

**Qualitative und quantitative Analyse
von β -Catenin in *Catnb*-mutierten
hepatozellulären Tumoren der Maus
mit Array-basierten Methoden**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von
Oliver Pötz

Tag der mündlichen Prüfung:

11.07.05

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Stevanović
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schwarz

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Protein-Mikroarray-Technologie	1
1.2	Mikroarray-Plattformen	2
1.3	Multiplxe Sandwichimmunoassays	4
1.4	Fängermoleküle	5
1.5	Peptid-Arrays	6
1.6	Array-basierte Proteomanalytik	7
1.7	Rolle des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs in hepatozellulären Karzinomen	9
1.8	Aufgabenstellung	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Chemikalien	15
2.2	Geräte	17
2.3	Software	18
2.4	Puffer	18
2.5	Mikroarray-Technologien	20
2.5.1	Planare Mikroarrays	20
2.5.2	Mikrosphären-basierte Mikroarrays	22
2.6	Biochemische Methoden	28
2.6.1	Probenvorbereitung für die Proteinanalytik	28
2.6.2	Proteinbestimmung	28
2.6.3	Gewebehomogenisierung zur Proteingewinnung	29
2.6.4	Lyse von Zellkulturen	29
2.6.5	Hypotonische Lyse von Zellen	30
2.6.6	Präparation von Zellkernen	30
2.6.7	SDS-PAGE	31
2.6.8	Western-Blot	31
2.6.9	Ko-Immünpräzipitation	33
2.6.10	Biotinylierung von Proteinen	33
2.6.11	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von GST- β -Catenin mit GSK3 β	34

Inhaltsverzeichnis

2.7	Zellbiologische Methoden	34
2.7.1	Zelllinien	34
2.7.2	Subkultivierung von Zelllinien	37
2.7.3	Beschichtung von Zellkulturmaterial mit Kollagen	37
2.7.4	Immuncytochemie	37
2.7.5	Immunhistochemie	38
2.8	Molekularbiologische Methoden	39
2.8.1	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	39
2.8.2	Plasmidpräparation	40
2.8.3	Expression von GST-Fusionsproteinen	40
2.8.4	Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen	40
2.9	Peptidsynthese	41
2.9.1	Automatisierte multiple Festphasenpeptidsynthese	41
2.9.2	Kopplung von X-Positionen	42
2.9.3	Synthese von Phosphopeptiden	43
2.9.4	Einführung von Biotin am Aminoterminus von Peptiden.....	43
2.9.5	Einführung von 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride am Aminoterminus von Peptiden	44
2.9.6	Quantifizierung von dabsylierten Peptiden	44
2.9.7	Nachweis freier Aminogruppen - Kaisertest	44
2.9.8	Abspaltung der Peptide und Freisetzung funktioneller Gruppen	44
2.9.9	Qualitätskontrolle mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	45
2.9.10	Qualitätskontrolle mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC).....	45
2.10	Synthetisierte Peptide	46
2.11	Verwendete Antikörper	52
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Antikörpercharakterisierung	55
3.1.1	Epitopkartierung und Affinitätsbestimmung von Fab-Fragmenten.....	58
3.1.2	Kompetitionsassay zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante von peptidspezifischen Fab-Fragmenten .	64
3.1.3	Charakterisierung von phospho- und nicht-phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern.....	71
3.2	Sandwichimmunoassays zur Untersuchung von β-Catenin in Lebernorgewebe und Lebertumoren aus Mäusen	83
3.2.1	β -Catenin Sandwichimmunoassay	83
3.2.2	Glutaminsynthetase-Sandwichimmunoassay	88
3.2.3	Sandwichimmunoassay zur Analyse des Phosphorylierungsmusters von β -Catenin	89
3.2.4	Etablierung einer Mikrosphären-basierten Ko-Immunpräzipitation zur Bestimmung von membranständigem β -Catenin	96
3.3	Untersuchung von β-Catenin in <i>Catnb</i>-mutierten hepatozellulären Maustumoren .	103
3.3.1	Glutaminsynthetase	104
3.3.2	β -Catenin	105
3.3.3	Analyse von N- und E-Cadherin	107

3.3.4	Ko-Immunpräzipitation von β -Catenin mit E-Cadherin bzw. E-Cadherin mit β -Catenin.....	110
3.3.5	Ko-Immunpräzipitation von β -Catenin mit N-Cadherin bzw. N-Cadherin mit β -Catenin	112
3.3.6	Analyse der Phosphorylierung von β -Catenin	114
3.3.7	Subzelluläre Lokalisation von phosphoryliertem β -Catenin	119
4	DISKUSSION.....	130
4.1	Mikroarrays zur Antikörpercharakterisierung.....	130
4.2	Detektion und Quantifizierung der Phosphorylierung und Komplexierung von β-Catenin	133
4.2.1	Messung des β -Catenin-Zielgens Glutaminsynthetase.....	134
4.2.2	Quantifizierung der membranständige β -Catenin Bindepartner N- und E- Cadherin.....	134
4.2.3	Quantifizierung von membranständigem β -Catenin anhand der Cadherin-Komplexe.....	135
4.2.4	Analyse des Phosphorylierungsmusters und der subzellulären Verteilung von β -Catenin	137
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	141
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	142
7	PUBLIKATIONSLISTE	152
8	LEBENS LAUF	153
9	AKADEMISCHE LEHRER.....	154
10	DANKSAGUNG	155

Abkürzungen

β -Me	β -Mercaptoethanol
[Ab]	Konzentration freier Antikörper
[Ab ₀]	Gesamtkonzentration Antikörper
[AbAg]	Konzentration Antikörper-Antigen-Komplex
[Ag]	Konzentration freies Antigen
[Ag ₀]	Gesamtkonzentration an Antigen
Ab	Antikörper
AbAg	Antikörper-Antigen-Komplex
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
Aca	ϵ -Aminocaprinsäure
AcN	Acetonitril
Ag	Antigen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
bcat	β -Catenin
Bis-Tris	[Bis(2-Hydroxyethyl)imino]-tris(hydroxymethyl)methan
BP	Blockierungspuffer
BSA	Rinderserumalbumin
CY3	Cyanpolymethinfarbstoff 3
CY5	Cyanpolymethinfarbstoff 5
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doa	8-Amino-3,6-dioxa-octansäure
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
Ecad	E-Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalent
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
fc	<i>fragment crystalline</i>
FIA	<i>Fluorescence Immunoassay</i>

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
GAPDH	Glyceraldehydphosphatdehydrogenase
GS	Glutaminsynthetase
GST	Glutathion S-Transferase
H ₂ O _{dd}	Deionisiertes Wasser
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure)
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
Mab	<i>monoclonal antibody</i>
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Mittelwert
Ncad	N-Cadherin
NMP	1-N-Methylpyrrolidon
Pab	<i>polyclonal antibody</i>
PB	Phenobarbital
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PIP	Piperidin
PLL	Poly-L-Lysin
PMT	<i>Photomultiplier</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SMCC	4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-Carboxyl-3-Sulfo-N-Hydroxysuccinimid Ester
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
SPSS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
Stabw	Standardabweichung
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline/ 0.05% Tween 20</i>
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Tetrafluoroborat

TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
Tis	Triisopropylsilan
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	γ -Aminobuttersäure
Wt	Wildtyp

Aminosäuren wurden gemäß IUPAC mit dem Einbuchstabencode abgekürzt.

1 EINLEITUNG

1.1 Protein-Mikroarray-Technologie

Die Mikroarray-Technologie wird heutzutage routinemäßig in der mRNA-Analyse eingesetzt [1]. Tausende immobilisierte Oligonucleotide oder cDNAs erlauben die parallele Detektion von tausenden mRNAs in einem Experiment. Zur Beschreibung der dynamischen Prozesse einer Zelle sind mRNA-Expressionsdaten allein jedoch nicht ausreichend. Es existiert keine absolute Korrelation zwischen der mRNA-Menge und dem korrespondierenden Protein [2]. Das komplexe zelluläre Verhalten wird nicht primär über Gene und deren exprimierte mRNA vermittelt, sondern über deren Translationsprodukte, den Proteinen. Die Quantifizierung aller Proteine und deren posttranslationaler Modifikationen ist Gegenstand der Proteomanalyse. Heutzutage wird für diese Analytik neben 2D-LC/ MS vor allem die zweidimensionale Gelelektrophorese in Kombination mit der Massenspektrometrie verwendet. Diese Technik erlaubt es, in einem Experiment mehrere tausend Proteine aufzutrennen und diese nach enzymatischem Verdau durch massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente zu identifizieren. Allerdings stößt diese Methode bei sehr sauren bzw. sehr basischen, bei niedermolekularen oder sehr hochmolekularen Proteinen, bei schwerlöslichen Proteinen und bei Proteinen, die nur in sehr geringen Konzentrationen im Gewebe oder der Zelle vorliegen, an ihre Grenzen [3].

Die Protein-Mikroarraytechnologie stellt eine viel versprechende Ergänzung zur bestehenden Proteomanalytik dar. Mikroarrays bestehen aus einer Vielzahl an immobilisierten Antikörpern oder rekombinanten Proteinen und wurden erfolgreich zur Quantifizierung und zur funktionellen Analyse von Proteinen verwendet [4-6]. Abhängig von der Anwendung können Protein-Mikroarrays in zwei Kategorien unterteilt werden: (1) Arrays für Proteomics d.h. Systeme zur parallelen Detektion und Quantifizierung ausgewählter Proteine und (2) Arrays zum funktionellen Studium von Proteinen.

Arrays zur Quantifizierung von Proteinen in Patientenproben oder Lysaten können weiter unterteilt werden. Sie unterscheiden sich in der Applikation der zu

untersuchenden Probe. Man spricht von so genannten *forward phase*-Arrays, wenn die Probe auf einem Array mit einer Vielzahl von immobilisierten Fängermolekülen inkubiert wird. Ziel ist es, in einer Probe gleichzeitig viele Analyten zu detektieren. Als Beispiel wären hier Antikörperarrays zu nennen, mit denen es möglich ist, durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Lysaten parallel mehrere Proteine in einem Analyseansatz zu messen [7, 8]. Werden die Proben selbst zur Herstellung eines Arrays verwendet, spricht man von einem *reverse phase*-Array. Diese Art Array ermöglicht es, in einem Experiment parallel bis zu 600 Proben mit einem Antikörper auf ein Protein hin zu untersuchen [9, 10].

Die zweite Kategorie von Protein-Mikroarrays - Arrays die zu funktionellen Studien verwendet werden - bestehen aus zahlreichen rekombinanten Proteinen oder Proteindomänen. Mit Hilfe dieser Arrays können nach Inkubation mit ausgewählten Proteinen Protein-Protein-Interaktionen im Genommaßstab untersucht werden. Die wohl bemerkenswerteste Arbeit in diesem Bereich war die Generierung eines rekombinanten Proteom-Arrays von *Saccharomyces cerevisiae* [11]. 5800 GST-Fusionsproteine wurden überexprimiert, gereinigt und dazu verwendet einen Array herzustellen. Mit diesem Array war man in der Lage neue und bekannte Calmodulin-Interaktionen zu detektieren.

Die Protein-Mikroarray-Technologie erlaubt die funktionelle Analyse von Proteinen in hoher Multiplizität. Außerdem sind die Interaktionen von Proteinen mit hunderten bis tausenden von immobilisierten Molekülen wie Proteinen, Peptiden, Oligosacchariden, niedermolekularen Substanzen oder DNA-Molekülen möglich [4, 5].

1.2 Mikroarray-Plattformen

Mikroarray-Experimente sind parallelisierte miniaturisierte Festphasenassays. Klassische Mikroarrays verwenden Glasoberflächen als feste Phase zur Immobilisierung der Proteine, cDNA usw. Die Kodierung dieser so genannten Fängermoleküle erfolgt durch die Immobilisierung in einer exakten XY-Position bei der Herstellung eines Arrays. Neben dieser lokalen Verschlüsselung existieren alternative Methoden zur Durchführung eines multiplexen Assays. Hierzu werden Polystyrolmikrosphären als feste Phase zur Immobilisierung von Fängermolekülen

verwendet [12]. Die Kodierung der Fänger-moleküle ergibt sich nicht wie bei planaren Arrays aus der XY-Position, sondern durch eindeutige Markierung der Mikrosphären mit Fluoreszenzfarbstoffen (Luminex, Austin, TX, USA) oder durch Größenunterschiede der Mikrosphären (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA).

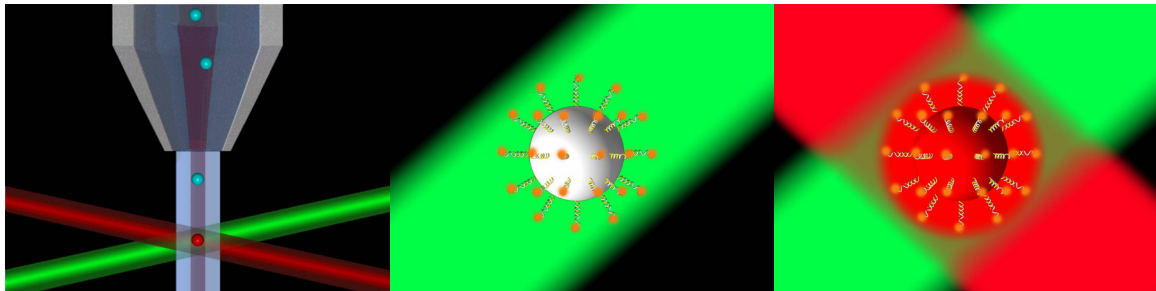


Abbildung 1.1: Prinzip der Messung eines Mikrosphären-basierten Arrays. Die Mikrosphären werden in einer Messzelle vereinzelt (Bild links). Anschließend erfolgt die Klassifizierung einer Mikrosphäre durch Anregung der eingebetteten Fluorophore (Klassifizierungssignal) mit einem grünen Laser (635 nm) (mittleres Bild). Mit Hilfe eines roten Lasers (535 nm) wird der so genannte Reporterfluorophor angeregt. Das Reportersignal (565-585 nm) wird nur dann aufgezeichnet, wenn gleichzeitig eine Mikrosphäre detektiert wird (abgeändert nach einer Präsentation von J.W. Jacobson, Luminex®).

Die Durchflusszytometrie erlaubt die simultane Klassifikation der Mikrosphären und das Auslesen von geeigneten Reporter-molekülen (siehe Abbildung 1.1). Vorteile der Mikrosphären-basierten Arrays bestehen vor allem in der schnellen und einfachen Entwicklung und Durchführung von Assays. Außerdem ist man unabhängig von teuren wartungsintensiven Geräten, die zur Herstellung von planaren Arrays benötigt werden. Ein weiterer Vorteil ist das Wegfallen der zeitaufwendigen Bildauswertung planarer Mikroarrays. Nachteil dieser Mikrosphären-basierten Methode ist die niedrige Komplexität der Arrays verglichen mit planaren Mikroarrays. Während auf planaren Arrays mehr als 10000 Fänger-moleküle potentiell immobilisiert werden können, stehen im Fall von Mikrosphären-Arrays nur 100 verschiedene Mikrosphären zur Verfügung (Luminex, Austin, TX, USA). Mikrosphären-basierte Systeme sind eine Alternative zur planaren Plattform, insbesondere wenn die parallel zu bestimmende Anzahl an Analyten niedrig ist.

1.3 Multiplexe Sandwichimmunoassays

Bei einer geringen Anzahl an nachzuweisenden Analyten in einer Probe bzw. in einem Zellhomogenat sind multiplexe Sandwichimmunoassays eine Möglichkeit Proteine parallel zu detektieren. Die Verwendung von zwei Antikörpern in einem Sandwichimmunoassay gewährleistet Sensitivität und Spezifität bis in den femtomolaren Bereich [13].

Die Möglichkeit der Miniaturisierung und Parallelisierung von Sandwichimmunoassays wurde schon des mehrfachen von anderen Arbeitsgruppen gezeigt [12, 14-24]. Einer der ersten Mikroarray-basierten Sandwichimmunoassays wurde von Ekins und Mitarbeitern entwickelt [16, 25]. TSH (thyroid stimulating hormone) und Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (HbsAG) konnten hier im femtomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Mit 150 Sandwichimmunoassays für 150 verschiedene Cytokine und andere Serumkomponenten haben Shao *et al.* die bis jetzt komplexeste Sandwichimmunoassay-Analyse auf planaren Mikroarrays durchgeführt [23].

Neben der Untersuchung von Serummarkern ist natürlich auch die Messung von Zellproteinen von großem Interesse. Das komplexe Netzwerk der Signaltransduktion bedarf einer schnellen, preisgünstigen und sensitiven Möglichkeit zur parallelen Quantifizierung relevanter Proteine und ihres Phosphorylierungsstatus. Nielsen *et al.* [19] haben einen planaren Antikörperarray zur Quantifizierung der Menge und der Phosphorylierung des ErbB-Rezeptors in Zelllysaten entwickelt. Mit einem Zweifarbandetektionssystem waren sie in der Lage, parallel Gesamtmenge und Phosphorylierung von ErbB zu messen. Verschiedene Zelllinien zeigten Unterschiede in der ErbB-Expression und ErbB-Phosphorylierung infolge einer Stimulation mit EGF (Epidermal growth factor). Mikrosphären-basierte Arraysysteme werden mittlerweile routinemäßig zur parallelen Messung von Cytokinen und Antikörpern in biologischen Proben wie Patientenseren und Zellkulturüberständen verwendet [12, 14, 15, 17, 20, 21, 26, 27]. Eine wachsende Zahl an Mikrosphären-basierten Sandwichimmunoassays zur multiplexen Bestimmung von Cytokinen, Serummarkern, phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Kinasen sind mittlerweile kommerziell verfügbar.

Die größte Einschränkung beim Einsatz von multiplexen Sandwichimmunoassays zur Analyse von komplexen Proteinproben ist die begrenzte Verfügbarkeit von geeigneten Antikörpern bzw. rekombinanten Fängermolekülen.

1.4 Fängermoleküle

Hochspezifische und selektive Fängermoleküle sind die Voraussetzung für die Generierung von DNA- und Protein-Mikroarrays. Die Herstellung von Fängermolekülen für DNA-Arrays ist unkompliziert. Hochaffine Fängermoleküle können nach der Watson-Crick-Basenpaarung einfach vorhergesagt werden. Automatisierte Oligonucleotid-Synthese und PCR-basierte Ansätze erlauben eine schnelle und kostengünstige Herstellung von Sonden für DNA-Mikroarrays. Im Gegensatz zur DNA sind die Strukturen in Proteinen weitaus komplexer. Die Seitenketten der 20 proteinogenen Aminosäuren ergeben weit mehr Möglichkeiten zur Interaktion als die Eins zu Eins Paarung der vier Nucleobasen. Proteine bilden Sekundärstrukturen wie z.B. α -Helices oder β -Faltblätter. Eine verlässliche Vorhersage für eine Fänger-Liganden-Interaktion ist daher alleine auf der Basis einer Proteinsequenz bis heute noch nicht möglich.

Die für Protein-Arrays benötigten Fängermoleküle können zum einen durch klassische Immunisierungen mit anschließender Generierung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gewonnen werden [28], zum anderen über rekombinante molekularbiologische Methoden wie die *Phage-Display*-Technologie [29] oder über *in-vitro*-Evolutions-Techniken [30, 31]. Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, Fängermoleküle bzw. Antikörper gegen fast jedes beliebige Molekül zu generieren. Der limitierende Faktor ist jedoch die Selektion und Charakterisierung geeigneter potentieller Binder [4, 32]. Gegenwärtig werden kinetische Daten von Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten über Bindungsstudien unter Einsatz von *surface plasmon resonance*-Sensoren bestimmt [33]. Die Instrumentierung dieser Methode erlaubt jedoch nur einen geringen Probendurchsatz. Daher ist es notwendig schnellere Methoden zur Bestimmung von Bindungseigenschaften wie z.B. Dissoziationskonstanten zu entwickeln.

1.5 Peptid-Arrays

Zur Charakterisierung von Fängermolekülen/ Antikörpern gehört neben der Bestimmung kinetischer Daten wie Affinitätskonstanten auch die Ermittlung der Spezifität des Fängers für sein Analytmolekül. Zur genaueren Beschreibung der Antigen-Antikörper-Interaktion werden in der Regel die Epitope eines Antikörpers bestimmt. Für eine Epitopkartierung bzw. die Bestimmung von Spezifitäten haben sich Peptid-Makroarrays und -Mikroarrays als äußerst hilfreich erwiesen [34]. Diese Arrays werden dazu verwendet, Epitope bis auf eine einzige Aminosäure einzugrenzen [35]. Routinemäßig werden Makroarrays aus Peptiden verwendet, die direkt auf einer Cellulose-Membran synthetisiert werden (SPOT-Peptidsynthese) [36]. Diese Methode erlaubt es bis zu 3000 Peptide gleichzeitig in einem Assay zu untersuchen [37]. Die Generierung von Peptid-Arrays mit einzelnen synthetisierten Peptiden bietet jedoch einige Vorteile. Die Verwendung solcher Peptide bietet die Möglichkeit einer Qualitätskontrolle jedes Peptids und der Abtrennung von Synthesenebenprodukten. Mit Hilfe einer chemoselektiven Immobilisierung können Rohpeptide direkt zur Herstellung von Arrays verwendet werden [38-40]. Falsch-positive Signale, die von synthesebedingten Nebenprodukten erzeugt werden, können auf diese Weise vermieden werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der Herstellung von Arrays mit höherer Spotdichte. Mit konventionellen *Microarrayern* können Arrays mit 500-mal höheren Spotdichten hergestellt werden als mit der SPOT-Peptidsynthese. Dadurch wird der Verbrauch an Probe bzw. Antikörper drastisch gesenkt. Neben der SPOT-Synthese existiert eine weitere adressierbare direkte Chip-Synthese, die der On-Chip-DNA-Synthese ähnelt. Die *light directed synthesis* [41, 42] verwendet photoaktive Aminosäurebausteine zum Aufbau von Peptiden an einer Glasoberfläche unter Verwendung photolithographischer Masken. Die Spotdichte dieser Arrays ist noch höher als die, die mit Arrayrobotern erreicht werden kann. Der Herstellungsmethode fehlt es jedoch an technischer Reife. Aufgrund unzureichender Kopplungseffizienz der Aminosäurebausteine konnten bisher keine solcher Arrays für die Beantwortung einer biologischen Fragestellung verwendet werden.

Peptid-Arrays bieten die Möglichkeit, parallel die Interaktion von Antikörpern oder rekombinanten Bindemolekülen mit einer Vielzahl an Peptiden zu untersuchen. Die Bestimmung der Bindungsspezifität oder die Kartierung eines linearen Epitops sind in einem Experiment möglich.

1.6 Array-basierte Proteomanalytik

Die Proteomanalyse hat das erklärte Ziel, die Menge aller Proteine und deren posttranslationale Modifikationen in einer Zelle oder einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erfassen. Dadurch sollen die dynamischen Prozesse in Zellen und Geweben auf Proteinebene darstellbar und damit in ihren molekularen Wechselwirkungen verstehbar werden. Die klassische Proteomanalyse verwendet häufig die 2D-Gel-MS-Analytik zur Untersuchung von Proteinen in biologischen Proben. Die Methode ist in der Lage tausende Proteine aufzutrennen und zu identifizieren. Das größte Problem dieser Analyseverfahren ist jedoch die erforderliche Menge an Probenmaterial (ca. 0.5 mg) und der Zeitaufwand, der für eine Untersuchung notwendig ist. Die Probenmenge stellt für Studien mit Zellkulturen kein Problem dar. Biologisches Material wie beispielsweise Tumorproben ist jedoch limitiert. Die Miniaturisierung, Parallelisierung und die Sensitivität von Immunoassay-basierten Mikroarraymethoden haben das Potential, die klassischen Proteomanalysemethoden zu ergänzen. Bis jetzt liegt die Komplexität von solchen Arrays jedoch aufgrund fehlender Antikörper weit hinter dem Potential von 2D-Gelen.

Im BMBF-Projekt „PepART“ (peptidbasierte Proteomanalyse mittels Arraytechnologie) wird ein modifizierter Ansatz der array-basierten Proteomanalyse entwickelt. Proteine sollen nach enzymatischem oder chemischem Verdau anhand von Signaturpeptiden identifiziert und quantifiziert werden. Durch *in silico*-Verdau und Sequenzvergleich werden einzigartige, proteinspezifische Peptide identifiziert, synthetisiert und zur Generierung von klassischen Antikörpern oder rekombinanten Bindern verwendet. Mit diesen peptidspezifischen Antikörpern werden Mikroarrays generiert und zur Analyse der Peptide verwendet. Die Detektion der Peptide erfolgt entweder über eine direkte chemische Konjugation der Peptide an Fluorophore nach dem Verdau (siehe

Abbildung 1.2) oder über einen zweiten peptidspezifischen Antikörper (Sandwichimmunoassay). Ein Vorteil dieser Strategie besteht in der Verwendung von synthetisch einfach herzustellenden Antigenen, die zur Generierung von Fängermolekülen eingesetzt werden. Der Ansatz peptidspezifische Antikörper zur Detektion zu verwenden, bringt Vorteile für die Probenvorbereitung. Während für konventionelle Sandwichimmunoassays der Analyt meist in nativer Form erhalten werden muss, wird das Protein im PepART-Ansatz denaturiert und verdaut. Die Probenaufarbeitung und -vorbereitung ist ein kritischer Schritt, der für die Reproduzierbarkeit von klassischen Sandwichimmunoassays mitverantwortlich ist, vor allem wenn man Bedingungen für mehrere Analyten gleichzeitig optimieren muss. Die Probenvorbereitung sollte für die PepART-Methode daher generell einfacher zu standardisieren sein. Außerdem sollte es kein Problem darstellen, für die 2D-Gel-MS-Methode schwierige Analyten wie Membranproteine zu verdauen und auf diesem Wege nachzuweisen.

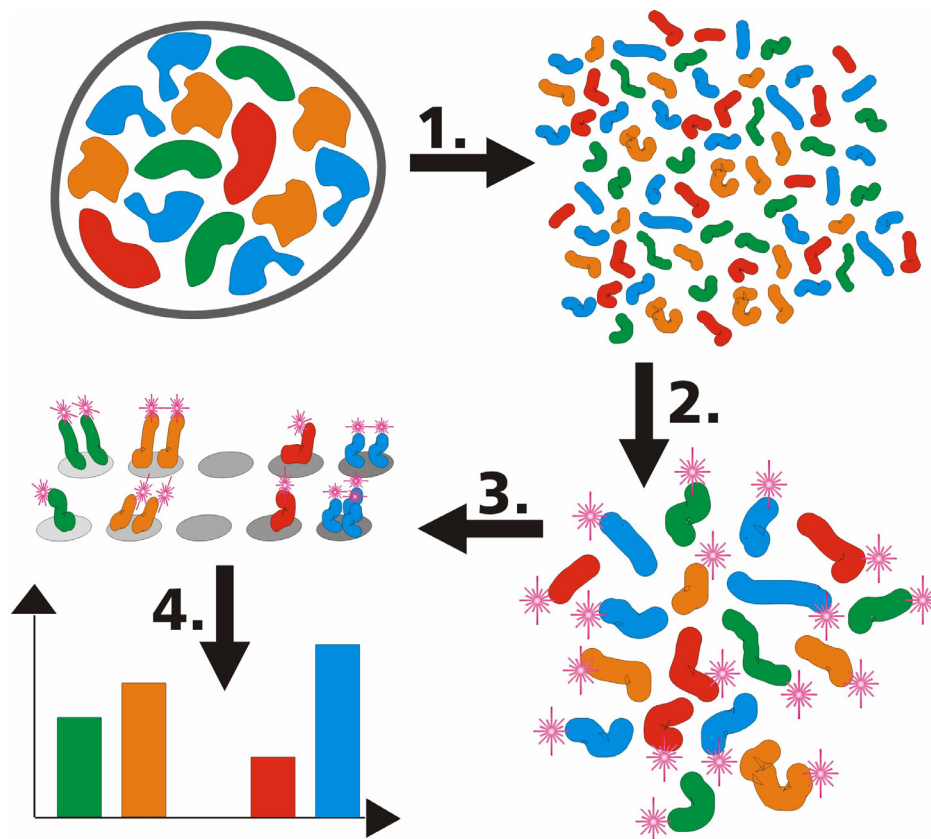


Abbildung 1.2: PepART-Konzept. Das gesamte Proteom wird durch einen enzymatischen Verdau in charakteristische Peptide gespalten (1). Die Peptide werden nach dem Verdau chemisch mit Fluorophoren oder Haptenen markiert (2) und auf einem Array mit peptidspezifischen Antikörpern inkubiert (3). Die multiplexe quantitative Analyse der Proteine erfolgt durch das ortsaufgelöste Auslesen der Fluoreszenz (4).

Ein Schritt auf dem Weg zur Generierung von PepART-Arrays ist die Herstellung der peptidspezifischen Binder oder Antikörper. Diese sollen rekombinant mit der *phage display*-Methode bzw. mit klassischer Immunisierung hergestellt werden. Eine hohe Spezifität und Affinität der Antikörper sind Voraussetzung für die Verwendung in diesem Ansatz. Die Entwicklung von Peptid-Arrays zur Evaluierung dieser Eigenschaften von Antikörpern stellt daher eine große Herausforderung in diesem Projekt dar.

1.7 Rolle des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs in hepatozellulären Karzinomen

Die Kanzerogenese ist ein Prozess, der sowohl durch aktivierende Mutationen in wachstumsfördernden Genen (Protoonkogenen) als auch durch inaktivierende Mutationen in wachstumshemmenden Genen (Tumorsuppressorgenen) getrieben wird. Die Akkumulation solcher Mutationen wird zudem durch Defekte in DNA-Reparaturmechanismen verstärkt. Ferner spielen promovierende Effekte durch Fremdstoffe eine Rolle. Mittlerweile wurden in Tumoren mehr als 150 verschiedene Gene identifiziert, die beeinträchtigt sein können und an der Regulation von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind. Die meisten dieser Gene gehören zu Komponenten von Signalwegen, deren Funktion in der Weiterleitung von externen Signalen von der Zelloberfläche zum Zellkern liegt. Krebszellen zeigen häufig eine permanente Aktivierung von Signalkaskaden und sind meist von deren Genprodukten abhängig [43]. Hepatozelluläre Karzinome (HCC, *hepatocellular carcinoma*) gelten als die häufigsten primären malignen Tumore der Leber und umfassen weltweit 5% aller Krebsarten (3% in Deutschland [44]). Pro Jahr werden 250.000 bis 1,2 Millionen neue Fälle geschätzt und 500.000 bis 1 Million Todesfälle hiermit in Verbindung gebracht [45]. Genetische Prädispositionen für HCC-Initiation oder HCC-Progression sind noch weitgehend ungeklärt. Mindestens vier Signalwege sind an der Kanzerogenese beteiligt: p53, ras, RB und Wnt-/ β -Catenin [46]. Eine veränderte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs wird bei 30–40% aller humanen HCCs beobachtet [47].

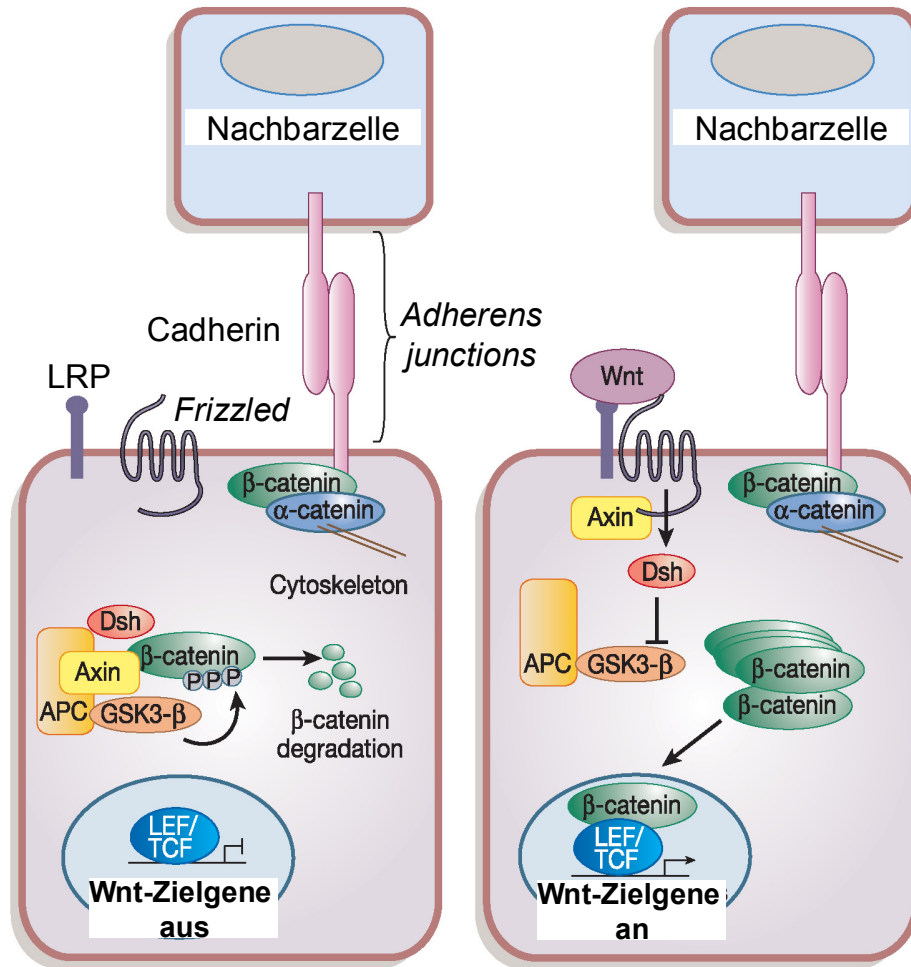


Abbildung 1.3: Alternative Rollen von β -Catenin im Wnt-Signalweg und der Zelladhäsion. In der Abwesenheit eines Wnt-Signals (linke Hälfte des Bildes), ist β -Catenin Bestandteil in einem Komplex aus Axin, APC, Dsh, GSK3 β und CK1 α . In diesem Komplex wird β -Catenin phosphoryliert und für den Abbau markiert. Des Weiteren liegt β -Catenin membranassoziiert an Cadherinen vor und reguliert Zell-Zell Adhäsion. In Gegenwart eines Wnt-Signals (rechte Hälfte des Bildes) wird die Phosphorylierung von β -Catenin inhibiert, das Protein wird nicht weiter degradiert und transloziert in den Kern. Hier bindet es an Transkriptionsfaktoren der Lef/ Tcf-Familie und aktiviert die Expression von Zielgenen (verändert nach [48]).

Der Wnt-Signalweg wird über die Bindung des Lipoproteins Wnt (Familie von 19 Genen) an den 7-Transmembranrezeptor *frizzled* aktiviert. Intrazellulär wird das Signal von einem Protein namens *dishevelled* (*dsh*) weitergeleitet. Als Folge dieses Signals wird der Abbau von β -Catenin inhibiert. Es kommt zur Akkumulation des Proteins im Cytosol und schließlich zur Translokation in den Kern. Hier bindet β -Catenin an Transkriptionsfaktoren der LEF (*lymphoid enhancer factor*)/ TCF (*T cell factor*)-Familie und aktiviert die Expression von mehr als 20 Zielgenen, die unter anderem an Regulationsprozessen der Zellproliferation

und der Zelldifferenzierung beteiligt sind [49]. In ruhenden Zellen ist der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg nicht aktiviert. Im inaktivierten Zustand lässt sich die Gesamtmenge an β -Catenin in zwei Fraktionen unterteilen: in cytosolisches und membranassoziiertes (siehe Abbildung 1.3). Die größere Fraktion ist an die cytoplasmatische Domäne von Zelladhäsionsmolekülen, den Cadherinen, gebunden. β -Catenin bildet zusammen mit α -Catenin eine Brücke zwischen Cadherin und Aktin. Das Protein erfüllt die essentielle Rolle eines Adaptermoleküls zwischen der Zellmembran und dem Cytoskelett und ist damit maßgeblich an der strukturellen Organisation der Zelle beteiligt. Die funktionelle Integrität dieses Komplexes wird über die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste im Protein gesteuert [50-53].

Die cytosolische Fraktion an β -Catenin wird permanent am N-terminalen Bereich phosphoryliert, ubiquitinyliert und anschließend proteasomal degradiert. Die Halbwertszeit des Proteins liegt bei ca. 3 h [54]. Die Phosphorylierung findet in einem Multiproteinkomplex (*Destruction Complex*), bestehend aus Axin, Casein Kinase 1 α (CK1 α), Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β), dem Adenomatösen Polyposis Coli-Protein (APC) und *Dishevelled* (Dsh) statt (siehe Abbildung 1.3). Die Phosphorylierung der verschiedenen Phosphorylierungsstellen verläuft sequentiell [55]. Zunächst wird β -Catenin von CK1 α an Serin 45 und im Folgenden von GSK3 β an Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 phosphoryliert (siehe Abbildung 1.4). Die anschließende Ubiquitinylierung von β -Catenin erfolgt nach Bindung der Ubiquitinligase β -Trcp an die phosphorylierten Serine 33 und 37 [56]. Nach der Ubiquitinylierung kann das Protein durch das 26S-Proteasom degradiert werden [57]. Bei aktiviertem Wnt-Signalweg inhibiert *dsh* GSK3 β , die Phosphorylierung wird unterbunden und β -Catenin akkumuliert im Cytosol.

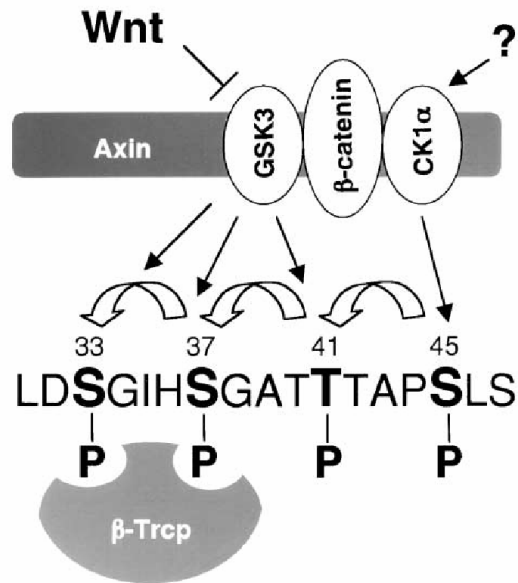


Abbildung 1.4: Modell der Phosphorylierungssequenz von β -Catenin im *Destruction Complex*. CK1 α phosphoryliert im ersten Schritt Serin 45. Nach diesem Schritt werden Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 von GSK3 β phosphoryliert. Nach Phosphorylierung von Serin 33 und 37 ist β -Trcp in der Lage mit β -Catenin zu interagieren und zu ubiquitinylieren (modifiziert nach [55]).

Eine Hyperaktivierung des Wnt-Signalwegs wird in verschiedenen Tumoren in Folge von Mutationen in APC, Axin oder Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Bereich von β -Catenin beobachtet. Im Allgemeinen führen diese Mutationen zu einer reduzierten Degradation von β -Catenin im Cytosol. Als Folge der Stabilisierung von cytosolischem β -Catenin, werden Transkripte der Wnt-Gene auch in Abwesenheit eines externen Wnt-Signals induziert. Im Falle von HCCs kann eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs auf Mutationen in zwei Genen zurückgeführt werden. Die Veränderungen betreffen die Phosphorylierungsbereiche von β -Catenin *Ctnnb1* (human)/ *Catnb* (Maus) oder die Gene *AXIN1* oder *AXIN2*. Mutationen in APC konnten interessanterweise wie in Kolontumoren nicht gefunden werden [47]. Im Gegensatz zur Situation in Kolonkarzinomen konnte in HCCs nicht immer eine erhöhte Konzentration an β -Catenin in Folge eines veränderten Wnt-Signalwegs festgestellt werden [58-61].

Als Besonderheit von Mauslebertumoren mit Mutationen im β -Catenin-Gen konnte eine Überexpression des Enzyms Glutaminsynthetase (E.C. 6.2.1.3) festgestellt werden [62, 63]. Dieses Enzym setzt Glutamat mit NH_3 unter Verbrauch von ATP zu Glutamin um. In der Leber findet eine GS-Expression nur

in Hepatocyten statt, die die Zentralvene umgeben. In humanen HCCs korreliert ebenfalls ein erhöhter mRNA-Spiegel für GS mit Mutationen im β -Catenin-Gen (persönliche Mitteilung Prof. M. Schwarz).

1.8 Aufgabenstellung

Die Funktion von β -Catenin wird laut Literatur über die Konzentration und die Phosphorylierung des Proteins bestimmt. Seine transkriptionelle Aktivität wird also unter anderem durch das Gleichgewicht von Synthese und Degradation reguliert. Die vierfache Phosphorylierung am N-terminalen Bereich markiert das Protein zum Abbau durch das Proteasom. In Kolonkarzinomen führt eine Mutation in den Phosphorylierungsstellen, wie bei einer Aktivierung des Wnt-Signalweges zur Inhibition dieses Abbauweges und zur Akkumulation des Proteins. Der Selektionsvorteil dieser Tumoren lässt sich also direkt auf eine Hyperaktivierung des Wnt-Signalwegs zurückführen, also auf die Wirkung von β -Catenin als Transkriptionsfaktor.

Die Behandlung von C3H/He-Mäusen mit Diethylnitrosamin und Phenobarbital führt zu Lebertumoren mit 80% Mutationsprävalenz in β -Catenin [58]. Im Gegensatz zu Messungen in Kolonkarzinomen konnten jedoch hier keine Konzentrationsunterschiede in den Tumoren gegenüber Normalgewebe mit der Western-Blot-Methode festgestellt werden. Anhand bekannter Wnt-Zielgene wie *c-myc* und *Cyclin D1* konnte auch keine Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, mit miniaturisierten Sandwichimmunoassays Unterschiede in der β -Catenin-Konzentration in den oben erwähnten *Catnb*-Lebertumoren der Maus zu messen. Die Konzentration von β -Catenin wurde in der oben erwähnten Arbeit [58] nur in Gesamthomogenaten von Tumoren gemessen. Maßgeblich für die transkriptionelle Aktivität des Proteins ist jedoch nicht seine Gesamtkonzentration, sondern die cytosolische bzw. nukleäre Konzentration. Es besteht die Möglichkeit, dass durch den Überschuss an membrangebundenem β -Catenin größere Unterschiede in der Menge an cytosolischem β -Catenin überdeckt werden. Eine Bestimmung des membranständigen Anteils an β -Catenin über miniaturisierte Ko-

Immunpräzipitationen von Cadherin/ β -Catenin-Komplexen sollte indirekt Rückschlüsse auf die Menge an cytosolischem β -Catenin ermöglichen. Mit einer erhöhten freien cytosolischen Fraktion an β -Catenin wäre eine klassische Erklärung für den Selektionsvorteil dieser speziellen *Catnb*-Tumoren möglich

Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern eine unterschiedliche Phosphorylierung am N-terminalen Bereich von β -Catenin für die Tumorentwicklung in den *Catnb*-Lebertumoren eine Rolle spielt. Da in den oben beschriebenen *Catnb*-Tumoren interessanterweise keine Mutation in Serin 45 gefunden wurde, könnte die Phosphorylierung dieser Position für die Tumorpromotion mit PB wichtig sein. In der Literatur wird die Phosphorylierung dieser Aminosäure als bestimmender Schritt zum Abbau von β -Catenin beschrieben [55, 64]. Eine weitere Funktion von Serin 45-phosphoryliertem β -Catenin ist nicht bekannt.

Zur Untersuchung des Phosphorylierungsmusters sollten daher verschiedene Antikörper hinsichtlich ihres Potentials zur Diskriminierung der Phosphorylierungsstellen mit selbst etablierten Phosphopeptid-Arrays untersucht werden. Die Entwicklung von Systemen zur Untersuchung der Phosphoselektivität und Sequenzspezifität unter Verwendung der Arraytechnologie war daher eine zentrale Aufgabe dieser Arbeit. Eine Voraussetzung zum Aufbau von miniaturisierten Sandwichimmunoassays und anderen antikörperbasierten Methoden wie der Western-Blot-Technik, ist die Untersuchung der Spezifität der für diese Anwendung benötigten Binder. Daher sollte in dieser Arbeit ein array-basiertes Testsystem etabliert werden, das sich zur schnellen Charakterisierung von rekombinanten Fab-Fragmenten und Antikörpern eignet.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10x <i>reducing agent</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
10x SDS-MOPS Laufpuffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
10x Transferpuffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
4x LDS-Probenpuffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid	Pierce, Rockford, IL, USA
1-N-Methylpyrrolidon	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl Chlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Accustain	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aminosäure-Harz	PepChem NMI TT GmbH, Reutlingen, Deutschland
ATP	Merck Biosciences, Bad Soden, Deutschland
Biotin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Blocking Reagent for ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Brij 10%	Merck Biosciences, Bad Soden, Deutschland
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete Proteaseinhibitoren	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Dichlormethan	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Diethylether	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Diisopropylcarbodiimid	Orpegen, Heidelberg, Deutschland
Diisopropylethylamin	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Dimethylformamid	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethandithiol	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Esel Normalserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fmoc-8-Amino-3,6-dioxaoctansäure	NeoMPS, Strasbourg, Frankreich
Fmoc-Aminosäurederivate	Orpegen, Heidelberg, Deutschland
Fmoc-Phosphoaminosäurederivat	Novabiochem, Läfelfingen, Schweiz
Fmoc- ϵ -Aminocaprinsäure	NeoMPS, Strasbourg, Frankreich
Glutathion	Fluka, Buchs, Schweiz
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
GSK3 β	Merck Biosciences, Bad Soden, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hydroxybenztriazol	IRIS Biotech, Markdrewitz, Deutschland
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaisers-Glycerolgelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid, KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumcyanid, KCN	Fluka, Buchs, Schweiz
Lysozym	Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA
Magermilchpulver	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Morpholinoethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N-(2-Hydroxyethyl)Piperazine-N'-(2-ethanosulfonsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(Benzotriazol-1-)	Orpegen, Heidelberg, Deutschland
Uronium Tetrafluoroborat	
Natriumazid, NaN ₃	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid, NaCl	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumphosphat, Na ₃ PO ₄	Fluka, Buchs, Schweiz
n-Butanol	Fluka, Buchs, Schweiz
NHS-LC-LC-Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
N-Hydroxysulfosuccinimid	Pierce, Rockford, IL, USA
Ninhydrin	Fluka, Buchs, Schweiz
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Polyacrylamid Gele	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS (ohne Calcium und Magnesium)	Eurobio, Cedex, Frankreich
Phenol	Fluka, Buchs, Schweiz
Phosphataseinhibitor I und II	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pyridin	Fluka, Buchs, Schweiz
Saccharose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Seebloomer [®]	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SMCC-BSA	Merck Biosciences, Bad Soden, Deutschland
Trifluoressigsäure	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Triisopropylsilan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-(2-carboxyethyl)phosphin	Fluka, Buchs, Schweiz
Trishydroxymethylaminomethan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ziegen-Normalserum	Jackson Dianova, Hamburg, Deutschland

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Dismembrator	Braun, Melsungen, Deutschland
ELISA Reader FluoStar Optima	BMG LABTECH, Offenburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Wetzlar, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1	Christ, Osterode, Deutschland
Gelelektrophoresesystem NuPAGE	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
HPLC-Anlage, Pumpe M480, Probengeber Gina 50	Gynkotec, Germering, Deutschland
Luminex L100	Luminex, Austin, TX, USA
Massenspektrometer, ESI-Q-ToF-1	Micromass, Manchester, Großbritannien
<i>Microarray Scanner GMS 418</i>	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
<i>Microarrayer Biochip Arrayer</i>	PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA
<i>Microarrayer GMS 417</i>	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Mikroskopkamera DFC320	Leica Microsystems, Cambridge, UK
Pipettierroboter, Genesis Gemini 100	Tecan, Hombrechtikon, Schweiz
Reinstwasseranlage	MembraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland
Syntheseroboter RSP 5031	Tecan, Hombrechtikon, Schweiz
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge, TL-Optima	Beckman, Palo Alto, CA; USA
UV-Spektrometer Uvikon923,	Kontron Instruments, Buckinghamshire, Großbritannien
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg Deutschland
Zentrifuge Rotanta	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 2s	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.3 Software

Software	Version	Hersteller
ArraysScanner Software	V1.51.0.42	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Datenanalyse	Origin 6.0	Microcal, Northhampton, MA, USA
FACS	Luminex IS 2.2	Luminex, Austin, TX, USA
HPLC	Chromeleon	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Massenspektrometer	Masslynx V.3.5	Micromass, Manchester, Großbritannien
Microarray	ImageOne V4.0	Biodiscovery, El Segundo, CA, USA
Peptidsynthesizer	Syro V1.22	MultiSynTech, Bochum, Deutschland
Spektrometer	Fluostar Optima V.1.10-0	BMG, Labtechnologies, Offenburg, Deutschland
Bildanalyse Western-Blot	Kodak Digital Science V.3.0.0	Kodak Eastman, Rochester, NY, USA

2.4 Puffer

Allgemein verwendete Puffer

TBS	150 mM NaCl 20mM Tris pH 7,4
TBST	0,05% Tween 20 150 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4
PBST	0,1% TWEEN 20 PBS pH 7,4

Zellyse und Zellfraktionierung

Zellysepuffer	150 mM NaCl 1 x Complete Proteaseinhibitoren 1% Phosphataseinhibitor I und II 1% Triton X-100 50 mM HEPES pH 7,4
---------------	---

hypotoner Lysepuffer	10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 1 x Complete Proteaseinhibitoren 10 mM HEPES pH 7,4
Kernwaschpuffer	250 mM Saccharose 5 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES pH 7,4

Herstellung und Anwendung von planaren Mikroarrays

Blockierungspuffer (BP)	1,5% BSA 5% Magermilchpulver in PBS pH 7,2
Konjugationspuffer	600 mM NaCl 60 mM EDTA 50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,2
Verdünnungspuffer (VP)	1,5% BSA 2,5% Magermilchpulver 0,1% TWEEN 20 in PBS pH 7,2

Herstellung und Anwendung von Mikrosphären-basierten Mikroarrays

Assaypuffer	0,01 % Tween 20 ELISA Blocking Reagent
Lumavidin-Assaypuffer	0,1% BSA 0,1% Tween 20 PBS pH 7,4
Aktivierungspuffer	0,1 M Na ₃ PO ₄ pH 6,2
Kopplungspuffer	50 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure pH 5,0

2.5 Mikroarray-Technologien

2.5.1 Planare Mikroarrays

2.5.1.1 Herstellung von planaren Mikroarrays

Zur Herstellung von planaren Arrays wurden zwei verschiedene Mikrodosiersysteme, genannt *Microarrayer*, eingesetzt, die Volumina im Pico- bis Nanoliterbereich reproduzierbar dosieren können. Ein so genannter Kontaktdrucker (Affymetrix GMS Arrayer 417, Santa Clara, CA, USA) und ein kontaktloser Drucker (Biochip Arrayer, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) wurden für die Generierung von Protein- und Peptid-Arrays verwendet. Genauere Informationen zur Arrayproduktion finden sich unter 2.5.1.3 und 2.5.1.4.

