der geringen DNA-Fragmentenlänge besonders 10%ige-Acrylamidgele.

5.2.2.1. Gießen der Acrylamidgele

Es wurden drei Spacer, zwei Glasplatten, ein Gelkamm und mehrere Klemmen benötigt, um die Apparatur für das Gelegießen vorzubereiten. Die Spacer wurden an drei Seiten zwischen den zwei Glasplatten mit Hilfe von Klemmen so fixiert, dass sie möglichst keine Flüssigkeit mehr durchlassen konnten. An die Ecken zwischen den Spacern wurde prophylaktisch geschmolzene Agarose getropft, um ein etwaiges Auslaufen zu verhindern.

Für ein 10%iges Acrylamidgel wurde folgendes benötigt:

	16,6	ml H ₂ O bidest.
	12,0	ml Rotiphorese Gel 30
	7,2	ml 5x TBE-Puffer
	180	µl APS 10 %
	20,0	µl Temed
Σ	36,0	ml

Nach vorsichtigem Mischen konnte die Lösung zwischen die zwei abgedichteten Glasplatten gegossen und der Gelkamm gesteckt werden. Nur blasenfrei gegossene Gele wurden verwendet. Zum Auspolymerisieren braucht das Gel ca. 1,5 Stunden. Anschließend wurde der Kamm und der untere Spacer gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer gestellt. Gegen das Austrocknen des Gels, wurde es mit 1x TBE-Puffer überschichtet.

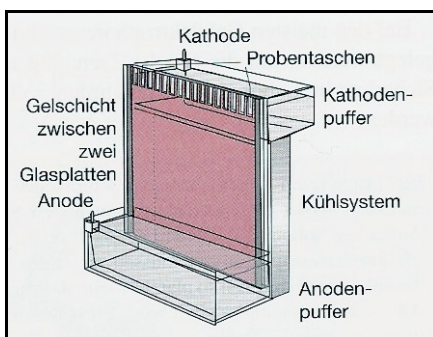


Abbildung 13:

Flachgelapparatur für Polyacrylamid-Gelelektrophoresen. Entsprechend dem elektrischen Strom werden die in die Probenaschen aufgetragenen Proben von der Kathode zur Anode aufgetrennt. (Lottspeich, Bioanalytik, 2. Auflage: 241, 2006).

5.2.2.2. Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

5 µl des fertigen PCR-Produktes wurden mit 1 µl 10x Ladepuffer in einem neuen Eppendorf-Gefäß gemischt. Nachdem die Gelkammern gespült waren, wurden diese 6 µl komplett aufgetragen. Um die entstehenden DNA-Banden zuordnen zu können, wurden 6 µl eines Größen-Markers mit (pBR322 für Größen bis zu 587 bp oder 100 bp + für Größen bis zu 3.000 bp) zusätzlich aufgetragen.

Die Elektrophorese-Apparatur wurde danach verschlossen und für ca. 75 Minuten bzw. solange, bis die unterste Bande des Markers ca. 5 cm oberhalb des unteren Gelrandes angelangt ist, eine Spannung von 300 V angelegt.

5.2.2.3. Entwicklung der Acrylamidgele

Das fertig gelaufene Gel wurde aus der Apparatur genommen und in einer Plastikschaale für ca. 10 Minuten in 0,00005 %iger Ethidiumbromidlösung gefärbt. Ethidiumbromid absorbiert UV-Licht und interkaliert aufgrund seiner Struktur in die DNA. Unter UV-Licht wird deshalb die DNA im Gel sichtbar.

Die Ethidiumbromidlösung wurde nach den 10 Minuten Inkubation zur erneuten Verwendung wieder in das ursprüngliche Gefäß gefüllt. Das Gel wurde kurz mit VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) gewaschen und anschließend in die CSC-Kamera gelegt. Unter UV-Licht mit einer Expositionszeit von 250 – 300 Frames wurde das Gel fotografiert. Nach Abschluss des Fotografierens wurde das Gel im Sonderabfall entsorgt.

5.2.3. Mutationsanalyse der amplifizierten DNA

5.2.3.1. Aufreinigung der amplifizierten DNA

Bevor das PCR-Produkt auf Mutationen untersucht werden kann, muss es von Salzen (zum Beispiel $MgCl_2$), übrig gebliebenen Primern und anderen Teilchen, die die Sequenzierung stören könnten, befreit werden. Mit Hilfe der

Absorptions-Chromatographie lässt sich die amplifizierte DNA reinigen. Zur Durchführung wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen (Artikel-Nr.: 28106) verwendet.

40 µl des PCR-Produkts wurden mit 200 µl eines Äquillibrierungs-Puffers gemischt und anschließend auf ein Absorptions-Säulchen aufgetragen. Damit die DNA an diese bindet, wurde die Mischung für 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Auf die Absorptions-Säule wurden danach 750 µl eines Wasch-Puffers gegeben und alles wieder bei der gleichen Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert. Hierbei werden alle niedermolekularen Nukleinsäuren (z.B. überschüssige Primer) mit dem Eluat

ausgewaschen. Ein erneuter Zentrifugations-Schritt ist nötig, um den Wasch-Puffer komplett aus der Säule zu entfernen. Als letztes kamen 30 µl eines Elutions-Puffers auf die Säule. Dieser löst bei Zentrifugation mit 14.000 rpm für 1 Minute die jetzt aufgereinigte DNA aus der Säule. Bis die aufgereinigte DNA weiterverwendet wurde, wurde sie bei -20 °C tiefgefroren.

5.2.3.2. Sequenzierung

Zur Sequenzierung werden der aufgereinigten DNA dNTPs, Puffer, Primer im Überschuss und Taq-Polymerase hinzugegeben. Dieser Reaktionsansatz wird in vier Teilproben aufgeteilt und in jeden einzelnen Aliquot eines der vier fluoreszenzmarkierten ddNTPs gegeben. Anschließend folgt eine reguläre PCR-Reaktion. Wird in den neu entstehenden DNA-Strang ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch, da von der Taq-Polymerase zwischen ddNTPs und dNTPs keine Phosphodiesterase-Bindung hergestellt werden kann. Da dies zufällig geschieht, entstehen in den vier einzelnen Aliquots ganz unterschiedlich lange DNA-Amplifikate, die aber jeweils jedes mit dem gleichen ddNTP enden.

Diese DNA-Amplifikate der vier Aliquots werden nebeneinander auf ein Acrylamid-Gel mit sehr feinporiger Struktur aufgetragen. Bei dem anschließenden Gellauf erfolgt eine Auftrennung gemäß der Größe der einzelnen DNA-Amplifikate. An jeder Stelle der aufgereinigten DNA werden ddNTPs eingebaut, so dass die Sequenz aufsteigend nach ihrer Größe aus den Banden abgelesen werden kann.

Diese Methode zur DNA-Sequenzierung, die nach dem Erfinder Sanger benannt wurde, ist sehr aufwendig und ökonomisch nur von einem Labor durchzuführen, das viele Proben sequenziert. Deshalb wurde die aufgereinigte DNA zur Sequenzierung nach Reutlingen zur Firma '4baselab' geschickt, die die in großem Maßstab durchführt.

Eine nach Sequenzierung in einer Richtung gefundene Mutation kann in seltenen Fällen artifiziell sein, so dass zur Absicherung grundsätzlich aus beiden Richtungen sequenziert wurde.

Für Punktmutationen stellte sich zur Sequenzierung die Primerkombination Hu1 mit Hu2, für Deletionen die Primerkombination P1A mit B2_Hu als besonders effektiv heraus.

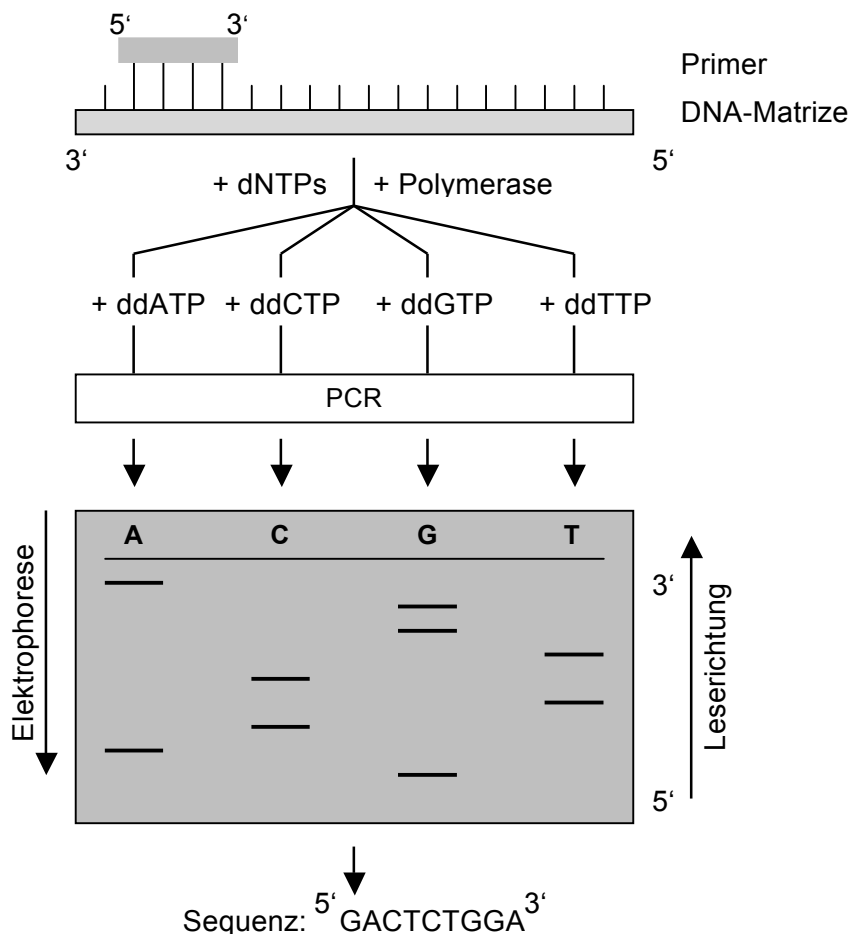


Abbildung 14: Sequenzierung nach Sanger.

(dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate, ddATP Didesoxyadenosintriphosphat, ddCTP Didesoxycytidintriphosphat, ddGTP Didesoxyguanosintriphosphat, ddTTP Didesoxythymidintriphosphat).

(modifiziert nach Lottspeich, Bioanalytik, 2. Auflage: 782, 2006).

5.2.3.3. Bestätigung der Mutation

Es kann mitunter vorkommen, dass die Taq-Polymerase während einer PCR Mutationen in die Hotspot-Codons (Codons der DNA, in der Mutationen um ein Vielfaches häufiger vorkommen als nach der normalen Mutationsrate zu erwarten wäre) einliest. Deshalb müssen alle gefundenen Mutationen bestätigt werden.

Hierzu wurde mit der isolierten DNA derselben Tumorprobe, in der eine Mutation durch Sequenzierung in beide Richtungen identifiziert wurde, eine

erneute PCR (mit den gleichen Primern) durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde erneut aufgereinigt und wieder zur Sequenzierung geschickt. Bestätigte sich in dieser Sequenzierung der DNA aus der gleichen Tumorprobe die Mutation, wurde diese als verifiziert angesehen werden.

5.3. LightCycler Verfahren

5.3.1. RNA-Gewinnung aus den Tumorproben

5.3.1.1. RNA-Isolierung aus den Tumorproben

Das Prinzip der RNA-Isolierung entspricht dem Prinzip der DNA-Isolierung. Zuerst erfolgte eine Aufschließung der Zellen mit Hilfe des Mikrodismembrators. Unterstützend wirkt hier Trizol, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat (ein Detergenz, das Zellmembranen zerstört aber gleichzeitig protektiv auf die RNA wirkt). Von diesem wurden 150 µl in das stickstoffgekühlte Teflongefäß zusammen mit der Probe und einer kleinen Stahlkugel geben. Nach dem Zermörsern in dem Mikrodismembrator wurde das Pulver in ein Röhrchen, in das 1,5 ml Trizol vorgelegt wurde überführt.

Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte in Analogie zum Vorgehen bei der DNA-Isolierung (siehe 5.2.1.2.) in den nächsten Schritten die Entfernung von Proteinen durch Behandlung mit Chloroform. Dazu wurde zweimal je 400 µl Chloroform der Lösung hinzugegeben, für 15 sec kräftig geschüttelt und nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 6.000 rpm die obere wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt.

Zur Präzipitation (Fällung) der RNA wurde hier allerdings nicht Ethanol, sondern Isopropanol verwendet. Dies hat bei Verwendung von kleinen Ansätzen einen Vorteil. Außerdem fällt es Salze (vor allem Natriumchlorid) leichter als Ethanol. Im Gegensatz zur DNA-Isolierung erfolgte bei der RNA-Präzipitation nach Zusatz von 1,5 ml Isopropanol und Inkubation bei -20 °C für 30 min ein weiterer

Zentrifugationsschritt bei 4°C und 6.000 rpm für 30 min. Das dabei entstehende Nukleinsäure-Pellet wurde mit 2 ml 75 %igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (5 min, 6.000 rpm, 4 °C) und vor dem Lösen in sterilem Wasser für 10 min an der Luft getrocknet. Nachdem das Pellet über Nacht im Kühlschrank gelöst wurde, konnte die Konzentration der RNA-Lösung bestimmt werden.

5.3.1.2. RNA-Aufreinigung

Um etwaige (molekulare) Rückstände, die spätere Analysen (z.B. Light Cycler Analysen) stören könnten, aus der RNA-haltigen Lösung zu entfernen, wurde vor der eigentlichen Aufreinigung eine DNase-Behandlung durchgeführt.

Dazu wurde folgender Ansatz bei 37°C für 30 Minuten inkubiert:

	100,0	µg	Total-RNA
	10,0	µl	10x DNase-Puffer
	5,0	µl	U DNase – RNase frei
<hr/>			
<i>ad</i>	100	µl	<i>ddH₂O</i>

Anschließend wurden der RNA-Lösung 100 µl H₂O-gesättigtes Phenol und 60 µl Chloroform zugegeben und alles kräftig gevortext. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm über 5 Minuten bei 4°C wird die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, von der organischen Phase abgetrennt. Die obere, wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Chloroform versetzt und wieder gevortext. Es schlossen sich nach Abgießen der wässrigen Phase und Zugabe von 100 µl Chloroform ein erneuter Zentrifugations-Schritt an, wie der erste. Aus der dann entnommenen oberen wässrigen Phase kann die RNA gefällt werden. Dazu wurde diese Phase in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1/10 Volumen 2M Natriumacetatpuffer (pH 4,5) angesäuert und danach mit 2,5 Volumenanteilen 100 %igem Ethanol versetzt. Die Lösung wurde kurz gevortext und für 10 Minuten auf Eis inkubiert,

damit die RNA-Ausfällung von statten geht. Durch Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, 4 °C) entsteht am Boden des Reaktionsgefäß ein RNA-Pellet. Nach Abgießen des Überstandes wurden dem Pellet 500 µl 75 %ige Ethanol-Lösung hinzugegeben. So wird die Mehrzahl der Salze aus dem Pellet entfernt. Es folgte ein erneuter Zentrifugations-Schritt (14.000 rpm, 15 min, 4 °C), allerdings dieses Mal nur für 5 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, damit das Pellet an der Luft für kurze Zeit getrocknet werden kann. Die so erhaltene reine RNA wurde in 50 µl sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen und vor der Quantifizierung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

5.3.1.3. RNA-Quantifizierung

Die Methode zur RNA-Quantifizierung entspricht der zur DNA-Quantifizierung (siehe 5.2.1.3.). Auch hier kann die Menge an RNA entweder photometrisch gemessen werden oder mit Hilfe der NanoDrop-Methode. Bei der photometrischen Methode wird die isolierte RNA im Verhältnis 1:500 verdünnt und anschließend die Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine Konzentration von 40 µg RNA/ µl entsprechen hier einer OD von 1. In dieser Arbeit kam vor allem die NanoDrop-Methode zum Einsatz.

5.3.2. Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Um zu überprüfen, ob ein Gen transkribiert wurde, muss man die abgelesene RNA analysieren. Hierzu muss zuerst die RNA in die komplementäre DNA, die sogenannte cDNA (copy DNA) umgeschrieben werden. Im Unterschied zur genomischen DNA enthält die cDNA keine Introns. Introns sind Genabschnitte, die keine Informationen tragen und während der Transkription zur mRNA (messenger RNA) herausgeschnitten werden. Als nächster Schritt folgt dann die Auswertung/ Quantifizierung mittels PCR bzw. genauer, mittels Real Time PCR.

Die zur Umschreibung von RNA in DNA notwendige Polymerase kommt in der Natur in verschiedenen Viren vor. Der bekannteste Vertreter ist hier das HI-Virus (HIV, Human immunodeficiency virus). Diese DNA-Polymerasen oder auch Reverse Transkriptasen erlauben den Viren ihre eigene RNA in einem Wirt zu cDNA umzuschreiben und anschließend in die genomische DNA des Wirtes zu integrieren. In der RT-PCR werden Reverse Transkriptasen verwendet, um mRNA in cDNA umzuschreiben.

In dieser Arbeit wurde im Reaktionsansatz die Reverse Transkriptase aus dem Avian Myoblastosis Virus (AMV-RT) verwendet.

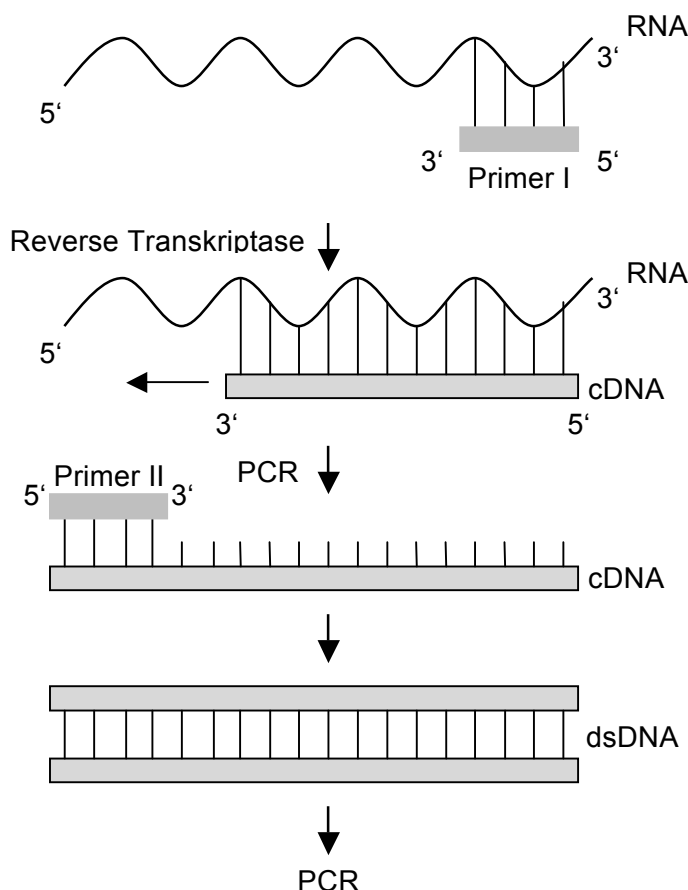


Abbildung 15: Schematische Darstellung der RT-PCR. Da RNA durch die PCR nicht direkt amplifiziert werden kann, muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Diese wird dann für die „eigentliche“ PCR eingesetzt. (modifiziert nach Lottspeich, Bioanalytik, 2. Auflage: 750, 2006).

Folgender Ansatz wurde für die RT-PCR verwendet:

5,05	µl	H ₂ O (Ampuwa – DNase und RNase frei)
3,00	µl	MgCl ₂ [25 mM]
1,50	µl	10x PCR-Puffer
1,50	µl	dNTPs [10 mM]
0,38	µl	Primer Oligo d(T)15
0,38	µl	Primer Random d(N)6

Vortexen

0,19	µl	AMV-RT
3,00	µl	isolierte RNA [125 ng/ µl]
<hr/>		
Σ	15,0	µl
<hr/>		

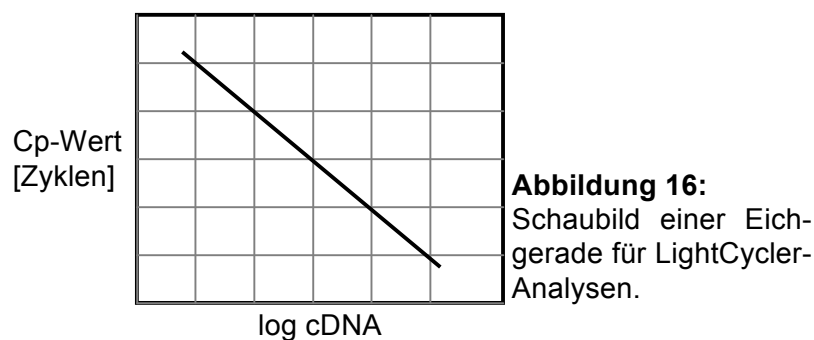
Bei 42°C erfolgte für 1 Stunde die Elongation, bevor im Anschluss bei 95°C für 5 Minuten die AMV-RT inaktiviert wurde.

