

Einfluss von Phenobarbital auf den β -Catenin-/ Wnt-Signalweg

Dissertation

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

Vorgelegt von
Nicola Groll
aus Henstedt-Ulzburg

Tübingen
2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

21.10.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Schwarz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanovic

Betreuer an der Eberhard Karls Universität Tübingen

Prof. Dr. Michael Schwarz

und

Prof. Dr. Stefan Stevanović

**Betreuer am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut
an der Universität Tübingen**

Dr. Thomas O. Joos

und

Dr. Oliver Pötz

Inhaltsverzeichnis

Einfluss von Phenobarbital auf den β -Catenin-/ Wnt-Signalweg.....	1
Dissertation	1
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 β -Catenin und der Wnt-Signalweg	3
1.2 Calpain	7
1.3 <i>Cellular sarcoma</i> Kinase.....	9
1.4 Phenobarbital	12
2 Ziel der Arbeit	15
3 Material	17
3.1 Materialien	17
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	17
3.1.2 Antikörper	19
3.1.3 Puffer und Lösungen	20
3.1.4 Zelllinien	24
3.1.5 Bakterienstämme und Expressionsvektoren	24
3.1.6 Plasmide	25
3.1.7 Kits.....	26
3.1.8 Primer für LightCycler-PCR.....	26
3.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	27

3.1.10	Geräte.....	28
3.1.11	Software	29
4	Methoden.....	31
4.1	Zellkultur.....	31
4.1.1	Allgemeines.....	31
4.1.2	Mediumwechsel.....	31
4.1.3	Passagierung.....	32
4.1.4	Zellzahlbestimmung	32
4.1.5	Aussäen	33
4.1.6	Auftauen und Einfrieren von Zellen	33
4.1.7	Zellbehandlung.....	34
4.1.8	AlamarBlue Assay.....	35
4.1.9	Transiente Transfektion	35
4.1.10	Tet-On Induzierbare Expression von β -Catenin ^{S33Y}	35
4.2	Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	37
4.2.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	37
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	38
4.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry.....	39
4.2.4	LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
4.2.5	Coomassie-Färbung.....	40
4.2.6	Western Blot.....	40
4.2.7	Immunhistochemische Färbung.....	41
4.3	Mikrosphären- basierte Methoden	42
4.3.1	Kovalente Immobilisierung von Proteinen auf Carboxyl-funktionalisierten Polystyrolmikrosphären	44

4.3.2	Nicht-kovalente Immobilisierung von Proteinen auf Carboxyl-funktionalisierten Polystyrolmikrosphären	45
4.3.3	Probenvorbereitung für den β -Catenin-Assay	46
4.3.4	β -Catenin Assay	46
4.3.5	Protein-Protein-Interaktion.....	47
4.4	Luziferase Assays	48
4.5	mRNA-Expressions-Analysen.....	49
4.5.1	RNA Isolierung.....	49
4.5.2	Reverse Transkription	49
4.5.3	Real-time-PCR.....	50
4.6	Assays zur Messung der Calpain Aktivität	54
4.6.1	Assay zur Messung der Calpain Aktivität von Abcam	54
4.6.2	Assay zur Messung der Calpain Aktivität von Merck Millipore.....	54
4.7	Src Aktivität Assay.....	55
4.7.1	Zelllyse.....	55
4.7.2	ProFluor® Src-Kinase Aktivitäts Assay	55
4.8	Pulsed-SILAC Assay	56
4.8.1	Zellkultur und Behandlung	57
4.8.2	Zelllyse.....	57
4.8.3	Tryptische Proteolyse.....	57
4.8.4	β -Catenin Immunopräzipitation.....	58
4.8.5	LC-MS-Analyse.....	59
4.8.6	Vergleich der β -Catenin Peptide mittels tSIM-MS (targeted Single Ion Monitoring)	
	59	
5	Ergebnisse	61

5.1	Einfluss von Phenobarbital auf Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.....	61
5.1.1	Immunhistologische Färbungen.....	61
5.1.2	Western Blot Analysen.....	62
5.1.3	Zeitliche Änderung der verschiedenen β -Catenin-Spezies	65
5.1.4	Einfluss von Phenobarbital auf die Protein-Protein-Interaktion von β -Catenin.....	72
5.1.5	Untersuchung der Aktivität des Wnt-Signalwegs	74
5.1.6	mRNA-Expressionsanalysen	78
5.1.7	Einfluss des CAR-Agonisten TCPOBOP auf den Wnt-Signalweg.....	81
5.2	Einfluss von Phenobarbital auf Calpain	82
5.2.1	mRNA Expression der Calpaine	82
5.2.2	Assay zur Messung der Calpain-Aktivität von Abcam	84
5.2.3	Assay zur Messung der Calpain-Aktivität von Merck Millipore	85
5.2.4	Western Blot-Analysen.....	86
5.2.5	Einfluss von Calpain-Inhibitoren auf den Wnt-Signalweg.....	88
5.3	Einfluss von Phenobarbital auf Src	90
5.3.1	Assay zur Messung der Src-Aktivität	90
5.3.2	Einfluss von Src- und EGFR-Inhibitoren auf den Wnt-Signalweg	91
5.4	Einfluss von Phenobarbital auf die β -Catenin-Synthese	94
5.4.1	mRNA Expression von β -Catenin.....	94
5.4.2	Hemmung der Proteinbiosynthese von β -Catenin durch Cycloheximid.....	95
5.4.3	Untersuchung der Neusynthese von β -Catenin	99
6	Diskussion.....	101
7	Zusammenfassung.....	111
8	Literatur.....	113
9	Publikationsliste	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die 10 Eigenschaften von Tumorzellen nach Hanahan und Weinberg [2].	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung von β -Catenin.	4
Abbildung 3: Kanonischer Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.	5
Abbildung 4: Einfluss von Calpain auf den Wnt-Signalweg.	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Src-Kinase.	9
Abbildung 6: Regulierung der Translation durch Src.	10
Abbildung 7: STF Reporter Vektor.	25
Abbildung 8: pRL-CMV Reporter-Vektor (Promega).	25
Abbildung 9: Standard-Ausführung der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.	32
Abbildung 10: Die xMAP Technologie der Firma Luminex.	42
Abbildung 11: Schematischer Aufbau des β -Catenin Assays.	43
Abbildung 12: <i>Firefly</i> -Luziferase Reaktion.	48
Abbildung 13: SYBER Green.	50
Abbildung 14: Prinzip des Pulsed-SILAC.	56
Abbildung 15: Immunhistologische Fluoreszenzmikroskopie.	62
Abbildung 16: Änderung des β -Catenin-Spiegels nach Behandlung von 70.4 Zellen mit MG132 und Phenobarbital.	63
Abbildung 17: Zeitliche Änderung der gesamten β -Catenin-Menge in 70.4 K15 Zellen.	66
Abbildung 18: Zeitliche Änderung der verschiedenen Phosphorylierungsspezies von β -Catenin in 70.4 K15 Zellen.	67
Abbildung 19: Zeitliche Änderung des zur Bindung „freien“ β -Catenins in 70.4 K15 Zellen.	70
Abbildung 20: Zeitliche Änderung des an E-Cadherin gebundenen β -Catenins in 70.4 K15 Zellen.	71
Abbildung 21: Einfluss von Phenobarbital auf die Protein-Protein-Interaktion von β -Catenin.	72
Abbildung 22: Einfluss von Proteasom-Inhibitoren und Phenobarbital auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.	74
Abbildung 23: Einfluss von S33Y β -Catenin und Phenobarbital auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.	75

Abbildung 24: Einfluss von Phenobarbital auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.....	76
Abbildung 25: Relative mRNA Expression des β -Catenin-Zielgens Axin2	78
Abbildung 26: Relative mRNA Expression von CAR, RXR, Connexin32, Cyp2B10 und Cyp2C.....	79
Abbildung 27: Einfluss von TC auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.....	81
Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von μ Calpaine und mCalpain	83
Abbildung 29:Relative Calpain-Aktivität (Abcam).....	84
Abbildung 30: Relative Calpain Aktivität (Millipore).....	85
Abbildung 31: Änderung der Calpain-Menge.....	86
Abbildung 32: Western Blot Analyse der Calpain Substrate β -Catenin und EGFR.....	87
Abbildung 33:Effekt verschiedener Calpain-Inhibitoren, LiCl und Phenobarbital auf den Wnt- / β -Catenin-Signalweg	89
Abbildung 34: Relative Src-Aktivität (ProFluor®Src-Family Kinase Assay)	90
Abbildung 35: Effekt von Src-Inhibitoren, LiCl und Phenobarbital auf den Wnt- / β -Catenin-Signalweg.....	92
Abbildung 36: Effekt von EGFR-Inhibitoren, LiCl und Phenobarbital auf den Wnt- / β -Catenin-Signalweg.....	93
Abbildung 37:Relative mRNA-Expression von <i>Ctnnb1</i>	94
Abbildung 38:Mikrosphären-basierter Sandwich-Immunoassay (Sandwich-Immunoassay).	96
Abbildung 39: Mikrosphären-basierter Sandwich-Immunoassay (Protein-Protein-Interaktions Assay).....	98
Abbildung 40:Messung der Neusyntheserate von β -Catenin (Pulsed SILAC).	100
Abbildung 41: Einfluss der Src- und Calpain-Aktivität auf den Wnt-Signalweg.....	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 2: Antikörper.....	19
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 4: Zelllinien	24
Tabelle 5: Bakterienstämme und Expressionsvektoren.....	24
Tabelle 6: Kits	26
Tabelle 7: Primer für LightCycler-PCR	26
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 9: Geräte	28
Tabelle 10: Software.....	29
Tabelle 11: Kulturschalen mit verwendeten Medium-Volumina.....	31
Tabelle 12: Zellzahl der für die Versuche ausgesäten Zellen	33
Tabelle 13: Konzentration und Wirkung der zur Behandlung eingesetzten Substanzen	34
Tabelle 14: Antikörper Verdünnungen.....	41
Tabelle 15: Kopplungskonzentration der immobilisierten Antikörper	45
Tabelle 16: Automatisierte Assay Durchführung in der KingFisher96®-Plattform	47
Tabelle 17: RT-PCR Reaktionsansatz	50
Tabelle 18: LightCycler Programm für Axin2.....	52
Tabelle 19: LightCycler Programm für β -Aktin	52
Tabelle 20: LightCycler Programm für β -Catenin	52
Tabelle 21: LightCycler Programm für Calpain-Variante 1	52
Tabelle 22: LightCycler Programm für Calpain-Variante 2	52
Tabelle 23: LightCycler Programm für Connexin 32.....	53
Tabelle 24: LightCycler Programm für Cyp2C.....	53
Tabelle 25: LightCycler Programm für Cyp2B10	53
Tabelle 26: LightCycler Programm für 18s rRNA.....	53
Tabelle 27: Gerätekonfiguration der tSIM-Messmethode	60

Abkürzungsverzeichnis

α	Anti
Abl1	<i>Abelson murinleukemia viral oncogen homolog 1</i>
ADP	Avalanche-Photodioden
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol Propionsäure
AMV	<i>Avian myoblastosis virus</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AR	<i>Armadillo repeats</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Essigsäure
bp	Basenpaare
β -TrCP	<i>β transductin repeats-containing protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Calp1	μ Calpain
Calp2	mCalpain
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
Ck	Casein-Kinase
<i>Ctnnb1</i>	β -Catenin-Gen
Da	Dalton
DEN	Diethylnitrosamin
dk	Esel (<i>donkey</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified Eagle medium: nutrient mixture F-12</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
Dvl	<i>Dishvelled</i>
ECAD	E-Cadherin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ECT</i>	<i>E-cadherin cytosolic tail</i>
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein</i>

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
et al.	Und andere (<i>et alii</i>)
FKS	Fetales Kälberserum
fwd	Vorwärts (<i>forward</i>)
Fzd	Frizzled-Transmembranrezeptor
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GS	Glutamin Synthetase
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
GST	Glutathion-S-Transferase
gt	Ziege (<i>goat</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
HCA	<i>hepatocellular adenoma</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HGF	<i>Hepatocyt-growth factor</i>
hu	Mensch (<i>human</i>)
ICAT	<i>Inhibitor of β-catenin</i>
IRAC	<i>International agency for research on cancer</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LEF	<i>Lymphocyte enhancer binding factor</i>
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor related protein</i>
m / z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>median fluorescence intensity</i>)
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mRNA	<i>message ribonucleic acid</i>
ms	Maus (<i>mouse</i>)
MS	Massenspektrometrie

XII

MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	Anzahl (<i>number</i>)
nL	Nanoliter
p53	Protein mit der Masse 53 kDa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PKA	Protein-Kinase A
PXR	<i>Pregnan-X-receptor</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
rbt	Kaninchen (<i>rabbit</i>)
rev	Rückwärts (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Ser	Serin
SILAC	<i>Stable isotope labeling by/with amino acids in cell cultur</i>
SH	Src homolog
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis (<i>signal to noise ratio</i>)
Src	<i>Cellular sarcoma</i>
STF	<i>Super TOP flash</i>
Sulfo-NHS	Sulfo-N-Hydroxysuccinimid
Sz	Spezies
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBST	TBS + Tween 20
TCF	<i>T cell factor</i>
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tSIM	<i>Targeted single ion monitoring</i>
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
Tyr	Tyrosin
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

XIII

Wg	<i>Wingless</i>
WHO	<i>World health organization</i>
Wnt	Zusammengesetzt aus <i>wingless</i> und <i>int1</i>

1 Einleitung

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [1]. Als Krebs wird in der Medizin eine bösartige Gewebeneubildung bezeichnet. Diese Neoplasien können prinzipiell in allen Gewebearten auftreten und durch unterschiedliche Ursachen hervorgerufen werden. In gesundem Gewebe wird die Zell-Homöostase streng kontrolliert, so kann eine Deregulation von einem oder mehreren der regulierenden Prozesse zur Tumorentstehung führen. Dabei handelt es sich um einen Prozess, der sich über mehrere Jahre erstrecken kann.

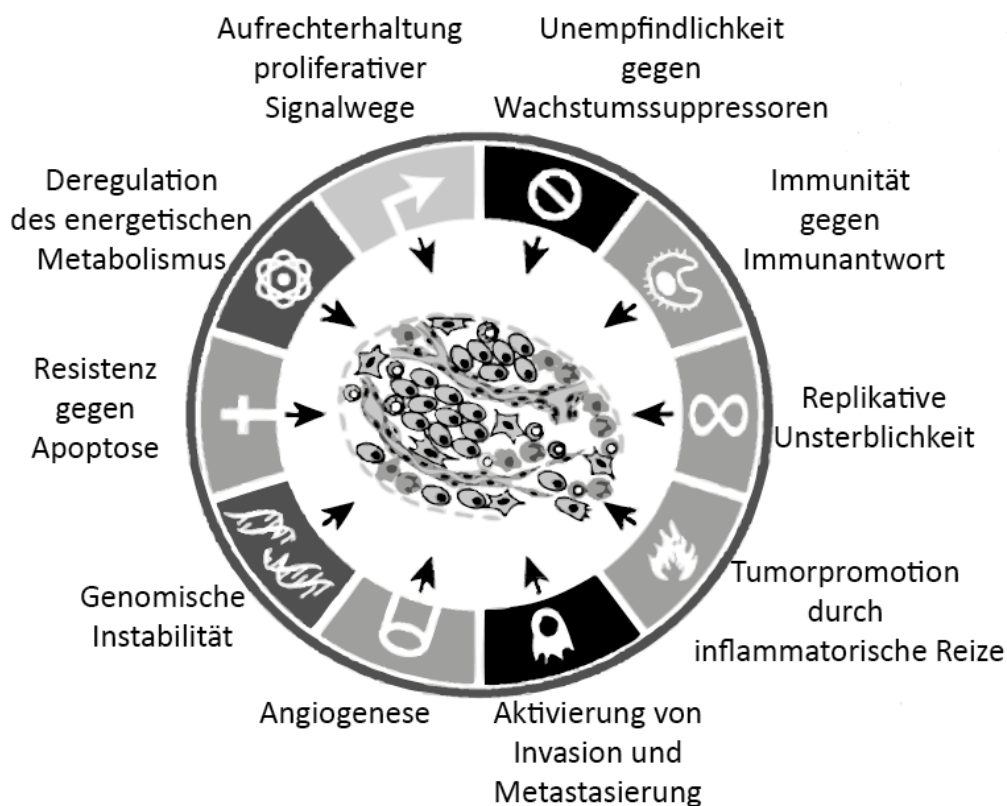


Abbildung 1: Die 10 Eigenschaften von Tumorzellen nach Hanahan und Weinberg [2]. Dargestellt sind die 10 Eigenschaften von Tumorzellen.

Nahezu allen malignen Tumoren lassen sich ähnliche Eigenschaften zuweisen. Diese wurden von Hanahan und Weinberg 2000 zusammengefasst und 2011 erweitert (Abbildung 1) [2, 3].

Eine Reihe von Umweltfaktoren und Chemikalien können Prozesse auslösen, welche in der Lage sind, eine chemische Kanzerogenese einzuleiten. Dabei führen klassische genotoxische Karzinogene zu direkten Beschädigungen des Erbguts, in deren Folge es zu Mutationen kommen kann. Dieser Prozess wird auch als Initiation bezeichnet. Nicht genotoxische Karzinogene hingegen sind nicht in der Lage, das Erbgut direkt zu schädigen. Diese Substanzen können über verschiedene Mechanismen oder Wechselwirkungen die Krebsentstehung begünstigen. Prozesse dieser Art werden als Promotion bezeichnet [4]. Das von Fearon und Vogelstein 1990 vorgestellte Modell der mehrstufigen Kanzerogenese von kolorektalen Karzinomen zeigt dabei die Bedeutung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. So führt eine Mutationen von Proto-Onkogenen, wie *RAS*, *RAF* und *CTNNB1* [5-7] zur Expression eines konstitutiv aktivierten Genprodukts. Dieses ist unabhängig von zellulären Signalen und führt zu einer Deregulation zellproliferierender oder zelldifferenzierender Signalwege und somit zu einer erhöhten Proliferation [8]. Im Gegensatz dazu führt eine Mutation von Tumorsuppressorgenen, wie p53 und *Adenomatous Polyposis Coli*-Protein (APC) zu einer Inaktivierung des jeweiligen Tumorsuppressors. Diese Proteine übernehmen meist regulierende Funktionen des Zellzyklus oder besitzen eine proapoptotische Wirkung [9].

1.1 β -Catenin und der Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle während der Embryonal-Entwicklung sowie bei der Zellproliferation, Zellpolarität und Gewebshomöostase [10]. Dabei werden Signale unter anderem durch Wnt-Proteine vermittelt. Dies sind Glykoproteine mittlerer molekularer Masse zwischen 29 kDa und 46 kDa. Wobei sich der Name „Wnt“ aus der Homologie zum Protein *wingless* (Wg) aus *Drosophila melanogaster* sowie dem Gen *Int-1*, das durch die Integration des Maus-Mammatumovirus in Mäusen aktiviert wird, ableitet [11]. Dabei dient β -Catenin als Überträger des Wnt vermittelten Signals in den Zellkern. Zusätzlich übernimmt β -Catenin in adulten Organismen auch eine wichtige Rolle als Zell-Zell-Adhäsionsprotein. Zusammen mit α -Catenin bildet β -Catenin einen Komplex, der an den cytoplasmatischen Teil des E-Cadherins (ECAD) bindet und so in homotypischen Zellen die *adherens junctions* bildet oder den Kontakt zum Cytoskelett vermittelt. Dadurch ist der größte Anteil des β -Catenins in Zellen an der Zellmembran lokalisiert [12]. Im Cytoplasma übernimmt β -Catenin, vor allem während der Embryonalentwicklung aber auch in adulten Zellen, eine Schlüsselrolle im kanonischen Wnt-Signalweg. Aus diesem Grund wird die Menge und Aktivität an freiem cytoplasmatischen β -Catenin stringent durch verschiedene Signalwege reguliert. So wird cytosolisches β -Catenin durch den *destruction complex* konsequent abgebaut [13]: Dabei wird β -Catenin durch die Tumorsuppressor-Proteine APC und Axin direkt gebunden, welche gemeinsam das Grundgerüst des „*destruction complex*“ bilden [14]. Anschließend wird β -Catenin durch die an diesen Komplex rekrutierte Caseinkinase 1 α (CK1 α) an der Position Serin (Ser) 45 phosphoryliert. Daraufhin wird das so markierte β -Catenin durch die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) sequenziell an den Positionen Threonin (Thr) 41, Ser 37 und Ser 33 phosphoryliert [15, 16]. Diese Aminosäuren sind in einer regulatorische Domäne lokalisiert, diese befindet sich N-terminal vor den Armadillo *repeats* (AR) und wird auch als SSTS-Motiv bezeichnet (Abbildung 2: Schematische Darstellung von β -Catenin.). Das am SSTS-Motiv phosphorylierte β -Catenin wird aus dem Komplex entlassen, durch die E3 Ubiquitinligase β -*transducin repeats-containing proteins* (β -TrCP) erkannt und an den Positionen Ser 33 und Ser 37 ubiquitiniert. Das ubiquitinierte β -Catenin wird anschließend durch das 26 S Proteasom abgebaut [20, 21].