2.5.1.2 Konjugation von Peptiden an BSA

Peptid-BSA-Konjugate wurden unter der Verwendung von prä-aktiviertem BSA hergestellt [65]. Das BSA war bereits mit dem bifunktionalen Quervernetzungsreagenz 4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexane-1-Carboxyl 3-Sulfo-N-Hydroxysuccinimid-Ester (SMCC) modifiziert. Das prä-aktivierte BSA wurde in Konjugationspuffer (20 μ l, 0.65 mg/ml) mit 50fachem molarem Überschuss Cysteinylpeptid (40 μ l, 500 μ M, in 30% DMF/ Konjugationspuffer(v/v)) gemischt. Vor der Konjugation wurden die Peptide mit 1eq Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) versetzt, um eventuell oxidierte Thiolgruppen zu reduzieren. Die Reaktionsmischung wurde 3 h sanft bei RT geschüttelt. Überschüssiges bzw. nicht reagiertes Peptid wurde mittels Größen-Ausschluss-Chromatographie von den Konjugaten abgetrennt. Das Gelmaterial der Zentrifugensäulen (Princeton Separations Inc, Adelphia, USA) wurde vor Auftrag 30 min in PBS (650 μ l) gequollen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 800 rcf (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Die Reaktionsmischung wurde vorsichtig in der Mitte des Säulenmaterials aufgetragen. Die Elution des BSA-Peptid-Konjugates erfolgte durch erneute Zentrifugation für 2 min bei 800 rcf in ein neues Reaktionsgefäß.

2.5.1.3 Array-Generierung

Peptid-Konjugat- und Protein-Lösungen wurden in PBS auf eine Konzentration von 100-400 µg/ml verdünnt und anschließend auf Glasobjektträger (CSS Aldehyde Slides, Telechem, Sunnyvale, CA, USA) unter Verwendung eines Biochip Arrayer (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) oder GMS 417 Microarrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) gedruckt. Gedrucktes Volumen auf einem Mikrosplot betrug annähernd 300 µl im Falle des Biochip Arrayers und 150 µl im Falle des GMS Arrayers. Der Spot-Abstand wurde auf 375 µm eingestellt. Auf einen Standard-Objektträger wurden 6 Subarrays gedruckt. Nach dem Druckprozess wurden die Arrays in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert, um eine maximale Bindung der Proteine bzw. der Konjugate zu erlauben. Zur Stabilisierung und zur Aufbewahrung wurden die Arrays 2h in Blockierungspuffer (100 µl) inkubiert. Überschüssige Lösung wurde entfernt. Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei RT.

2.5.1.4 Bestimmung der Antikörperspezifität (direkter Fluoreszenz-Immunoassay) mittels planarer Peptid-Arrays

Vor Verwendung der Arrays wurden diese in PBST 10 min rehydriert. Nach Rehydrieren folgten noch drei Waschschrte mit PBST, um überschüssiges Blockierungsprotein zu entfernen. Rekombinante Fab-Fragmente wurden auf eine Konzentration von 1-10 µg/ml in Verdünnungspuffer verdünnt. Die Fab-Lösung (30 µl) wurde 45 min auf dem Array inkubiert und anschließend durch CY5-konjugierten Ziege-anti-Human-IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland) (50 µl, 1 µg/ml) in Verdünnungspuffer ersetzt. Nach weiteren 45min bei RT folgte je ein Waschschrte mit PBST (100 µl) und mit H₂O_{dd} (100 µl). Zum Schluss wurden die Arrays im N₂-Strom vorsichtig getrocknet.

2.5.1.5 Signaldetektion auf planaren Mikroarrays

Die Detektion der auf dem Array gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde mit einem GMS Array Scanner 418 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Der verwendete GMS Array Scanner 418 besitzt einen YAG-Laser, der im Grünbereich (532 nm) und im Rotbereich (635 nm) anregen kann. Das Fluoreszenzlicht wird bei 575 nm bzw. 660 nm gefiltert. Daher können mit diesem Gerät Proben analysiert werden, die mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert sind. Die laterale Auflösung des GMS Array Scanner 418 beträgt 10 μm . Eine 100 μm^2 große Fläche wird also in eine Bildeinheit umgewandelt. Ein Messpunkt auf einem Array mit dem Durchmesser von 125 μm setzt sich folglich nach einem *Scan* aus ca. 120 Bildeinheiten zusammen.

2.5.1.6 Auswertung von Bilddaten des GMS-Scanners

Die Quantifizierung der Immunoassays bzw. der Messpunkte wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageneTM 4.1 (Biodiscovery, Los Angeles, USA) durchgeführt. Mit diesem Programm lässt sich das Bildmaterial des Scanners wieder in numerische Daten umwandeln. Ein Raster aus Kreisen wird um die Spots der Mikroarrays gelegt. Die Software bildet den Median der pro Spot ermittelten Grauwerte.

2.5.2 Mikrosphären-basierte Mikroarrays

Zur Analyse von Mikrosphären-basierten Mikroarrays wurde das Luminex L100 verwendet (Luminex, Austin, TX, USA). Das Fenster zur Diskriminierung von Mikrosphären-Dubletten wurde in der Software IS 2.2 (Luminex, Austin, TX, USA) auf 7500–15000 AU eingestellt. Standardmesszeit betrug maximal 60 s/ Kavität. Zur Auswertung der Reporterfluoreszenz wurde der Median von 100 Ereignissen gebildet.

2.5.2.1 Kopplung von Peptiden auf Avidin-belegte Mikrosphären/ Peptid-Mikroarrays

Peptide wurden zwecks Charakterisierung von Antikörpern auf Avidin-belegte Mikrosphären gekoppelt. Da je nach Experiment sehr viele Peptide gekoppelt werden mussten, wurde die Immobilisierung in Filterplatten mit 96 Kavitäten (MultiScreen HTS, BV 1,2 μm Hydrophil, Millipore, Billerica, MS, USA) durchgeführt. Zur Immobilisierung wurden die Peptide mit Biotin und zwei ϵ -Amino-Caprönsäuren am N-Terminus synthetisiert. Zur Kopplung wurden 100000 Mikrosphären (40 μl) einer Kodierung in eine Kavität gegeben. In einer Vakuum-Absauganlage (Millipore, Billerica, MS, USA) wurde die Flüssigkeit mit 100 mbar Unterdruck abgesaugt. Nach Waschen mit PBS (2 x 100 μl) und anschließendem Absaugen erfolgte die Zugabe von Peptidlösung (250 μl , 5 μM , 1% BSA in PBS). Die Kopplung erfolgte mit einer Inkubationszeit von 1 h auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei RT und 650 rpm. Das Entfernen von überschüssigem Peptid geschah durch 3maliges Waschen mit PBS (200 μl) auf der Absauganlage. Die Mikrosphären wurden in Assaypuffer (50 μl) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß aus Polypropylen (Starlab, Ahrensburg, Deutschland) überführt. Die Kavität wurde ein weiteres Mal mit Assaypuffer (50 μl) gespült und das Volumen in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Für multiplexe Ansätze wurden alle Kopplungen in ein Gefäß überführt, anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Mikrosphären in Assaypuffer (1 ml) resuspendiert.

2.5.2.2 Mikrosphären-basierte Peptid-Arrays zur Bestimmung der Antikörperspezifität (direkter Fluoreszenz-Immunoassay)

Die Peptide wurden wie unter 2.5.2.1 beschrieben auf Mikrosphären immobilisiert. Die Arrays (10 μl) (1000 Mikrosphären/ Sorte) wurden 1h mit einer Antikörperverdünnung (40 μl) in einer Mikrotiterfilterplatten (MultiScreen HTS, BV 1,2 μm Hydrophil, Millipore, Billerica, MS, USA) auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei RT und 650 rpm inkubiert. In einer Vakuum-Absauganlage

(Millipore, Billerica, MS, USA) wurde die Flüssigkeit mit 100 mbar Unterdruck abgesaugt. Es folgte 45 min Inkubation mit einem PE-konjugierten tierspezifischen Antikörper (1 µg/ml, 30 µl) auf einem Mikrotiterplattenschüttler. Nach der Inkubation wurde ein Waschschrift mit PBS (100 µl) durchgeführt und die Mikrosphären in PBS (100 µl) resuspendiert. Das Auslesen des Assays erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

2.5.2.3 Kopplung von Proteinen auf Polystyrol-Mikrosphären

Proteine wurden über Aminogruppen in Lysin-Seitenketten an Polystyrol-Mikrosphären mit Carboxyl-Oberflächen (Luminex, Austin, TX, USA) gekoppelt. Vor der Immobilisierung mussten die Carboxylgruppen der Mikrosphären zunächst in N-Sulfosuccinimidylester überführt werden.

Zentrifugationsschritte mit Mikrosphären wurden generell bei 10000 rcf für 2 min durchgeführt (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Die Stammlösung der Mikrosphären wurde zentrifugiert, anschließend kurz sonifiziert und für 10s gemischt, bis eine homogene Suspension zu erkennen war. 2,5 Millionen Mikrosphären (200 µl) wurden der Stammlösung entnommen und in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß aus Polypropylen (Starlab, Ahrensburg, Deutschland) überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und der Niederschlag mit Aktivierungspuffer (AP) (80µl) wieder resuspendiert. Der Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Zur Prä-Aktivierung wurden der Suspension (80 µl) N-Hydroxysulfosuccinimid-Lösung (10 µl, 50 mg/ ml, in AP) und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl-)Carbodiimid-Lösung (10 µl, 50 mg/ml, in AP) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 20 min bei 1000 rpm inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Nach Prä-Aktivierung folgten Waschschriffe mit Kopplungspuffer (KP) (2 x 500 µl). Die Immobilisierung der Proteine (250 µl, 80 µg/ml in KP) erfolgte über 2 h bei 1000 rpm (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Nach der Inkubationszeit wurden die Mikrosphären mit PBST (2 x 1 ml) gewaschen. Nach letztem Zentrifugieren erfolgte ein Resuspendieren in Assaypuffer (100 µl, Blocking Reagent for ELISA). Zum Vermeiden von mikrobiellem Wachstum wurde der Suspension NaN₃ bis zu

einer Konzentration von 0.1 % zugesetzt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 8°C.

Bei der Bestimmung der Mikrosphärenzahl und der Belegung mit Antikörpern wurde die Stammlösung 1:1000 verdünnt. Die Suspension (50 µl) wurde 1:1 mit einer Lösung von PE-konjugiertem Antikörper (50 µl, 2 µg/ml in Assaypuffer) versetzt. Der konjugierte Antikörper war polyklonal und jeweils spezifisch für die Spezies des immobilisierten Antikörpers. Nach 45 min Inkubation bei RT und 650 rpm in einer Mikrotiterplatte auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde die Suspension im Luminex L100 (Luminex, Austin, TX, USA) vermessen. In der Software wurde das Probenvolumen auf 50 µl und die Anzahl der zu zählenden Mikrosphären auf 10000 eingestellt. Bei einem Totvolumen von 20 µl ergab sich die Mikrosphärenkonzentration bei Multiplikation der Ereignisse mit der Verdünnung dividiert durch 30. Ein Reportersignal von 15000 bis 20000 MFI weist erfahrungsgemäß auf eine gute Belegung der Mikrosphären hin.

2.5.2.4 Indirekte Immobilisierung von polyklonalen Kaninchenantikörpern auf Mikrosphären

Um polyklonale Kaninchenantikörper schnell und unkompliziert auf Mikrosphären immobilisieren zu können, wurden ein polyklonaler Esel-anti-Kaninchen-Antikörper (Jackson Dianova, Hamburg, Deutschland) an Mikrosphären gekoppelt (siehe 2.5.2.3). Entsprechende Kaninchen-Fängerantikörper (1 µg/ml in PBS) wurden mit diesen Mikrosphären in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Starlab, Ahrensburg, Deutschland) 2 h bei 1000 rpm (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach der Anbindung der Antikörper wurden die Mikrosphären mit Assaypuffer (2 x 200 µl) gewaschen, bevor sie in einem Sandwichimmunoassay verwendet wurden.

2.5.2.5 Mikrosphären-basierte multiplexe Sandwichimmunoassays

2000 Mikrosphären in Assaypuffer (10 µl), beladen mit entsprechendem Fängerantikörper, wurden mit 1-20 µg Protein in Zelllysepuffer (40 µl) über Nacht

bei 8°C, 650 rpm auf einem Mikrotiterplattenschüttler in einer 96 Kavitäten Mikrotiterplatte (Corning® Nonbinding Surface (NBS™) Microplates, Corning, NY, USA) inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Mikrotiterfilterplatte (MultiScreen HTS, BV 1,2 µm Hydrophil, Millipore, Billerica, MS, USA) mit Assaypuffer (50 µl) 30 min vorblockiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit der Vakuum-Absauganlage (Millipore, Billerica, MS, USA) entfernt. Die Mikrosphären-Suspension wurde von der Mikrotiterplatte in die Mikrotiterfilterplatte transferiert und mit TBS (2 x 100 µl) gewaschen. Die Inkubation mit den Detektionsantikörpern erfolgte 60 min, bei RT und 650 rpm auf einem Mikrotiterplattenschüttler. Die Visualisierung erfolgte nach Waschen mit TBS (2 x 100 µl) durch Zugabe von PE-markiertem Streptavidin oder tierspezifischem Antikörper (Jackson Dianova, Hamburg, Deutschland). Die Inkubation mit PE-markiertem Protein bei RT und 650 rpm auf einem Mikrotiterplattenschüttler dauerte 45 min. Das Auslesen geschah mit einem Luminex L100 (Luminex, Austin, TX, USA). Wurden die Fängerantikörper über spezies-spezifische Antikörper auf Mikrosphären immobilisiert, wurde der PE-konjugierte Antikörper zur Reduktion unspezifischer Wechselwirkung 120 min in 1% Esel-Normalserum in Assaypuffer vorinkubiert. Die entsprechenden Kombinationen von Fänger- und Detektionsantikörpern für die einzelnen Analyten und deren Konzentrationen sind der Tabelle 2.18 zu entnehmen.

2.5.2.6 Mikro-Ko-Immunpräzipitation

Mit Hilfe einer Ko-Immunpräzipitation können Proteinkomplexe bzw. Proteininteraktionen detektiert werden. Dazu wird aus einer komplexen Proteinmischung ein Protein mit seinem Interaktionspartner herausgefangen. Die Interaktion wird mit einem für den Interaktionspartner spezifischen Antikörper nachgewiesen. Experimenteller Aufbau, Inkubationszeiten und Prinzip sind identisch mit dem eines Sandwichimmunoassays. Der einzige Unterschied besteht in der Verwendung eines Detektionsantikörpers, der für ein anderes Immunogen spezifisch ist als der Fängerantikörper (Tabelle 2.18).

2.5.2.7 Flüssigphasen-Assay zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante von peptidspezifischen Fab-Fragmenten (cFIA)

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten von Fab-Fragmenten wurde ein kompetitiver ELISA (cFIA) zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten nach Friguet und Goldberg [66, 67] modifiziert. Bei dieser Methode wird der Antikörper mit verschiedenen Konzentrationen an freiem Antigen inkubiert. Nach Einstellen des Gleichgewichts zwischen freiem Antigen, freiem Antikörper und Antikörper-Antigen-Komplex wird die Konzentration an freiem Antikörper in Lösung mit einem direkten ELISA quantifiziert.

Assay und Gleichgewichtseinstellung wurde in Lumavidin-Assaypuffer durchgeführt (0,1% BSA, 0,1% Tween-20 in PBS pH 7,4). Antikörperlösung (0.1 µg/ml, 30 µl) wurde zusammen mit einer Verdünnungsreihe an Peptidantigen (10 pM - 1 µM, 30 µl) über 3 h bis zur Gleichgewichtseinstellung vorinkubiert. Nach Einstellung des Gleichgewichts wurden 1000 Mikrosphären in Lumavidin-Assaypuffer (30 µl) mit immobilisiertem Peptidantigen zur Quantifizierung des freien Fab-Fragment zugegeben und für weitere 60 min inkubiert. Die Detektion der freien Fab-Fragmente (an Mikrosphäre gebunden) erfolgte durch 30 min Inkubation mit PE-konjugiertem Ziege-anti-human-IgG (30 µl, 5 µg/ml). Zur Quantifizierung wurde eine Eichreihe mit Fab-Fragmenten hergestellt, mit Peptidantigen immobilisiert auf Mikrosphären inkubiert und detektiert. Die Auswertung und die Kurvenanpassungen wurden mit dem Kalkulationsprogramm Origin 6.0 (Microcal, Northhampton, MA, USA) durchgeführt (siehe 3.1.2). Assay und Assayprotokoll wurden mit einem Pipettierroboter Genesis RSP100 (Tecan, Hombrechtikon, Schweiz) und der Steuersoftware Gemini 3.4 (Tecan, Hombrechtikon, Schweiz) erstellt und durchgeführt. Das Auslesen erfolgte auf einem Luminex L100 (Luminex, Austin, TX, USA).

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Probenvorbereitung für die Proteinanalytik

Tumorgewebe aus der Leber von männlichen C3H/He-Mäusen (Cx32-Wt-Mäuse) wurden von M. Schwarz (Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Dieses Material stammte aus dem „PRO“-Versuch, der von O. Mönnikes 1999 durchgeführt wurde [68, 69]. Mutationstyp ist in Tabelle 2.1 aufgeführt. Lebernorgewebe von drei Monate alten männlichen Mäusen (CH3/He-Mäuse) wurde freundlicherweise von S. Stahl [70] zur Verfügung gestellt (Tiere G H, I, J, K, L, 4, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18).

Tabelle 2.1: Mauslebertumore mit Angabe der Mutation im *Catnb*-Gen

Tumor Nr.	<i>Catnb</i> Mutation
75T1	Keine
74T1	Keine
116T3	keine
93T2	D32G
97T1	T41A
117T1	T41A
116T2	T41A
115T3	T41A
115T2	T41A
115T1	T41A
114T4	T41I
113T3	T41A
114T3	S33P
113T2	S33P
89T1	S33P
116T1	S37P
113T1	S37P
114T2	S37P
114T1	S37P

2.6.2 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge der Leberhomogenate und der Zellkulturhomogenate wurde nach der BCA-Methode [71] bestimmt. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch reduktive Gruppen im Protein, z.B. durch Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung. Entstehende Cu^+ -Ionen bilden mit

Bicinchoninsäure (BCA) einen Komplex, der bei 562 nm ein Absorptionsmaximum besitzt.

Für eine Standardverdünnungsreihe (0.25-40 µg/ml) wurde BSA (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. BCA-Arbeitslösung (150 µl, 50% Reagenz A, 48% Reagenz B und 2% Reagenz C) wurden mit Proteinverdünnung in PBS (150 µl) in einer Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gemischt und 2 h bei 37°C auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Thermomixer comfort 5355, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Das Auslesen erfolgte mit einem ELISA-Reader (BMG LABTECH, Offenburg, Deutschland) bei 565 nm.

2.6.3 Gewebehomogenisierung zur Proteingewinnung

Ein ca. 5 mm³ großes Stück gefrorenes Gewebe bzw. Tumor wurde in einem Mikrodismembrator (B Braun AG, Melsungen, Deutschland) zusammen mit 350 µl gefrorenem Zellysepuffer (siehe 2.4) bei 2000 s⁻¹ für 20 s homogenisiert. Nach Aufschluss wurde das Pulver mit einem Spatel aus dem Dismembrator-teflongefäß in ein Reaktionsgefäß überführt. Spatel, Dismembrator-kugel und Teflongefäß waren mit Flüssigstickstoff vorgekühlt. Die Homogenate wurden bei 8°C aufgetaut und 10 s mit Ultraschall behandelt (10 Zyklen, Output 50%) (Branson Sonifier, Korea). Nach der Proteinbestimmung (2.6.2) wurden die Homogenate aliquotiert und bei -78°C aufbewahrt.

2.6.4 Lyse von Zellkulturen

Die Kulturen wurden zweimal mit sterilem PBS (5 ml, bei 10 cm Kulturschalen) gewaschen und mit Zellysepuffer (1 ml, bei 10 cm Kulturschalen) bedeckt. Nach 15 min Inkubation bei 8°C auf einem Schüttler wurde das Lysat in ein Standardreaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt wurde gemäß 2.6.2. bestimmt und die Proben im Weiteren bei -78°C gelagert.

2.6.5 Hypotonische Lyse von Zellen

Kulturen wurden zweimal mit sterilem PBS (5 ml bei 10 cm Kulturschalen) gewaschen, in hypotonem Lysepuffer (siehe 2.4) mit einem Zellschaber (Corning, Corning, NY, USA) geerntet, 15 min auf Eis inkubiert und in einen *Douncer* (Spaltabstand \varnothing 20 μ m) überführt. Durch 20 Auf- und Abbewegungen bei 1000 rpm des Stößels wurden die Zellen homogenisiert. Zur Auftrennung des Homogenats in eine Cytosol und Kern/ Membran Fraktion wurde das Homogenat 1 h bei 100000 rcf und 4°C in einem Festwinkelrotor TLA 45 (Beckman, Palo Alto, Ca, USA) in einer Tischultrazentrifuge (TL-Optima, Beckman, Palo Alto, Ca, USA) zentrifugiert. Der Überstand, das Cytosol, wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und der Niederschlag in Zelllysepuffer (100 μ l) aufgenommen und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Fraktionen wurden bei 78°C gelagert.

2.6.6 Präparation von Zellkernen

Kulturen wurden zweimal mit sterilem PBS (5 ml bei 10 cm Kulturschalen) gewaschen, in hypotonem Lysepuffer (1 ml) mit einem Zellschaber (Corning, Corning, NY, USA) geerntet, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in einen *Douncer* (Spaltabstand \varnothing 20 μ m) überführt. Durch 20 Auf- und Ab-Bewegungen bei 1000 rpm des Stößels wurden die Zellen homogenisiert. Zur Auftrennung des Homogenats in eine Cytosol- und Kern-Fraktion wurde das Homogenat 10 min bei 500 g und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand, das Cytosol, wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Der Niederschlag wurde dreimal in Kernwaschpuffer (2 ml) (siehe 2.4) gewaschen. Der gewaschene Niederschlag wurde in Zelllysepuffer (100 μ l) aufgenommen und zur vollständigen Lyse 10 s mit Ultraschall behandelt (10 Zyklen, Output 50%) (Branson Sonifier, Korea).

2.6.7 SDS-PAGE

Die *Sodiumdodecylsulfat*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [72] wurde zu analytischen Auftrennungen von Proteinen verwendet. Die SDS-PAGE wurde mit dem NuPAGE-Elektrophorese-System der Firma Invitrogen durchgeführt (Carlsbad Ca, USA). Das System arbeitet mit vorgefertigten Gelen und bei neutralem pH. Das neutrale Milieu während der Elektrophorese sorgt für maximale Stabilität der Gelmatrix und der Proteine [73, 74]. Die Proteinproben wurden 1:4 mit vierfachem Probenpuffer und zehnfachem *reducing agent* versetzt und 10 min auf 76°C zur Denaturierung erhitzt. Folgender Laufpuffer wurde, wenn nicht anders erwähnt, verwendet: 50 mM 4-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 50 mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris), 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7. Während der Elektrophorese wurde die Spannung konstant bei 200 V gehalten. Die Laufzeit betrug ca. 50 min. Als Größenreferenzierung wurde in einer Spur eine Proteinmischung (5 µl, Seebloomer) aufgetrennt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden 4-12% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gele zur Analyse verwendet (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA).

e

2.6.8 Western-Blot

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *Blot*-Apparatur (XCell II™ Blot Module, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Protran 0.45 µm, Schleicher und Schuell, Keene, NH, USA) transferiert [75]. Hierzu wurden auf die Kathode der Transferzelle zwei mit Transferpuffer (25 mM N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin, 25 mM [Bis(2-Hydroxyethyl)imino]-tris(hydroxymethyl)methan, 1 mM EDTA, 10% Methanol, pH 7,2, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) getränkte Schwämme gelegt, anschließend folgten das Gel und die Membran zwischen zwei puffergetränkten Filterpapieren (Schleicher und Schuell, Keene, NH, USA) und drei weitere puffergetränkte Schwämme. Die Zelle wurde mit der Anodenplatte verschlossen. Es wurde mit konstantem Strom 2.5 mA/ cm² über 2 h transferiert.

Die Membran wurde nach Transfer zur Blockierung unspezifischer Bindungen 1 h bei RT in einem 50 ml-Gefäß (Falcon, BD Biosciences, Franklin

MATERIAL UND METHODEN

Lakes, NJ, USA) mit 5 ml Blockierungslösung (0,1% Tween 20, 3% BSA in TBS) auf einem Rollenmischer (RM5, Assistent, Sondheim, Deutschland) rotiert. Nach Blockierung erfolgte die Inkubation mit 5 ml verdünntem Erstantikörper über Nacht bei 8°C. Es folgten dreimal zehn Minuten Waschen mit TBST. Die Membran wurde dann für 1 h mit meerrettichperoxidase-konjugiertem Zweitantikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten wurde die Detektion des Proteins durch Zugabe der Entwicklungslösung (ECL Plus, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) gestartet. Die Meerrettichperoxidase oxidiert das zyklische Diacylhydrazid-Luminol unter Lichtemission ($\lambda = 428 \text{ nm}$). Das Auslesen dieser Lichtemission erfolgte an einer Image-Station (Kodak Image Station 440cf, Rochester, NY, USA). Das Bild wurde mit der Software Kodak Digital Science 1D (Kodak, Rochester, NY, USA) analysiert. Die eingesetzten Antikörperverdünnungen können der Tabelle 2.2 entnommen werden.

Tabelle 2.2: Verdünnungen der eingesetzten Erst- und Sekundärantikörper im Western-Blot

Erstantikörper	Verdünnung/ Konzentration
$\alpha_{\text{bcat}}_{10}$	1:1000
$\alpha_{\text{bcat}}_{11}$	1:1000
$\alpha_{\text{bcat}}_{12}$	1:1000
$\alpha_{\text{bcat}}_{17}$	1:1000
α_{GS}_{3}	1:20000
α_{ecad}_{1}	1:1000
α_{ncad}_{2}	1 $\mu\text{g/ml}$
$\alpha_{\text{GAPDH}}_{1}$	1:20000

Sekundärantikörper	Konzentration/ Verdünnung
Ziege-anti-Kaninchen-IgG mit HRP konjugiert	0.125 $\mu\text{g/ml}$
Ziege-anti-Maus-IgG mit HRP konjugiert	0.125 $\mu\text{g/ml}$
Ziege-anti-Schaf-IgG mit HRP konjugiert	0.125 $\mu\text{g/ml}$

2.6.9 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen.

Gewebe wurde wie unter 2.6.3 beschrieben homogenisiert. Nach der Proteinbestimmung wurden 2 mg des Lysats in 500 µl Lysepuffer mit 2 µg Antikörper versetzt und 1 h bei RT rotiert. Es folgte die Zugabe von 40 µl Protein G-Agarose (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und eine Inkubation über Nacht bei 4°C und permanentem Rotieren über Kopf. Die Agarose wurde anschließend 5mal bei 500 rcf für 1 min abzentrifugiert (Tischzentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und mit Zelllysepuffer (1 ml) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von LDS 1x Probenpuffer (40 µl, Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) mit anschließendem Erhitzen auf 96°C für 10 min. Die Suspension wurde erneut für 2 min bei 500 rcf zentrifugiert und der Überstand auf ein 4-12% NuPAGE-Gel aufgetragen (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA). Gelelektrophorese, Transfer und Immundetektion erfolgten wie unter 2.6.7 und 2.6.8 beschrieben.

2.6.10 Biotinylierung von Proteinen

Zur Biotinylierung von Proteinen wurde NHS-LC-LC-Biotin (5,5 µl, 2 mg/ml in DMSO) in 50fachem Überschuss zur Proteinlösung (50 µl, 1 mg/ml) gegeben und gemischt. Die Reaktion wurde drei Stunden auf Eis gekühlt. Nicht reagiertes Biotin wurde mit Hilfe von Gelfiltrationssäulen (Centrispin, Princeton Sep) abgetrennt. Dazu wurde die Säule zur Äquilibration des Gelmaterials mit PBS (650 µl) aufgefüllt. Um Luftblasen zu entfernen, wurde die Säule auf einem Vortex geschüttelt. Kurz vor Benutzung wurde die Säule 2 min bei 3000 rcf in einer Zentrifuge (Eppendorf 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und der Reaktionsansatz aufgetragen. Durch weitere 2 min Zentrifugation bei 3000 rcf wurde das Protein eluiert. Das biotinylierte Protein wurde bei -20°C gelagert. Um das Einfrieren des Antikörpers zu verhindern, wurde durch Zugabe von Glycerol ein Glycerol/ Puffer-Gehalt von 1:1 (v/v) hergestellt.

2.6.11 *In vitro*-Phosphorylierung von GST- β -Catenin mit GSK3 β

Die *in vitro*-Phosphorylierung von GST- β -Catenin wurde in 0,5 mM Dithiothreitol, 0,4 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 0,3% Brij, 25 mM HEPES, pH 7,4 mit 1 μ g rekombinanter GSK3 β durchgeführt. Das Ansetzen der ATP- und DTT-Stammlösungen geschah immer unmittelbar vor der Phosphorylierungsreaktion. Zur Negativkontrolle wurde einem Reaktionsansatz kein ATP zugefügt. GSK3 β wurde nach Herstellerangaben gelöst, aliquotiert und bei -78°C gelagert. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und durch Zugabe von ATP gestartet. Die Inkubation fand 1 h bei 37°C bei 650 rpm (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) statt.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Zelllinien

55.1c

Beschreibung:	Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Sublinie, die aus einem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus gewonnen wurde.
Zelltyp:	Maus-Hepatom
Referenzen:	[76]
Erhalten von:	Dr. Kress, Tübingen
Nährmedium:	DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% P/S
Wachstumsbedingungen	37°C , 5% CO ₂

Untersuchte Mutationen

Gen	Mutationsstatus
β -Catenin	Deletion von Exon 3/ Wt [77]
Ha-ras	Codon 61: Wt/Wt
P53	mt/mt

56.1b

Beschreibung:	Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Sublinie, die aus einem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus gewonnen wurde.
Zelltyp:	Maus-Hepatom
Referenzen:	[76]
Erhalten von:	Dr. Kress, Tübingen
Nährmedium:	DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% P/S
Wachstumsbedingungen	37°C, 5% CO ₂

Untersuchte Mutationen

Gen	Mutationsstatus
β-Catenin	Deletion von Exon 3/ Wt [77]
Ha-ras	Codon 61: Wt/Wt
P53	mt/mt

70.4

Beschreibung:	Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Sublinie, die aus einem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus gewonnen wurde.
Zelltyp:	Maus-Hepatom
Referenzen:	[76]
Erhalten von:	Dr. Kress, Tübingen
Nährmedium:	DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% P/S
Wachstumsbedingungen	37°C, 5% CO ₂

Untersuchte Mutationen

Gen	Mutationsstatus
β-Catenin	Wt/Wt [77]
Ha-ras	Codon 61: Wt/Wt
P53	mt/mt

MATERIAL UND METHODEN

HepF1

Beschreibung:	Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Sublinie, die aus einem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus gewonnen wurde.
Zelltyp:	Maus-Hepatom
Referenzen:	[76]
Erhalten von:	Dr. Kress, Tübingen
Nährmedium:	DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% P/S
Wachstumsbedingungen	37°C, 5% CO ₂

Untersuchte Mutationen

Gen	Mutationsstatus
β-Catenin	Codon 45 Serin → Prolin/ Wt [77]
Ha-ras	Codon 61: Wt/Wt
P53	mt/mt

HeLa

Beschreibung:	Sublinie, kultiviert aus einem Cervix CA
Zelltyp:	Epithelial
Referenzen:	American Type Tissue Culture
Erhalten von:	American Type Tissue Culture
Nährmedium:	DMEM/F12 mit 10% FKS und 1% P/S
Wachstumsbedingungen	37°C, 5% CO ₂

Untersuchte Mutationen

Gen	Mutationsstatus
β-Catenin	n.d
Ha-ras	n.d.
P53	n.d.

2.7.2 Subkultivierung von Zelllinien

Konfluente Zellen wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin/ EDTA (0,5 mg/ml Trypsin und 0,2 mg/ml EDTA in PBS (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)) von den Zellkulturschalen abgelöst (Inkubation 2-3 min bei 37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM/ 10% FKS abgestoppt. Die Zellen wurden entweder mit einer Neubauer-Kammer gezählt und in entsprechender Zahl ausgesät oder direkt nach der Trypsinisierung in einem bestimmten Verhältnis für die Subkultur passagiert.

2.7.3 Beschichtung von Zellkulturmaterial mit Kollagen

Zur Beschichtung von Zellkulturmaterial wurde Kollagen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit 25 µg/ml in steriler Essigsäure (0,2% (v/v)) gelöst. Das Zellkulturmaterial (8well Chamberslides, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurde mit der Kollagen-Lösung bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zu verwendende Oberflächen wurden zweimal mit PBS gewaschen und ohne Trocknung mit Zellen besät.

2.7.4 Immunocytochemie

Eine Zellsuspension (350 µl, 15000 Zellen/ ml) wurden in 8well Chamberslides (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit TBS (100 µl) gewaschen und anschließend 10 min mit 4% Accustain/ TBS (100 µl) fixiert. Der Fixierung folgte ein Waschschrift mit TBS (200 µl). Die Zellen wurden 10 min mit 0,2% Triton X-100 in TBS (200 µl) permeabilisiert. Nach drei Waschschriften mit TBS (100 µl) wurden die Zellen mit 5% Ziegen-Normalserum in TBS (100 µl) 1 h blockiert, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit TBS (100 µl). Die Inkubation mit dem ersten proteinspezifischen Antikörper geschah über Nacht bei 4°C in 3% BSA in TBS (100 µl, Antikörperkonzentration siehe

Tabelle 2.3). Der Überschuss an Erstantikörper wurde durch vier Waschschriften mit TBST (200 µl) entfernt. Das Präparat wurde anschließend mit einem

tierspezifischen polyklonalen CY3-markierten Antikörper in 3% BSA in TBS (100 µl, Antikörperkonzentration siehe

Tabelle 2.3) 1 h lang inkubiert. Vor der Kernfärbung durch 10 min Inkubation mit Hoechst 33258 wurde noch zweimal mit TBST (200 µl) gewaschen. Der Färbung folgten zwei Waschschriffe mit TBST (200 µl) und einmal H₂O_{dd}. Zur Konservierung des Präparates wurde flüssige Kaisers-Glycerolgelatine aufgetropft und mit einem Deckglas bedeckt. Über Nacht wurde das Präparat im Dunkeln bei RT getrocknet. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Wetzlar, Deutschland) und einer Kamera (DFC320, Leica Microsystems, Cambridge, UK) gemacht. Aufnahmezeiten und Verstärkungen wurden bei zu vergleichenden Aufnahmen gleich gehalten.

Tabelle 2.3: eingesetzte Antikörperverdünnungen in der Immuncytochemie

Erstantikörper	Verdünnung
α_bcat_10	1:100
α_bcat_11	1:100
α_bcat_12	1:100
α_bcat_17	1:100
α_bcat_13	1 µg/ml

Sekundärantikörper	Antikörperkonzentration
Ziege-anti-Kaninchen-IgG Cy3 konjugiert	5 µg/ml
Ziege-anti-Maus-IgG Cy3 konjugiert	2.5 µg/ml

2.7.5 Immunhistochemie

Gefrierschnitte von Maus-Lebergeweben wurden mit einer Schichtdicke von 10 µm in einem Kryotom (Frigocut 2800, REICHERT-JUNG, Wien) angefertigt. Die Schnitte wurden 30 min bei 40°C getrocknet und 5 min in 4% Accustain/ TBS bei 4°C fixiert. Nach zehn Minuten Waschen mit TBST (100 µl) folgte ein Blockierungsschritt für 1 h mit 5% Ziegen-Normalserum in TBST (100 µl). Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in 3% BSA in TBST (100 µl). Der überschüssige Antikörper wurde durch drei Inkubationen mit TBST (200 µl) für je zehn Minuten entfernt. Der fluoreszenzmarkierte tierspezifische Antikörper wurde in 3% BSA in TBS (100 µl, Antikörperkonzentration siehe Tabelle

2.4) für eine Stunde mit dem Präparat inkubiert. Vor der Kernfärbung mit Hoechst 33258 wurde zweimal mit TBST (200 µl) gewaschen. Das Präparat wurde nach zwei weiteren Waschschritten mit TBST (200 µl) und einem mit H₂O_{dd} mit Kaisers-Glycerolgelatine konserviert. Die Antikörper wurden wie in Tabelle 2.4 angegeben verdünnt.

Tabelle 2.4: eingesetzte Antikörperverdünnungen in der Immunhistochemie

Erstantikörper	Verdünnung
α_bcat_10	1:50
α_bcat_11	1:50
α_bcat_12	1:50
α_bcat_17	1:50
α_bcat_13	1 µg/ml
α_bcat_16	1:100

Sekundärantikörper	Antikörperkonzentration
Ziege-anti-Kaninchen-IgG Cy3 konjugiert	5 µg/ml
Ziege-anti-Maus-IgG Cy3 konjugiert	2.5 µg/ml

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Transformation von kompetenten *E. coli* mit Plasmid-DNA

Das pGEX-β-Catenin-Plasmid wurde freundlicherweise von H. Aberle hergestellt und von R. Kemler zur Verfügung gestellt [78]. Das Plasmid wurde auf Whatman-Papier getrocknet übergeben. Der *Spot* wurde ausgeschnitten, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und das Plasmid durch 30 min Inkubation bei 37°C mit H₂O_{dd} (50 µl) eluiert. Kompetente DH5α (hergestellt von M. Niere) wurden auf Eis aufgetaut, mit Plasmid (3 µl) versetzt und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min auf Eis, 10 min bei RT und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium zugefügt, der Ansatz auf LB-Platten (mit 50 µg/ml Ampicilin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit zwei Klonen wurden je 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht in einem Inkubator (C25 incubator shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) bei 37°C geschüttelt. Mit dieser Kultur (1 ml) wurde LB-Medium (200 ml, 200 µg/

Ampicilin) angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 kultiviert. Ein Teil der Kultur (500 µl) wurde mit Glycerol bis zu einem Verhältnis von 1:1 (v/v) versetzt und zur Aufbewahrung bei -78°C gelagert.

2.8.2 Plasmidpräparation

Zur Herstellung und Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde mit einer LB-Schüttelkultur (120 ml) eine Aufreinigung mittels einer Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid-Midi-Kit der Qiagen AG (Hilden, Deutschland) verwendet.

2.8.3 Expression von GST-Fusionsproteinen

Das GST-Fusionsprotein wurde in den oben beschriebenen transfizierten *E. coli* DH5 α exprimiert. Die Bakterien wurden in LB-Medium (1 l, 0,2 mg/ml Ampicilin) bis zu einer OD von 0,6 kultiviert. Die Expression von rekombinantem GST-Fusionsprotein wurde mit Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid bei einer Konzentration von 1 mM für 1 h bei 30°C induziert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000 rcf geerntet (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

2.8.4 Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Bakterien wurden in PBS mit 1 x Complete Proteaseinhibitor (10 ml) resuspendiert, mit 1 mg Lysozym versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Nach Erhöhen der Konzentration von Triton X-100 auf 1 % wurden die Bakterien durch Ultraschallbehandlung (40 Zyklen, Output 50 %) (Branson Sonifier, Korea) vollständig lysiert. Um unlösliche Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Lysat 15 min bei 15000 rcf zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg Deutschland). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Spritze und eines Sterilfilters (0.22 µm, Millipore, Billerica, MS, USA) von Partikeln befreit. Die eigentliche Reinigung des Proteins wurde mit Hilfe von Affinitätschromatographie durchgeführt. Eine Spritzenpumpe (Pump22, Harvard Apparatus, Holliston, MS,

USA) wurde mit einer 1ml GST-TrapFF Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) verbunden. Nach Äquilibrieren der Säule mit PBS (20ml) wurde das Lysat mit 0,2 ml/ min aufgetragen. Der Durchlauf wurde anschließend erneut über die Säule gepumpt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit PBS (10 ml) entfernt. Die Elution geschah mit 10 mM Glutathion in 50 mM Tris, pH 8 (10 ml) Bei einer Flussrate von 1 ml/ min wurden 250 µl große Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert. Positive Fraktionen wurden vereinigt und mit Ultrafiltrationseinheiten (Centricon 30, Millipore, Piscataway, NJ, USA) bei 4000 rcf (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg Deutschland) eingengt. Die Proben wurden in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5 umgepuffert. Nach Aufkonzentrierung wurde die Proteinlösung mit Glycerol auf einen Glycerolgehalt von 50% eingestellt. Die Proteinlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Peptidsynthese

2.9.1 Automatisierte multiple Festphasenpeptidsynthese

Die Peptide wurden nach dem von Merrifield beschriebenen Prinzip der Festphasensynthese/ *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPSS) [79] und der Fmoc-Strategie hergestellt [80].

Die Synthesen wurden automatisiert auf einem Syntheseroboter RSP 5031, (Tecan, Hombrechtikon, Schweiz) mit Steuersoftware Syro 1.22 (MultiSynTech, Bochum, Deutschland) durchgeführt. Als Reaktoren wurden 1000 µl Filtertips mit hydrophoben Filtern (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Parallel konnten 288 verschiedene Peptide synthetisiert werden. Für eine Standardsynthese wurden ca. 30 mg bzw. ca. 15 µmol (Belegung ca. 0,5 mmol/g) des entsprechenden mit Aminosäure vorbeladenen Harzes verwendet. Die Kopplung der Fmoc-geschützten natürlichen Aminosäuren sowie der ϵ -Aminocaprinsäure (Aca) und der 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure (Doa) erfolgte in neunfachem Überschuss durch Aktivierung mit Diisopropylcarbodiimid (DIC). Die Aminosäurederivate wurden zusammen mit Hydroxybenztriazol (HOBt) (240 µl 0,55 M, in DMF) zum in DMF vorgequollenen Harz pipettiert. Anschließend wurde

DIC (80 μ l, 1,5 M in DCM/DMF 2:1(v/v)) zupipettiert. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde eine Lösung von 20% (v/v) Piperidin in DMF verwendet. Nach beendeter Synthese wurden die Harze mit Methanol (3 x 300 μ l) und Diethylether (3 x 300 μ l) gewaschen. Um freie Aminogruppen zu blockieren, die bei einem unvollständigen Kopplungsschritt entstehen, folgte nach jedem Kopplungsschritt eine Acetylierung freier Aminogruppen (*Capping*). Dabei wurden zuerst Diisopropylethylamin (150 μ l, 1,5 M in DCM/ DMF 1:2 (v/v)) und anschließend Essigsäureanhydrid (150 μ l, 1,5M in DCM/ DMF 2:1 (v/v)) zu den Fmoc-geschützten harzgebundenen Peptiden gegeben. Dadurch wurde die weitere Kopplung von Aminosäuren an unvollständige Peptidsequenzen verhindert. Ein Standard-Syntheszyklus für Peptide am multiplen Syntheseautomaten ist in Tabelle 2.5 beschrieben.

Tabelle 2.5 Standard-Syntheszyklus am Multiplen Peptidsynthesizer Syro 1.2.2

Operation	Volumen	Reagenz	Reaktionszeit
1. Waschen	3 x 400 μ l	DMF	je 30 s
2. Fmoc-Abspaltung	300 μ l	20 % PIP/DMF	15 min
3. Waschen	7 x 400 μ l	DMF	je 30 s
4. Kopplung	80 μ l	1,5 M DIC in DCM/DMF 2:1 (v/v)	60 min
	240 μ l	0,55 M AS-Derivat in 0,55 M HOBt in DCM/ DMF 2:1 (v/v)	
5. Waschen	3 x 400 μ l	DMF	je 30 s
6. Acetylierung	150 μ l	1,5 M DIPEA in DCM/DMF 2:1 (v/v)	30 min
(Capping)	150 μ l	1,5 M Acetanhydrid in DCM/DMF 2:1 (v/v)	

2.9.2 Kopplung von X-Positionen

Die Kopplung einer X-Position, d.h. die simultane Kopplung aller 20 Aminosäuren, erfolgte mit einem optimierten Kopplungsprotokoll. Zur Reaktion wurde das Harz 2mal für 180 min mit DIC (80 μ l, 0,75 M) und einer Mischung aller Aminosäurenderivate mit HOBt (240 μ l, 62,5 mM in DCM/DMF 2:1 (v/v)) inkubiert. Die restlichen Syntheseschritte waren identisch zum unter 2.9.1 beschriebenen Standardprotokoll.

2.9.3 Synthese von Phosphopeptiden

Zur Synthese von Phosphopeptiden wurde eine alternative Kopplungschemie angewendet, da bei der Verwendung der DIC-Chemie häufig Eliminierungen der Phosphatgruppe als Nebenreaktion auftreten. Zur Aktivierung der Aminosäurederivate wurde daher N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(Benzotriazol-1-)uronium Tetrafluoroborat (TBTU) verwendet. Das Kopplungsprotokoll mit DIC wurde für die TBTU-Kopplung modifiziert. In Literaturvorschriften werden die Aminosäurederivate in separaten Gefäßen mit TBTU voraktiviert und anschließend in den Synthesereaktor gegeben. Dies war jedoch aufgrund mangelnder Flexibilität der Steuerungs-Software für den Pipettierroboter nicht möglich. Daher wurden Aktivierung der Aminosäuren mit TBTU und Kopplung in einem Schritt durchgeführt. Das Fmoc-Aminosäurederivat (150 µl, 0,5 M in DMF) bzw. Fmoc-Phosphoaminosäurederivat wurde zum Harz gegeben, und direkt anschließend erfolgte die Zugabe von DIPEA (120 µl, 2 M in DMF) und TBTU (135 µl, 0,5 M in DMF). Das Kopplungsreagenz wurde im leichten Überschuss zur Reaktion beigefügt, um die Nebenreaktion der Bildung von Tetramethylguanidin aus freien Aminogruppen der Aminosäuren am Harz und der Uroniumgruppe des TBTUs zu vermeiden. Die Waschschrte, Acetylierungsreaktion und die Abspaltung der Peptide wurden analog zur DIC-Kopplung durchgeführt (siehe 2.9.1).

2.9.4 Einführung von Biotin am Aminoterminus von Peptiden

Die Umsetzung des Aminoterminus von Peptiden mit Biotin erfolgte über Nacht unter Schütteln in einer Mischung aus Biotin (375 mM), TBTU (375 mM), HOBt (375 mM) und DIPEA (750 mM) in DCM (200 µl, für 15 µmol Standardsynthese). Vor der Kopplung wurde das Harz mit 1-N-Methylpyrrolidon (NMP) (3 x 1 ml) gewaschen und 1mal 60 min mit NMP gequollen. Nach der Reaktion folgten Waschschrte mit DCM (3 x 500 µl), MeOH (2 x 500 µl) und Diethylether (2 x 500 µl). Eine geringe Menge des Harzes wurde zu einem Kaisertest [81] verwendet, um die Vollständigkeit der Markierung zu überprüfen. Die Abspaltung vom Harz erfolgte wie unter 2.9.8 beschrieben.