5.3.3. Real Time PCR

Als letzter Schritt erfolgte die Quantifizierung der durch RT-PCR gewonnenen cDNA und so indirekt auch der mRNA. Die hierzu verwendete Methode, die Real Time PCR (Echtzeit PCR), hat ihren Namen aufgrund der Echtzeitmessung des Anstiegs der amplifizierten DNA. Weiterer Vorteil dieser Methode ist ihre kurze Dauer, die durch die sehr kleinen Reaktions-Ansätze und die Verwendung sehr dünner Reaktionsgefäße (Glaskapillaren), die schnelle Temperaturänderungen erlauben, erreicht wird.

Gemessen wird der Anstieg der amplifizierten DNA anhand der Fluoreszenzemission von Farbstoffen (in dieser Arbeit SYBR Green I), die in doppelsträngige DNA interkalieren. Je mehr doppelsträngige DNA vorliegt, desto stärker ist die Emission des Fluoreszenzfarbstoffes. Die Quantifizierung erfolgt gegen eine Eichgerade, die man durch Amplifikation von cDNA bekannter Konzentration erhält (absolute Quantifikationsanalyse).

Um die Eichgerade zu bestimmen wird in der Regel ein Gen verwendet, dessen Expression in allen Geweben zu jedem Zeitpunkt relativ konstant ist (so genanntes *Housekeeping-Gen*, in dieser Arbeit *18S-RNA*). Die Referenzprobe bekannter Konzentration und ihre Verdünnungen (1:100, 1:10.000) werden auf der Abszisse gegen die korrespondierenden *Crossing-points* (Cp) auf der Ordinate logarithmisch aufgetragen. Der Betrag der Steigung ergibt die cDNA Veränderung pro Zyklus.



Unter den Crossing-Points versteht man den Zeitpunkt, zu dem die Fluoreszenz der Probe die des Hintergrunds übertrifft und konstant ansteigt. Angegeben werden die Crossing-Points in Zyklen. Je größer die initiale cDNA-Konzentration, desto früher erscheint der Crossing-Point (weniger Amplifikationszyklen). Cp-Werte von Proben unbekannter DNA-Konzentration können mittels der Eichgerade quantifiziert werden.

Eine Möglichkeit der relativen Quantifizierung, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist der Vergleich von Cp-Werten einer Probe (Zielgen) relativ zu denen einer Referenzprobe (*Housekeeping-Gen*). So kann ein Induktionswert ermittelt werden, der angibt, um welchen Faktor die Expression der Probe, die der Referenzprobe überschreitet. Folgende Formel diente zur Berechnung dieses Induktionsfaktors (F):

$$F = 2^{\Delta C_p \text{ Zielgen (NG - TG)}} / 2^{\Delta C_p \text{ Housekeeping-Gen (NG - TG)}}$$

Legende: Als Referenz wurde 18S-RNA verwendet. Positiv Proben sind die Tumorgewebe (TG), negativ Proben die korrespondierenden Normalgewebe (NG).

Folgende Reagenzien wurden in eine gekühlte Glaskapillare pipettiert:

5,7	µl	H ₂ O (DNase und RNase frei)
0,8	µl	MgCl ₂ [25 mM]
1,0	µl	10x Mix
0,25	µl	Forward Primer [0,5 mM]
0,25	µl	Reverse Primer [0,5 mM]
2,0	µl	cDNA (Verdünnung 1:1 mit H ₂ O)
Σ	10,0	µl

Die anschließende Real-Time-PCR lief vollautomatisch im LightCycler ab. Für die Quantifizierung unterschiedlicher Gene wurden unterschiedliche Primer eingesetzt: hier 18s-RNA (als Kontrolle), humanes GS und CYP 1A1.

5.4. Western Blot

1971 wurde von Southern eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und anschließender Hybridisierung etabliert, das so genannte Southern-Blotting. In Anlehnung an diese Namensgebung bezeichnet man das 1979 von Tombin und Renard eingeführte Protein-Blotting als Western-Blotting.

Der erste Schritt des Western-Blots besteht in einer elektrophoretischen Auftrennung der aus Gewebe isolierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die Zugabe von SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) zu dem Proteingemisch bewirkt eine Denaturierung der nativen Proteine und eine Überdeckung der Ladung der Proteine mit der negativen Ladung des SDS. Es ergibt sich eine direkte Proportionalität zwischen Molekulargewicht und (negativer) Ladung.

Im nächsten Schritt werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch eine elektrische Spannung, die senkrecht auf das Gel wirkt, auf eine *PVDF* (*Polyvinylidenfluorid*)-Membran übertragen. Das Bild der elektrophoretischen

Auftrennung bleibt hierbei erhalten. Praktisch wird für diese elektrophoretische Übertragung ein so genanntes Tank-Blot-System verwendet. Das SDS wird bei diesem Schritt ausgewaschen und die Proteine können einen Teil ihrer ursprünglichen Konfiguration (Sekundär- und Tertiärstruktur) wieder einnehmen. Dies ist wichtig, damit die Proteine von Antikörpern erkannt werden können.

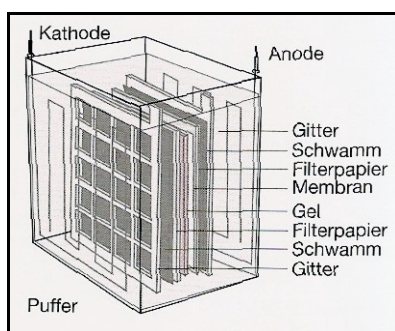


Abbildung 17:

Blotting-Tank für den elektrophoretischen Transfer der getrennten Proteine auf eine *PVDF*-Membran. Durch den elektrischen Strom, der von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode läuft, werden die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen.

(Lottspeich, Bioanalytik, 2. Auflage: 265, 2006).

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper mit den Proteinen zu vermeiden, müssen die unspezifischen freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. In dem verwendeten Blockpuffer (BSA oder Milchpulver) befinden sich Proteine, die von den Antikörpern nicht erkannt werden können.

Der Komplex aus Protein-spezifischem primärem Antikörper und Protein ist noch nicht sichtbar. Zur Visualisierung wird ein Enzym verwendet (*HRP horseradish peroxidase* oder Alkalische Phosphatase), das verschiedene Substrate umsetzen kann und dessen Produkt sichtbar ist. Dieses Enzym ist an einen Spezies-spezifischen sekundären Antikörper gekoppelt (z.B. anti-mouse), der an den primären Antikörper bindet.

5.4.1. Proteinisolierung

Um an die intrazellulären Proteine zu gelangen, wurde wie bei der Nukleinsäure-Isolierung, die Zellen des Gewebes zerstört. Hierzu eignen sich zum Beispiel Vibrationszelmühlen, bei deren Verwendung aber Reibungswärme entsteht, weshalb hier unter Kühlung gearbeitet werden muss. Beim Homogenisieren entsteht ein Gemisch aus den verschiedensten Zellbestandteilen (Zellorganellen, Membranbestandteile, intakte und aufgebrochene Zellen etc.). Diese befinden sich jetzt nicht mehr in ihrer physiologischen Umgebung. Damit sie nicht noch mehr zerstört werden, wird ein Homogenisierungs-Puffer verwendet, der den Zellorganellen einen gewissen Schutz bietet, z.B. vor Proteasen. Sind die Zellen bei der groben Homogenisierung durch die Vibrationszelmühle noch nicht genügend aufgebrochen, kann im Anschluss noch mittels Ultraschallwellen nachgeholfen werden. Über einen Metallstab, der in die Isolierungs-Lösung gehalten wird, erzeugen die Ultraschallwellen (10 - 40 kHz) starke Druckänderungen, was zum Aufbrechen der Zellen und Zellorganellen führt. Auch hier muss wegen der Wärmeentstehung auf Eis gearbeitet werden. Bei dieser Methode kommt es zur Auftrennung der Proteine in kleinere Stücke.

Zu 10 ml von dem von uns verwendeten Homogenisierungs-Puffer wurde 1 Complete Tablette (Firma Roche, enthält Protease-Inhibitoren) hinzugegeben. Von dieser Mischung wurden 500 µl in ein mit Stickstoff gekühltes Teflongefäß vorgelegt. Dazu kamen ein kleines Stück Gewebeprobe und eine kleine Stahlkugel. Nachdem die Gewebeprobe durch den Mikrodismembrator zertrümmert war, wurde sie in ein neues Gefäß überführt und auf Eis für 30 Minuten aufgetaut. Anschließend wurde das Zellgemisch mehrmals gevortext und bei Bedarf die Zellen mit Ultraschall weiter aufgeschlossen. Als letztes folgte ein Zentrifugationsschritt (14.000 g bei 4°C für 30 Minuten), nach dem der klare Überstand abgenommen werden konnte. Jetzt wurde die Konzentration des so erhaltenen Protein-Gesamthomogenats bestimmt.

5.4.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford macht man sich die unterschiedlichen Absorptionsmaxima des Farbstoffes Coomassie-Brillantblue G 250 in verschiedenen Umgebungen zu Nutze. Bei Vorhandensein von Proteinen im sauren Milieu kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm. Verantwortlich hierfür ist eine Stabilisierung des Farbstoffes durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Proteinen. Die Änderung des Absorptionsmaximums kann photometrisch gemessen und damit die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Vor der Messung müssen die Proteinproben je nach Proteinkonzentration mit H₂O bidest. verdünnt werden um in den Bereich der Eichgerade zu gelangen. Die Eichgerade wurde nach folgendem Schema mit BSA-Stammlösung (5 mg/ml) pipettiert:

Tabelle 14: Pipettierschema für die Bradford-Eichgerade.

Protein-Konzentration [µg/ µl]	BSA-Stamm- lösung [µl]	H ₂ O bidest. [µl]	Lysis-Puffer [µl]
0	0	980	20
25	5	975	20
50	10	970	20
75	15	965	20
100	20	960	20
125	25	955	20
150	30	950	20
200	40	940	20

Auf eine 96-Well Mikrotiterplatte wurden je 2 µl der Eichgeradenlösung für eine Doppel- und je 2 µl der verdünnten Proteinproben für eine Dreifachbestimmung aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde dann in den Victor-Plattenreader gestellt. Dieser gibt zu den Proben Bradford Reagenz (enthält den Farbstoff

Coomassie-Brillantblue G 250), das zuvor 1:5 mit H₂O bidest. verdünnt wurde und schüttelt die Platten für 5 Minuten. Mit einer Wellenlänge von 595 nm erfolgte dann die Messung der Extinktion. Der Mittelwert aus den drei Proteinlösungen ergibt die Proteinkonzentration.

5.4.2. Gelelektrophorese

5.4.2.1. Gießen der Acrylamidgele

Das Proteingemisch wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Den Größen der zu untersuchenden Proteine angepasst, wurden 12,5%ige (für GS und CYP) oder 10%ige (für β -Catenin) Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet.

Nachdem die Gelkammern vorbereitet, also abgedichtet wurden, wurde vorsichtig das Trenngel zwischen die zwei Platten der Gelkammer pipettiert. Das Trenngel wurde anschließend mindestens 1 Stunde zur Polymerisation bei Raumtemperatur aufbewahrt. Damit es während dieser Zeit nicht austrocknete, wurde es mit Isopropanol überschichtet. Nach dieser Zeit konnte das Isopropanol abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden. Beim Stecken der Gelkämme wurde darauf geachtet, dass keine Blasen entstehen. Nach weiteren 30 Minuten war auch das Sammelgel polymerisiert und das gesamte Gel konnte verwendet werden.

5.4.2.2. Probenvorbereitung und –auftragung

Vor der weiteren Verwendung des Proteinhomogenats, wurde dieses 1:1 mit 2x Lämmli-Lösung (enthält unter anderem den Farbstoff Bromphenolblau) verdünnt. Diese Verdünnung wurde für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Dabei kommt es zu einer Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, so dass sich das im Lämmli enthaltene SDS an die Aminosäureketten anlagern kann. Dies ist für den späteren Gellauf wichtig.

Um zu garantieren, dass verschiedene Laufverhalten bei der Gelelektrophorese nicht auf unterschiedlichen Proteinmengen beruhen, wurden nach der Proteinbestimmung die Probenvolumina berechnet, die die gleiche Menge an Protein (z.B. 50 µg) enthalten. Diese gleich großen Proteinmengen wurden dann auf das Gel aufgetragen, das mit 1x Laufpuffer überschichtet wurde. Um die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, muss ein Größen-Marker mitlaufen, in diesem Fall Prestained Protein Ladder (Artikel-Nr.: SM 0671; Fermentas).

Der Gellauf wurde durch Anlegen einer Spannung zwischen 100 und 150V gestartet. War das im Lämmli enthaltene Bromphenolblau am unteren Ende des Gels angelangt (ca. 1,5 Stunden), wurde der Gellauf gestoppt.

5.4.3. Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran

Um Verwechslungen zu vermeiden, wurde die *PVDF*-Membran vor Verwendung beschriftet. Kurzes Befeuchten mit Methanol führt zur Öffnung der Poren. Anschließend wurde die Membran in 1x Transferpuffer eingeweicht.

Ein auch in Transferpuffer befeuchtetes Filterpapier wurde auf einen mit Transferpuffer getränkten Schwamm ausgebreitet. Nachdem das Gel behutsam aus der Gelapparatur genommen wurde, wurde das Sammelgel mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Trenngel wird ohne Luftblasen auf das Filterpapier gelegt. Auf das Trenngel kam nun die Membran. Auch in diesem Fall dürfen sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befinden. Als letztes kamen erneut ein Filterpapier und dann ein weiterer Schwamm, beides in Transferpuffer eingeweicht, auf die Membran. Zusammengehalten wurde dieser Aufbau durch eine Gel-Halter-Kassette. Diese wurde in die Blot-Apparatur gestellt und unter kühlen Bedingungen (im Kühlschrank) für 120 bis 150 Minuten ein kontinuierlicher Strom von 400 mA angelegt.

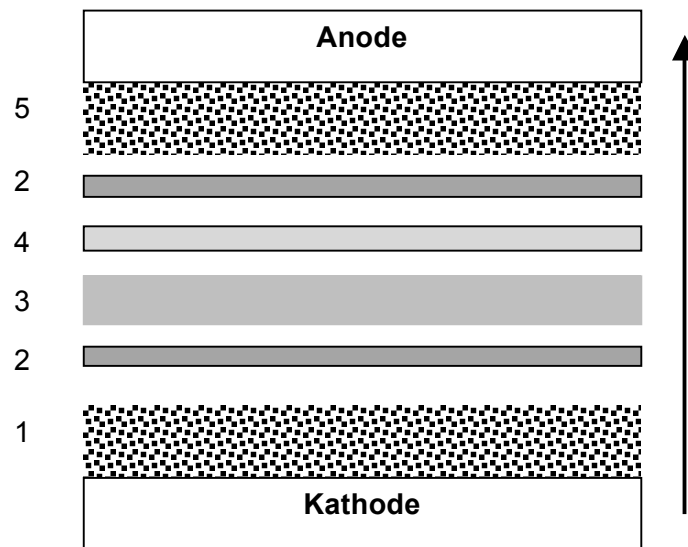


Abbildung 18: Elektroblotting.

1) Kathode mit in Transferpuffer getränktem Schwamm; 2) Filterpapier in Transferpuffer getränkt; 3) Gel mit aufgetrennten Proteinen; 4) *PVDF*-Membran; 5) Anode mit in Transferpuffer getränktem Schwamm.

Durch den angelegten Strom, der von der Kathode zur Anode fließt, werden die Proteine auf die Nitrocellulose-Membran übertragen.

(modifiziert nach Lottspeich, Bioanalytik, 2. Auflage: 87, 2006).

5.4.4. Immunoblot

Nachdem die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen worden waren, konnte die Membran aus der Gel-Halte-Apparatur genommen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet werden (mindestens für 15 Minuten).

Anschließend wurde die Membran kurz in Methanol befeuchtet und dann zwei Mal für 10 Minuten in 15 ml Waschpuffer (PBS/T) gewaschen. Alle Wasch-, Block und Inkubationsschritte erfolgten unter ständigem leichtem Schütteln, um eine gleichmäßige Verteilung der jeweiligen Lösungen zu gewährleisten.

Bevor die Inkubation mit Antikörper beginnen konnte, wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit 15 ml Blockpuffer (I-Block) für 1,5 h bei Raumtemperatur geblockt. Dann konnte der erste Antikörper auf die Membran gegeben werden. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu

vermeiden, wurde dieser über Nacht bei 4°C inkubiert. Sollte es doch zu solchen unerwünschten Bindungen gekommen sein, wurden diese durch zwei weitere Waschschrte entfernt (10 Minuten in 15 ml PBS/T).

Mit der 2. Antikörperlösung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschschrte mit PBS/T um unspezifische Bindungen zu entfernen. Da die zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine notwendige Lumineszenzreaktion ein optimales pH-Milieu benötigt, wurde die Folie zweimal für 2 Minuten mit Äquilibrierungs-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran in eine vorbereitete Plastikfolie gelegt und 400 µl CDP-Star Ready to use (Chemilumineszenz-Reagenz, dass durch die Alkalische Phosphatase umgesetzt wird) hinzupipettiert. Die Membran wurde in der Folie eingeschweißt und je nach Antikörper zwischen 30 Minuten und 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

5.4.5. Entwicklung der Blots

Die Visualisierung der Proteinbanden mit der CSC-Kamera kann frühestens nach 30 Minuten erfolgen, je nach verwendetem Antikörper. Um den Proteinmarker nachher gut zu erkennen, wurden dessen Banden mit einem Stift nachgezogen und mit den jeweiligen Größen beschriftet. Als erstes wurde ein Auflichtbild gemacht und gespeichert. Dieses war nachher zur Größenordnung der einzelnen Banden wichtig. Deshalb durfte die Membran unter der Kamera ab jetzt nicht mehr bewegt werden. Als Anfangs-Expositionsdauer wurden 2000 Frames gewählt und davon ein Bild gemacht. Als Richtwert für die Qualität des Bildes wurde der White-Level verwendet – je näher dieser an 100% ist, desto besser ist die Qualität des Bildes. Deshalb wurde die Expositionsdauer je nach erreichtem White-Level erhöht.

5.4.6. Ladekontrolle

Da nie mit absoluter Sicherheit ein fehlerhaftes Auftragen der Proteinmengen auf die einzelnen Bahnen des Gels ausgeschlossen werden kann, muss stets eine Ladekontrolle durchgeführt werden.

Die bereits entwickelten Membranen wurden wieder aus der Folie genommen und kurz in Waschpuffer gewaschen. Bei dem folgenden Inkubationsschritt in 15 ml Strong Antibody Stripping Solution (15 Minuten) werden die primären und sekundären Antikörper von ihren spezifischen Bindungsstellen heruntergewaschen (z.B. von der GS-Bande). Nach weiteren Waschschrritten folgte ein Blockierungsschritt. Anschließend konnte der Antikörper, der spezifisch gegen die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAP-DH, bindet zur Inkubation auf die Membran gegeben werden.

Man geht davon aus, dass die Expression der GAP-DH unabhängig von äußeren Anwendungen stets konstant ist, so dass gleiche Banden der GAP-DH im Western-Blot für die Auftragung von immer gleichen Proteinmengen pro Bahn sprechen. Zur Visualisierung der GAP-DH wurden die Schritte wie unter 5.4.4. beschriebenen verwendet.

5.5. Mikrodissektion

5.5.1. Mikrodissektion

Mit Hilfe der Mikrodissektion können gleiche Zellverbände oder sogar einzelne Zellen aus Geweben gewonnen und im Anschluss weiter analysiert werden (z.B. Gen- oder Proteinanalysen). Auf diese Art und Weise lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen morphologischen und molekularen Pathologien herstellen. Man unterscheidet zwischen Laser Capture- und Laser Cutting Mikrodissektion. In dieser Arbeit wurde die Laser Capture Methode verwendet.

Zur Durchführung der Mikrodissektion wird ein spezielles Gerät benötigt (PIX Cell II Laser Capture Microdissection System – von Prof. R. Kurek Universitäts-Frauenklinik Tübingen zur Verfügung gestellt). Dieses beinhaltet ein Mikroskop, eine Kamera und eine Laser-Vorrichtung, die mit einem Computer gekoppelt sind.