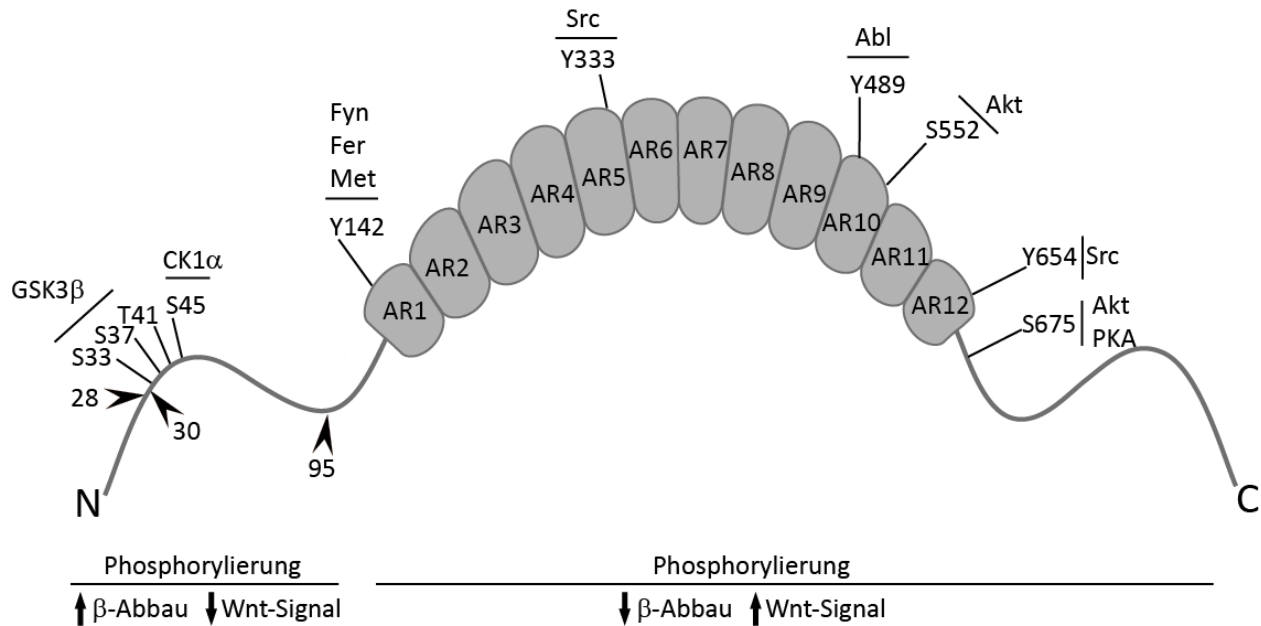


Abbildung 2: Schematische Darstellung von β -Catenin.

Dargestellt sind die Aminosäuren, die durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden (1.1). Dabei markieren Phosphorylierungen vor den Armadillo *repeats* (AR) durch Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) oder die Caseinkinase 1 α (CK1 α) für den proteasomalen Abbau. Phosphorylierungen in den AR oder der C-Terminale Domäne hingegen führen zu einer Stabilisierung von β -Catenin und somit zu einer Verstärkung des kanonischen Wnt-Signalwegs [17, 18]. Mögliche Calpain-Spaltstellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet [19, 20].

Nach Ausschüttung des Wnt-Liganden bindet, dieser an den Frizzled-Transmembranrezeptor (Fzd) und führt zu einer Dimerisierung von Fzd mit dem *low-density lipoprotein receptor-related protein* LRP 5/6. Das Protein Dishevelled (Dvl) wird an den Komplex rekrutiert und phosphoryliert zusammen mit der Caseinkinase γ (CK1 γ) das LRP 5/6 [21, 22]. Das aktive LRP rekrutiert das im *destruction complex* gebundene Axin und verhindert die Phosphorylierung von β -Catenin [17, 18]. Infolgedessen wird β -Catenin nicht mehr phosphoryliert und so dem proteasomalen Abbau nicht mehr zugeführt. Das am SSTS-Motiv nicht phosphorylierte β -Catenin akkumuliert im Cytoplasma und transloziert in den Zellkern. Dort kann es an Transkriptionsfaktoren, aus den *T-cell factor* (TCF)- oder den *lymphocyte enhancer binding factor* (LEFs)-Familien binden und so die Expression von Wnt-responsiven Genen aktivieren [23-26]. Die *high mobility group* (HMG)-Proteine LEF 1 und TCF 4 binden im Komplex mit β -Catenin unter anderem an der spezifischen Erkennungssequenz, dem (A/T)(A/T)CAA(A/T)G-Motiv in der Promotorsequenz von Wnt-Zielgenen [27].

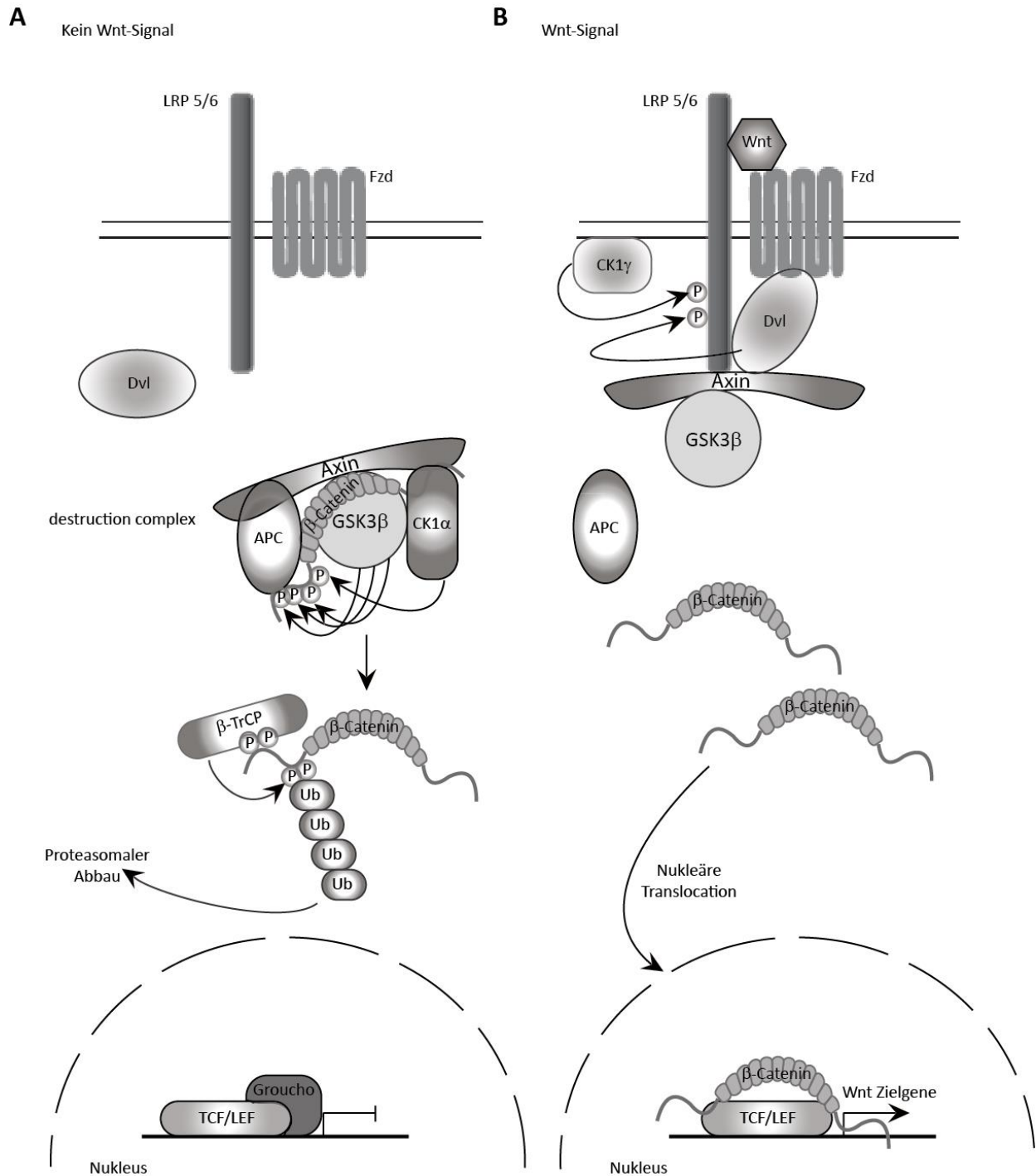


Abbildung 3: Kanonischer Wnt-/β-Catenin-Signalweg.

(A) In Abwesenheit des Wnt-Liganden wird β-Catenin sequenziell durch CK1α und GSK3β im *destruction complex* phosphoryliert. Durch eine anschließende Ubiquitinilierung durch β-TrCP wird β-Catenin für den proteasomalen Abbau markiert.

(B) Der Wnt-Ligand bindet an den Frizzled-Transmembranrezeptor, dieser dimerisiert mit LRP 5/6 und rekrutiert Dvl und CK1γ, diese phosphorylieren und aktivieren LRP 5/6. Der entstandene Komplex bindet und inhibiert den *destruction complex*. Infolgedessen wird β-Catenin nicht mehr abgebaut, kann sich in der Zelle anreichern, in den Nukleus translozieren und dort als Co-Aktivatoren für TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren dienen, welche dann Wnt-responsive Gene aktivieren [17, 18].

Mutationen im β -Catenin-Gen (Mensch: *CTNNB1*; Maus: *Ctnnb1*), die eine Eliminierung der Phosphorylierungsstellen zur Folge haben und so β -Catenin vor dem *destruction complex* assoziierten Abbau schützen führen zu einer Anreicherung des cytosolischen β -Catenins [28-30]. Infolgedessen haben Punkt-Mutationen im SSTS-Motiv oder Deletionen des Exon 3 des β -Catenin-Gens ebenso wie inaktivierende Mutationen des *Axin*- oder *Apc*-Gens eine konstitutiv aktivierende Wirkung auf den Wnt-Signalweg [31]. Diese Mutationen konnten in der Vergangenheit in hepatozellulären Karzinomen (HCC) und in colorektalen Karzinomen beobachtet werden [30-33].

Des Weiteren kann β -Catenin auch unabhängig vom kanonischen Wnt-Signalweg reguliert werden. So führt die Phosphorylierung von Tyrosin (Tyr) 142 durch die Tyrosinkinasen Fer und Fyn sowie die Rezeptortyrosinkinase Met, auch *hepatocyte growth factor* (HGF)-Rezeptortyrosinkinase genannt, zu einer Stabilisierung von β -Catenin und auch zu einer Verminderung der Bindung zu α -Catenin, was beides zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt [34-37]. Eine weitere Möglichkeit der Wnt-unabhängigen Regulation ist die Phosphorylierung an den Positionen Tyr 333 und Tyr 654 durch die *cellular sarcoma* (Src)-Kinase, welche über ein *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Signal aktiviert wird [38, 39]. Dies führt ebenfalls zu einer Stabilisierung von β -Catenin und zu einer Dissoziation von der Membran und somit zu einer Steigerung der Aktivität des Wnt-Signalwegs. Derselbe Effekt ist nach der Phosphorylierung von Thr 489 durch die *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1* (Abl 1)-Kinase zu beobachten [40].

Auch durch Phosphorylierungen der Aminosäuren Ser 552 und Ser 675 durch die Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase B (Akt) kommt es auf Grund von Konformationsänderung des frei beweglichen C-terminus zu einer Steigerung der Aktivität von β -Catenin im kanonischen Wnt-Signalweg [41-43]. Zusammengefasst führen Phosphorylierungen der frei beweglichen N-terminalen Domäne zu einer Destabilisierung. Infolgedessen kommt es zum proteasomalen Abbau und somit zu einer Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs, während Phosphorylierungen der AR und der C-terminalen Domäne einen stabilisierenden Effekt auf β -Catenin haben. Zusätzlich unterstützen diese eine Translokation von β -Catenin von der Zellmembran in das Cytosol (Abbildung 2) [17, 18].

1.2 Calpain

Die Calpaine bilden eine Super-Familie von intrazellulären, Papain-*like* und Ca^{2+} -abhängigen Cystein-Proteasen [44]. Über 83 Gene in 23 Organismen codieren für Calpaine, wobei die Isoformen des m-Calpain (Calp2) und μ -Calpains (Calp1) am besten charakterisiert sind. Diese setzen sich aus zwei Untereinheiten, einer 80 kDa großen katalytischen Untereinheit und einer kleinen 28 kDa schweren regulatorischen Untereinheit zusammen. Dabei enthalten die Hetero-Dimere m-Calpain und μ -Calpain eine identische 28 kDa-Domäne, welche durch das Gen *CAPN4* codiert wird. Beide unterscheiden sich aber in der 80 kDa-Domäne, die durch die Gene *CAPN1* bzw. *CAPN2* codiert werden. *CAPN1* und *CAPN2* weisen eine Sequenzhomologie von 55-65 % auf [45].

Calpaine werde nahezu in allen Geweben exprimiert und regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen. So sind Calpaine am Umbau des Cytoskelett und dessen Verankerung an die Zellmembran beteiligt [46, 47]. Außerdem sind Calpaine an der Regulierung verschiedener Signaltransduktionswege [48, 49], Zellzyklus und Apoptose beteiligt [44, 50-53]. Die Regulation der Calpain-Aktivität ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass vor allem ein Verlust der Ca^{2+} -Homöostase, zum Beispiel in Folge einer Ischämie, eine Steigerung der Calpain-Aktivität nach sich zieht.

Ebenso stehen Calpaine im Verdacht, bei einer Vielzahl patho-physiologischer Prozesse wie Alzheimer [54, 55], multipler Sklerose [56, 57], Gewebeschädigung nach neuronaler Ischämie [58, 59] sowie Zwangstörungen [60] involviert zu sein. Auch β -Catenin wird als Substrat von Calpain in der N-terminalen Region proteolytisch gespalten (Abbildung 2: Schematische Darstellung von β -Catenin.). Dabei entstehen verschiedene unterschiedlich lange β -Catenin-Fragmente, die teilweise noch ein vollständiges SSTS-Motiv enthalten, allerdings ist die Phosphorylierung dieser ca. 85 kDa großen Fragmente durch GSK3 β deutlich vermindert [19]. Ein 75 kDa großes Fragment entsteht durch die Abspaltung des SSTS-Motivs. Infolgedessen wird die Phosphorylierung durch GSK3 β und damit der proteosomale Abbau verhindert. In beiden Fällen kann sich das verkürzte, aber aktive β -Catenin im Cytosol anreichern. Das stabilisierte β -Catenin kann in den Zellkern translozieren und die Wnt-Zielgene aktivieren [19, 61-63] (Abbildung 4: Einfluss von Calpain auf den Wnt-Signalweg..

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass in Zellen, in denen durch inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens APC der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert wurde, es nach Steigerung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu einer Verminderung der Aktivität des Wnt-Signalwegs kommt.

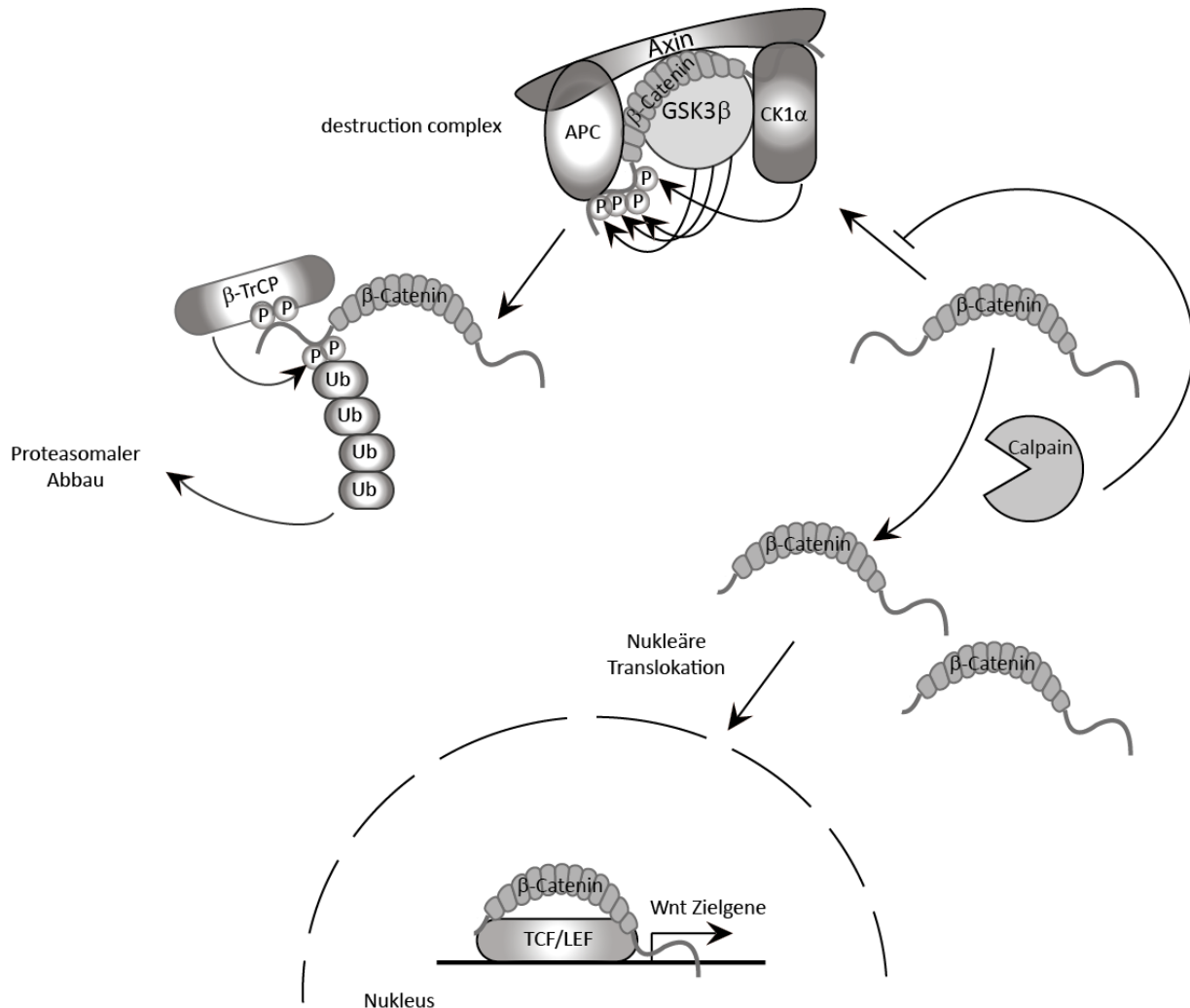


Abbildung 4: Einfluss von Calpain auf den Wnt-Signalweg.

Stabilisierung von β -Catenin durch proteolytische Abspaltung der regulatorischen N-terminalen Domäne mit dem für den proteasomalen Abbau essenziellen SSTS-Motiv. Es kommt zu einer Anreicherung der stabilisierten 75 kDa und 85 kDa großen β -Catenin-Fragmente und zu einer Translokation in den Nucleus und zu einer Steigerung der Expression der Zielgene des canonischen Wnt-Signalwegs [19, 61].

Des Weiteren konnten eine Erhöhung der Menge der 85 kDa β -Catenin-Fragmente im Cytosol und eine Verringerung der Menge des ungeschnittenen β -Catenins im Zellkern beobachtet werden. Dieser Effekt konnte durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA oder durch Calpastatin, einem Calpain inhibierenden Protein, aufgehoben werden [64].