2.9.5 Einführung von 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride am Aminoterminus von Peptiden

Die Umsetzung des Aminoterminus von Peptiden mit 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride (Dabsylchlorid) erfolgte für 5h unter Schütteln in einer Mischung aus Dabsylchlorid (225 mM) und DIPEA (450 mM) in DCM (200 μ l, für 15 μ mol Standardsynthese). Quellen, Waschschrirte und Abspaltung wurden wie bei der Biotinylierung durchgeführt.

2.9.6 Quantifizierung von dabsylierten Peptiden

Der Extinktionskoeffizient von dabsylierten Peptiden beträgt in Methanol bei einer Wellenlänge von 345 nm $31000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Diese Eigenschaft wurde dazu verwendet Peptidlösungen mit Hilfe eines UV-Spektrometers (Uvikon923, Kontron Instruments, Buckinghamshire, Großbritannien) zu quantifizieren.

2.9.7 Nachweis freier Aminogruppen - Kaisertest

Um die Kopplung von carboxyfunktionalisierten Bausteinen an Peptide auf Vollständigkeit zu überprüfen, erfolgte der Nachweis freier Aminogruppen durch die im folgenden beschriebene Umsetzung mit Ninhydrin [81]. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde eine Spatelspitze des zu testenden Syntheseharzes mit je einem Tropfen einer KCN-Lösung (0,013 mg/ ml in 2% $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ / Pyridin (v/v)), einer Ninhydrin-Lösung (50 mg/ ml in n-Butanol) und einer Phenol-Lösung (4 g/ ml in n-Butanol). Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 5min auf 110°C erhitzt. Bei Anwesenheit primärer Aminogruppen färbt sich die Lösung intensiv blau. Parallel wurde eine Leerwertkontrolle ohne Harz durchgeführt.

2.9.8 Abspaltung der Peptide und Freisetzung funktioneller Gruppen

Die Abspaltung der Peptide (ca. 30 mg bzw. 15 μ mol) vom Harz erfolgte standardmäßig durch Zugabe von Abspalllösung (300 μ l) bestehend aus 94% (v/v)

TFA, 1% (v/v) Triisopropylsilan, 2.5% (v/v) H₂O_{dd} und 2.5% (v/v) Ethandithiol in die Reaktionskammer. Nach 3 h wurde die Abspalllösung mit dem freigesetzten Peptid vom Harz abgetrennt und in ein 10 ml Polypropylen-Reagenzglas überführt. Durch Zugabe von Diethylether (2 ml) wurden die Peptide gefällt. Durch Inkubation des Ethers bei -20°C für 1 h wurden nicht gefällte Peptide nachgefällt. Nach der Fällung wurden die Peptide mit Diethylether (2 x 2 ml) gewaschen und bei 2500 rpm (Rotanta, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Nach jedem Waschvorgang wurde der Peptidniederschlag auf einem Vortex-Mischer aufgeschlämmt. Vor dem zweiten Waschschrift wurde zusätzlich mit Ultraschall behandelt (5 min). Danach wurde der Peptidniederschlag in einem tertiären Butanol-Wassergemisch (4:1, v/v, 5 ml) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet.

2.9.9 Qualitätskontrolle mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Für die Qualitätskontrolle durch ESI-MS wurden die Peptide (30 µg/ml) in 50% (v/v) AcN/ H₂O_{dd} gelöst. Die Einstellungen des ESI-Massenspektrometers (ESI-Q-Tof 1, Micromass, Manchester, Großbritannien) zur Analyse synthetischer Peptide waren für die Kapillarspannung 3.2 kV und für den Gradienten an der Konusdüse 20 bis 40 V (200-2000 Da).

2.9.10 Qualitätskontrolle mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Als weitere Qualitätskontrolle für die synthetisierten Peptide wurde die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) verwendet. Das HPLC-System bestand aus einem Autosampler (Gina-160, Gynkotec, Germering, Deutschland), einer programmierbaren Pumpeneinheit (High Precision Pump Model 480, Gynkotec, Germering, Deutschland) und einem Diodenarraydetektor (UVD 320 S, Gynkotec, Germering, Deutschland). Die Programmierung und Steuerung der Anlage erfolgte über einen PC mit der Software Chromeleon 4.20.

Analytische Trennungen wurden mit einer monolithischen RP 18 E Säule 50 x 4.6 mm (Chromolith Speed ROD, Merck, Darmstadt, Deutschland) bei einem

Fluss von 3 ml/ min durchgeführt. Als mobile Phase dienten Laufmittel A (H₂O_{dd}/ 0,1% (v/v) TFA) und Laufmittel B (AcN/ 0,1% (v/v) TFA) in linearen Gradientensystemen. Die Reinheit der Produkte wurde anhand der Signalfächen der Chromatogramme bei 214 nm bestimmt. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl bei einer Peptidkonzentration von 1 mg/ ml. Die Peptide wurden für die Analyse in 10% (v/v) AcN/ H₂O_{dd} gelöst.

2.10 Synthetisierte Peptide

Tabelle 2.6: Sequenzen der überlappenden Peptide zur Epitopkartierung von Fabs gegen rekombinantes Mac I-Antigen. Die Peptide überlappen mit 11 Aminosäuren. Alle Peptide wurden mit einer C-Aca-Aca-Sequenz am N-Terminus synthetisiert (Peptide wurden im Rahmen der eigenen Diplomarbeit hergestellt [82]). Peptide trugen eine Amidfunktion am C-Terminus. Nach Konjugation an BSA wurden die Peptide auf einen funktionalisierten Glasobjektträger gedruckt. Aminosäuren, die nicht zur Mac I-Proteinsequenz gehören, sind rot unterlegt.

Nr.	Proteinbereich	Sequenz
1	AS 163-175	C-Aca-Aca-SRPHDFRRMKEFVST-NH ₂
2	AS 165-179	C-Aca-Aca-DFRRMKEFVSTVMEQ-NH ₂
3	AS 169-183	C-Aca-Aca-MKEFVSTVMEQLKKS-NH ₂
4	AS 173-187	C-Aca-Aca-VSTVMEQLKKSCTLF-NH ₂
5	AS 177-191	C-Aca-Aca-MEQLKKSCTLFSLMQ-NH ₂
6	AS 181-195	C-Aca-Aca-KSKTLFSLMQYSEE-NH ₂
7	AS 185-199	C-Aca-Aca-TLFSLMQYSEEFRIH-NH ₂
8	AS 189-203	C-Aca-Aca-LMQYSEEFRIHFTFK-NH ₂
9	AS 193-207	C-Aca-Aca-SEEFRIHFTFKFQN-NH ₂
10	AS 197-211	C-Aca-Aca-RIHFTFKFQNNPNP-NH ₂
11	AS 201-215	C-Aca-Aca-TFKFQNNPNPRSLV-NH ₂
12	AS 205-219	C-Aca-Aca-FQNNPNPRSLVKPIT-NH ₂
13	AS 209-223	C-Aca-Aca-PNPRSLVKPITQLLG-NH ₂
14	AS 213-227	C-Aca-Aca-SLVKPITQLLGRTHT-NH ₂
15	AS 217-231	C-Aca-Aca-PITQLLGRTHTATGI-NH ₂
16	AS 221-235	C-Aca-Aca-LLGRTHTATGIRKVV-NH ₂
17	AS 225-239	C-Aca-Aca-THTATGIRKVVRELF-NH ₂
18	AS 229-243	C-Aca-Aca-TGIRKVVRELFNITN-NH ₂
19	AS 233-247	C-Aca-Aca-KVVRELFNITNGARK-NH ₂
20	AS 237-251	C-Aca-Aca-ELFNITNGARKNAFK-NH ₂
21	AS 241-255	C-Aca-Aca-ITNGARKNAFKILVV-NH ₂
22	AS 245-259	C-Aca-Aca-ARKNAFKILVVITDG-NH ₂
23	AS 249-263	C-Aca-Aca-AFKILVVITDGEKFG-NH ₂
24	AS 253-267	C-Aca-Aca-LVVITDGEKFGDPLG-NH ₂
25	AS 257-271	C-Aca-Aca-TDGEKFGDPLGYEDV-NH ₂
26	AS 261-275	C-Aca-Aca-KFGDPLGYEDVIPEA-NH ₂
27	AS 265-279	C-Aca-Aca-PLGYEDVIPEADREG-NH ₂

28	AS 269-283	C-Aca-Aca-EDVIPEADREGVIRY-NH ₂
29	AS 273-287	C-Aca-Aca-PEADREGVIRYVIGV-NH ₂
30	AS 277-291	C-Aca-Aca-REGVIRYVIGVGDAF-NH ₂
31	AS 281-295	C-Aca-Aca-IRYVIGVGDAFRSEK-NH ₂
32	AS 285-299	C-Aca-Aca-IGVGDAFRSEKSRQE-NH ₂
33	AS 289-303	C-Aca-Aca-DAFRSEKSRQELNTI-NH ₂
34	AS 293-307	C-Aca-Aca-SEKSRQELNTIASKP-NH ₂
35	AS 297-311	C-Aca-Aca-RQELNTIASKPPRDH-NH ₂
36	AS 301-315	C-Aca-Aca-NTIASKPPRDHVFQV-NH ₂
37	AS 305-319	C-Aca-Aca-SKPPRDHVFQVNNFE-NH ₂
38	AS 309-323	C-Aca-Aca-RDHVFQVNNFEALKT-NH ₂
39	AS 313-327	C-Aca-Aca-FQVNNFEALKTIQNQ-NH ₂
40	AS 317-331	C-Aca-Aca-NFEALKTIQNQLREE-NH ₂
41	AS 321-335	C-Aca-Aca-LKTIQNQLREEFSHH-NH ₂
42	AS 325-330	C-Aca-Aca-QNQLRE EFSHHHHHH
43	Negative control	C-Aca-Aca-EKQLISEEDL
44	Negative control	C-Aca-Aca-DYKDDDDU

Tabelle 2.7: Sequenzen der Peptide zur Epitopcharakterisierung von Fab-Fragmenten auf planaren Peptid-Arrays. Der Buchstabe X in den Sequenzen repräsentiert die 20 häufigsten proteinogenen Aminosäuren (A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y). Alle Peptide wurden mit einer Biotinyl-C-Aca-Aca-Sequenz am N-Terminus synthetisiert. Die C-terminal verkürzten Peptide trugen eine Amidfunktion am C-Terminus. Nach Konjugation an BSA wurden die Peptide auf einen funktionalisierten Glasobjektträger gedruckt

Verwendung	Peptid	Sequenz
X-Position	1	XAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	2	DXFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	3	DAXRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	4	DAFXSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	5	DAFRXEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	6	DAFRSXKSRQELNTIASKPPRDHVF
	7	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	8	DAFRSEKXRQELNTIASKPPRDHVF
	9	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	10	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	11	DAFRSEKSRQXLNTIASKPPRDHVF
	12	DAFRSEKSRQEXNTIASKPPRDHVF
	13	DAFRSEKSRQELXTIASKPPRDHVF
	14	DAFRSEKSRQELNXIASKPPRDHVF
	15	DAFRSEKSRQELNTXASKPPRDHVF
	16	DAFRSEKSRQELNTIXSKPPRDHVF
	17	DAFRSEKSRQELNTIAXKPPRDHVF
	18	DAFRSEKSRQELNTIASXPPRDHVF
	19	DAFRSEKSRQELNTIASKXPPRDHVF

MATERIAL UND METHODEN

	20		DAFRSEKSRQELNTIASKPXRDHVF
	21		DAFRSEKSRQELNTIASKPPXDHVF
	22		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRXHVF
	23		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	24		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	25		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
N-	26		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
terminale	27		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
Verkürzung	28		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	29		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	30		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	31		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	32		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	33		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	34		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	35		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	36		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	37		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	38		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	39		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	40		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	41		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	42		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	43		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	44		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	45		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	46		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	47		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	48		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	49		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
	50		DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF
C-	51	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
terminale	52	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
Verkürzung	53	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	54	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	55	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	56	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	57	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	58	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	59	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	60	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	
	61	DAFRSEKSRQELNTIASKPPRDHVF	

62	DAFRSEKSRQELNT
63	DAFRSEKSRQELN
64	DAFRSEKSRQEL
65	DAFRSEKSRQE
66	DAFRSEKSRQ
67	DAFRSEKSR
68	DAFRSEKS
69	DAFRSEK
70	DAFRSE
71	DAFRS
72	DAFR
73	DAF
74	DA
75	D

Tabelle 2.8: Peptidsequenzen zur K_D -Bestimmung von Fab-Fragment 4 mit Hilfe eines Kompetitionsfluoreszenzimmunoassays. Alle Peptide wurden mit einer Amidfunktion am C-Terminus und zur Quantifizierung mit einer Dabsyl-Aca-Aca-Sequenz am N-Terminus versehen.

Nr.	Mutation	Sequenz
1	Wildtyp	DAFRSEKS
2	D1E	EAFRSEKS
3	A2L	DLFRSEKS
4	F3Y	DAYRSEKS
5	R4K	DAFKSEKS
6	S5T	DAFRTEKS
7	E6D	DAFRSDKS
8	K7R	DAFRSDRS

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.9: Sequenzen der Peptide zur Bestimmung der Selektivität von phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern. Der Sequenzbereich AS 27-48 von β -Catenin wurde mit allen möglichen Phosphorylierungskombinationen hergestellt. Alle Peptide wurden als Amid und mit einer Biotinyl-Aca-Aca-Sequenz am N-Terminus synthetisiert, auf Mikrosphären immobilisiert und zu einem Array kombiniert.

Nr.	Phosphorylierung	Sequenz
1	keine	QQSYLDSGIHSGATTTAPSLSG
2	S33	QQSYLDS (phos) GIHSGATTTAPSLSG
3	S37	QQSYLDSGIHS (phos) GATTTAPSLSG
4	T41	QQSYLDSGIHSGATT (phos) TAPSLSG
5	S45	QQSYLDSGIHSGATTTAPS (phos) LSG
6	S33/S37	QQSYLDS (phos) GIHS (phos) GATTTAPSLSG
7	T41/S45	QQSYLDSGIHSGATT (phos) TAPS (phos) LSG
8	S33/S45	QQSYLDS (phos) GIHSGATTTAPS (phos) LSG
9	S37/S45	QQSYLDSGIHS (phos) GATTTAPS (phos) LSG
10	S37/T41	QQSYLDSGIHS (phos) GATT (phos) TAPSLSG
11	S33/T41	QQSYLDS (phos) GIHSGATT (phos) TAPSLSG
12	S37/S37/S45	QQSYLDS (phos) GIHS (phos) GATTTAPS (phos) LSG
13	S33/T41/S45	QQSYLDS (phos) GIHSGATT (phos) TAPS (phos) LSG
14	S37/T41/S45	QQSYLDSGIHS (phos) GATT (phos) TAPS (phos) LSG
15	S33/S37/T41	QQSYLDS (phos) GIHS (phos) GATT (phos) TAPSLSG
16	S33/S37/T41/S45	QQSYLDS (phos) GIHS (phos) GATT (phos) TAPS (phos) LSG
17	Crosstide	GRPRTSS (phos) FAEG

Tabelle 2.10: Sequenzen der Peptide zur Bestimmung der Selektivität von phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern. Der Sequenzbereich AS 27-48 von β -Catenin wurde mit allen möglichen Phosphorylierungskombinationen hergestellt. Alle Peptide wurden als Amid und mit einer Biotinyl-Aca-Aca-Sequenz am N-Terminus synthetisiert, auf Mikrosphären immobilisiert und zu einem Array kombiniert.

Nr.	Proteinbereich	Mutation	phosphoryliert	Sequenz
1	AS 27-48	Wt	Keine	QQSYLDSGIHSGATTTAPSLSG
2	AS 27-48	Wt	S33	QQSYLDS (phos) GIHSGATTTAPSLSG
3	AS 27-48	Wt	S37	QQSYLDSGIHS (phos) GATTTAPSLSG
4	AS 27-48	Wt	T41	QQSYLDSGIHSGATT (phos) TAPSLSG
5	AS 27-48	Wt	S45	QQSYLDSGIHSGATTTAPS (phos) LSG
6	AS 33-53	Wt	keine	SGIHSGATTTAPSLSGKGNPE
7	AS 33-53	Wt	T41	SGIHSGATT (phos) TAPSLSGKGNPE
8	AS 33-53	Wt	S45	SGIHSGATTTAPS (phos) LSGKGNPE
9	AS 33-53	T41A	S45	SGIHSGATATAPS (phos) LSGKGNPE
10	AS 37-56	Wt	keine	SGATTTAPSLSGKGNPEEED
11	AS 37-56	Wt	T41	SGATT (phos) TAPSLSGKGNPEEED
12	AS 37-56	Wt	S45	SGATTTAPS (phos) LSGKGNPEEED
13	AS 37-56	T41A	S45	SGATATAPS (phos) LSGKGNPEEED
14	Crosstide			GRPRTSS (phos) FAEG

Tabelle 2.11: Sequenzen der Peptide zur Epitopkartierung von peptidspezifischen β -Catenin-Antikörpern. Die Der Sequenzbereich AS 12-65 von β -Catenin wurde mit überlappenden Peptiden hergestellt. Peptide hatten eine Länge von 15 AS und überlappten mit 13 AS. Alle Peptide wurden als Amid und mit einer Cysteinyl-Doa Sequenz am N-Terminus synthetisiert, auf Mikrosphären immobilisiert und zu einem Array kombiniert.

Nr.	Proteinbereich	Sequenz
1	AS12-27	MAMEPDRKAAVSHWQ
2	AS14-29	MEPDRKAAVSHWQQQ
3	AS16-31	PDRKAAVSHWQQQSY
4	AS18-33	RKAAVSHWQQQSYLD
5	AS20-35	AAVSHWQQQSYLD SG
6	AS22-37	VSHWQQQSYLD SG I H
7	AS24-39	HWQQQSYLD SG I H S G
8	AS26-41	QQQSYLD SG I H S G A T
9	AS28-43	QSYLD SG I H S G A T T T
10	AS30-45	YLD SG I H S G A T T T A P
11	AS32-47	D SG I H S G A T T T A P S L
12	AS34-49	G I H S G A T T T A P S L S G
13	AS36-51	H S G A T T T A P S L S G K G
14	AS38-53	G A T T T A P S L S G K G N P
15	AS40-55	T T T A P S L S G K G N P E E
16	AS42-57	T A P S L S G K G N P E E E D
17	AS44-59	P S L S G K G N P E E E D V D
18	AS46-61	L S G K G N P E E E D V D T S
19	AS48-63	G K G N P E E E D V D T S Q V
20	AS50-65	G N P E E E D V D T S Q V L Y
21	Negativkontrolle	E K Q L I S E E D L

2.11 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.12: β -Catenin-Antikörper

Code	Immunogen/ Epitop	Klon	Distributor	Bestell Nr.
α _bcat_1	rekombinantes β -Catenin/ AS 769-781	10H8 monoklonal	calbiochem	219356
α _bcat_2	rekombinantes β -Catenin/ <i>armadillo repeats</i>	9g10 monoklonal	calbiochem	219350
α _bcat_3	rekombinantes β -Catenin/ C-Terminus	7d8 monoklonal	calbiochem	219355
α _bcat_4	AS 27-37 dephosphoryliert	8E4 monoklonal	calbiochem	219350
α _bcat_5	AS 35-50 dephosphoryliert	7a7 monoklonal	calbiochem	219349
α _bcat_6	rekombinantes β -Catenin/ Exon 3	9G4 monoklonal	calbiochem	219350
α _bcat_7	rekombinantes β -Catenin/ N-Terminus	7D11 monoklonal	calbiochem	219357
α _bcat_8	Peptid/ AS 32-45/ S33 phosphoryliert	BC76 monoklonal	Sigma	C 2363
α _bcat_9	Peptid/ AS 32-45/ S33 und S37 phosphoryliert	BC22 monoklonal	Sigma	C 4231
α _bcat_10	Peptid/ S33, S37 und T41 phosphoryliert	polyklonal	Cell signalling Technology	9561
α _bcat_11	Peptid/ T41 und S45 phosphoryliert	polyklonal	Cell signalling Technology	9565
α _bcat_12	Peptid/ S45 phosphoryliert	polyklonal	Cell signalling Technology	9564
α _bcat_13	rekombinantes β -Catenin-Fragment/ AS 571-781	14 monoklonal	BD Transduction laboratories	610153
α _bcat_14	rekombinantes GST- β -Catenin	polyklonal	chemicon	AB19022
α _bcat_15	Peptid/ AS 29-49	polyklonal	upstate	# 06-734
α _bcat_16	rekombinant AS 1-100/ AS 36-44 HSGATTTAP	8E7 monoklonal	upstate	# 05-665
α _bcat_17	rekombinantes β -Catenin	polyklonal	biosource	AHO0462

Tabelle 2.13: Antikörper gegen Glutaminsynthetase

Code	Immunogen/ Epitop	Klon	Distributor	Bestell Nr.
α _GS_1	Glutaminsynthetase aus Schafgehirn	Mab 302 monoklonal	Chemicon	Mab 302
α _GS_2	Glutaminsynthetase aus Schafgehirn	6 monoklonal	BD Transduction laboratories	6'10517
α _GS_3	Peptid/ AS 357-373/ N-Terminus	polyklonal	Sigma	G 2781

Tabelle 2.14: Antikörper gegen E-Cadherin

Code	Immunogen/ Epitop	Klon	Distributor	Bestell Nr.
α _Ecad_1	Rekombinantes Fusionsprotein/ extrazelluläre Domäne	polyklonal	R&D	AF648

Tabelle 2.15: Antikörper gegen N-Cadherin

Code	Immunogen/ Epitop	Klon	Distributor	Bestell Nr.
α _Ncad_1	Rekombinantes Fusionsprotein/ Teil der intrazellulären Domäne	3B9 monoklonal	Zymed	Mab 302
α _Ncad_2	Peptid/ AS 802-819	32 monoklonal	BD Transduction laboratories	610920

Tabelle 2.16: Antikörper gegen GAPDH

Code	Immunogen/ Epitop	Klon	Distributor	Bestell Nr.
α _GAPDH_1	Natives Protein isoliert aus humanen Erythrocyten	polyklonal	abcam	Ab9485

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.17: Antikörperkonjugate/ Streptavidinkonjugate für das Auslesen von Immunoassays

Spezifität	Spezies	Konjugation	Hersteller	Verwendung
Maus	Ziege	Phycoerythrin	Jackson Dianova	Sandwichimmunoassay
Kaninchen	Esel	Phycoerythrin	Jackson Dianova	Sandwichimmunoassay
Biotin	Streptavidin	Phycoerythrin	Jackson Dianova	Sandwichimmunoassay
Human	Ziege	Cy5	Jackson Dianova	
Maus	Ziege	HRP	Jackson Dianova	Western-Blot
Kaninchen	Ziege	HRP	Jackson Dianova	Western-Blot
Ziege	Esel	HRP	Jackson Dianova	Western-Blot

Tabelle 2.18 Fänger/ Detektionsantikörper aller verwendeten Sandwichimmunoassays/ Ko-Immünpräzipitationen. Die eingesetzten Konzentrationen zur Kopplung an die Mikrosphären und zur Detektion sind ebenfalls angegeben.

Xplex	Analyt	Fängerantikörper	Kopplungskonzentration [µg/ml]	Detektionsantikörper	Assaykonzentration [µg/ml]
1plex	Glutaminsynthetase	α_GS_1	50	α_GS_3	20
3plex	β-Catenin	α_bcat_13	50	α_bcat_17	4
		α_Ncad_2	80	α_bcat_17	4
		α_Ecad_1	80	α_bcat_17	4
2plex	β-Catenin/ N-Cadherin	α_Ncad_2	80	Biotinylierter α_Ncad_1	2
		α_bcat_13	50	Biotinylierter α_Ncad_1	2
2plex	β-Catenin/ E-Cadherin	α_Ecad_1	80	Biotinylierter α_Ecad_1	2
		α_bcat_13	50	Biotinylierter α_Ecad_1	2
3plex	Phospho 33/37/41 β-Catenin	α_bcat_10	1	α_bcat_13	1
		α_bcat_11	1	α_bcat_13	1
		α_bcat_12	1	α_bcat_13	1

3 ERGEBNISSE

3.1 Antikörpercharakterisierung

Zwei Eigenschaften bestimmen die Qualität eines Antikörpers als analytisches Instrument. Die Affinität bestimmt die Sensitivität eines Assays und die Spezifität die Möglichkeiten der Anwendung eines Antikörpers. In dieser Arbeit sollte ein System etabliert werden, um lineare Epitope, die Sequenzspezifität bzw. die Phosphospezifität von Bindern zu bestimmen. Für den PepART Ansatz (siehe 1.6) sind Antikörper notwendig, die lineare Epitope erkennen und sequenzspezifisch sind. Vom Projektpartner MorphoSys AG wurden rekombinante Fab-Fragmente zur Etablierung eines array-basierten Testsystems zur Verfügung gestellt. Herkömmliche Verfahren benutzen mit Spotsynthese hergestellte Makroarrays zur Untersuchung von Epitopen [34, 35, 38].

Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Herstellung von Peptid-Mikroarrays verwendet Peptide, die vor der Arraygenerierung an BSA konjugiert wurden. Dies erlaubt erstmals die gleichzeitige Verwendung von Peptiden und Proteinen zur Herstellung eines Mikroarrays. Alle Peptide wurden mit konventioneller Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) [79, 80] hergestellt. Zur Konjugation an mit 4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexane-1-Carboxyl 3-Sulfo-N-Hydroxysuccinimid Ester (SMCC) aktiviertem BSA wurden alle Peptide mit einer Cysteinyl-Gruppe während der Synthese versehen. Die Peptid-Protein-Konjugate konnten leicht mit der selektiven Maleinimid-Thiol-Kopplungschemie hergestellt werden. Mit Hilfe von Standard-*Spotting*-Technologie wurden Mikroarrays mit Peptid-BSA-Konjugaten generiert.

Durch die Verwendung einer selektiven Kopplungschemie eröffnet sich ein großer Vorteil gegenüber der herkömmlichen Herstellung von Peptid-Makroarrays mit der SPOT-Synthese. Die direkte Synthese von Peptiden auf Cellulose-Membranen führt zu synthesebedingt verkürzten Peptiden oder Peptiden mit Fehlsequenzen. Diese unerwünschten Nebenprodukte können u.U. zu falschen Ergebnissen führen. In der hier verwendeten Methode werden Peptide mit Abbruchsequenzen nicht an SMCC-aktiviertes BSA gekoppelt, da die benötigte Sulfhydrylgruppe für die kovalente Kopplung fehlt. Aufgrund der Verwendung eines Acetylierungsschrittes nach jedem Kopplungsschritt während der Synthese

wird die Verlängerung von Fehlsequenzen vermieden, und auch eine Kopplung von Cystein findet nicht statt. Folglich werden nur Peptide mit richtiger und vollständiger Sequenz an das Trägerprotein gekoppelt. Dies führt zu einem Gewinn an Qualität bei der Herstellung der Peptid-Mikroarrays. Die Verwendung von HPLC- und MS-charakterisierten Peptiden und die gewählte Immobilisierungsstrategie führen zu qualitätskontrollierten Peptiden auf den Arrays.

Neben der Qualitätskontrolle der Peptide bietet die hier gezeigte Methode, verglichen mit Makroarrays, einen weiteren großen Vorteil. Mit Standardrobotik zur Herstellung von Mikroarrays ist eine 500-mal höhere Spotdichte als mit der Spotsynthese möglich. Aufgrund der Miniaturisierung mit bis zu 1000 Spots/cm² sinkt die Menge an Antikörper oder Protein, die pro Test eingesetzt werden muss, substantiell. Ein Bindungsassay kann mit weniger als 100 ng eines Antikörpers durchgeführt werden.

Eine Voraussetzung für das *Screening* von rekombinanten Antikörper-Bibliotheken ist die Bereitstellung von hunderten Arrays. Weniger als 1 mg Peptid sind ausreichend, um mit der hier beschriebenen Methode in einem einzigen Prozess hunderte Arrays zu drucken. Dies gewährleistet die Durchführung von hunderten Assays mit identischem Material. Eine Voraussetzung die von Makroarrays, hergestellt mit Spotsynthese, nicht erfüllt wird.

Vom Projektpartner MorphoSys AG wurden zur Untersuchung von Epitopen elf verschiedene rekombinante Fab-Fragmente zur Verfügung gestellt. Für die Etablierung der oben beschriebenen Methode waren unterschiedliche Gruppen von Fab-Fragmenten gegen das Protein CD11b/ Mac I vorhanden. Die Fab-Fragmente wurden mit zwei unterschiedlichen Aufreinigungsstrategien aus der *HuCAL[®] Fab 1 Phage display antibody library* [83] isoliert. Für sechs Binder wurde die rekombinante extrazelluläre Domäne (AS 162-330) von CD11b verwendet (Fab-Fragment Nr. 6-11) und für fünf andere das 25mer Peptid M18 (AS 289-313) (Fab-Fragment Nr. 1-5). Für die Kartierung der Epitope und zur Untersuchung der Spezifität der bereitgestellten Fab-Fragmente sollten Peptid-Arrays verwendet werden. Für die Fab-Fragmente, die mit der rekombinanten Domäne aufgereinigt worden sind, standen mit der SPR-Methode bestimmte Assoziationskonstanten zur Verfügung (bestimmt von der MorphoSys AG). Mit Hilfe eines human-

spezifischen Fängerantikörpers und des immobilisierten Antigens kann eine relative Affinitätskonstante zu den Fab-Fragmenten bestimmt werden [84]. Damit ist die Bestimmung einer Affinitätsrangordnung parallel zu einer Epitopuntersuchung möglich. Dies ist jedoch aus folgenden Gründen nur in einem miniaturisierten System möglich. Im Gleichgewicht besteht für die Assoziationskonstante nach dem Massenwirkungsgesetz folgender Zusammenhang:

$$K_A = \frac{[AbAg]}{[Ab_0 - AbAg] \times [Ag_0 - AbAg]}$$

Formel 3.1: Massenwirkungsgesetz

Betrachtet man diesen Zusammenhang in einem miniaturisierten System, in dem sich der Antikörper in massivem Überschuss gegenüber dem Antigen befindet, vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$K_A = \frac{[AbAg]}{[Ab_0] \times [Ag_0]}$$

Formel 3.2: Vereinfachtes Massenwirkungsgesetz bei $[Ab] \gg [Ag]$

Diese Vernachlässigung ist nur möglich, wenn in einem System die Menge an freiem Antikörper durch die Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes nur geringfügig verändert wird. In einem Mikroarray sind in einem Spot ca. 1fmol Antigen immobilisiert (bei einem Molekulargewicht des Antigens von 100 kDa, einer Druckkonzentration von 100 µg/ml und einem Druckvolumen von 150 pl), d.h. dass bei einem Assayvolumen von 50 µl die Konzentration an Antigen etwa 20 pM beträgt. In einem typischen Assay liegt die Konzentration eines Fab-Fragments zwischen 1 und 10 µg/ml bzw. 20 bis 200 nM, d.h. die Komplexmenge beträgt maximal ein Tausendstel der Antikörpergesamtmenge. Daher ist es möglich eine relative Affinitätskonstante zu bestimmen, wenn die Gesamtmenge an Antikörper und die des Antigen-Antikörperkomplexes unter *ambient analyte* Bedingungen [25] gemessen werden können (Formel 3.3).

$$\text{Relative Affinitätskonstante} = K_A \times [Ag_0] = \frac{[AgAb]}{[Ab_0]}$$

Formel 3.3: Relative Affinität bestimmt unter *ambient analyte* Bedingungen

3.1.1 Epitopkartierung und Affinitätsbestimmung von Fab-Fragmenten

Rekombinante Fab-Fragmente, die mit zwei verschiedenen Isolierungs-Strategien gewonnen wurden, wurden dazu verwendet die etablierte Methode zu testen. Als Antigene wurden zum einen die rekombinante extrazelluläre Domäne (AS 162–330) und zum anderen ein 25mer-Peptid (AS 289-313) von CD11b verwendet.

Ein Mikroarray, bestehend aus Proteinen und Peptid-BSA-Konjugaten, wurde generiert. Zu den immobilisierten Molekülen gehörten die zur Isolierung verwendeten Antigene und ein Antikörper, spezifisch für den Fc-Anteil von humanen IgGs. Diese immobilisierten Moleküle wurden zu einer relativen Affinitätsbestimmung der untersuchten Binder verwendet. Zur Epitopkartierung wurden überlappende Peptide, die den Sequenzbereich der extrazellulären Domäne von CD11b überdeckten, als BSA-Konjugate im gleichen Array immobilisiert. Der Peptidteil des Mikroarrays bestand aus 42 Peptiden, jedes 15 AS lang mit 11 AS Überlappung zum folgenden Peptid, und verschiedenen Negativkontrollen (siehe Tabelle 2.6). Mit Hilfe dieses Arrays konnten bei drei von sechs Fab-Fragmenten lineare Epitope detektiert werden. Diese drei Fab-Fragmente zeigten Interaktionen mit einer beschränkten Zahl an Peptiden, und alle Epitope konnten auf einen bestimmten Bereich in der rekombinanten Proteindomäne kartiert werden.

Tabelle 3.1: Lineare Peptidepitope von Protein bindenden Fab-Fragmenten. Zur Bestimmung der Epitope wurden Arrays mit 42 Peptid-BSA-Konjugaten verwendet. Die Konjugate wurden aus 15meren mit 11 AS Überlappung hergestellt. Die gebundenen Fab-Fragmente wurden über CY5-markiertes Ziege-anti-human-IgG detektiert. Mit Hilfe der Quantifizierung der Fab-Fragmente wurden relative Affinitätsdaten errechnet und den mit SPR ermittelten Assoziationskonstanten (Daten von der MorphoSys AG zur Verfügung gestellt) gegenübergestellt.

Binder	Kartiertes Epitop	Assoziationskonstanten ermittelt mit SPR [M^{-1}]	Relative Affinitätswerte
Fab 6	keine Bindung an Peptid	1.7.E+07	3374.9
Fab 7	keine Bindung an Peptid	1.3.E+07	4024.7
Fab 8	keine Bindung an Peptid	6.3.E+06	1791.5
Fab 9	EDVIPEADREG	1.3.E+06	292.5
Fab 10	KFGDPLGYEDV	3.9.E+05	183.1
Fab 11	EDVIPEADREG	7.1.E+04	0.3

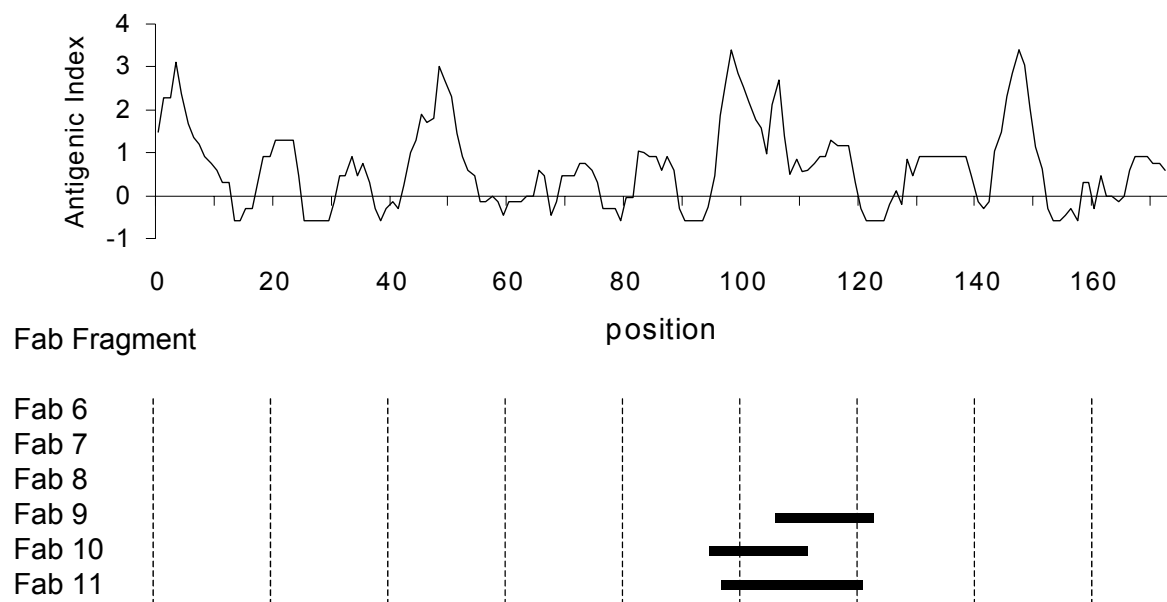


Abbildung 3.1: Antigenitätsplot der Proteindomäne aus Mac I. Die ermittelten Epitope der Fab-Fragmente sind als schwarze Balken unter dem Diagramm eingezeichnet.

Interessanterweise wurden alle drei Epitope im gleichen Bereich des Proteins gefunden. Ein Antigenitätsplot [85] dieser Region zeigte einen hohen antigenen Index für diesen Bereich (Abbildung 3.1). Dies zeigt, dass der Algorithmus nicht nur für die Vorhersage von antigenen Strukturen für klassische Immunisierungen geeignet ist, sondern auch für direkte Aufreinigungsstrategien aus synthetischen

Antikörperbibliotheken verwendet werden kann. Die restlichen drei Fab-Fragmente zeigten kein Signal über dem Hintergrund auf den Peptid-Spots, aber ein hohes Signal mit der rekombinanten Proteindomäne. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Antikörper diskontinuierliche oder konformationelle Strukturen erkennen, die mit überlappenden Peptiden nicht detektiert werden können. Durch Quantifizieren der Fab-Fragmente im System mit einem human-spezifischen Ziegen-IgG war es möglich die Affinitäten der Fab-Fragmente in eine Rangordnung zu bringen, die einer Rangfolge der gemessenen Assoziationskonstanten entsprach (Tabell3.1). Die fünf Fab-Fragmente, die mit dem Peptid M18 angereichert wurden, zeigten wie erwartet Interaktion mit dem Peptidantigen. Nur ein Fab-Fragment erkannte die Proteindomäne.

Um detaillierte Informationen über das Epitop der peptidspezifischen Fab-Fragmente zu bekommen, wurde das zur Anreicherung dieser Fab-Fragmente verwendete 25mer M18 24mal verkürzt hergestellt, einmal angefangen vom N-Terminus, und einmal angefangen vom C-Terminus (siehe Tabelle 2.7). Zur Bestimmung der minimalen Bindesequenz der Peptidbinder wurde mit den 48 Peptiden ein Array generiert.

Tabelle 3.2: Minimale Bindesequenzen der mit M18 aufgereinigten Fab-Fragmente. Minimale Epitope wurden mit Peptid-Arrays bestimmt, auf denen 50 verschiedene Peptid-BSA-Konjugate immobilisiert waren. Das M18-Antigen war sowohl vom N- als auch vom C-Terminus verkürzt auf dem Array präsentiert. Gebundenes Fab-Fragment wurde mit einem CY5-konjugierten Ziege-anti-human-IgG detektiert.

Binder	minimales Epitop
Fab 1	KPPRDHVF
Fab 2	SKPPRDHVF
Fab 3	KPPRDHV
Fab 4	DAFRSEK
Fab 5	KPPRDHVF

Die minimalen Epitope der verschiedenen Fab-Fragmente konnten auf diese Weise bestimmt werden. In Abbildung 3.2 ist exemplarisch ein Teil eines mit Fab 4 entwickelten Arrays gezeigt. Mit Hilfe von überlappenden und verkürzten Peptiden der antigenen Region, immobilisiert in einem Array, ist die Definition des minimalen Motivs zur Bindung eines Fab-Fragments in einem Experiment möglich.

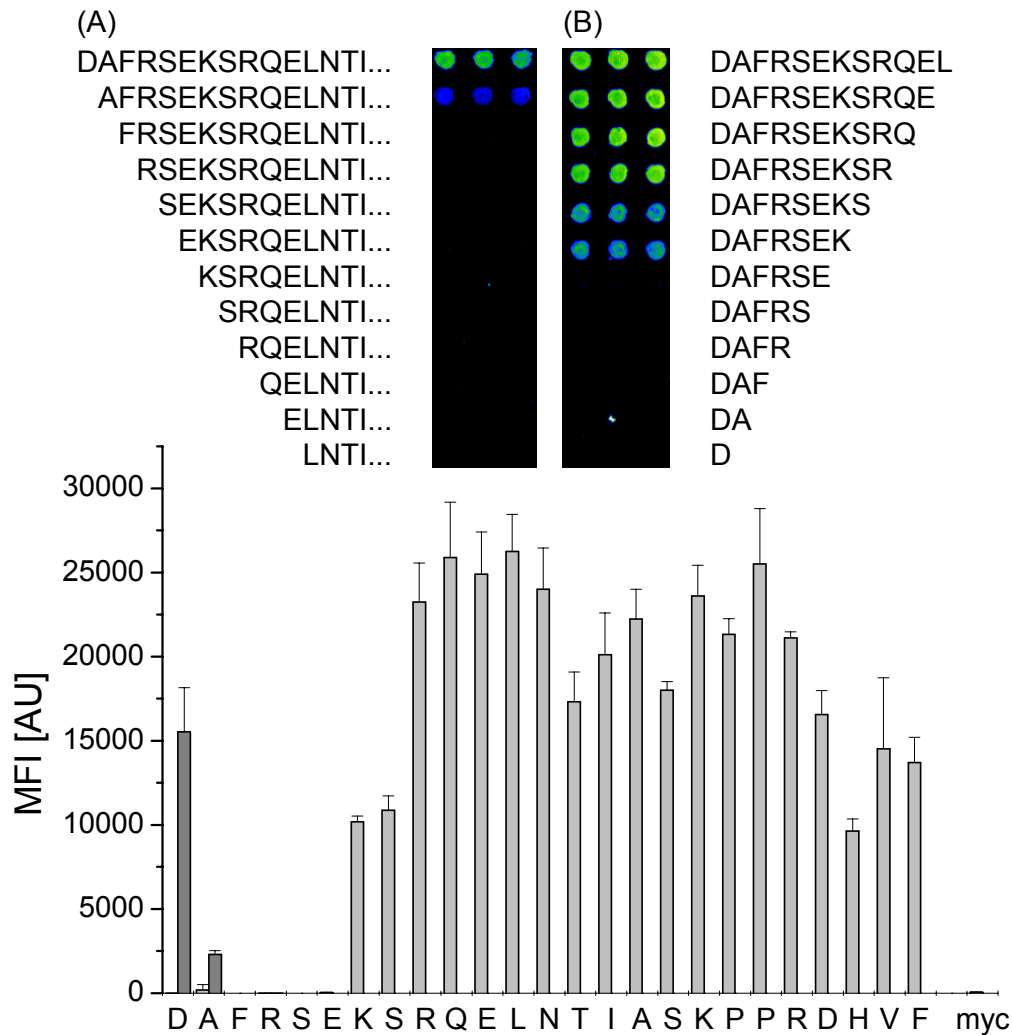


Abbildung 3.2: Peptid-Mikroarrays zur Epitopkartierung. Zur Bestimmung der minimalen Epitope der isolierten Fab-Fragmente wurden Peptid-Mikroarrays eingesetzt. Der Array wurde aus N-terminal- (A) und C-terminal- (B) verkürzten Peptiden hergestellt. Die Fab-Fragmente wurden auf dem Array inkubiert und mit einem CY5-konjugierten Ziegen-anti-human-IgG detektiert. Exemplarisch ist ein Falschfarbenbild eines mit Fab 4 entwickelten Arrays gezeigt. Die minimale Bindesequenz wurde auf DAFRSEK bestimmt. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert der Fluoreszenz von drei Spots gegen die Sequenz von M18 aufgetragen. C-terminal-verkürzte Peptide sind in dunkelgrau und N-terminal-verkürzte Peptide in hellgrau dargestellt.

Zusätzlich zur Identifizierung des minimalen Epitops wurden Peptid-Arrays dazu verwendet, den individuellen Einfluss von Aminosäureseitenketten innerhalb eines Peptidepitops auf die Bindung eines peptidspezifischen Antikörpers zu bestimmen. Die Charakterisierung von Fab 4, einem Fragment, das sowohl das M18-Antigen als auch die rekombinante Proteindomäne in einem linearen Epitop von 7 AS bindet, ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Hier wurden, ausgehend von dem

ERGEBNISSE

25mer Peptid, Positionsbibliotheken hergestellt. Jede Aminosäure wurde durch alle 20 AS ersetzt und dadurch randomisiert (siehe Tabelle 2.7). Ein Verlust an Bindungsaktivität bei einem Assay bedeutet eine hohe Spezifität des Fab-Fragments für diese Aminosäure. In Abbildung 3.3 ist leicht zu erkennen, welche Positionen für die Bindung des Fab-Fragments wichtig bzw. notwendig sind. Ist eine der ersten drei oder die siebente Position im Epitop randomisiert, ist das Fluoreszenzsignal stark reduziert, während das Signal der restlichen Positionen auch nach Randomisierung nahezu gleich bleibt. Damit kann der Einfluss jeder einzelnen Position gewichtet werden. Position 1, 2, 3 und 7 sind offensichtlich die Aminosäuren, deren Seitenketten maßgeblich zur Bindung des Fab-Fragments beitragen. Dieser Befund erlaubt die Definition eines Bindemotivs für dieses Fab-Fragment, DAFXXXK.

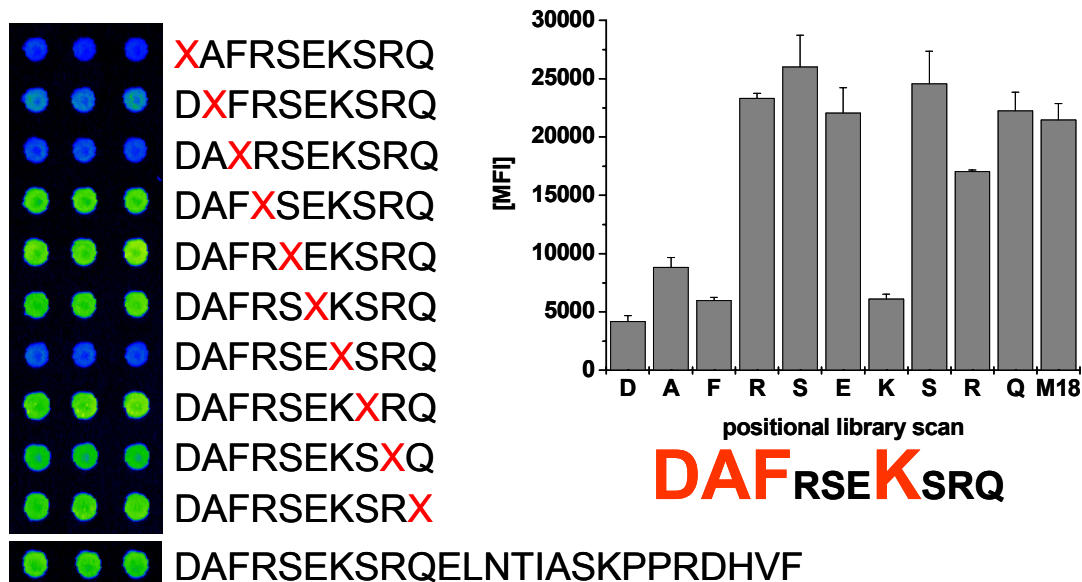


Abbildung 3.3: Peptid-Positionsbibliothek-Mikroarray zur Epitopkartierung. 25 verschiedene Peptidbibliotheken wurden synthetisiert. In jeder Bibliothek wurde eine Position des ursprünglichen 25mer Peptids durch alle 20 AS ersetzt. Fab 4 wurde auf diesem Array inkubiert und mit einem CY5-markierten humanspezifischen Antikörper detektiert. Die Signalintensitäten der Spots spiegeln den Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die Antikörperbindung wider. Ein Ersetzen der vierten, fünften und sechsten Position durch den gesamten Satz an proteinogenen Aminosäuren führt zu keinem Signalverlust, während der Austausch von Position 1, 2, 3 und 7 eine Bindung des Fab-Fragments massiv schwächt. Die Seitenketten von AS 1, 2, 3 und 7 sind also maßgeblich für die Bindung des Fab-Fragments.

Dieses Motiv kann dazu verwendet werden, frühzeitig während des *screenings* von Hybridoma-Kulturen oder einer Bank von rekombinanten Bindern potentielle

Kreuzreaktivitäten festzustellen. Mit Hilfe einer Proteindatenbank (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pirnref.shtml>) wurden alle bekannten humanen Proteinsequenzen nach dem Motiv DAFXXXK durchsucht (siehe Tabelle 3.3). Die Suche ergab 242 Treffer. Nach Überprüfen der Sequenzen auf Redundanz blieben 62 Proteine, für die Fab 4 potentiell Kreuzreaktivitäten zeigt.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Proteindatenbanksuche nach dem Motiv DAFXXXK

	Treffer	Unique
DAFRSEKS	9	1
DAFRSEK	9	1
DAFRSE	9	1
DAFRS	38	11
DAFXXXK	242	62

Für das Projekt PepART ist es eine Voraussetzung hochspezifische Peptidbinder zu generieren und diese auch zu testen. Hier wurde ein Verfahren etabliert, um mit Hilfe planarer Peptid-Arrays eine hohe Zahl von Antikörper oder rekombinante Binder auf ihr Epitop und ihre relative Affinität hin zu untersuchen. Die planare Technologieplattform hat jedoch einige Nachteile gegenüber der in der Einleitung beschriebenen Mikrosphären-basierten Plattform. Reproduzierbarkeit und bislang unzureichende Automatisierung sind zwei dieser Nachteile. Folgende Versuche und Experimente sind daher auf der Mikrosphären-basierten Plattform durchgeführt. Die Epitopkartierungen und -untersuchungen wurden analog zu den Versuchen mit der planaren Array-Plattform mit dem Mikrosphären-basierten Arraysystem durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse decken sich mit denen hier gezeigten.