Die Gewebeschnitte auf nicht-silanisierten Objektträgern wurden unter das Mikroskop gelegt und über eine Kamera auf dem Bildschirm des Computers betrachtet. Nachdem eine zu untersuchende Stelle im Gewebeschnitt ausgesucht war, wurde auf diese Stelle ein spezielles Cap (Cap Sure LCM Caps, Arcturus) gesetzt. Auf der Unterseite des Caps befindet sich ein spezieller Transferfilm. Manuell konnten dann einzelne Laser-Impulse (Anzahl der verwendeten Laser-Impulse: 10, 20, 30 oder 45) mit einem Durchmesser von 7 – 30 μm senkrecht durch das Cap auf das Gewebe „geschossen“ werden. Durch den Laser-Impuls wird die Thermofolie ausgedehnt und haftet an der zuvor am Bildschirm ausgesuchten Stelle des Gewebes. Solche Laser-Impulse können beliebig oft wiederholt werden. Nach Abheben des Caps von dem Gewebeschnitt bleiben die Teile des Gewebes, die zuvor in Kontakt mit der Thermofolie gekommen sind, an diesem hängen. Das Cap wurde nochmals

kurz auf eine freie Stelle des Objektträgers gesetzt, um ein etwaiges Vorhandensein von Verunreinigungen auszuschließen. Danach wurde das Cap mit dem Gewebe als Deckel auf ein Eppendorf-Gefäß gesetzt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

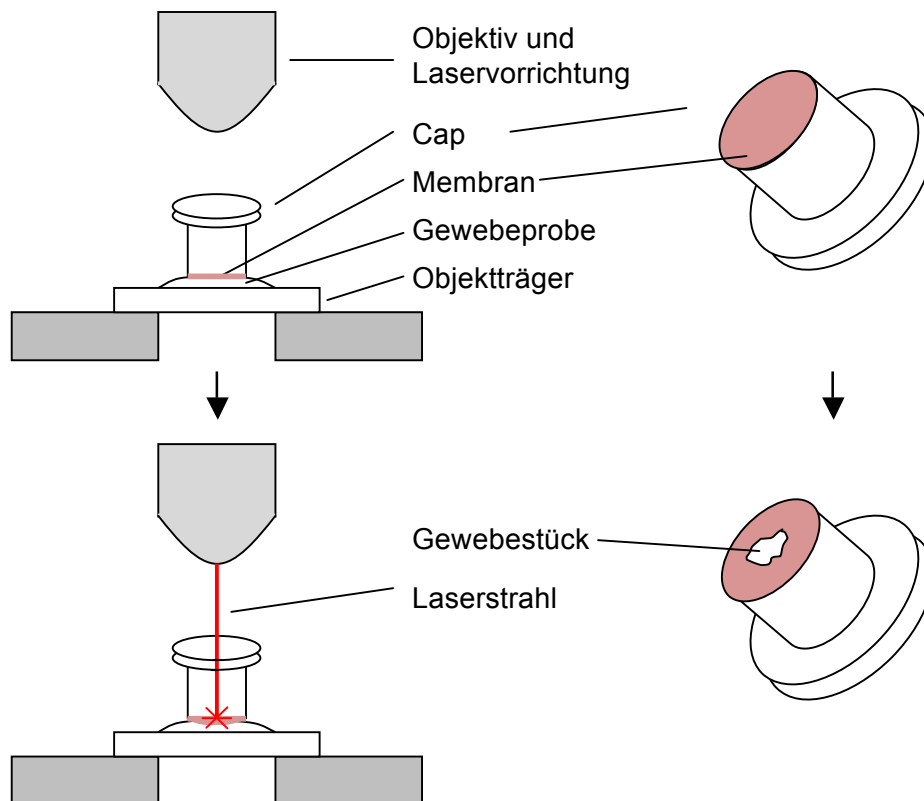


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Methode der Mikrodissektion.

Der Laserstrahl führt zu Erwärmung und somit zur Ausdehnung der Membran des Caps. Das an der Stelle der Ausdehnung benachbarte Gewebe haftet jetzt an der Membran und kann zu weiteren Analysen verwendet werden.

5.5.2. Verdau der mikrodissezierten Proben

Zur Isolierung der DNA wurde ein Proteinase-K Verdau verwendet. Proteinase-K ist eine Endoprotease, die Proteine inaktiviert und degradiert. Dazu wurde

folgender Ansatz in das Eppendorf-Gefäß mit der mikrodissezierten Probe pipettiert:

- 32 µl deionisiertes Wasser (DNase- und RNase-frei)
- 5 µl 10x TAQ-Puffer
- 2 µl Proteinase K-Lösung [10 mg/ml]

Die Eppendorf-Gefäße wurden mit Parafilm ummantelt, um ein Verdampfen der Lösung zu verhindern. Auf dem Kopf stehend, so dass die Lösung auf dem Thermofilm des Caps ist, wurden die Eppendorf-Gefäße bei 50°C über Nacht in einem Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C für 20 Minuten inaktiviert. Nach Zentrifugation und Abschrecken auf Eis konnten die Proben direkt für die PCR weiter verwendet werden.

5.5.3. Amplifikation der mikrodisszezierten Proben

Von den 39 µl des Proteinase K-Ansatzes wurden 13 µl für die PCR verwendet, der Rest zur späteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

Folgender Ansatz wurde zur Durchführung der PCR verwendet:

	22,5 µl	H ₂ O bidest. (DNase- und RNase-frei)
	3,5 µl	10x Taq-Puffer
	5,0 µl	dNTPs [2mM]
	1,0 µl	BSA [5 mg/ ml]
	2,5 µl	Primer 1 [10 µM]
	2,5 µl	Primer 2 [10 µM]
	2,0 µl	Taq-Polymerase, nativ [1 U/µl]
	<hr/>	
Σ	39,0 µl	
	<hr/>	
+	13,0 µl	DNA (Proteinase K-Verdau)

Tabelle 15: PCR-Programme zur Amplifikation der mikrodisszezierten DNA-Proben.
(bp Basenpaare, Anzahl der PCR-Runden: 50).

Programm	1	2	3	4
5'-Primer	P1A	P1A	Hu1	Hu1
3'-Primer	A2_Hu	B2_Hu	Hu2	C2
95°C, 5 min. 45 sec				
Denaturierung	95°C, 1min.	95°C, 1min.	95°C, 1min.	95°C, 1min.
Annealing	65°C, 45 sec	65°C, 45 sec	60°C, 45 sec	60°C, 45 sec
Elongation	72°C, 2min.	72°C, 2min.	72°C, 1min.	72°C, 2min.
	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.
Länge PCR-	1688 bp	1352 bp	232 bp	493 bp
Amplifikat				
Programm	5	6		
5'-Primer	P1A	P1A		
3'-Primer	C2	Hu2		
95°C, 5 min. 45 sec				
Denaturierung	95°C, 1 min.	95°C, 1 min.		
Annealing	65°C, 45 sec	60(+5)°C, 45 sec		
Elongation	72°C, 2 min.	72°C, 2 min.		
	72°C, 5 min.	72°C, 5 min.		
Länge PCR-	957 bp	696 bp		
Amplifikat				

6. Ergebnisse

6.1. Mutationsanalyse

Mutationen in den sogenannten Hotspot-Codons des *CTNNB1*-Gens (Codon 29, 33, 37, 41 und 45) des Exon 3 können, wenn es dadurch zu einem Austausch der Aminosäuren Serin oder Threonin kommt, zum Verlust einer Phosphorylierungsstelle führen. Das Protein wird dadurch weniger abgebaut und akkumuliert im Zytosol.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf verschiedene Tumorarten auf *CTNNB1*-Mutationen in dieser Region untersucht: Hepatoblastome, Nephroblastome (Wilms-Tumore), Neuroblastome, Rhabdomyosarkome und andere Weichteilsarkome. Aus den tiefgefrorenen Proben wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion DNA gewonnen. Nach Vervielfältigung durch PCR und Aufreinigung, wurden die Proben in beide Richtungen sequenziert. Bei Vorliegen einer Mutation wurde eine erneute PCR mit der isolierten DNA und eine zweite Sequenzierung in beide Richtungen zur Bestätigung der Mutation durchgeführt. Tabelle 16 zeigt eine Zusammenfassung der Mutationshäufigkeit im *CTNNB1*-Gen aller untersuchten Tumore.

Tabelle 16: Anzahl der *CTNNB1*-Mutationen der untersuchten Tumore.

Tumorart	Untersuchte Proben [n]	Proben mit <i>CTNNB1</i>- Mutation [n]
Hepatoblastome	10	8
Nephroblastome	13	4
Neuroblastome	35	keine
Rhabdomyosarkome	16	keine
Weichteilsarkome	13	keine

6.1.1. Hepatoblastome

Von den 10 Hepatoblastomen wiesen acht (80%) eine *CTNNB1*-Mutation auf. Von diesen acht Mutationen waren fünf Punktmutationen, die alle zu einem Aminosäureaustausch führten und sich auch in den Hotspot-Codons befanden. Die anderen drei Mutationen waren Deletionen im Exon 3 (Tab. 18).

Die Abbildung 20 zeigt eine Punktmutation, gefunden in Hepatoblastom Hb10.

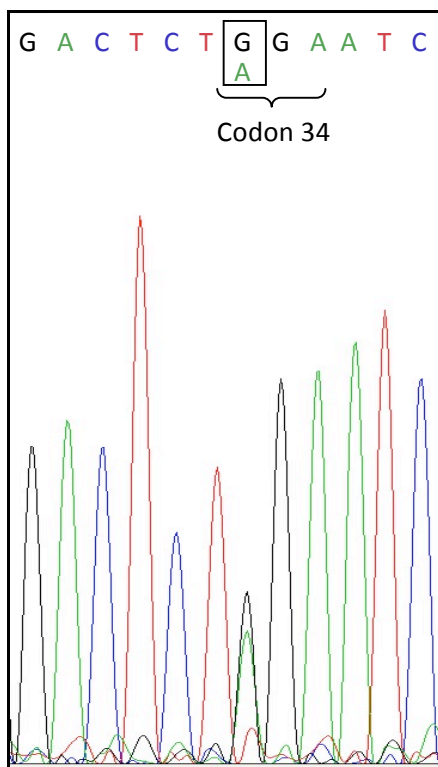


Abbildung 20:

Beispiel einer Punktmutation im *CTNNB1*-Gen.

(Tumor Hb10, Punktmutation im Codon 34 GGA → AGA (Glycin34Arginin). Die einzelnen Kurvenmaxima stellen jeweils eine Base dar. Die vier unterschiedlichen Farben stehen für die vier möglichen Basen (grün: Adenin (A), blau: Cytosin (C), schwarz: Guanin (G) und rot: Thymin (T). Sind an derselben Stelle zwei vergleichbar große überlagernde Kurvenmaxima zu sehen, handelt es sich um eine heterozygote Punktmutation).

Tabelle 17 stellt am Hepatoblastom Hb7 exemplarisch eine der Deletionen dar.

Tabelle 17: Exemplarische Darstellung einer Deletion im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens. (Hepatoblastom Hb7; betroffen waren die Codons 28 bis einschließlich 43 (Δ 48 Basenpaare)).

Codon		26	27	28	29	30
β-Catenin	529	CAG	CCA	CAG	TCT	TAC
Hb 7	24	CAG	CCA	---	---	---
		31	32	33	34	35
β-Catenin	544	CTG	GAC	TCT	GGA	ATC
Hb 7	—	---	---	---	---	---
		36	37	38	39	40
β-Catenin	559	CAT	TCT	GGT	GCC	ACT
Hb 7	—	---	---	---	---	---
		41	42	43	44	45
β-Catenin	574	ACC	ACA	GCT	CCT	TCT
Hb 7	30	---	---	---	CCT	TCT

In Tabelle 18 sind alle Mutationen im *CTNNB1*-Gen der untersuchten Hepatoblastome aufgelistet.

Tabelle 18: Mutationen und Veränderungen der Proteinsequenz des β -Catenins der Hepatoblastome.

8 von 10 untersuchten Hepatoblastomen wiesen eine Mutation im *CTNNB1*-Gen auf. Von diesen 8 Mutationen waren 5 Punktmutationen und 3 Deletionen. Alle Mutationen führten zu einem Austausch einer Aminosäure bzw. dem Verlust mehrerer Aminosäuren im Hot-Spot Bereich des Exon 3.

(Die Probennummerierung der Hepatoblastome ist nicht fortlaufend. Wiedergegeben sind die Nummern der Proben, die zur Verfügung standen. Aufgrund der Nachvollziehbarkeit mit dem Labormanual wurde die Nummerierung nicht in eine fortlaufende Nummerierung geändert; Δ Deletion, bp Basenpaare, \Rightarrow wird zu).

Tumorprobe	Nukleotidveränderung	Auswirkung der Mutation
Hb 1	keine	keine
Hb 2	keine	keine
Hb 3	GGA \Rightarrow GTA	Glycin 34 Valin
Hb 4	Δ 111 bp	Δ Codon 5 – 42, Exon 3
Hb 5	Δ 255 bp	Δ Codon 5 – 90, Exon 3
Hb 6	GGA \Rightarrow AGA	Glycin 34 Arginin
Hb 7	Δ 48 bp	Δ Codon 28 – 43, Exon 3
Hb 9	TCT \Rightarrow TTT	Serin 37 Phenylalanin
Hb 10	GGA \Rightarrow AGA	Glycin 34 Arginin
Hb 12	GAC \Rightarrow GTC	Aspartat 32 Valin

6.1.2. Nephroblastome

Von den 13 Nephroblastomen zeigten 4 (31%) eine Mutation im *CTNNB1*-Gen. Bei 3 der betroffenen Nephroblastome lagen insgesamt 4 Punktmutationen vor, bei einem weiteren eine Deletion. Nur drei der Punktmutationen führten zu einem Austausch einer Aminosäure. Eine weitere Punktmutation ergab eine Basensequenz, die für die gleiche Aminosäure codiert wie die ursprüngliche Basensequenz (Wt 16, CTG \Rightarrow TTG, Leukin 46 Leukin) (Tab. 19).

Zwei der Mutationen sind bisher noch nicht beschrieben worden: Serin 45 Alanin, Serin 45 Glutamin (Abb. 21 bzw. 22). Besonders erwähnenswert ist die *CTNNB1*-Mutation im Nephroblastom Wt16 (Abb. 22), da es sich hier um einen vierfachen Basenaustausch handelt.

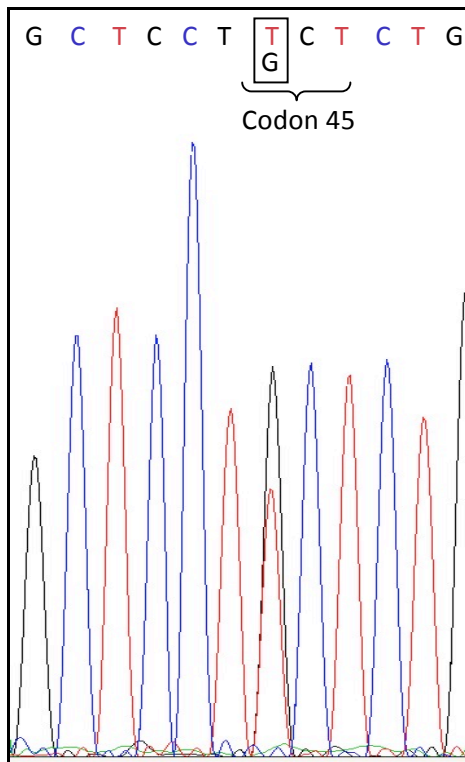


Abbildung 21: Punktmutation im *CTNNB1*-Gen. (Tumor Wt5, Punktmutation in Codon 45, TCT → GCT (Ser45Ala)).

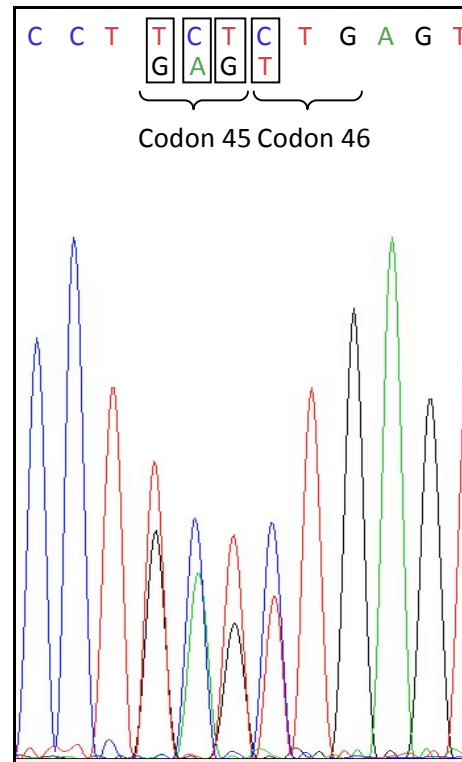


Abbildung 22: 4-facher Basenaustausch im *CTNNB1*-Gen. (Tumor Wt16, Basenaustausch in Codon 45, TCT → GAG (Ser45Glu) und in Codon 46 CTG → TTG (Leu46Leu)).

Tabelle 19: Mutationen und Veränderungen der Proteinsequenz des β -Catenins der Nephroblastome.

4 von 13 Nephroblastomen wiesen wenigstens eine Mutation im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens auf. Von den 4 Punktmutationen führten 3 zu einem Aminosäureaustausch in der Hot-Spot Region des Exon 3. Zudem fand sich noch eine Deletion.

(Δ Deletion, bp Basenpaare, \Rightarrow wird zu).

Tumorprobe	Nukleotidveränderung	Auswirkung der Mutation
Wt 3	ACC \Rightarrow GCC	Threonin 41 Alanin
Wt 4	keine	keine
Wt 5	TCT \Rightarrow GCT	Serin 45 Alanin
Wt 7	keine	keine
Wt 8	keine	keine
Wt 9	keine	keine
Wt 10	Δ 3 bp	Δ Codon 45
Wt 11	keine	keine
Wt 12	keine	keine
Wt 14	keine	keine
Wt 15	keine	keine
Wt 16	TCT \Rightarrow GAG CTG \Rightarrow TTG	Serin 45 Glutamin Leukin 46 Leukin
Wt 17	keine	keine

6.1.3. Neuroblastome

Bei den Mutationsanalysen konnten keine Mutationen im *CTNNB1*-Gen der untersuchten Neuroblastome nachgewiesen werden.

6.1.4. Rhabdomyosarkome

Auch die analysierten Rhabdomyosarkome wiesen keine Mutationen im *CTNNB1*-Gen auf.

6.1.5. Weichteilsarkome

Alle zusätzlich zu den Rhabdomyosarkomen noch untersuchten Weichteilsarkome waren genotypische im *CTNNB1*-Gen unauffällig.

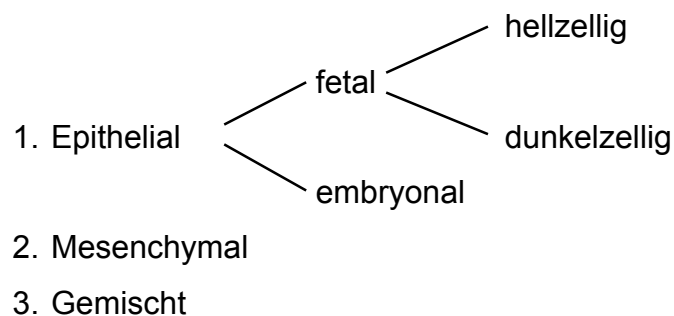
6.2. HE-Färbung und Immunhistochemie

Es sollte mittels HE-Färbung und Immunhistochemie die Frage geklärt werden, ob Tumore, die eine Mutation im *CTNNB1*-Gen aufweisen im Vergleich zu Tumoren ohne diese Mutation und Lebernorgalgewebe ein anderes Verhalten in der Expression von GS und CYP zeigen. Anhand der Immunhistochemie wurden Unterschiede im Expressionsmuster von GS und CYP analysiert. Die Untersuchung mittels HE-Färbung diente zur Differenzierung morphologischer Strukturen.

Der Nachweis von GS und CYP beruht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen. Als Antigen fungieren die darzustellenden Proteine. Über einen gegen den ersten proteinspezifischen Antikörper gerichteten, enzymgekoppelten zweiten Antikörper kommt es nach Substratzugabe zu einer Farbreaktionen und somit zur Visualisierung von GS und CYP.

6.2.1. Hepatoblastome

Die Klassifizierung der Hepatoblastome wurde nach folgender Einteilung vorgenommen:



Diese Tumortypen können nebeneinander in der gleichen Tumorprobe vorkommen (Tab. 20).

6.2.1.1. HE- und GS-Färbung der Hepatoblastome

Eine mögliche mikroskopische Einteilung der Leber kann in sogenannte Leberläppchen erfolgen, in deren Zentrum sich eine Zentralvene befindet (Einleitung, Abb. 5).

Die mikroskopische Struktur des Lebernorgangewebes, wie sie in der HE-Färbung gesehen werden kann, ist weitgehend homogen (Abb. 23).

In der Glutaminsynthetase (GS)-Färbung färbten sich im Lebernorgangewebe nur ein bis drei Zellschichten um die Zentralvene herum. Es entsteht so ein typisches Bild (Abb. 24).

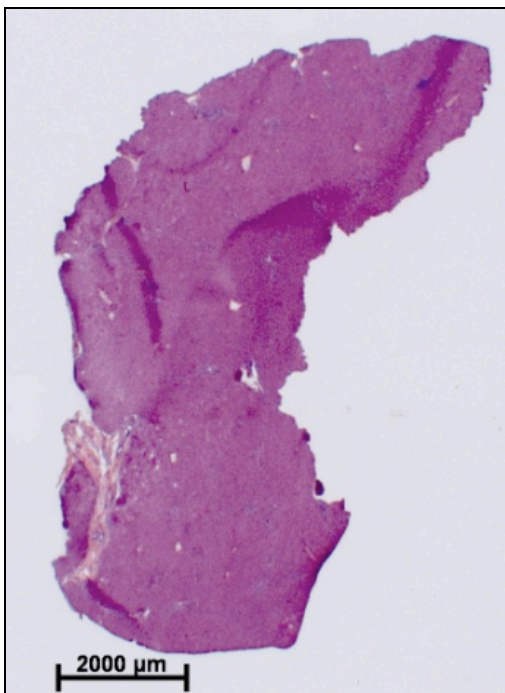


Abbildung 23: HE-Färbung eines Lebernorgangewebes. (Referenzgewebe zu Hepato-blastom Hb7).