1.3 Cellular sarcoma Kinase

Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src gehört zu den ersten in Wirbeltieren entdeckten Proteinen, welche von einem Proto-Onkogen codiert werden [65, 66]. Das retrovirale Gegenstück, das Gen v-Src aus dem Rous-Sarkoma-Virus, wurde in den frühen 1910er-Jahren von Peyton Rous beschrieben. Durch Injektion eines zellfreien Extraktes aus Sarkomen, welche aus dem Brustmuskel von *Gallus gallus domesticus* isoliert wurden, konnte Rous solide Tumore in den behandelten Hühnern induzieren [67]. Erst Jahrzehnte später in den 1950er-Jahren wurden Rous Beobachtungen bestätigt [68, 69]. Anfang der 1980er-Jahre konnte gezeigt werden, dass die Src-Kinase spezifische Tyrosin-Reste phosphoryliert. Sie gehörte damit zu einer der ersten beschriebenen Kinasen [70]. Src stellt den Prototyp der heute 9 bekannten Mitglieder der Src-Kinase Familie dar. Die über einen N-terminalen Myristinsäure-Rest in der Zellmembran verankerte Src-Kinase besteht aus vier Src-Homologie (SH)-Domänen und einer *unique*, also einer für die jeweilige Isoform einzigartigen Domäne (SH4). Die C-terminal lokalisierte SH1-Domäne weist in der SRC-Kinase-Familie dabei die höchste Sequenzhomologie auf und vermittelt die katalytische Aktivität. In dieser katalytischen Domäne liegt eine für die katalytische Aktivität wichtige Tyrosin-Autophosphorylierungsstelle. Die SH2- und SH3-Domäne beeinflussen die Kinase-Aktivität der SH1-Domäne und bedingen die subzelluläre Lokalisation der Src-Kinase und übernehmen somit regulatorische Funktionen (Abbildung 5: Schematische Darstellung der Src-Kinase. [71-74]).

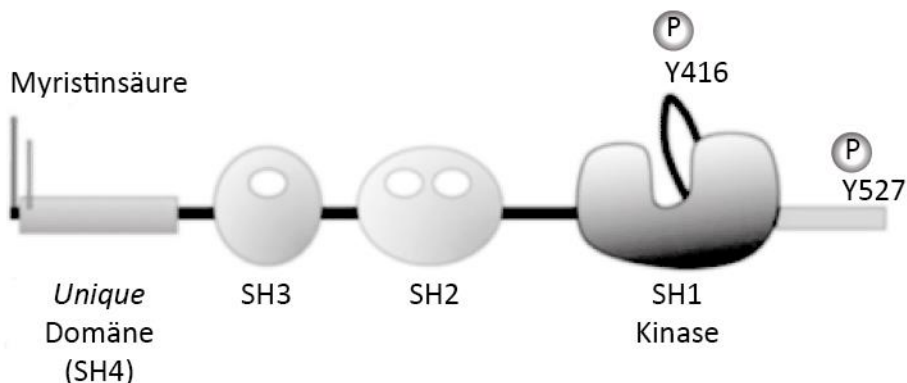


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Src-Kinase.

Dargestellt sind die für die jeweilige Isoform der Src-Kinase spezifische SH4-Domäne mit dem N-terminalen Myristinsäure-Rest, mit dem die Src-Kinase in der Zellmembran verankert ist, sowie die regulatorischen SH2- und SH3-Domänen und die katalytische SH1-Domäne, welche eine hohe Sequenzhomologie aufweist [75].

Zusätzlich vermitteln die SH2- und SH3-Domänen die Enzym-Substrat-Bindung [75-79].

Src-Kinasen liegen in zwei Konformationen vor. Diese werden vor allem durch den Phosphorylierungszustand zweier Tyrosinreste, Tyr 416 und Tyr 529 bedingt (Abbildung 5: Schematische Darstellung der Src-Kinase. so führt eine Phosphorylierung an der Position Tyr 416 der Kinase-Domäne und eine Dephosphorylierung des Tyr 529 der C-terminalen Schwanzregion zu einer Öffnung der Konformation und somit zu einer Aktivierung der Src-Kinase [74, 75, 77, 80]. Src-Kinasen kommen in fast allen Geweben vor und sind wichtige Schlüsselproteine in der Signalübertragung von extrazellulären Signalen in den Zellkern und übernehmen so eine wichtige Rolle für physiologische Prozesse wie Zellproliferation und Metabolismus [81]. Somit spielen sie als Proto-Onkogene ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Karzinome [82-84]. Auch β -Catenin kann als Substrat durch die Src-Kinase phosphoryliert und so stabilisiert werden.

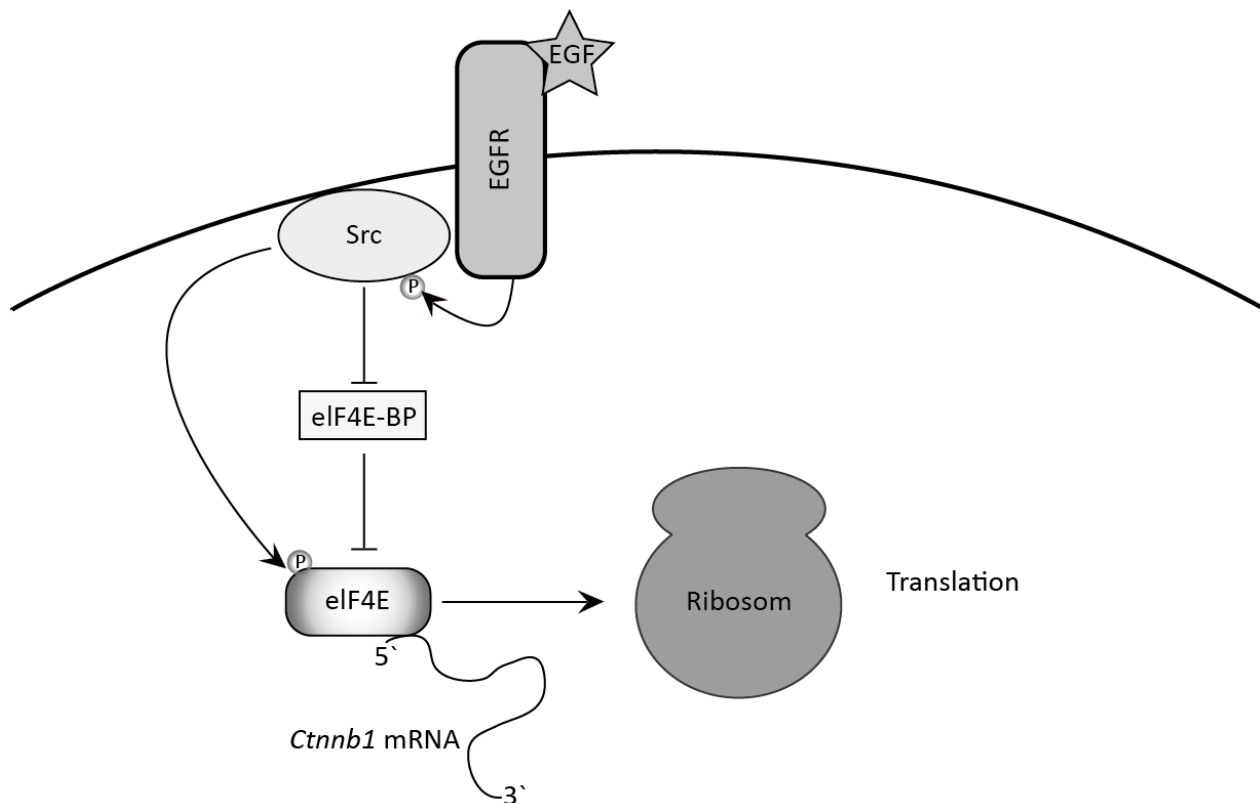


Abbildung 6: Regulierung der Translation durch Src.

Nach der Phosphorylierung durch den EGF-Rezeptor ist die aktivierte Src-Kinase in der Lage, durch Phosphorylierung des *eukaryotic translation initiation faktor 4E* (eIF4E) und dessen Inhibitor *eIF4E-binding protein* (eIF4E-BP) die Translokation der prozessierten *Ctnnb1* mRNA zum Ribosom zu steigern.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von Proteinen ist die Beeinflussung der Proteinbiosynthese. Diese kann ebenfalls durch die Src-Kinase gesteigert werden. Nach Phosphorylierung der Src-Kinase an der Position Tyr 416 durch den EGF-Rezeptor [85, 86] phosphoryliert diese den *eukaryotic translation initiation* Faktor 4E (eIF4E) und aktiviert diesen. Gleichzeitig wird das eIF4E-*binding protein* (eIF4E-BP) phosphoryliert, dies führt zur Dissoziation des Translations-Repressor-Proteins aus dem Komplex mit eIF4E. Beides führt zu einer Aktivierung des eIF4E, dieser bindet an dem 5'-*cap* von prozessierter mRNA und vermittelt die *Translokation zum Ribosom* [87-90]. Dies führt zu einer Steigerung der Translation und somit der Proteinbiosynthese von β -Catenin (Abbildung 6: Regulierung der Translation durch Src.) [91].

1.4 Phenobarbital

Das Barbiturat Phenobarbital wurde von Bayer 1912 als Schlafmittel unter dem Handelsnamen Luminal® eingeführt. Kurz darauf wurde die antiepileptische Wirkung von Alfred Hauptmann beschrieben [92]. Phenobarbital wurde zu einem bewährten Medikament zur Behandlung von Epilepsie [93] und wurde 1977 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in die Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der WHO aufgenommen [94]. Bis heute gilt Phenobarbital als das wichtigste Antikonvulsivum in Entwicklungsländern [95] und wird auch in den Industrieländern in der Human- und Veterinär-Medizin eingesetzt [96, 97]. Die pharmakologische Wirkung von Phenobarbital beruht auf der Verstärkung der Wirkung des hemmenden Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA). Durch Bindung an den GABA_A-Rezeptor führt Phenobarbital zu einer Verlängerung der Öffnungszeit des Liganden-gesteuerten Ionenkanals bei Bindung des Neurotransmitters GABA [98]. Zusätzlich blockiert Phenobarbital die erregende Wirkung des Neurotransmitters Glutamat durch Inhibition des α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptors, eines Mitglieds der Glutamat-Rezeptor-Familie [99].

Bereits Mitte der 1960er-Jahre wiesen Studien in Ratten und Mäusen darauf hin, dass es nach Gabe von Phenobarbital zu Veränderungen der Leber kommt, so konnte eine Erhöhung des relativen Lebergewichts beobachtet werden [100-102]. Mitte der 1970er-Jahre konnte bei Mäusen, denen über die Nahrung eine tägliche Dosis von 65-70 mg/ kg Körpergewicht Phenobarbital zugeführt wurde, eine erhöhte Tumorzinzidenz festgestellt werden [103-105]. Bei einer Behandlung mit 113 mg/ kg Körpergewicht Phenobarbital täglich zeigten männliche C57BL/ 10J Mäuse eine deutliche Erhöhung von Adenomen und Karzinomen in der Leber. Dieser Effekt konnte bei einer täglichen Gabe von 22 mg/ kg Körpergewicht nicht beobachtet werden. Bei weiblichen Tieren konnte auch bei der maximal tolerierbaren Dosis von 113 mg/ kg keine signifikante Erhöhung der Inzidenz von hepatozellulären Tumoren beobachtet werden [106]. Des Weiteren konnte eine Abhängigkeit vom Alter der behandelten Tiere beobachtet werden: so zeigten zum Zeitpunkt des Beginns der Phenobarbital-Behandlung ältere Tiere eine höhere Tumorzinzidenz als jüngere Tiere [107, 108].

Zusätzlich konnten weitere paradoxe Effekte beobachtet werden. So kann Phenobarbital unter bestimmten Bedingungen auch Tumor protektiv wirken. In männlichen B6C3F-Mäusen ist dabei sowohl der Zeitpunkt der Tumorzinzidenz als auch der Zeitpunkt der Tumorzinzidenz von

Bedeutung [109-112]. So traten bei Tieren, die im Alter von 12 Tagen mit Diethylnitrosamin (DEN) und anschließend mit Phenobarbital behandelt wurden zu 90 % basophile, RAS-mutierte Tumore auf [113], wobei sowohl die Anzahl der Läsionen als auch die Tumorgroße durch die Behandlung mit Phenobarbital vermindert wurde [112]. Im Gegensatz dazu entwickelten Tiere, die im Alter von 5 Wochen mit DEN und anschließend mit Phenobarbital behandelt wurden vor allem eosinophile, β -Catenin-mutierte Tumore [114, 115]. Durch die Behandlung mit Phenobarbital wurde hier die Tumormultiplizität deutlich erhöht [112]. Auch der genetische Hintergrund ist von entscheidender Bedeutung; so zeigen CAR-aktivierende Substanzen wie TCPOBOP in APC-mutierten Hepatocyten eine deutlich geringere proliferative Wirkung als in β -Catenin-mutierten Hepatocyten [116]. Ebenso stimuliert Phenobarbital in APC-*knockout* Mäusen das Wachstum von hepatozellulären Adenomen (HCA) aber inhibiert die Bildung von HCC [117].

Trotz dieser paradoxen Effekte gilt Phenobarbital als Modellsubstanz für ein nicht genotoxisches Kanzerogen in Nagetieren [118, 119], wobei verschiedene Wirkmechanismen diskutiert werden. Als gesicherte involvierte Moleküle gelten das *gap junction*-Protein Connexin 32 [120], β -Catenin [114, 121] und der *constitutive androstane* Rezeptor (CAR) [122]. Der nukleäre Rezeptor CAR spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzymsysteme der Phase I & II, aber auch bei der Regulierung der Zellproliferation von Hepatozyten [123, 124].

Die Bedeutung der Tumorpromotion durch Phenobarbital für den Menschen ist allerdings umstritten. So konnte in einer epidemiologischen Studie mit ungefähr 30.000 Epilepsie-Patienten gezeigt werden, dass Phenobarbital zu einer Erhöhung der Tumorinzidenz führt [125]. Auch klinische Fallberichte wie der eines 13-jährigen Mädchens, das nach 7 Jahren Phenobarbital-Behandlung ein hepatozelluläres Adenom entwickelte weisen auf einen kanzerogenen Effekt von Phenobarbital hin [126]. Dem entgegen steht eine Studie mit 10.000 Epilepsie-Patienten, die keine signifikante Veränderung der Tumorinzidenz nach Phenobarbital-Behandlung verzeichnen konnte [127]. Cofaktoren wie Alkohol- oder Tabak-Konsum sowie andere Medikationen wurden in diesen Studien nicht berücksichtigt und können ebenfalls zu einem Einfluss auf die Tumorinzidenz führen [128]. Die erhobenen Daten aus humanen Studien sind somit nicht eindeutig. Sie liefern weder einen eindeutigen Beweis für die kanzerogene Wirkung von Phenobarbital, noch können sie diese hinreichend ausschließen [119, 129].

Der beobachtete tumorpromovierende Effekt bei Nagetieren trat nach einer Langzeit-Behandlung mit 0,05 % Phenobarbital in der Nahrung auf; dies entspricht einer aufgenommenen Menge von ca. 80 mg/ kg Körpergewicht und Tag [130]. Die therapeutisch verabreichte Menge von Phenobarbital beim Menschen beläuft sich auf ca. 1-4 mg/ kg Körpergewicht [131], also eine 20-fach geringere Dosis. Unter Berücksichtigung der Körpergröße und einer allometrischen Skalierung entspricht die von Mäusen aufgenommene Menge von 80 mg/ kg Körpergewicht einer humanen Dosis von 11,5 mg/ kg Körpergewicht [132]. In Untersuchungen konnte beim Menschen ein Serum-Spiegel von 15-70 µg/ mL Phenobarbital [133] und bei Mäusen ein Serum-Spiegel von 15,1-17,8 µg/ mL Phenobarbital [134] ermittelt werden, somit bewegen sich die gemessenen Mengen in einem vergleichbaren Bereich. Es konnten in beiden Spezies auch ähnliche Effekte nach der Behandlung mit Phenobarbital beobachtet werden. So stieg die Expression von Cyp2B und anderen CAR-induzierten Genen an, zudem konnte eine Hypertrophie der Leber beobachtet werden [123, 135]. Im Gegensatz dazu konnte nur in Nagetieren die Apoptose gehemmt und die replikative DNA-Synthese wie auch eine Leberhyperplasie induziert werden. Dieser Effekt konnte beim Menschen nicht beobachtet werden [136-138]. Die Aktivierung des CAR gilt als ein Schlüsselereignis der kanzerogenen Wirkung durch Phenobarbital [139]. Neue Untersuchungen mit transgenen Mäusen, welche die humanen Rezeptoren CAR und *pregnane X receptor* (PXR) exprimieren zeigen eine Aktivierung der CAR-responsiven Gene sowie tumorpromovierende Effekte in der Leber [132, 140]. Sie stützen damit die Einschätzung der *International Agency for Research on Cancer* (IARC), welche Phenobarbital als möglicherweise krebserregend für den Menschen mit der Kategorie 2 B klassifiziert [141].

2 Ziel der Arbeit

Auch wenn die kanzerogene Wirkung von Phenobarbital auf den Menschen umstritten ist und das Medikament zumindest in den Industriestaaten an Bedeutung verliert, kann die Entschlüsselung der Wirkmechanismen nicht genotoxischer Kanzerogene einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Krebsentstehung leisten und ist somit von Interesse sowohl für die Beurteilung des kanzerogenen Potentials von chemischen Substanzen als auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

Für die tumorpromovierende Wirkung von Phenobarbital ist neben CAR und Connexin 32 auch β -Catenin von entscheidender Bedeutung. So führt eine Behandlung von Mäusen mit Phenobarbital nach initialer DEN-Gabe zu einer Selektion von Tumoren, die eine β -Catenin-aktivierende Mutation des *Ctnnb1*-Gens aufweisen [114, 115]. Umgekehrt hemmt Phenobarbital im Tierversuch die Entwicklung von malignen hepatozellulären Karzinomen mit aktiviertem β -Catenin. β -Catenin scheint daher eine entscheidende Rolle bei der Erklärung des paradoxen Einflusses von Phenobarbital auf die Kanzerogenese in der Leber zu spielen.

Somit ist das Verständnis der Zusammenhänge und der Beeinflussung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Phenobarbital von besonderen Interesse. Dessen ungeachtet ist die Wirkung von Phenobarbital auf β -Catenin und β -Catenin-assoziierte Signalwege bislang kaum untersucht. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit die direkte Wirkung von Phenobarbital auf den kanonischen Wnt-Signalweg untersucht und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufgeklärt werden.