Die Bestimmung von relativen Affinitäten ist hilfreich für die Vorauswahl von rekombinanten Bindern innerhalb einer *screening*-Prozedur. Auf diesen Schritt muss jedoch eine Affinitätsbestimmung in flüssiger Phase zur Charakterisierung eines Antikörpers folgen. Der hier gezeigte Festphasenassay ist für eine solche Messung nicht geeignet.

3.1.2 Kompetitionsassay zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante von peptidspezifischen Fab-Fragmenten

Dissoziationskonstanten von Antikörpern werden im Allgemeinen durch die Messung der Kinetik der Komplexbildung und der Komplexdissoziation bestimmt. Durch die Bildung des Quotienten aus k_{off} und k_{on} wird anschließend die Dissoziationskonstante errechnet [86]. Zu der Messung von k_{off} und k_{on} wird das Antigen auf einer festen Phase immobilisiert und man detektiert die Bindung des Antikörpers. Die Detektion erfolgt über das *surface plasmon resonance*-Phänomen. Bindet ein Antikörper oder ein anderes Molekül an dieses Antigen ändert sich der Reflexionswinkel von polarisiertem Licht an der Glasoberfläche. Die Änderung des Winkels, hervorgerufen durch Bindung oder Dissoziation von Molekülen, ist proportional der Masse von gebundenem Material und wird von einem Sensor aufgenommen. Die Messmethode beruht jedoch auf einer Interaktion eines Proteins mit einer festen Phase. Dies ist problematisch da Effekte wie Avidität oder *rebinding* des Antikörpers die Ergebnisse verfälschen können. Die Dissoziationskonstanten können, verglichen mit einem Assay in flüssiger Phase, um den Faktor 500 unterschiedlich sein [86].

Daher wurde mit Hilfe der Luminex-Plattform ein durchsatzfähiges System entwickelt, das Dissoziationskonstanten in Lösung messen kann. Dabei wird das zu untersuchende Fab-Fragment mit verschiedenen Antigenkonzentrationen bis zur Gleichgewichtseinstellung vorinkubiert. Zu diesem Gleichgewicht wird anschließend Antigen immobilisiert auf Mikrosphären zugegeben. Nicht komplexiertes freies Fab-Fragment bindet an das immobilisierte Antigen und kann über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen werden. Dadurch kann indirekt die Konzentration an Antikörper-Antigen-Komplex bestimmt werden. Die Konzentration an freiem Fab Fragment muss über eine Eichreihe ermittelt werden (siehe Abbildung 3.4). Die Methode Dissoziationskonstanten mit einem kompetitiven ELISA zu messen, wurde von Friguet et al. [66, 67] für das Mikrotiterformat entwickelt und später von Nieba et al. an das SPR-System angepasst. Die Methode wurde hier auf das Luminex-System übertragen, da es der SPR-Methode an Durchsatzfähigkeit und an Sensitivität fehlt.

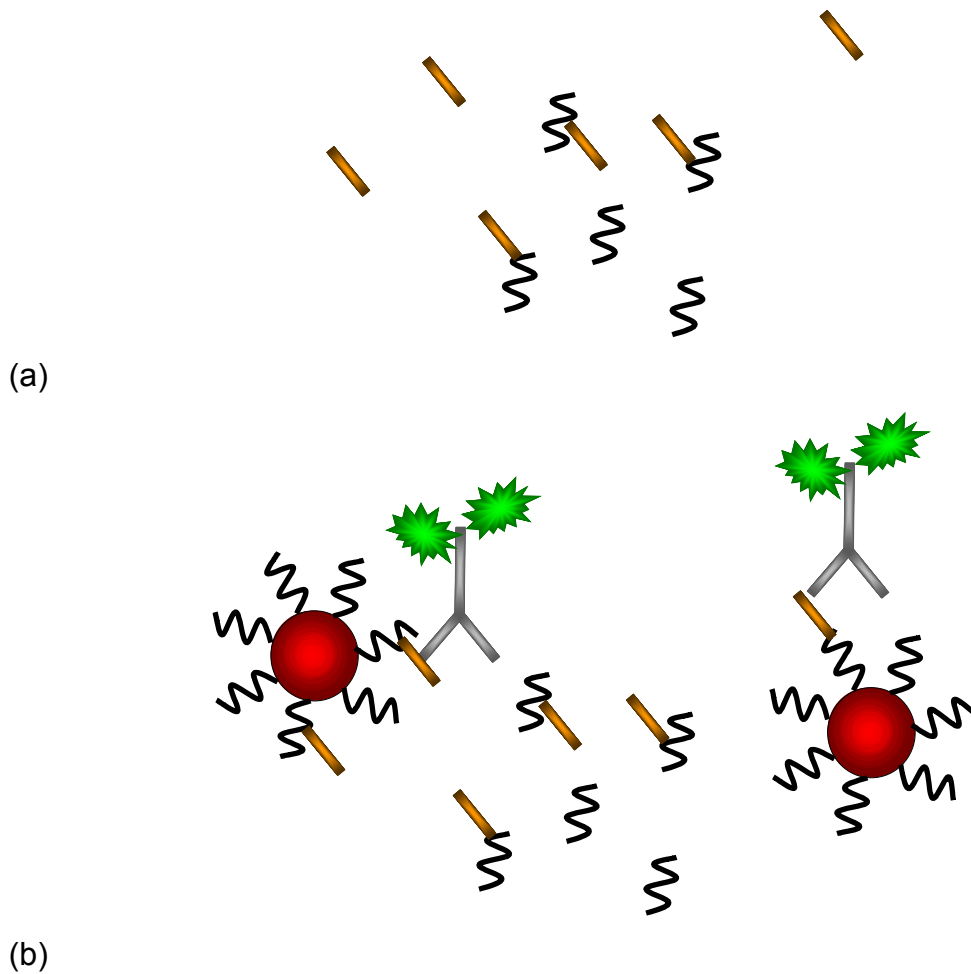


Abbildung 3.4: Kompetitionsassay zur K_D -Bestimmung von Fab-Fragmenten. Zunächst wird das Fab-Fragment mit löslichem Antigen inkubiert (a). Nach Gleichgewichtseinstellung werden zu dieser Lösung Mikrosphären mit immobilisiertem Antigen gegeben. Freies Fab-Fragment bindet an das immobilisierte Peptid und kann über einen PE-konjugierten anti-human-IgG nachgewiesen werden (b). Zur Quantifizierung des freien Fab-Fragments muss zusätzlich eine Verdünnungsreihe des Fab-Fragments ohne lösliches Antigen mit den Antigenmikrosphären inkubiert werden.

Zur Quantifizierung des Fab-Fragments wurden verschiedene Verdünnungen an Fab-Fragment zunächst mit dem auf einer Mikrosphäre immobilisierten Antigen inkubiert und anschließend mit einem PE-konjugierten Ziege-anti-human-IgG detektiert. In Abbildung 3.5 ist eine typische Verdünnungsreihe eines Fab-Fragmentes dargestellt. Eine sigmoide Kurve wurde an die erhaltenen Fluoreszenzwerte angepasst (Formel 3.4 und Abbildung 3.5). Mit den berechneten Parametern der Kurvenanpassung konnten die Fluoreszenzwerte aus dem kompetitiven Assay in Konzentrationen an freiem Fab-Fragment berechnet werden.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

Formel 3.4: Sigmoidale Kurvenanpassung nach logistischem Modell. Aus der Kurvenanpassung wurden die Parameter A_1 (untere Grenze), A_2 (obere Grenze), p (Ordnung) und x_0 (EC50) mit Origin 6.0 bestimmt. Die bekannten Parameter waren hierbei der x-Wert (Konzentration an Bindemolekül) und der gemessene y-Wert (MFI-Wert).

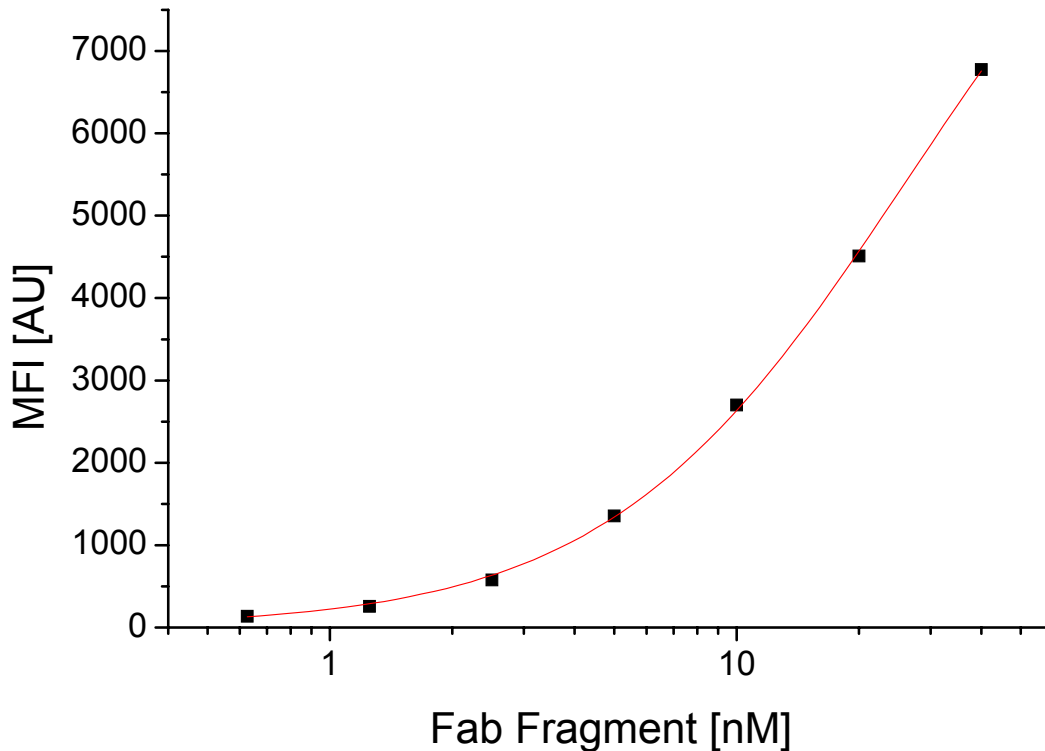


Abbildung 3.5: Quantifizierung von Fab-Fragmenten. Exemplarisch wurde eine Verdünnungsreihe von Fab 4 mit seinem Antigen immobilisiert auf einer Mikrosphäre inkubiert. Die Detektion des Fabs erfolgte durch Markierung mit PE-konjugiertem anti-human-IgG. Eine Kurve wurde mit Hilfe von Formel 3.4 an die Messwerte angepasst.

Der K_D -Wert im Gleichgewichtszustand folgt dem Massenwirkungsgesetz (Formel 3.5),

$$K_D = \frac{[Ab] \times [Ag]}{[AbAg]}$$

Formel 3.5: Massenwirkungsgesetz

Mit [Ab] ersetzt durch [Ab₀] - [AbAg] gilt:

$$K_D = \frac{([Ab_0] - [AbAg]) \times ([Ag_0] - [AbAg])}{[AbAg]}$$

Formel 3.6

Löst man Formel 3.6 nach der Konzentration des Komplexes [AbAg] und ersetzt diesen in Formel 3.7,

$$[Ab] = [Ab_0] - [AbAg]$$

Formel 3.7

erhält man:

$$[Ab] = [Ab_0] - \frac{[Ab_0] + [Ag_0] + K_D}{2} + \sqrt{\frac{([Ab_0] + [Ag_0] + K_D)^2}{4} - [Ag_0] \times [Ab_0]}$$

Formel 3.8

Mit der Gesamtkonzentration des Antigens ([Ag₀]) als unabhängige Variable X und der Konzentration an freiem Antikörper ([Ab]), die über die Eichkurve des Fab-Fragments berechnet wurde, lassen sich über eine Zwei-Parameter-Kurvenanpassung an Formel 3.8 die Dissoziationskonstante und die Gesamtkonzentration an Antikörper ([Ab₀]) bestimmen. Zur Reproduzierbarkeit des Assays wurden mit Fab 4 vier unabhängige Kompetitionsassays durchgeführt und die Standardabweichung der K_D-Bestimmung ermittelt (Abbildung 3.6). Mit einer Standardabweichung von ca. 10% ist die Reproduzierbarkeit mit der SPR-Methode vergleichbar [86].

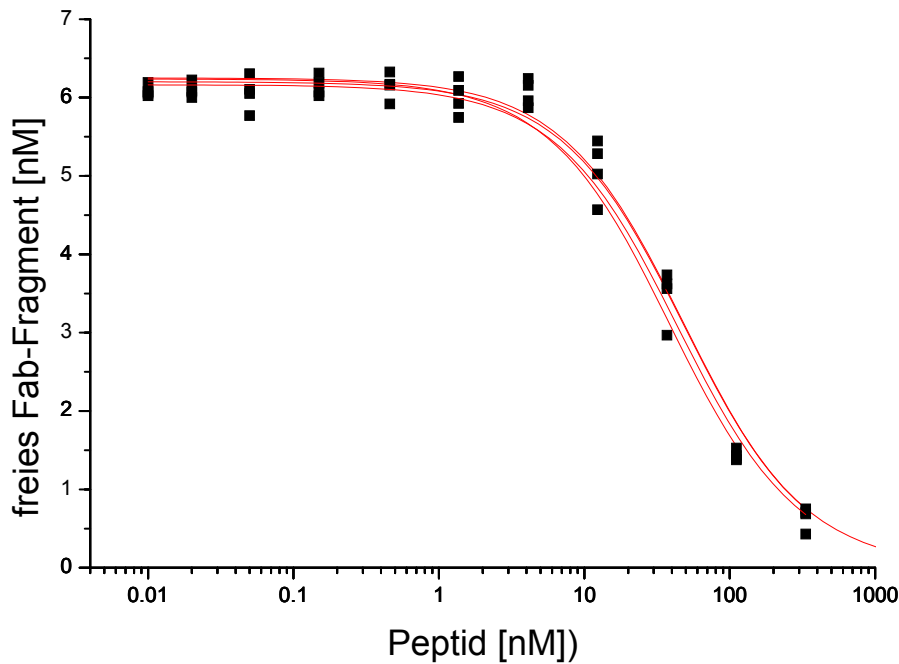


Abbildung 3.6: Wettbewerbsassay zur K_D -Bestimmung von Fab-Fragmenten. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der K_D -Bestimmung wurde in einem Experiment viermal das Peptid DAFRSEKS verdünnt und im Wettbewerbsassay verwendet. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Fab-Fragments in Konzentrationen an freiem Fab-Fragment umgerechnet. Die Bestimmung ergab ein K_D von 42 ± 4 und damit eine Reproduzierbarkeit von unter 10%.

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante nach dieser Methode war es zwingend notwendig, dass die Zugabe der immobilisierten Antigene das eingestellte Gleichgewicht nicht beeinflusst. Theoretisch bedeutet das Einbringen der Mikrosphären bei 1000 Mikrosphären und ca. 1000000 Antigenen/Mikrosphären (Angaben des Herstellers) eine zusätzliche Stoffmenge von ca. 2 fmol bzw. entspricht dies einer zusätzlichen Konzentration von ca. 30 pM. Damit ist die Konzentration an löslichem Antigen um den Faktor 30 bis 40 000 höher. Um sicher zu gehen, dass kein Transfer von Fab-Fragment aus gebildetem Antikörper-Antigen-Komplex auf immobilisiertes Antigen stattfindet, wurde über einen Zeitraum von 95 min das Signal einer kompetierten und einer nicht kompetierten Situation beobachtet. Die Signalwerte schwanken über 75 min in einem Bereich von 5%. Damit ist gezeigt, dass innerhalb dieses Zeitraums kein Transfer stattfindet.

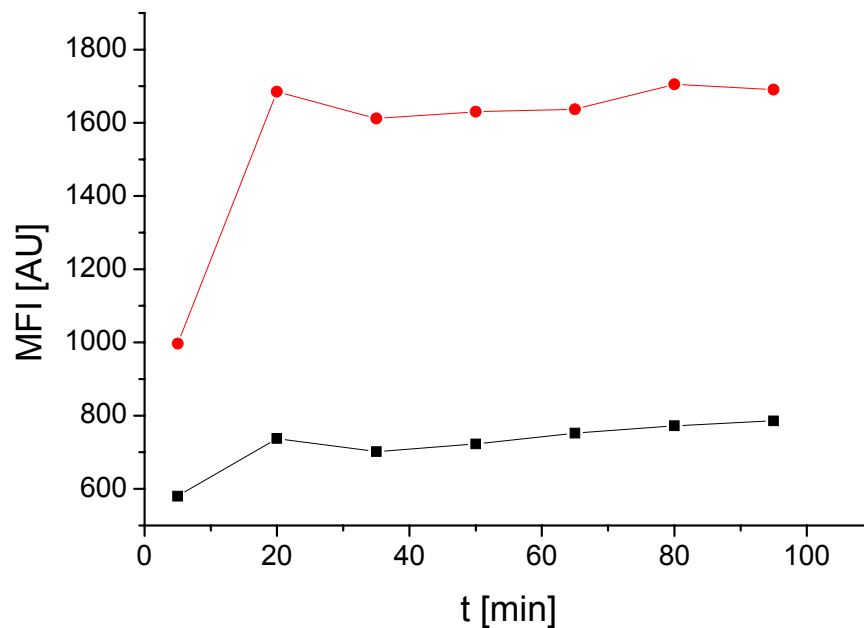


Abbildung 3.7: Kinetik eines kompetierten und eines nicht kompetierten Assays. Die Messwerte für die nicht kompetierte (-●-) und bei 40 nM kompetierte (-■-) Situation wurden gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen. Es wurden sieben Assays angesetzt und die Inkubationszeiten mit PE-markiertem Ziege-anti-human-Antikörper variiert. Es ist kein signifikanter Signalanstieg für einen kompetierten Assay festzustellen. Die Schwankungen der Signalwerte liegen ab 20 min innerhalb eines Bereichs von 5%.

Die Methode wurde dazu verwendet, die Affinität von Fab 4 zu verschiedenen in seinem Epitop punktmultierten Peptiden (siehe Tabelle 2.8) zu bestimmen. Hierzu wurde ein Gleichgewicht zwischen dem Fab-Fragment und den punktmultierten Peptiden eingestellt und die Menge des freien Binders mit Mikrosphären, beladen mit dem Originalepitop, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst und einige Kompetitionskurven in Abbildung 3.8 dargestellt. Die Dissoziationskonstanten spiegeln die Ergebnisse der Experimente wider, die mit den planaren Peptid-Arrays durchgeführt wurden. Position 1, 2, 3 und 7 sind die Positionen, die die Bindung des Fab-Fragments an das Peptid bestimmen. Ein Austausch von Aminosäure 4, 5 hat keinen und von Aminosäure 6 nur einen geringen Einfluss auf die Affinität des Fab-Fragments.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.4: ermittelte Dissoziationskonstanten und Kreuzreaktivitäten von Fab 4 mit Hilfe des kompetitiven Fluoreszenzimmunoassays. Die Ergebnisse sind aus vier unabhängigen Experimenten an vier verschiedenen Tagen ermittelt. Zur Konkurrenz wurden verschiedene Peptide verwendet, in denen eine Aminosäureposition der Epitopsequenz konservativ ausgetauscht war (rot eingefärbt).

Kompetitor	K_D [nM] MW (n=4)	Stabw [nM] (n=4)
DAFRSEKS	51	13
E AFRSEKS	2749	413
D LFRSEKS	17775	896
DA Y RSEKS	5167	321
DAF K SEKS	35	14
DAFR T EKS	43	8
DAFRS D KS	246	85
DAFRSD R S	1818	71

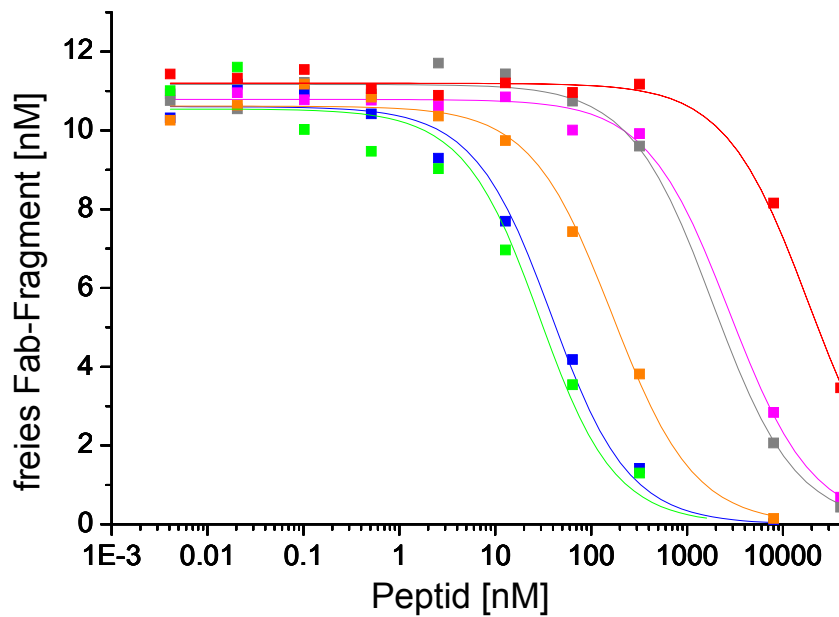


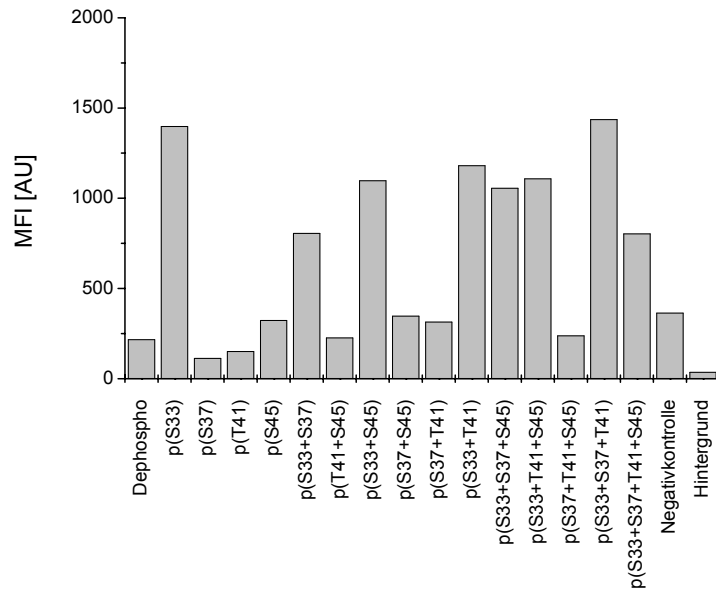
Abbildung 3.8: Verschiedene Konkurrenzkurven zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten von Fab 4 zu punktmultierten Peptiden (Originalepitop in blau -■-, D1E in magenta -■-, A2L in rot -■-, R4K in grün -■-, E6D in orange -■- und K7R in grau -■- dargestellt)

3.1.3 Charakterisierung von phospho- und nicht-phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern

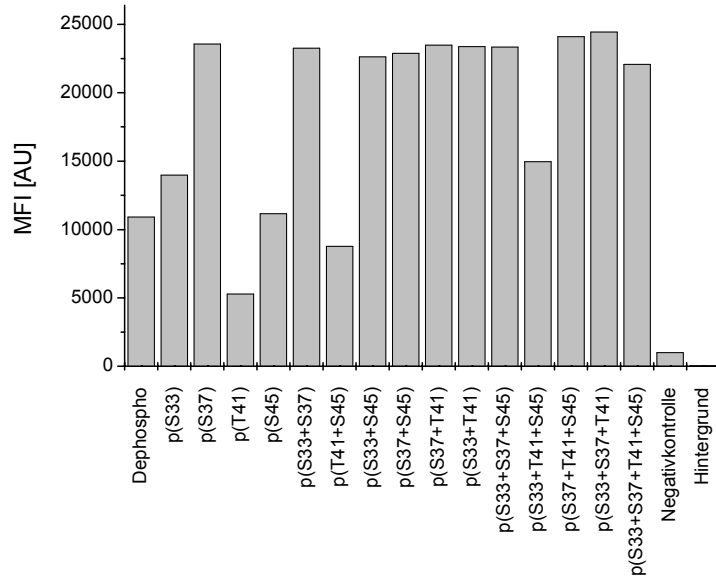
Die beschriebene Methode, Epitope von Antikörpern mit auf Mikrosphären immobilisierten Peptiden zu untersuchen, wurde auf das Testen von Phosphospezifität erweitert.

Um das Phosphorylierungsmuster im N-terminalen Bereich von β -Catenin untersuchen zu können, wurden die Epitope verschiedener phosphospezifischer ($\alpha_{\text{bcat}_8-12}$, siehe Tabelle 2.12) und dephosphospezifischer Antikörper ($\alpha_{\text{bcat}_5, 15}$ und 16, siehe Tabelle 2.12) untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst Peptide synthetisiert, die den Bereich AS 27-48 abdecken. In diesem Bereich findet die vierfache Phosphorylierung statt, die zur Degradation des Proteins führt [55-57, 87-89]. Die Peptide wurden in allen möglichen Kombinationen an Phosphorylierungsmustern hergestellt (siehe Tabelle 2.9). Zur Immobilisierung wurde während der Synthese dem Peptid N-terminal ein Biotin mit zwei ϵ -Aminocapronsäuren (Aca) angehängt. Die 17 Peptide wurden auf Avidin-belegte Mikrosphären immobilisiert (siehe 2.5.2.1) und zu einem 17plex vereinigt. Die Immobilisierung über das Avidin/ Streptavidin erlaubt auch hier nur die Anbindung von vollständigen Peptiden. Bei der Synthese der hier verwendeten Peptide wurde nach jedem Syntheseschritt eine Acetylierung durchgeführt. Die Kopplung von Biotin am N-Terminus konnte somit nur auf vollständigen Peptidsequenzen stattfinden.

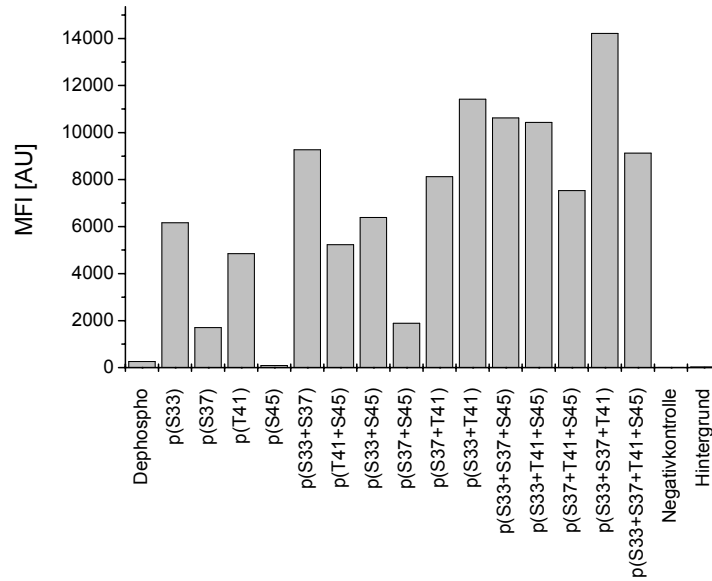
Die Untersuchung der Spezifität wurde wie unter 2.5.2.2 beschrieben durchgeführt. Als Konzentration an Antikörper wurden die für Western-Blot empfohlenen Mengen eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Phosphoserin-Peptid. Das so genannte *Crosstide* Peptid ist der Sequenz der humanen Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β) entnommen. Die Sequenz beinhaltet die Phosphorylierungsstelle durch PKB/AKT.



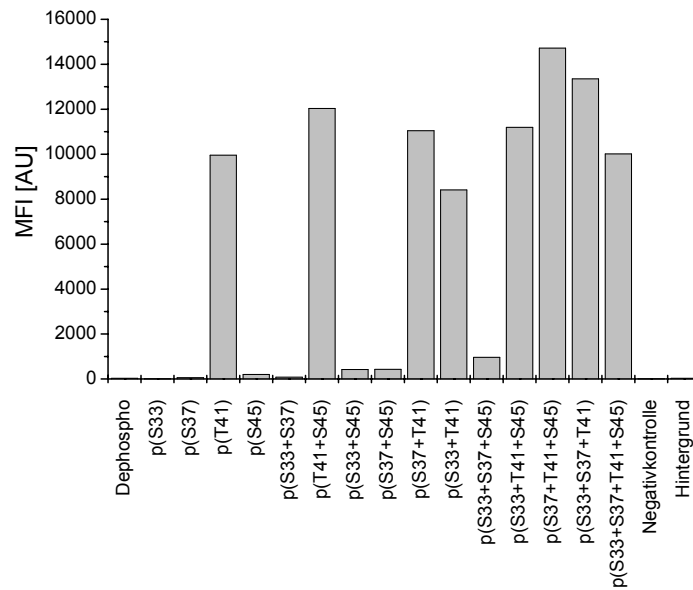
(a)



(b)



(c)



(d)

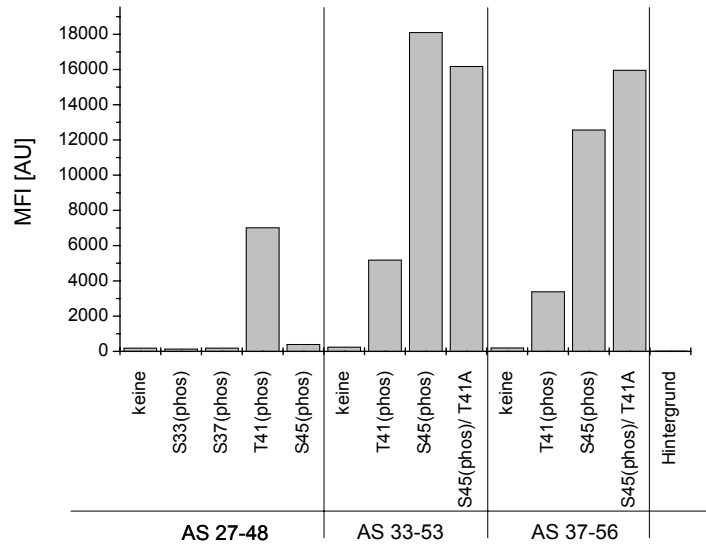
Abbildung 3.9: Selektivität von phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern. Es wurden Peptide in allen möglichen Kombinationen phosphoryliert synthetisiert und ein 17plex Mikrosphären-basierter Peptid-Mikroarray hergestellt. Mit Hilfe eines direkten Fluoreszenz-immunoassays wurden die Spezifitäten der Antikörper getestet. (a) α_{bcat_8} bei 1 $\mu\text{g/ml}$, generiert gegen Peptid phosphoryliert in S33, (b) α_{bcat_9} bei 0,4 $\mu\text{g/ml}$, generiert gegen Peptid phosphoryliert in S33 und S37, (c) $\alpha_{\text{bcat}_{10}}$, bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$, generiert gegen Peptid phosphoryliert in S33, S37 und T41 (d) $\alpha_{\text{bcat}_{11}}$, bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$, generiert gegen Peptid phosphoryliert in T41 und S45.

Die Ergebnisse für die monoklonalen Antikörper α_{bcat_8} und 9 sind hinsichtlich der Phosphospezifität unzureichend. Beide Mabs erkennen ihre phosphorylierten Immunogene, aber auch zu einem hohen Anteil das nicht phosphorylierte Peptid. Das Signal von Immunogen zu nicht phosphoryliertem Peptid beträgt im Falle von α_{bcat_8} sieben und im Falle von α_{bcat_9} lediglich zwei (siehe Abbildung 3.9). Weitere Verdünnungen von α_{bcat_9} führen zwar zu einer Verbesserung auf den Faktor 10, die Signalstärke nimmt dafür aber rapide ab. Im Falle von α_{bcat_8} steigt das Verhältnis der Signale auf maximal 22, aber auch hier sinkt die Signalstärke dramatisch. Des Weiteren zeigen beide Mabs Interaktion mit der phosphorylierten Negativkontrolle. Damit ist eine gewisse Affinität der Antikörper allein zu einem phosphorylierten Serin festzustellen.

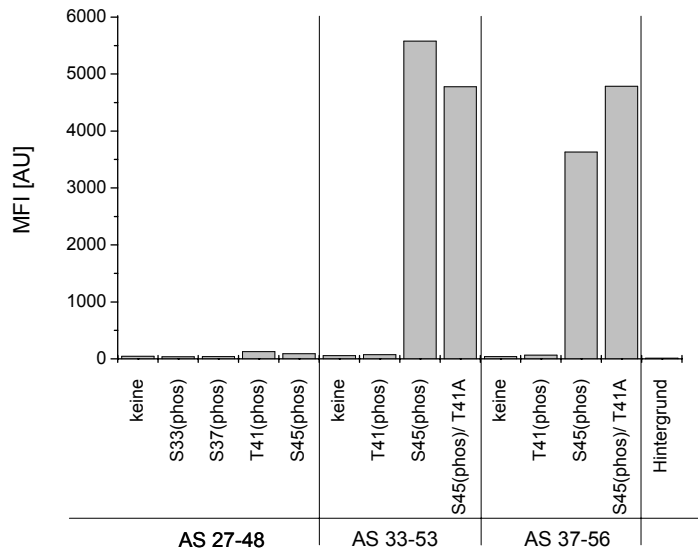
Die zwei polyklonalen Antikörper $\alpha_{\text{bcat}_{10}}$ und 11 hingegen zeigen eine sehr hohe Spezifität. $\alpha_{\text{bcat}_{10}}$ wurde gegen ein an S33, S37 und T41 phosphoryliertes Peptid generiert, der genaue Sequenzbereich ist vom Hersteller nicht angegeben. Der Pab zeigt Interaktionen sowohl mit den Peptiden mit den entsprechenden einzelnen Phosphorylierungen als auch mit denen, die mehrfach phosphoryliert sind. Das höchste Signal und damit die stärkste Interaktion mit dem Pab zeigt das Peptid mit Phosphorylierung an AS 33, 37 und 41 (Verhältnis phosphoryliert zu nicht-phosphoryliert: 100). Die Signale der einfach phosphorylierten Peptide lassen eine Gewichtung der einzelnen phosphorylierten AS für die Bindung des Antikörpers zu. Die Phosphatgruppen an S33 und T41 scheinen einen höheren Beitrag zur Bindung des Antikörpers zu leisten, als die an S37. Die Signale der Peptide mit einfacher Phosphorylierung verhalten sich sogar additiv zu den Signalen, die von der Interaktion mit den mehrfach phosphorylierten Peptiden generiert werden. Im Falle des zweiten Pab fand die Immunisierung mit einem Peptid phosphoryliert an T41 und S45 statt. Der Antikörper zeigt eine sehr gute Selektivität hinsichtlich der Unterscheidung zwischen dem nicht-phosphorylierten und dem an T41 phosphorylierten Peptid. Alle Peptide an T41 und S45 phosphoryliert zeigen ein Signalverhältnis von ca. 500 gegenüber dem nicht-phosphorylierten Peptid. Im Falle der einfach phosphorylierten Peptide erhält man bei T41 ein Verhältnis von 300, und bei S45 ein Verhältnis von sieben. Der dritte Pab $\alpha_{\text{bcat}_{12}}$, generiert gegen ein an S45 phosphoryliertes Peptid, zeigte wider Erwarten keine Interaktion mit den immobilisierten Peptiden (Daten nicht

gezeigt). Da die exakte Sequenz des Peptids, das zur Generierung von $\alpha_{\text{bcat}}_{12}$ verwendet wurde, nicht bekannt war, lag der Schluss nahe, dass möglicherweise Aminosäuren hinter Position 48 eine Rolle bei der Antikörperbindung spielen. Daher wurde ein neuer Satz an Peptiden synthetisiert. Während der erste Satz den Bereich von AS 27-48 im β -Catenin abdeckte, wurden für den zweiten Satz die Bereiche AS 33-53 und AS 36-56 gewählt. Die Peptide wurden jedoch nur einfach phosphoryliert synthetisiert (phosphoryliert an T41 und S45, siehe Tabelle 2.10). Außerdem wurde eine Variante hergestellt, in der das Threonin in Position 41 durch Alanin ersetzt wurde. Mit diesem mutierten Peptid sollte überprüft werden, ob die Bindung der Antikörper durch diese Mutation unterbunden oder gestört wird.

Die Untersuchung von $\alpha_{\text{bcat}}_{12}$ mit dem neuen Satz an Peptiden ergab eine hohe Selektivität für das phosphorylierte S45 (Abbildung 3.10 b). Offensichtlich benötigt der Antikörper zur Bindung weitere AS hinter Position 48. Die Signale des phosphorylierten Peptids im Bereich AS 33-53 übersteigen die Signale des unphosphorylierten Peptids um den Faktor 100. Die mutierte Variante ergibt ein etwas geringeres Signal. Das Signal für das phosphorylierte Peptid im Bereich AS 37-56 ist geringer und ergibt nur ein Verhältnis von 70. Dies beruht unter Umständen auf sterischen Effekten oder auf der Ausbildung einer Sekundärstruktur. Eine genauere Bestimmung wäre nur durch eine Epitopminimierung möglich. Erstaunlicherweise zeigt der Pab die gleich starke Interaktion zur mutierten phosphorylierten Version in den Bereichen AS 33-53 und 36-56. $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ wurde mit dem beschriebenen Peptid-Mikroarray ein weiteres Mal untersucht. Interessanterweise sinkt das Signal des an T41 phosphorylierten Peptids in den beiden Bereichen AS 33-53 und 36-56 gegenüber Bereich AS 27-48. Im Gegensatz dazu steigt das Signal in Bezug auf das S45-phosphorylierte Peptid. Während die Peptide, die den Bereich 27-48 abdecken, fast kein Signal für phosphoryliertes S45 ergeben, steigt das Signal im Bereich AS 33-53 um den Faktor 50 und im Bereich AS 36-56 um den Faktor 30. Für die mutierte Variante zeigt der Antikörper wieder die gleiche Interaktion in beiden Bereichen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Pab zumindest aus zwei Populationen besteht: eine spezifisch für den Bereich um phosphoryliertes T41 und eine spezifisch für den Bereich um phosphoryliertes S45.



(a)



(b)

Abbildung 3.10: Selektivität von phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern. Es wurde ein Satz an Peptiden synthetisiert, der die Phosphorylierungsregion von β -Catenin überlappend in Bereich von AS 27 bis AS 56 überspannt. Die Peptide waren an S33, T41 oder S45 einfach phosphoryliert oder dephosphoryliert. Mit einem 14plex Mikrosphären-basierten Peptid-Mikroarray wurde ein direkter Fluoreszenzimmunoassay zur Bestimmung der Spezifitäten der Antikörper durchgeführt. (a) $\alpha_{\text{bcat}_{11}}$, bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$, generiert gegen Peptid phosphoryliert in T41 und S45, (b) $\alpha_{\text{bcat}_{12}}$, bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$, generiert gegen Peptid phosphoryliert an S45.

Es wurden fünf Antikörper mit Hilfe von Mikrosphären-basierten Peptid-Arrays hinsichtlich ihrer Phosphoselektivität untersucht. Zwei monoklonale Antikörper zeigten schlechte Ergebnisse in Bezug auf eine Differenzierung

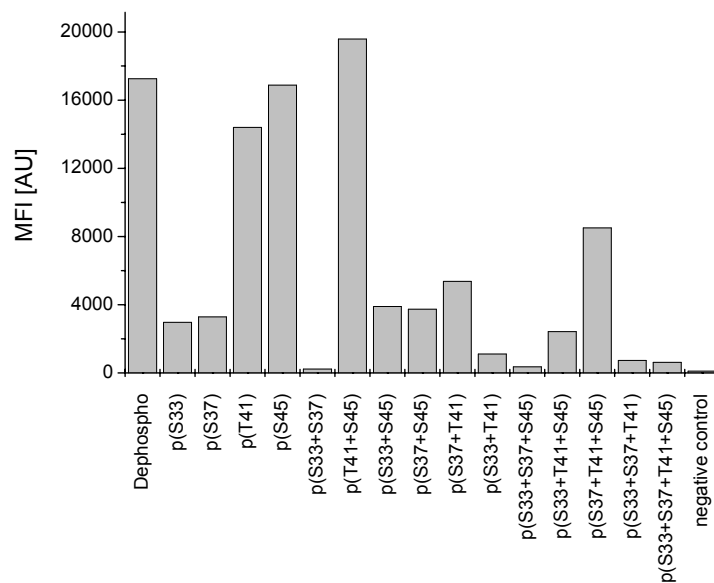
zwischen phosphoryliert und nicht phosphoryliert. Die drei polyklonalen Antikörper ergaben sehr gute Ergebnisse. Sie konnten zwischen den einzelnen Phosphorylierungen unterscheiden und zeigten eine sehr geringe Affinität zu den nicht phosphorylierten Peptiden. Mit den vorhandenen Antikörpern ist eine Differenzierung im Phosphorylierungsstatus von β -Catenin möglich. Somit kann nach diesen Ergebnissen eine Phosphorylierung direkt an S45 und indirekt an T41 bzw. S33/S37 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für die Phosphoselektivität der monoklonalen Antikörper in der gezeigten Arbeit stehen im Widerspruch zu den Daten von Sadot et al. [89], bei denen keine Affinität der beiden Antikörper zur dephosphorylierten Form des Peptids festgestellt werden konnte. Unter Umständen ist dies auf die unterschiedliche technologische Plattform bzw. unterschiedliche experimentelle Ansätze zurückzuführen.

Zusätzlich zu den phosphospezifischen Antikörpern standen peptid-spezifische Binder zur Verfügung, die gegen die dephosphorylierte Form von β -Catenin hergestellt worden sind. Mit Hilfe des 17plex Phosphopeptid-Arrays (siehe Tabelle 2.11) konnte untersucht werden, ob die Peptide nur mit der nicht phosphorylierten Form von β -Catenin interagieren.

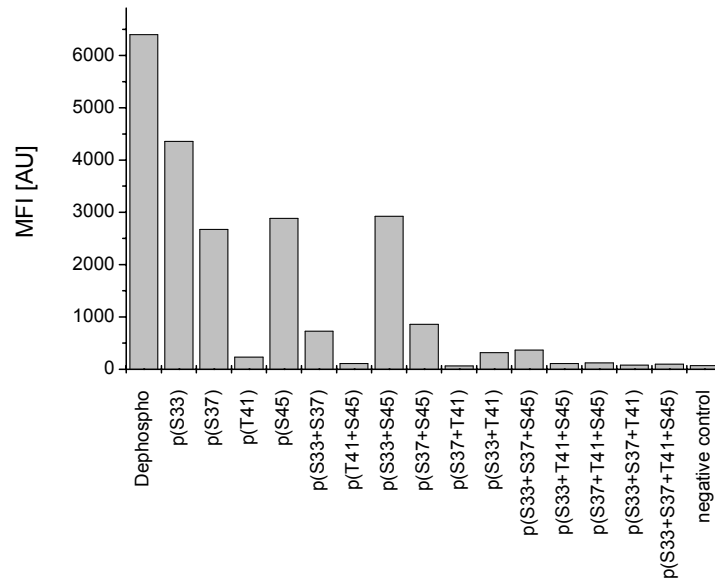
Die Antikörper binden alle an die teilweise phosphorylierten β -Catenin-Peptide. Die Interaktion aller IgGs wird durch die Modifikation aller vier Phosphorylierungsstellen unterbunden. Eine Phosphorylierung an S33 und S37 in allen Peptiden stört die Bindung von α_{bcat_5} an sein Epitop. Dies ist erklärbar da der Antikörper gegen die Peptidsequenz AS 35-50 generiert wurde. Die Phosphorylierung in S33 liegt zwar außerhalb des Immunogens, aber möglicherweise stört eine Phosphatgruppe in nächster Nähe zum Epitop des Antikörpers. Die Interaktion von α_{bcat_16} mit dem Phosphorylierungsbereich in β -Catenin wird durch eine einzelne Phosphorylierung teilweise bis ganz unterbunden. Der Antikörper zeigt keine bis eine sehr schwache Interaktion mit an T41 phosphorylierten Peptiden. Offensichtlich liegt T41 mitten im Epitop des Antikörpers. Dieses Ergebnis bestätigt eine Epitopkartierung der Arbeitsgruppe, die den Antikörper hergestellt hat [88]. Der Bereich AS 36-43 wurde von dieser Arbeitsgruppe als Epitop bestimmt. Die umliegenden Aminosäuren bzw. deren Phosphorylierung scheinen in jedem Fall die Bindung des Antikörpers zu beeinträchtigen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe wurde

ERGEBNISSE

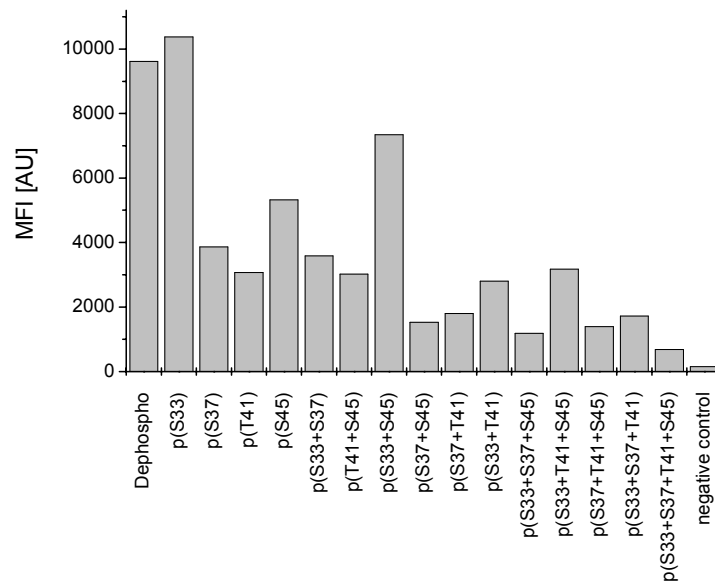
ein kompletter Signalverlust durch eine Phosphorylierung an S37 jedoch nicht beobachtet. Eine Phosphorylierung an S45 wurde von dieser Arbeitsgruppe nicht untersucht. Die Interaktionen von α _bcat_15 mit den immobilisierten Peptiden ergeben eine Schwächung der Wechselwirkung bei einer Phosphorylierung in S37, T41 und S45. Die Phosphorylierung in S33 hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Bindung. Die Aminosäure scheint außerhalb des Epitops zu liegen.



(a)

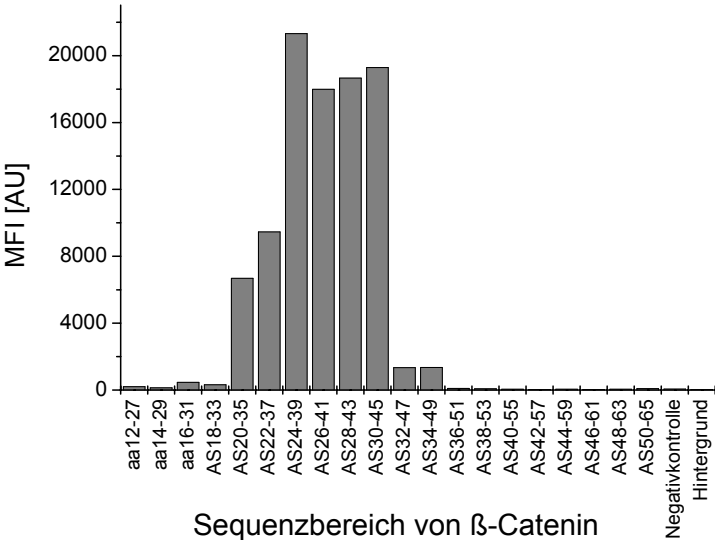


(b)

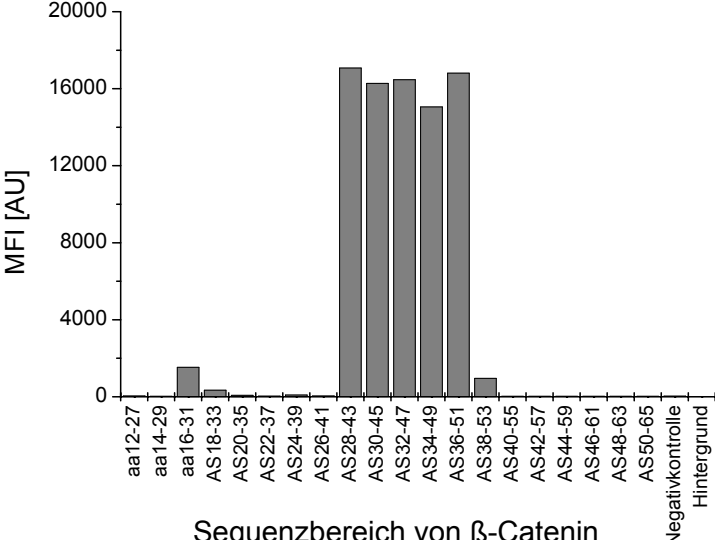


(c)

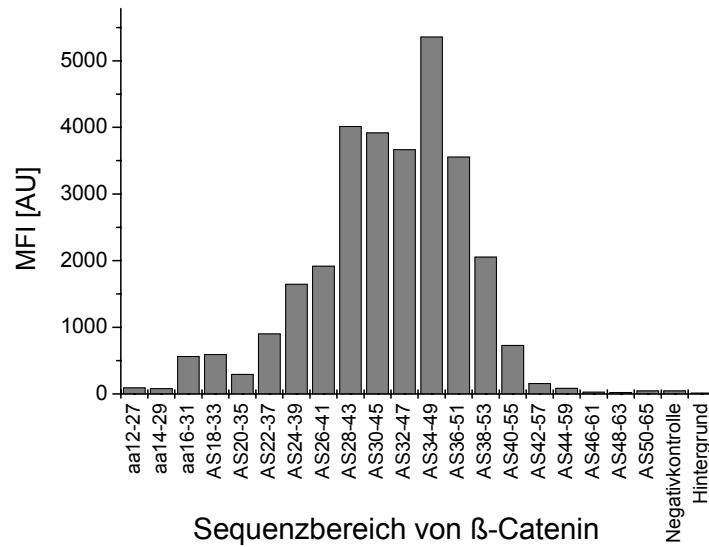
Abbildung 3.11: Selektivität von dephosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern. Es wurden Peptide in allen möglichen Kombinationen phosphoryliert synthetisiert und ein 17plex Mikrosphären-basierter Peptid-Mikroarray hergestellt. Mit Hilfe eines direkten Fluoreszenzimmunoassays wurden die Interaktionen der Antikörper getestet. (a) α _bcat_5 bei 1 μ g/ml, generiert gegen Peptid AS 35-50, (b) α _bcat_16 bei 0,4 μ g/ml, generiert gegen rekombinantes Proteinfragment AS 1-100, (c) α _bcat_15, bei 0,2 μ g/ml, generiert gegen Peptid AS 29-49.