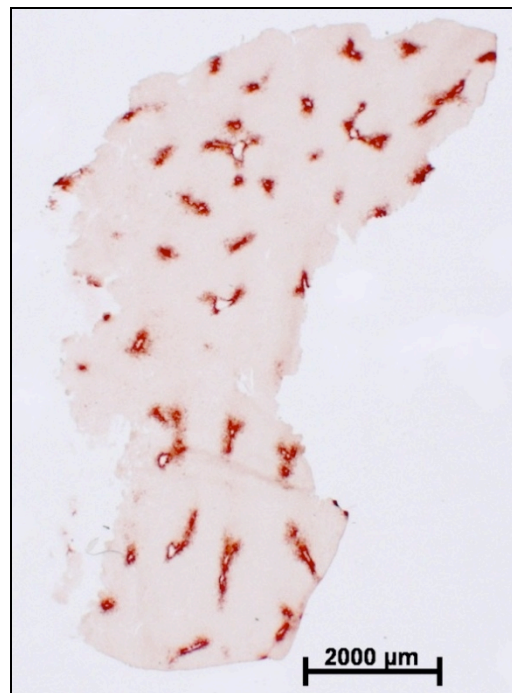


Abbildung 24: GS-Färbung eines Lebernorgangewebes. (Korrespondierender Schnitt zu Schnitt für Abb. 23). Die GS wird nur um die Zentralvenen eines jeden Leberläppchens exprimiert.

Bei den in den Abbildung 25 und 26 dargestellten Schnitten handelt es sich um ein Hepatoblastom (Hb7) mit Mutation im *CTNNB1*-Gen. Man kann nach HE-Färbung deutlich die Grenze zwischen Tumor, auf der rechten Seite, und angrenzendem Normalgewebe, auf der linken Seite erkennen.

Die Färbung desselben Tumors für die GS zeigte eine weitgehend homogene Anfärbung des gesamten Tumorbereiches (Abb. 26). Dies steht im Gegensatz zu der Expression der GS nur um die Zentralvenen im Lebernorgelgewebe (vgl. Abb. 24).

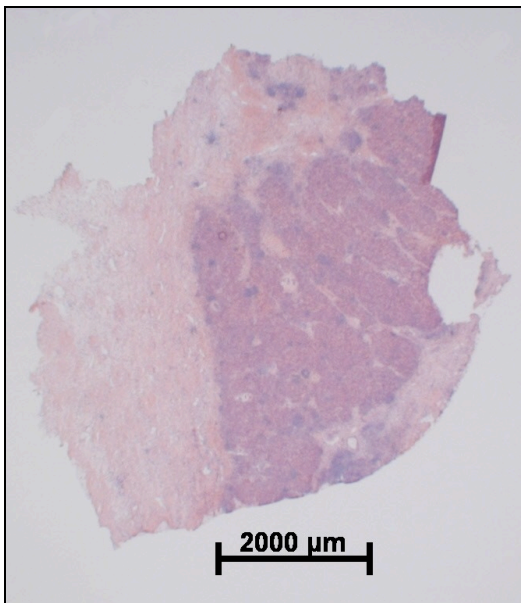


Abbildung 25: HE-Färbung eines *CTNNB1*-mutierten Tumors (Hb7). Histologie: Epithelial, teils embryonal, teils fetal-dunkelzellig. Der Tumorbereich ist wesentlich basophiler als das angrenzende Normalgewebe.

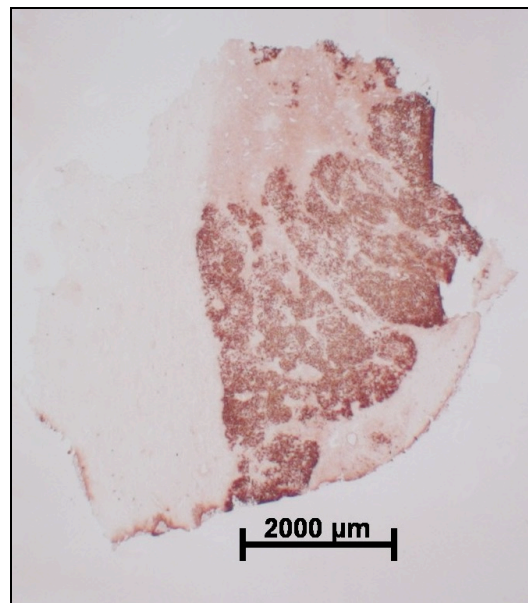


Abbildung 26: GS-Färbung eines *CTNNB1*-mutierten Tumors (Hb7). (Korrespondierender Schnitt zu Schnitt für Abb. 25). Im Vergleich zum Normalgewebe (vgl. Abb. 24) ist nicht nur der Bereich um die Zentralvene, sondern der ganze Tumorbereich stark dunkel GS-gefärbt.

Eine vermehrte Produktion der GS konnte bei 9 der 10 Hepatoblastome festgestellt werden (Tab. 20). Von diesen 9 GS-positiven Tumoren waren 8 im *CTNNB1*-Gen mutiert, nur einer zeigte keine Mutation (Hb1).

Die genaue histologische Untersuchung ergab, dass beide Subtypen der epithelialen Hepatoblastome, embryonale und fetale, die GS vermehrt produzierten. Tumorbereiche vom mesenchymalen Subtyp und mit duktaler Differenzierung hingegen waren GS-negativ (Hb4, 5 und 10; Tab. 20).

Bei 5 der 9 GS-positiven Tumoren fiel eine deutlich vermehrte Expression der GS vor allem im Randbereich zwischen Tumor und umgebendem Stromagewebe auf (Hb1, Hb3, Hb4, Hb5 und Hb10; Abb. 28, gezeigt für Hb3). Diese randständige Färbung war ausschließlich bei epithelialen-fetalen Hepatoblastomen vom hellzelligen Subtyp zu sehen (Tab. 20).

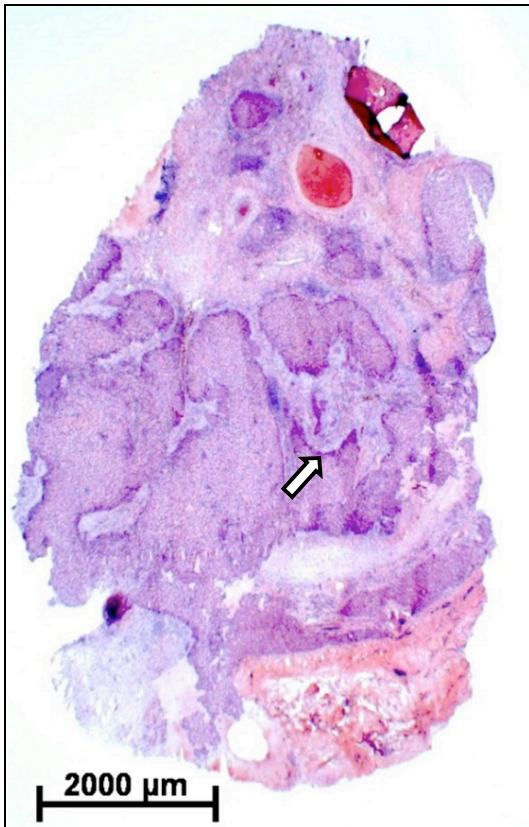


Abbildung 27: HE-Färbung eines *CTNNB1*-mutierten Tumors (Hb3). Histologie: Epithelial-fetal, hellzelliger Subtyp. Die verstärkte Anfärbung im Randbereich des Tumors ist vor allem auf eine erhöhte Kern-Plasma-Relation zurück zu führen (Pfeil).

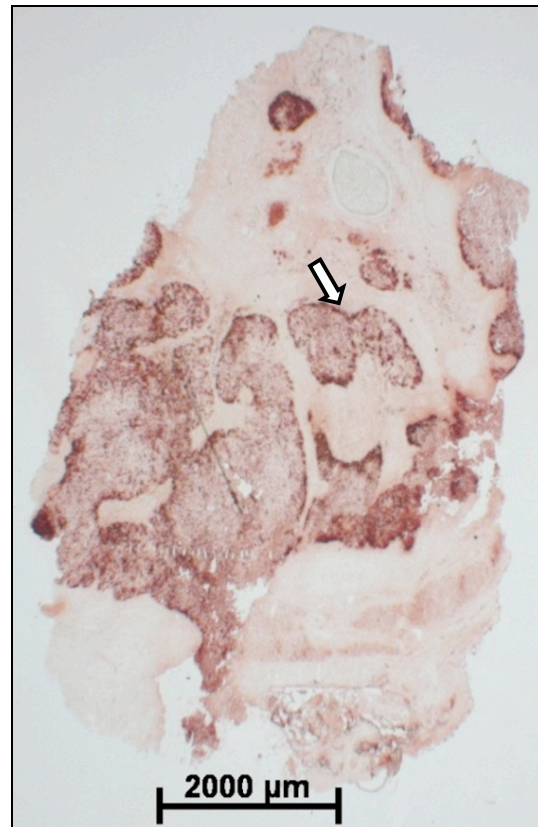


Abbildung 28: GS-Färbung Hepatoblastom Hb3. (Korrespondierender Schnitt zu Schnitt für Abb. 27). Die GS wird vor allem im Randbereich (über-)exprimiert (Pfeil).

Tabelle 20: *CTNNB1*-Mutation, Histologie und GS-Expression der Hepatoblastome. Die GS wurde in beiden epithelialen Subtypen, embryonalen und fetalen, exprimiert. Aber nur epitheliale Tumorbereiche vom fetal-hellzelligem Subtyp wiesen eine randständige Färbung der GS-Expression auf. Epithelial-embryonale Areale exprimierten die GS homogen im ganzen Tumorbereich. Hepatoblastome vom mesenchymalen Subtyp und mit duktalem Differenzierung waren GS-negativ. (CTNNB1-Mutation).

Tumor	Histologie	Muster der GS-Expression
Hb1	Epithelial, überwiegend fetal-hellzellig; embryonale Anteile	Fetal-hellzellige Areale: randständig; embryonale Areale: homogen
Hb2	Epithelial, embryonaler Subtyp	keine Expression
Hb3	Epithelial, vor allem fetal-hellzellig; Plattenepithelmetaplasien	Fetal-hellzellige Areale: randständig
Hb4	Epithelial, überwiegend embryonal; fetal-hellzelliger Anteil; duktales Areal	Embryonale Areale: homogen; fetal-hellzellige Areale: randständig; duktales Bereiche: keine Expression
Hb5	Gemischt, überwiegend epithelial-embryonal; mesenchymaler Anteil mit Osteoid; fetal-hellzelliges Areal	Fetal-hellzelliges Areal: randständig; embryonale Bereiche: homogen; mesenchymaler Anteil: keine Expression
Hb6	Epithelial, embryonaler Subtyp	Homogen
Hb7	Epithelial, teils embryonal, teils fetal-dunkelzellig	Homogen
Hb9	Epithelial, fetal-dunkelzelliger Subtyp	Homogen
Hb10	Gemischt, epithelial-embryonal und mesenchymal; kleiner epithelial-fetaler (hellzelliger) Bereich	Fetal-hellzelliges Areal: randständig; embryonale Bereiche: homogen; mesenchymaler Bereich: keine Expression
Hb12	Epithelial, überwiegend embryonal; fetale Anteile, dunkelzellig	Homogen

In den Abbildungen 29 und 30 wird durch die stärkere Vergrößerung die Randständigkeit der GS-Expression in den epithelial-fetalen Hepatoblastomen vom hellzelligen Subtyp noch deutlicher sichtbar.

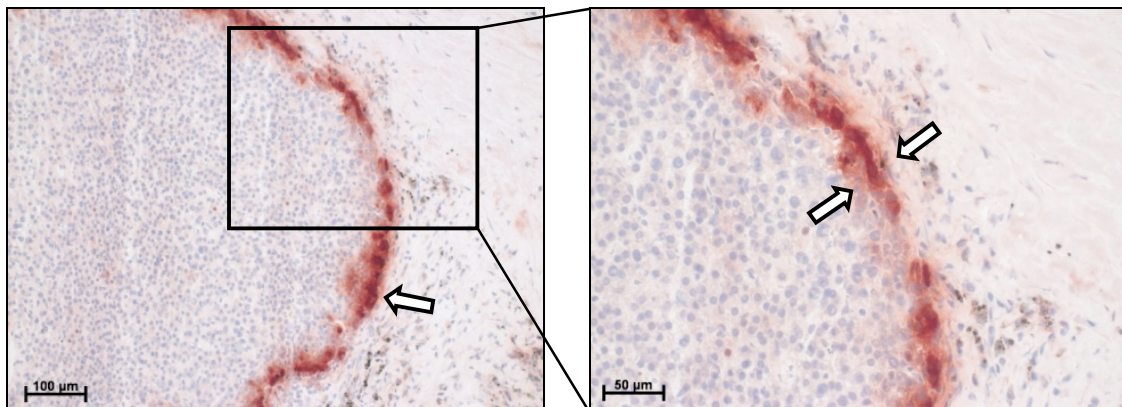


Abbildung 29: Randständige GS-Färbung bei Hepatoblastom Hb10; 20x. Histologie: Fetal-hellzelliger Bereich des gemischten Tumors. In größerer Vergrößerung (20x) zeigt sich auch bei diesem genotypisch *CTNNB1*-mutierten Tumor in der GS-Färbung eine erhöhte Expression der GS im Randbereich (Pfeil).

Abbildung 30: Randständige GS-Färbung bei Hepatoblastom Hb10; 40x. In der 40-fachen Vergrößerung ist zu erkennen, dass die GS nur von ca. 1 – 3 Zellschichten am Rand des Tumors vermehrt exprimiert wird (Pfeile); ähnlich den 1 – 3 Zellschichten um die Zentralvene im Lebernorgangewebe.

6.2.1.2. Cytochrom P450 (CYP)-Färbungen der Hepatoblastome

Untersucht wurden in dieser Arbeit die CYP-Isoformen 1A2, 2B1, 2C6, 2D6, 2E1 und 3A4.

Die CYP-Enzyme werden im Lebernorgangewebe nach einem ganz typischen Muster in den Leberläppchen exprimiert (Abb. 31). Durch die geringe Expression der CYP in der Lläppchenperipherie lassen sich die Lläppchen gut gegeneinander abgrenzen.

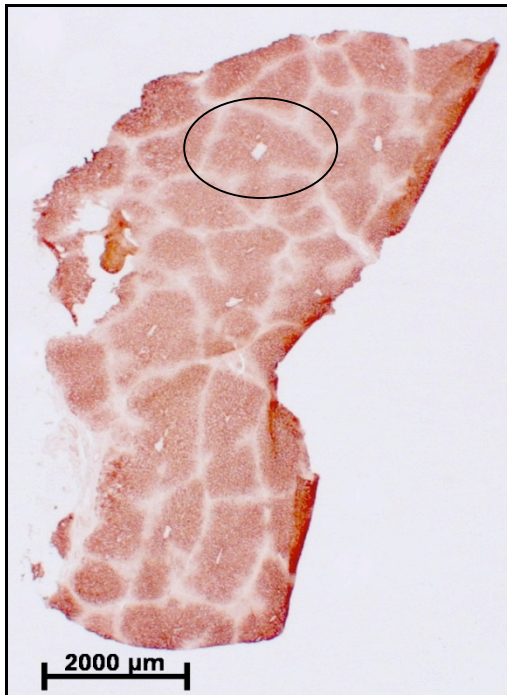


Abbildung 31:
CYP 2E1-Färbung eines Leber-
normalgewebes (Referenzgewebe
zu Hb7).
(Oval umrahmt: Leberläppchen mit
Zentralvene in der Mitte)

Alle GS-positiven Hepatoblastome exprimierten in ihren GS-positiven Bereichen wenigstens ein CYP-Isoenzym (Abb. 32, für Hb3 abgebildet). Eine Regel, dass nur bestimmte CYP-Isoenzyme in den GS-positiven Bereichen des Tumors verstärkt produziert werden, lässt sich nicht aufstellen. Die CYP-Expression in diesen Bereichen variierte je nach Tumor (Tab. 21).

Beim Hepatoblastom Hb3 war die CYP-Expression in einem GS-negativen Bereich des Tumors am stärksten ausgeprägt (Abb. 32). Es handelt sich bei diesem GS-negativen Tumorbereich um den gleichen histologischen Subtyp des Hepatoblastoms der bei den GS-positiven Bereichen vorliegt. Allerdings ist in diesem Bereich eine erhöhte Zelldichte zu sehen (vgl. HE-Färbung der Probe Abb. 27).

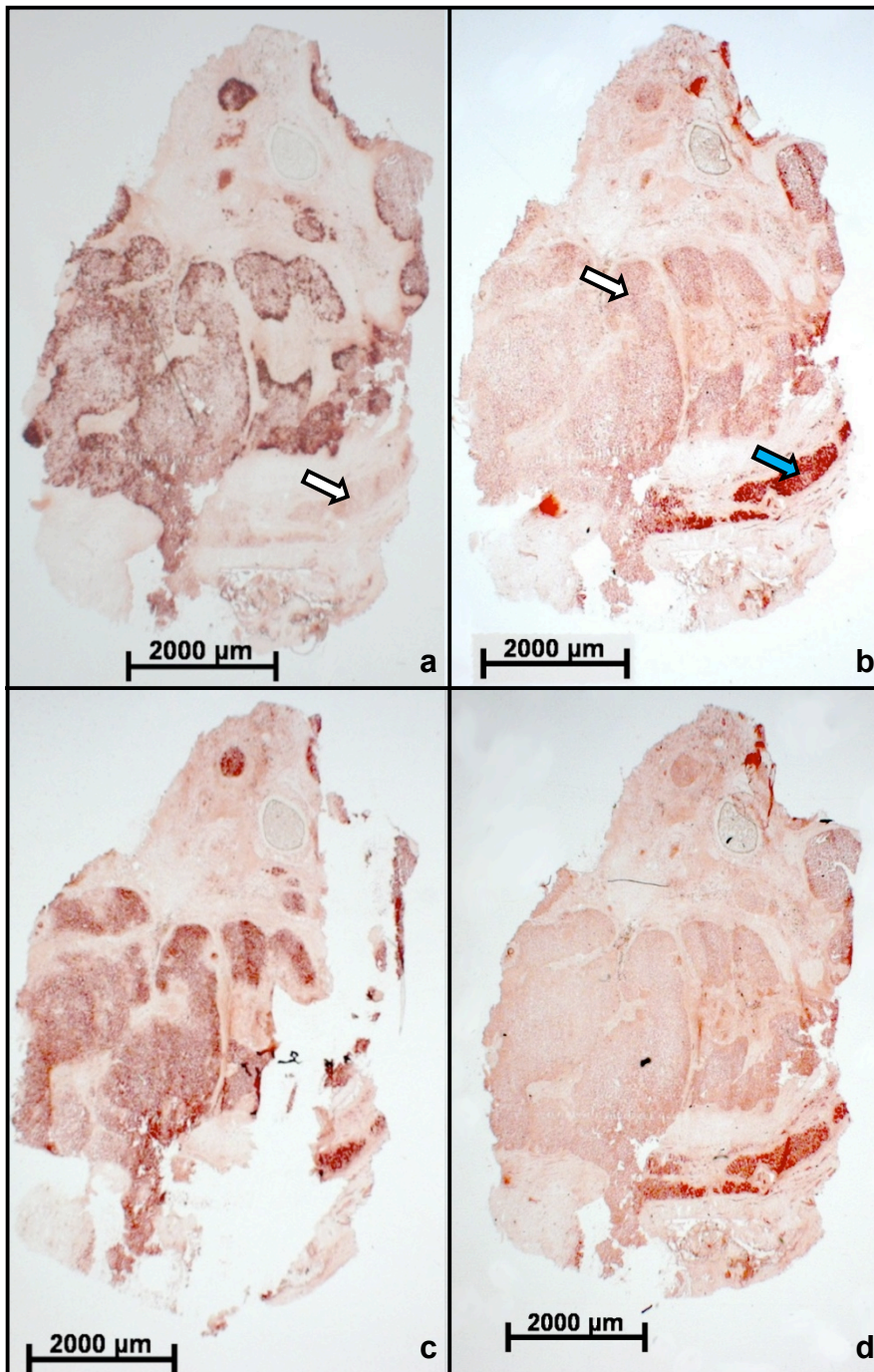


Abbildung 32: GS- und verschiedene CYP-Färbungen des Hepatoblastoms Hb3 in der Übersicht. Histologie: Epithelial-fetal, hellzelliger Subtyp.

a) GS-Färbung mit verstärkter Expression im Randbereich: GS-negativer Tumorbereich mit ausgeprägter erhöhter Zelldichte (Pfeil); b) CYP 2C6-Färbung, GS-positive Tumorbereiche exprimierten auch das CYP 2C6 (Pfeil), allerdings ist die stärkste Expression in einem Tumorbereich zu sehen, der keine GS produziert (blauer Pfeil); c) CYP 2E1-Färbung, das Expressionsmuster dieser CYP-Isoform entspricht der des CYP 2C6; insgesamt stärkere Expression; d) CYP-2B1-Färbung, Expressionsmuster wie 2C6 und 2E1; nur schwächere Expression.