3 Material

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Arginin 6 (CLM-2265H1)	Euriso-Top, Saarbrücken, DE
Arginin 10 (CNLM539H1)	Euriso-Top, Saarbrücken, DE
BAPTA / AM	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Bacto™ Tryptone	BD Biosciences, Franklin Lakes, US
Bacto™ Yeast Extrakt	BD Biosciences, Franklin Lakes, US
Benzonase® Nuclease	Merck, Darmstadt, DE
Blocking reagent for ELISA	Roche, Mannheim, DE
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Calpain Inhibitor XI	Merck, Darmstadt, DE
Coelenterazin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, DE
Complete Protease Inhibitor	Roche, Mannheim, DE
Comassie® Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg, DE
D-Luciferin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, DE
DMEM/ F12	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
DMEM SILAC	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Donkey Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Dynabeads® ProteinG	Life Technologies, Carlsbad, US
EDC	Pierce, Rockford, US
Essigsäure (≥ 99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol (≥ 96 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Erlotinib	k.A.
FKS	PPA Laboratories, Pasching, AT
Gefitinib	k.A.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Glutathion	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Goat Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe, DE
iCTR3	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
LiCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Lipofectamine 2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Lysin 4 (DLM-26401)	Euriso-Top, Saarbrücken, DE
Lysin 8 (CNLM-291H1)	Euriso-Top, Saarbrücken, DE
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
MG132	Enzo Life Sciences, Lausen, CH
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt, DE
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
NaN ₃	Merck, Darmstadt, DE
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
NuPAGE® Transfer buffer (20 x)	Life Technologies, Carlsbad, US
NuPAGE® Reducing Agent (10 x)	Life Technologies, Carlsbad, US
Opti-MEM I	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Passive Lysis buffer 5x	Promega, Madison, US
PBS	PPA Laboratories, Pasching, AT
PD 150606	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Penicillin/ Streptomycin	PPA Laboratories, Pasching, AT
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Phosphatase Inhibitor Cocktail III	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Phenobarbital (Na)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Ponceau-S	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PP1	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Resazurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Salzsäure (32 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
SB216763	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, US
Src Inhibitor I	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Sulfo-NHS	Pierce, Rockford, US
Tris ($\geq 99,9\%$)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X 100 (100 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US
Tween20 (100 %)	Merck, Darmstadt, DE

3.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

Antigen	Sz	Konjugat	Hersteller
C-Terminal β -Catenin	ms		BD Biosciences, Franklin Lakes , US
Calpain große UE 80 kD	ms		Merck Millipore, Darmstadt, DE
Calpain kleine UE 30 kD	ms		Merck Millipore, Darmstadt, DE
Calpain			Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
E-Cadherin 24E10	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
E-Cadherin	rbt		R&D Systems, Minneapolis, US
EGFR	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
GST	gt		GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
GFP	nb		ChromoTeck, München, DE
GFP 3E5	rt		ChromoTeck, München, DE
GFP 3H9	rt		ChromoTeck, München, DE
Gt IgG (H+L)	dk	PE	Jackson-Dianova, Hamburg, DE
ICAT	rbt		Cara J Gottardi, Charlottesville, US
Ms IgG (H+L)	gt	Cy3	Jackson-Dianova, Hamburg, DE
ms IgG (H+L)	gt	PE	Jackson-Dianova, Hamburg, DE
ms IgG (H+L)	gt	HRP	Jackson-Dianova, Hamburg, DE
ms IgG (H+L)	dk	IRDye800	Li-Core Biosciences, Lincoln, US
ms IgG (H+L)	dk	IRDye680	Li-Core Biosciences, Lincoln, US

Antigen	Sz	Konjugat	Hersteller
Non pS33/ pS37/ pT41 β -Catenin	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
pS33/ pS37/ pT41 β -Catenin	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
pS45 β -Catenin	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
pS552 β -Catenin	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
pS675 β -Catenin	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
rbt IgG (H+L)	dk	PE	Jackson-Dianova, Hamburg, DE
rbt IgG (H+L)	dk		Jackson-Dianova, Hamburg, DE
Rbt IgG (H+L)	dk	HRP	Jackson-Dianova, Hamburg, DE
Rt IgG (H+L)	dk	PE	Jackson-Dianova, Hamburg, DE
rbt IgG (H+L)	dk	IRDye800	Li-Core Biosciences, Lincoln, US
rbt IgG (H+L)	dk	IRDye680	Li-Core Biosciences Lincoln, US
TCF4	rbt		Cell-signaling technology, Cambridge, UK
Total β -Catenin	gt		R&D Systems, Minneapolis, US

3.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Bestandteile	Konzentration
Assaypuffer	Blocking Reagent for ELISA	1x
	Tween20	0,1 % (w/ v)
Aktivierungspuffer pH 6,2	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	100 mM
	Triton X-100	0,005 % (v/ v)
Bindepuffer pH 7,4	NaCl	50 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	150 mM
	Imidazol	1 % (w/ v)

Puffer / Lösung	Bestandteile	Konzentration
	Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/ v)
Coomassie-Färbelösung	Methanol	50 % (v/ v)
	Essigsäure	10 % (v/ v)
Einfriermedium	Zellkultur Medium	90 % (w/ v)
	DMSO	10 % (v/ v)
Elutionspuffer pH 7,4	NaCl	500 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	20 mM
	Imidazol	500 mM
Entfärber I	Ethanol	50 %
	Essigsäure	10 %
Entfärber II	Ethanol	10 %
	Essigsäure	5 %
Kopplungspuffer pH 5,0	Mes	50 mM
	Triton X-100	0,005 % (v/ v)
Kopplungswaschpuffer pH 7,4	PBS	1x
	Triton X-100	0,005 % (v/ v)
Lagerungspuffer	Blocking Reagent for ELISA	1x
	NaN ₃	0,1 % (w/ v)

Puffer / Lösung	Bestandteile	Konzentration
Lysepuffer	NaCl	150 mM
	Tris pH 7,4	50 mM
	Triton X-100	1 % (v/ v)
	Complete Protease Inhibitor	1x
	Phosphatase Inhibitor Cocktail II&III	1x
	Benzonase	1 U
Passive Lysis Puffer	Passive Lysis buffer 5x	20 % (v/ v)
Lysepuffer (Silac)	EDTA	2 mM
	NaCl	150 mM
	Na Orthovanadat	1 mM
	NaF	50 mM
	NP40	1 % (v/ v)
	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
Lysepuffer (Src-Assay)	Triton X-100	0,5 % (v/ v)
	SDS	0,1 % (v/ v)
	NaCl	150 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	10 mM
	EDTA	2 mM

Puffer / Lösung	Bestandteile	Konzentration
PBS pH 7,4	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Ponceau-S Färbelösung	Ponceau-S	0,1% (w/ v)
	Essigsäure	1 % (v/ v)
TBS pH 7,2	Tris	50 mM
	NaCl	140 mM
TBST	TBS	1x
	Tween 20	0,1 % (v/ v)
Transferpuffer für Western Blot	NuPAGE Transfer Buffer	1x
	NuPAGE Antioxidant	0,1 % (v/ v)
	Methanol	10 % (v/ v)
Waschpuffer	PBS	1x
	Tween 20	0,1 % (v/ v)
Zellkultur Medium Behandlung	DMEM/F12	1x
	L-Glutamine	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	FKS	1 %
Zellkultur Medium Erhaltung	DMEM/F12	1x
	L-Glutamine	2 mM
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	FKS	10 %

3.1.4 Zelllinien

Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Mutations Status		Referenz
70.4	DEN-induzierte Maus (C3H/HE) Hepatom-Zelllinie	<i>Ctnnb1</i>	wt/wt	[142]
		<i>H-ras</i>	wt/wt	
		<i>P53</i>	mt/mt	
70.4 K15	Stabil transfizierter (STF) 70.4- Subklon	<i>Ctnnb1</i>	wt/wt	[143]
		<i>H-ras</i>	wt/wt	
		<i>P53</i>	mt/mt	
70.4 Mo K50	Stabil transfizierter Tet-On S33Y β -Catenin Expressions Vektor	<i>Ctnnb1</i>	wt/wt	[144]
		<i>H-ras</i>	wt/wt	
		<i>P53</i>	mt/mt	
HEK	Humane embryonale Nierenzellen	<i>Ctnnb1</i>	wt/wt	[145]
		<i>H-ras</i>	wt/wt	

3.1.5 Bakterienstämme und Expressionsvektoren

Tabelle5: Bakterienstämme und Expressionsvektoren

<i>E.coli</i> -Stamm	Expressionsvektor	Referenz
BL21 DE3	pGEX-ECT / pGEX-ICAT	[146, 147]
TOP10F	pGEX-TCF4	[146]

3.1.6 Plasmide

STF (SuperTOPFlash)

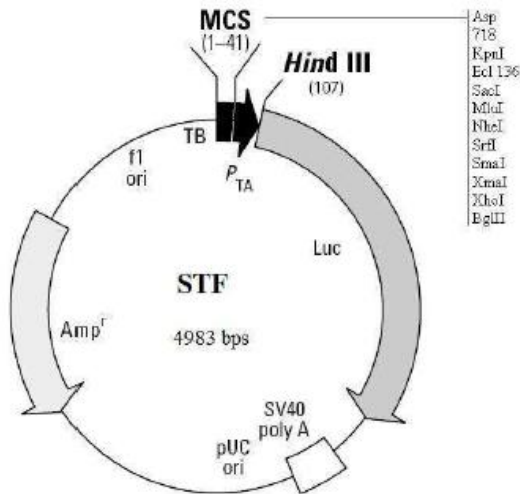


Abbildung 7: STF Reporter Vektor

Der SuperTopFlash-Vektor dient als Reportervektor für den β -Catenin-/Wnt-Signalweg und besitzt ein Firefly-Luciferase-Gen, dem 7 TCF/LEF-Bindestellen vorgeschaltet sind. Somit konnte schon eine geringe Aktivität des Wnt-Signalwegs detektiert werden. Der STF beinhaltet ebenfalls eine Ampicillin-Resistenz. Der Vektor basiert auf dem pTA-luc von Clontech.

pRL-CMV

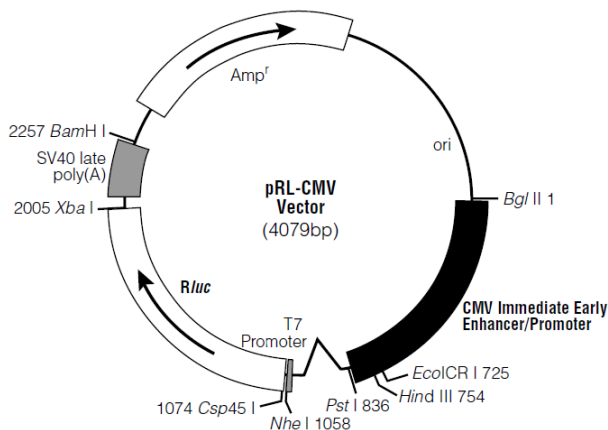


Abbildung 8: pRL-CMV Reporter-Vektor (Promega)

Dieser Vektor dient zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und wurde co-transfiziert. Durch einen vorgeschalteten CMV-Promotor wurde die Renilla-Luciferase konstitutiv expremiert.

3.1.7 Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Hersteller
Calpain activity assay	Abcam, Cambridge, UK
Calpain activity assay	Merck Millipore, Darmstadt, DE
DC Protein Assay	Biorad, Hercules, US
ECL plus WB Detection System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
ProFluor® Src-Family Kinase Assay	Promega, Madison, US

3.1.8 Primer für LightCycler-PCR

Tabelle 7: Primer für LightCycler-PCR

Zielgen	Primer	Sequenz (5'→3')
18S rRNA	18S rRNA_fwd	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	18S rRNA_rev	GCTGGAATTACCGCGGCT
Axin2	mAxin2_fwd	CGA CGC ACT GAC CGACGA TT
	mAxin2_rev	TCC AGA CTA TGG CGG CTT TCC
μCalpain 80 kDa TV1	mCalp1_TV1_fwd	GCA GCA ATC TCC CAA ACT CC
	mCalp1_TV1_rev	GCTCCT TGT CCC GCT TCT T
μCalpain 80 kDa TV2	mCalp1_TV2_fwd	GCA GTT GCA GCC ACC AGA G
	mCalp1_TV2_rev	GGG TTT GAC ATC AGT TCC GTA G
μCalpain 80 kDa total	mCalp1_tot_fwd	GTT GGA GGA GGT GGA TGA CG
	mCalp1_tot_rev	CTC TGA CTG CGC CCG AGA A
mCalpain 80 kDa	mCalp2_fwd	CGG AGC CGA GGA GGT TGA A
	mCalp2_rev	TGC CGA GGT GGA TGT TGG
Calpain 28 kDa	mCalpSm_1_fwd	TGG ATA GCG ACA CCA CAG G
	mCalpSm_1_rev	GTA GCA GGA CAT GAC CAT GAA A
β-Catenin	mCtnnb1_fwd	GCG TGG ACA ATG GCT ACT CAA G
	mCtnnb1_rev 5	CCT GAC CCT TTT CGG AAC GAG

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, DE
15 mL Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
50 mL Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
1,5 mL Protein LoBind Tube	Eppendorf, Hamburg, DE
10 cm Gewebekulturschale	BD Clontech, Heidelberg, DE
6- well Gewebekulturplatte	BD Clontech, Heidelberg, DE
12-well Gewebekulturplatte	BD Clontech, Heidelberg, DE
24-well Gewebekulturplatte	BD Clontech, Heidelberg, DE
96-well Gewebekulturplatte	BD Clontech, Heidelberg, DE
Acclaim Rapid Separation LC (RSLC) Column	Thermo Scientific, Waltham, US
Deep Well 96 Platte für Äkta	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Glaswaren	Schott, Mains, DE
Glaspipetten (5 mL/ 10 mL/ 20 mL)	Brand, Wertheim, DE
GST Hitrap FF 1 mL	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Kanülen	BD Clontech, Heidelberg, DE
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim, DE
Luminex MagPlex® Mikrosphären	Luminex Corp., Austin, US
Mikrotiterplatte, 96-Well, glasklar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Mikrotiterplatte, 96-Well, PCR-Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Mikrotiterplatte, 96-Well, non-binding surface	Corning, New York, US
Nitril Handschuhe, L	VWR, Darmstadt, DE
NuPAGE 4-1 % Bis-Tris Gel	Life Technologies, Carlsbad, US
Parafilm	Bemis, Oshkosh, US
PCR Tubes	Biozyme Scientific, Oldendorf, DE
Pipettenspitzen 0,1 µL-10 µL	Mettler-Toledo, Columbus, US
Pipettenspitzen 1 µL-200 µL	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 1 µL-200 µL, low-Binding	VWR, Darmstadt, DE
Pipettenspitzen 1 µL-300 µL	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 100 µL-1000 µL	Starlab, Hamburg, DE

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pipettenspitzen 100 µL-5000 µL	NeoLab, Heidelberg, DE
Protran 0,2 µm Nitrocellulose Membran	Whatman GmbH, Dassel, DE
Sterilfilter 0,22 µm	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Whatman Gel-Blotting-Papier	Whatman GmbH, Dassel, DE
Zellschaber	Corning, New York, US

3.1.10 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Hersteller
1420 Multilabel Counter Victor 3V	Perkin Elmer; Waltham, US
ÄKTExpress	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
DynaMag™-Spin Magnet	Life Technologies, Carlsbad, US
FLEXMAP 3D	Luminex Corp., Austin, US
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH, Offenburg, DE
ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Innova 44 Incubator Shaker	Eppendorf, Hamburg, DE
KingFisher® 96/ KingFisher® Flex	Thermo Scientific, Waltham, US
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, DE
Odyssey Infrared Imager	Li-COR Biosciences, Lincoln, US
pH-Meter 766	Knick, Berlin, DE
Polymax 2040	Heidolph Instruments, Schwabach
Q Exactive Plus™ - Orbitrap Mass	Thermo Scientific, Waltham, US
Rollenmischer RM 5	Assistent, Sondheim, DE
Rotator für Reagenz- und Probenröhrchen	VWR, Darmstadt, DE
Shaker DRS-12	NeoLab, Heidelberg, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Typhoon TRIO Variable Mode Imager	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic, Berlin, DE
Ultimate 3000 Nano HPLC System	Thermo Scientific, Waltham, US
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, US
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, DE

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge Sorvall RC-6 Plus	Thermo Scientific, Waltham, US

3.1.11 Software

Tabelle 10: Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS5	Adobe, San Jose, USA
Adobe Photoshop CS5	Adobe, San Jose, USA
BindIt Software 3.1	Thermo Scientific, Waltham, USA
EndNote X5	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
Image Studio V 4.0	Li-COR Biosciences, Lincoln, US
LightCycler Run V.3.5	Roche, Rotkreutz, CH
OPTIMA Software V 2.20	BMG LABTECH, Offenburg, DE
Origin2015	OriginLab, Northhampton, US
Microsoft Office 2013	Microsoft, Redmond, USA
Pinpoint 1.2	Thermo Scientific, Waltham, US
Typhoon Scanner Control v5.0	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Victor Workout 1.5	Perkin Elmer, Waltham, US
XLfit 5.3.1.3	IDBS, Guildford, UK
xPONENT 4.0.846.0 SP1	Luminex, Austin, USA

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeines

Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Aus diesem Grund wurden alle Arbeiten unter der Sterilbank durchgeführt. Zu verwendende Lösungen, Glaswaren und Pipettenspitzen wurden autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 μm). Verbrauchsgegenstände wie Kulturschalen, Reaktionsgefäße, Spritzen und Kanülen wurden unter sterilen Bedingungen geöffnet bzw. mit 70 % EtOH sterilisiert, auf gleiche Weise wurde mit unsterilem Arbeitsgerät oder Flaschen verfahren. Gefäße wurden unter der Sterilbank geöffnet und die Flaschenhalse abgeflammt. Zu verwendende Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bei gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

4.1.2 Mediumwechsel

Verbrauchte Nährstoffe, sich im Medium anreichernde Stoffwechselprodukte und toxische Metabolite mussten alle 2-3 Tage ausgetauscht werden. Zu diesem Zweck wurde das Medium randständig von der gekippten Platte abgesaugt und neues Medium randständig aufpipettiert.

Tabelle 11: Kulturschalen mit verwendeten Medium-Volumina

Kulturschalen	Medium-Volumen
10 cm	10 mL
6-well Platte	1,5 mL/ well
12- well Platte	1 mL/ well
24-well Platte	0,5 mL/ well
96-well Platte	0,1 mL/ well

4.1.3 Passagierung

Um ein gleichbleibendes Wachstum, einen konstanten Metabolismus und einen Zell-Monolayer und somit einheitliche Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 90 % passagiert.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen für 2-5 min bei 37 °C mit 1 mL Trypsin inkubiert, um die Zellen von der Kulturschale zu lösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9 mL (bei 10 cm Kulturschale) FKS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (0,9 x 40 mm) vereinzelt. Für eine Erhaltungskultur wurden ca. 5 Tropfen der Zellsuspension in eine 10 cm Kulturschale mit vorgelegtem Medium überführt und durch Schwenken verteilt.

4.1.4 Zellzahlbestimmung

Nach der Trypsinierung (4.1.3) wurden 20 µL der Zellsuspension 1:10 mit Medium verdünnt und in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt. Diese besteht aus 16 Kleinquadraten, die wiederum aus je 4x4 Kleinstquadraten bestehen. Es wurden 4 Kleinquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die Zellzahl der Suspension errechnet sich aus dem Mittelwert der ausgezählten Kleinquadrate, dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen der Zählkammer nach folgender Formel:

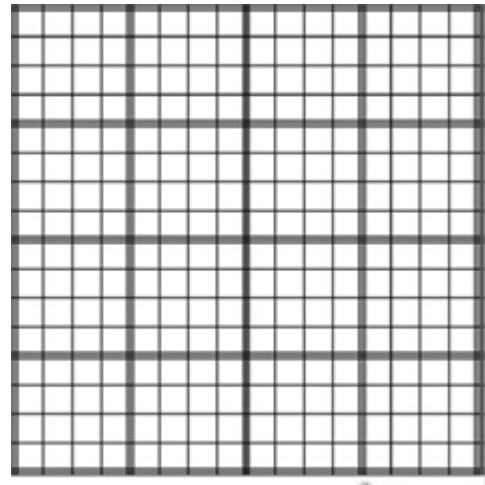


Abbildung 9: Standard-Ausführung der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer
(www.ZaehlKammer.de)

$$\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Zellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammerhöhe [mm]}}$$

4.1.5 Aussäen

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die auszusäenden Mengen so gewählt, dass nach 24 h mit der Behandlung begonnen werden konnte. Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 95 % geerntet.

Tabelle 12: Zellzahl der für die Versuche ausgesäten Zellen

Kulturschalen	Zellzahl/well
10 cm	5.000.000
6-well Platte	450.000
12- well Platte	150.000
96-well Platte	10.000

4.1.6 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die gefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, die Zellsuspension in 9 mL DMEM/ F12 +/ + Medium resuspendiert und bei 900 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 10 mL Medium resuspendiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Nach 2 Zellpassagen wurden Versuche mit den Zellen durchgeführt.

Zur Lagerung wurden die Zellen wie (4.1.3) beschrieben trypsiniert, die Zellsuspension wurde 5 min bei 900 g zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Zellpellet wurde anschließend in 3 mL vorgekühlten Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert (1 mL pro Röhrchen). Der anschließende Kühlvorgang erfolgte schrittweise, die Aliquots wurden zunächst auf Eis für 1 h inkubiert, anschließend über Nacht bei -70 °C weiter herunter gekühlt. Anschließend konnten die Zellen langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

4.1.7 Zellbehandlung

Für die Zellbehandlung wurde ein Kulturmedium mit wenig FKS (1 %) verwendet, da die in FKS vorhandenen Bestandteile im Verdacht stehen, den Wnt-Signalweg zu beeinflussen[148].

Um das β -Catenin-Signal zu verstärken wurden die GSK-3 β -Inhibitoren LiCl, CHIR99021 und der Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet. LiCl stabilisiert die inaktive phosphorylierte Form der GSK-3 β und inhibiert diese so unkompetitiv [149]. CHIR99021 bindet kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle und inhibiert so die Kinaseaktivität der GSK-3-Familie. Zur Inhibition des Wnt-Signalwegs wurde iCRT verwendet. Zur Inhibition von Calpainen wurden die Calpain-Inhibitoren PD150606 und Calpain Inhibitor XI sowie der Ca²⁺-Chelator BAPTA/AM (1,2-bis(o-aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Essigsäure) verwendet. Zur Inhibition der Src-Kinase wurden die Src-Inhibitoren PP1 und Src Inhibitor I verwendet. Um den EGFR zu inhibieren wurden die EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib verwendet.