(a)



(b)



(c)

Code	Immunogen	gefundenes Epitop
α_{bcat}_5	AS 35-50	AS 30-35
$\alpha_{\text{bcat}}_{16}$	rekombinantes Proteinfragment AS 1-100	AS 36-43
$\alpha_{\text{bcat}}_{15}$	AS 29-49	AS 38-43

(d)

Abbildung 3.12: Epitopkartierung von peptidspezifischen β -Catenin-Antikörpern. Ein 21plex-Peptidarray, bestehend aus überlappenden Peptiden mit 15 AS Länge und 13 AS Überlappung wurde verwendet, die Epitope von (a) α_{bcat}_5 , bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$, (b) $\alpha_{\text{bcat}}_{16}$, bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$, und (c) $\alpha_{\text{bcat}}_{15}$, bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ zu kartieren. (d) Tabelle der gefundenen Epitope und die Sequenzen der zur Immunisierung verwendeten Peptide.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein Antikörper in der Lage ist, den gesamten Phosphorylierungsbereich abzudecken; dazu ist der Sequenzbereich zu groß. Die Bindung der peptidspezifischen Antikörper wird jedoch durch die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren stark unterbrochen. Eine Phosphorylierung von β -Catenin in T41 würde eine Detektion durch $\alpha_{\text{bcat}}_{16}$ nahezu komplett verhindern, während α_{bcat}_5 durch eine Phosphorylierung in S33 und S37 kaum Signale zeigen würde.

Um hinsichtlich der Epitope der Antikörper die Ergebnisse aus den Experimenten mit den Phosphopeptid-Arrays zu verifizieren, wurde ein 21plex-Peptidarray mit überlappenden Sequenzen generiert. Der Sequenzbereich von AS 12-65 wurde mit 15mer-Peptiden mit 13 AS Überlappung abgedeckt. Der Array

wurde dazu verwendet die Epitope der oben erwähnten dephosphospezifischen Peptidbinder näher zu untersuchen. In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse in Diagrammen und einer Tabelle wiedergegeben. $\alpha_{\text{bcat}}_{16}$ bindet, wie schon von van Noort et al. gefunden, im Bereich AS 36-43. $\alpha_{\text{bcat}}_{15}$ bindet Sequenzabschnitt AS 38-43, was die Ergebnisse, die mit dem Phosphopeptidarray generiert wurden, bestätigt: Eine Phosphorylierung in S33 sollte auf die Bindung des Antikörpers keinen Einfluss haben. Die Ergebnisse der Epitopkartierung von α_{bcat}_{5} zeigen eine minimale Bindesequenz in Bereich AS 30-35. Dies ist einerseits erfreulich, da die Resultate die Wechselwirkungen des Antikörpers mit den phosphorylierten Peptiden erklären. Andererseits wurde damit aber ein Epitop bestimmt, das außerhalb des vom Hersteller angegebenen Immunogens liegt.

Verschiedene Antikörper wurden sowohl hinsichtlich ihres Epitops als auch hinsichtlich ihrer Phosphoselektivität untersucht. Die Antikörper sind geeignet, die N-terminale Phosphorylierungsregion von β -Catenin mit unterschiedlichen Methoden zu untersuchen. Mit Western-Blot, Immunfärbungen und Sandwichimmunoassays sollte eine Unterscheidung des Phosphorylierungsgrades durchgeführt werden.

3.2 Sandwichimmunoassays zur Untersuchung von β -Catenin in Lebernorgewebe und Lebertumoren aus Mäusen

Die Untersuchung von biologischen Proben mit Methoden wie Western-Blot oder Immunhistochemie ist zeitaufwändig. Mikrosphären-basierte Sandwichimmunoassays sind schnell und einfach durchführbar. Außerdem bietet diese Methode eine gegenüber dem Western-Blot bessere Möglichkeit zur Quantifizierung bzw. Semiquantifizierung von Proteinen, da keine zeitaufwändige Bildbearbeitung notwendig ist. Die Parallelisierung von Assays mit der Mikrosphären-basierten Arraytechnologie führt des Weiteren zu einer Reduktion des Probenmaterialverbrauchs. In dieser Arbeit sollten multiplexe Sandwichimmunoassays zur Untersuchung von *Catnb*-mutierten hepatozellären Tumoren entwickelt und angewendet werden. Wegen einer limitierten Menge an Probenmaterial ist die Anwendung von miniaturisierten Systemen enorm von Vorteil.

3.2.1 β -Catenin Sandwichimmunoassay

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an β -Catenin in Mauslebergeweben wurde ein Sandwichimmunoassay aufgebaut. Zunächst wurden die Antikörper mit der Western-Blot-Methode hinsichtlich ihrer Spezifität zum Analyten untersucht. 20 μ g Protein aus einem Leberhomogenat wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit verschiedenen β -Catenin-Antikörpern in einem Western-Blot analysiert (Abbildung 3.13). Generell zeigen alle Antikörper eine spezifische Bande bei 93 kDa. Während α_{bcat_2} , 3 und 5 noch zusätzliche schwache Banden zeigen, scheinen α_{bcat_4} , 6, 7, 13, 15, 16 und 17 sehr spezifisch für β -Catenin zu sein. α_{bcat_1} wurde in einem anderen Experiment getestet und zeigte ebenfalls nur eine Bande (Daten nicht gezeigt).

Zum Aufbau eines Sandwichimmunoassays wurden die monoklonalen β -Catenin-Antikörper als Fänger und die polyklonalen β -Catenin-Antikörper zur Detektion verwendet. Zur Identifizierung der optimalen Antikörperkombination wurden die Antikörper α_{bcat_1} , 2, 3, 4, 5, 7, 13 auf Mikrosphären immobilisiert. In einem 8plex-Sandwichimmunoassay wurden einerseits verschiedene Mengen an

rekombinantem GST- β -Catenin und andererseits verschiedene Mengen an Zelllysate einer Hepatomzelllinie (MH1c1) mit den entsprechenden Mikrosphären inkubiert und anschließend mit verschiedenen polyklonalen Antikörpern detektiert ($\alpha_{\text{bcat}}_{14}$, 15 und 17). Zur Bestimmung des besten Antikörperpaares wurden die Verhältnisse aus spezifischen Signalen und Signalen ohne Analyten gebildet (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.16). Bemerkenswert ist die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen mit rekombinanten Proteinen und Zelllysate. Während alle Kombinationen für einen Sandwichimmunoassay mit dem GST-Fusionsprotein anwendbar sind, ergeben die Messungen mit dem Zelllysate weniger Möglichkeiten (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.16). Das beste Antikörperpaar stellt jedoch $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ als Fänger und $\alpha_{\text{bcat}}_{17}$ als Detektor dar. Mit einem Signal zu Hintergrund-Verhältnis von acht bei 0,4 μg Homogenat und fünf bei 200 pg rekombinantem Protein zeigt dieses Antikörperpaar die beste Sensitivität. In Abbildung 3.16 ist ein typischer Sandwichimmunoassay für β -Catenin mit einer Verdünnung eines Leberhomogenates in Vergleich zu einem Western-Blot gezeigt. Eine sehr gute Linearität des Immunoassays ist in einem Bereich von 500 bis 5000 MFI festzustellen. Die Signale für einen relativen Vergleich des β -Catenin-Gehalts sollten für eine Auswertung in diesem Bereich liegen. Die möglichen Kombinationen mit α_{bcat}_{8} wurden ebenfalls ausgetestet, erreichten aber keine besseren Sensitivitäten als die oben erwähnte Kombination.

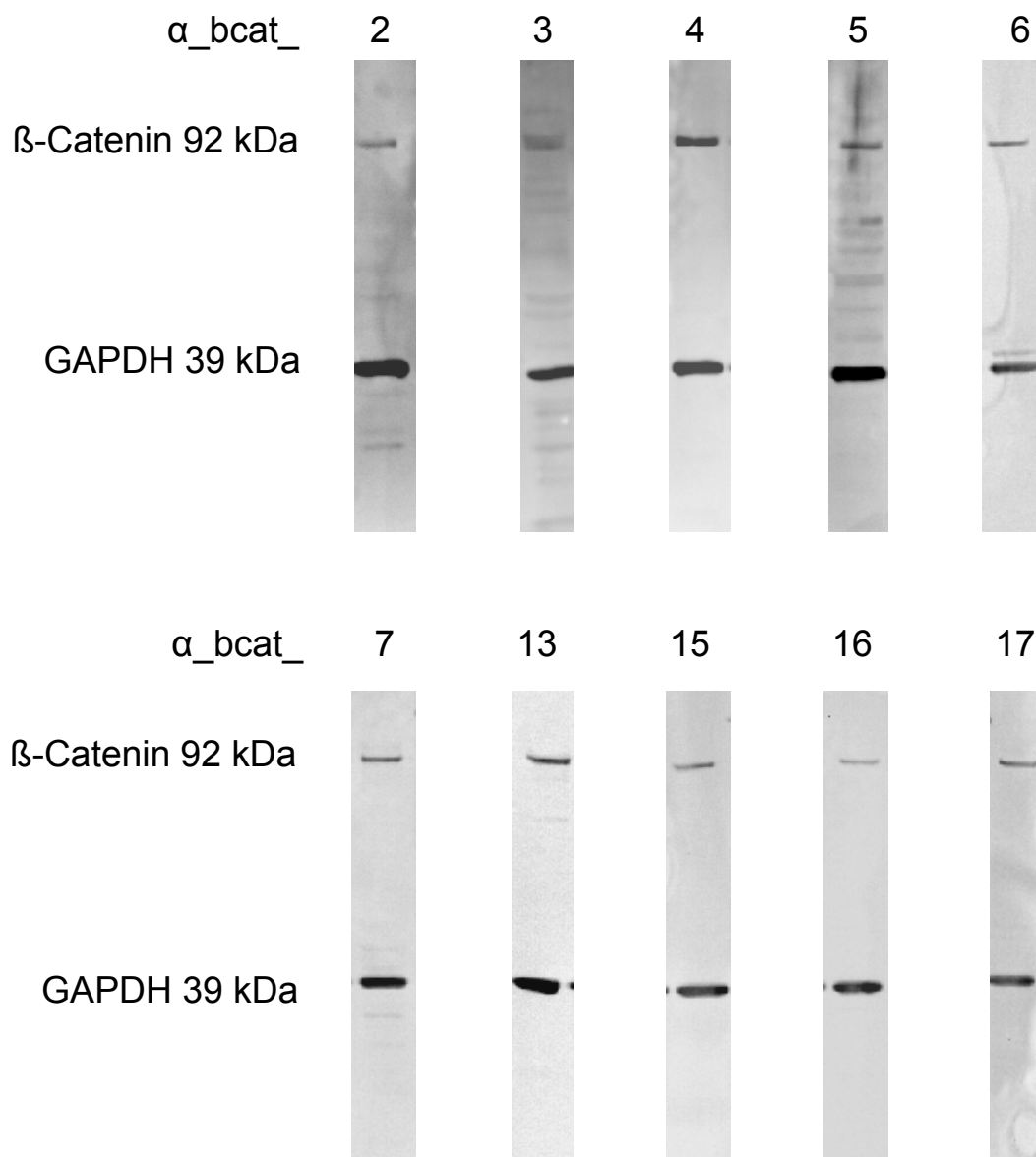
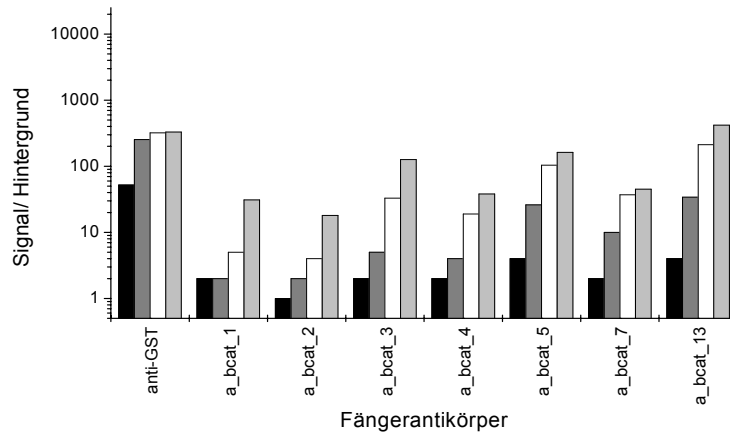
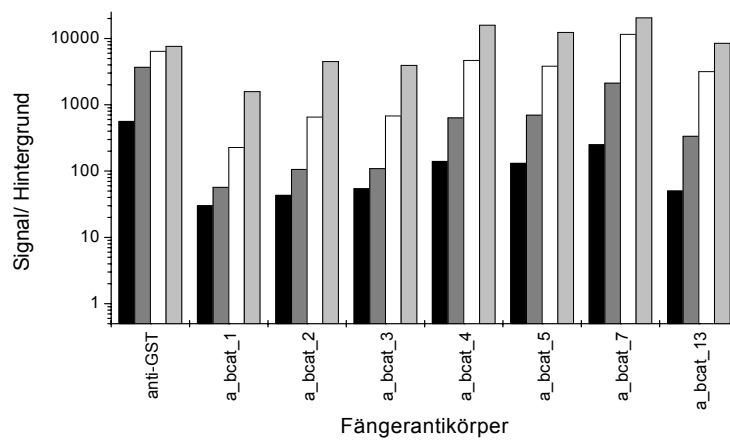


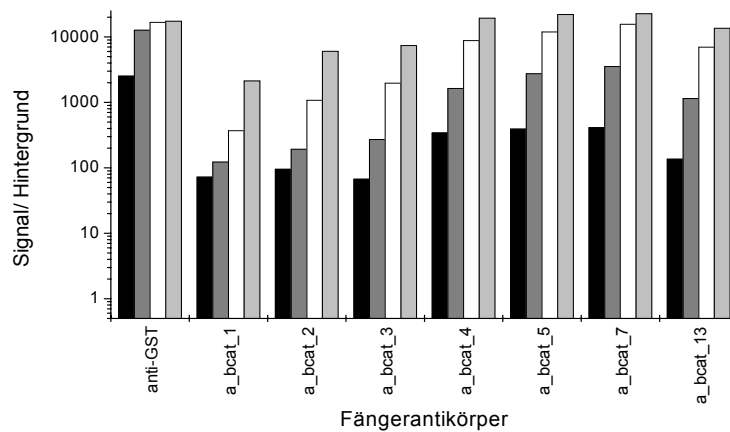
Abbildung 3.13: Western-Blot mit verschiedenen β -Catenin-Antikörpern. 20 μ g Protein aus einem Leberhomogenat wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit verschiedenen β -Catenin-Antikörpern getestet. Zusätzlich wurde zur Ladungskontrolle ein GAPDH-Antikörper mit den Blots inkubiert.



(a)

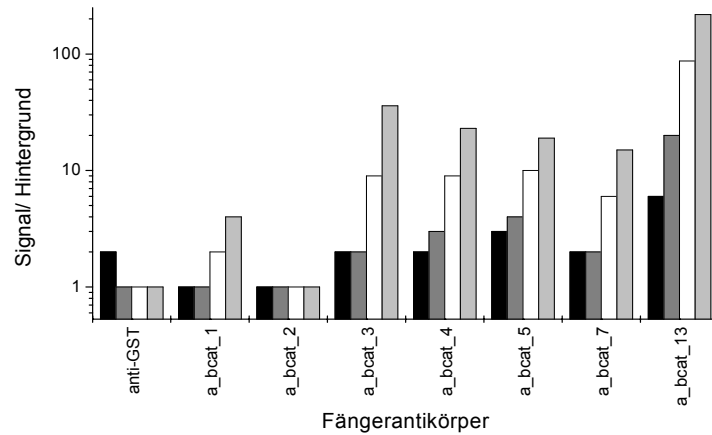


(b)

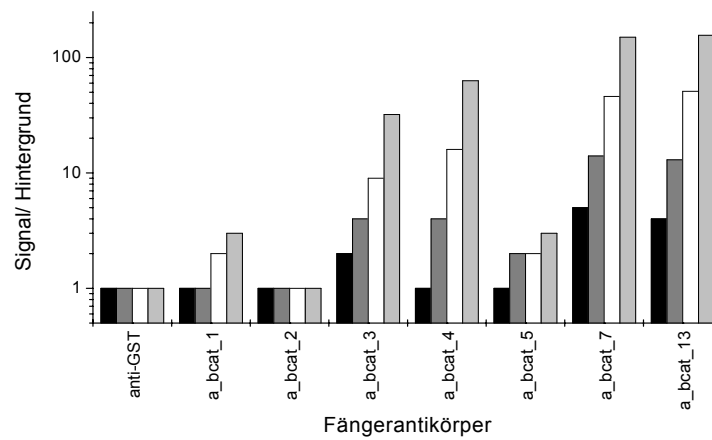


(c)

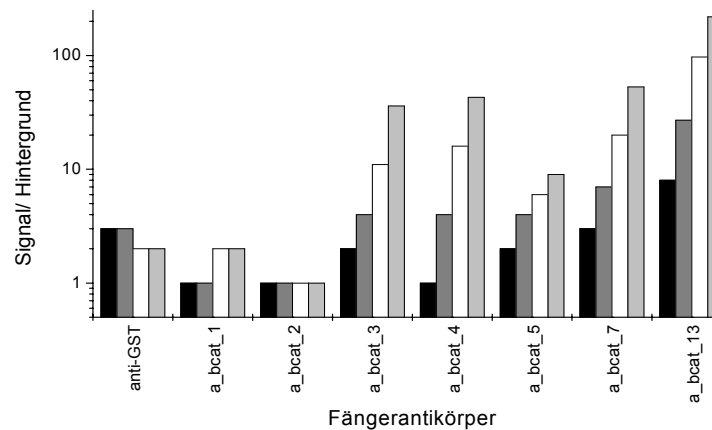
Abbildung 3.14: β -Catenin-Sandwichimmunoassays. Verschiedene Antikörper wurden auf unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Mikrosphären immobilisiert und zu einem Array kombiniert. Als Analyt wurde rekombinantes GST- β -Catenin (■ 0,2 ng, ■ 2 ng, □ 20 ng, ■ 200 ng) im Assay eingesetzt. Gefangenes β -Catenin wurde mit verschiedenen Detektionsantikörpern analysiert (a) α_{bcacat_14} ; (b) α_{bcacat_15} ; (c) α_{bcacat_17} . In den Diagrammen sind die Quotienten aus spezifischem Signal und Signal ohne Analyt gegen den Fängerantikörper aufgetragen.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.15: β -Catenin-Sandwichimmunoassays. Verschiedene Antikörper wurden auf unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Mikrosphären immobilisiert und zu einem Array kombiniert. Als Analyt wurde Zelllysat (■ 0,4 μ g, ■ 2,5 μ g, □ 10 μ g, ■ 50 μ g) der Zelllinie MH1c1 im Assay eingesetzt. Gefangenes β -Catenin wurde mit verschiedenen Detektionsantikörpern analysiert ((a), α _bcat_14; (b) α _bcat_15; (c) α _bcat_17). In den Diagrammen sind die Quotienten aus spezifischem Signal und Signal ohne Analyt gegen den Fängerantikörper aufgetragen.

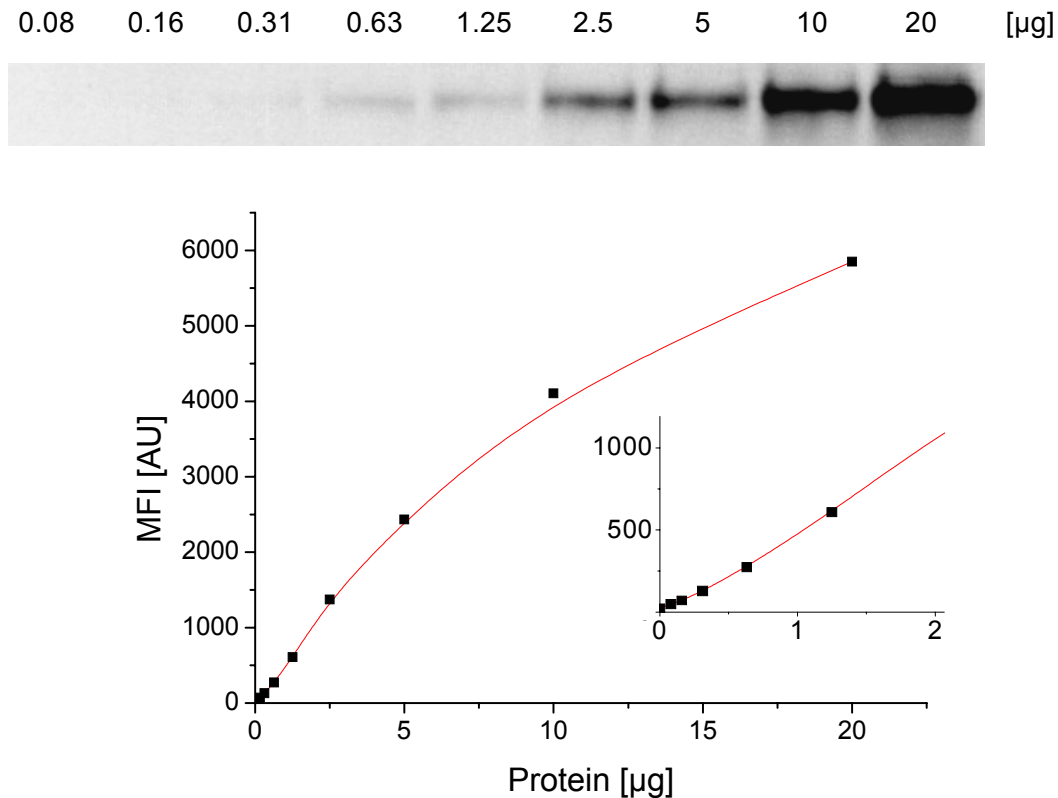


Abbildung 3.16: β -Catenin Sandwichimmunoassay und Western-Blot. In der Abbildung sind die Signale aus einem Western-Blot und einem Mikrosphären-basierten Sandwichimmunoassay für β -Catenin dargestellt. β -Catenin wurde in verschiedenen Mengen an Leberhomogenat mit Hilfe eines Western-Blots (α_{bcat_13}) und eines Sandwichimmunoassays (Fängerantikörper α_{bcat_13} / Detektionsantikörper α_{bcat_17}) analysiert. Im oberen Abschnitt ist die Lumineszenzaufnahme des Western-Blots gezeigt, während im unteren Teil die Messkurve des Sandwichimmunoassays dargestellt ist.

3.2.2 Glutaminsynthetase-Sandwichimmunoassay

Glutaminsynthetase (E.C. 6.2.1.3) wird in *Catnb*-mutierten Mauslebertumoren überexprimiert. Zur Charakterisierung dieser Mauslebertumoren wurde ein Sandwichimmunoassay für Glutaminsynthetase (GS) etabliert. Als bestes Sandwichpaar konnte α_{GS_1} als Fänger- und α_{GS_3} als Detektionsantikörper ermittelt werden. Abbildung 3.17 zeigt eine Verdünnung eines homogenisierten Tumors (114T3), die mit dem GS-Sandwichimmunoassay und einem Western-Blot analysiert wurde. Der Signalbereich zwischen 500 und 10000 MFIs ist zur Bestimmung eines relativen GS-Gehalts in homogenisiertem Gewebe geeignet.

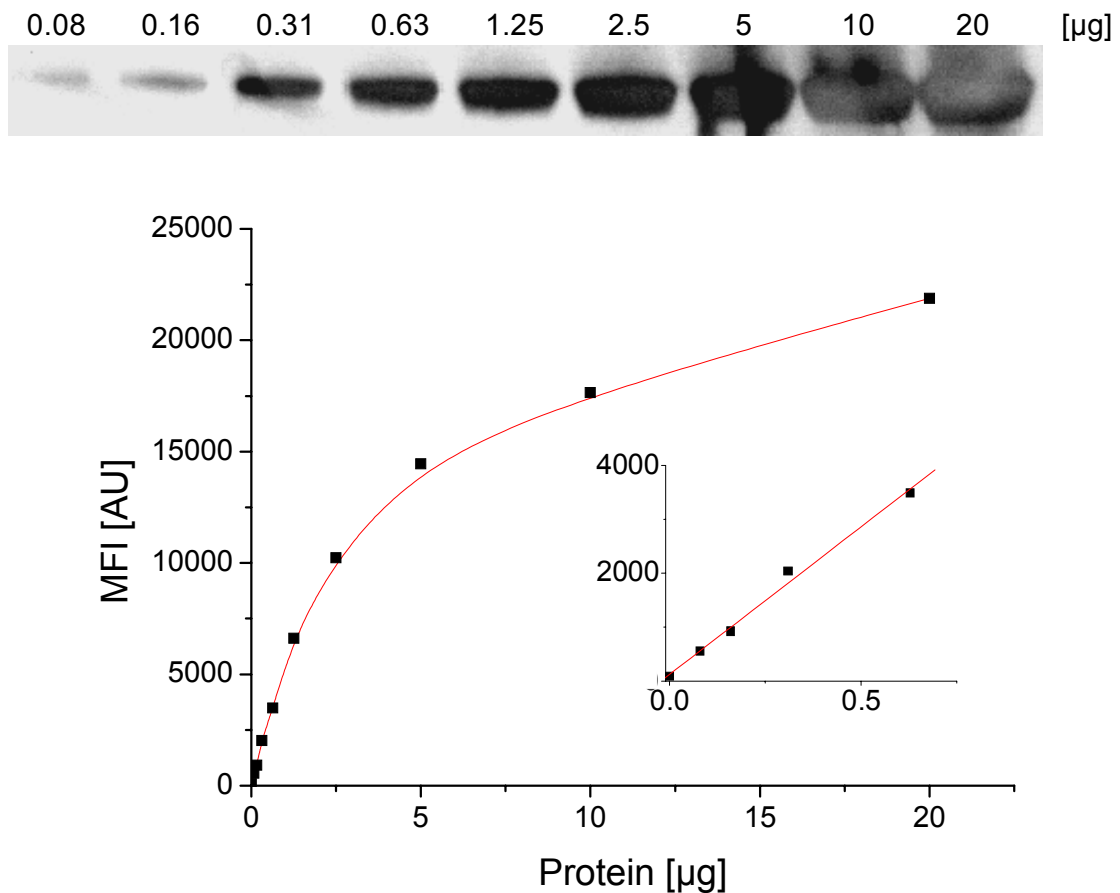


Abbildung 3.17: Glutaminsynthetase Sandwichimmunoassay und Western-Blot. In der Abbildung sind die Signale aus einem Western-Blot und einem Sandwichimmunoassay für GS dargestellt. GS wurde in verschiedenen Mengen an Mauslebertumorgewebe (114T3) mit Hilfe eines Western-Blots (α_{GS_3}) und eines Sandwichimmunoassays (Fängerantikörper α_{GS_1} / Detektionsantikörper α_{GS_3}) analysiert. Im oberen Abschnitt ist die Lumineszenzaufnahme des Western-Blots gezeigt, während im unteren Teil die Messkurve des Sandwichimmunoassays dargestellt ist.

3.2.3 Sandwichimmunoassay zur Analyse des Phosphorylierungsmusters von β -Catenin

Das Phosphorylierungsmuster von β -Catenin im Bereich des N-Terminus ist maßgeblich für die Degradation und die Stabilisierung des Proteins. In bestimmten Tumoren führt eine Mutation in einer der Phosphorylierungsstellen zu einer Hyperaktivierung des Wnt-Signalwegs. Dies wird auf eine Stabilisierung von β -Catenin und eine verminderte Degradation des Proteins zurückgeführt. Die Mutation in S33, S37, T41 oder S45 bzw. in umgebende Aminosäuren führt zu

einer verminderten Phosphorylierung. Im Folgenden sollte ein System zur Diskriminierung und Bestimmung des Phosphorylierungsmusters im N-terminalen Bereich von β -Catenin etabliert werden. Mit diesem System sollte untersucht werden, ob die nicht mutierten Aminosäuren im Protein weiterhin phosphoryliert werden bzw. ob die phosphorylierte Form des Proteins akkumuliert.

Zur Etablierung dieses Systems wurde zunächst β -Catenin als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Das PGEX-Plasmid mit der Mausequenz von β -Catenin [78] wurde freundlicherweise von R. Kemler zur Verfügung gestellt. Nach Expression des Proteins wurde dieses mit rekombinanter GSK3 β *in vitro* phosphoryliert (siehe 2.6.11). Die Bedingungen für die Phosphorylierungsreaktion wurden der Literatur entnommen [64]. Die Analyse der Phosphorylierungsreaktion mit $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$, 11, 12 und 13 (Abbildung 3.18) zeigte indirekt eine Phosphorylierung von T41 durch GSK3 β , da ein phosphospezifisches Signal nur im Experiment mit $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ und 11 erhalten werden konnte. $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ ist zwar spezifisch für S33, S37 und T41, eine Phosphorylierung in S33 und S37 ist aber nur zu vermuten, da der Antikörper auch nur bei einer Phosphorylierung von T41 alleine bindet (Abbildung 3.9c). Die Ergebnisse bestätigen zumindest, dass T41 von GSK3 β phosphoryliert wird. Für S45 war eine Phosphorylierung durch GSK3 β mit der Western-Blot-Methode nicht festzustellen.



Abbildung 3.18: *In vitro* Phosphorylierung von rekombinantem GST β -Catenin (120 kDa) mit GSK3 β . GST β -Catenin wurde mit GSK3 β phosphoryliert (Spur 1: - ATP, Spur 2: + ATP). Je 100 ng des Reaktionsansatzes wurden mit einem Western-Blot analysiert. Zur Analyse wurde in (a) $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$, (b) $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$, (c) $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ und (d) $\alpha_{\text{bcat}}_{12}$ verwendet.

Zur Etablierung eines Sandwichimmunoassays für phosphoryliertes β -Catenin wurde zunächst versucht, mit einem C-Terminus-spezifischen Antikörper β -Catenin zu fangen ($\alpha_{\text{bcat}_{13}}$) und die Phosphomodifikation über den phosphospezifischen Antikörper zu detektieren. Die Signale, die mit Proben aus dem Phosphorylierungsexperiment für phosphoryliertes β -Catenin erhalten wurden, waren jedoch äußerst gering (Daten nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, dass ohne die anderen Komponenten des *destruction complex*, des APC, des Axin und der CK1 α die Phosphorylierung von β -Catenin nur zu einem geringen Anteil stattfindet. Es ist nicht verwunderlich, dass bei dieser Versuchsanordnung nur ein sehr niedriges Signal erhalten wurde, da wahrscheinlich ein sehr hoher Überschuss an nicht phosphoryliertem β -Catenin um die Bindungsstellen an den Antikörpern konkurriert. Daher wurde der Aufbau des Assays umgedreht und der phosphospezifische Antikörper als Fängerantikörper verwendet. Ein Hindernis bei dieser Anordnung der Antikörper war jedoch die enorm niedrige Konzentration der phosphospezifischen Antikörper und die Gegenwart eines Überschusses an BSA in der vom Hersteller gelieferten Antikörperlösung. Diese Tatsache verhinderte eine direkte chemische Kopplung an die Mikrosphären nach Standardprotokoll (siehe 2.5.2.4). Ein Esel-anti-Kaninchen-Antikörper wurde daher auf Mikrosphären immobilisiert und zur indirekten Kopplung der phosphospezifischen β -Catenin-Antikörper benutzt. In Abbildung 3.19 sind die Ergebnisse des beschriebenen Sandwichimmunoassays mit drei verschiedenen Konzentrationen der Phosphorylierungsreaktion gezeigt. Die Konzentration ist auf die Menge an β -Catenin bezogen, die anteilig aus dem Phosphorylierungsexperiment stammt. Die Experimente bestätigen die Ergebnisse der Western-Blots. Interessanterweise zeigt jedoch der Immunoassay für phosphoryliertes S45 (Abbildung 3.19 (c) und Abbildung 3.20) ebenfalls eine Phosphorylierung von β -Catenin. Dieses Signal kann nicht von unphosphoryliertem β -Catenin stammen, da kaum ein Signal im Reaktionsansatz ohne ATP zu messen ist. Daher ist davon auszugehen, dass auch S45 von GSK3 β phosphoryliert wird. Die Konzentrationen an Kinase und Substrat sind jedoch nicht physiologisch relevant, daher ist nicht darauf zu schließen, dass β -Catenin von GSK3 β an S45 *in vivo* phosphoryliert wird.

ERGEBNISSE

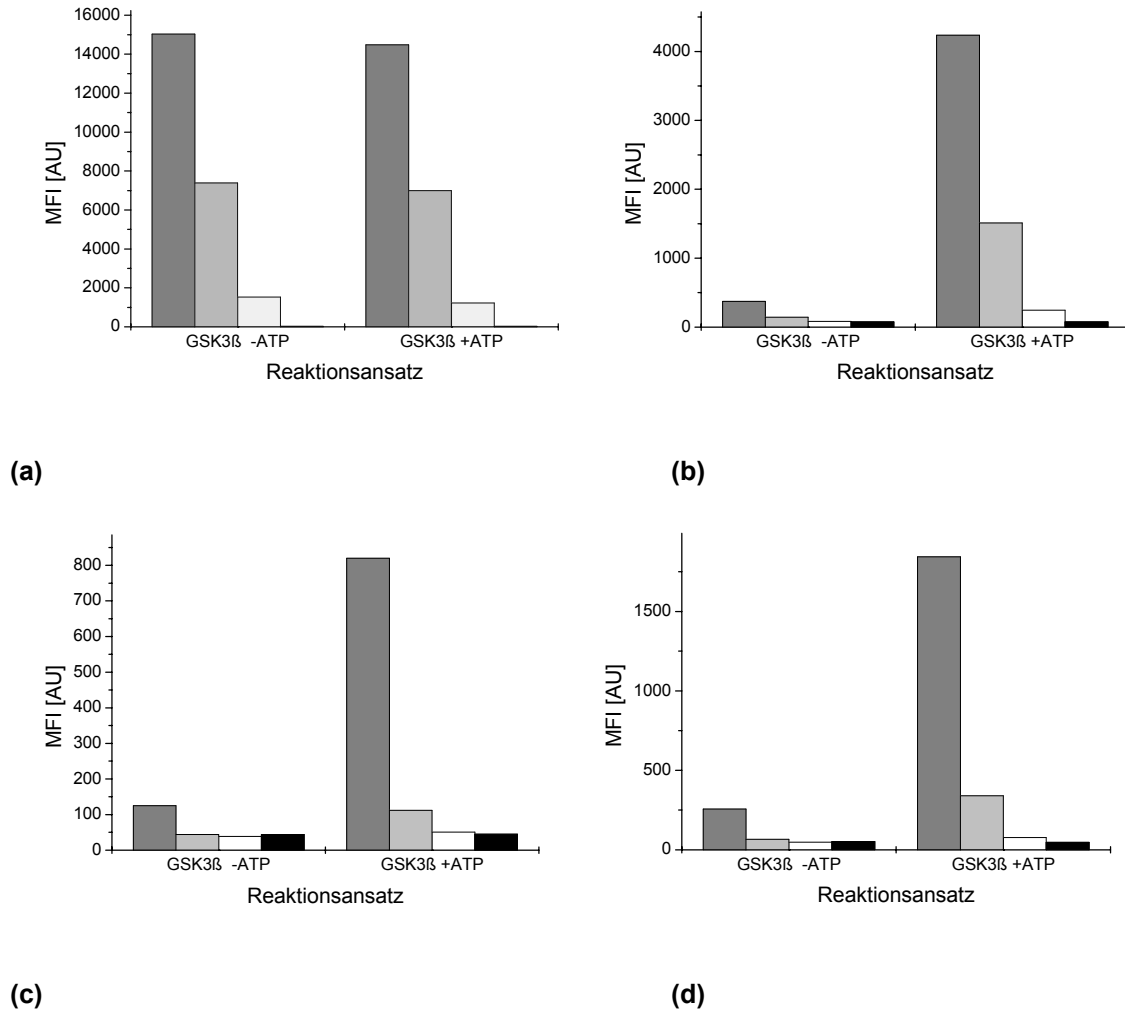


Abbildung 3.19: Nachweis von phosphoryliertem GST-β-Catenin. GST-β-Catenin wurde mit GSK3β phosphoryliert und mit verschiedenen Sandwichimmunoassays analysiert. In den Diagrammen sind die Fluoreszenzsignale gegen zwei verschiedene Phosphorylierungsreaktionen (ohne und mit ATP) aufgetragen. Zur Analyse wurden drei Verdünnungen der Enzymreaktion verwendet (■ 100 ng, ▒ 10 ng, □ 1 ng, ■ Hintergrund). In (a) sind die Ergebnisse der Messung für gesamtes β-Catenin (Fängerantikörper α_bcat_13/ Detektionsantikörper α_bcat_17) dargestellt. Für die Sandwichimmunoassays zur Bestimmung an phosphoryliertem β-Catenin wurden die phosphospezifischen β-Catenin-Antikörper (b) α_bcat_10 (S33/ S37/ T41-Phospho-β-Catenin), (c) α_bcat_11 (T41/ S45-Phospho-β-Catenin) und (d) α_bcat_12 (S45-Phospho-β-Catenin) indirekt über Esel-anti-Kaninchen-Mikrosphären immobilisiert und zum Fangen von β-Catenin verwendet. Zur Detektion des gefangenen phosphorylierten β-Catenins wurde α_bcat_13 eingesetzt und mit PE-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG nachgewiesen.

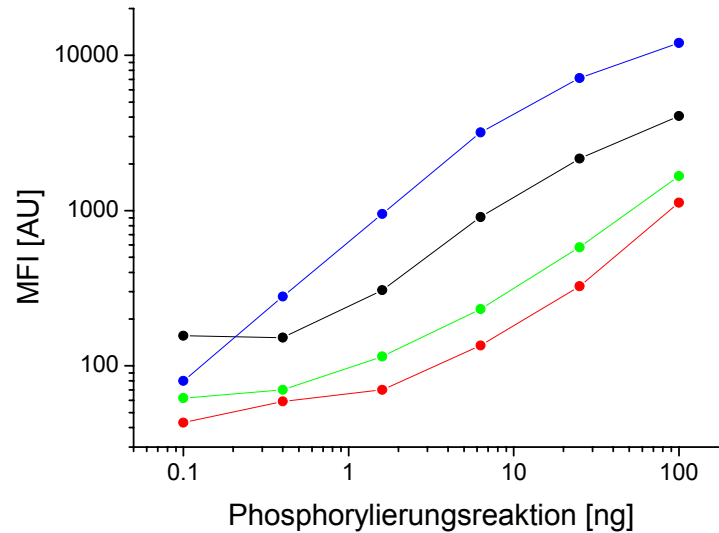


Abbildung 3.20: Analyse der β -Catenin-Phosphorylierung durch GSK3 β . Verschiedene Mengen der *in vitro*-Phosphorylierungsreaktion wurden mit Sandwichimmunoassays für (-●-)S33/ S37/ T41-Phospho- β -Catenin, (-●-)S45-Phospho- β -Catenin, (-●-)T41/ S45-Phospho- β -Catenin und (-●-) Gesamt- β -Catenin analysiert. In einem doppelt logarithmischen Diagramm wurden die Fluoreszenzsignale gegen den eingesetzten Anteil an GST- β -Catenin in der Phosphorylierungsreaktion aufgetragen. Die phosphospezifischen β -Catenin-Antikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$, $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ und $\alpha_{\text{bcat}}_{12}$ wurden indirekt über Esel-anti-Kaninchen-IgG Mikrosphären immobilisiert und zum Fangen von β -Catenin verwendet. Zur Detektion des phosphorylierten β -Catenin wurde $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ eingesetzt und mit PE-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG nachgewiesen. Der Nachweis von Gesamt- β -Catenin wurde mit der Kombination Fängerantikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ / Detektionsantikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{17}$ durchgeführt.

Um hinsichtlich phospho- β -Catenin eine positive biologische Probe zu generieren, wurden HeLa-Zellkulturen mit dem Serin/ Threonin-Phosphataseinhibitor Calyculin A behandelt. Eine Calyculin A-Behandlung führt in bestimmten Zellkulturen zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten und einer Hyperphosphorylierung von β -Catenin [90]. In Gegenwart dieses Inhibitors wurden HeLa-Zellen 15 und 30 min kultiviert. Nach 15 min begannen die Zellen den Zell-Zell-Kontakt aufzulösen und nach 30 min hatten sich alle Zellen abgelöst. Nach Zentrifugation und Lyse der Zellen wurden die verschiedenen phosphospezifischen Antikörper im Western-Blot und in Sandwichimmunoassays zur Analyse von phosphoryliertem β -Catenin eingesetzt. In Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse der Western-Blot- und der Sandwichimmunoassayanalyse dargestellt. Mit beiden Methoden ist ein deutlicher Anstieg an phosphoryliertem β -Catenin zu erkennen.

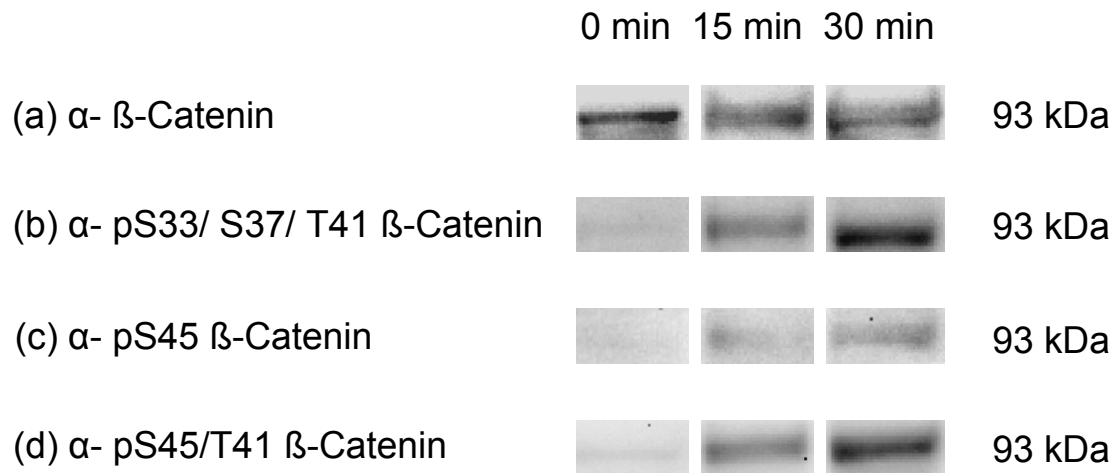


Abbildung 3.21: Nachweis von phosphoryliertem β -Catenin in Calyculin A-behandelter HeLa-Zellkultur. Drei HeLa-Kulturen wurden mit 50 nM Calyculin A 0, 15 und 30 min inkubiert. Nach Lyse der Kulturen wurden 30 μ g Protein über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Zur Analyse wurde in (a) α _bcat_13, (b) α _bcat_10, (c) α _bcat_11 und (d) α _bcat_12 verwendet.

Damit wurden mit den etablierten Sandwichimmunoassays sowohl *in vitro*-phosphoryliertes β -Catenin als auch phosphoryliertes β -Catenin in behandelten Zellkulturen nachgewiesen.

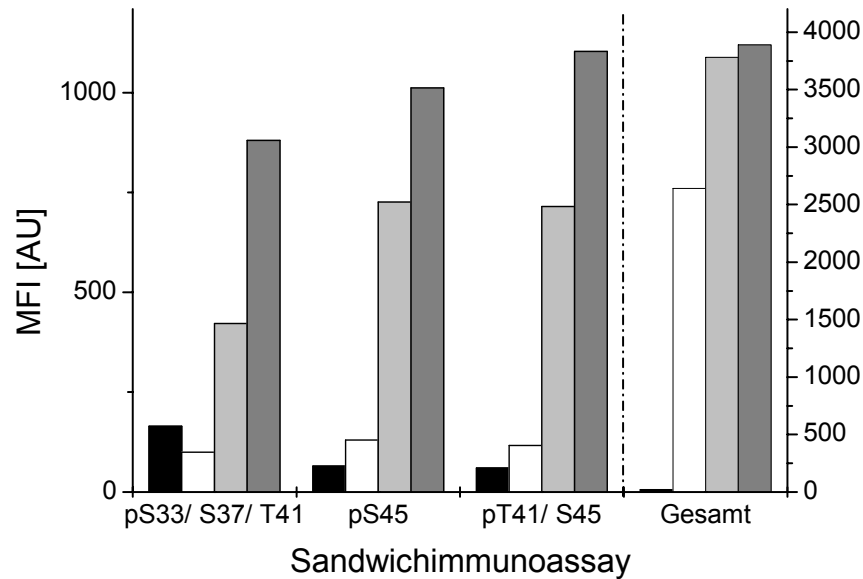


Abbildung 3.22: Sandwichimmunoassays zur Analyse von phosphoryliertem β -Catenin in Calyculin A-behandelter HeLa-Zellkultur. Eine HeLa-Zellkultur wurde mit 50 nM Calyculin A über 0 min, 15 min und 30 min behandelt. Nach der Lyse wurden mit 30 μ g Protein Gesamt- β -Catenin, S33/ S37/ T41-Phospho- β -Catenin, S45-Phospho- β -Catenin und T41/ S45-Phospho- β -Catenin analysiert. Die Fluoreszenzsignale von Hintergrund, 0 min, 15 min und 30 min wurden gegen den entsprechenden Assay im Diagramm aufgetragen. Die Ergebnisse für in S33/ S37/ T41, S45 und T41/ S45 phosphoryliertem β -Catenin sind im Diagramm auf die linke Y-Achse bezogen und die für Gesamt- β -Catenin (durch gestrichelte Linie abgetrennt) auf die rechte. Die phosphospezifischen β -Catenin-Antikörper α_{bcat_10} , α_{bcat_11} und α_{bcat_12} wurden indirekt über Esel-anti-Kaninchen-Mikrosphären immobilisiert und zum Fangen von β -Catenin verwendet. Zur Detektion des phosphorylierten β -Catenin wurde α_{bcat_13} eingesetzt und mit PE-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG nachgewiesen. Der Nachweis von Gesamt- β -Catenin wurde mit der Kombination von Fängerantikörper α_{bcat_13} / Detektionsantikörper α_{bcat_17} durchgeführt.

3.2.4 Etablierung einer Mikrosphären-basierten Ko-Immunitprzipitation zur Bestimmung von membranstndigem β -Catenin

Die Ko-Immunitprzipitation eignet sich hervorragend zur Untersuchung von Proteininteraktionen. Proteinkomplexe werden von auf Agarose immobilisierten Antikrpern gefangen und anschlieend mit Hilfe der Western-Blot-Methode analysiert. Auf diese Weise knnen sowohl Interaktionen von rekombinanten Proteinen nachgestellt als auch Interaktionen von Proteinen in komplexen Proben nachgewiesen werden.