Tabelle 21: *CTNNB1*-Mutation und immunhistochemische Färbungen der Hepatoblastome.

Alle Hepatoblastome, die im Genotyp *CTNNB1*-mutiert waren (unterstrichen) zeigten auch eine GS-Positivität. Zudem war der nicht mutierte Tumor Hb1 GS-positiv.

Die GS-positiven Tumore produzierten auch CYP, allerdings unterschiedliche Isoformen, so dass auf keine direkte Korrelation zwischen GS-Expression bzw. *CTNNB1*-Mutation und Expression einer der CYP-Isoformen geschlossen werden kann.

(_unterstrichen *CTNNB1*-mutiert; visuelle Ausprägung der jeweiligen Anfärbung: (+) leicht, + moderat, ++ stark, +++ sehr stark, – keine Anfärbung; Ø nicht durchgeführt).

Tumor	GS	CYP					
		1A2	2B1	2C6	2D6	2E1	3A4
Hb1	+	–	–	–	+	–	+
Hb2	–	–	–	–	–	–	–
<u>Hb3</u>	+++	–	stellenweise +	+	–	+++	++
<u>Hb4</u>	++	–	stellenweise (+)	stellenweise (+)	–	–	(+)
<u>Hb5</u>	++	–	–	++	(+)	+	(+)
<u>Hb6</u>	++	–	–	–	Ø	stellenweise +	Ø
<u>Hb7</u>	++	(+)	(+)	+	Ø	+	Ø
<u>Hb9</u>	++	–	–	(+)	Ø	+	Ø
<u>Hb10</u>	++	–	–	+	Ø	++	Ø
<u>Hb12</u>	+	–	–	–	(+)	(+)	–

Ein Vergleich der CYP-Färbung von Hepatoblastomen mit *CTNNB1*-Mutation mit der Färbung korrespondierender Lebernorgangewebe ergab kein einheitliches Muster der Stärke der CYP-Expression. Die Isoenzyme zeigten im Vergleich zu den Normalgeweben alle Variationen, d.h. sowohl geringere, gleiche oder stärkere Anfärbung. Dabei verhielten sich die verschiedenen Isoenzyme nicht gleich (Tab. 22).

Tabelle 22: Vergleich der immunhistochemischen Enzym-Färbungen (GS und CYP) zwischen Hepatoblastomen mit *CTNNB1*-Mutation und korrespondierenden Lebernorgangeweben.

Alle Tumoren produzierten mehr GS im Vergleich zum Normalgewebe. Für die CYP-Expression der Tumoren ist kein einheitliches Muster erkennbar.

(unterstrichen *CTNNB1*-mutiert; > der Tumor exprimiert mehr Enzym als das Normalgewebe, < das Normalgewebe produzierte mehr Enzym als der Tumor, = kein Unterschied in der Expression).

Tumor : Normalgewebe	GS	CYP			
		1A2	2B1	2C6	2E1
<u>Hb3</u> : NG3	>	=	1 Stelle >, sonst =	>	>
<u>Hb4</u> : NG4	>	<	<	<	<
<u>Hb6</u> : NG6	>	=	<	<	<
<u>Hb7</u> : NG7	>	=	>	>	<
<u>Hb9</u> : NG9	>	=	<	<	<

In der CYP 2E1-Färbung des Hepatoblastoms Hb3 war der Rand des Tumors zum Teil von der CYP-Färbung ausgespart. Es entstand so das Bild eines blauen „HE-Saums“ (Abb. 33 und 34). Im Vergleich dieser Färbung mit der GS-Färbung zeigte sich, dass dieser Randbereich demjenigen in der GS-Färbung entspricht, der vermehrt GS-positiv ist (Abb. 35 und 36).

Das in den Abbildungen 33 - 36 beobachtete inverse Muster überhöhter GS-Expression und verminderter CYP 2E1-Expression betrifft allerdings nicht den kompletten Tumorbereich, sondern beschränkt sich alleine auf den Randbereich, so dass vielmehr von einer Akzentuierung der CYP-Färbung in Richtung der Tumormitte zu sprechen ist.

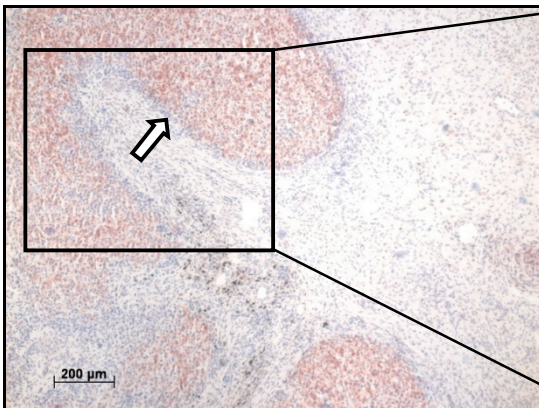


Abbildung 33: CYP 2E1-Färbung, Tumor Hb3, 10x-Vergrößerung. Um den Tumorbereich, der das CYP 2E1 produziert, ist ein blauer „HE-gefärbter-Saum“ sichtbar (Pfeil).

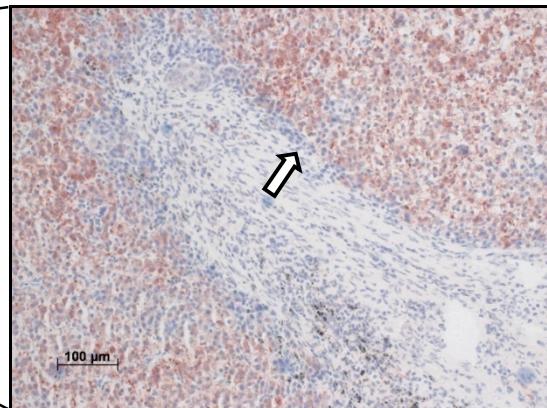


Abbildung 34: CYP 2E1-Färbung, Tumor Hb3, 20x-Vergrößerung. Auch in der größeren Vergrößerung ist der „HE gefärbte-Saum“ aus Zellen sichtbar (Pfeil).

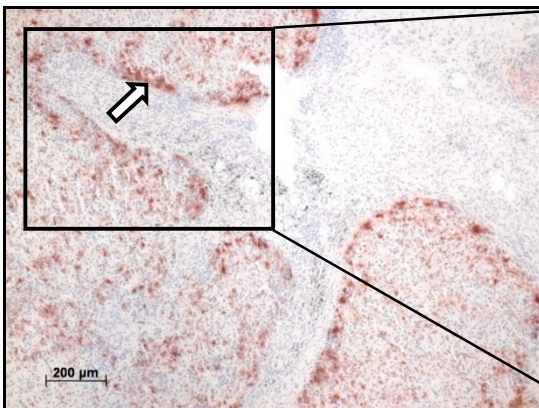


Abbildung 35: GS-Färbung, Tumor Hb3, 10x-Vergrößerung. Der blaue „HE-gefärbte-Saum“ aus Abb. 33 und 34 entspricht in der GS-Färbung dem Randbereich des Tumors, der verstärkt GS-positiv ist (Pfeil).

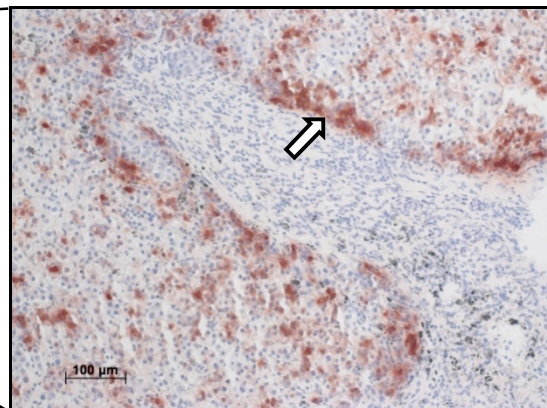


Abbildung 36: GS-Färbung, Tumor Hb3, 20x-Vergrößerung. Hier ist noch besser zu erkennen, dass der „ausgesparte“ Randbereich in den Abb. 33 und 34 dem GS-positiven Randbereich des Tumors in der GS-Färbung entspricht (Pfeil).

6.2.2. Nephroblastome

4 der 13 Nephroblastome wiesen eine Mutation im *CTNNB1*-Gen auf (Wt 3, 5, 10 und 16; Tab. 19).

6.2.2.1. HE- und GS-Färbung der Nephroblastome

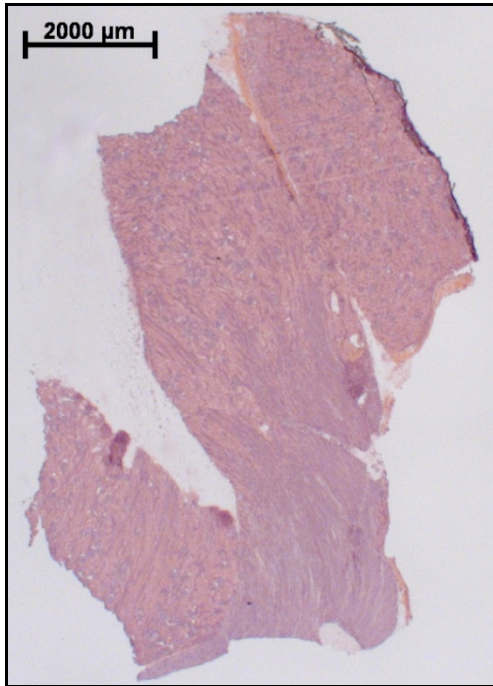


Abbildung 37: HE Färbung Nieren-normalgewebe.
Referenzgewebe zu Nephroblastom Wt3.



Abbildung 38: GS-Färbung des Normalgewebes zu Wt3.
(Korrespondierender Schnitt zu Schnitt für Abb. 37).
Es ist nur eine sehr geringe Expression des Enzyms fest zu stellen.

Die Nierennormalgewebe zeigten keine bis nur eine sehr schwache Anfärbung der GS (Abb. 38).

Die *CTNNB1*-mutierten Nephroblastome (Wt3, 5, 10 und 16) wiesen kein einheitliches GS-Expressionsmuster auf. Die Tumore Wt3, 10 und 16 zeigten eine leichte bis moderate GS-Färbung, Tumor Wt5 war GS-negativ (Tab. 23).

Im Vergleich mit den korrespondierenden Normalgeweben zeigten zwei der Nephroblastome mit Mutation im *CTNNB1*-Gen Wt3 (vgl. Ab. 38 und 40; Tab. 24) und Wt5 (Tab. 24) tendenziell eher eine geringere bis die gleiche Expression der GS. Der Wilms-Tumor Wt10 wies eine leicht stärkere Anfärbung der GS auf als das dazugehörige Normalgewebe (Abb. 41; Tab. 24). Für den *CTNNB1*-mutierten Wilms-Tumor Wt16 lag kein Referenzgewebe für die Immunhistochemie vor.

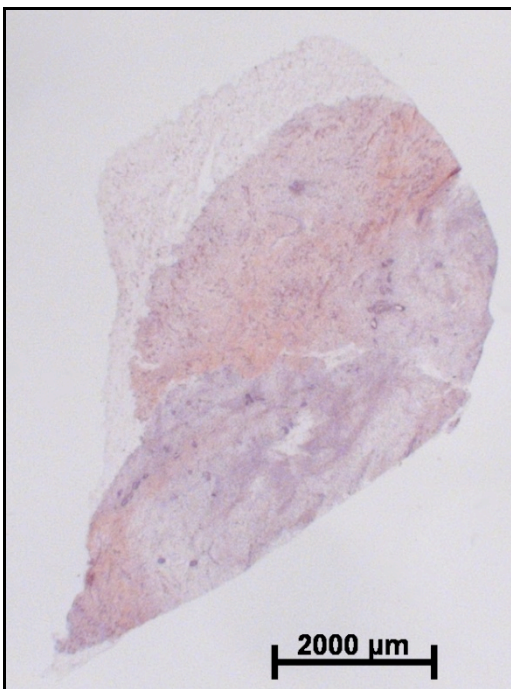


Abbildung 39: HE-Färbung *CTNNB1*-mutiertes Nephroblastom Wt3.

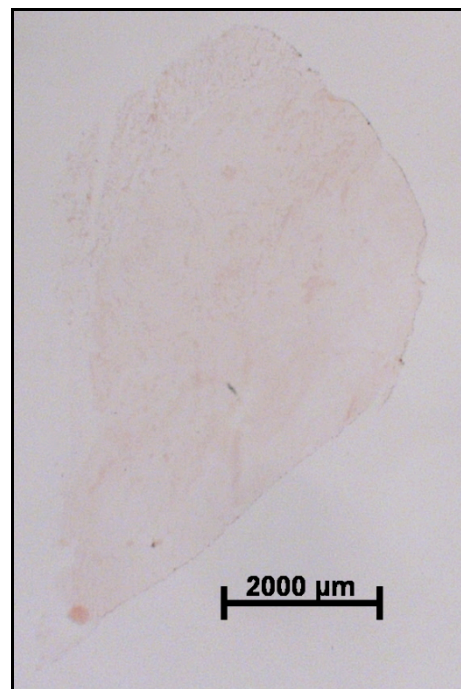


Abbildung 40: GS-Färbung Nephroblastom Wt3. (Korrespondierender Schnitt zu Schnitt für Abb. 39). Im Vergleich zum dazugehörigen Normalgewebe (Abb. 38) ist kaum ein Unterschied in der GS-Expression zu sehen. Tendenziell ist die Anfärbung hier etwas schwächer.

Eine allgemein gültige Regel, dass alle Wilms-Tumoren mit genotypisch mutiertem *CTNNB1* eine erhöhte oder verminderte GS-Menge aufweisen, kann daher nicht aufgestellt werden (Tab. 24).

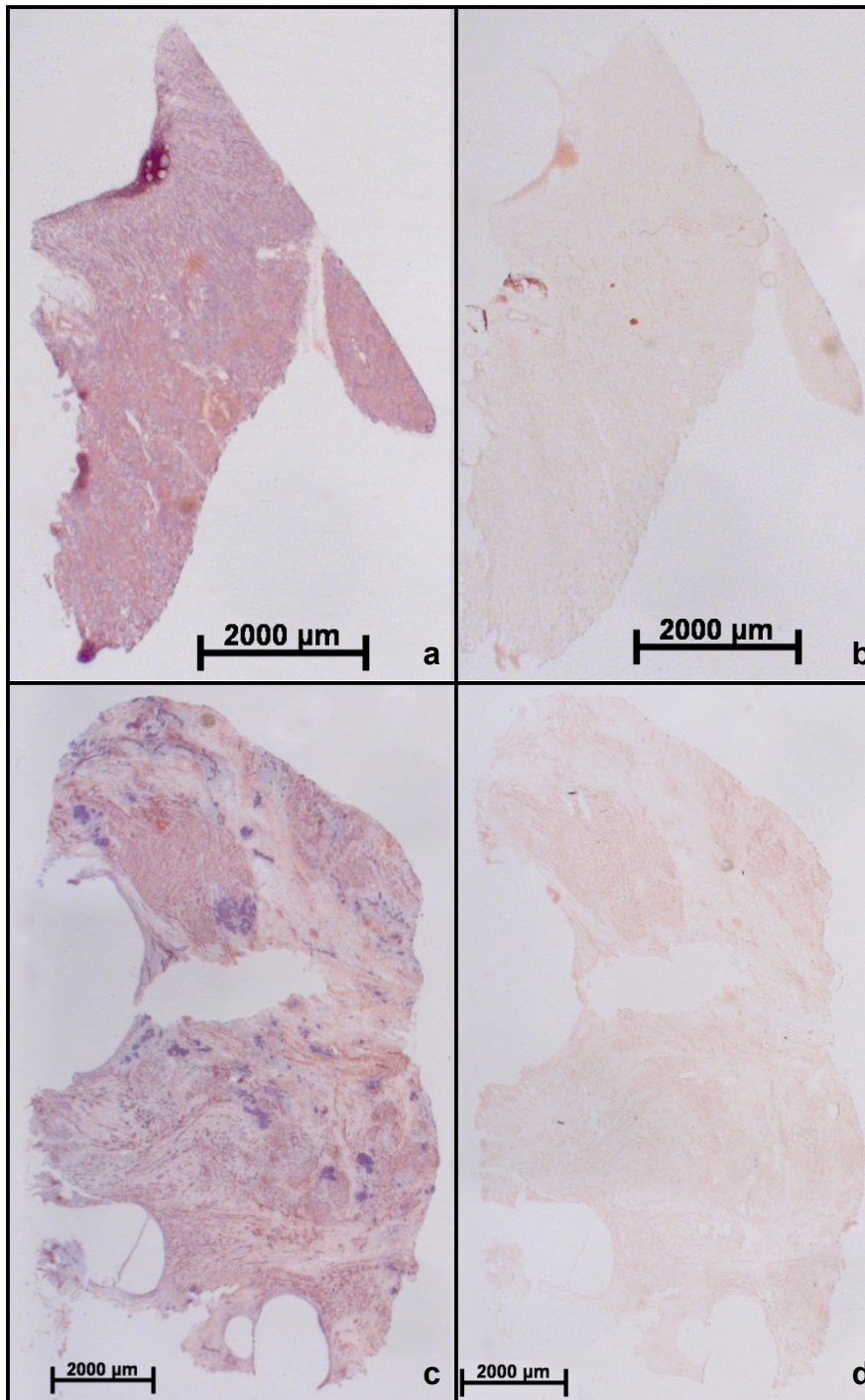


Abbildung 41: HE- und GS-Färbung von Nephroblastom Wt10 und korrespondierendem Normalgewebe.

a) HE-Färbung Normalgewebe zu Wt10; b) GS-Färbung des Normalgewebes, es ist nur eine sehr schwache Anfärbung zu beobachten. c) HE-Färbung Nephroblastom Wt10; d) GS-Färbung des Tumors, im Gegensatz zu den anderen *CTNNB1*-mutierten Wilms-Tumoren, ist hier die GS-Expression im Vergleich zum Normalgewebe etwas erhöht.

6.2.2.2. CYP-Färbung der Nephroblastome

Untersucht wurde die Expression von CYP 1A2 und 2E1. Die korrespondierenden Nierennormalgewebe zeigten selbst große Unterschiede in der Expression der Enzyme. Auch die Nephroblastome mit Mutation im *CTNNB1*-Gen ließen kein einheitliches Expressionsmuster der CYP erkennen (Tab. 23).

Tabelle 23: *CTNNB1*-Mutation und immunhistochemische Färbungen der Nephroblastome.

Die *CTNNB1*-mutierten Wilms-Tumore zeigten kein einheitliches GS-Expressionsmuster und eine unterschiedliche, nicht einheitliche Expression der CYP 1A2 und 2E1. Auch für nicht mutierte Tumore ist kein einheitliches Verhalten festzustellen.

(unterstrichen *CTNNB1*-Mutation; visuelle Ausprägung der jeweiligen Anfärbung: (+) leicht, + moderat, ++ stark, +++ sehr stark, – keine Anfärbung; Ø nicht durchgeführt).

Tumor	GS	CYP	
		1A2	2E1
<u>Wt3</u>	(+)	+	+
Wt4	–	Ø	–
<u>Wt5</u>	–	(+)	(+)
Wt6	–	+	(+)
Wt7	+	stellenweise +	–
Wt8	–	–	–
Wt9	+	++	+
<u>Wt10</u>	+	+	++
Wt11	–	Ø	–
Wt12	(+)	–	–
Wt14	–	Ø	–
Wt15	–	Ø	–
<u>Wt16</u>	(+)	Ø	(+)
Wt17	–	Ø	–

Im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe war bei Nephroblastom Wt10 für die CYP-Isoformen 1A2 und 2E1 jeweils eine erhöhte Expression zu sehen, bei Wt5 eine erniedrigte. Wt3 exprimierte mehr CYP 2E1 als das dazugehörige Normalgewebe und in etwa die gleiche Menge an CYP 1A2 (Tab. 24).

Tabelle 24: Vergleich der immunhistochemischen Enzym-Färbungen (GS und CYP) von Nephroblastomen mit korrespondierenden Nierennormalgeweben.

Von den Nephroblastomen mit Mutation im *CTNNB1*-Gen produzierten zwei (Wt3 und 5) weniger bzw. gleich viel und einer (Wt10) mehr GS als das korrespondierende Normalgewebe. Für Tumor Wt16 stand kein Referenzgewebe zur Verfügung.

Die CYP-Expression der *CTNNB1*-mutierten Tumore lässt kein Schema erkennen. Wt10 zeigte insgesamt eine vermehrte Expression der Enzyme, Wt5 dagegen eine geringere Expression. Wt3 hatte im Vergleich die höhere CYP 2E1-, aber die gleiche CYP 1A2-Expression.

Die nicht *CTNNB1*-mutierten Tumore zeigten im Vergleich zu den Normalgeweben ebenfalls kein einheitliches GS-Expressionsverhalten. Die CYP wurden von den Tumoren gleich oder weniger exprimiert.