Als Lösemittel-Kontrollen wurden NaCl oder DMSO verwendet.

Tabelle 13: Konzentration und Wirkung der zur Behandlung eingesetzten Substanzen

Substanz	Wirkung	Endkonzentration
BAPTA/AM	Ca ²⁺ -Chelator	2,5 μ M
Calpain Inhibitor XI	Calpain-Inhibitor	50 μ M
CHIR99021	GSK-3 β -Inhibitor	10 μ M
Cycloheximid	Translationshemmer	0,33 μ M
Erlotinib	EGFR-Inhibitor	2 μ M
Gefitinib	EGFR-Inhibitor	2 μ M
iCRT	Wnt-/ β -Catenin-Inhibitor	20 μ M
LiCl	GSK-3 β -Inhibitor	15 mM
MG132	Proteasom-Inhibitor	1 μ M
PD150606	Calpain-Inhibitor	25 μ M
Phenobarbital	k.A.	3 mM
PP1	Src-Inhibitor	10 μ M
Src Inhibitor I	Src-Inhibitor	10 μ M
TCPOBOP	K.A.	10 μ M

4.1.8 AlamarBlue Assay

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der AlamarBlue-Assay verwendet, dabei wurde der verwendete redox-sensitive Farbstoff Resazurin in lebenden Zellen durch NAD(P)H+H⁺ zu dem fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert. Um eine mögliche Zytotoxizität zu messen wurden die Behandelten Zellen 1h mit Resazurin-haltigem Medium inkubiert, die Fluoreszenz wurde anschließend bei 600 nm_{exc} und 550 nm_{emm} gemessen. Die Zellen konnten anschließend weiter verwendet werden.

4.1.9 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion von Plasmiden wurde das kationische Reagenz Lipofectamine 2000 verwendet. Die Zellen wurden in Antibiotika-freiem Medium kultiviert, die Transfektion wurde bei einer Konfluenz von ca. 50 % und 24 h vor Behandlung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt [150]. Die zu transfizierenden Plasmide und Lipofectamin 2000 wurden in OPTI-MEM I Medium in Polystyrenröhrchen resuspendiert, zunächst wurden diese separat gelöst und für 5 min bei RT inkubiert, anschließend wurden die Lösungen gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert, 100 µl der Lösung wurden kreisförmig auf die Zellen in das Medium aufgetropft.

Zur Reduzierung der Zytotoxizität des Transfektionsreagens wurde ein Mediumwechsel nach 4-6 h durchgeführt.

4.1.10 Tet-On Induzierbare Expression von β -Catenin^{S33Y}

Das *Tet-On Advanced System* von Clontech wurde verwendet um das in der C-terminalen regulatorischen Domäne mutierte β -Catenin^{S33Y} bei Bedarf zu exprimieren. Diese Form ist durch Austausch der Aminosäure Serin an der Position 33 zu Tyrosin (S33Y) gegenüber der durch GSK3 β vermittelten Phosphorylierung resistent und somit unempfindlich für den *destruction-complex* vermittelten Abbau. Das verwendete System besteht aus dem *Tet-On Advanced* Transaktivator (rtTA), dabei handelt es sich um eine modifizierte Form des *reversed* Tet-Repressor-Proteins aus *E. coli*, und dem induzierbaren Promotor P_{Tight}, der die Expression von β -Catenin^{S33Y} reguliert. In

Gegenwart von Doxycyclin bindet der Transaktivator (rtTA) an den P_{Tight}-Promotor und aktiviert damit die Expression des Zielgens [151]. Beide Plasmide wurden stabil transfiziert; die daraus entstandene Zelllinie 70.4 Mo K50 wurde verwendet.

Zur Aktivierung der Expression von β -Catenin^{S33Y} wurden die Zellen über 24 h mit 10 μ g/ mL behandelt.

4.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

4.2.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Bakterien-Glycerolstocks zur Expression der Fusionsproteine *glutathion-S-transferase-E-cadherin cytosolic tail* (GST-ECT), *glutathion-S-transferase-T-Cell factor 4* (GST-TCF4) und *glutathion-S-transferasen-inhibitor of β -catenin* (GST-ICAT) wurden von Kathrin Luckert zur Verfügung gestellt [20, 152].

Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt, dabei wurden 75 mL LB-Medium + 100 μ g/ mL Ampicillin mit dem jeweiligen Glycerolstock angeimpft und ü.N. bei 37 °C und 175 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Für die Expressionskultur wurden zweimal je 980 mL LB Medium + 100 μ g/ mL Ampicillin mit 20 mL Vorkultur angeimpft und in einem 4 l Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 37 °C und 100 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte (OD) bei 600 nm von 0,5-0,8 erreicht wurde. Durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) erfolgte die Induktion der Expression, diese erfolgte ü.N. bei 30 °C und 100 rpm im Orbitalschüttler.

Anschließend wurde die Expressionskultur bei 6000 g bei 4 °C für 5 min in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 mL PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für weitere 5 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Das Pellet wurde zum Zellaufschluss auf Eis in 25 mL Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall (10x 10x 2 sec Ultraschall-Stöße) beschallt. Das Volumen wurde mit Lysepuffer auf 50 mL aufgefüllt und für 1 h bei Raumtemperatur im Rotator lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 10000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert und der Überstand in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Das lösliche Proteinextrakt wurde vor der Aufreinigung über einen 0,22 μ m Spritzenfilter filtriert.

Anschließend wurde das filtrierte Extrakt über eine ÄKTA FPLC aufgereinigt. Zunächst erfolgte eine Affinitätsaufreinigung der GST-Fusionsproteine über eine GST Hitrap FF 1 mL (Amersham Biosciences) Säule. Zu diesem Zweck wurde die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen mit PBS equilibriert. Der Probenauftrag erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 mL/ min, anschließend

wurden ungebundene Proteine mit dem 10-fachen Säulenvolumen PBS (Flussrate 1 mL/ min) entfernt.

Die GST-Fusionsproteine wurden mit dem 5-fachen Säulenvolumen 10 mM Glutathion in 50 mM Tris HCl pH 8,5 bei einer Flussrate von 1 mL/ min eluiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit dem 5-fachen Säulenvolumen PBS wurde den Fraktionen NaCl bis zu einer Endkonzentration von 150 mM zugegeben.

Anschließend erfolgte die Abtrennung von niedermolekularen Pufferbestandteilen und GSH durch Größenasusschlußchromatographie über eine Hi Prep 26/10 Desalting Säule (Amersham Biosciences). Die Reinheit der GST-Fusionsproteine wurde mittels Coomassie LDS-Gel überprüft, die Proteinkonzentration wurde über die Absorption bei 280 nm bestimmt (Biophotometer Eppendorf).

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich um eine photometrische Methode, die auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 mit aromatischen und primär basischen Seitengruppen von Proteinen basiert [153]. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Standardkurve als Referenz mit sieben Messpunkten verwendet. Ausgehend von einer 2 mg/ mL BSA-Lösung wurde eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe in Lysepuffer erstellt. In einer Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) wurden 5 µL Probe/ Standard gemischt mit 200 µL verdünntem Bradford-Reagenz (1:4 mit H₂O). Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 570 nm im Luminometer 1420 Multilabel Counter Viktor 3V gemessen. Die Konzentrationen wurden aus den gemessenen Absorptions-Werten errechnet. Diese Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde für Lysate verwendet die in den Calpain-Aktivitäts Assays, den Src-Familien Aktivitäts Assay oder dem Pulsed-Silac Assay verwendet wurden.

4.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen, die für LDS-polyacrylamid Gelelektrophorese (4.2.4) oder den Mikrosphären basierten β -Catenin Assay (4.3) verwendet wurden, wurde das DC Protein Assay Kit verwendet. Dieses basiert auf der von Lowry beschriebenen kolorimetrischen Methode und stellt eine Kombination der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol Reagenz dar [154]. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Absorption bei 650 nm mittels des Mikropplattenlesers FLUOstar OPTIMA bestimmt. Die Proben wurde 1:10 mit Lysepuffer verdünnt. Als Referenz für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Standardkurve verwendet, hierfür wurde eine 2 mg/ mL BSA-Lösung 1:2 seriell verdünnt. 5 μ L Probe wurden für 15 min mit 200 μ L DC Protein Assay Reagenz Mix in einer Mikrotiterplatte inkubiert.

Die Konzentration wurde mit der MARS Daten Analyse Software aus den gemessenen Absorptions-Werten errechnet.

4.2.4 LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das NuPAGE System von Life Technologies verwendet, wobei es sich um eine diskontinuierliche denaturierende Lithium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (LDS-Page) handelt.

Das Proteingemisch wurde mit NuPAGE Sample Reducing Agent (10x), NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) versetzt und bei 70 °C und 650 rpm für 15 min denaturiert. Nachdem die NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris-Gel Kassetten in die Elektrophorese-Kammer eingespannt wurden, wurde die innere Kammer mit 200 mL NuPAGE MES SDS Running Buffer befüllt und 500 μ L Antioxidans zugesetzt. Anschließend wurden die denaturierten Proben auf das Gel aufgetragen. Als Proteinstandard wurde 6 μ L SeeBlue2 verwendet. Die äußere Kammer wurde ebenfalls mit NuPAGE MES SDS Running Buffer befüllt. Die Elektrophorese wurde auf Eis bei einer Spannung von 200 V für 45 min durchgeführt.

4.2.5 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine nach der Gelelektrophorese wurden die Gele für 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde unspezifisch gebundener Farbstoff entfernt; zu diesem Zweck wurden die Gele 1 h in Entfärber I und anschließend ü.N. in Entfärber II gewaschen. Die gefärbten Gele wurden mit dem Fujifilm CCD-Kamerasystem ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) dokumentiert.

4.2.6 Western Blot

Zur weiteren Untersuchung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurden diese zunächst mittels Nasstransferverfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert [155]. Der Transfer erfolgte ebenfalls in dem NuPAGE-System bei einer konstanten Stromstärke von 160 mA für 80 min. Um zu überprüfen, ob der Transfer vollständig und artefaktfrei vollzogen wurde, wurden die Membranen reversibel mit einer Ponceau-S Färbelösung für ca. 5 min inkubiert. Die Dokumentation erfolgte über den ImageQuant LAS 4000 mini.

Anschließend wurde die Membran mit TBS+Tween20 0,1 % (TBST) vollständig entfärbt. Um unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers zu minimieren, wurde die Membran 1 h bei RT mit 3 % (v/w) BSA in TBST inkubiert. Die blockierte Membran wurde zur späteren Verwendung zwischen zwei Whatmanpaper getrocknet oder direkt mit dem Detektionsantikörper inkubiert. Die Membran wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend mit dem primären Antikörper (Tab AK Verdünnung) in 5 mL PBST + 1,5 % BSA auf dem Rollmischer bei 4 °C ü.N. inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit TBST (10 min) wurde die Membran erneut in TBST + 3 % BSA geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem Spezies-spezifischen Sekundäantikörper für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit TBST (20 min) erfolgte die Detektion mit dem entsprechenden Auslesesystem; für IRDey-konjugierte Antikörper wurde der Odyssey Infrared Imager und für HRP-konjugierte Antikörper der ImageQuant LAS 4000 mini verwendet. Die densitometrische Analyse erfolgte über die Image Studio V 4.0 Software.

Tabelle 14: Antikörper Verdünnungen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-C-Terminal β -Catenin	BD Biosciences, Franklin Lakes , US	1:1000
Anti-Calpain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US	1:1000
Anti-EGFR	Cell-signaling technology, Cambridge, UK	1:1000
Anti-MS IgG (H+L)-HRP	Jackson-Dianova, Hamburg, DE	1:4000
Anti-Rbt IgG (H+L)-HRP	Jackson-Dianova, Hamburg, DE	1:4000
Anti-Ms IgG-IRDye680	Li-Core Biosciences, Lincoln, US	1:10000
Anti-Ms IgG-IRDye800	Li-Core Biosciences, Lincoln, US	1:10000
Anti-rbt IgG-IRDye680	Li-Core Biosciences, Lincoln, US	1:10000
Anti-rbt IgG-IRDye800	Li-Core Biosciences, Lincoln, US	1:10000

4.2.7 Immunhistochemische Färbung

Zur Visualisierung der Lokalisation von β -Catenin wurden 70.4 K15-Zellen über 24 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (MG132), Phenobarbital (PB), in Kombination (MG132+PB) oder mit DMSO als Kontrolle (Ctr) behandelt. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 5 min auf Eis durch eine Lösung von 4 % Paraformaldehyd in PBS, gefolgt von einer 5 min Inkubation mit TBST +Triton X100 (0,1 %).

Um unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers zu minimieren wurden die Zellen 1 h bei RT mit 3 % (v/ w) BSA in TBST inkubiert, anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit dem pan-spezifischen β -Catenin-Antikörper (BD) 1:250 in 3 % (v/ w) BSA in TBST inkubiert.

Um den Detektionsantikörper zu entfernen wurden die Zellen dreimal mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers α -ms IgG-Cy3 über 2,5 h bei RT im Dunkeln. Nach einem finalen Waschriff (2 x 5 min) wurden die Zellen mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckt. Die Fluoreszenz des Cy3 Farbstoffes konnte bei 570 nm_{emm} im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

4.3 Mikrosphären- basierte Methoden

Seit dem Einzug des Microarrays in die Biowissenschaften in den 1990er-Jahren [156] ermöglichen diese die Identifizierung und Quantifizierung einer großen Anzahl von Analyten aus einer kleinen Probe innerhalb eines Assays. Die Protein-Microarray Technologie zeichnet sich durch Miniaturisierung, Sensitivität und die Möglichkeit, mehrere Analyten parallel zu analysieren aus und ist somit ein wichtiges Werkzeug zur Analyse von Proteinen und deren Interaktionen [152, 157-161]. Das hier verwendete Mikrosphären-basierte Array-System der Firma Luminex basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie, wobei bis zu 500 verschiedene superparamagnetische Mikrosphären-Spezies identifiziert werden können. Dies ermöglichen 3 Farbstoffe (rot, infrarot und orange) die in unterschiedlichen Konzentrationen in die 6,5 μm großen Polystyrol-Mikrosphären eingelagert werden.

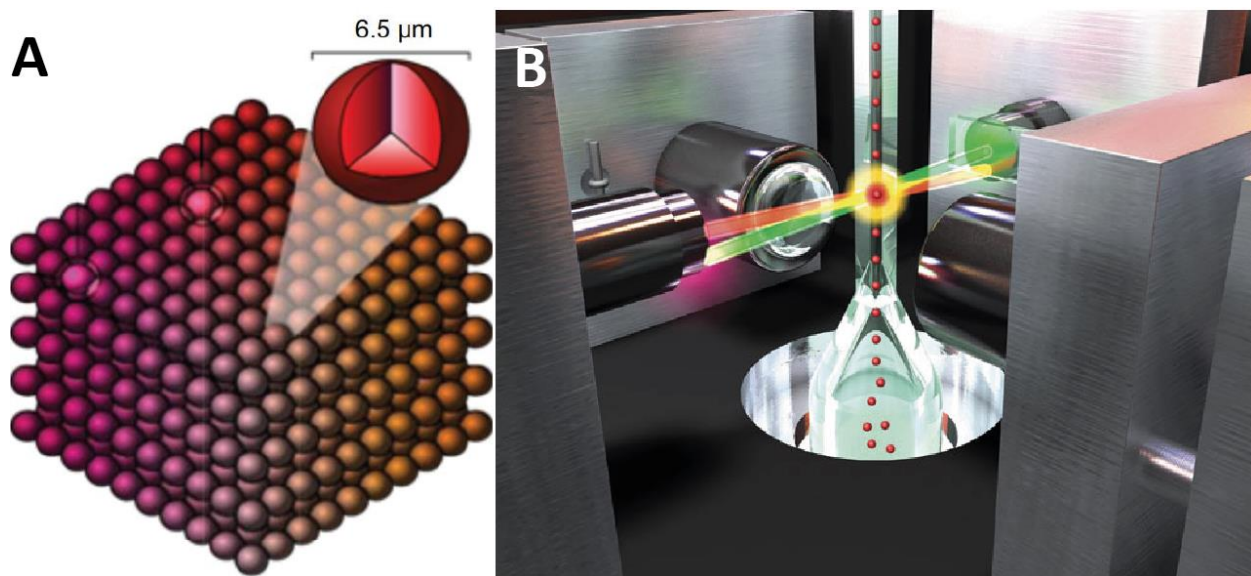


Abbildung 10: Die xMAP Technologie der Firma Luminex.

(A) Farbcodierung der Mikrosphärenspezies durch ein spezifisches Konzentrationsverhältnis der drei Fluoreszenz-Farbstoffe (Infrarot, Rot und Orange). (B) Schematische Darstellung der Durchflusszelle, in der mit Hilfe eines roten Lasers die Mikrosphärensorte bestimmt und mit einem grünen Laser das Reportersignal erfasst wird. Modifizierte Abbildungen nach [162].

Diese Farbcodierung wird in dem Auslesegerät FLEXMAP 3D durch einen roten Laser angeregt, wobei die resultierende Emission der Fluoreszenzfarbstoffe von Avalanche-Photodioden (APDs) in drei Klassifizierungs-Kanälen erfasst wird. Die Größe der Mikrosphären wird in einem Dubletten-Diskriminierungskanal mit einer separaten APD über die Lichtstreuung gemessen.

Dieser Kanal dient der Identifizierung von Partikeln, welche kleiner oder größer als eine einzelne Mikrosphäre sind, wie z. B. Mikrosphären-Aggregate.

Ein grüner Laser wiederum dient zur Anregung des Reporter-moleküls (Phycoerythrin), dessen Emission in einem Reporterkanal von dem Photomultiplier detektiert wird (Abbildung 10) [162].

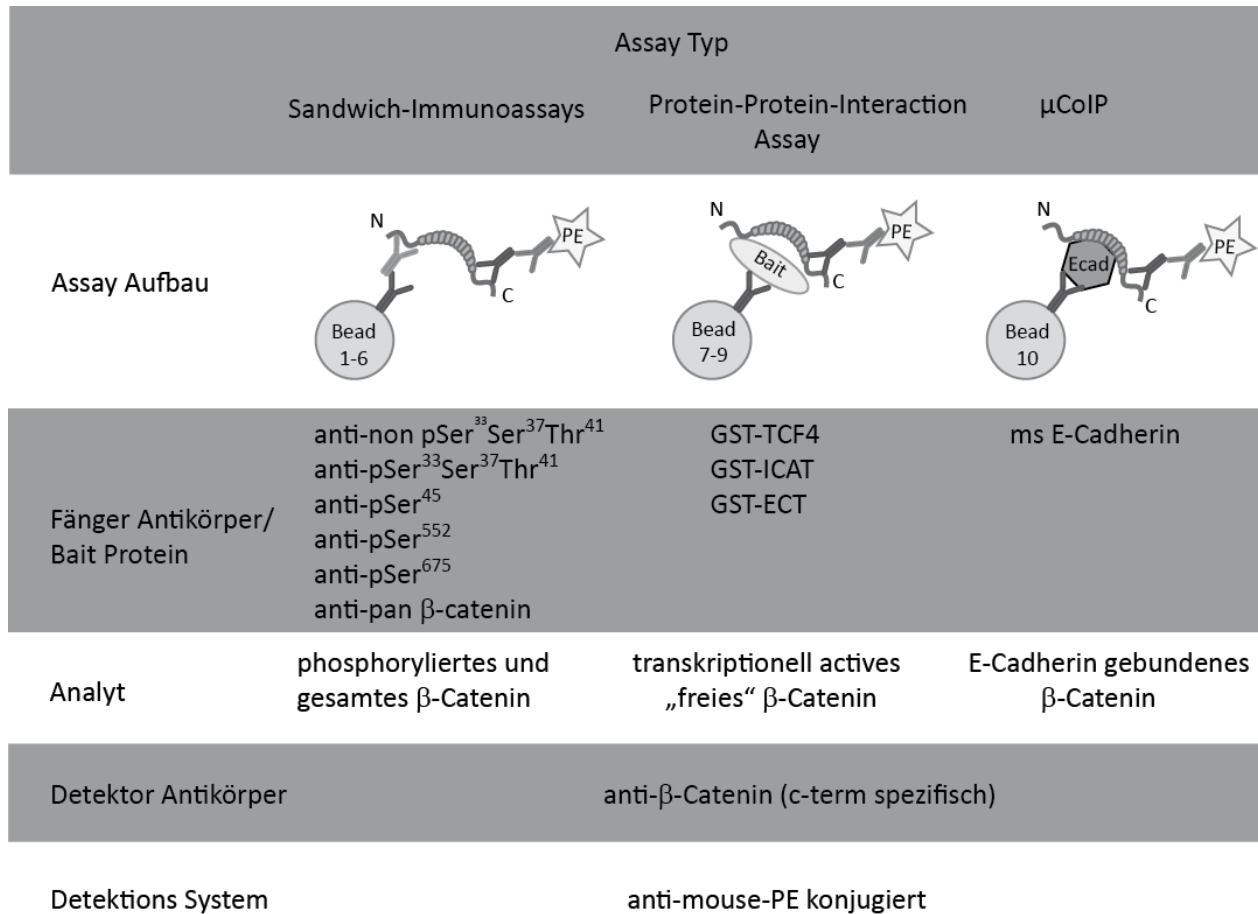


Abbildung 11: Schematischer Aufbau des β -Catenin Assays.