Um den Membrananteil von β -Catenin in Mauslebertumoren zu bestimmen, sollten Ko-Immunitprzipitation mit N- und E-Cadherin durchgefuhrt werden. Fr eine klassische Ko-Immunitprzipitation werden im allgemeinen 500 μ g Protein aus Gewebehomogenaten eingesetzt [91]. Da die Menge an Mauslebertumorgewebe limitiert war, wurden multiplexe miniaturisierte Ko-Immunitprzipitationen entwickelt. Zur Evaluierung der Antikrper wurde zunchst eine klassische Ko-Immunitprzipitation mit homogenisiertem Lebernorgewebe durchgefuhrt. In Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse von insgesamt zwlf Ko-Immunitprzipitationen fr β -Catenin (a), E-Cadherin (b) und N-Cadherin (c) gezeigt. Die Ergebnisse besttigen die Interaktionen von β -Catenin mit N- und E-Cadherin [92] und qualifizieren die Antikrper als Fngermolekule fr eine Miniaturisierung. Die zur klassischen Ko-Immunitprzipitation verwendeten Antikrper wurden zwecks Miniaturisierung auf Mikrosphren immobilisiert. Das Prinzip fr die miniaturisierte Ko-Immunitprzipitation ist in Abbildung 3.24 verglichen mit einem Sandwichimmunoassay dargestellt. Ein Fngerkntkper, spezifisch fr Protein B, bindet einen Komplex aus Protein A und Protein B (Abbildung 3.24 (b)). Der Komplex wird durch einen Antikrper, spezifisch fr Protein A, detektiert. Parallel kann Protein A auf einer anders kodierten Mikrosphre in einem Sandwichimmunoassay mit einem fr Protein A spezifischen Fnger quantifiziert werden (Abbildung 3.24 (a)). Auf diese Weise konnten drei verschiedene Multiplex-Assays zur Bestimmung von Interaktionen zwischen β -Catenin mit E- und N-Cadherin und zur Quantifizierung der einzelnen Proteine etabliert werden (siehe Abbildung 3.25, Abbildung 3.26, und Abbildung 3.27). In Abbildung 3.25 ist ein paralleler Assay mit verschiedenen Proteinmengen aus einem Homogenat von

Lebernorgewebe zur Quantifizierung von β -Catenin, des Komplexes N-Cadherin/ β -Catenin und des Komplexes E-Cadherin/ β -Catenin gezeigt. Die Ergebnisse konnten durch die inverse Anordnung der Antikörper bestätigt werden. Die Zweiflexe zur Quantifizierung von N- bzw. E-Cadherin und der Komplexe β -Catenin/ N- bzw. E-Cadherin sind in Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27 zu sehen. Ein linearer Zusammenhang zwischen den Fluoreszenzsignalen und der eingesetzten Menge ist im gemessenen Bereich festzustellen.

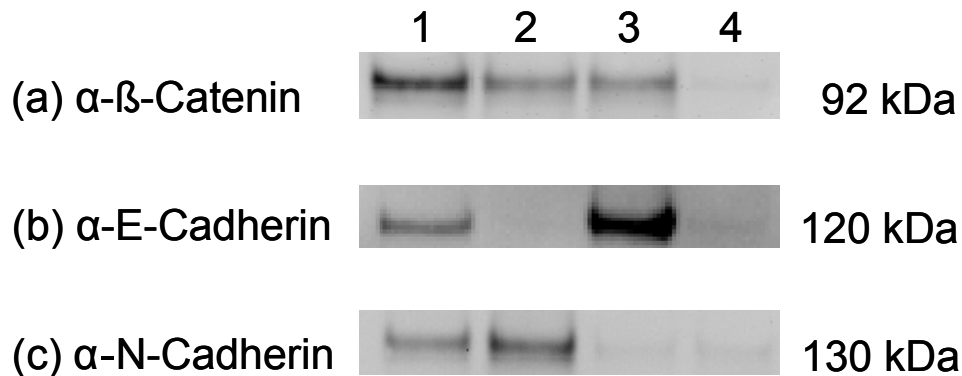


Abbildung 3.23: Western-Blot mit klassischer Ko-Immunitäzitation (a) von β -Catenin, (b) von E-Cadherin und (c) von N-Cadherin. Die Antikörper wurden zusammen mit 1 mg lysiertem Lebernorgewebe 1 h inkubiert und anschließend mit Protein G-Agarose über Nacht präzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Auf den Spuren 1, 2 und 3 sind die Präzipitate mit β -Catenin (α -bcat_13, Spur 1), mit N-Cadherin (α -Ncad_2, Spur 2) und mit E-Cadherin (α -Ecad_1, Spur 3) aufgetrennt. In Spur 4 wurde das Präzipitat ohne Fängerantikörper aufgetrennt, um unspezifische Wechselwirkungen der Protein G-Agarose auszuschließen. (a) β -Catenin wurde mit α -bcat_17 und einem HRP-konjugierten polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion wurde das Signal sichtbar gemacht. Spuren 1, 2 und 3 zeigen eine spezifische Bande bei 93 kDa. Die Interaktion von β -Catenin mit N- und E-Cadherin wurde mit der Ko-Immunitäzitation gezeigt. (b) E-Cadherin wurde mit α -E-Cad_1 und einem HRP-konjugierten polyklonalen Esel-anti-Ziege Antikörper detektiert. Mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion wurde das Signal sichtbar gemacht. Hier sind Signale in Spur 1 und 3 zu erkennen. E-Cadherin interagiert, wie schon unter (a) Spur 3 gezeigt, mit β -Catenin. In Spur 2 ist keine Bande zu erkennen, da keine Interaktion zwischen N- und E-Cadherin stattfindet. (c) N-Cadherin wurde mit α -N-Cad_2 und einem HRP-konjugierten polyklonalen Ziege-anti-Maus-Antikörper detektiert. Mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion wurde das Signal sichtbar gemacht. Hier sind Signale in Spur 1 und 2 zu erkennen. N-Cadherin interagiert also wie schon in (a) Spur 2 gezeigt mit β -Catenin. In Spur 3 ist keine Bande zu erkennen, da keine Interaktion zwischen N- und E-Cadherin stattfindet. Eine unspezifische Bindung der Protein G-Agarose ist in Spur 4 in keinem Experiment zu detektieren.

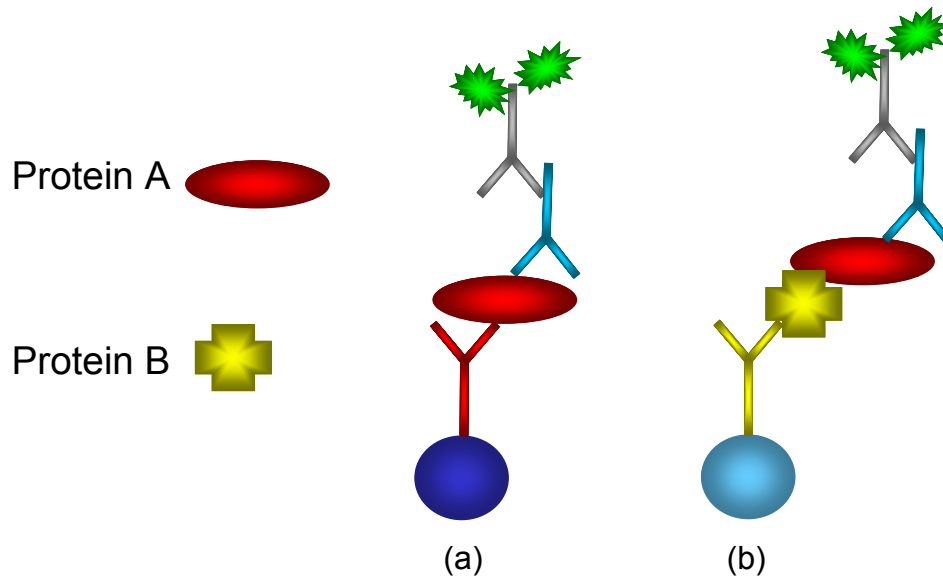


Abbildung 3.24: Schematische Darstellung eines Mikrosphären-basierten Sandwichimmunoassays (a) und einer Mikro-Ko-Immünpräzipitation (b). Es erfolgt zunächst ein Fangen mit unterschiedlichen Antikörpern, spezifisch für Protein A und Protein B. Die Detektion geschieht nur mit einem Antikörper - beispielsweise spezifisch für Protein A. Daher ist es möglich, parallel einerseits Protein A zu quantifizieren und andererseits die Interaktion von Protein B mit Protein A zu messen.

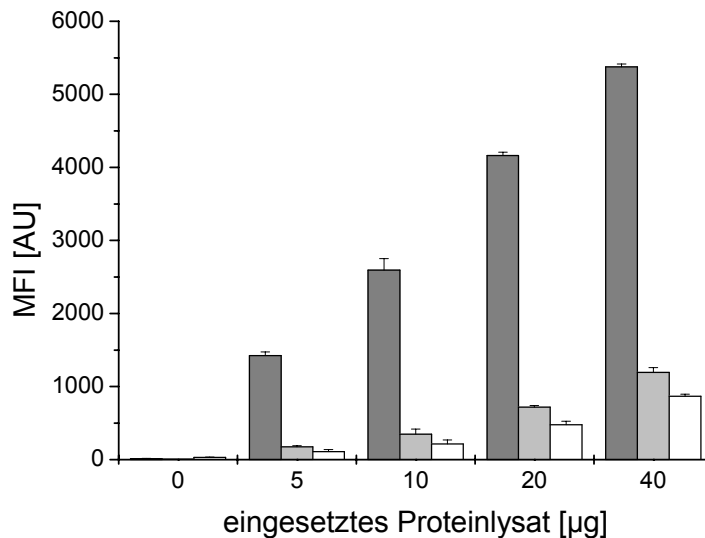


Abbildung 3.25: Mikrosphären-basierter Sandwichimmunoassay von (■) β -Catenin und Mikro-Ko-Immünpräzipitationen von β -Catenin mit (■) E- und (□) N-Cadherin (3plex-Assay). Die Antikörper α _bcat_13, α _Ecad_1 und α _Ncad_2 wurden auf unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Mikrosphären immobilisiert, miteinander gemischt und mit verschiedenen Mengen an Proteinlysatz eines Lebernorgangewebes inkubiert. Die Detektion erfolgte mit α _bcat_17. Der Detektionsantikörper wurde schließlich mit einem PE-konjugierten Esel-anti-Kaninchen-Antikörper zum Auslesen markiert. Sowohl eine Interaktion zwischen N-Cadherin und β -Catenin als auch eine Interaktion von E-Cadherin mit β -Catenin ist parallel zu einer Quantifizierung von β -Catenin messbar.

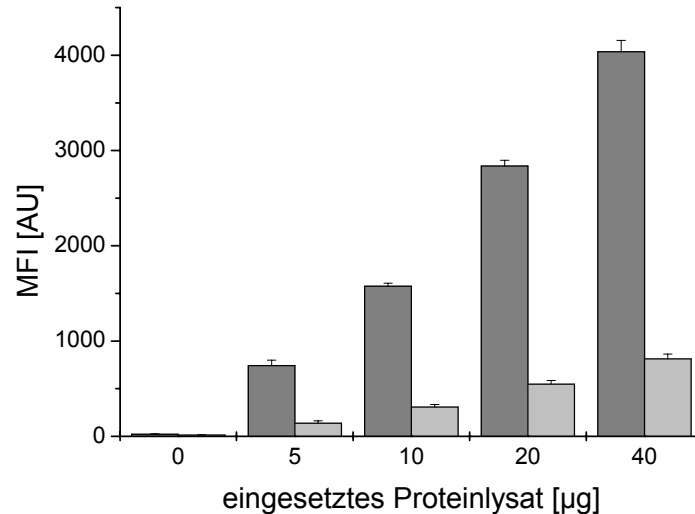


Abbildung 3.26: Mikrosphären-basierter Sandwichimmunoassay für (■) E-Cadherin und Mikro-Ko-Immünpräzipitation von E-Cadherin mit (□) β-Catenin (2plex-Assay). Die Antikörper α-bcat_13 und α_Ecad_1 wurden auf unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Mikrosphären immobilisiert, miteinander gemischt und mit verschiedenen Mengen an Proteinlysate eines Lebernorgangewebes inkubiert. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem α_Ecad_1. Der Detektionsantikörper wurde schließlich mit einem PE-konjugierten Streptavidin zum Auslesen markiert. Eine Interaktion zwischen E-Cadherin und β-Catenin ist parallel zu einer Quantifizierung von E-Cadherin zu messen.

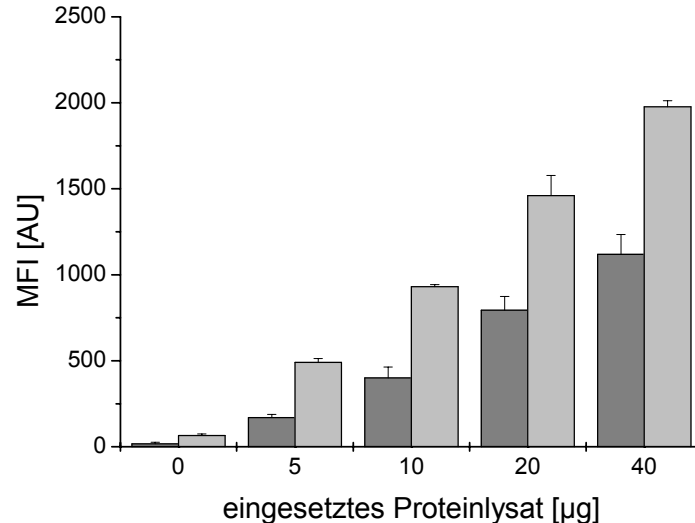


Abbildung 3.27: Mikrosphären-basierter Sandwichimmunoassay für (■) N-Cadherin und Mikro-Ko-Immünpräzipitation von N-Cadherin mit (□) β-Catenin (2plex-Assay). Die Antikörper α-bcat_13 und α_Ncad_2 wurden auf unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Mikrosphären immobilisiert, miteinander gemischt und mit verschiedenen Mengen an Proteinlysate eines Lebernorgangewebes inkubiert. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem α_Ncad_1. Der Detektionsantikörper wurde schließlich mit einem PE-konjugierten Streptavidin zum Auslesen markiert. Eine Interaktion zwischen N-Cadherin und β-Catenin ist parallel zu einer Quantifizierung von N-Cadherin zu messen.

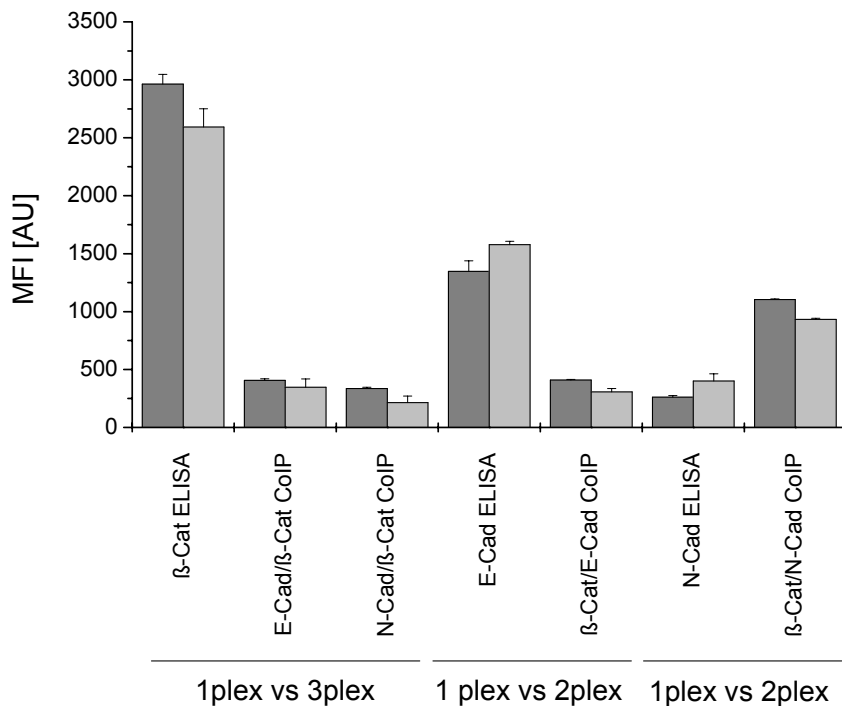


Abbildung 3.28: Gegenüberstellung von Einzel Assays gegenüber Multiplex-Assays. Die Sandwichimmunoassays bzw. Mikro-Ko-Immünpräzipitationen wurden mit 10 µg Lebernorgewebe sowohl im Einzel-Assay (■) als auch im Multiplex (□) durchgeführt. Die Signale wurden gegen den entsprechenden Assay aufgetragen. Die Ergebnisse der einzelnen Assays werden durch die Multiplex-Analyse in den hier gezeigten Beispielen nicht beeinflusst.

Ein Einfluss der Multiplizität auf die Ergebnisse der Assays ist in den hier gezeigten Assays nicht zu erkennen. In Abbildung 3.28 sind die Ergebnisse von einzeln durchgeführten Assays denen der parallel durchgeführten gegenübergestellt. Es ist keine Tendenz zu erkennen, dass einzeln durchgeführte Assays zu einem qualitativ besseren Ergebnis führen.

Die eigentliche Information, die mit den miniaturisierten KoIPs gewonnen werden sollte, war die Bestimmung des an der Membran lokalisierten β-Catenins. Daher wurde die Kultur einer Maushepatomzelllinie (55.1c) durch hypotone Lyse und Ultrazentrifugation (siehe 2.6.5) in eine Cytosol- und eine Membran-/Kernfraktion aufgetrennt. Die Mauszelllinie 55.1c ist im *Catnb*-Gen heterozygot mutiert [77]. Dem Protein fehlen 118 AS aufgrund einer Mutation zu einem Stopcodon innerhalb von Exon 3. Die Fraktionen wurden mit einer Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.23) für das Kernprotein Histon H3 (c), dem Membranprotein

E-Cadherin (a) und β -Catenin (b) kontrolliert. Der Western-Blot für β -Catenin (Abbildung 3.29 (b)) zeigt zwei Banden: Eine für das Wildtyp- β -Catenin (93 kDa) und eine für mutiertes β -Catenin mit deletiertem N-Terminus. E-Cadherin und Histon H3 sind im Cytosol nicht zu detektieren. Beide β -Catenin-Formen, Wt und Δ N-Terminus, sind im Cytosol allerdings zu detektieren. Die Analyse der Fraktionen mit Sandwichimmunoassays für β -Catenin und E-Cadherin (Abbildung 3.30 (a) und (b)) bzw. mit Ko-IP für E-Cadherin mit β -Catenin und umgekehrt (Abbildung 3.30 (c) und (d)) ergeben identische Ergebnisse. Es ist lediglich für E-Cadherin mit dem Sandwichimmunoassay ein geringes Signal im Cytosol zu detektieren (Abbildung 3.30 (b)). Es ist jedoch festzuhalten, dass kein E-Cadherin/ β -Catenin-Komplex im Cytosol zu detektieren ist (Abbildung 3.30 (c) und (d)).

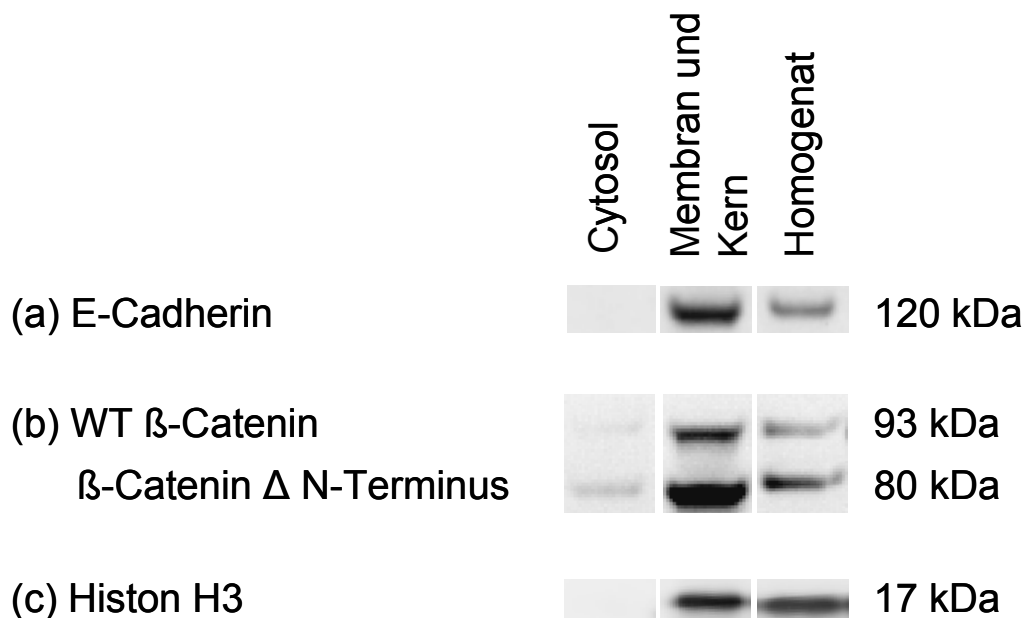


Abbildung 3.29: Western-Blots von Zellfraktionen. Eine 55.1c-Kultur wurde hypotonisch lysiert und homogenisiert. Membranen und Kerne wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert. 5 μ g der Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blots wurden mit (a) α_{ecad_1} , (b) α_{bcat_13} und (c) α_{HistonH3} analysiert.

ERGEBNISSE

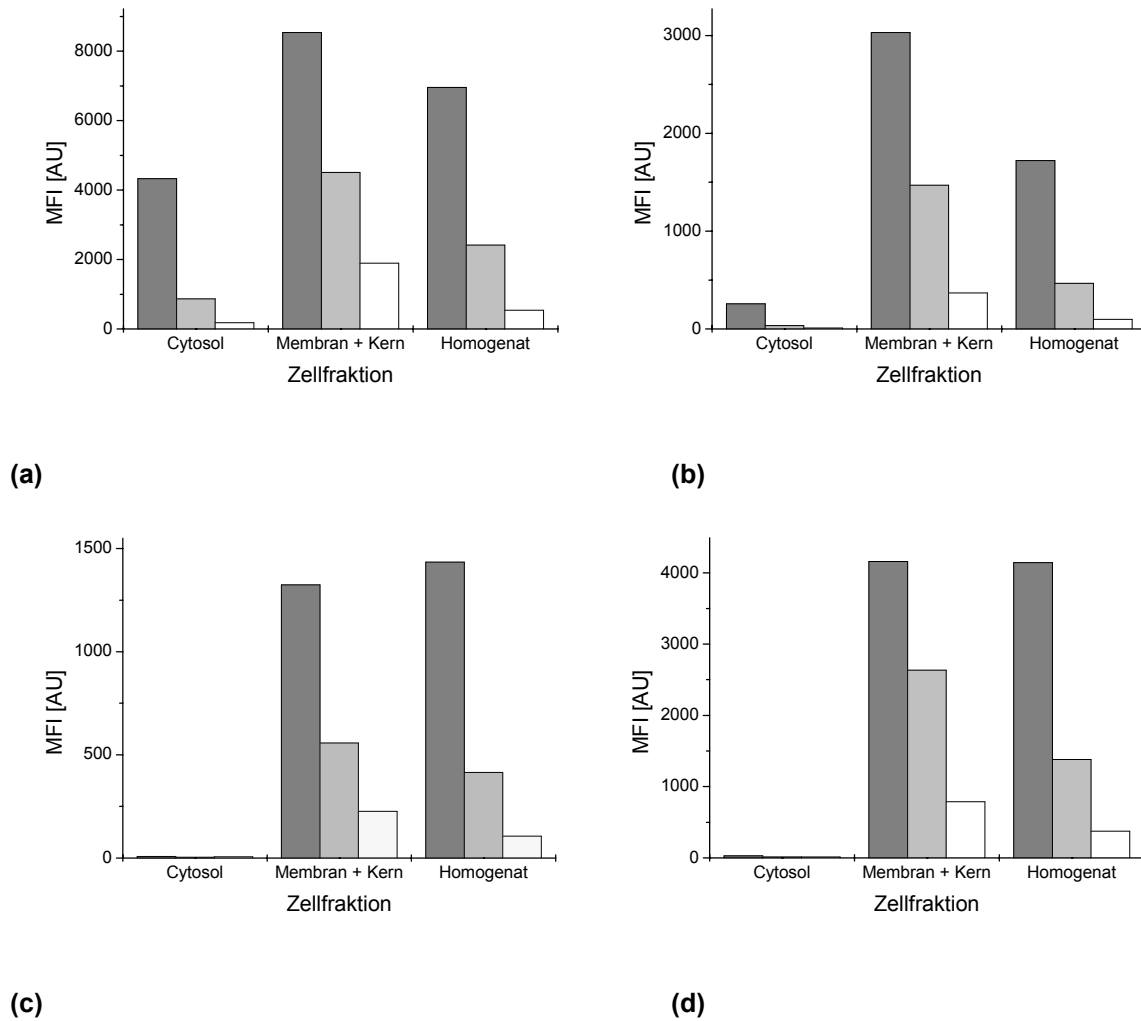


Abbildung 3.30: Sandwichimmunoassays und miniaturisierte KoIPs mit Zellfraktionen. Eine 55.1c-Kultur wurde hypotonisch lysiert und homogenisiert. Membranen und Kerne wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert. 10 µg (■), 1 µg (▒) und 0,1 µg (□) Proteinmenge der einzelnen Fraktionen wurden mit Sandwichimmunoassays für (a) β-Catenin (Fängerantikörper α_bcat_13/ Detektionsantikörper α_bcat_17) und (b) E-Cadherin (Fängerantikörper α_ecad_1/ Detektionsantikörper biotinylierter α_ecad_1) vermessen. Die Fluoreszenzsignale wurden gegen die Zellfraktion aufgetragen. In (c) und (d) sind die Ergebnisse der KoIPs von E-Cadherin mit (β-Catenin Fängerantikörper α_bcat_13/ Detektionsantikörper biotinylierter α_ecad_1) und von β-Catenin mit E-Cadherin (Fängerantikörper α_ecad_1/ Detektionsantikörper α_bcat_17) dargestellt.

3.3 Untersuchung von β -Catenin in *Catnb*-mutierten hepatozellulären Maustumoren

Die Promotion von DEN-induzierten Hepatomen mit Phenobarbital (PB) führt im Mausmodell zum Auftreten von *Catnb*-mutierten Tumoren [58]. Interessanterweise geht eine Überexpression von Glutaminsynthetase mit dieser Beobachtung einher [62, 63]. Zur Untersuchung von DEN-induzierten und PB-promovierten Tumoren wurden insgesamt 25 verschiedene Lebergewebe homogenisiert und analysiert. Unter diesen Geweben befanden sich 19 Tumore: 16 Tumore, die in *Catnb* und 3 Tumore, die weder im Ha-ras Gen noch im β -Catenin Gen mutiert waren [58]. Alle 19 Tumore entstammen einem Tierexperiment von O. Moennikes [69] und alle Normalgewebe einem Tierexperiment von S. Stahl [70]. Im Alter von 6 Wochen wurden Versuchsmäuse (C3H/He) mit einer Einmalinjektion des Karzinogens DEN behandelt. Nach einem behandlungsfreien Intervall von 3 Wochen wurden die Tiere 39 Wochen lang mit oder ohne Phenobarbitalzusatz ernährt. Die Phenobarbital-Behandlung führte in 80% aller Fälle zu Tumoren mit einer Mutation in *Catnb*. Als Kontrollgruppe wurden 6 Lebernorgewebe von ausgewachsenen CH3/He-Mäusen [70] verwendet. Mit proteinbiochemischen Methoden und Immunoassays wurde die Phosphorylierung von β -Catenin und die Komplexbildung mit E- bzw. N-Cadherin untersucht.

Zur Auswertung wurden die Messwerte der Sandwichimmunoassays einer Konzentration (20 μ g Protein der Gewebehomogenate) in einem *Box and Whiskers plot* aufgetragen [93] (siehe Abbildung 3.31), dabei wurden die Messwerte in drei Gruppen eingeteilt: Normalgewebe (n=6), *Catnb* Tumor (n=16) und sonstiger Tumor (n=3) (keine Mutation im *Catnb* und *H-Ras* Gen). Zur statistischen Bewertung hinsichtlich der Signifikanz wurden t-Tests mit den Gruppen untereinander durchgeführt. Da multiple t-Tests durchgeführt wurden, wurden die P-Werte nach dem Bonferroni-Verfahren adjustiert [93]. Die Ergebnisse der t-Tests sind unter den *Box and Whisker plots* in Tabellen zusammengefasst. Ein repräsentativer Western-Blot wurde exemplarisch über dem *plot* gezeigt.

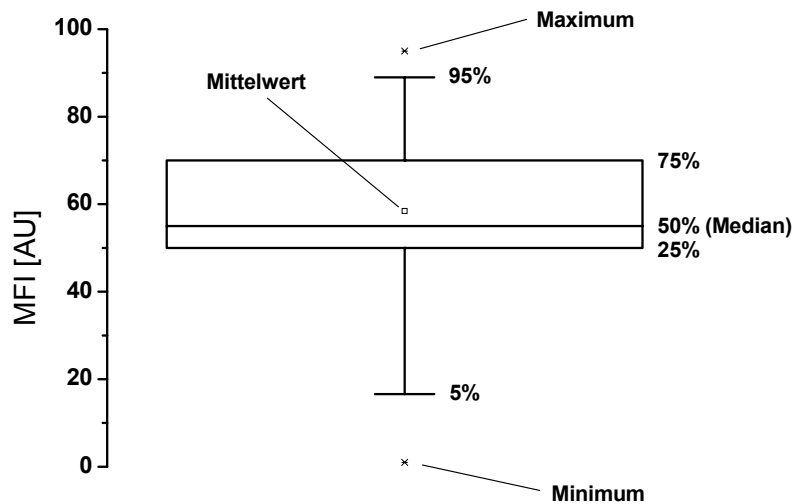
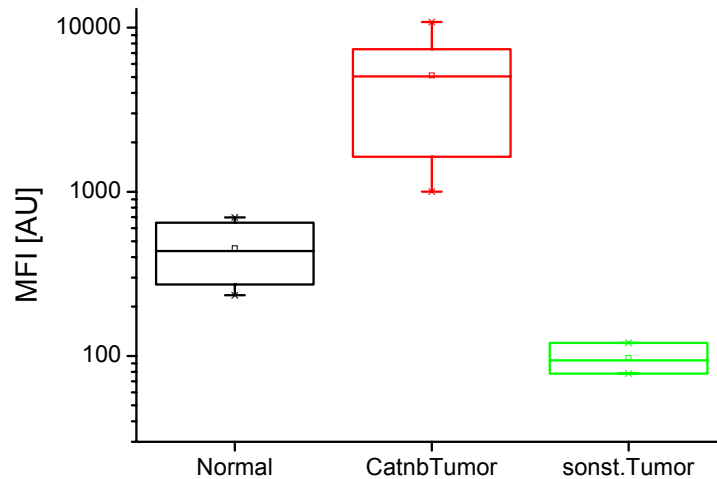
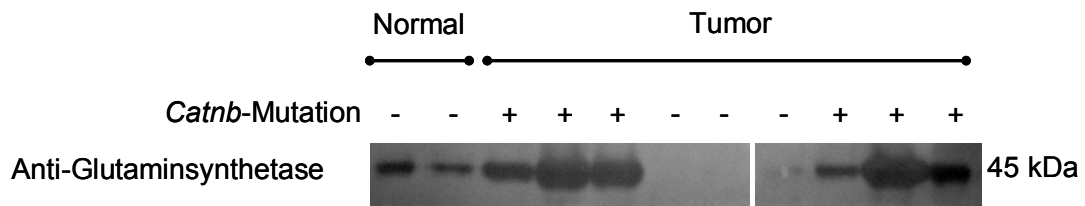


Abbildung 3.31: Box and Whiskers Plot. Im Diagramm sind die einzelnen Komponenten eines *Box and Whiskers Plot* erklärt. Die *Box* umfasst 50% aller Messwerte. Die Enden der senkrechten Balken (*Whiskers*) schließen 90% aller Messwerte ein. Die Kreuze unterhalb und oberhalb der Balken markieren die Extremwerte der Messung. Der Mittelwert ist durch ein kleines Quadrat in der *Box* dargestellt. Der Median ist innerhalb der *Box* mit einer durchgehenden Linie dargestellt.

3.3.1 Glutaminsynthetase

Das Enzym Glutaminsynthetase (E.C. 6.2.1.3) kann als Markerenzym zur Charakterisierung von hepatozellulären Maus-Tumoren herangezogen werden. Eine statistische Auswertung der Experimente ergab eine sehr hohe Signifikanz (P-Wert <0.00005) für die Korrelation zwischen einer β -Catenin-Mutation und einer erhöhten Glutaminsynthetase-Expression. Die Analyse der sonstigen Tumore ergab weder im Sandwichimmunoassay noch im Western-Blot ein Signal über dem Hintergrund. Es ist daher davon auszugehen, dass in diesen Tumoren keine GS exprimiert wird.



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	453	5113	97
Stabwn	173	3167	17
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,00005
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<0,006
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0.00002

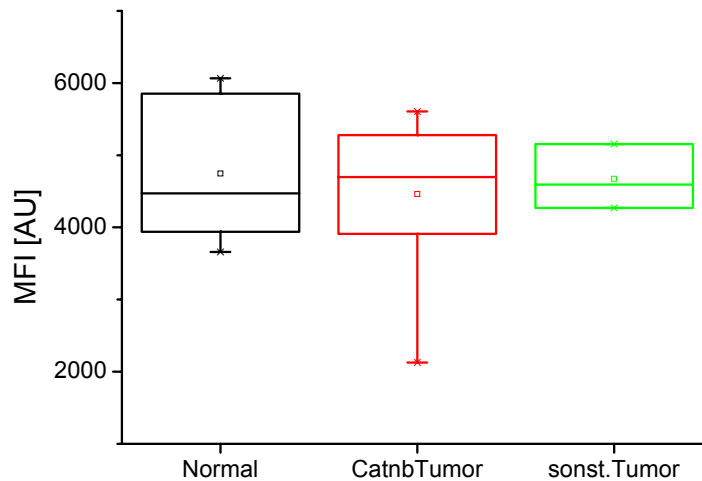
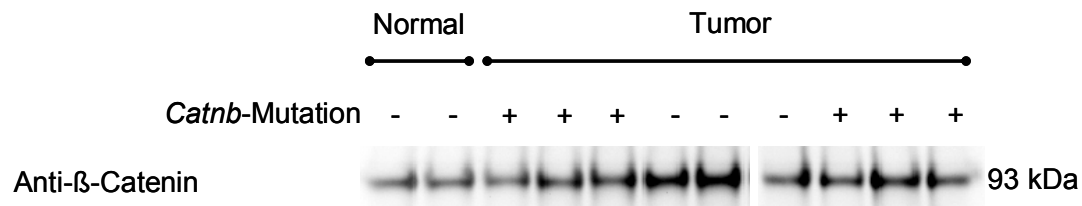
Abbildung 3.32: Analyse von Glutaminsynthetase in Mauslebertumoren. Im oberen Teil der Abbildung ist repräsentativ ein Western-Blot gezeigt. Der Mutationsstatus von β -Catenin in der Probe ist durch ein „+“ für „mutiert“ und ein „-“ für „nicht mutiert“ gekennzeichnet. Unterhalb des Western-Blots ist ein *box and whiskers plot* mit den Medianen der gemessenen Fluoreszenzeinheiten für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.

3.3.2 β -Catenin

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der β -Catenin-Konzentration zwischen in *Catnb*-mutierten Tumoren und Mauslebernorgangewebe mit Hilfe des etablierten Sandwichimmunoassays feststellen. Damit wurden die Western-Blot-

ERGEBNISSE

Ergebnisse der Arbeitsgruppe Schwarz bestätigt [58], dass in den β -Catenin-mutierten Tumoren keine erhöhte Gesamtmenge an β -Catenin zu finden ist.



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	4747	4503	4813
Stabwn	887	836	835
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,7
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<1
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,7

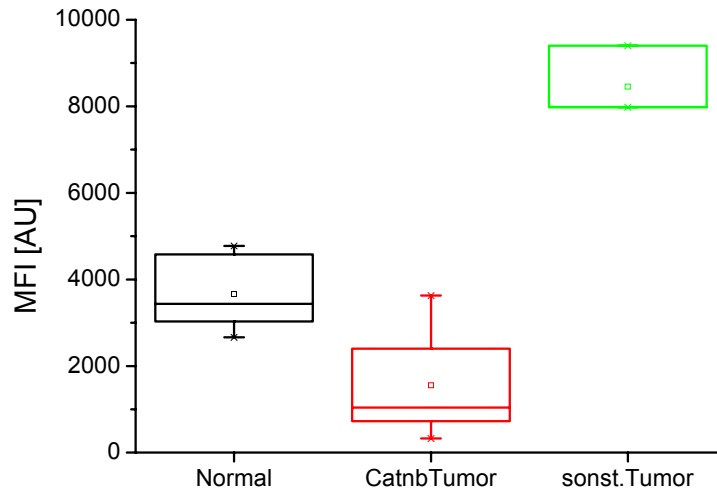
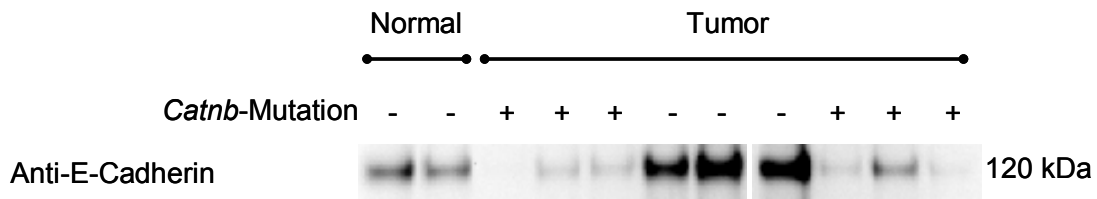
Abbildung 3.33: Analyse von β -Catenin in Mauslebertumoren. Im oberen Teil der Abbildung ist repräsentativ ein Western-Blot gezeigt. Der Mutationsstatus von β -Catenin in der Probe ist durch ein „+“ für „mutiert“ und ein „-“ für „nicht mutiert“ gekennzeichnet. Unterhalb des Western-Blots ist ein *box and whiskers plot* mit den Medianen der gemessenen Fluoreszenzeinheiten für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.

3.3.3 Analyse von N- und E-Cadherin

N- und E-Cadherin sind Bindepartner von β -Catenin an der Zellmembran von Leberzellen und wurden daher als weitere Analyten ausgewählt [94]. Verhältnisse von β -Catenin zu N- und E-Cadherin könnten darüber Aufschluss geben, ob in den schon erwähnten *Catnb*-Tumoren β -Catenin erhöht im Cytosol zur Verfügung steht.

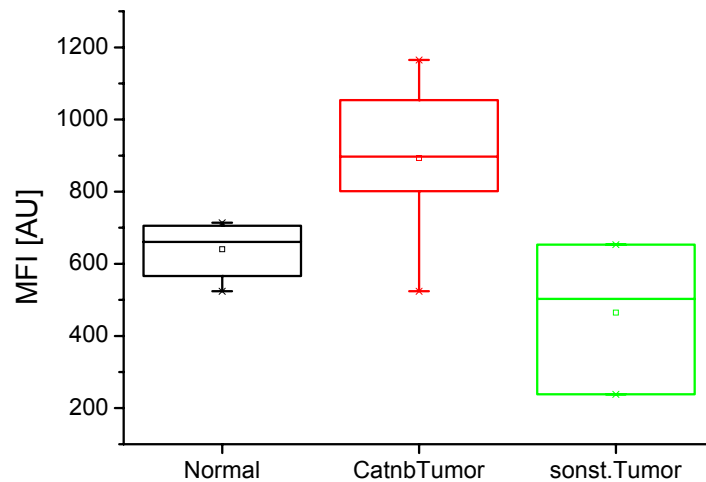
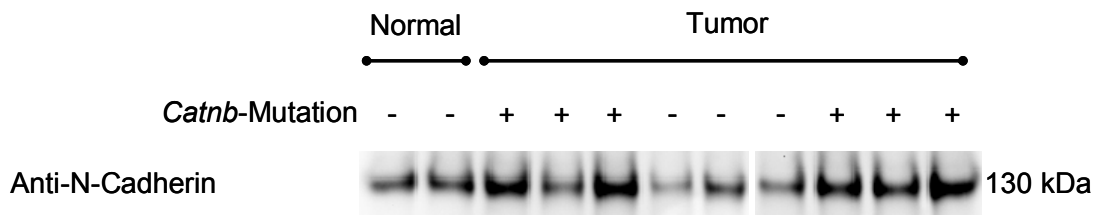
Die Analyse von E-Cadherin ergab für *Catnb*-Tumore signifikant ($P < 0,0004$) eine erniedrigte Expression (ca. Faktor 0,125) des Proteins. Im Falle von N-Cadherin war eine Hochregulation im Vergleich von Normalgewebe mit *Catnb*-Tumoren festzustellen (ca. Faktor 2). Die Western-Blot-Ergebnisse bestätigten die Messwerte des Sandwichimmunoassays. Die Ergebnisse des N-Cadherin-Sandwichimmunoassays für die drei nicht klassifizierten Tumore weisen auf einen erniedrigten relativen Gehalt gegenüber dem Normalgewebe hin. Im Falle von E-Cadherin ist eine starke Hochregulation im Vergleich zum Normalgewebe festzustellen.

ERGEBNISSE



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	3663	1552	8454
Stabwn	751	1041	668
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,0004
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<0,002
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,0006

Abbildung 3.34: Analyse von E-Cadherin in Mauslebertumoren. Im oberen Teil der Abbildung ist repräsentativ ein Western-Blot gezeigt. Der Mutationsstatus von β -Catenin in der Probe ist durch ein „+“ für „mutiert“ und ein „-“ für „nicht mutiert“ gekennzeichnet. Unterhalb des Western-Blots ist ein *box and whiskers plot* mit den Medianen der gemessenen Fluoreszenzeinheiten für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	640	893	464
Stabwn	69	178	172

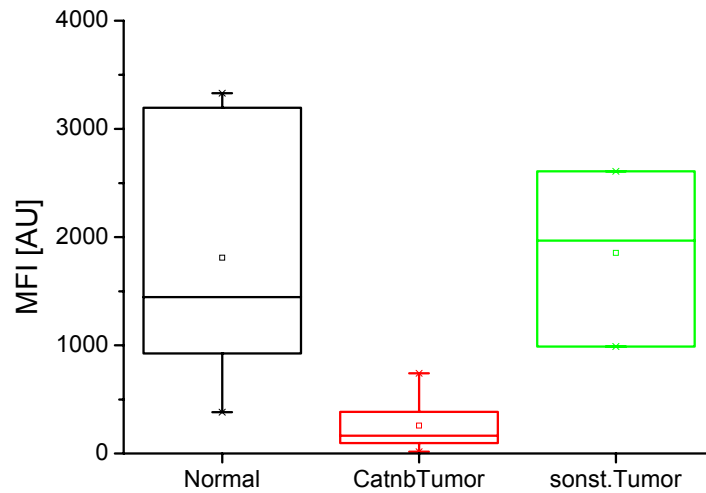
t-Test	P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor	<0,0002
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor	<0,3
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor	<0,06

Abbildung 3.35: Analyse von N-Cadherin in Mauslebertumoren. Im oberen Teil der Abbildung ist repräsentativ ein Western-Blot gezeigt. Der Mutationsstatus von β -Catenin in der Probe ist durch ein „+“ für „mutiert“ und ein „-“ für „nicht mutiert“ gekennzeichnet. Unterhalb des Western-Blots ist ein *box and whiskers plot* mit den Medianen der gemessenen Fluoreszenzeinheiten für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.

3.3.4 Ko-Immünpräzipitation von β -Catenin mit E-Cadherin bzw. E-Cadherin mit β -Catenin

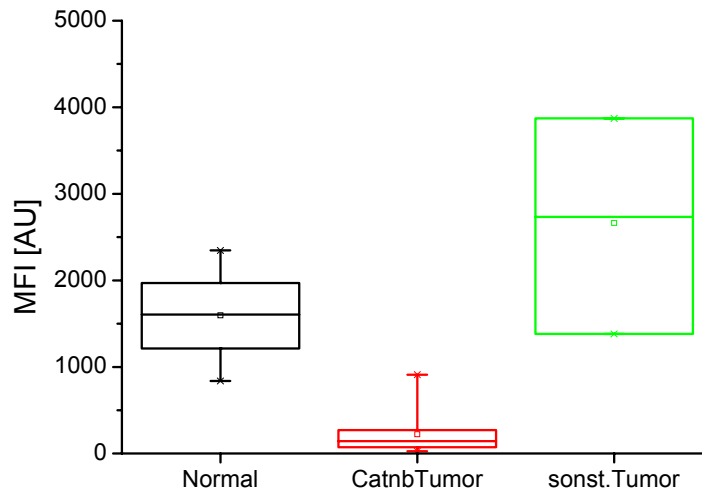
Die Messung des β -Catenin/ E-Cadherin-Komplexes sollte Aufschluss darüber geben, ob cytosolisch mehr β -Catenin zur Verfügung steht. Konventionelle Ko-Immünpräzipitationen wurden aufgrund der geringen Menge an Probenmaterial nicht durchgeführt.

Die in 3.3.4 beschriebenen miniaturisierten Ko-Immünpräzipitationen wurden für die Messung des β -Catenin/ E-Cadherin Komplexes verwendet. Bei der Verwendung von $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ als Fängerantikörper und $\text{biot}_{\alpha_{\text{Ecad}}_1}$ als Detektionsantikörper streuen die Ergebnisse für die Normalgewebe (n=6) sehr stark im Vergleich zu den *Catnb*-Tumoren. Als Ergebnis wäre festzuhalten, dass sich die *Catnb*-Tumore statistisch von den Normalgeweben abgrenzen lassen ($P < 0,02$). Der Mittelwert der Ergebnisse für die *Catnb*-Tumore liegt deutlich niedriger als der für Normalgewebe. Bei umgedrehter Versuchsanordnung zur Messung des Komplexes, d.h. α_{Ecad}_1 als Fängerantikörper und $\alpha_{\text{bcat}}_{17}$ als Detektionsantikörper, ergab die statistische Auswertung eine bessere Abgrenzung der *Catnb*-Tumore von den Normalgeweben und ebenfalls ein deutlich geringeres Vorkommen des Komplexes ($P < 0,0008$). Die Streuung der Messwerte fiel bei dieser Anordnung weitaus geringer aus.



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	1810	258	1855
Stabwn	1086	216	666
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,03
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<1
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,08

Abbildung 3.36: Analyse des β -Catenin/ E-Cadherin-Komplexes (α_{Ecad_1} als Fängerantikörper und α_{bcat_17} als Detektionsantikörper). β -Catenin wurde mit E-Cadherin aus Homogenaten von Mauslebertumoren ko-immunpräzipitiert. Die gewonnenen Fluoreszenzmesswerte für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) sind in einem *box and whiskers plot* dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.



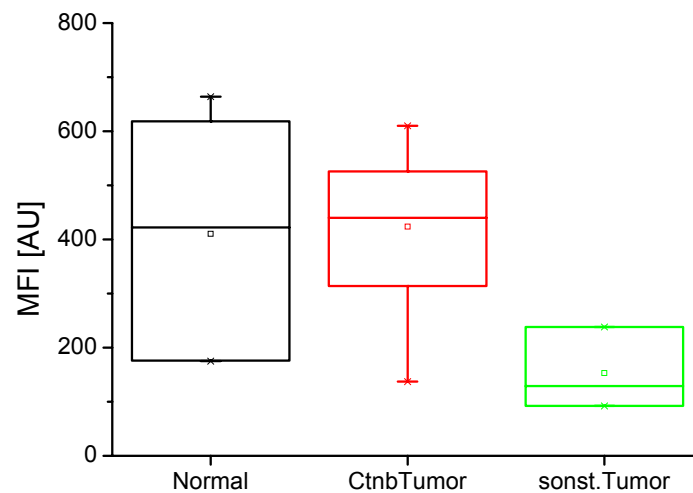
	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	1596	221	2663
Stabwn	459	224	1018
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,0008
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<0,3
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,08

Abbildung 3.37: Analyse des β -Catenin/ E-Cadherin-Komplexes (α_{bcat_13} als Fängerantikörper und biotinylierter α_{Ecad_1} als Detektionsantikörper). E-Cadherin wurde mit β -Catenin aus Homogenaten von Mauslebertumoren ko-immunpräzipitiert. Die gewonnenen Fluoreszenzmesswerte für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) sind in einem *box and whiskers plot* dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.