(unterstrichen *CTNNB1*-mutiert; > der Tumor exprimiert mehr Enzym als das Normalgewebe, < das Normalgewebe produzierte mehr Enzym als der Tumor, = kein Unterschied in der Expression; Ø nicht untersucht).

Tumor : Normalgewebe	GS	CYP	
		1A2	2E1
<u>Wt3</u> : NG3	<	=	>
<u>Wt5</u> : NG5	=	<	<
<u>Wt8</u> : NG8	<	<	<
<u>Wt10</u> : NG10	>	>	>
<u>Wt11</u> : NG11	<	Ø	<
<u>Wt12</u> : NG12	=	<	<
<u>Wt14</u> : NG14	<	Ø	<
<u>Wt15</u> : NG15	>	Ø	=
<u>Wt17</u> : NG17	<	Ø	<

Die in den Tabellen 23 und 24 zusammengefassten Ergebnisse der Immunhistochemie der Wilms-Tumoren zeigen, dass keine Korrelation zwischen GS- und CYP-Expression und *CTNNB1*-Mutation besteht.

6.3. Western-Blot

Um die in Relation zum Lebernorgangewebe erhöhte GS-Expression in *CTNNB1*-mutierten Hepatoblastomen und die erhöhte Expression verschiedener CYP-Isoformen auch quantitativ zu bestimmen, wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt; 1) das die Proteinexpression bestimmende Western-Blotting und 2) das LightCycler Verfahren, das die Transkriptionsrate der untersuchten Gene (GS und CYP) erfasst (Kap. 6.4.).

Es waren zu fünf der 10 Hepatoblastome Lebernorgangewebe verfügbar (zu Hb3, 4, 6, 7 und 9).

6.3.1. β -Catenin-Western-Blot der Hepatoblastome

Aufgrund der Deletion sind bei den Hepatoblastomen Hb4 und 5 zwei Banden im β -Catenin-Western-Blot zu sehen. Eine in der Größe des β -Catenin-Proteins (92 kDa) und aufgrund der Deletion eine zweite, kleinere Bande (Abb. 42, gezeigt für Hb4). Hepatoblastome mit Punktmutation weisen nur eine Bande auf (Abb. 42, gezeigt für Hb3).

Die Expression von β -Catenin war bei Hb4 und Hb6 im Vergleich zum Normalgewebe deutlich stärker ausgeprägt, bei den anderen Tumoren (Hb3, 7 und 9) wenigstens gleich stark (Tab. 25).

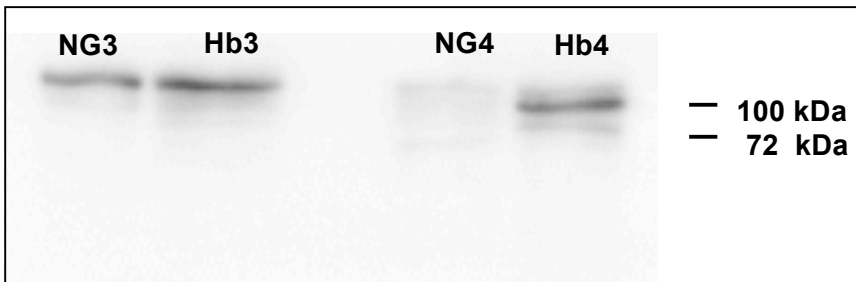


Abbildung 42: β -Catenin-Western-Blot (92 kDa), Hepatoblastome Hb3, Hb4 und korrespondierende Normalgewebe (NG3 bzw. NG4); aufgetragene Proteinmengen 10 μ g.

Im Vergleich zum Normalgewebe exprimierte Tumor Hb4 deutliche mehr, Tumor Hb3 wenigstens gleich viel β -Catenin wie das korrespondierende Normalgewebe.

6.3.2. GS-Western-Blot der Hepatoblastome

Im Vergleich zu den Lebernorgangeweben zeigten vier der entsprechenden Hepatoblastome auch im Western-Blot eine erhöhte GS-Expression (Hb3, 4, 7 und 9). Die Banden von Hb6 und dem dazugehörigen Lebernorgangewebe sind in etwa gleich und lassen keinen Unterschied in der GS Menge erkennen (Tab. 25).

Abbildung 43 zeigt den quantitativen Unterschied der GS-Expression am Beispiel von Hb3 und Hb4.

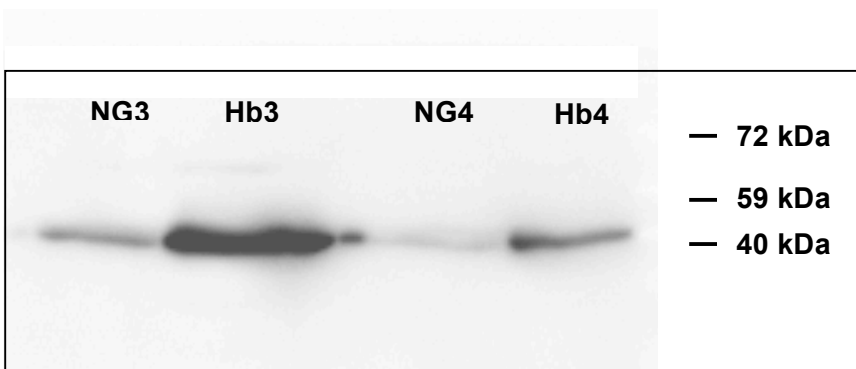


Abbildung 43: GS-Western-Blot (45 kDa), Hepatoblastome Hb3, Hb4 und korrespondierende Normalgewebe (NG3 bzw. NG4); aufgetragene Proteinmengen 50 μ g.

Die *CTNNB1*-mutierten Tumore exprimierten mehr GS als die korrespondierenden Lebernorgangewebe.

6.3.2.1. CYP-Western-Blot der Hepatoblastome

Untersucht wurde das CYP-Isoenzym 2E1. Bis auf Hb9 zeigten die Tumore eine geringere Expression des CYP 2E1 als die korrespondierenden Normalgewebe (Abb. 44, gezeigt für Hb3 und Hb4).

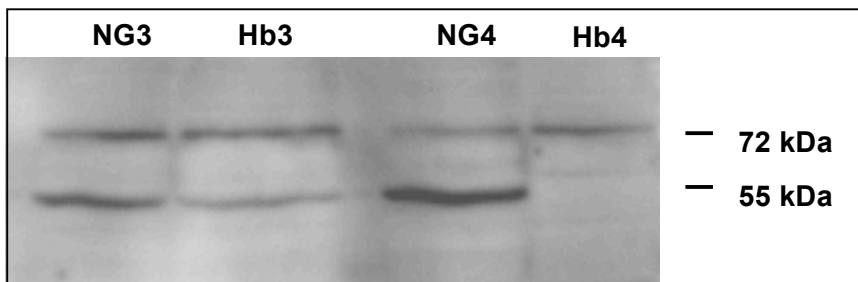


Abbildung 44: CYP-Western-Blot 2E1 (~50 – 55 kDa), Hepatoblastome Hb3, Hb4 und korrespondierende Normalgewebe (NG3 bzw. NG4); aufgetragene Proteinmengen 50 µg. Hb3 exprimierte weniger CYP als NG3. Für Hb4 ist gar keine Bande für das CYP zu sehen.

Tabelle 25: Western-Blot-Untersuchungen für β -Catenin, GS und CYP 2E1 der Hepatoblastome.

Hb 4 und 6 wiesen eine deutlich erhöhte, die anderen Tumore eine vergleichbare Expressionsmenge an β -Catenin auf. Alle *CTNNB1*-mutierten Tumore exprimierten mehr (4) oder vergleichbar viel (1) GS wie die korrespondierenden Lebernorgewebe. Für das CYP 2E1 zeigten die Tumore (bis auf Hb9) eine schwächere Expression als die Normalgewebe.

(unterstrichen *CTNNB1*-mutiert; > der Tumor exprimierte mehr Protein als das Normalgewebe, < das Normalgewebe produzierte mehr Protein als der Tumor, = kein Unterschied in der Expression).

Tumor :	β -Catenin	GS	CYP 2E1
<u>Normalgewebe</u>			
<u>Hb3</u> : NG3	=	>	<
<u>Hb4</u> : NG4	>	>	<
<u>Hb6</u> : NG6	>	=	<
<u>Hb7</u> : NG7	=	>	<
<u>Hb9</u> : NG9	=	>	=

6.4. Light-Cycler

Die zweite Methode zur quantitativen Auswertung der Enzym-Expression der Hepatoblastome war das Light-Cycler Verfahren. Es wurden die Expression von GS und CYP 1A1 untersucht.

Aus den Hepatoblastom- und Lebernorgalgewebeprouben wurde durch Zusatz von Trizol bei gleichzeitigem mechanischem Aufschluss der Zellen durch eine Vibrationskugelmühle RNA isoliert. Die so gewonnene RNA wurde durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA kam letztendlich im LightCycler zur quantitativen PCR zum Einsatz.

6.4.1. GS-LightCycler-Verfahren

Wie der Verlauf der Schmelzkurve zeigt (Abb. 45) waren keine Nebenprodukte bei dem GS-LightCycler-Verfahren vorhanden.

Die Ergebnisse einer erhöhten GS-Expression in allen *CTNNB1*-mutierten Tumoren konnte im LightCycler-Verfahren bestätigt werden (Abb. 46). Für jeden Tumor konnte mit einer LightCycler Probe eine erhöhte GS-Expression nachgewiesen werden (Abb. 46). Allerdings zeigten sich bei zwei verschiedenen Proben des gleichen Tumors (Hb3) unterschiedliche GS-Expressionshöhen – einmal eine erhöhte GS-Expression im Vergleich zum Normalgewebe (Hb3a), das andere Mal eine verminderte Expression der GS im Vergleich zum Normalgewebe (Hb3b).

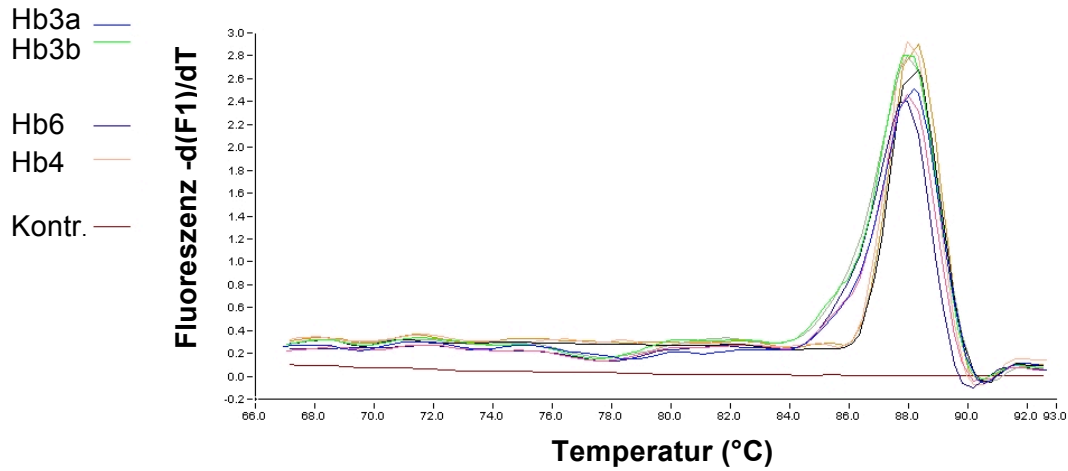


Abbildung 45: Schmelzkurve GS-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome. Es zeigten sich keine Nebenprodukte.

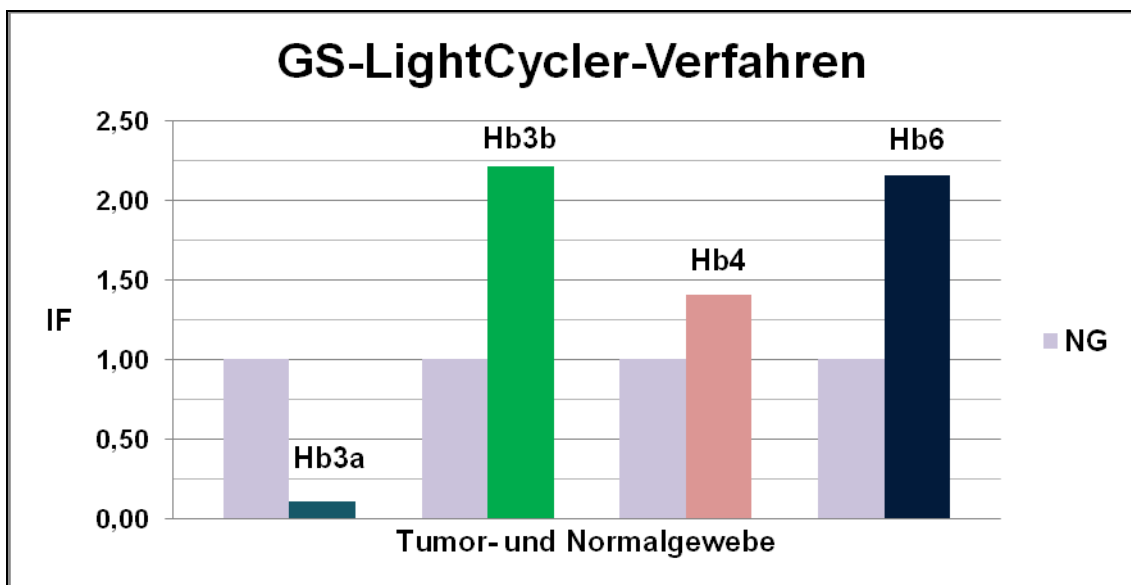


Abbildung 46: GS-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome und der korrespondierenden Lebernorgewebe, auf welches normiert wurde.

Die Proben Hb3a und Hb3b stammen aus dem gleichen Tumor Hb3, wurden aber für die LightCycler-Untersuchung jeweils neu isoliert. Die Tumore (Hb3b, Hb4 und Hb6) überexprimierten die GS im Vergleich zum dazugehörigen Lebernorgewebe. Die zweite Probe aus dem Tumor Hb3 (Hb3a) exprimierte die GS weniger stark als das korrespondierende Normalgewebe.

6.4.2. CYP-LightCycler-Verfahren

Nur der Verlauf der Schmelzkurve von Normalgewebe 3 zeigte minimale Mengen eines Nebenprodukts (Abb. 47).

Bei dem CYP-LightCycler-Verfahren der Isoform 1A1 zeigte sich je nach Hepatoblastom eine unterschiedliche Expressionshöhe – teilweise mehr, teilweise weniger als das dazugehörige Normalgewebe (Abb. 48). Dies war auch bei der Immunhistochemie des CYP 1A2 der Fall (CYP 1A1 und 1A2 besitzen den gleichen Promotor, womit eine Vergleichbarkeit gewährleistet ist), aber der Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Methoden untereinander ergibt keine Übereinstimmungen (Abb. 48, Tab. 22). So wies z.B. Hb4 für CYP 1A2 in der Immunhistochemie eine geringere Färbung auf, CYP 1A1 im LightCycler-Verfahren eine vermehrte.

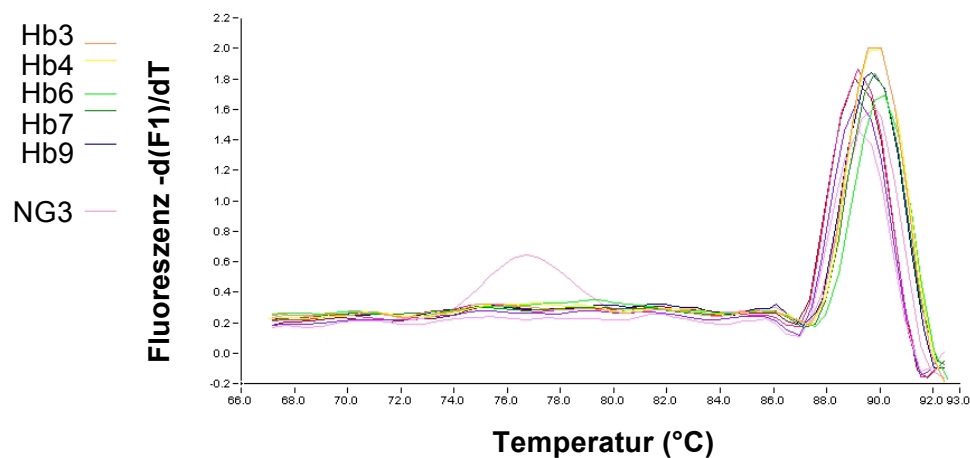


Abbildung 47: Schmelzkurve CYP 1A1-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome. Nur das Normalgewebe 3 zeigte etwas Nebenprodukte, ansonsten war nur das gewünschte Produkt entstanden.

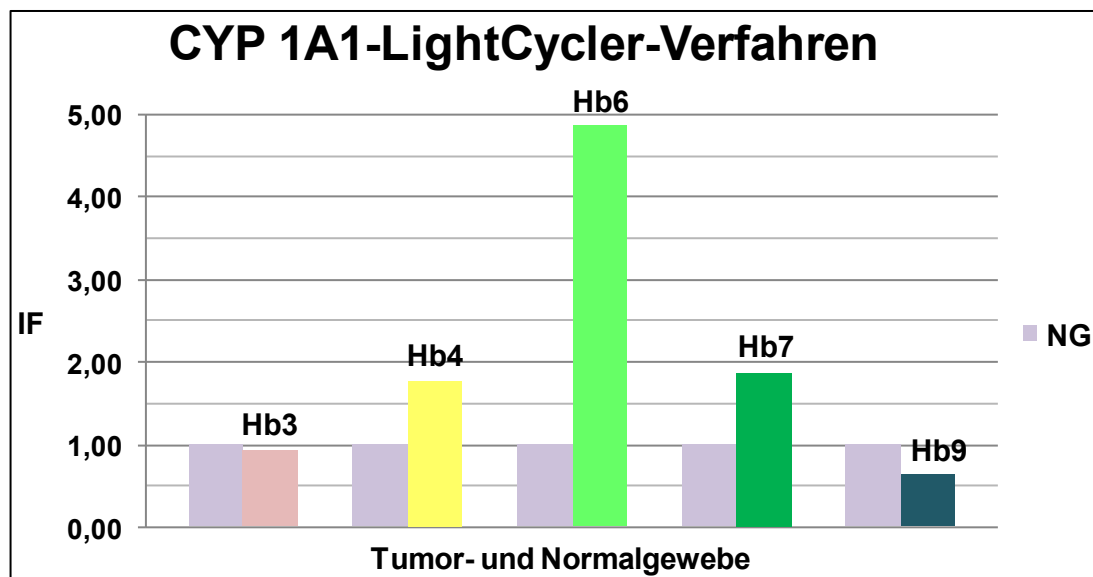
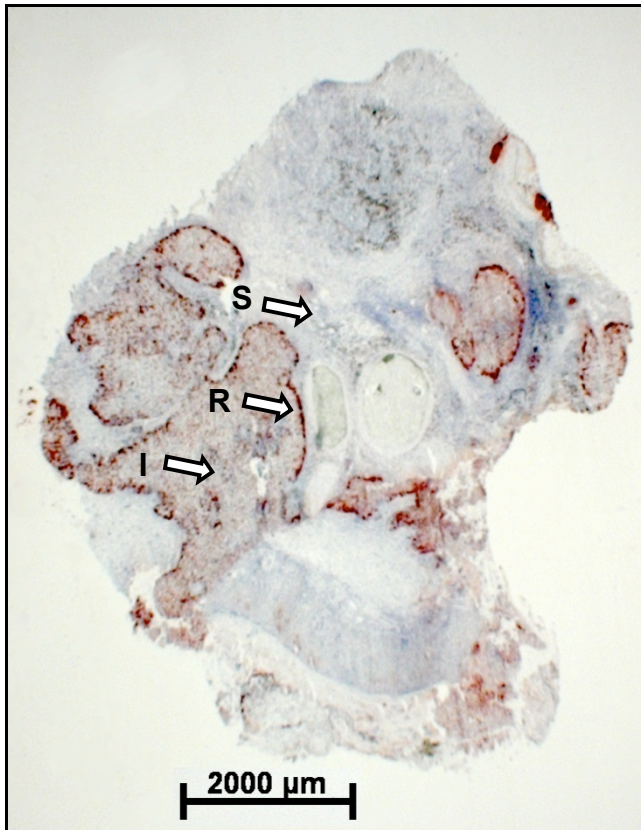


Abbildung 48: CYP 1A1-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome und der dazugehörigen Lebernorgewebe, auf welches normiert wurde. Teilweise war die Produktion von CYP 1A1 in den Hepatoblastomen deutlich erhöht (Hb6), andererseits war sie teilweise auch geringer als die des Normalgewebes (Hb3 und Hb9). Ein einheitliches Expressionsmuster kann nicht erkannt werden.

6.5. Mikrodissektion

Um zu klären, ob die Randbereiche der Tumoren, welche die GS verstärkt produzieren (Hb1, 3, 4, 5 und 10) unter Umständen eine andere Mutation als die Nichtrandbereiche des Tumors oder sogar keine *CTNNB1*-Mutation aufweisen, wurde die Methode der LaserCapture-Mikrodissektion verwendet.