Zur Erfassung der verschiedenen phosphorylierten Formen von β -Catenin wurden phosphospezifische Antikörper auf Mikrosphären immobilisiert und in einem konventionellen Sandwich Immunoassay eingesetzt. Zur Detektion von „freiem“ β -Catenin wurden die GST-Fusionsproteine GST-ICAT, GST-ECT und GST-TCF4 auf Mikrosphären immobilisiert und in einem Protein-Protein-Interaktions-Assay verwendet. Um Membran-gebundenes β -Catenin zu detektieren wurden Antikörper gegen die cytosolische Domäne von E-Cadherin auf Mikrosphären immobilisiert und in einer μ Co-Immunopräzipitation eingesetzt. Das gebundene β -Catenin wurde durch einen C-terminal bindenden Antikörper erkannt und konnte durch einen sekundären PE-konjugierten Antikörper detektiert werden [163].

Der hier verwendete β -Catenin-Assay verbindet 3 verschiedene Assay-Anordnungen (Abbildung 10), einen Sandwich-Immunoassay, einen Protein-Protein-Interaktions-Assay und eine μ Co-Immunopräzipitation (μ CoIP).

Dabei können die Gesamtmenge und die verschiedenen phosphorylierten Formen von β -Catenin durch den Sandwich-Immunoassay erfasst werden. Freies β -Catenin kann durch die Bindung an die bekannten Interaktionspartnern TCF, ICAT und ECT nachgewiesen werden [152]. Das mit E-Cadherin komplezierte β -Catenin wiederum wird durch die μ CoIP detektiert [163, 164].

4.3.1 Kovalente Immobilisierung von Proteinen auf Carboxyl-funktionalisierten Polystyrolmikrosphären

Zur Kopplung einer Bead-Spezies wurden 200 μ L der MagPlex[®] Stocklösung (entspricht $2,5 \times 10^6$ Mikrosphären) zunächst gründlich gemischt und 30 sec mit Ultraschall behandelt; die Suspension wurde anschließend in ein 1,5 mL lowBinding Tube überführt und der Überstand nach Zentrifugation (2 min, 10000 g; alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten analog) verworfen. Anschließend wurden die MagPlex[®] zweimal mit Aktivierungspuffer gewaschen.

Die durch Carboxylgruppen funktionalisierte Oberfläche der *beads* (MagPlex[®] Mikrosphären) wurde anschließend durch Zugabe von 10 μ L (50 mg/ mL in Aktivierungspuffer) EDC-Lösung (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid) und 10 μ L (50 mg/ mL) Sulfo-NHS (Sulfo-N-hydroxysuccinimid) aktiviert. Die Inkubation erfolgte in 80 μ L Aktivierungspuffer für 20 min im Dunkeln, wobei die Carboxylgruppen zu einem Aktivester aktiviert wurden. Nach 2 Waschschrinen mit 500 μ L Kopplungspuffer wurden die aktivierten *beads* in der Verdünnung der zu immobilisierenden Antikörper in Kopplungspuffer (Tabelle 15) aufgenommen und für 2 h im Dunkeln inkubiert. Dabei werden die Antikörper kovalent immobilisiert, indem die primären Aminogruppen (NH_2 -Gruppen) der eingesetzten Antikörper unter Freisetzung eines Harnstoffderivats mit den Aktivestern auf den Mikrosphären zu Amidbindungen abreagieren.

Tabelle 15: Kopplungskonzentration der immobilisierten Antikörper

Antikörper	Antigen	Endkonzentration
dk- α -rbt IgG	α -rabbit	100 μ g/ mL
gt- α -GST	α -GST	250 μ g/ mL
gt- α huE Cadherin	α huE Cadherin	80 μ g/ mL
gt- α msE Cadherin	α msE Cadherin	80 μ g/ mL
gt- α total β -Catenin	α total β -Catenin	80 μ g/ mL

Anschließend wurde der nicht gebundene Antikörper durch 3-maliges waschen mit 1000 μ L Waschpuffer entfernt und die gekoppelten MagPlex[®] Mikrosphären wurden in 100 μ L Lagerungspuffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die *bead*-Konzentration in einer 1:500-Verdünnung nach folgender Formel im Luminex FLEXMAP3D-System ermittelt:

$$beads/\mu l = \frac{(gemessene\ beads \cdot 500)}{30}$$

4.3.2 Nicht-kovalente Immobilisierung von Proteinen auf Carboxyl-funktionalisierten Polystyrolmikrosphären

Die Fänger-Antikörper und Proteine für den Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay wurden nicht-kovalent auf den mit dem jeweiligen Antikörper gekoppelten *beads* gebunden.

Zu diesem Zweck wurde jeder phosphospezifischer β -Catenin-Antikörper separat mit einer definierten Anzahl an α -rabbit-Antikörper gekoppelten *beads* (2,5 μ L phosphospezifischer Antikörper für 1×10^5 *beads*) für 6 h bei 650 rpm, RT und im Dunkeln in 50 μ L PBS inkubiert. Die GST-Fusionsproteine wurden für 4 h ebenfalls separat mit einer definierten Anzahl an α -GST gekoppelten *beads* (1 μ g GST-Fusionsprotein für 1×10^5 *beads*) bei 650 rpm, RT und im Dunkeln in 50 μ L PBS inkubiert. Anschließend wurde jede *bead*-Spezies separat 3-mal mit 200 μ L Waschpuffer mit Hilfe eines Magnet-Separators gewaschen und in 100 μ L Assay Puffer vereinigt.

4.3.3 Probenvorbereitung für den β -Catenin-Assay

Für die Zellyse wurden die Zellen zunächst mit vorgekühltem PBS (4 °C) gewaschen, anschließend wurden die Zellen (10 cm Zellkulturschalen) in 1 mL PBS von der Zellkulturplatte entfernt, die Zellsuspension wurde in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt und die Zellen bei 5000 g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 mL Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Für die Zellyse in 96-Well Zellkulturplatten wurden die Zellen mit vorgekühltem PBS (4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ L Lysepuffer/Well 30 min in Eis inkubiert und das Lysat wurde anschließend in 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt. Um Zelltrümmer und unlösliche Fraktionen zu entfernen wurden die Lysate bei 10000 g, bei 4 °C und für 30 min abzentrifugiert. Die Bestimmung der Konzentration des löslichen Proteinextrakts erfolgte wie in 4.2.2 beschrieben.

4.3.4 β -Catenin Assay

Die Proteinextrakte wurden mit Lysepuffer auf ein Volumen von 40 μ L bei einem einheitlichen Gesamtproteingehalt von 10-20 μ g verdünnt. Zusammen mit 20 μ L Beadmix (2000 *beads*/ Set und Well) wurden die Proteinextrakte in einer low-binding surface 96-Well Mikrotiterplatte ü.N. bei 4 °C und 750 rpm inkubiert.

Die Assay Durchführung erfolgte in einem semiautomatisierten System (KingFisher®96); dabei wurden die paramagnetischen Mikrosphären zwischen acht 96-Well Mikrotiterplatten transferiert. Diese Automatisierung ermöglicht einen erhöhten Durchsatz bei verbesserter Reproduzierbarkeit und Konsistenz der Ergebnisse.

Zur Minimierung des Hintergrunds wurde die sekundäre Antikörper-Lösung (dk- α -ms-IgG-PE 2,5 μ g/ mL in Assaypuffer) 2 h vor Assay beginn mit Esel- und Ziegen-Serum (1 % v/ v) bei RT und 650 rpm im Dunkeln inkubiert, um dadurch die Kreuzreaktivität des polyklonalen PE-konjugierten Sekundär-Antikörpers zu vermindern. Des Weiteren wurden alle verwendeten 96-Well PCR-Platten mit 100 μ L Assaypuffer für 10 min inkubiert, um die Oberfläche mit Protein abzusättigen. Anschließend wurden die jeweiligen 96-Well PCR-Platten mit 50 μ L/ Well der primären Antikörper-Lösung (ms- α -C-terminal- β -Catenin 1 μ g/ mL in Assaypuffer), der sekundären Antikörper Lösung oder 100 μ L/Well Waschpuffer befüllt. Anschließend wurden die

Assay-Ansätze aus der 96-Well Mikrotiterplatte in eine vorinkubierte 96-Well PCR-Platte überführt. Das Protokoll der Assay Durchführung (Tabelle 16) wurde mit Hilfe der KingFischer®-Software erstellt.

Nach der semi-automatischen Assay Durchführung erfolgte das Auslesen des Assays mit dem FLEXMAP 3D Gerät (Einstellungen: Probenvolumen 100 µL, maximale Messzeit 60 s, minimale Anzahl an Mikrosphären pro Sorte 100). Die Messwerte wurden als mittlere Fluoreszenzintensität (*median fluorescence intensity*, MFI) angegeben [163, 164].

Tabelle 16: Automatisierte Assay Durchführung in der KingFisher96®-Plattform

Schritt	Platte	Assay-Schritt	Dauer
1	Proben Platte	Sammeln der <i>beads</i>	10 sec
2	Wasch Platte 1	Waschen	1 min
3	Wasch Platte 2	Waschen	1 min
4	Detektions AK Platte	Primäre AK Inkubation	60 min
5	Wasch Platte 3	Waschen	1 min
6	Wasch Platte 4	Waschen	1 min
7	Sekundärer AK Platte	Sekundäre AK Inkubation	45 min
8	Wasch Platte 2	Waschen	1 min
9	Wasch Platte 4	Waschen	1 min
10	Elutions Platte	Elution der <i>beads</i>	20 sec

4.3.5 Protein-Protein-Interaktion

Um den direkten Einfluss von Phenobarbital auf die Protein-Protein Interaktion zwischen β -Catenin und den bekannten Bindungspartnern E-Cadherin, ICAT und TCF4 zu untersuchen wurden GST-Fusionsproteine wie in 4.3.2 beschrieben auf *beads* immobilisiert. Diese wurden mit auf gereinigtem β -Catenin (0,1-1 µg/ well) und Phenobarbital (0,3-30 mM) in Assaypuffer für 1 h in low-binding surface 96-Well Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze wie in 4.3.4 beschrieben ausgelesen.

4.4 Luziferase Assays

Für die Untersuchung der Genexpression eukaryotischer Zellen wurde unter anderem das Luziferase Reporter Assay System verwendet. Dieses basiert auf einem leicht zu messenden Biolumineszenz-Signal.

Zu diesem Zweck wurde der Subklon K15 der Maushepatom-Zelllinie 70.4 verwendet, der stabil mit dem SuperTopFlash-Reporter-Vektor transfiziert ist. Dieser Vektor dient der Untersuchung des kanonischen Wnt-/ β -Catenin Signalwegs. Dem Gen für die Firefly-Luziferase ist eine Promotorsequenz mit 7 TCF/ Lef-Bindestellen vorgeschaltet, wodurch der Reportervektor sehr sensitiv auf Veränderungen des Wnt-Signalwegs reagiert.

Kommt es zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs, bindet der β -Catenin-TCF4-Komplex an der TCF/Lef Promotorsequenz und es erfolgt die Expression der Luziferase. Diese oxidiert nun Luziferin zu Oxyluziferin und erzeugt so ein Chemolumineszenzsignal (Abbildung 12). Das Signal wurde im Luminometer bei 560 nm detektiert.

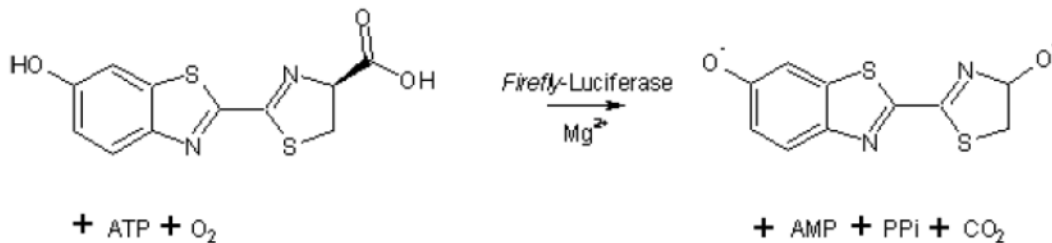


Abbildung 12: Firefly-Luziferase Reaktion.

Luziferin wird durch die Firefly-Luziferase in Anwesenheit von Mg²⁺ unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch zu Oxyluziferin oxidiert, dabei entsteht Chemolumineszenz. (Allard, 2008)

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 100 μ L 1x *passive-lysis-buffer* für 20 min auf dem Plattenschüttler inkubiert. Je 10 μ L des Lysats wurden auf eine 96-well-Platte überführt durch Zugabe des *Firefly-Luziferase-Puffers* wurde die Reaktion gestartet, die Lumineszenz konnte anschließend gemessen werden.

4.5 mRNA-Expressions-Analysen

4.5.1 RNA Isolierung

Zur Bestimmung der mRNA-Expression wurde diese nach der Methode von Chomczynski und Sacchi [165] isoliert. Durch die Verwendung eines Guanidiniumthiocyanat-haltigen Reagenz werden RNasen inaktiviert und gleichzeitig die Zellen lysiert, zusätzlich löst das in dem Reagenz enthaltene Phenol Proteine und DNA. Nachdem die Protein- und DNA-haltige Phase entfernt wurde, konnte die RNA gefällt werden.

Die Zellen wurden in 6-well-Gewebekulturplatte kultiviert, bei einer Konfluenz von mindestens 90 % wurden die Zellen mit 4 °C kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µL TriFast bzw. TRIzol lysiert. Das Lysat wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µL auf -20 °C vorgekühltem Chloroform für 30 sec kräftig ausgeschüttelt. Um eine saubere Phasentrennung zu erreichen wurde das Lysat bei 4 °C und 12.000 g für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die in der oberen wässrigen Phase gelöste RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dabei wurde eine Verunreinigung durch Interphase oder phenolische Phase vermieden. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 500 µL vorgekühltem Isopropanol bei -20 °C für 1 h gefällt. Die Suspension wurde bei 4 °C und 12000 g für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 mL -20 °C vorgekühltem 75 % Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugations-Schritt bei 4 °C und 12000 g für 15 min wurde das Pellet getrocknet und in 25 µL H₂O über Nacht bei 4 °C gelöst. Die Proben wurden bei -20 °C oder langfristig bei -70 °C gelagert.

4.5.2 Reverse Transkription

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben wurde die Reverse Transkriptase aus dem Myeloblastosis-Vogelvirus (*avian myoblastosis virus (AMV)*) verwendet. Diese besitzt neben RNA- und DNA-abhängiger Polymerase- auch RNase-H-Aktivität. Mittels PCR wurde die mRNA zu cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Zunächst wurde die RNA-Lösung auf 125 ng/ µL verdünnt; diese Verdünnung wurde für die Reverse Transkription (RT)-PCR verwendet.

Tabelle 17: RT-PCR Reaktionsansatz

Reagenz	Menge
H ₂ O	4,85 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
10x Puffer	1,5 µL
dNTPs (je 10 mM)	1,5 µL
Oligo (dT) ₁₅ Primer (100 µM)	0,38 µL
Random Primers (dN) ₆ (500 ng/ µL)	0,38 µL
AMV-Reverse Transkriptase (10 U/ µL)	0,39 µL

Der Reaktionsansatz (Tabelle 17) wurde für 60 min bei 42 °C inkubiert. Durch eine anschließende 5-minütige Denaturierungsphase bei 95°C wurde die AMV-Reverse Transkriptase hitzeinaktiviert und so die RT-Reaktion gestoppt. Für nachfolgende Verwendung wurde der RT-Reaktionsansatz 1:2 mit H₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

4.5.3 Real-time-PCR

Diese Weiterentwicklung der PCR ermöglicht es, die amplifizierte DNA zu quantifizieren [166].

Dies wurde durch den Einsatz interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht. Diese bilden mit

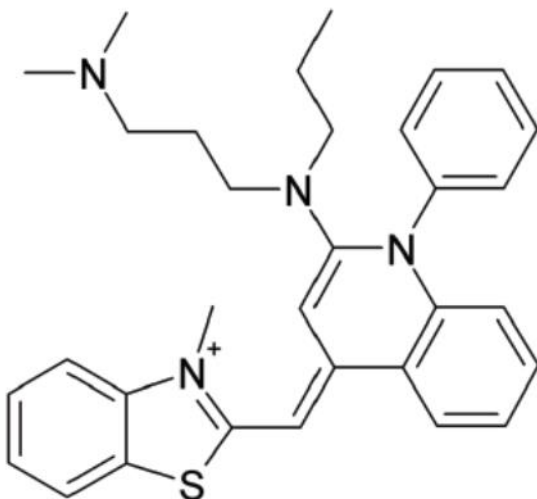


Abbildung 13: SYBER Green

Diese bilden mit doppelsträngiger DNA einen Komplex, der ein charakteristisches Absorptionsspektrum aufweist. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur amplifizierten DNA zu, diese Zunahme wird durch eine sigmoidale Amplifikationskurve dargestellt. Die relative Expression des Zielgens lässt sich durch den Schnittpunkt (*crossing point*) der Wendepunktstangenten mit der Reaktionszyklusachse berechnen.

Für Real-time-PCR wurde das LightCycler 1.5

System von Roche verwendet. Dieses nutzt zum Heizen und Kühlen der Proben einen temperierten Luftstrom. Dies und die geringe Probenmenge ermöglicht es die Zyklen-Dauer

drastisch zu verkürzen. Als Farbstoff wurde SYBR Green I (Abbildung 13) verwendet, der Komplex aus diesem und der doppelsträngigen DNA absorbiert blaues Licht der Wellenlänge 494 nm und emittiert grünes Licht der Wellenlänge 521 nm. Als Referenzgen wurde 18s rRNA verwendet und auf diese die Expression des zu untersuchenden Zielgens normalisiert.

Die PCR-Effizienz wurde über die Steigung m einer Standardkurve nach $E = 10^{-1/m}$ berechnet. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe einer Probe erstellt, die das gewünschte Zielgen enthielt. Hier wurde eine Positivkontrolle verwendet.

Der Idealwert für E beträgt 2, in diesem Fall wird angenommen, dass die angestrebte Verdoppelung des Zielgens erreicht wird. Dies entspricht einer Steigung von -3,32 und stellt das Maximum der zu erreichenden PCR-Effizienz dar. Die relative Expression des Zielgens wurde unter Annahme der maximalen PCR-Effizienz wie folgt errechnet:

$$F = \frac{2^{\Delta C_p(\text{Kontrolle}-\text{Behandelt})\text{Zielgen}}}{2^{\Delta C_p(\text{Kontrolle}-\text{Behandelt})\text{Referenzgen}}}$$

Dabei beschreibt Faktor F , um das Wievielfache die Expression der Probe gegenüber der Kontrolle erhöht ist.

Zunächst wurde für die Real-time-PCR ein Mastermix nach folgendem Schema erstellt:

Reagenz	Menge
H ₂ O _{dest}	5,7 µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 µL
Primer rev (20 µM)	0,25 µL
Primer fwd (20 µM)	0,25 µL
10x PCR-Mix	1 µL
Σ	8 µL

Der vorgekühlte Proben-Adapter wurde mit den Probenkapillaren bestückt und diese anschließend mit 8 µL Mastermix und 2 µL der jeweiligen cDNA-Probe befüllt. Die Kapillaren wurden verschlossen und kurz bei 3000 g für 60 sec zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das Probenkarussell gesteckt, und dieses in der LightCycler-Apparatur arretiert.