3.3.5 Ko-Immunitätspräzipitation von β -Catenin mit N-Cadherin bzw. N-Cadherin mit β -Catenin

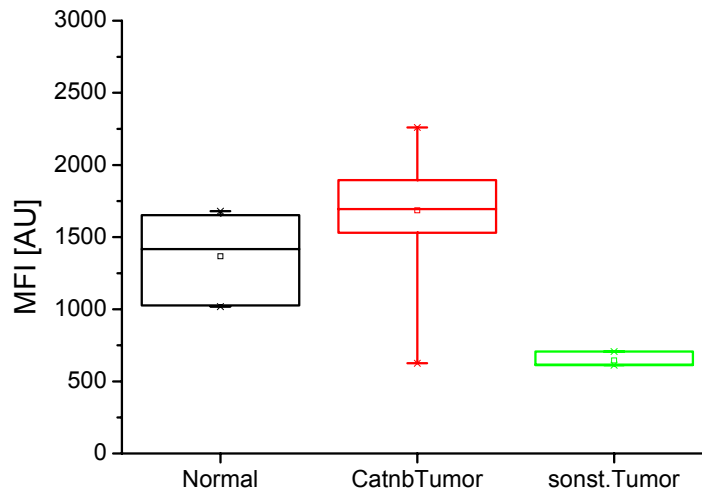
Zusätzlich zur Messung des Komplexes von β -Catenin mit E-Cadherin wurde der Anteil an N-Cadherin-Komplex in den vorhandenen Proben gemessen. Hier wurde β -Catenin mit einem N-Cadherin-spezifischen Antikörper ko-immunpräzipitiert. Die Ergebnisse für alle Proben streuen sehr stark. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Catnb*-Tumoren und den anderen

beiden Gruppen (siehe Abbildung 3.38). Auch nach der Messung des Komplexes mit vertauschtem Fänger und Detektionsantikörper konnten statistisch keine Unterschiede zwischen Normalgeweben und *Catnb*-Tumoren festgestellt werden (Abbildung 3.39). Lediglich die nicht kategorisierten Tumoren ließen sich gegenüber den anderen beiden Gruppen abgrenzen. Es war eine geringere relative Menge an Komplex in diesen Tumoren festzustellen.



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	410	424	153
Stabwn	213	125	62
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,9
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<0,05
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,006

Abbildung 3.38: Analyse des β -Catenin/ N-Cadherin-Komplexes (α _Ncad_2 als Fängerantikörper und α _bcat_17 als Detektionsantikörper). β -Catenin wurde mit N-Cadherin aus Homogenaten von Mauslebertumoren ko-immunpräzipitiert. Die gewonnenen Fluoreszenzmesswerte für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) sind in einem *box and whiskers plot* dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	1367	1685	645
Stabwn	281	375	44
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,07
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<0,002
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,00000002

Abbildung 3.39 Analyse des β -Catenin/ N-Cadherin-Komplexes (α_{bcat13} als Fängerantikörper und biotinylierter α_{Ncad1} als Detektionsantikörper).. N-Cadherin wurde mit β -Catenin aus Homogenaten von Mauslebertumoren ko-immunpräzipitiert. Die gewonnenen Fluoreszenzmesswerte für die drei verschiedenen Gruppen Normalgewebe (n=6), *Catnb*-Tumor (n=16) und sonstige Tumore (n=3) sind in einem *box and whiskers plot* dargestellt. In der Tabelle unterhalb des Diagramms finden sich die Mittelwerte der Messwerte für die einzelnen Gruppen. Die Ergebnisse der t-Tests sind ebenfalls in der Tabelle zusammengefasst.

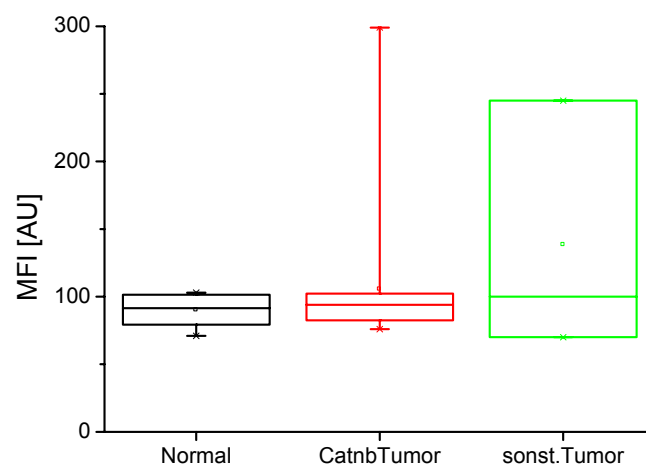
3.3.6 Analyse der Phosphorylierung von β -Catenin

Die Phosphorylierung von β -Catenin führt zur Ubiquitinylierung und zur Degradation von β -Catenin durch das Proteasom [55, 56, 89]. Die Gesamtkonzentration von β -Catenin in *Catnb*-mutierten Mauslebertumoren ist unverändert gegenüber normalem Gewebe (siehe 3.3.2 und [58]). Der Selektionsvorteil von mutierten Karzinomen wird im Allgemeinen alleine auf eine verminderte Phosphorylierung und einen reduzierten proteasomalen Abbau

ERGEBNISSE

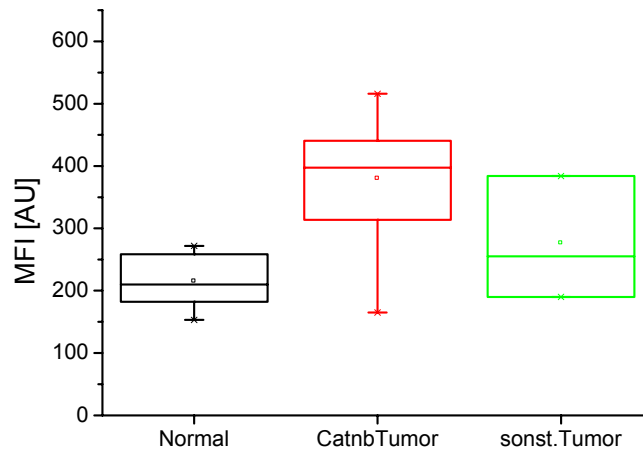
Bande zu detektieren (Abbildung 3.40 (c)). Die Ergebnisse mit $\alpha_{\text{bcat}_{12}}$ sind ähnlich denen mit $\alpha_{\text{bcat}_{11}}$; es ist sowohl eine Bande bei 93 kDa als auch eine bei 65 kDa zu erkennen. Die Signale sind jedoch im Allgemeinen sehr schwach.

Die Resultate der Sandwichimmunoassays für an S33/ S37/ T41 phosphoryliertes β -Catenin zeigen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 3.41). Mit den Resultaten des Immunoassay, spezifisch für an T41/ S45 phosphoryliertes β -Catenin, sind jedoch signifikante Unterschiede zwischen Normalgewebe und *Catnb*-Tumoren zu detektieren (siehe Abbildung 3.42). Eine sichere Abgrenzung zu den sonstigen Tumoren ist jedoch nicht möglich.



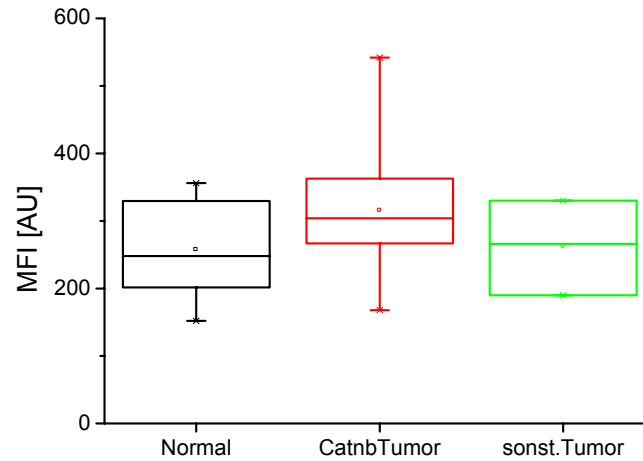
	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	89	160	138
Stabwn	12	99	76
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			P<0,4
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			P<0,5
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			P<0,8

Abbildung 3.41 Analyse von phosphoryliertem β -Catenin in homogenisiertem Lebergewebe. Mit Hilfe eines Sandwichimmunoassays wurde die Menge an S33/ S37/ T41 phosphoryliertem β -Catenin gemessen. Es ist zu beachten, dass zwischen den drei Phosphorylierungen nicht unterschieden werden kann



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	215	380	276
Stabwn	40	91	81
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,00003
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<0,4
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,3

Abbildung 3.42 Analyse von phosphoryliertem β -Catenin in homogenisiertem Lebergewebe. Mit Hilfe eines Sandwichimmunoassays wurde die Menge an T41/ S45 phosphoryliertem β -Catenin gemessen. Es ist zu beachten, dass zwischen den beiden Phosphorylierungen nicht unterschieden werden kann.



	Normalgewebe (n=6)	<i>Catnb</i> -Tumor (n=16)	Nicht klassifizierter Tumor (n=3)
Mittelwert	257	315	262
Stabwn	67	87	57
t-Test			P-Wert
Normal gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,2
Normal gegen nicht klassifizierten Tumor			<0,9
nicht klassifizierter Tumor gegen <i>Catnb</i> -Tumor			<0,3

Abbildung 3.43 Analyse von phosphoryliertem β -Catenin in homogenisiertem Lebergewebe. Mit Hilfe eines Sandwichimmunoassays wurde die Menge an S45 phosphoryliertem β -Catenin gemessen.

Die Ergebnisse der Sandwichimmunoassays weisen, wie die Messung der Cadherin/ β -Catenin-Komplexe, auf eine erhöhte Menge an β -Catenin im Cytosol der untersuchten *Catnb*-mutierten Karzinome hin. Die Anzahl der untersuchten, nicht *Catnb*-mutierten Tumore war zu klein, um eine sichere Abgrenzung zu den *Catnb*-Tumoren zu erhalten.

3.3.7 Subzelluläre Lokalisation von phosphoryliertem β -Catenin

Zur weiteren Untersuchung eventueller Unterschiede in der Gesamtmenge und der Phosphorylierungsmuster von β -Catenin wurden vorhandene *Catnb*-Tumore und Lebernorgangewebe immunhistochemisch untersucht. Ferner wurden zur subzellulären Lokalisation von Phospho- und Dephospho- β -Catenin verschiedene Zellkulturen mit und ohne *Catnb*-Mutation immunocytochemisch gefärbt. Ziel war es eventuelle Unterschiede in der Lokalisation und in der Quantität von phosphoryliertem β -Catenin und Gesamt- β -Catenin abhängig von Mutation oder Phosphorylierung zu detektieren.

Die Färbungen der Gefrierschnitte wurde mit vier Antikörpern durchgeführt: Mit zwei proteinspezifischen β -Catenin-Antikörpern $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ und 17 und den phosphospezifischen Antikörpern $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ und 11. Der Antikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{12}$ (spezifisch für an S45-phosphoryliertes β -Catenin) wurde ebenfalls verwendet, aber es wurde keine Färbung erzielt. Laut Hersteller ist dieser Antikörper nicht für die Verwendung in immunhistochemischen und immunocytochemischen Färbungen geeignet.

Die immunhistochemische Analyse von Lebernorgangeweben und Lebertumoren zeigte eine ungleiche Verteilung von phosphoryliertem β -Catenin, unabhängig von der Mutation. Die Färbung mit $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ (spezifisch für phosphoryliertes β -Catenin an S33/ S37/ T41) ergab eine Lokalisation im Cytosol. Der Kernbereich der Zellen blieb von der Färbung ausgespart (siehe Abbildung 3.44a). Die Untersuchung der Gewebe mit $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ (spezifisch für phosphoryliertes β -Catenin an T41 und S45) ergab in allen Normalgeweben und in elf von 18 *Catnb*-Tumoren neben Signal im Cytosol eine klare Lokalisation von modifiziertem β -Catenin im Kern der Zellen (siehe Abbildung 3.44b).

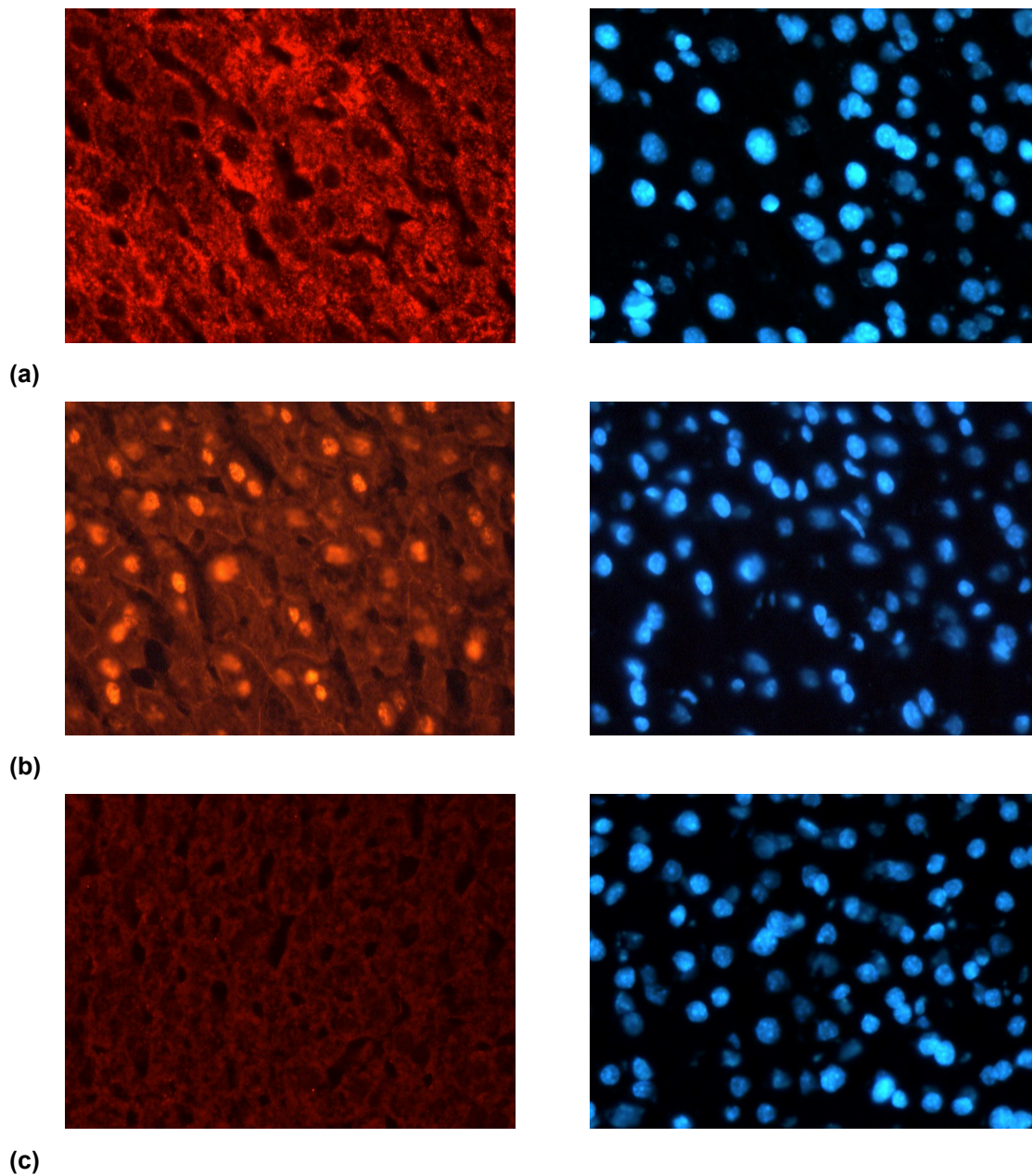


Abbildung 3.44: Nachweis von phosphoryliertem β -Catenin in Mauslebernormalgewebe. Mit (a) $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ (spezifisch für β -Catenin phosphoryliert an S33/ S37 und T41) und (b) $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ (spezifisch für β -Catenin phosphoryliert an T41 und S45) wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Visualisierung der Antikörper geschah mit einem CY3-markierten Esel-anti-Kaninchen-IgG ($\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ und 11) In (c) wurde zur Kontrolle von unspezifischer Bindung die Färbung ohne Primärantikörper durchgeführt. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung, rechte Bildreihe).

Die Ergebnisse der Färbungen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Ergebnisse der Analyse der Normalgewebe weisen auf eine unterschiedliche Verteilung von β -Catenin mit unterschiedlichem Phosphorylierungsmuster in den

Kompartimenten Cytosol und Kern hin. Während S33-, S37- und T41-phosphoryliertes β -Catenin im Cytosol auftritt, wurde mit $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ (spezifisch für an T41/ S45 phosphoryliertes β -Catenin) phosphoryliertes β -Catenin im Kern detektiert. Die Ergebnisse der Untersuchung der Tumore sind nicht eindeutig. S33/ S37/ T41- phosphoryliertes β -Catenin ist auch hier nur cytosolisch zu detektieren. Die Färbung von T41/ S45-phosphoryliertes β -Catenin ergab jedoch nur in 14 von 22 Schnitten eine eindeutige Kernlokalisation.

Tabelle 3.5: Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse von Gefrierschnitten von Lebernorgewebe und Lebertumorgewebe. Zur Analyse wurde $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$, 11 und 13 verwendet.

	$\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ pS33/S37/T41 β -Catenin	$\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ pT41/S45 β -Catenin	$\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ Gesamt- β -Catenin
Normalgewebe	Cytosolfärbung 3 von 3 positiv	Kernfärbung 13 von 14 positiv	Membran und diffus im Cytosol 14 von 14 Positiv
<i>Catnb</i> -Tumor	Cytosolfärbung 18 von 18 positiv	Kernfärbung 11 von 18 positiv	Membran und diffus im Cytosol 18 von 18 positiv
Nicht klassifizierte Tumore	Cytosolfärbung 4 von 4 positiv	Kernfärbung 3 von 4 positiv	Membran und diffus im Cytosol 4 von 4 positiv

Die Analyse des Phosphorylierungsmusters und der Lokalisation von β -Catenin in *Catnb*-mutierten und nicht mutierten Zelllinien führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden eine Zelllinie *Catnb*-genotypisch homozygot Wt (70.4), eine Zelllinie heterozygot in *Catnb*-Codon 45 punktmutiert (HepF1) und zwei weitere Zelllinien, 55.1c und 56.1b, mit Deletion des N-Terminus im *Catnb*-Gen verwendet. Zusätzlich zu den vier oben erwähnten Antikörpern wurde ein weiterer Antikörper zur Färbung eingesetzt. Das Epitop des Antikörpers $\alpha_{\text{bcat}}_{16}$ wurde nach van Noort *et al.* [88] mit Hilfe von Peptid-Makroarrays auf den Bereich AS 36-44 eingegrenzt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren untersucht werden, inwiefern eine Phosphorylierung die Bindung des Antikörpers stört (siehe 3.1.3).

Mit $\alpha_{\text{bcat}}_{17}$ (generiert gegen GST- β -Catenin) konnte in allen vier Zelllinien unabhängig von der Mutation mit der Immunocytochemie β -Catenin im Nukleus nachgewiesen werden (Abbildung 3.47). Auch mit Antikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{16}$ (spezifisch für AS-Bereich 36-44) lässt sich β -Catenin klar im Kern der verschiedenen Zelllinien nachweisen (Abbildung 3.46). Interessanterweise zeigten die Färbungen mit $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ (Epitop im Bereich AS 653-781) nie eine Lokalisation des Proteins im Kern der Zelllinien, lediglich an der Zellmembran (Abbildung 3.50). Die Färbungen der Zelllinien mit dem phosphospezifischen $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ (spezifisch für β -Catenin phosphoryliert an T41 und S45) ergab in allen vier Fällen eine Kernfärbung (Abbildung 3.45). Mit den Antikörpern $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ (spezifisch für phosphoryliertes β -Catenin an S33/ S37/ T41) und $\alpha_{\text{bcat}}_{12}$ (spezifisch für phosphoryliertes β -Catenin an S45) ist weder eine Färbung des Cytosols noch der Membran oder des Kerns zu sehen (Abbildung 3.48 und Abbildung 3.50).

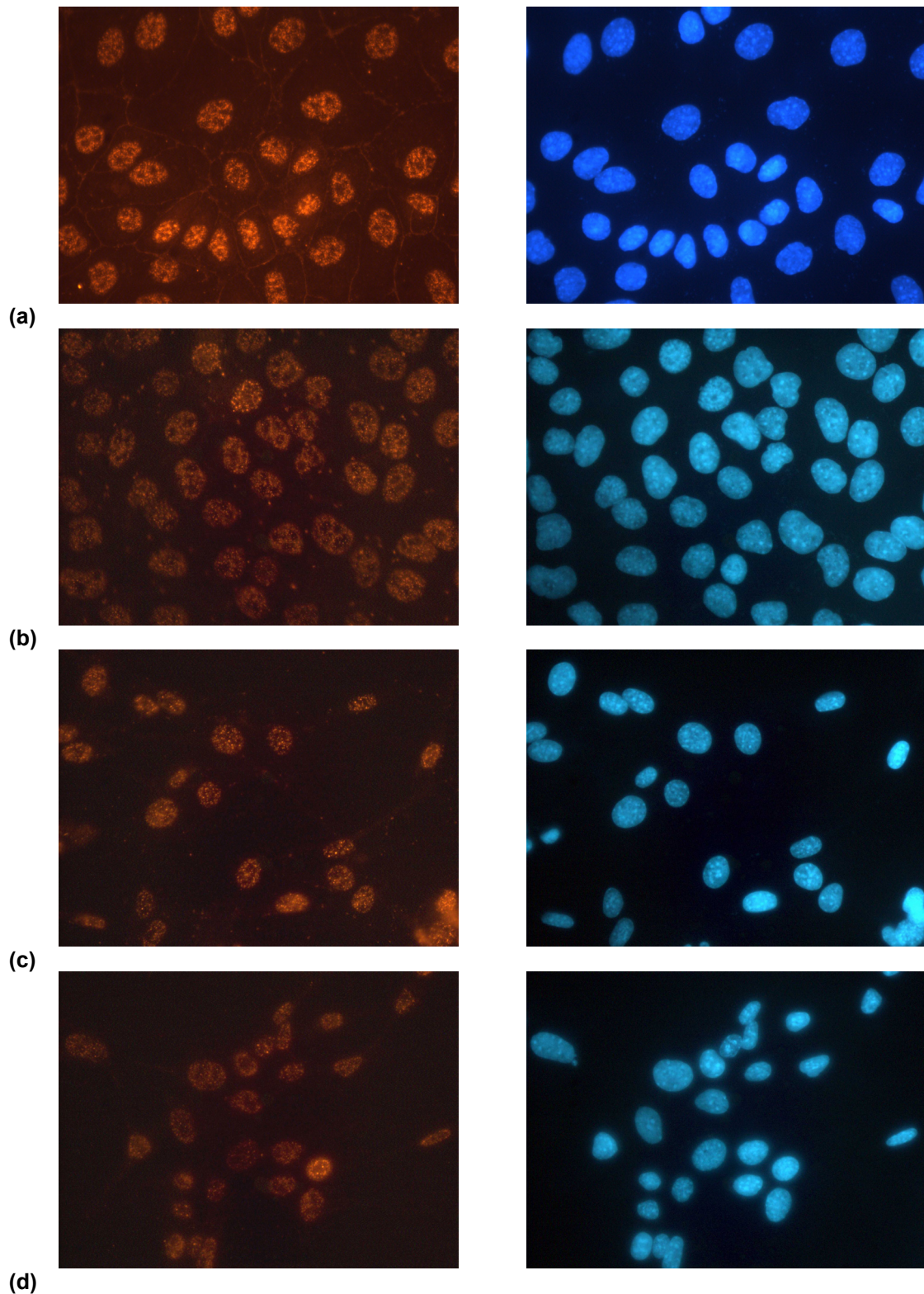


Abbildung 3.45: Nachweis von phosphoryliertem β -Catenin in *Catnb*-mutierten Maus-Hepatomzelllinien mit α_{bcat_11} (spezifisch für β -Catenin phosphoryliert an T41 und S45). Die Färbung wurde mit den Zelllinien (a) 70.4, (b) HepF1, (c) 55.1c und (d) 56.1b durchgeführt. Die Visualisierung der Antikörper geschah mit einem CY3-markierten Esel-anti-Kaninchen-IgG. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung, rechte Bildreihe).

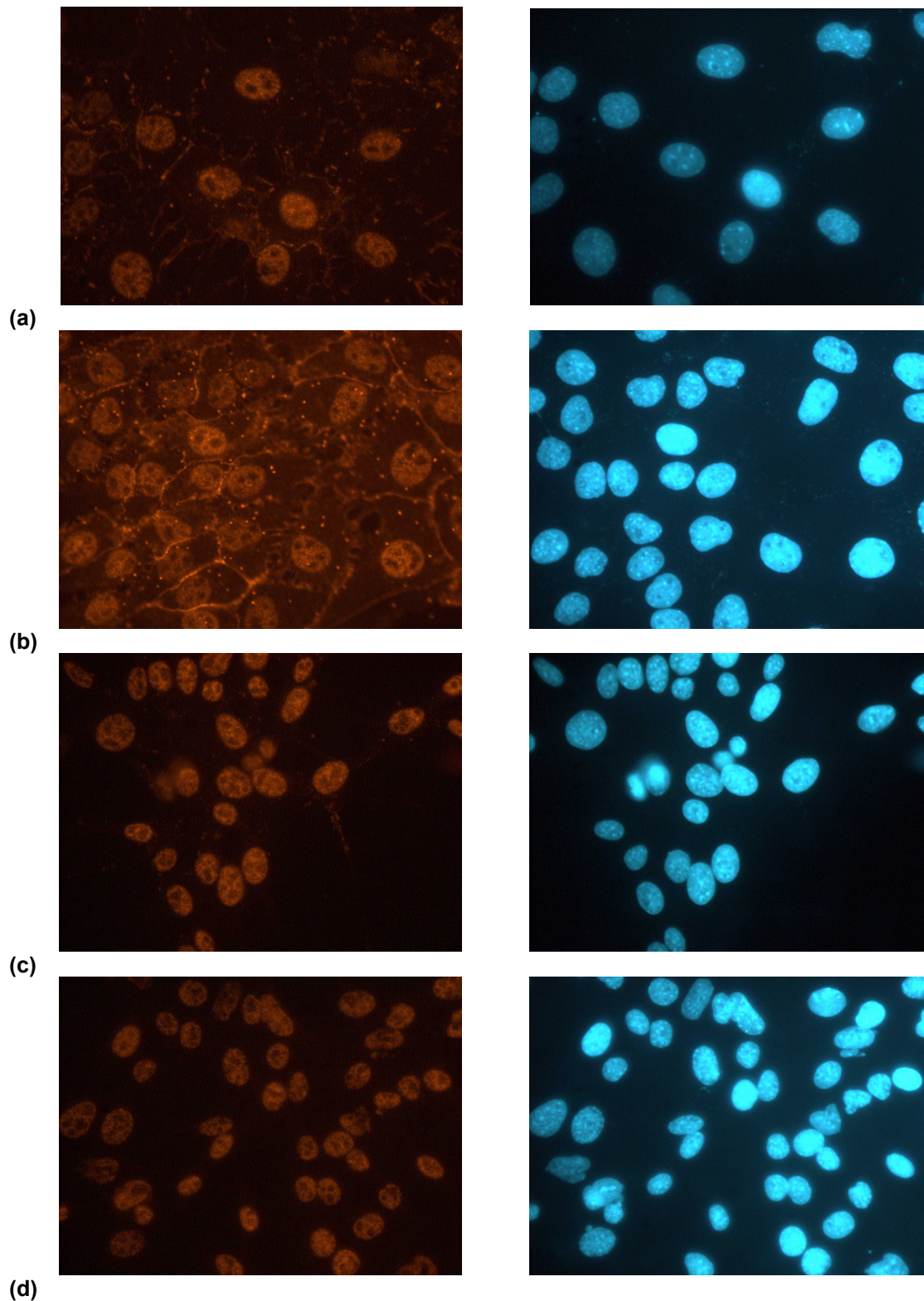


Abbildung 3.46: Nachweis von dephosphoryliertem β -Catenin in *Catnb*-mutierten Maus-Hepatomezelllinien mit α_{bcat_16} (Epitop AS 36-44). Die Färbung wurde mit den Zelllinien (a) 70.4, (b) HepF1, (c) 55.1c und (d) 56.1b durchgeführt. Die Visualisierung der Antikörper geschah mit einem CY3-markierten Ziege-anti-Maus-IgG. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung, rechte Bildreihe).

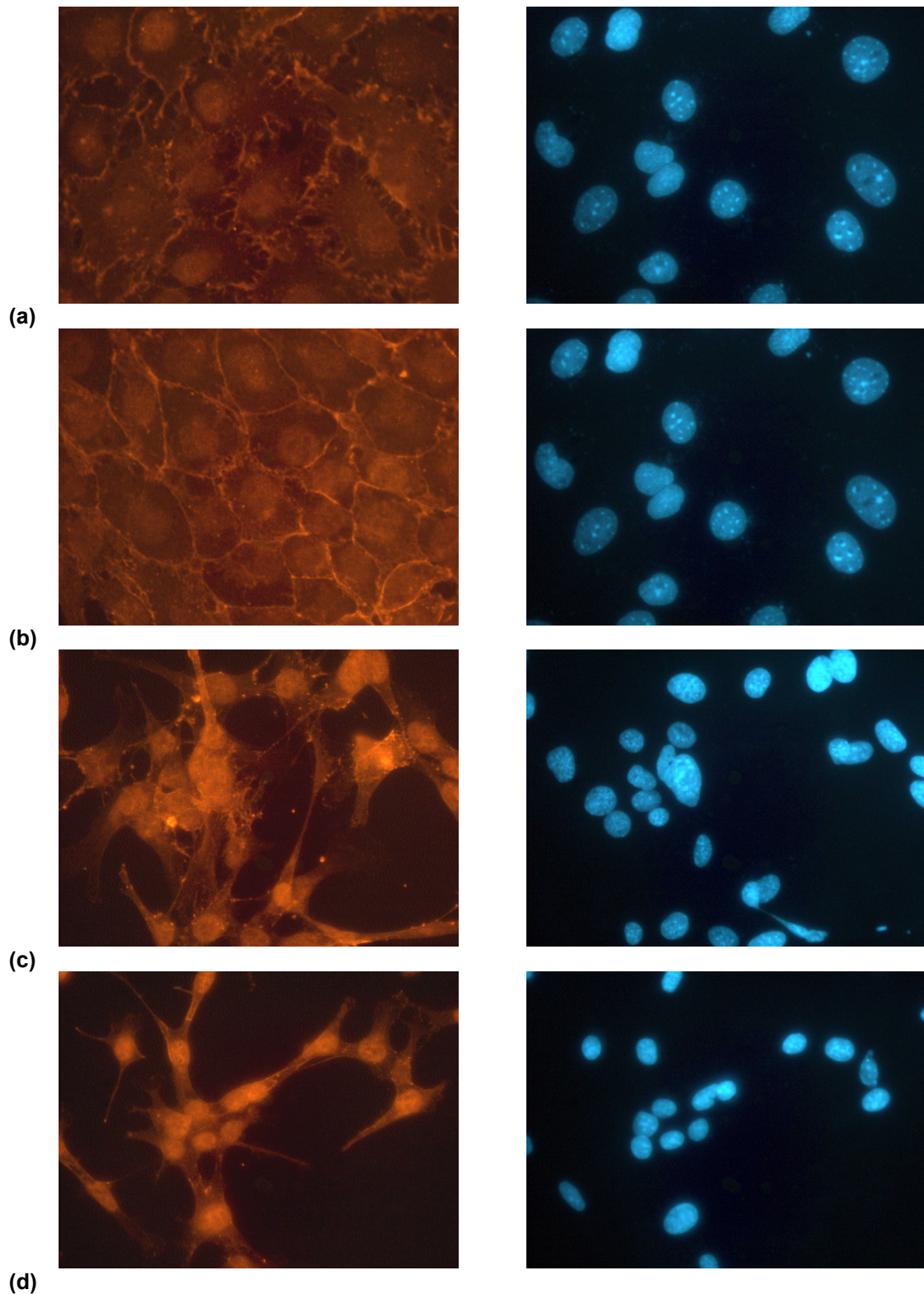


Abbildung 3.47: Nachweis von β -Catenin in *Catnb*-mutierten Maus-Hepatomzelllinien mit α _bcat_17 (Immunoegen gesamtes β -Catenin). Die Färbung wurde mit den Zelllinien (a) 70.4, (b) HepF1, (c) 55.1c und (d) 56.1b durchgeführt. Die Visualisierung der Antikörper geschah mit einem CY3-markiertem Esel-anti-Kaninchen-IgG. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gefärbt (blaue Färbung, rechte Bildreihe).

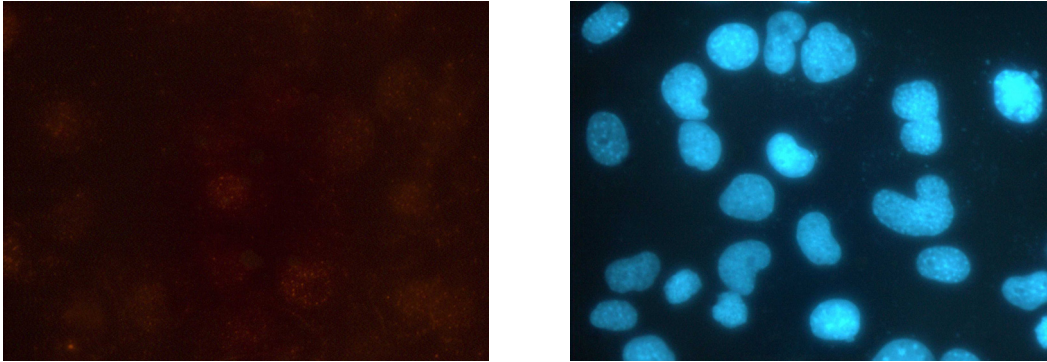


Abbildung 3.48: Nachweis von phosphoryliertem β -Catenin in *Catnb*-mutierten Maus-Hepatomezelllinien mit $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$ (spezifisch für β -Catenin phosphoryliert an S33/ S37 und T41). Die Färbung wurde mit den Zelllinien 70.4, HepF1, 55.1c und 56.1b durchgeführt. Exemplarisch ist ein Bild der Färbung von 70.4 gezeigt. Die Visualisierung des Antikörpers geschah mit einem CY3-markiertem Esel-anti-Kaninchen-IgG. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung).

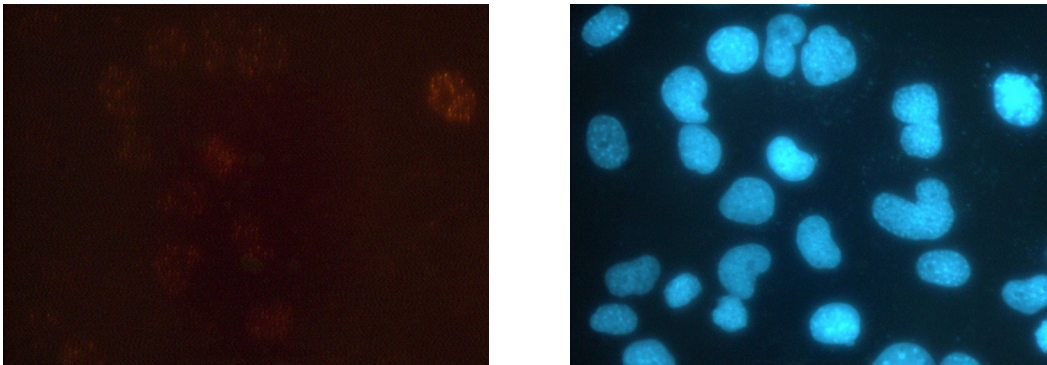


Abbildung 3.49: Nachweis von phosphoryliertem β -Catenin in *Catnb*-mutierten Maus-Hepatomezelllinien mit $\alpha_{\text{bcat}}_{12}$ (spezifisch für β -Catenin phosphoryliert an S45). Die Färbung wurde mit den Zelllinien 70.4, HepF1, 55.1c und 56.1b durchgeführt. Exemplarisch ist ein Bild der Färbung von 70.4 gezeigt. Die Visualisierung des Antikörpers geschah mit einem CY3-markiertem Esel-anti-Kaninchen-IgG. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung).

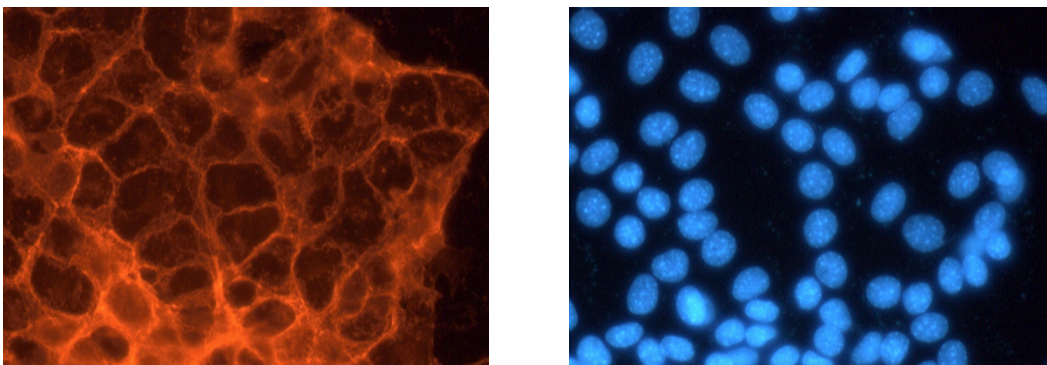


Abbildung 3.50: Nachweis von β -Catenin in *Catnb*-mutierten Maus-Hepatomezelllinien mit $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ (Epitop im Bereich 571-781). Die Färbung wurde mit den Zelllinien 70.4, HepF1, 55.1c und 56.1b durchgeführt. Exemplarisch ist ein Bild der Färbung von HepF1 gezeigt. Die Visualisierung des Antikörpers geschah mit einem CY3-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung).

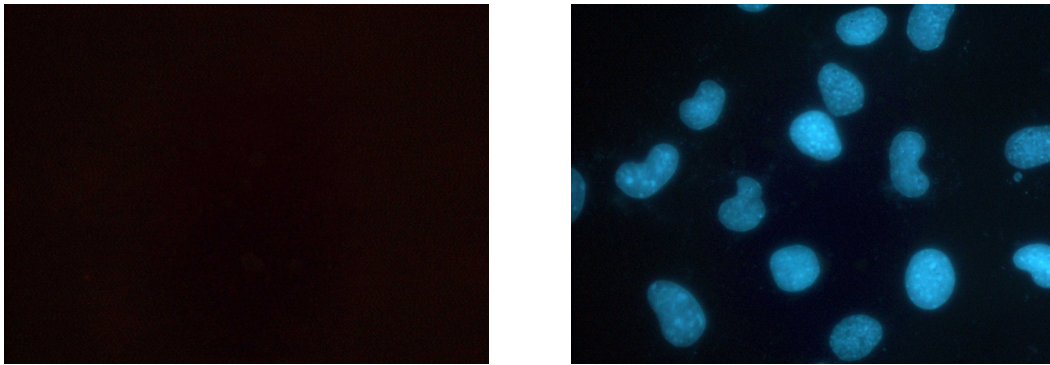


Abbildung 3.51: Unspezifische Bindung von CY3-markiertem Esel-anti-Kaninchen-IgG. Die Kontrollfärbung wurde ohne Primärantikörper mit den Zelllinien 70.4, HepF1, 55.1c und 56.1b durchgeführt. Exemplarisch ist ein Bild der Färbung von 70.4 gezeigt. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung).

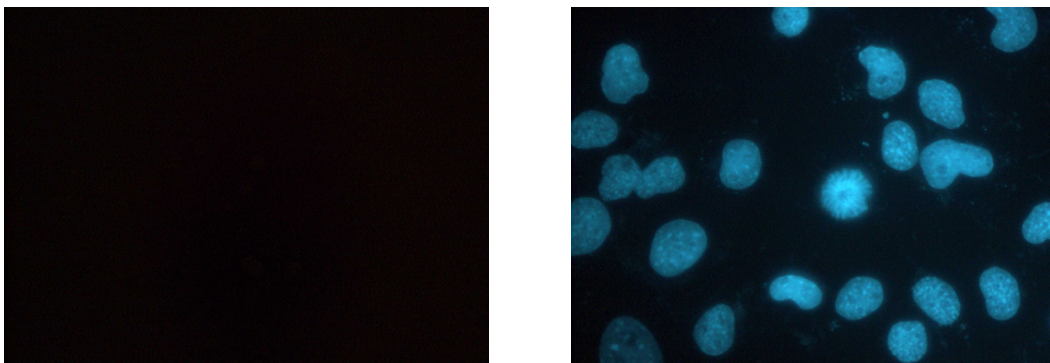


Abbildung 3.52: Unspezifische Bindung von CY3-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG. Die Kontrollfärbung wurde ohne Primärantikörper mit den Zelllinien 70.4, HepF1, 55.1c und 56.1b durchgeführt. Exemplarisch ist ein Bild der Färbung von 70.4 gezeigt. Kerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (blaue Färbung).

Um zu verifizieren, dass es sich bei dem im Kern detektierten Protein tatsächlich um phosphoryliertes β -Catenin handelt, wurden Western-Blot-Analysen mit Kernpräparationen der Zelllinien durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung durch die SDS-PAGE erlaubte eine zusätzliche Kontrolle des Antikörpersignals über das Molekulargewicht. Zur Western-Blot-Analyse der fraktionierten Zellen wurden die phosphospezifischen Antikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{10}$, 11, 12 und $\alpha_{\text{bcat}}_{17}$ (Gesamt- β -Catenin) eingesetzt. Die Kerne wurden, wie unter 2.6.5 im Methodenteil beschrieben, präpariert und zusammen mit Gesamthomogenat und Cytosol mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit der Immunoblot-Methode analysiert.

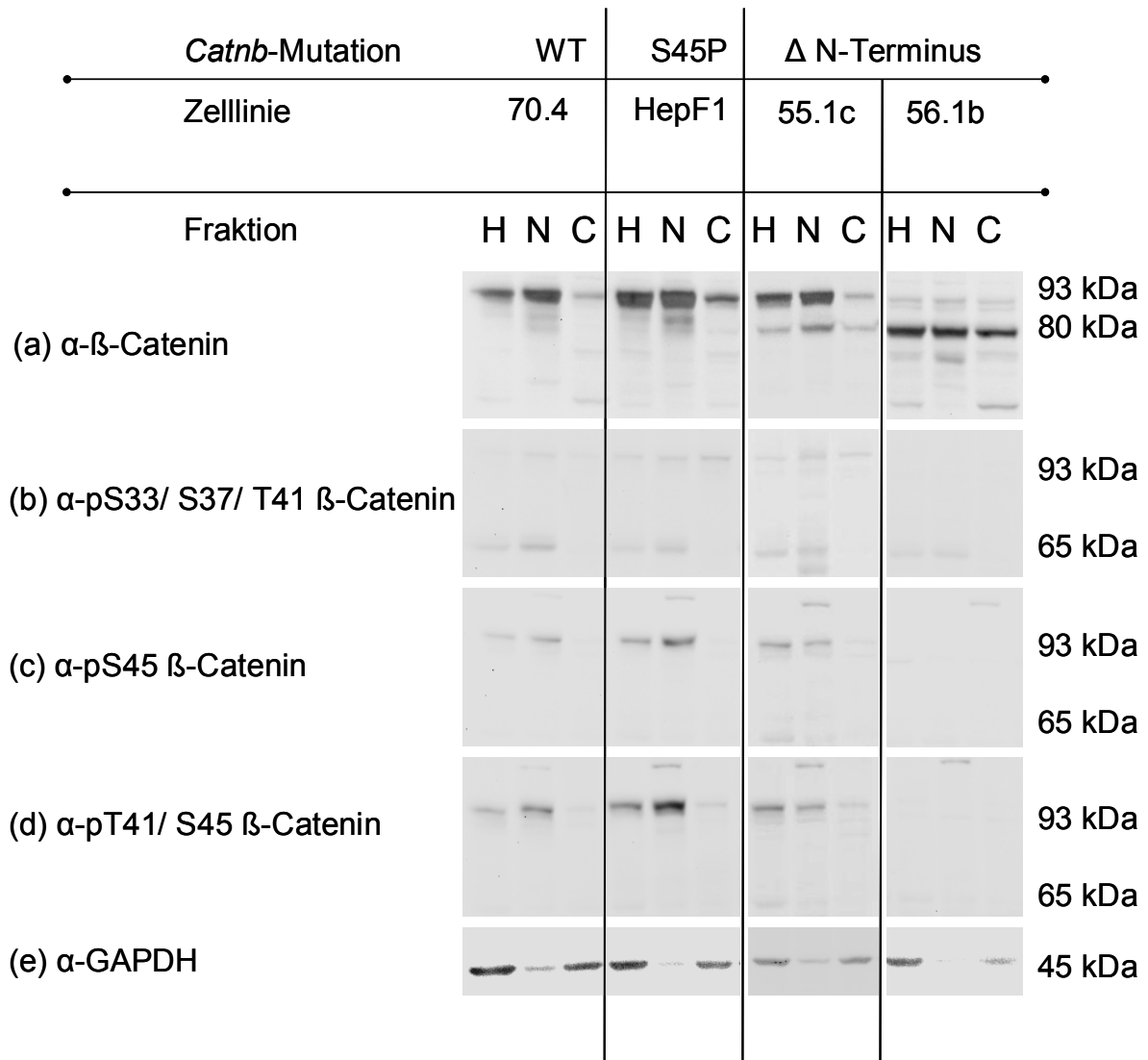


Abbildung 3.53: Western-Blot-Analyse von Cytosol- (C) und Kern-/ Membran-Fractionen (N). Zelllinien wurden hypotonisch lysiert und die Kerne und Membranen durch Zentrifugation vom Cytosol abgetrennt. 15 µg der Fraktionen und des Gesamthomogenats (H) wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Zur Analyse wurde in (a) α_bcat_13, in (b) α_bcat_10, in (c) α_bcat_12 und in (d) α_bcat_11 verwendet. Zur Kontrolle der Fraktionen wurde ein Blot (e) mit einem Antikörper gegen das cytosolische Enzym GAPDH (α_GAPDH_1) entwickelt.

Durch die Immunoblot-Analyse der Zellfraktionen konnte die Lokalisation von an Serin 45 phosphoryliertem β-Catenin in den Zelllinien 70.4, HepF1 und 55.1c verifiziert werden. Sowohl die mit α_bcat_11 als auch α_bcat_12 entwickelten Membranen zeigen deutlich eine Bande bei 93 kDa (Abbildung 3.53b und c). Mit α_bcat_10 sind kaum Banden bei 93 kDa zu erkennen (Abbildung 3.53b). Hier sind außerdem schwache Signale im Cytosol zu finden. Die Ergebnisse mit Zelllinie 56.1b unterscheiden sich von denen der anderen Zelllinien. Hier ist mit

keinem phosphospezifischen Antikörper bei einer Molekülgröße von 93 kDa ein Signal zu detektieren. Da diese Zelllinie wie 55.1c heterozygot im *Catnb*-Gen mutiert ist und dem Protein der N-Terminus fehlt, ist dieses Ergebnis erklärbar. Im Falle der Zelllinie 55.1c ist trotz des fehlenden N-Terminus ebenfalls phosphoryliertes β -Catenin in der Kern-/ Membranfraktion zu detektieren. Die Wildtyp-Form von β -Catenin ist in dieser Zelllinie allerdings stärker exprimiert als die mutierte Form (Abbildung 3.53a). Die Expression des verkürzten β -Catenin ist in 56.1b weitaus geringer als die des Wildtyps. Die Kontrolle der Fraktionierung mit α _GAPDH_1 zeigt eine leichte Verunreinigung der Kern-/ Membranfraktion mit cytosolischem Protein im Falle der 70.4- und der HepF1-Zelllinie. Die graphische Auswertung ergab jedoch eine Verunreinigung mit weniger als 1% im Vergleich zur cytosolischen Fraktion (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wäre zu bemerken, dass sowohl mit immunhistochemischen und immunocytochemischen Analysen phosphoryliertes β -Catenin in Zellkernen von Lebernorgewebe, teilweise auch in Zellkernen von Lebertumorgewebe, als auch in Hepatomzelllinien nachzuweisen war. Ein nukleärer Nachweis von β -Catenin mit nicht phosphospezifischen Antikörpern ist lediglich in den Zelllinien gelungen. Mit der Western-Blot-Analyse subzellulärer Fraktionen konnte in drei Zelllinien eine Lokalisation von an Serin 45 phosphoryliertem β -Catenin im Zellkern bestätigt werden. Durch die Analyse der Molekülgröße im Western-Blot wurde die Spezifität des Signals des phosphospezifischen Antikörpers verifiziert.

4 DISKUSSION

Antikörper sind wichtige analytische Hilfsmittel zur Untersuchung der Proteinexpression. Die genaue Charakterisierung eines Antikörpers entscheidet über die Verwendung in diversen Analysemethoden. Während die Spezifität das Anwendungsspektrum des Antikörpers bestimmt, ist die Affinität maßgeblich für die Sensitivität eines Assays.

Mit Hilfe von Peptid- und Protein-Mikroarrays wurden Systeme zur schnellen Identifizierung von linearen Epitopen bei gleichzeitiger Bestimmung einer relativen Affinität etabliert. Mikroarrays, bestehend aus Positionsbibliotheken von Peptiden, konnten zur Bestimmung der relevanten Aminosäureseitenketten in Epitopen peptidspezifischer Fabs verwendet werden. Ein schneller, miniaturisierter und durchsatzfähiger Flüssigphasenassay zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten und Kreuzreaktivitäten wurde entwickelt. Damit konnte ein vollständiges System zum *Screening* und zur Feincharakterisierung von peptidspezifischen Antikörpern erreicht werden. Das etablierte System wurde zu Epitopkartierungen und zur Bestimmung der Phosphospezifität von β -Catenin-Antikörpern eingesetzt. Die charakterisierten Antikörper wurden in Western-Blots, Mikrosphären-basierten Sandwichimmunoassays, immunhistochemischen und immunocytochemischen Methoden zur Untersuchung des Phosphorylierungsmusters und der Expression von β -Catenin in *Catnb*-mutierten Mauslebertumoren und Hepatomzelllinien eingesetzt.