Hierzu wurden aus drei verschiedenen Bereichen (Abb. 49) von zwei dieser Tumoren (Hb3 und 10) mikroskopisch kleine Zellverbände mit einem Laser heraus „geschossen“. Nach Proteinase K Verdau und anschließender PCR mit den gleichen Primern, die zur Genotypisierung der makroskopischen Tumorproben verwendet wurde, wurden die mikrodissezierten Proben sequenziert.

**Abbildung 49:**

GS-Färbung von Hepatoblastom Hb3, mit Gegenfärbung.

Aus drei verschiedenen Bereichen wurde durch Mikrodissektion Zellmaterial zur weiteren Untersuchung gewonnen: Innere des Tumors (I), Rand des Tumors (R) und außerhalb des Tumors/Stroma (S).

Zur Sequenzierung wurden Primer verwendet, welche sense- und antisense-Strang spezifisch waren und damit eine Sequenzierung beider Stränge erlaubten (5'→ 3' und 3'→ 5' Richtung). Für Hb3 wurde eine *CTNNB1*-Mutation im Inneren des Tumors und für Hb10 *CTNNB1*-Mutationen in allen drei untersuchten Bereichen gefunden. Alle gefundenen *CTNNB1*-Mutationen waren auch in den beiden korrespondierenden Nukleotiden der doppelsträngigen DNA nachzuweisen.

Bei den gefundenen *CTNNB1*-Mutationen handelt es sich um die gleichen *CTNNB1*-Mutationen, die bei Untersuchung der makroskopischen Tumorproben (Tab. 18) gefunden werden konnten.

Tabelle 26: Mutationen der mikrodissezierten Hepatoblastome.

Tumor Hb3 zeigte im Inneren des Tumors aus beiden Sequenzier-Richtungen (5'→ 3' und 3'→ 5') die gleiche *CTNNB1*-Mutation wie bei der Analyse der makroskopischen Tumorproben (Gly34Val). In allen drei Bereichen (Innen, Rand und Außen) war bei Tumor Hb10 auch aus beiden Richtungen die bereits bekannte *CTNNB1*-Mutation Gly34Arg zu finden.

Tumor	Lokalisation der analysierten Probe		
	Innen	Rand	Außen/Stroma
Hb3	Glycin34Valin	—	—
Hb10	Glycin34Arginin	Glycin34Arginin	Glycin34Arginin

Die Ergebnisse (Tab. 26) konnten auf Grund zu wenig Materials in einer zweiten PCR aus denselben mikrodissezierten Proben nicht reproduziert werden. Neu mikrodissezierte Proben aus denselben Bereichen, die bei der ersten Untersuchung *CTNNB1*-Mutationen aufwiesen, konnten bei einer weiteren Sequenzierung nur in einem Fall die zuvor gefundene *CTNNB1*-Mutation bestätigen.

7. Diskussion

Mutationshäufigkeit im CTNNB1-Gen der verschiedenen Tumorarten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutationshäufigkeit im *CTNNB1*-Gen der Hepatoblastome von 80% (8/10) und in dem der Nephroblastome (Wilms-Tumore) von 31% (4/13) gefunden. Alle *CTNNB1*-Mutationen befinden sich im Hot-Spot Bereich des Exon 3 des *CTNNB1*-Gens, welches entscheidend für die Stabilität des β -Catenin-Proteins und somit für die Aktivität des Wnt-Signalwegs ist (Morin et al., 1997). Alle anderen untersuchten Tumorarten (Neuroblastome, Rhabdomyosarkome und andere Weichteilsarkome) waren im *CTNNB1*-Gen unauffällig.

Die *CTNNB1*-Mutationshäufigkeit der Hepatoblastome mit 80% liegt im Bereich der gefundenen Mutationshäufigkeiten anderer Untersuchungen (Wei et al., 2000: 67%; Jeng et al., 2000: 89%). Die *CTNNB1*-Mutationshäufigkeit der Nephroblastome mit 31% ist in etwa doppelt so hoch wie von anderen Arbeitsgruppen berichtet, deren Berechnung auf einer Gesamtzahl von 40 (Koesters et al., 1999: 15%;) bzw. 153 Nephroblastomen (Maiti et al., 2000: 14%) beruht. Die in dieser Arbeit untersuchte Gesamtzahl von 13 Hepatoblastomen ist zu gering, um für die berechnete Häufigkeit von *CTNNB1*-Mutationen der Nephroblastome eine große statistische Sicherheit zu beanspruchen.

CTNNB1-Mutationen konnten für Neuroblastome, Rhabdomyosarkome und andere Weichteilsarkome im Gegensatz zu den Hepatoblastomen und Nephroblastomen nicht gefunden werden. Hepatoblastome, Nephroblastome und Neuroblastome sind Tumore, die von einem embryonalen Gewebetyp abstammen, die anderen untersuchten Tumorarten von differenzierteren Strukturen. Der Wnt-Signalweg spielt physiologischerweise v.a. eine Rolle bei der Organogenese, so

dass dies eine Erklärung für das Auftreten bei ‚embryonalen‘ Tumoren, aber nicht bei Tumoren mit höherer Differenzierung sein kann (Kelleher et al., 2006). Liu et al. (2008) konnten ebenfalls keine *CTNNB1*-Mutationen bei Untersuchungen von 73 Neuroblastomen nachweisen. Allerdings fanden sie eine Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs ohne den Mechanismus dafür bisher aufgeklärt zu haben.

GS-Expression in CTNNB1-mutierten Hepatoblastomen und Nephroblastomen

In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Lebertumore von Mäusen, die eine β -Catenin-Mutation tragen, das Enzym GS vermehrt exprimieren (Loeppen et al., 2002). Cadoret et al. (2002) und erst kürzlich wiesen Austin et al. (2008) diesen Sachverhalt auch für hepatozelluläre Karzinome (*HCC*) nach.

Immunhistochemisch wiesen in dieser Arbeit alle *CTNNB1*-mutierten Hepatoblastome vom epithelial-embryonalen und -fetalen Subtyp eine starke GS-Expression auf, so dass auch bei menschlichen Hepatoblastomen eine direkte Korrelation zwischen *CTNNB1*-Mutation und GS-Expression besteht. Für Tumoreale vom mesenchymalen Subtyp und mit duktaler Differenzierung war keine GS-Expression nachzuweisen.

Untersuchungen zur Zuordnung einer verstärkten GS-Expression zum Typ der entarteten Zellen liegen bisher nicht vor. Die gefundene Expression der GS in epithelial-embryonalen und epithelial-fetalen, aber nicht in den mehr differenzierten mesenchymalen und duktalem Tumorealen kann widerspiegeln, dass Komponenten des Wnt-Signalwegs bei höher differenzierten Zellen nicht exprimiert werden.

Von den beiden Proben ohne *CTNNB1*-Mutation zeigte eine Probe ebenfalls eine GS-Expression, die andere war GS-negativ. Als Ursache für die GS-Positivität des einen genotypisch unauffälligen Hepatoblastoms ist in Erwägung zu ziehen, dass auch Mutationen anderer Gene zu einer abnormen GS-Expression führen können. Zu diesen Genen gehört *APC* (*Adenomatous polyposis coli*), ein Tumorsuppressorgen, das in einer Vielzahl von Kolontumoren mutiert ist (Grodin et al., 1991). Im Wnt-Signalweg bindet es β -Catenin und trägt somit zu seinem Abbau bei (Munemitsu et al., 1995). Mutationen im *APC*-Gen führen deshalb zu einem verminderten Abbau von β -Catenin und folglich einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs (Colnot et al., 2004 und Benhamouche et al., 2006). Auch *Axin1* ist im β -Catenin-Abbau-Komplex integriert. Mutationen in diesem Tumorsuppressor können über den Wnt-Signalweg ebenfalls zu einer abnormen GS-Expression führen (Austin et al., 2008 und Zucman-Rossi et al., 2006).

Eine gesteigerte GS-Expression war auch auf Protein-Ebene (Western-Blot) bei 4 der 5 untersuchten Hepatoblastom-Normalgewebe-Paarungen deutlich ausgeprägt. Die Probe des Tumors Hb6 wies wenigstens die gleiche Expressionsmenge wie das korrespondierende Normalgewebe auf. Insgesamt bestätigen somit die Ergebnisse des Western-Blots die der Immunhistochemie.

Auch die Ergebnisse des LightCycler-Verfahrens stimmen mit den immunhistochemischen Befunden überein. So war bei jedem untersuchten Hepatoblastom mit *CTNNB1*-Mutation (Hb3, 4 und 6) eine im Vergleich zum korrespondierenden Lebernorgewebe erhöhte GS-Expression festzustellen.

Eine weitere Probe aus Tumor 3 (Hb3b) ergab eine deutlich geringere GS-Expression als das korrespondierende Normalgewebe. Das unterschiedliche Ergebnis für Hepatoblastom Hb3 bei Aufarbeitung einer anderen Probe weist auf die Bedeutung der Probengewinnung bei sensitiven Methoden wie dem

LightCycler-Verfahren hin. Aufgrund der Heterogenität der Hepatoblastome mit Tumorealen, die von GS-negativem Bindegewebe durchsetzt sind und den verschiedenen histologischen Ausprägungen des Tumors, ist nur schwer zu beurteilen, wie groß der tatsächliche Anteil an GS-positivem Tumorgewebe in der verwendeten Probe ist.

Insgesamt weisen die immunhistochemischen Befunde und die Ergebnisse der Western-Blot- und LightCycler-Untersuchungen für *CTNNB1*-mutierte Hepatoblastome eine gute Übereinstimmung auf und zeigen, dass mit der *CTNNB1*-Mutation eine erhöhte Expression von GS verbunden ist.

Die immunhistochemische Untersuchung der Wilms-Tumore ergab bei drei (Wt3, 10 und 16) der vier Tumore mit Mutation im *CTNNB1*-Gen einen GS-positiven Phänotyp, ein Tumor war phänotypisch negativ. Die Konstellation eines GS-negativen Phänotyps bei positivem Genotyp für eine *CTNNB1*-Mutation (Wt5) ist selten, aber nicht außergewöhnlich; Audard et al. (2007) konnten in einer Studie bei 2% der untersuchten *CTNNB1*-mutierten *HCCs* solch ein Ergebnis nachweisen.

Zudem wiesen 4 der 9 Wilms-Tumore ohne Mutation im *CTNNB1*-Gen einen GS-positiven Phänotyp auf. Als Ursache kommt, wie bereits für das GS-positive und nicht *CTNNB1*-mutierte Hepatoblastom diskutiert, eine Mutation in einem anderen Gen, z.B. *APC* oder *Axin1* in Frage.

Die Ergebnisse zu den Hepatoblastomen und Nephroblastomen zeigen, dass in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Austinat et al. (2008) von einem GS-positiven Phänotyp nicht automatisch auf einen *CTNNB1*-mutierten Genotyp geschlossen werden kann. Zum einen wiesen nicht *CTNNB1*-mutierte Tumore einen GS-positiven Phänotyp auf und zum anderen war einer der

CTNNB1-mutierten Nephroblastome GS-negativ. Als Indikator für Mutationen im *CTNNB1*-Gen ist die GS deshalb nur bedingt geeignet.

Korrelation von CTNNB1-Mutation und Expression von CYP 450-Enzymen

Meistens werden die CYP in Tumoren negativ reguliert. In einigen Fällen wurde allerdings auch das Gegenteil berichtet (Loeppen et al., 2005; Kondoh et al., 1999). So konnten neben der GS in einer weiteren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe auch Isoformen der CYP 450-Enzymfamilie als Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, die vermehrt exprimiert werden, identifiziert werden (Loeppen et al., 2005).

In dieser Arbeit wurden die CYP-Isoformen 1A2, 2B1, 2C6, 2D6, 2E1 und 3A4 untersucht. Die Anfärbung der Hepatoblastome mit CYP-Antikörpern zeigte, dass alle Hepatoblastome mit *CTNNB1*-Mutation wenigstens eine CYP-Isoform exprimieren. Die einzelnen *CTNNB1*-mutierten Hepatoblastome exprimierten jedoch ganz unterschiedliche CYP-Isoformen. Wegen dieser unterschiedlichen Expression von CYP-Isoformen in den *CTNNB1*-mutierten Hepatoblastomen kann bei *CTNNB1*-mutierten Hepatoblastomen keine direkte Korrelation zwischen CYP Isoform-Expression und *CTNNB1*-Mutation beansprucht werden.

Die Ergebnisse stehen jedoch nicht im Widerspruch zum Befund von Loeppen et al. (2005), dass bei Mäusen verschiedene CYP-Isoformen zu den Zielgenen des Wnt-Signalwegs gehören. Insbesondere ist zu bedenken, dass eventuell der für CYP bekannte genetische Polymorphismus wie z.B. die bei langsam Metabolisierern konstitutive geringe Expression von CYP 2D6 (Wormhoudt et al., 1999) oder die Beeinflussung der CYP-Expression durch die bei den Patienten angewandten Chemotherapeutika eine β -Catenin-vermittelte CYP-Expression moduliert bzw. überlagert haben kann.

Ein Hepatoblastom ohne *CTNNB1*-Mutation (Hb1) wies auch eine CYP-Expression auf. Da neben dem GS-Gen auch CYP-Gene zu den Zielgenen des Wnt-Signalwegs gehören, ist es wie bei der GS-Expression auch hier möglich, dass eine andere Mutation (z.B. *APC* oder *Axin1*), die diesen Signalweg beeinflusst, ursächlich für die CYP-Expression des Hepatoblastoms Hb1 ist.

Wie bei den Ergebnissen der Hepatoblastome war für *CTNNB1*-mutierte und nicht *CTNNB1*-mutierte Nephroblastome ebenfalls kein einheitliches CYP-Expressionsmuster zu erkennen.

Histologische Besonderheiten der Hepatoblastome

Fünf der neun GS-positiven Hepatoblastome exprimierten auffällig viel GS im Randbereich verschiedener Tumorareale. Die genaue histologische Untersuchung ergab, dass nur epithelial-fetale Tumorbereiche vom hellzelligen Subtyp diese Randständigkeit der GS-Expression aufweisen.

Schrode et al. (1990) konnten in einer Ko-Kultivierung von periportal Hepatozyten (in der normalen Leber GS-negativ) und humanen venösen Endothelzellen zeigen, dass vor allem diejenigen Hepatozyten eine gesteigerte GS-Expression zeigen, die in direkter Nachbarschaft zu den Endothelzellen sind. In Übereinstimmung mit diesem Befund ist eine mögliche Erklärung für das Phänomen der randständig erhöhten GS-Expression, dass bei diesem hellzelligen Subtyp Zellen, die im angrenzenden Stroma/Bindegewebe liegen, Wnt-Proteine produzieren und somit den Wnt-Signalweg der Tumorzellen in direkter Nachbarschaft aktivieren.

Tumorareale, die die oben beschriebene GS-Randständigkeit aufwiesen, zeigten eine Art „blauen HE-Saum“ mit geringer Anfärbung der CYP in diesem „Saum“. Dies ergibt ein inverses Muster überhöhter GS-Expression und verminderter CYP-Expression, das allerdings nicht den kompletten

Tumorbereich betrifft, sondern sich alleine auf den Randbereich beschränkt. Zellen in dem randständigen Bereich sind nicht grundsätzlich andere Zellen als die Zellen im Rest des jeweiligen Tumorareals; sie besitzen jedoch eine erhöhte Kern-Plasma-Relation und z.T. eine erhöhte Basophilie.

Mikrodissektion

Ziel der Mikrodissektion war es, einen möglichen Unterschied der Mutation im *CTNNB1*-Gen verschiedener Tumorbereiche (Innere und Rand des Tumors sowie Stroma) festzustellen.

Die gefundenen *CTNNB1*-Mutationen im Innern der beiden untersuchten Hepatoblastome sind die gleichen *CTNNB1*-Mutationen wie bei der Untersuchung der jeweiligen makroskopischen Tumorprobe. Einer der beiden Tumore wies außerdem die in der makroskopischen Probe gefundene *CTNNB1*-Mutation sowohl im Randbereich wie auch im Stroma auf. Eine Aufarbeitung einer weiteren mikrodissezierten Probe dieses Hepatoblastoms bestätigte diese *CTNNB1*-Mutationen nicht. Für den zweiten Tumor, bei dem für das Innere auch eine *CTNNB1*-Mutation gefunden wurde, konnte im Randbereich und im Stroma keine *CTNNB1*-Mutation nachgewiesen werden.

Insgesamt geben die für das Stroma gefundenen Ergebnisse, für das eigentlich keine *CTNNB1*-Mutation nachzuweisen sein sollte, und die unterschiedlichen Ergebnisse bei Aufarbeitung einer zweiten Probe einen Hinweis auf die Problematik, die mit der Sensitivität der angewendeten Methode verbunden ist. Bei der selektiven Auswahl einzelner Zellbereiche ist von vornherein nicht von einer 100%igen Trefferquote der gewünschten Zelltypen auszugehen, so dass im Prinzip eine statistische Annäherung an die Analyse, d.h. eine Vielzahl von Probenentnahmen erforderlich ist, um eine gesicherte Aussage machen zu können. Dies war in dieser Arbeit aufgrund der geringen Probenmengen nicht möglich.

8. Zusammenfassung und Ausblick

8.1. Zusammenfassung

Der Wnt-Signalweg und seine Komponenten spielen in der Kanzerogenese verschiedenster Tumorarten eine wichtige Rolle. Eine der wichtigsten Komponenten des Wnt-Signalwegs ist das Protein β -Catenin, das entscheidend zur Regulierung der Gene der Glutaminsynthetase (GS) und von Genen der Cytochrom P450 (CYP)-Isoformen beiträgt. In Studien aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass zwischen β -Catenin Mutationen in Mäuselebertumoren und der Expression der GS sowie von CYP-Isoformen eine positive Korrelation besteht (Loeppen et al., 2002, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob solide Tumore des Kindesalters (Hepatoblastome, Wilms-Tumore, Neuroblastome, Rhabdomyo-sarkome und andere Weichteilsarkome) Mutationen im *CTNNB1*-Gen und damit einhergehend eine veränderte GS- und CYP-Expression aufweisen.

8 von 10 der Hepatoblastome und 4 von 12 der Wilms-Tumore zeigten eine *CTNNB1*-Mutation, keine der anderen Tumorarten. In Einklang mit den eigenen Ergebnissen und den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnte für beide Tumorarten gezeigt werden, dass zwischen *CTNNB1*-Mutation und GS-Expression eine positive Korrelation besteht. Hepatoblastome vom epithelialen-embryonalen Subtyp wiesen eine homogene GS-Expression auf. Im Gegensatz hierzu zeigten epithelial-fetale Hepatoblastome vom hellzelligen Subtyp vor allem in Randbereich zum angrenzenden Stroma eine verstärkte Expression des Enzyms.

Alle *CTNNB1*-mutierten Tumore exprimierten mindestens eine CYP-Isoform. Eine Korrelation zwischen *CTNNB1*-Mutation und Expression einer bestimmten CYP-Isoform ließ sich nicht nachweisen.

8.2. Ausblick

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse sind ein weiterer Beleg für die Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Eigenschaften von HB und WT.

Die verstärkte GS-Expression der untersuchten Tumore kann einen Selektionsvorteil darstellen, da diese nicht mehr auf die externe Zufuhr der wichtigen Aminosäure Glutamin angewiesen sind.

Eine veränderte CYP-Expression kann einerseits die Resistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika erklären, wenn diese von einem hochregulierten CYP inaktiviert werden. Andererseits kann eine erhöhte CYP-Aktivität auch von Vorteil sein, wenn ein Zytostatikum zum Einsatz kommt, das erst durch dieses CYP in seine wirksame Form gelangt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können helfen, das unterschiedliche Ansprechen der verschiedenen Hepatoblastom-Subtypen (fetale besser als embryonale) auf die Chemotherapie zu verstehen und eine Strategie zu entwickeln, die Therapie noch individueller zu gestalten.