Das gewünschte Programm wurde mit Hilfe der Software *LightCycler Run 5.32* erstellt, es wurden folgende Programme verwendet:

Tabelle 18: LightCycler Programm für Axin2

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	8 sec
Anlagerung	62 °C	8 sec
Elongation	72 °C	11 sec
Schmelzkurve	62 °C→95 °C in Schritten von 0,1 °C pro sec	

Tabelle 19: LightCycler Programm für β -Aktin

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	5 sec
Anlagerung	58 °C	5 sec
Elongation	72 °C	11 sec
Schmelzkurve	58 °C→95 °C in Schritten von 0,1 °C pro sec	

Tabelle 20: LightCycler Programm für β -Catenin

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	7 sec
Anlagerung	56 °C	8 sec
Elongation	72 °C	11 sec
Schmelzkurve	56 °C→95 °C in Schritten von 0,1 °C pro sec	

Tabelle 21: LightCycler Programm für Calpain-Variante 1

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	6 sec
Anlagerung	61 °C	6 sec
Elongation	72 °C	9 sec
Schmelzkurve	61 °C→95 °C in Schritten von 0,1 °C pro sec	

Tabelle 22: LightCycler Programm für Calpain-Variante 2

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	96 °C	10 min
Denaturierung	96 °C	6 sec
Anlagerung	61 °C	6 sec
Elongation	72 °C	20 sec
Schmelzkurve	61 °C→96 °C in Schritten von 0,1 °C pro sec	

Tabelle 23: LightCycler Programm für Connexin 32

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	0 sec
Anlagerung	60 °C	5 sec
Elongation	72 °C	10 sec
Schmelzkurve	60°C→95°C in Schritten von 0,1°C pro sec	

Tabelle 24: LightCycler Programm für Cyp2C

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	8 sec
Anlagerung	62 °C	7 sec
Elongation	72 °C	5 sec
Schmelzkurve	62°C→95°C in Schritten von 0,1°C pro sec	

Tabelle 25: LightCycler Programm für Cyp2B10

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	0 sec
Anlagerung	60 °C	10 sec
Elongation	72 °C	5 sec
Schmelzkurve	60°C→95°C in Schritten von 0,1°C pro sec	

Tabelle 26: LightCycler Programm für 18s rRNA

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	10 sec
Anlagerung	65 °C	5 sec
Elongation	72°C	8 sec
Schmelzkurve	65°C→95°C in Schritten von 0,1°C pro sec	

Die Spezifität der PCR wird im Anschluss an die Temperaturzyklen durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Bei der charakteristischen Schmelztemperatur des PCR-Produkts wird die doppelsträngige DNA denaturiert, wobei eine Abnahme der Fluoreszenz detektiert wurde.

Primer-Dimere und Verunreinigungen können durch mehrfache Peaks oder durch Verbreiterung des Peaks erkannt werden.

4.6 Assays zur Messung der Calpain Aktivität

Um mögliche Änderungen der Aktivität der Calpaine durch Phenobarbital zu untersuchen wurden zwei verschiedene käufliche Assays verwendet.

4.6.1 Assay zur Messung der Calpain Aktivität von Abcam

Die behandelten Zellen wurden nach dem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokoll lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach 4.2.2 bestimmt. Für den Calpain-Assay wurden je Probe 50 µg Gesamtprotein eingesetzt, die Durchführung des Calpain Assays und die Messung der Calpain Aktivität erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.6.2 Assay zur Messung der Calpain Aktivität von Merck Millipore

Die behandelten Zellen wurden nach dem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokoll lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach 4.2.2 bestimmt. Für den Calpain-Assay wurden je Probe 50 µg Gesamtprotein eingesetzt, die Durchführung des Calpain Assays und die Messung der Calpain Aktivität erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.7 Src Aktivität Assay

Zur Bestimmung der Src-Aktivität wurde der nicht radioaktive ProFluor® Src-Kinase Aktivitäts Assay von Promega verwendet.

4.7.1 Zelllyse

Die Zellen wurden zweimal mit auf 4 °C gekühltem PBS gewaschen, abgekratzt und in 1 mL PBS resuspendiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (5000 g, 10 min bei 4 °C) wurden die Zellpellets in 1 mL Lysepuffer (Src-Assay) aufgenommen und auf Eis für 1 h inkubiert [167]. Anschließend wurden unlösliche Makromoleküle und Zelltrümmer durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (10000 g, 10 min bei 4 °C) entfernt, die Proteinkonzentration wurde wie in 4.2.2 beschrieben ermittelt.

4.7.2 ProFluor® Src-Kinase Aktivitäts Assay

20 µg Gesamtprotein wurden je Probe in dem ProFluor® Src-Kinase Aktivitäts-Assay eingesetzt und mit Lysepuffer (Src-Assay) auf 40 µL aufgefüllt. Um den Einsatz von nicht auf gereinigtem Lysat zu ermöglichen wurde das Volumen des vom Hersteller angegebenen Reaktionsansatzes um 10 µL pro Well verringert. Dies wurde durch eine Reduktion des zu verwendenden Wassers erreicht. Die nachfolgenden Schritte des ProFluor® Src-Kinase Aktivitäts Assay erfolgten nach den Angaben des Herstellers [168]. Die Detektion der Signale erfolgte über den 1420 Multilabel Counter Viktor 3V, wobei die Intensität des Signals der Inhibition der Src-Kinase entsprach, aus diesem Grund wurden die reziproken Signale auf die Kontrolle bezogen und so die relative Src-Aktivität berechnet.

4.8 Pulsed-SILAC Assay

Zur Bestimmung der Neusyntheserate von β -Catenin wurde die LC-MS (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie) basierte Pulsed-SILAC (*stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*) Methode verwendet. Bei dieser Methode wurden den 70.4 K15 Zellen während der Behandlung mit der zu untersuchenden Substanz isotoopenmarkierte Aminosäuren zur Verfügung gestellt. Infolge dessen wurden diese bei der Neusynthese von Proteinen eingebaut. Die Änderung der Masse konnte über die Analyse über LC-MS detektiert werden. Durch den Einsatz verschiedener SILAC-Medien konnten die Proben aufeinander bezogen werden, durch die Anreicherung der zu untersuchenden Peptide wurde die nötige Sensitivität gewährleistet [169].

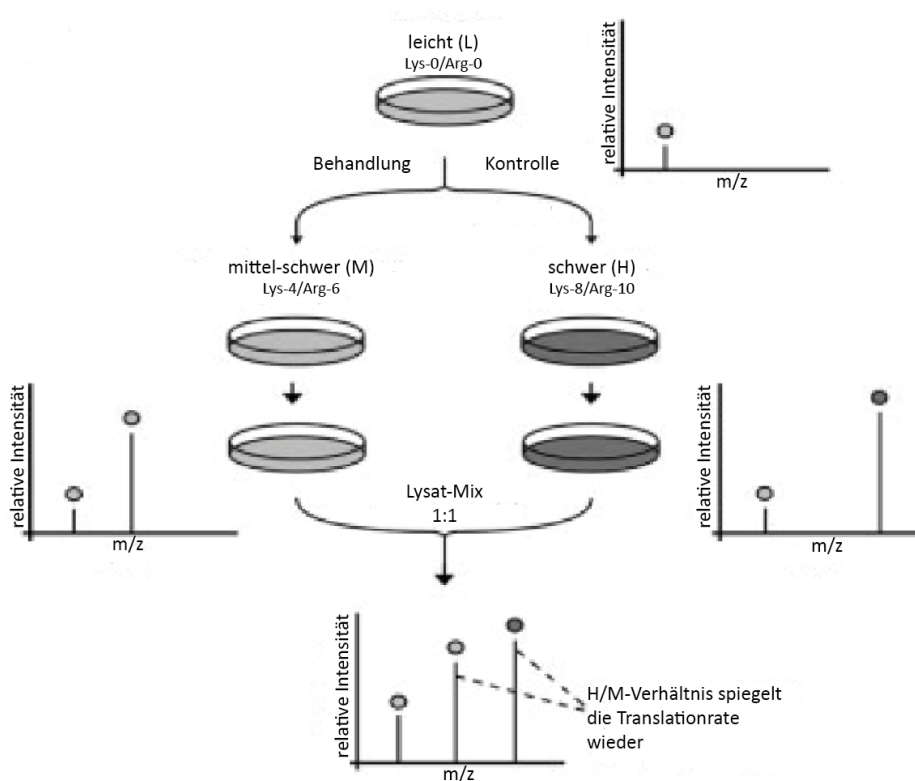


Abbildung 14: Prinzip des Pulsed-SILAC.

70.4 Zellen wurden in "leichtem" (L) Medium kultiviert. Die Behandlung erfolgte über 24 h und wurde in „mittel-schwerem“ (M)-Medium und die Lösemittelkontrolle wurde in "Schwerem" (H)-Medium inkubiert. Somit wurden neu synthetisierte Proteine entweder mit „mittel-schweren“ AS (Lys 4/ Arg 6) oder mit „schweren“ AS (Lys 8/ Arg 10) markiert. Die Lysate der jeweiligen Zell Populationen wurden im Verhältnis 1:1 (Gesamtprotein) gemischt und analysiert. Das Verhältnis der im MS gemessenen AUC für der jeweiligen „H“-und „M“-Peptide spiegelt Unterschiede in der Translationsrate der entsprechenden Proteine wieder [169].

4.8.1 Zellkultur und Behandlung

Die Zellkultur-Arbeiten wurden wie in 4.1 beschrieben durchgeführt. Zur Markierung der neu synthetisierten Proteine wurden zwei verschiedene Nährmedien eingesetzt. Die jeweilige Kontroll-Gruppe wurde mit „schwerem“ Nährmedium inkubiert. Dieses enthielt isotopenmarkiertes L-Lysin HCl, welches an den Positionen C 6 mit ^{13}C und an N 2 mit ^{15}N markiert war (MW=190.59 kDa) und an den Positionen C 6 mit ^{13}C und an N 4 mit ^{15}N markiertes L-Arginin HCl (MW=220.59 kDa), somit ergab sich eine Differenz von + 8 kDa für Lysin und + 10 kDa für Arginin. Die jeweilige Behandlungs-Gruppe wurde mit „mittel-schwerem“ Nährmedium inkubiert. Dieses enthielt isotopenmarkiertes L-Lysin HCl, welches an den Positionen 4,4,5,5 mit Deuterium markiert und somit 186.67 kDa schwer war und L-Arginin HCl, welches an der Position C 6 mit ^{13}C markiert war und somit ein Molekulargewicht von 216.62 kDa aufwies, somit ergab sich eine Differenz von + 4 kDa für Lysin und + 6 kDa für Arginin.

4.8.2 Zelllyse

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 30 μl Lysepuffer lysiert. Die Zellen wurden im Anschluss 1 h in einem Kühlraum auf einem Schüttler bei 4 °C lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 mL Reaktionsröhrchen überführt und bei 3000 g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde nach 4.2.3 bestimmt.

4.8.3 Tryptische Proteolyse

Für die Proteolyse wurden 30 μg Gesamtprotein je Lysat eingesetzt; es wurden die Lysate der Behandlung mit dem jeweiligen Lysat der Kontrolle gemischt und mit Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 110 μl aufgefüllt. Nach die Zugabe von 90 μl TEA-Puffer 2 (100 mM) und 10 μl NOG (10 %) erfolgte die Reduktion der Proteine durch Zugabe von 1 μl TCEP (0,55 M). Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 99 °C für 5 min auf dem Schüttler bei 650 rpm inkubiert. Nachdem die Proben auf RT temperiert wurden, erfolgte die Zugabe von 2 μl einer 0,55 M Iodacetamidlösung, gefolgt von einer 30 min Inkubation bei RT auf dem Schüttler im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben nach Zugabe von 6 μl einer 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konzentrierten Trypsinlösung bei 37 °C im Dunkeln auf dem Schüttler bei 650 rpm inkubiert. Der proteolytische

Verdau wurde nach 16 h durch fünfminütiges Erhitzen auf 99 °C auf einem Schüttler (650 rpm) abgestoppt. Im Anschluss wurden 1,2 µl PMSF (200 mM) hinzugegeben. Das Verdauvolumen betrug nach Beendigung der enzymatischen Proteolyse 220 µl.

4.8.4 β -Catenin Immunopräzipitation

Die β -Catenin Immunopräzipitation erfolgte in einem semiautomatisierten Prozess, zu diesem Zweck wurde ein Magnet Partikel Prozessor System (KingFisher™ 96/Flex, Thermo Scientific) auf der Basis von 96-Well-PCR-Platten verwendet [170, 171]. In einem ersten Schritt wurden je 10 µg Probe mit einem Triple-X-Proteomics (TXP)-Antikörper in einem Volumen 100 µL PBS 0,3 % Chaps für 1 h inkubiert. Bei TXP-Antikörpern handelt es sich um peptidspezifische Antikörper, die kurze vier Aminosäuren umfassende N-terminale oder C-terminale Sequenzen binden. Dabei wurde der Ansatz in sechs zehnminütigen Zyklen abwechselnd 2 min gemischt und 8 min ruhen gelassen. In einem zweiten Schritt wurden magnetische Mikrosphären, auf denen Protein G immobilisiert wurde (Dynabeads® ProteinG), zu den Immunopräzipitations-Ansätzen hinzugegeben. Die eingesetzte Partikelsuspension (5 µL pro µg eingesetzten TXP-Antikörper) wurden zuvor mit PBS mit 0,3 % Chaps gewaschen. In einer 1 h Inkubation (6 Zyklen a 10 min, je 2 min mischen und 8 min ruhen) wurde der FC-Teil der TXP-Antikörper durch das Protein G gebunden, nicht gebundene Peptide wurden in 5 Waschschritten (2 x mit PBS mit 0,3 % Chaps, 3 x mit Ammoniumbicarbonatpuffer mit 0,3 % Chaps) entfernt. Die gebundenen Peptide wurden anschließend sauer in 20 µL 1 % Ameisensäure eluiert.

4.8.5 LC-MS-Analyse

Der MS-Analyse ging eine Auftrennung über ein Hochdruckflüssigkeitschromatographiesystem (Ultimate 3000 Nano HPLC System) voran. Als Vorsäule wurde eine C18 PepMap100 μ -Precolumn (Innendurchmesser: 300 μ m x 5 mm; Partikelgröße: 5 μ m; Porengröße: 100 Å) von Thermo Scientific verwendet. Für die Beladung der Vorsäule mit den jeweiligen Proben wurde folgender Beladungspuffer (98 % ddH₂O, 2 % ACN, 0,05 % TFA) bei einer Flussrate von 20 μ l/min verwendet, dabei wurde der Säulenofen auf 40°C temperiert. Die Trennung der Peptide erfolgte anschließend über eine analytische C18-Säule mit einer Länge von 150 mm, einer Partikelgröße von 2,2 μ m und einer Porengröße von 100 Å (Acclaim Rapid Separation LC (RSLC) Column) von Thermo Scientific. Als Laufmittel A wurde ddH₂O mit 0,1 % FA verwendet. Laufmittel B bestand aus 80 % ACN, 20 % ddH₂O und 0,1 % FA. Die analytische Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 300 nL/min.

4.8.6 Vergleich der β -Catenin Peptide mittels tSIM-MS (targeted Single Ion Monitoring)

Die isotoopenmarkierten Peptide wurden im Verhältnis zueinander referenziert, zu diesem Zweck kam die „targeted Single Ion Monitoring“-Methode (tSIM) zum Einsatz. Die Methode wurde hierbei um die Möglichkeit erweitert, bei ausreichend starker Signalintensität in festen Zeitabständen ein verifizierendes MS/MS-Spektrum aufzunehmen (tSIM \rightarrow ddMS²). Dabei hatten alle tSIM-ddMS²-Gradienten eine Laufzeit von 18 min und wurden im Positivmodus mit der Vorgabe, zweifach geladene Ionen zu berücksichtigen, vermessen.

Tabelle 27:Gerätekonfiguration der tSIM-Messmethode

SIM-Einstellungen	
Resolution	35000
AGC target	5e6
Maximum IT	60/ 120 ms
Loop count	2
MSX count	2
Isolation window	2 m/z
Scan range	300- 1200 m/z
Datenabhängige Einstellungen	
Underfill ratio	0,6 %
Intensity threshold	2e4
Apex trigger	---
Charge exclusion	---
Peptide match	---
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	2 s
Datenabhängiges-MS ²	
Resolution	17500
AGC target	2e5
Maximum IT	60/ 120 ms
Loop count	1
TopN	1
Fixed first mass	---
NCE/ stepped NCE	30

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von Phenobarbital auf Wnt-/ β -Catenin-Signalweg

Phenobarbital gilt als nicht mutagenes Kanzerogen mit einer tumorpromovierenden Wirkung im Tierversuch. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass neben dem nicht nukleären Rezeptor CAR und den GAP-Junctions auch β -Catenin eine entscheidende Rolle in dem Prozess der Kanzerogenese in Mäusen spielt [114, 121, 172, 173]. Um den Einfluss von Phenobarbital auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg zu untersuchen wurde der Subklon 70.4 K15 einer Maus-Hepatoma-Zelllinie verwendet. Dieser Subklon enthält einen stabil transfizierten Reporter-Vektor (STF), der die Überwachung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ermöglicht.

5.1.1 Immunhistologische Färbungen

β -Catenin spielt eine Schlüsselrolle im kanonischen Wnt-Signalweg und in der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten. Um die Lokalisation von β -Catenin zu visualisieren wurden 70.4 K15 immunhistologisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden 70.4 K15-Zellen über 24 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (MG132), mit Phenobarbital (PB), mit einer Kombination beider Substanzen (MG132+PB) oder mit DMSO als Kontrolle (Ctr) behandelt.

Die Detektion von β -Catenin erfolgte über einen pan-spezifischen Antikörper und einen mit dem Farbstoff Cy3 konjugierten sekundären Antikörper. Die Fluoreszenz des Cy3-Farbstoffes konnte bei 570 nm im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

In der Kontrolle (Abbildung 15 A) konnte eine starke Färbung der Zellmembran und eine leichte Färbung des Cytosols beobachtet werden. Es konnte kein β -Catenin im Kern detektiert werden. Nach der Behandlung mit Phenobarbital (Abbildung 15 B) konnte nur noch die Membran angefärbt werden, es konnte kein β -Catenin im Cytosol oder im Nukleus detektiert werden. Zur Steigerung der β -Catenin-Gehalts wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt, der den Abbau von β -Catenin hemmt. Nach dieser Behandlung (Abbildung 15 C) konnte β -Catenin im Kern und im Cytosol detektiert werden.

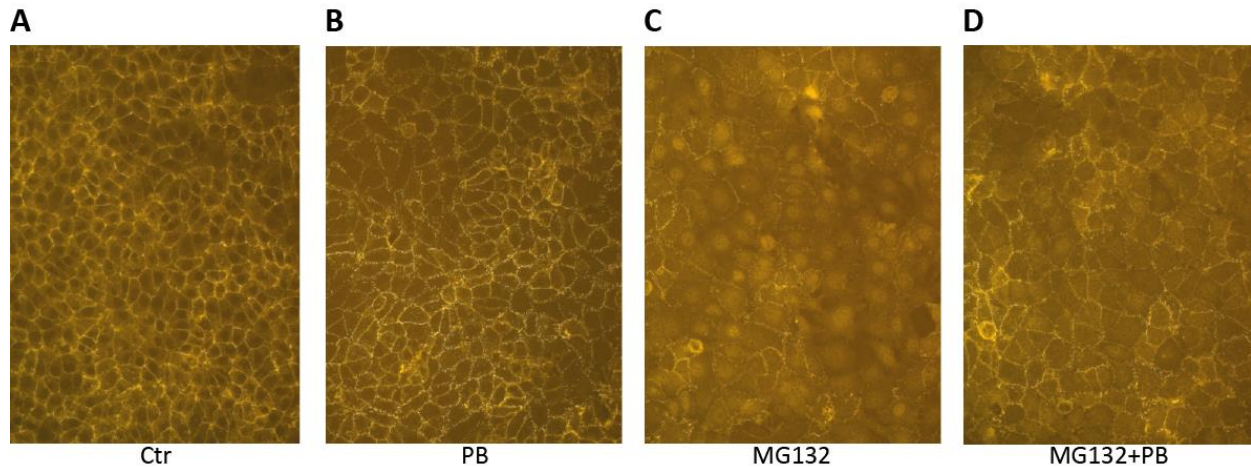


Abbildung 15: Immunhistologische Fluoreszenzmikroskopie.