4.1 Mikroarrays zur Antikörpercharakterisierung

Peptid- und Protein-Mikroarray-Methoden wurden entwickelt, um ein System zur Untersuchung der (i) Spezifität, (ii) Affinität und (iii) Phosphoselektivität von rekombinant und konventionell hergestellten Antikörpern zu etablieren. Herkömmlicherweise werden zur Untersuchung solcher Eigenschaften Peptid-Makroarrays, hergestellt mit der Spotsynthese, eingesetzt [34]. Die Verwendung von konventionell hergestellten Peptiden zur Herstellung von Peptid-Mikroarrays stellt eine Verbesserung dieser Methode dar. Die Generierung von Peptid-Arrays durch Drucken von Peptid-BSA-Konjugaten gestattet erstmals die Immobilisierung

von Proteinen und Peptiden im gleichen Array. Der zweite große Vorteil bei der Verwendung von Peptidkonjugaten zur Herstellung von Peptid-Arrays ist der thiol-spezifische Aufreinigungsschritt, der durch die Reaktion von N-terminalem Cystein mit der Maleinimidgruppe des Quervernetzungsreagenz stattfindet. Diese Aufreinigung erfolgt, indem während der Peptidsynthese ein Acetylierungsschritt (*Capping*) durchgeführt wird. Unvollständige Peptide, die häufig während der Synthese entstehen, werden nicht verlängert und tragen somit keinen Cysteinylnrest. Dadurch ist eine gerichtete Immobilisierung von Peptiden auf aktivierten Glaträgern möglich. Daher erlaubt diese Methode der Peptidarrayherstellung im Gegensatz zu *in situ*-Methoden wie der Spotsynthese eine Qualitätskontrolle.

Die generierten Peptid- und Protein-Mikroarrays wurden zur Charakterisierung von verschiedenen rekombinanten Fab-Fragmenten eingesetzt. Die Fab-Fragmente wurden von der MorphoSys AG zur Verfügung gestellt. Diese Fab-Fragmente wurden aus der vollsynthetischen *Phage display*-Bibliothek HuCal[®] über ein rekombinantes Proteinfragment oder ein 25mer-Peptid angereichert. Sowohl die Sequenz des Proteinfragments als auch die des 25mer-Peptids sind Bestandteile der Proteinsequenz von Mac I. Mit dem Array-System konnten für drei der sechs Proteinbinder lineare Epitope schnell ermittelt werden. Für drei Binder konnte kein Epitop kartiert werden. Vermutlich liegen hier konformationelle oder diskontinuierliche Epitope vor, bei deren Detektion die Methode an ihre Grenzen stößt. Die minimalen Bindungssequenzen der Peptidbinder konnten mit N- und C-terminal verkürzten Peptiden auf Längen von sieben bis neun Aminosäuren eingegrenzt werden. Eine genauere Untersuchung der Bindungseigenschaften von Fab 4 wurde mit Peptidpositionsbibliotheken untersucht. Auf diese Weise konnte die Spezifität dieses Fab-Fragments bestimmt werden. Drei der sieben Aminosäuren ließen sich ohne Verlust der Bindungskapazität des Fab-Fragments austauschen. Die Suche nach dem ermittelten Bindemotiv DAFXXXK in einer Proteindatenbank mit allen bekannten humanen Proteinsequenzen ergab 62 Sequenzen und damit 62 potentielle Kreuzreaktivitäten. Eine Suche mit einer theoretisch schrittweise erweiterten Spezifität zeigte erst ab einer Anzahl von sechs Aminosäuren eine absolute Sequenzspezifität.

Mit Hilfe eines humanspezifischen Antikörpers und des *panning targets*, immobilisiert im gleichen Array, ließ sich neben dem Epitop ein relativer Affinitätswert bestimmen. Die bestimmten relativen Affinitätswerte waren proportional zu den SPR-ermittelten Assoziationskonstanten. Die hier gezeigte Untersuchung der Fab-Fragmente wurde ebenfalls mit dem Mikrosphären-basierten Array-System durchgeführt. Die Immobilisierung der Peptide an die Mikrosphären fand jedoch über das Biotin-Avidin-System statt. Auch bei dieser Immobilisierungsstrategie erfolgte ein Aufreinigungsschritt über die spezifische Kopplung der Peptide. Die Daten dieser Untersuchungen führten zu den gleichen Ergebnissen, wie sie mit Hilfe der planaren Peptid-Arrays erzielt wurden. Zum Vergleich der beiden Mikroarray-Methoden ist anzumerken, dass die Mikrosphären-basierte Methode die schnellere und einfachere Durchführung der Experimente erlaubte. Dies ist auf das Wegfallen von zeitaufwendigen Spottingverfahren und Bildanalysen zurückzuführen.

Die Adaptierung und Automatisierung eines kompetitiven Fluoreszenz-immunoassays zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten von Antikörpern an das Luminex-System gestattete, die Affinitäten von Fab 4 zu konservativ punktmutierten Peptiden zu berechnen. Die gewonnenen Daten decken sich mit dem Peptidbindemotiv aus den vorher generierten Ergebnissen. Die Affinität des Fab-Fragments zu in Position 4, 5 und 6 mutierten Peptiden des sieben Aminosäuren langen Epitops ist nahezu gleich wie die zum Wildtyp. Die Bestimmung von Kreuzreaktivitäten über diese Methode erlaubt jedoch eine genauere Differenzierung der Aminosäurengewichtung bei der Antikörperbindung.

Die Methode zur Generierung Mikrosphären-basierter Peptid-Arrays wurde des Weiteren zur Analyse der Phosphoselektivität von phosphospezifischen und dephosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern eingesetzt. Die Diskriminierung zwischen einer phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form eines Proteins stellt sehr hohe Ansprüche an die Spezifität eines Antikörpers. Die zwei Epitope unterscheiden sich lediglich in einer Phosphatgruppe. Die Ergebnisse der Charakterisierung der Antikörper zeigen die Relevanz und Bedeutung der etablierten Methode für die Analyse von posttranslationalen Modifikationen.

Die Untersuchung der monoklonalen Antikörper α_{bcat_8} und 9 zeigt die Notwendigkeit, die Phosphospezifität von Antikörpern intensiv zu überprüfen. Die

Affinität von α_{bcat}_8 und 9 zum nicht phosphorylierten Peptid lässt eine Aussage über Phosphorylierung von β -Catenin nicht zu (siehe Abbildung 3.9a und b). Die polyklonalen Antikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{10, 11}$ und 12 hingegen zeigen eine sehr hohe Spezifität bezüglich der Phosphorylierung. Eine Affinität zum nicht phosphorylierten Peptid ist äußerst niedrig bzw. nicht detektierbar. Bei der Strategie zur Herstellung von phosphospezifischen Antikörpern scheint die Hybridoma-Technologie einen Nachteil gegenüber polyklonalen Seren zu besitzen. Diese können nach ihrer Herstellung verbessert werden: Eine sehr hohe Phosphospezifität kann durch die Depletion von Antikörperpopulationen gegen die dephosphorylierte Form mit Affinitätssäulen erreicht werden. Die charakterisierten Antikörper wurden im Laufe der Arbeit im Western-Blot, in der Immunhisto- und Immunocytochemie und im Aufbau von Sandwichimmunoassays zur Analyse von β -Catenin und dessen Komplexen eingesetzt.

4.2 Detektion und Quantifizierung der Phosphorylierung und Komplexierung von β -Catenin

Die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin wird über die Konzentration des Proteins bestimmt. Die Markierung zur Degradation durch das Proteasom erfolgt durch eine vierfache Phosphorylierung in der N-terminalen Region mit anschließender Ubiquitinylierung. Mutationen in den Phosphorylierungsstellen werden in Tumoren in allen Geweben und Spezies gefunden [92]. Der Selektionsvorteil dieser Tumore wird über eine Stabilisierung von β -Catenin erklärt. Aufgrund mutierter Phosphorylierungsstellen kann das Protein nicht mehr zum Abbau markiert werden. Daher akkumuliert das Protein im Cytosol, kann in den Kern translozieren und als Transkriptionsfaktor wirken.

In der Maus-Leber führt die Behandlung von DEN-induzierten Karzinomen mit Phenobarbital zu einem Selektionsvorteil für *Catnb*-mutierte Zellen [58]. Akkumulation bzw. Kernlokalisierung von β -Catenin war in diesen Tumoren mit Western-Blot und Immunhistochemie jedoch nicht nachweisbar. In Homogenaten, der in dieser Studie untersuchten Tumore und Lebergewebe, ließ sich dieses Ergebnis mit Hilfe des entwickelten Sandwichimmunoassays bestätigen (siehe Abbildung 3.33). Damit ist der Selektionsvorteil der hier untersuchten *Catnb*-

mutierten hepatozellulären Karzinome nicht durch eine Erhöhung der Gesamtkonzentration von β -Catenin erklären. Die Tatsache, dass keine erhöhte Konzentration an β -Catenin und keine erhöhte Expression von Wnt-Zielgenen wie Cyclin D1 oder c-myc gefunden wurde [58], spricht für einen alternativen Abbauweg oder einen alternativen Wirkmechanismus von β -Catenin. So können Unterschiede in der subzellulären Verteilung des β -Catenin - und nicht eine Erhöhung der Gesamtmenge - eine Ursache für die Entwicklung des Tumors sein. Durch Messung der membranständigen β -Catenin-Bindepartner N- und E-Cadherin und deren Komplexe, können Rückschlüsse auf die cytosolisch zugängliche, unkomplexierte Menge an β -Catenin gezogen werden.

4.2.1 Messung des β -Catenin-Zielgens Glutaminsynthetase

Glutaminsynthetase und andere Enzyme des Ammoniakstoffwechsels sind kürzlich identifizierte Zielgene der transkriptionellen Aktivität von β -Catenin in der Maus-Leber [62, 63]. Da in Folge einer *Catnb*-Mutation eine erhöhte GS-Expression in HCCs zu finden ist, wurde ein Sandwichimmunoassay für GS etabliert. Der Vergleich von 16 *Catnb*-mutierten hepatozellulären Mauskarzinomen und sechs Lebernorgangewebe zeigte mit einer Wahrscheinlichkeit > 99,9999% eine Korrelation zwischen einer erhöhten GS-Expression und einer *Catnb*-Mutation. Über die Analyse der GS-Expression konnte indirekt eine *Catnb*-Mutation im Probenmaterial verifiziert werden.

4.2.2 Quantifizierung der membranständige β -Catenin Bindepartner N- und E-Cadherin

Cadherine stellen die Hauptkomponenten von *Adherens Junctions* dar. Cluster dieser Strukturen sind an Zell-Zell Kontaktstellen in allen Geweben zu finden. In epithelialen Geweben bildet E-Cadherin über homophile Interaktion Kontakte zwischen den Zellen aus. Bei Tumoren epithelialen Ursprungs geht in den meisten Fällen die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion verloren, und es wird eine fortschreitende Malignität des Tumors beobachtet. Zwischen dem Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion und der Malignität von Tumoren besteht

eine inverse Korrelation [95]. Der Mechanismus, der zum Verlust der E-Cadherin-Funktion führt, erfolgt über zwei Mechanismen: zum einen durch herunterregulierte Expression [96], und zum anderen durch Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP), die den extrazellulären Anteil des Proteins enzymatisch abspalten [97]. Gleichzeitig wird in vielen Tumoren die Repression von E-Cadherin von einer erhöhten N-Cadherin-Expression begleitet. Dieser Effekt wurde in der Literatur bei Melanomen beschrieben und als *cadherin switch* bezeichnet [98-100].

Mit zwei unabhängigen Methoden - Western-Blot und Sandwich-immunoassay - wurde die Expression von E- und N-Cadherin in β -Catenin-mutierten, hepatozellulären Tumoren der Maus untersucht (siehe Abbildung 3.34). Mit sehr hoher Signifikanz ($P < 0,0004$) wurde eine Korrelation zwischen der Mutation von *Catnb* in diesen Tumoren und einer ca. 5fach verminderten E-Cadherin Expression gezeigt. Es bleibt offen, ob die Expression von E-Cadherin auf transkriptioneller oder auf Proteinebene negativ beeinflusst wurde. Gleichzeitig konnte die Menge an N-Cadherin auf Proteinebene bestimmt und eine Verdopplung beobachtet werden (siehe Abbildung 3.35).

Die Verschiebung der E-Cadherin-Expression hin zu einer vermehrten N-Cadherin Expression erlaubt möglicherweise auch hier den Tumorzellen, bestehende Zell-Zell-Verbindungen zu gesunden Zellen aufzuheben und leichter zu migrieren und zu metastasieren. Die verminderte Expression von E-Cadherin und die leicht erhöhte N-Cadherin Expression weisen auf einen solchen Effekt in den hier untersuchten Proben hin.

4.2.3 Quantifizierung von membranständigem β -Catenin anhand der Cadherin-Komplexe

N- und E-Cadherin sind Bindepartner von β -Catenin an der Zellmembran. Gewöhnlich ist der größte Anteil an β -Catenin von diesen Proteinen an der Membran komplexiert und erfüllt hier seine Adapterfunktion zwischen Zellmembran und Cytoskelett. Diese Interaktion ist maßgebend für die Morphologie von Zellen im Gewebe. Wie in Fraktionierungsexperimenten mit der Colonkarzinom-Zelllinie HCT116 gezeigt, sind mehr als 90% der Menge an β -

Catenin an der Membran lokalisiert [101]. Während der Zellmigration wird die Interaktion zwischen β -Catenin und E-Cadherin aufgehoben und die cytosolische Fraktion an β -Catenin steigt an [102]. Die Regulation dieser Interaktion erfolgt über die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 654 [50, 52, 102]. Ko-Immunpräzipitationen der Cadherin/ β -Catenin-Komplexe können indirekt Aufschluss über die im Cytosol verfügbare Menge an β -Catenin geben.

Die Ko-Immunpräzipitation wird verwendet, um die Interaktion von Proteinen und die Zusammensetzung von Proteinkomplexen nachzuweisen. Für eine Analyse muss jedoch eine relativ große Menge an Protein eingesetzt werden. Daher sind viele Untersuchungen mit Tumorgewebe aufgrund der limitierten Menge an Probenmaterial problematisch. Um den Verbrauch an Probenmaterial zu senken, wurde diese Methode an die Mikrosphären-basierte Mikroarraytechnologie adaptiert. Es wurden Ko-Immunpräzipitationen für β -Catenin, N-Cadherin und E-Cadherin parallelisiert und miniaturisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass 30 μ g Proteinlysat ausreichen, um 7 Präzipitationen durchzuführen. Bei Verwendung der klassischen Methode hätten ca. 4 mg Protein eingesetzt werden müssen. Das bedeutet eine Reduktion des Verbrauchs an Probenmaterial ca. um den Faktor 100. Durch die Verwendung von miniaturisierten Assays konnte der Antikörperverbrauch sogar um den Faktor 200 gegenüber der klassischen Methode gesenkt werden. Die enorme Reduktion des Zeitaufwands stellt jedoch den größten Gewinn dieser Methode dar. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch das Fehlen der Größenkontrolle der präzipitierten Proteine. Im Western-Blot bestätigt - neben der Detektion durch den spezifischen Antikörper - die Größe des Proteins das Ergebnis. Damit werden zwei voneinander unabhängige Eigenschaften des Proteins im Western-Blot ausgenutzt. Die hier gezeigte Technik verwendet in zwei unabhängigen Experimenten Antikörper für beide Interaktionspartner als Fängerantikörper in der Immunpräzipitation. Damit wird das Experiment auch in reziproker Konfiguration durchgeführt und das Ergebnis auf diese Weise abgesichert. Vorteilhaft für die Entwicklung solcher Assays ist die genaue Information über die Epitope der Antikörper und der Interaktionsstellen der Proteine, da der Nachweis im Gegensatz zur klassischen Methode am intakten Komplex erfolgt. Zwei Bedingungen müssen erfüllt sein: Die Epitope der beiden Antikörper müssen weit

genug voneinander entfernt sein, um die Bindung zu gewährleisten. Außerdem müssen Epitope und Interaktionsstellen in verschiedenen Proteinbereichen liegen, da das Epitop ansonsten im Proteinkomplex maskiert ist. Mit der hier beschriebenen Technik können etablierte Ko-Immunitpräzipitationen mit geringen Probenmengen und vor allem mit hohem Durchsatz angewandt werden, so dass die klassische Ko-Immunitpräzipitation von der miniaturisierten Methode ergänzt wird.

Die Messung des E-Cadherin/ β -Catenin-Komplexes in den Normalgeweben ergab ca. das 8fache an Signal bzw. die 8fache Menge verglichen mit den *Catnb*-Tumoren (siehe Abbildung 3.36 und Abbildung 3.37). Signifikante Unterschiede im Vorkommen des Komplexes N-Cadherin/ β -Catenin (Abbildung 3.37 und Abbildung 3.38) konnten jedoch nicht gefunden werden.

Gegenüber dem Normalgewebe sind sowohl die E-Cadherin-Expression als auch die Menge des E-Cadherin/ β -Catenin-Komplexes in *Catnb*-Tumoren deutlich verringert. Zudem konnte eine Erhöhung der N-Cadherin-Expression festgestellt werden. Dem entgegen wurde keine signifikante Erhöhung an N-Cadherin/ β -Catenin-Komplex gefunden. Da die Gesamtkonzentration an β -Catenin zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied aufwies, deuten diese Beobachtungen auf eine erhöhte cytosolische Verfügbarkeit von β -Catenin in den hier untersuchten *Catnb*-Tumoren hin. Zu einer Bestätigung dieser Ergebnisse wäre eine Zellfraktionierung mit diesen Proben aufschlussreich gewesen. Eine Fraktionierung mit den über mehrere Jahre tiefgefrorenen Proben war jedoch nicht möglich.

4.2.4 Analyse des Phosphorylierungsmusters und der subzellulären Verteilung von β -Catenin

Neben der Analyse der β -Catenin/ Cadherin-Komplexe wurde mit verschiedenen Sandwichimmunoassays untersucht, ob N-terminal phosphoryliertes β -Catenin in den *Catnb*-Tumoren erhöht vorkommt. Das exprimierte Wildtyp- β -Catenin wird gewöhnlich schnell proteasomal degradiert. Mutiertes β -Catenin hingegen sollte der Theorie nach akkumulieren.

Lediglich mit dem Sandwichimmunoassay für an T41/ S45 phosphoryliertes β -Catenin ließen sich erhöhte Werte in den *Catnb*-Tumoren im Vergleich zu den Normalgeweben messen (siehe 3.3.6). Das Ergebnis weist also wie die Messung der Cadherin-Komplexe auf eine erhöhte Konzentration an β -Catenin im Cytosol von *Catnb*-mutierten HCCs hin. In der zweiten Kontrollgruppe - den HCCs mit Mutationen in anderen Protoonkogenen - konnte jedoch kein Unterschied zu den *Catnb*-Tumoren festgestellt werden. Die Zahl an gemessenen Tumoren ohne *Catnb*-Mutation war jedoch zu klein, um eine sichere Aussage darüber zu treffen, ob diese Erhöhung *Catnb*-tumorspezifisch ist oder in allen Tumoren auftritt. Auf eine *Catnb*-tumorspezifische Erhöhung an N-terminal-phosphoryliertem β -Catenin kann daher nicht geschlossen werden.

Die Analyse der subzellulären Verteilung von β -Catenin in Lebernorgewebe und Lebertumorgewebe von CH3/He-Mäusen mit immunhistochemischen Färbungen erbrachte hinsichtlich von Gesamt- β -Catenin keine Unterschiede. Erstaunlicherweise konnte jedoch allgemein eine ungleiche Verteilung von phosphoryliertem β -Catenin in den Zellen gefunden werden. Die Analyse ergab mit dem S33/ S37/ T41-phosphospezifischen β -Catenin-Antikörper ($\alpha_{\text{bcat}}_{10}$) nur eine Färbung im Cytosol (siehe Abbildung 3.44 a und Tabelle 3.5). Da für diesen Antikörper gezeigt wurde, dass er stark mit einfach phosphoryliertem β -Catenin interagiert (siehe Abbildung 3.9c), liegt die Vermutung nahe, dass kein β -Catenin in diesen Positionen phosphoryliert im Kern vorliegt. Mit $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$, spezifisch für an T41 und S45 phosphoryliertes β -Catenin, ließ sich das Protein jedoch in Zellkernen von Normalgeweben und teilweise in Zellkernen von Tumoren detektieren (Abbildung 3.41b und Tabelle 3.5). Die Analyse der Phosphospezifität der beiden Antikörper mit Phosphopeptid-Arrays und die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen weisen darauf hin, dass ein Teil des β -Catenins in Serin 45 phosphoryliert im Nukleus vorliegt. Mit den nicht phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern $\alpha_{\text{bcat}}_{13}$ und 17 konnte jedoch keine erhöhte Konzentration von β -Catenin im Nukleus festgestellt werden.

Die Untersuchung verschiedener Hepatomzelllinien (Genotyp *Catnb* Wt/ Wt, Wt/ Δ N-Terminus und Wt/ S45) mit den S33/ S37/ T41- und T41/ S45-phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern ergab ebenso - unabhängig von einer *Catnb*-Mutation - eine erhöhte Lokalisation von S45-phosphoryliertem β -Catenin

im Zellkern. Sowohl immuncytochemisch als auch in Western-Blot-Analysen von Kernpräparationen ist die phosphorylierte Form von β -Catenin in den untersuchten Hepatomzelllinien mit $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ (spezifisch für S45/ T41-phosphoryliertes β -Catenin) detektierbar (siehe Abbildung 3.45). Das nukleäre Vorkommen der posttranslational modifizierten Form von β -Catenin ließ sich nach der immuncytochemischen Färbung über das Molekulargewicht im Western-Blot verifizieren (siehe Abbildung 3.53). Der S45-phosphospezifische Antikörper ($\alpha_{\text{bcat}}_{12}$) wurde nur im Western-Blot eingesetzt, da er für Färbungen von Gewebeschnitten oder Zellkulturen nicht geeignet ist (Herstellerangabe: Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA). Mit dieser Analyse lässt sich eine Kernlokalisierung von β -Catenin in den Zellkulturen zeigen (siehe Abbildung 3.53). Im Falle der Zelllinie 56.1b konnte jedoch nur mit Immuncytochemie eine schwache nukleäre Lokalisation mit dem phosphospezifischen Antikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ nachgewiesen werden. In der nukleären Fraktion war im Western-Blot kein Signal zu detektieren.

Interessanterweise konnte mit nicht phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern nur bei Verwendung bestimmter IgGs ($\alpha_{\text{bcat}}_{16}$ und 17) eine Kernlokalisierung in den Zelllinien gezeigt werden (siehe Abbildung 3.46 und Abbildung 3.47). Ein für den C-Terminus spezifischer Antikörper war nur in der Lage membranständiges β -Catenin zu detektieren (siehe Abbildung 3.50). Dies legt die Vermutung nahe, dass hier der C-Terminus des kernlokalisierten β -Catenin von anderen Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren komplexiert ist. Die nukleäre Färbung der Zelllinien mit Antikörper $\alpha_{\text{bcat}}_{16}$ (siehe Abbildung 3.46) ist von besonderer Bedeutung, da eine Phosphorylierung an Threonin 41 eine Interaktion des Antikörpers mit β -Catenin verhindert (siehe Abbildung 3.11). Dies spricht für die Abwesenheit von T41-phosphoryliertem β -Catenin, schließt aber eine Anwesenheit von S45-phosphoryliertem Protein nicht aus.

So wurde sowohl mit Serin 45-phosphospezifischen ($\alpha_{\text{bcat}}_{11}$ und 12) als auch mit nicht phosphospezifischen Antikörpern β -Catenin im Nukleus von Hepatomzelllinien nachgewiesen. In Normalgeweben und Tumorgeweben konnte jedoch nur mit T41/ S45-phosphospezifischen β -Catenin-Antikörpern eine Lokalisation von β -Catenin im Kern gezeigt werden. Eine funktionelle Aktivität von Serin 45-phosphoryliertem β -Catenin wurde jedoch bisher nicht untersucht. Die

Ergebnisse legen nahe, dass S45-phosphoryliertes β -Catenin im Kern lokalisiert ist und eine Funktion ausübt. Daher bieten sich EMSA-Studien mit den phosphospezifischen Antikörpern an. In einer Veröffentlichung von Sadot et al. wurden EMSA-Studien mit den phosphospezifischen Antikörpern (α_{bcat_8} und 9) gezeigt. Es konnte dabei keine DNA-Bindung von phospho- β -Catenin an TCF-Promotersequenzen nachgewiesen werden. In dieser Untersuchung wurden jedoch nur Antikörper verwendet, die phosphoryliertes Serin 33 und Serin 37 erkennen. Damit wird eine transkriptionelle Aktivität von Serin 45-phosphoryliertem β -Catenin nicht ausgeschlossen. Ein weiterer Hinweis für eine besondere Funktion von S45-phosphoryliertem β -Catenin wäre in der Tatsache zu sehen, dass bei der Genotypisierung der *Catnb*-mutierten Maus-HCCs von Aydilinek et al. keine Mutationen in Codon 45 gefunden wurden. Dies deutet auf eine Notwendigkeit zum Erhalt dieser Aminosäure an dieser Position hin. Die Ergebnisse einer Affymetrix-mRNA-Analyse von humanen HCCs untermauern diese Hypothese. Es wurden klare Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Tumoren mit Codon 45-Mutation im *Catnb*-Gen und Tumoren, die in den vorderen Phosphorylierungsstellen mutiert waren, festgestellt (persönliche Mitteilung M. Schwarz). Es liegen also mehrere Hinweise vor, die auf funktionelle Unterschiede von β -Catenin mit unterschiedlichem Phosphorylierungsmuster in der Leber hindeuten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Teil von nukleärem β -Catenin in Hepatocyten und Hepatomzellen phosphoryliert an Serin 45 vorliegt. Eine biologische Funktion von S45-phosphoryliertem β -Catenin wäre durch eine Überexpression von S45- bzw. S33-punktmutiertem β -Catenin in Hepatomzelllinien zu belegen. Eine Interaktion von S45-phosphoryliertem β -Catenin mit einem anderen Transkriptionsfaktor wäre eine nahe liegende Erklärung für die nukleäre Lokalisation des Proteins. Unterschiedliche mRNA-Expressionsprofile dieser überexprimierenden Zellen würden auf unterschiedliche Interaktionspartner bzw. Transkriptionsfaktoren hinweisen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Protoonkogen β -Catenin ist das terminale Effektormolekül im Wnt-/ β -Catenin-Signalweg. Seine zellulären Funktionen – Transkriptionsfaktor oder Zellstrukturmolekül – werden über Konzentration, Phosphorylierung und Komplexierung mit Cadherinen bestimmt. Daher wurden in β -Catenin-mutierten hepatozellulären Tumoren der Maus (i) das komplexe Phosphorylierungsmuster, (ii) die Komplexierung mit Cadherinen und (iii) die zelluläre Verteilung von β -Catenin untersucht, um einen Selektionsvorteil dieser speziellen Tumore zu erklären. Durch Etablierung multiplexer Mikroarray-basierter Sandwichimmunoassays waren diese Analysen mit minimalen Probenmengen durchführbar.

Die Messung der Gesamtkonzentration an β -Catenin in den β -Catenin-Tumoren ergab, wie auch schon von Aydinlik *et al.* (Oncogene, 2001) gezeigt, keine erhöhte Konzentration gegenüber dem Normalgewebe. Der Selektionsvorteil dieser hepatozellulären Tumore konnte somit nicht, wie z. B. bei Colon-Tumoren, auf eine erhöhte Gesamtkonzentration an β -Catenin zurückgeführt werden.

Nach dem Aufbau einer miniaturisierten Ko-Immünpräzipitation konnten funktionelle β -Catenin/ Cadherin-Komplexe auch in geringen Mengen Tumorlysat detektiert und so membranständiges β -Catenin über seinen Interaktionspartner Cadherin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse weisen auf eine erhöhte cytosolische Menge an β -Catenin hin und geben eine mögliche neue Erklärung für einen Selektionsvorteil dieser Tumore. Gleichzeitig konnte eine erhöhte N-Cadherin- und eine erniedrigte E-Cadherin-Expression mit der β -Catenin-Mutation korreliert werden. Dies deutet auf einen so genannten *Cadherin-Switch* hin, welcher in Tumoren mit erhöhter Malignität beobachtet wird.

Die subzelluläre Lokalisation und der komplexe Phosphorylierungsstatus von β -Catenin in Lebergeweben und Zelllinien wurde mit Antikörpern untersucht, die über ein neu entwickeltes durchsatzfähiges Peptid-Mikroarray-basiertes System hinsichtlich Phosphoselektivität, Sequenzspezifität, Affinität und minimaler Bindesequenz charakterisiert wurden. Erstmals konnte die Lokalisation von Serin 45-phosphoryliertem β -Catenin im Kern von Maus-Lebernorgangeweben, Maus-Lebertumorgeweben und in unstimulierten Maus-Hepatomzelllinien gezeigt werden. Dies weist auf eine besondere Funktion dieser modifizierten Form von β -Catenin im Kern hin.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Chipping Forecast II. *Nat Genet* **32supp**, 461-552 (2002).
- [2] Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. and Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 1720-1730 (1999).
- [3] Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. and Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9390-9395 (2000).
- [4] Templin, M. F., Stoll, D., Schwenk, J. M., Potz, O., Kramer, S. and Joos, T. O. Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* **3**, 2155-2166 (2003).
- [5] MacBeath, G. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* **32 Suppl**, 526-532 (2002).
- [6] Poetz, O., Schwenk, J. M., Kramer, S., Stoll, D., Templin, M. F. and Joos, T. O. Protein microarrays: catching the proteome. *Mech Ageing Dev*, (online available-in press) (2004).
- [7] Miller, J. C., Zhou, H., Kwekel, J., Cavallo, R., Burke, J., Butler, E. B., Teh, B. S. and Haab, B. B. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* **3**, 56-63 (2003).
- [8] Sreekumar, A., Nyati, M. K., Varambally, S., Barrette, T. R., Ghosh, D., Lawrence, T. S. and Chinnaiyan, A. M. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res* **61**, 7585-7593 (2001).
- [9] Nishizuka, S., Charboneau, L., Young, L., Major, S., Reinhold, W. C., Waltham, M., Kouros-Mehr, H., Bussey, K. J., Lee, J. K., Espina, V., Munson, P. J., Petricoin, E., 3rd, Liotta, L. A. and Weinstein, J. N. Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14229-14234 (2003).
- [10] Paweletz, C. P., Charboneau, L., Bichsel, V. E., Simone, N. L., Chen, T., Gillespie, J. W., Emmert-Buck, M. R., Roth, M. J., Petricoin, I. E. and Liotta, L. A. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* **20**, 1981-1989 (2001).

- [11] Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R. A., Gerstein, M. and Snyder, M. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **293**, 2101-2105 (2001).
- [12] Carson, R. T. and Vignali, D. A. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* **227**, 41-52. (1999).
- [13] Grebenchtchikov, N., Brinkman, A., Van Broekhoven, S. P., De Jong, D., Geurts-Moespot, A., Span, P. N., Peters, H. A., Portengen, H., Foekens, J. A., Sweep, C. G. and Dorssers, L. C. Development of an ELISA for Measurement of BCAR1 Protein in Human Breast Cancer Tissue. *Clin Chem* **50**, 1356-1363 (2004).
- [14] Bellisario, R., Colinas, R. J. and Pass, K. A. Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay. *Early Hum Dev* **64**, 21-25. (2001).
- [15] Dunbar, S. A., Vander Zee, C. A., Oliver, K. G., Karem, K. L. and Jacobson, J. W. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods* **53**, 245-252 (2003).
- [16] Finckh, P., Berger, H., Karl, J., Eichenlaub, U., Weindel, K., Hornauer, H., Lenz, H., Sluka, P., Weinreich, G. e., Chu, F. and Ekins, R. Microspot - an ultrasensitive microarray-based ligand assay system. A practical application of ambient analyte assay theory. *Proc UK NEQAS Meeting* **3**, 155-165 (1998).
- [17] De Jager, W., Te Velthuis, H., Prakken, B. J., Kuis, W. and Rijkers, G. T. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 133-139 (2003).
- [18] Knight, P. R., Sreekumar, A., Siddiqui, J., Laxman, B., Copeland, S., Chinnaiyan, A. and Remick, D. G. Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. *Shock* **21**, 26-30 (2004).
- [19] Nielsen, U. B., Cardone, M. H., Sinskey, A. J., MacBeath, G. and Sorger, P. K. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9330-9335 (2003).
- [20] McBride, M. T., Gammon, S., Pitesky, M., O'Brien, T. W., Smith, T., Aldrich, J., Langlois, R. G., Colston, B. and Venkateswaran, K. S. Multiplexed liquid arrays for simultaneous detection of simulants of biological warfare agents. *Anal Chem* **75**, 1924-1930 (2003).

- [21] McBride, M. T., Masquelier, D., Hindson, B. J., Makarewicz, A. J., Brown, S., Burris, K., Metz, T., Langlois, R. G., Tsang, K. W., Bryan, R., Anderson, D. A., Venkateswaran, K. S., Milanovich, F. P. and Colston, B. W., Jr. Autonomous detection of aerosolized *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. *Anal Chem* **75**, 5293-5299 (2003).
- [22] Prabhakar, U., Eirikis, E. and Davis, H. M. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay. *J Immunol Methods* **260**, 207-218 (2002).
- [23] Shao, W., Zhou, Z., Laroche, I., Lu, H., Zong, Q., Patel, D. D., Kingsmore, S. and Piccoli, S. P. Optimization of Rolling-Circle Amplified Protein Microarrays for Multiplexed Protein Profiling. *J Biomed Biotechnol* **2003**, 299-307 (2003).
- [24] Schweitzer, B., Roberts, S., Grimwade, B., Shao, W., Wang, M., Fu, Q., Shu, Q., Laroche, I., Zhou, Z., Tchernev, V. T., Christiansen, J., Velleca, M. and Kingsmore, S. F. Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nat Biotechnol* **20**, 359-365 (2002).
- [25] Ekins, R. P. Multi-analyte immunoassay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 155-168 (1989).
- [26] Chen, R., Lowe, L., Wilson, J. D., Crowther, E., Tzeggai, K., Bishop, J. E. and Varro, R. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem* **45**, 1693-1694. (1999).
- [27] Fulton, R. J., McDade, R. L., Smith, P. L., Kienker, L. J. and Kettman, J. R., Jr. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* **43**, 1749-1756. (1997).
- [28] Kohler, G. and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- [29] Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A. and Virnekas, B. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* **296**, 57-86 (2000).
- [30] Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R. and Pluckthun, A. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14130-14135 (1998).

- [31] Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A. and Pluckthun, A. Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* **18**, 1287-1292 (2000).
- [32] Phelan, M. L. and Nock, S. Generation of bioreagents for protein chips. *Proteomics* **3**, 2123-2134 (2003).
- [33] Hahnefeld, C., Drewianka, S. and Herberg, F. W. Determination of kinetic data using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Mol Med* **94**, 299-320 (2004).
- [34] Reineke, U., Volkmer-Engert, R. and Schneider-Mergener, J. Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 59-64 (2001).
- [35] Reineke, U., Sabat, R., Misselwitz, R., Welfle, H., Volk, H. D. and Schneider-Mergener, J. A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. *Nat Biotechnol* **17**, 271-275 (1999).
- [36] Reineke, U., in: Lo, B. K. C. (Ed.), *Methods Mol Biol*, Humana Press, Totowa 2003, pp. 443-463.
- [37] Panse, S., Dong, L., Burian, A., Carus, R., Schutkowski, M., Reimer, U. and Schneider-Mergener, J. Profiling of generic anti-phosphopeptide antibodies and kinases with peptide microarrays using radioactive and fluorescence-based assays. *Mol Divers* **8**, 291-299 (2004).
- [38] Reimer, U., Reineke, U. and Schneider-Mergener, J. Peptide arrays: from macro to micro. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 315-320 (2002).
- [39] Falsey, J. R., Renil, M., Park, S., Li, S. and Lam, K. S. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug Chem* **12**, 346-353 (2001).
- [40] Houseman, B. T., Huh, J. H., Kron, S. J. and Mrksich, M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat Biotechnol* **20**, 270-274 (2002).
- [41] Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. and Solas, D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**, 767-773 (1991).
- [42] Gao, X., Zhou, X. and Gulari, E. Light directed massively parallel on-chip synthesis of peptide arrays with t-Boc chemistry. *Proteomics* **3**, 2135-2141 (2003).

- [43] Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **297**, 63-64 (2002).
- [44] <http://www.dkfz.de> *Krebsatlas*
- [45] Befeler, A. S. and Di Bisceglie, A. M. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* **122**, 1609-1619 (2002).
- [46] Buendia, M. A. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* **10**, 185-200 (2000).
- [47] Giles, R. H., van Es, J. H. and Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**, 1-24 (2003).
- [48] Rattis, F. M., Voermans, C. and Reya, T. Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol* **11**, 88-94 (2004).
- [49] Dihlmann, S. and von Knebel Doeberitz, M. Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int J Cancer* **113**, 515-524 (2005).
- [50] Piedra, J., Martinez, D., Castano, J., Miravet, S., Dunach, M. and de Herreros, A. G. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 20436-20443 (2001).
- [51] Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H. G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A. and Dunach, M. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* **23**, 2287-2297 (2003).
- [52] Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A. and Dunach, M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **274**, 36734-36740 (1999).
- [53] Nelson, W. J. and Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-1487 (2004).
- [54] Playford, M. P., Bicknell, D., Bodmer, W. F. and Macaulay, V. M. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12103-12108 (2000).
- [55] Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. and He, X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837-847 (2002).

- [56] Liu, C., Kato, Y., Zhang, Z., Do, V. M., Yankner, B. A. and He, X. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6273-6278 (1999).
- [57] Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**, 3797-3804 (1997).
- [58] Aydinlik, H., Nguyen, T. D., Moennikes, O., Buchmann, A. and Schwarz, M. Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene* **20**, 7812-7816 (2001).
- [59] Cui, J., Zhou, X., Liu, Y., Tang, Z. and Romeih, M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* **18**, 280-287 (2003).
- [60] Devereux, T. R., Anna, C. H., Foley, J. F., White, C. M., Sills, R. C. and Barrett, J. C. Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene* **18**, 4726-4733 (1999).
- [61] Nhieu, J. T., Renard, C. A., Wei, Y., Cherqui, D., Zafrani, E. S. and Buendia, M. A. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* **155**, 703-710 (1999).
- [62] Loeppen, S., Schneider, D., Gaunitz, F., Gebhardt, R., Kurek, R., Buchmann, A. and Schwarz, M. Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital. *Cancer Res* **62**, 5685-5688 (2002).
- [63] Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Levy, L., Lamers, W. H., Kitajewski, J., Kahn, A. and Perret, C. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* **21**, 8293-8301 (2002).
- [64] Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y. and Alkalay, I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* **16**, 1066-1076 (2002).
- [65] *Production of antipeptide antisera*, New York 1994.
- [66] Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L. and Goldberg, M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* **77**, 305-319 (1985).

- [67] Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L. and Goldberg, M. E. Under proper experimental conditions the solid-phase antigen does not disrupt the liquid phase equilibrium when measuring dissociation constants by competition ELISA. *J Immunol Methods* **182**, 145-150 (1995).
- [68] Moennikes, O. Untersuchung zur Rolle von Cx32 in der chemisch induzierten Hepatokanzerogenese im Mausmodell. *Dissertation, Tübingen* (2000).
- [69] Moennikes, O., Buchmann, A., Romualdi, A., Ott, T., Werringloer, J., Willecke, K. and Schwarz, M. Lack of phenobarbital-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in connexin32-null mice. *Cancer Res* **60**, 5087-5091 (2000).
- [70] Stahl, S. Untersuchungen zur differentiellen Genexpression in der Leber von Connexin32-Knock-out- und Connexin32-Wildtyp-Mäusen sowie in Lebertumoren mit Mutationen im β -Catenin- bzw. Ha-ras-Onkogen. *Dissertation, Tübingen* (2004).
- [71] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).
- [72] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- [73] Moos, M., Jr., Nguyen, N. Y. and Liu, T. Y. Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J Biol Chem* **263**, 6005-6008 (1988).
- [74] Kubo, K. Effect of incubation of solutions of proteins containing dodecyl sulfate on the cleavage of peptide bonds by boiling. *Anal Biochem* **225**, 351-353 (1995).
- [75] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354 (1979).
- [76] Kress, S., König, J., Schweizer, J., Lohrke, H., Bauer-Hofmann, R. and Schwarz, M. p53 mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors. *Mol Carcinog* **6**, 148-158 (1992).
- [77] Acar, A. Aktivierung von β -Catenin durch Genmutation in kultivierten Hepatomzellen. *Dissertation, Tübingen* (2005).

- [78] Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R. and Hoschuetzky, H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* **107** (Pt 12), 3655-3663 (1994).
- [79] Merrifield, R. B. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **85**, 2149-2154 (1963).
- [80] Fields, G. B. and Noble, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* **35**, 161-214 (1990).
- [81] Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. and Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* **34**, 595-598 (1970).
- [82] Poetz, O. Miniaturisierte und parallelisierte Ligandenbindungsassays zur Charakterisierung peptidspezifischer Antikörper. *Diplomarbeit, Tübingen* (2001).
- [83] Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A. and Rothe, C. Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem* **278**, 38194-38205 (2003).
- [84] Poetz, O., Ostendorp, R., Brocks, B., Schwenk, J. M., Stoll, D., Joos, T. O. and Templin, M. F. Protein microarrays for antibody profiling: Specificity and affinity determination on a chip. *Proteomics* **5**, 2402-2411 (2005).
- [85] Jameson, B. A. and Wolf, H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* **4**, 181-186 (1988).
- [86] Nieba, L., Krebber, A. and Pluckthun, A. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **234**, 155-165 (1996).
- [87] Orford, K., Crockett, C., Jensen, J. P., Weissman, A. M. and Byers, S. W. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* **272**, 24735-24738 (1997).
- [88] van Noort, M., Meeldijk, J., van der Zee, R., Destree, O. and Clevers, H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* **277**, 17901-17905 (2002).
- [89] Sadot, E., Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Shnizer, D., Lando, Z., Zharhary, D., Kam, Z., Ben-Ze'ev, A. and Geiger, B. Regulation of S33/S37

phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci* **115**, 2771-2780 (2002).

[90] Serres, M., Grangeasse, C., Haftek, M., Durocher, Y., Duclos, B. and Schmitt, D. Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. *Exp Cell Res* **231**, 163-172 (1997).

[91] Micsenyi, A., Tan, X., Sneddon, T., Luo, J. H., Michalopoulos, G. K. and Monga, S. P. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* **126**, 1134-1146 (2004).

[92] Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**, 1837-1851 (2000).

[93] Sachs, L., *Angewandte Statistik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1996, p. 149.

[94] Nuruki, K., Toyoyama, H., Ueno, S., Hamanoue, M., Tanabe, G., Aikou, T. and Ozawa, M. E-cadherin but not N-cadherin expression is correlated with the intracellular distribution of catenins in human hepatocellular carcinomas. *Oncol Rep* **5**, 1109-1114 (1998).

[95] Hirohashi, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* **153**, 333-339 (1998).

[96] Hajra, K. M., Chen, D. Y. and Fearon, E. R. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* **62**, 1613-1618 (2002).

[97] Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Polette, M., Bruyneel, E., Laronze, J. Y., Bonnet, N., Foidart, J. M., Mareel, M. and Birembaut, P. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer* **105**, 790-795 (2003).

[98] Cavallaro, U. and Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 118-132 (2004).

[99] Gruss, C. and Herlyn, M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr Opin Oncol* **13**, 117-123 (2001).

[100] Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J. L. and Herlyn, M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* **113** (Pt 9), 1535-1542 (2000).

[101] Reinacher-Schick, A. and Gumbiner, B. M. Apical membrane localization of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein and subcellular distribution of the beta-catenin destruction complex in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **152**, 491-502 (2001).

[102] Muller, T., Choidas, A., Reichmann, E. and Ullrich, A. Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem* **274**, 10173-10183 (1999).

7 PUBLIKATIONSLISTE

Poetz O, Ostendorp R, Brocks B, Schwenk JM, Stoll D, Joos TO and Templin MF (2005) Protein Mikroarrays for Antibody Profiling: Specificity and Affinity Determination on a Chip. *Proteomics* (im Druck)

Poetz O, Schwenk JM, Kramer S, Templin MF and Joos TO (2005) Protein Mikroarrays: Catching the Proteome. *Mechanisms of Ageing and Development* 126(1): 161 – 170

Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Pötz O, Kramer S and Joos TO (2003) Protein Mikroarrays: Promising tool for proteomic research. *Proteomics* 3: 2155 – 2166

Schwenk, J. M., Poetz, O. and Kramer, S. (2003) Zellmikroarrays heute. *Bioforum* 11, 717-719

Schwenk JM and Poetz O (2003) Cell Mikroarrays – Present and Future Applications. *Screening* 5(4): 36 – 37

8 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Oliver Pötz

geboren am 18.März 1974 in Limburg an der Lahn

verheiratet mit Andrea Pötz, zwei Kinder

Ausbildung

3/ 2002 – 7/ 2005 Promotion „*Qualitative und quantitative Analyse von β -Catenin in Catnb-mutierten hepatozellulären Tumoren der Maus mit Array-basierten Methoden*“

Betreuer: Prof. Dr. S Stevanovic,

Interfakultäres Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen

in Kooperation mit

Prof. Dr. M. Schwarz,

Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Universität Tübingen

und

Dr. Thomas Joos

Naturwissenschaftliches und medizinisches Institut an der Universität

Tübingen (NMI)

5/ 2001- 1/ 2002 Diplomarbeit „*Miniaturisierte und parallelisierte Ligandenbindungsassays zur Charakterisierung von peptidspezifischen Antikörpern*“

Betreuer: Prof. Dr. U. Weber

Naturwissenschaftliches Institut der Universität Tübingen (MNF),

Naturwissenschaftliches und medizinisches Institut an der Universität

Tübingen (NMI)

4/ 1996 – 4/ 2001 Studium der Biochemie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

4/ 1995 – 3/ 1996 Studium der Biologie und Chemie, Johannes Gutenberg Universität, Mainz

1993 - 1994 Zivildienst, Malteser Hilfsdienst, Limburg

1984 - 1993 Gymnasium

9 AKADEMISCHE LEHRER

Prof. Dr. Albert

Prof. Dr. Bayer

Prof. Dr. Bisswanger

Prof. Dr. Bock

Prof. Dr. Bohley

Prof. Dr. Breyer-Pfaff

Dr. Buchmann

Prof. Dr. Dringen

Prof. Dr. Eisele

Prof. Dr. Gauglitz

Prof. Dr. Günzl

Prof. Dr. Hagenmaier

Prof. Dr. Hamprecht

Prof. Dr. Hanack

Prof. Dr. Häfelinger

PD Dr. Ilg

Prof. Dr. Jung

Dr. Kalbacher

Prof. Dr. Lindner

Prof. Dr. Mayer

Prof. Dr. Mecke

PD Dr. Münzel

Prof. Dr. Nakel

Prof. Dr. Oberhammer

Prof. Dr. Overath

Prof. Dr. Pfaff

Prof. Dr. Pfeiffer

Prof. Dr. Pommer

Prof. Dr. Probst

Prof. Dr. Rammensee

Prof. Dr. Reinecke

Prof. Dr. Reutter

Prof. Dr. Schwarz

Prof. Dr. Stevanovic

PD Dr. Stoeva

Prof. Dr. Strähle

Prof. Dr. Voelter

Prof. Dr. Voigt

Prof. Dr. Weber

Prof. Dr. Wegmann

Prof. Dr. Werringloer

Prof. Dr. Weser

Prof. Dr. Wiesinger

10 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Stefan Stevanovic** für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Michael Schwarz** möchte ich für Diskussionen und Hilfestellungen danken.

Bei **Dr. T. Joos**, **Dr. D. Stoll** und **Dr. M.F. Templin** für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung in fachlicher und menschlicher Hinsicht.

Dr. Ralf Ostendorp und **Dr. Bodo Brocks** von der MorphoSys AG danke ich für die Kooperation und die Bereitstellung von rekombinanten Fab-Fragmenten

Annette Döttinger danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Markus Herrmann danke ich für die intensive Unterstützung bei der Peptidsynthese.

Bei **Jochen Schwenk**, **Stefan Kramer** und **Michael Hartmann** vom NMI für fruchtbare Diskussionen und erholsame Kaffeepausen zwischendurch.

Ein großes Dankeschön geht an Frau **E. Zabinski**, Frau **J. Mahr** und Frau **S. Vetter** von der Abteilung Toxikologie für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Bei allen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biochemie am NMI und der AG Schwarz in der Toxikologie Tübingen** möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen bedanken.

Besonderer Dank gilt **meinen Eltern, Margret und Klaus Pötz**.

Meiner Frau Andrea und meinen Kindern Mika und Henri danke ich für ihre Geduld und große Unterstützung jeglicher Art, nicht nur während dieser Dissertation.