9. Abbildungen und Tabellen

9.1. Abbildungen

Abb. 1	Schematische Darstellung des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese.....	2
Abb. 2	Der kanonische Wnt-Signalweg.....	5
Abb. 3	Diagramm des β -Catenin-Proteins	8
Abb. 4	Katalyse-Reaktion der Glutaminsynthetase (GS).....	8
Abb. 5	Schematische Darstellung der Leberläppchen-Struktur	9
Abb. 6	Anteil (%) der verschiedenen Krebserkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren ermittelt aus den Jahren 1997 bis 2006 an der Gesamttumorhäufigkeit	12
Abb. 7	DNA-Marker pBR322 DNA-MspI Digest.....	33
Abb. 8	DNA-Marker 100bp Plus.....	33
Abb. 9	Protein-Marker Prestained Protein Ladder	33
Abb. 10	Schematische Darstellung der Visualisierung der Antigene.....	42
Abb. 11	Phenolextraktion wässriger DNA-Lösungen	44
Abb. 12	Schematische Darstellung der PCR	47
Abb. 13	Flachgelapparatur für Polyacrylamid-Gelelektrophoresen.....	50
Abb. 14	Sequenzierung nach Sanger	54
Abb. 15	Schematische Darstellung der RT-PCR	58
Abb. 16	Schaubild einer Eichgerade für LightCycler-Analysen.....	60
Abb. 17	Blotting-Tank für den elektrophoretischen Transfer der getrennten Proteine auf eine PVDF-Membran	62
Abb. 18	Elektroblotting	67
Abb. 19	Schematische Darstellung der Methode der Mikrodisektion...	71
Abb. 20	Beispiel einer Punktmutation im <i>CTNNB1</i> -Gen	75
Abb. 21	Punktmutation im <i>CTNNB1</i> -Gen.....	78
Abb. 22	4-facher Basenaustausch im <i>CTNNB1</i> -Gen.....	78
Abb. 23	HE-Färbung eines Lebernorgangewebes	81
Abb. 24	GS-Färbung eines Lebernorgangewebes.....	81
Abb. 25	HE-Färbung eines <i>CTNNB1</i> -mutierten Tumors (Hb7).....	82

Abb. 26	GS-Färbung eines <i>CTNNB1</i> -mutierten Tumors (Hb7).....	82
Abb. 27	HE-Färbung eines <i>CTNNB1</i> -mutierten Tumors (Hb3).....	83
Abb. 28	GS-Färbung Hepatoblastom Hb3	83
Abb. 29	Randständige GS-Färbung bei Hepatoblastom Hb10; 20x	85
Abb. 30	Randständige GS-Färbung bei Hepatoblastom Hb10; 40x	85
Abb. 31	CYP 2E1-Färbung eines Leber-Normalgewebes (Referenzgewebe zu Hb7).....	86
Abb. 32	GS- und verschiedene CYP-Färbungen des Hepatoblastoms Hb3 in der Übersicht.	87
Abb. 33	CYP 2E1-Färbung, Tumor Hb3, 10x-Vergrößerung	90
Abb. 34	CYP 2E1-Färbung, Tumor Hb3, 20x-Vergrößerung.	90
Abb. 35	GS-Färbung, Tumor Hb3, 10x-Vergrößerung.....	90
Abb. 36	GS-Färbung, Tumor Hb3, 20x-Vergrößerung.....	90
Abb. 37	HE Färbung Nierennormalgewebe	91
Abb. 38	GS-Färbung des Normalgewebes zu Wt3	91
Abb. 39	HE-Färbung <i>CTNNB1</i> -mutiertes Nephroblastom Wt3.....	92
Abb. 40	GS-Färbung Nephroblastom Wt3	92
Abb. 41	HE- und GS-Färbung von Nephroblastom Wt10 und korrespondierendem Normalgewebe.....	93
Abb. 42	β -Catenin-Western-Blot (92 kDa), Hepatoblastome Hb3, Hb4 und korrespondierende Normalgewebe (NG3 bzw. NG4)	97
Abb. 43	GS-Western-Blot (45 kDa), Hepatoblastome Hb3, Hb4 und korrespondierende Normalgewebe (NG3 bzw. NG4)	97
Abb. 44	CYP-Western-Blot 2E1 (~50 – 55 kDa), Hepatoblastome Hb3, Hb4 und korrespondierende Normalgewebe (NG3 bzw. NG4)	99
Abb. 45	Schmelzkurve GS-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome	100
Abb. 46	GS-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome und der korrespondierenden Lebernnormalgewebe	100
Abb. 47	Schmelzkurve CYP 1A1-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome.....	101

Abb. 48	CYP 1A1-LightCycler-Verfahren der Hepatoblastome und der dazugehörigen Lebernorgane	102
Abb. 49	GS-Färbung von Hepatoblastom Hb3, mit Gegenfärbung	103

9.2. Tabellen

Tab. 1	Aminosäuren-Wildtyp (WT)-Sequenz des <i>CTNNB1</i> -Gens	7
Tab. 2	<i>Prodrugs</i> von Zytostatika, die in der Therapie von soliden Tumoren des Kindesalters zum Einsatz kommen	11
Tab. 3	DNA- und Protein-Marker	23
Tab. 4	Reagenzien für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
Tab. 5	Reagenzien für die LightCycler-PCR	24
Tab. 6	Reagenzien für die Reverse Transkriptase (RT)-PCR	25
Tab. 7	Antikörper	34
Tab. 8	Humane Tumorproben	35
Tab. 9	Histologie der Nephroblastome, Alter und Geschlecht der Patienten zum Zeitpunkt der OP	36
Tab. 10	Histologie der Hepatoblastome (HB) und klinische Daten der HB-Patienten	37
Tab. 11	PCR-Primer	38
Tab. 12	LightCycler-Primer	38
Tab. 13	PCR-Programme zur Amplifikation der isolierten genomischen DNA	49
Tab. 14	Pipettierschema für die Bradford-Eichgerade	64
Tab. 15	PCR-Programme zur Amplifikation der mikrodyssezierten DNA-Proben	73
Tab. 16	Anzahl der <i>CTNNB1</i> -Mutationen der untersuchten Tumore	74
Tab. 17	Exemplarische Darstellung einer Deletion im Exon 3 des <i>CTNNB1</i> -Gens	76
Tab. 18	Mutationen und Veränderungen der Proteinsequenz des β -Catenins der Hepatoblastome	77
Tab. 19	Mutationen und Veränderungen der Proteinsequenz der Nephroblastome	79

Tab. 20	<i>CTNNB1</i> -Mutation, Histologie und GS-Expression der Hepatoblastome	84
Tab. 21	<i>CTNNB1</i> -Mutation und immunhistochemische Färbungen der Hepatoblastome	88
Tab. 22	Vergleich der immunhistochemischen Enzym-Färbungen (GS und CYP) zwischen Hepatoblastomen und korrespondierenden Lebernorgangewebe.....	89
Tab. 23	<i>CTNNB1</i> -Mutation und immunhistochemische Färbungen der Nephroblastome.....	94
Tab. 24	Vergleich der immunhistochemischen Enzym-Färbungen (GS und CYP) zwischen Nephroblastomen und korrespondierenden Nierenorgangewebe	95
Tab. 25	Western-Blot-Untersuchungen für β -Catenin, GS und CYP 2E1 der Hepatoblastome.....	98
Tab. 26	Mutationen der mikrodisezierten Hepatoblastome	104

10. Literaturverzeichnis

Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R.:
Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function (1996). *J. Cell Biochem.*, 61: 514-523.

Armitage, P. und Doll, R.:
The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis (1954). *Int. J. Epidemiol.*, 33: 1174-1179.

Audard, V., Grimber, G., Elie, C., Radenen, B., Audebourg, A., Letourneur, F., Soubrane, O., Vacher-Lavenu, M.C., Perret, C., Cavard, C., Terris, B.:
Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying β -Catenin mutations (2007). *Journal of Pathology*, 212: 345-352.

Austinat, M., Dunsch, R., Wittekind, C., Tannapfel, A., Gebhardt, R., Gaunitz, F.:
Correlation between beta-catenin mutations and expression of Wnt-signaling target genes in hepatocellular carcinoma (2008). *Mol. Cancer*, 7: 21.

Benhamouche, S., Decaens, T., Perret, C., Colnot, S.:
Wnt/beta-catenin pathway and liver metabolic zonation: a new player for an old concept (2006). *Med. Sci. (Paris)*, 22: 904 - 906.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R.:
A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor (1996). *Nature*, 382: 225-230.

Cadoret, A., Ovejero, C., Saadi-Kheddouci, S., Souil, E., Fabre, M., Romagnolo, B., Kahn, A., Perret, C.:
Hepatomegaly in Transgenic Mice Expressing an Oncogenic Form of β -Catenin (2001). *Cancer Research*, 61: 3245-3249.

Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Lévy, L., Lamers, W.H., Kitajewski, J., Kahn, A., Perret, C.:
New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism (2002). *Oncogene*, 21: 8293-8301.

Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M., Perret, C.:
Liver-targeted disruption of *Apc* in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101: 17216-17221.

Curia, M.C., Zuckermann, M., De Lellis, L., Catalano, T., Lattanzio, R., Aceto, G., Veschi, S., Cama, A., Otte, J.B., Piantelli, M., Mariani-Costantini, R., Cetta, F., Battista, P.:

Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of b-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations (2008). *Modern Pathology*, 21: 7-14.

Fanto, M., McNeill, H.:

Planar polarity from flies to vertebrates (2004). *J Cell Sci.*, 117: 527-533.

Fuchs, J., Rydzynski, J., Von Schweinitz, D., Bode, U., Hecker, H., Weinel, P., Bürger, D., Harms, D., Erttmann, R., Oldhafer, K., Mildenerger, H.; Study Committee of the Cooperative Pediatric Liver Tumor Study Hb 94 for the German Society for Pediatric Oncology and Hematology:

Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94 (2002). *Cancer*, 95: 172-182.

Gebhardt, R., Schuler, M., Schörner, D.:

The spontaneous induction of glutamine synthetase in pig hepatocytes cocultured with RL-ET-14 cells is completely inhibited by triiodothyronine and okadaic acid (1998). *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 246: 895-898.

Gebhardt, R., Tanaka, T., Williams, G. M.:

Glutamine synthetase heterogenous expression as a marker for the cellular lineage preneoplastic and neoplastic liver populations (1989). *Carcinogenesis*, 10: 1917-1923.

Gebhardt, R., und Mecke, D.:

Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture (1983). *The EMBO Journal*, 2: 567-570.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., et al.:

Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene (1991). *Cell*, 66: 589-600.

Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., Kemler, R.:

Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1 (1996). *Mech. Dev.*, 59: 3-10.

Jeng, Y.M., Wu, M.Z., Mao, T.L., Chang, M.H., Hsu, H.C.:

Somatic mutations of β -Catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma (2000). *Cancer Letters*, 152: 45-51.

Jungermann, K. und Kietzmann, T.:

Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver (1996). *Annu Rev Nutr.*, 16: 179-203.

Kelleher, F.C., Fennelly, D., Rafferty, M.:

Common critical pathways in embryogenesis and cancer (2006). *Acta Oncologica*, 45: 375-388.

Kim, K., Pang, K.M., Evans, M., Hay, E.D.:

Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators (2000). *Mol. Biol. Cell*, 11: 3509-3523.

Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., von Schweinitz, D., Pietsch, T.:

Childhood Hepatoblastomas Frequently Carry a Mutated Degradation Targeting Box of the β -Catenin Gene (1999). *Cancer Research*, 59: 269-273.

Koesters, R., Ridder, R., Kopp-Schneider, A., Betts, D., Adams, V., Niggli, F., Briner, J., Von Knebel Doeberitz, M.:

Mutational Activation of the β -Catenin Proto-Oncogene Is a Common Event in the Development of Wilms' Tumors (1999). *Cancer Research*, 59: 3880-3882.

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

Identification and Characterization of Genes Associated with Human Hepatocellular Carcinogenesis (1999). *Cancer Research* 59: 4990-4996.

Kuhl, M.:

The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements (2004). *Front Biosci.*, 9: 967-974.

Kuo, F.C., Darnell, J.E. Jr.:

Evidence that interaction of hepatocytes with the collecting (hepatic) veins triggers position-specific transcription of the glutamine synthetase and ornithine aminotransferase genes in the mouse liver (1991). *Mol. Cell. Biol.*, 11: 6050-6058.

Loeppen, S., Koehle, C., Buchmann, A., Schwarz, M.:

A β -Catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrom P450 isoforms in mouse liver tumors (2005). *Carcinogenesis*, 26: 239-248.

Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Kurek, R., Buchmann, A., Schwarz, M.:

Liu, X., Mazanek, P., Dam, V., Wang, Q., Zao, H., Guo, R., Jagannathan, J., Cnaan, A., Maris, J.M., Hogarty, M.D.:

Deregulated Wnt/ β -catenin program in high-risk neuroblastomas without MYCN amplification (2008). *Oncogene*, 27: 1478-1488.

Overexpression of Glutamine Synthetase Is Associated with β -Catenin-Mutations in Mouse Liver Tumors during Promotion of Hepatocarcinogenesis by Phenobarbital (2002). *Cancer Research*, 62: 5685-5688.

Maiti, S., Alam, R., Amos, C.I., Huff, V.:

Frequent Association of β -*Catenin* and *WT1* Mutations in Wilms' Tumors (2000). *Cancer Research*, 60: 6288-6292.

McCrea, P.D., Turck, C.W., Gumbiner, B.:

A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin (1991). *Science*, 254: 1359-1361.

Moolgavkar, S.H. und Knudson, A.G. Jr:

Mutation and cancer: a model of human carcinogenesis (1981). *J. Nat. Cancer Inst.*, 66: 1037 - 1052.

Moolgavkar, S.H.:

Model of human carcinogenesis: action of environmental agents (1983). *Environ. Health Perspect.*, 50: 285-291.

Morin, P.:

β -Catenin signaling and cancer (1999). *BioEssays*, 21: 1021-1030

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.:

Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC (1997). *Science*, 275: 1787-1790.

Morris, D.W., Barry, P.A., Bradshaw, H.D. Jr, Cardiff, R.D.:

Insertion mutation of the int-1 and int-2 loci by mouse mammary tumor virus in premalignant and malignant neoplasms from the GR mouse strain (1990). *J. Virol.*, 64: 1794-1802.

Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., Polakis, P.:

Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 3046-3050.

Munemitsu, S., Albert, I., Rubinfeld, B., Polakis, P.:
Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein (1996). *Mol. Cell Biol.*, 16: 4088-4094.

Noordermeer, J., Klingensmith, J., Perrimon, N., Nusse, R.:
Dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila* (1994). *Nature*, 367: 80-83.

Pandur, P. und Kühl, M.:
An arrow for wingless to take-off (2001). *Bioessays*, 23: 207-210.

Reya, T. und Clevers, H.:
Wnt signaling in stem cells and cancer (2005). *Nature*, 434: 843-850.

Ruck, P:
Schriftliche und mündliche Mitteilungen (2009).

Rooseboom, M., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P.:
Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs (2004). *Pharmacological Reviews* 56: 53-102.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., Polakis, P.:
Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines (1997). *Science*, 275: 1790-1792.

Schrode, W., Mecke, D., Gebhardt, R.:
Induction of glutamine synthetase in periportal hepatocytes by cocultivation with a liver epithelial cell line (1990). *Eur J Cell Biol*, 53: 35-41.

Siegfried, E., Chou, T.B., Perrimon, N.:
Wingless signaling acts through zeste-white 3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate (1992). *Cell*, 71: 1167-1179.

Siegfried, E., Wilder, E.L., Perrimon, N.:
Components of wingless signalling in *Drosophila* (1994). *Nature*, 367: 76-80.

Takayasu, H., Horie, H., Hiyama, E., Matsunaga, T., Hayashi, Y., Watanabe, Y., Suita, S., Kaneko, M., Sasaki, F., Hashizume, K., Ozaki, T., Furuuchi, K., Tada, M., Ohnuma, N., Nakagawara, A.:

Frequent Deletions and Mutations of the *b-Catenin* Gene Are Associated with Overexpression of *Cyclin D1* and *Fibronectin* and Poorly Differentiated Histology in Childhood Hepatoblastoma (2001). *Clinical Cancer Research*, 7: 901-908.

Taniguchi, K., Roberts, L.R., Aderca, I.N., Dong, X., Qian, C., Murphy, L.M., Nagorney, D.M., Burgart, L.J., Roche, P.C., Smith, D.I., Ross, J.A., Liu, W.: Mutational spectrum of b-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas (2002). *Oncogene*, 21: 4863-4871.

Udatsu, Y., Kusafuka, T., Kuroda, S., Miao, J., Okada, A.: High frequency of β -Catenin mutations in hepatoblastoma (2001). *Pediatr. Surg. Int.*, 17: 508-512.

Van Leeuwen, F., Samos, C.H., Nusse, R.: Biological activity of soluble wingless protein in cultured *Drosophila* imaginal disc cells (1994). *Nature*, 368: 342-344.

Von Schweinitz, D., Hecker, H., Schmidt-von-Arndt, G., Harms, D.: Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma (1997). *Int. J. Cancer*, 74: 593-599.

Wei, Y., Fabre, M., Branchereau, S., Gauthier, F., Perilongo, G., Buendi, M.-A.: Activation of b-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas (2000). *Oncogene*, 19: 498-505.

Willert, K. and Nusse, R.: β -Catenin: a key mediator of Wnt signaling (1998). *Current Opinion in Genetics & Development*, 8: 95-102.

Wormhoudt, L.W., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P.: Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity (1999). *Crit. Rev. Toxicol.*, 29: 59-124.

Zucman-Rossi, J., Jeannot, E., Nhieu, J.T., Scoazec, J.Y., Guettier, C., Rebouissou, S., Bacq, Y., Leteurtre, E., Paradis, V., Michalak, S., Wendum, D., Chiche, L., Fabre, M., Mellottee, L., Laurent, C., Partensky, C., Castaing, D., Zafrani, E.S., Laurent-Puig, P., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P.: Genotyp-phenotyp correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC (2006). *Hepatology*, 43: 515 - 524.

Lehrbücher:

De Gruyter, W.: Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch (261. Auflage). Walter de Gruyter GmbH & Co. KG (2007).

Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (6. überarbeitete Auflage):

Krebs in Deutschland, 2003 – 2004, Häufigkeiten und Trends (2008).

Lottspeich, F. und Engels, J. W.:

Bioanalytik (2. Auflage). Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag (2006).

Marquardt, H. und Schäfer, S. G.:

Lehrbuch der Toxikologie (2. Auflage). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2004).

Schwarz, M. und Bock, K.W.:

Mechanismen der Entstehung fremdstoffbedingter Krebsformen (1998). Handbuch der Molekularen Medizin (Band 2 Tumorerkrankungen, 27- 45), Springer-Verlag.

Stocker, J.T., Schmidt, D.:

Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, Hepatoblastoma (2000). World Health Organization Classification of Tumors: 184-189; International Agency for Research on Cancer (IARC) *Press*, Lyon 2000.

Internet:

AWMF (Arbeitsgemeinschaften der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften) online - www.awmf-leitlinien.de, Hepatoblastom, 05/2008.

AWMF online, Nephroblastom, 01/2008.

AWMF online, Neuroblastom, 05/2008.

AWMF online, Weichteilsarkome, 05/2008.

Wnt-Homepage (03/2009)

<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

11. Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Michael Schwarz für die Vergabe dieses interessanten und spannenden Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien. Zudem danke ich Herrn Prof. Michael Schwarz für die konsequente, hilfsbereite Anleitung während dem praktischen und theoretischen Teil meiner Arbeit.

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn PD Dr. Steven W. Warmann und Herrn Prof. Jörg Fuchs aus der Kinderchirurgie der Universitätskinderklinik Tübingen für die Bereitstellung der humanen Tumorproben, die großartige Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Präsentation meiner Arbeit in Wilsede richten.

Großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Peter Ruck für seine große Unterstützung bei der histologischen Beurteilung der Hepatoblastome und seine Hilfsbereitschaft.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Elke Zabinsky für die Einarbeitung in die vielen verschiedenen Methoden, die Verarbeitung der Gefrierschnitte sowie ihr jederzeit offenes Ohr. Herrn Dr. Albrecht Buchmann danke ich für die Hilfe und Anregungen bei der PCR und den Sequenzierungen. Für seine große Geduld und Sorgfalt beim Korrekturlesen meiner Doktorarbeit danke ich Herrn Benjamin Rignall. Frau Johanna Mahr, Herrn Dr. Christoph Köhle und Frau Sandra Loeppen danke ich für die fachkundliche Unterstützung.

Einen großen Anteil am Gelingen meiner Doktorarbeit hatten die freundliche Atmosphäre und die allseitige Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter, Diplomanden und Doktoranden der Abteilung Toxikologie, denen ich dafür sehr danken möchte.

Bei Herrn Prof. Raffael Kurek, Universitäts-Frauenklinik Tübingen, bedanke ich mich für die zur Verfügungsstellung des Laser Capture Mikrodisektion-Systems.

Last, but not least möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Traudel und Heinrich Schmidt bedanken, die mir zu jeder Zeit und in allen Lebenslagen mit ihrer Unterstützung und ihrem Rat zur Seite stehen.

12. Lebenslauf

Name: Schmidt

Vorname: Andreas

Geburtsdatum & -ort: 29. Oktober 1981, Tübingen

Schulbildung:

1987 - 1991 Aischbach-Grundschule Tübingen

1991 - 2001 Wildermuth-Gymnasium Tübingen

Berufsausbildung:

2001/2002 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz

Oktober 2002 Beginn des Medizinstudiums in Tübingen

September 2004 Ärztliche Vorprüfung

09.06.2009 Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)

Famulaturen:

28.02.2005 - 01.04.2005 Anästhesie, Sana Herzchirurgie Stuttgart

05.09.2005 - 05.10.2005 Neurologie, SRH Klinikum Karlsbad-
Langensteinbach

15.09.2006 - 15.10.2006 Kinderchirurgie, Universitätskinderklinik Tübingen

26.02.2007 - 27.03.2007 Innere Notaufnahme, Städtisches Klinikum Karlsruhe

Praktisches Jahr:

20.08.2007 - 09.12.2007 Pädiatrie, Olgahospital Stuttgart

01.01.2008 - 30.03.2008 Innere Medizin, Zürich/Schweiz

07.04.2008 - 01.06.2008 Chirurgie, St. John's, Neufundland/Kanada

02.06.2008 - 27.07.2008 Chirurgie, Toronto, Ontario/Kanada