70.4 Zellen wurden über 24 h mit 3 mM Phenobarbital (PB) (B), 1 μ M MG132 (MG132) (C), MG132 + Phenobarbital (MG132+PB) (D) oder DMSO also Kontrolle (Ctr) (A) behandelt. Zur Detektion von β -Catenin wurde der pan-spezifische Anti- β -Catenin von BD als Primärantikörper und als Sekundärantikörper ein Anti-Maus IgG Cy3 verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische Detektion erfolgte bei 570 nm_{em}.

Nach der Kombinations-Behandlung von MG132 und Phenobarbital (Abbildung 15 D) wurde deutlich weniger β -Catenin im Vergleich zur MG132 Einzelsubstanz-Behandlung im Cytosol detektiert; auch in den Kernen konnte fast kein β -Catenin detektiert werden.

5.1.2 Western Blot Analysen

Um die beobachteten Änderungen der β -Catenin-Mengen in der Zelle mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen wurden Western Blot-Analysen (Abbildung 16 A, C, E) mit einem *pan*-spezifischen Antikörper gegen β -Catenin durchgeführt.

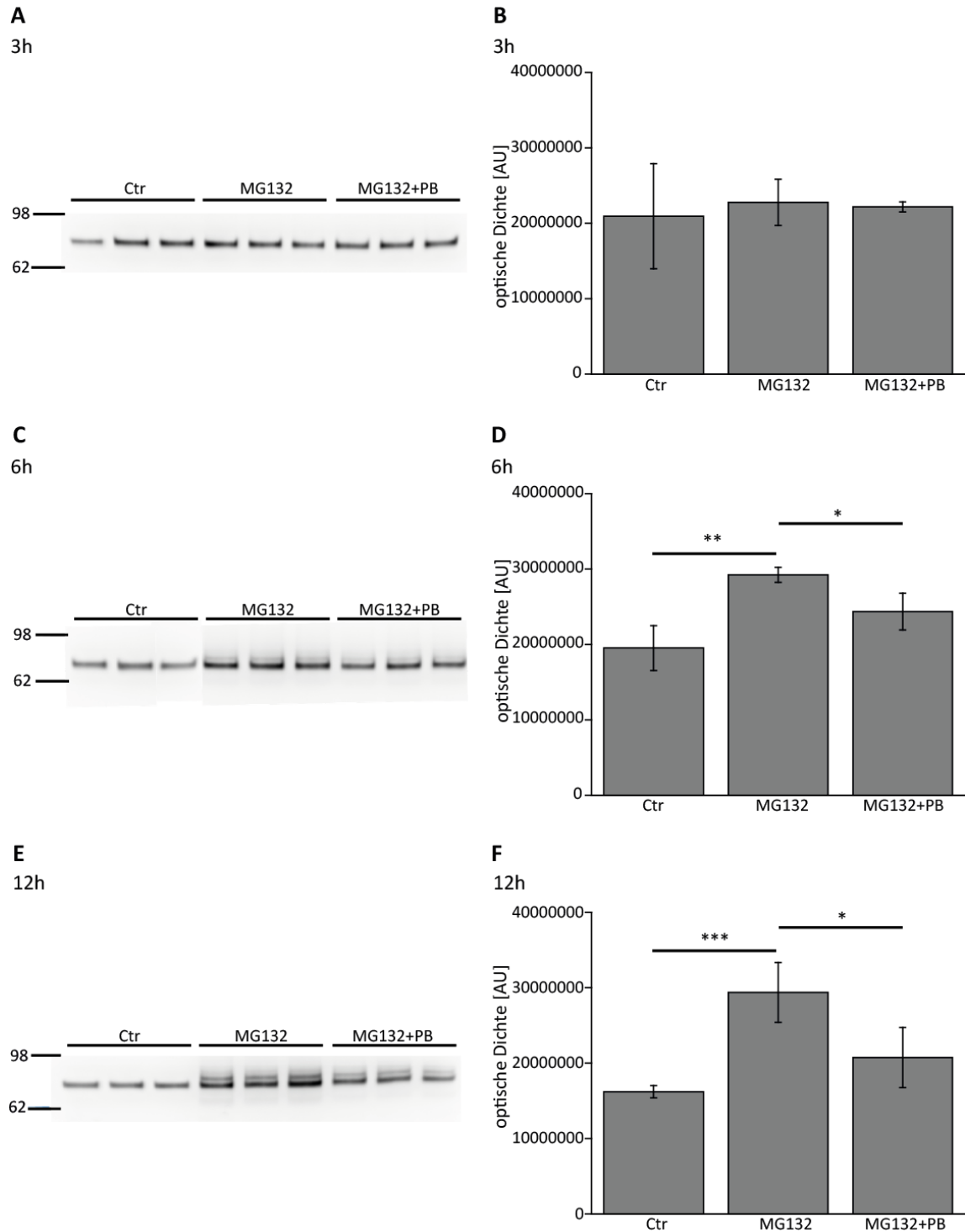


Abbildung 16: Änderung des β -Catenin-Spiegels nach Behandlung von 70.4 Zellen mit MG132 und Phenobarbital

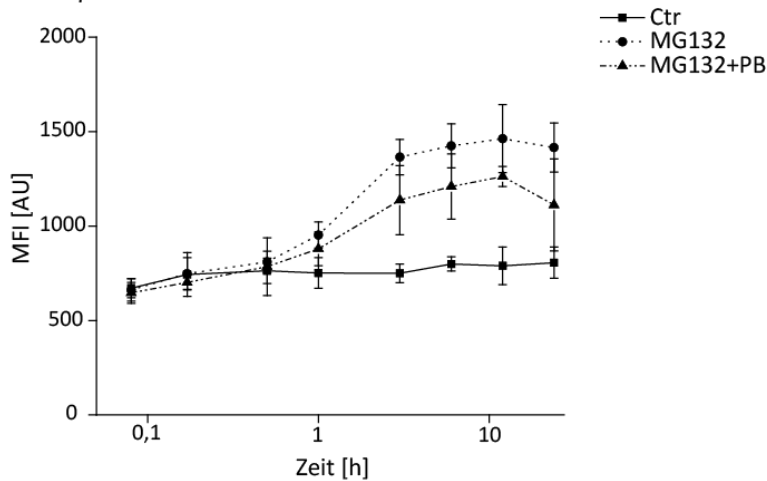
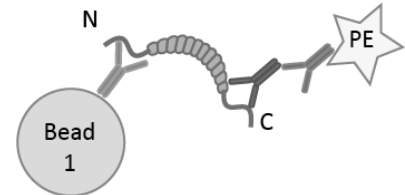
Western Blot-Analyse (**A**, **C**, **E**) und densitometrische Auswertung (**B**, **D**, **F**) von 70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen nach Behandlung mit Phenobarbital (3 mM) über 3 h (**A**, **B**), 6 h (**C**, **D**) und 12 h (**E**, **F**). Aufgetragen wurden 20 μ L Lysat. Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3); statistische Signifikanz wurde nach Student's t-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$) berechnet.

Nach Behandlung mit MG132 konnten zwei Banden detektiert werden, wobei die Bande mit dem höheren Molekulargewicht in der Kontroll-Behandlung nicht vorhanden war und sich erst nach 6 h (Abbildung 16 C) ausprägte. Da der *destruktions-complex* durch MG132 nicht inhibiert wurde, ist davon auszugehen, dass ubiquitinyliertes β -Catenin detektiert wurde. Die Gesamtmenge an β -Catenin war nach 6 h (Abbildung 16 C) und 12 h (Abbildung 16 E) nach Behandlung mit MG 132 erhöht; nach 3 h (Abbildung 16 A) war noch kein Effekt zu beobachten. Durch eine zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital wurde dieser Effekt deutlich verringert. Densitometrische Analysen (Abbildung 16 B, D, F) zeigten, dass Phenobarbital die Menge von β -Catenin um ca. 30 % nach 12 h (Abbildung 16 E, F) und um ca. 20 % nach 6 h (Abbildung 16 C, D) Behandlung verringert. Diese Änderungen des β -Catenin Spiegels nach Behandlung mit MG132 und MG132+PB waren signifikant.

5.1.3 Zeitliche Änderung der verschiedenen β -Catenin-Spezies

Die Western Blot-Analysen haben gezeigt, dass die Behandlung mit Phenobarbital die Menge von β -Catenin in der Zelle verändert. Um ein differenzierteres Bild über die Änderungen der verschiedenen β -Catenin-Spezies zu erhalten, wurde ein Mikrosphären-basierter β -Catenin-Assay verwendet. Dieser ermöglicht die detaillierte Analyse verschiedener β -Catenin-Pools; dabei wurden 3 verschiedene Assay Konfigurationen verwendet. Zur Erfassung der verschiedenen phosphorylierten Formen des β -Catenins wurden phosphospezifische Antikörper auf Mikrosphären immobilisiert und in einem konventionellen Sandwich Immunoassay eingesetzt (Abbildung 17 & Abbildung 18). Zur Detektion von „freiem“ β -Catenin wurden die GST-Fusionsproteine GST-ICAT, GST-ECT und GST-TCF4 auf Mikrosphären immobilisiert und in einem Protein-Protein-Interaktions-Assay verwendet (Abbildung 19). Um membrangebundenes β -Catenin zu detektieren wurden Antikörper gegen die cytosolische Domäne von E-Cadherin auf Mikrosphären immobilisiert und in einer μ Co-Immunopräzipitation eingesetzt (Abbildung 20).

70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen wurden in einer 96 Well-Zellkulturschale kultiviert und mit DMSO als Kontrolle, 1 μ M MG132 oder 1 μ M MG132 und 3 mM Phenobarbital über verschiedene Zeiträume von 5 min bis 24 h (5 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h) behandelt. Während der gesamten Dauer der Behandlung wurden die Zellen in 1 % FKS-haltigem Medium kultiviert um störende Effekte von Wachstumsfaktoren auszuschließen. Der Mikrosphären-basierte β -Catenin-Assay wurde als multiplexer Assay durchgeführt; dies ermöglichte die Messung aller Parameter in einer Probe. Die Detektion des gebundenen β -Catenins erfolgte durch einen C-Terminal bindenden Antikörper und einen PE-markierten Detektions-Antikörper (Abbildung 11). Das gemessene Signal wurde als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) angegeben.

Aanti-total β -Catenin**B****Abbildung 17: Zeitliche Änderung der gesamten β -Catenin-Menge in 70.4 K15 Zellen.**

Die Zellen wurden mit 1 μ M des Proteasom-Inhibitors MG132 alleine (MG132) oder in Kombination mit 3 mM Phenobarbital (MG132+PB), oder mit DMSO (Ctr) als Kontrolle über verschiedene Zeiträume (5, 30, 60, 180, 360, 720 und 1440 min) behandelt. Anschließend wurden 20 μ g Gesamtprotein in einem Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay analysiert. Dabei wurden, wie in der schematischen Darstellung des Sandwich-Immunoassays gezeigt (B), ein immobilisierter pan-spezifischer und ein C-Terminal bindender Antikörper gegen β -Catenin verwendet. Durch einen sekundären, PE-konjugierten Antikörper konnte die Bindung von β -Catenin detektiert werden. Die detektierten Signale wurden als Mittelwerte und Standardabweichung ($n=3$) in MFI (A) dargestellt.

In Abbildung 17 ist die zeitliche Änderung des gesamten β -Catenin dargestellt: Nach Behandlung mit MG132 kam es zu einem Anstieg des gesamten β -Catenins. Der zeitliche Verlauf zeigte einen Anstieg zwischen 30 min bis 12 h auf bis zu 250 % im Vergleich zur Kontrolle. Das Maximum war nach 12 h erreicht und blieb über den gesamten Zeitraum der Messung nahezu erhalten.

Bei der Kombinations-Behandlung mit MG132 und Phenobarbital war der beobachtete Anstieg des gesamten β -Catenins geringer; nach dem Erreichen des Maximums nach 12 h Behandlung kam es zusätzlich zu einem Abfall des β -Catenin Spiegels in den Zellen und somit zu einer Verringerung der Zunahme an gemessenen β -Catenin um bis zu 50 % im Vergleich zur MG132-Behandlung (Abbildung 17 A).

Die verschiedenen Phosphorylierungsformen von β -Catenin sind in Abbildung 18 dargestellt.

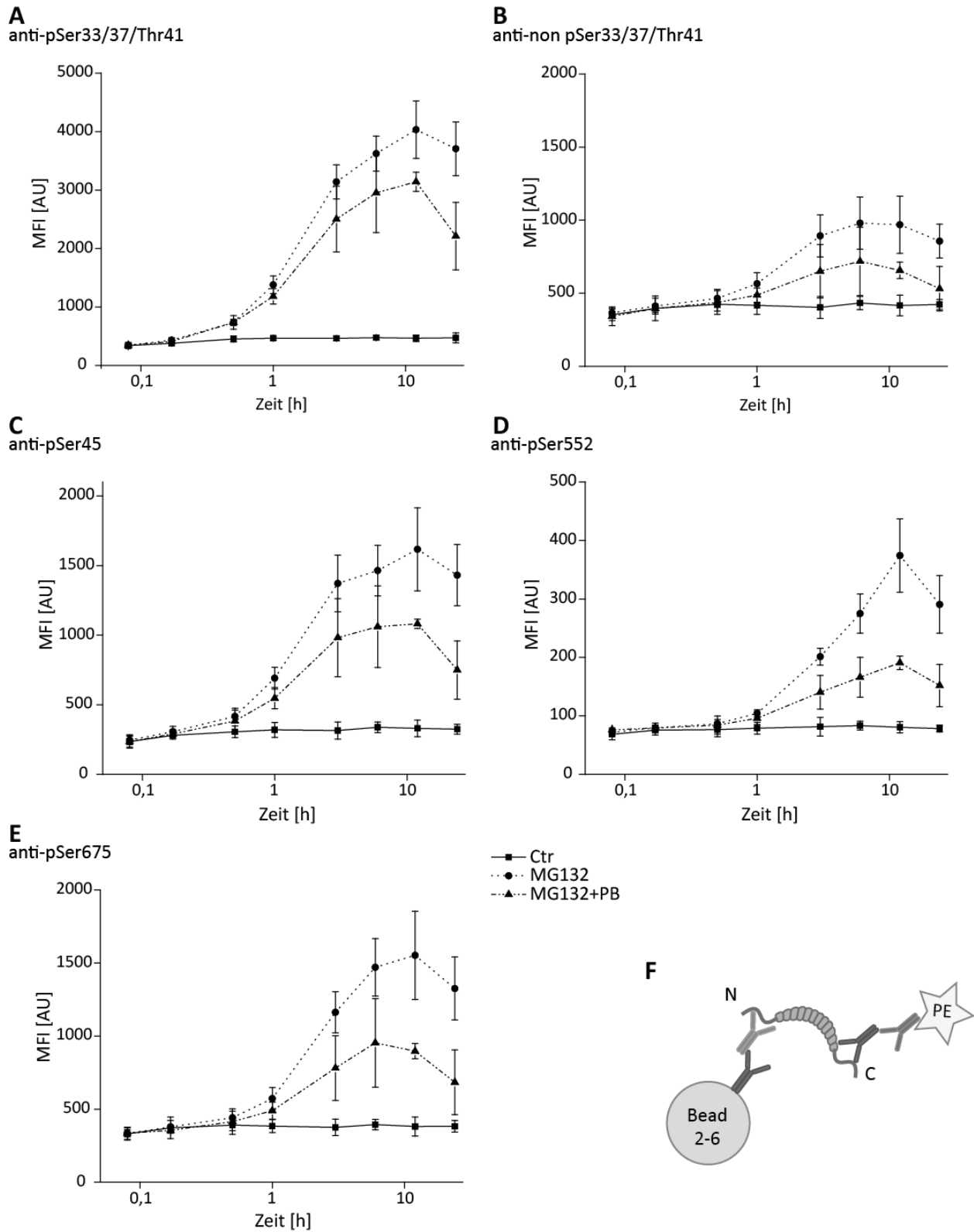


Abbildung 18: Zeitliche Änderung der verschiedenen Phosphorylierungspezies von β -Catenin in 70.4 K15 Zellen.

Die Zellen wurden mit $1 \mu\text{M}$ des Proteasom-Inhibitors MG132 alleine (MG132) oder in Kombination mit 3 mM Phenobarbital (MG132+PB), oder mit DMSO (Ctr) als Kontrolle über verschiedene Zeiträume (5, 30, 60, 180, 360, 720 und 1440 min) behandelt. Anschließend wurden $20 \mu\text{g}$

Gesamtprotein in einem Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay analysiert. Dabei wurden wie in der schematischen Darstellung des Sandwich-Immunoassays gezeigt (**F**), verschiedene nicht kovalent immobilisierte phosphospezifische (anti-pSer33/ 37/ Thr41 (**A**), anti-non pSer33/ 37/ Thr41 (**B**), anti-pSer45 (**C**), anti-pSer552 (**D**) und anti-pSer675 (**E**)) und ein C-Terminal bindender Antikörper gegen β -Catenin verwendet. Durch einen sekundären, PE-konjugierten Antikörper konnte die Bindung von β -Catenin detektiert werden. Die detektierten Signale wurden als Mittelwerte und Standardabweichung (n=3) in MFI (**A-E**) dargestellt.

Es wurden 4 verschiedene Phosphorylierungspositionen untersucht: Die Aminosäure, der N-terminalen Domäne, Ser45, welche durch die CK1 phosphoryliert wird und so die Bindung der GSK3 β ermöglicht, und der regulatorische Region Ser33/ Ser37/ Thr41, welche im *destruction-complex* durch die GSK3 β phosphoryliert wird und so β -Catenin für den Abbau markiert, sowie an den zwei Aminosäuren Ser552 und Ser675, der C-terminalen Domäne, dessen Phosphorylierung zu einer Stabilisierung des β -Catenins führt.

Durch die Behandlung mit MG132 kam es zu einem starken Anstieg des an Ser33/ Ser37/ Thr41 phosphorylierten β -Catenins (pSer33/ Ser37/ Thr41). Das Maximum wurde mit einer Anreicherung um das 8-fache im Vergleich zur Kontrolle nach 12 h Behandlung erreicht. Die Kombinations-Behandlung mit MG132 und Phenobarbital zeigte einen schwächeren Anstieg, mit einem starkem Abfall des pSer33/ Ser37/ Thr41 β -Catenins nach 24 h Behandlung um bis zu 40 % im Vergleich zur MG132-Behandlung (Abbildung 18A). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei dem an der Position Ser45 phosphorylierten (pSer45) β -Catenin: Durch Behandlung mit MG132 konnte die Menge an pSer45 β -Catenin um das bis zu 6-fache im Vergleich zu Kontrolle gesteigert werden. Durch zusätzliche Gabe von Phenobarbital konnte die Menge von pSer45 im Vergleich zur MG132-Behandlung deutlich reduziert werden (Abbildung 18 C).

Die nicht phosphorylierte Form Ser33/ Ser37/ Thr 41 (non-pSer33/ Ser37/ Thr41) von β -Catenin wurde ebenfalls detektiert. Hier wurde das Plateau-Niveau mit einer Verdoppelung der non-pSer33 /Ser37/ Thr41-Form von β -Catenin nach 6 h MG132-Behandlung erreicht; die Anreicherung nach Kombinations-Behandlung mit MG132 und Phenobarbital war deutlich geringer und fiel nach 24 h Behandlung annähernd auf Kontroll-Niveau ab (Abbildung 18 B).

Zusätzlich wurden die an den C-terminalen Aminosäuren Ser552 und Ser675 phosphorylierten Formen von β -Catenin untersucht. Nach Behandlung mit MG132 zeigten beide Phosphorylierungsformen ein Maximum der Anreicherung um das 3- bis 4-fache nach 12 h. Dieser Effekt wurde nach zusätzlicher Gabe von Phenobarbital bis zu 60 % im Vergleich zur MG132-

Einzel-Behandlung reduziert (Abbildung 18). Insgesamt konnten also alle beobachteten phosphorylierten Formen von β -Catenin durch Gabe von MG132 angereichert werden. Dieser Effekt wurde durch eine gleichzeitige Gabe von Phenobarbital um bis zu 60 % im Vergleich zur MG132-Einzel-Behandlung reduziert.

Die Messungen der Protein-Protein-Interaktionen von β -Catenin mit den rekombinanten Interaktionspartnern GST-ICAT, GST-ECT und GST-TCF4 sind in Abbildung 19 dargestellt.

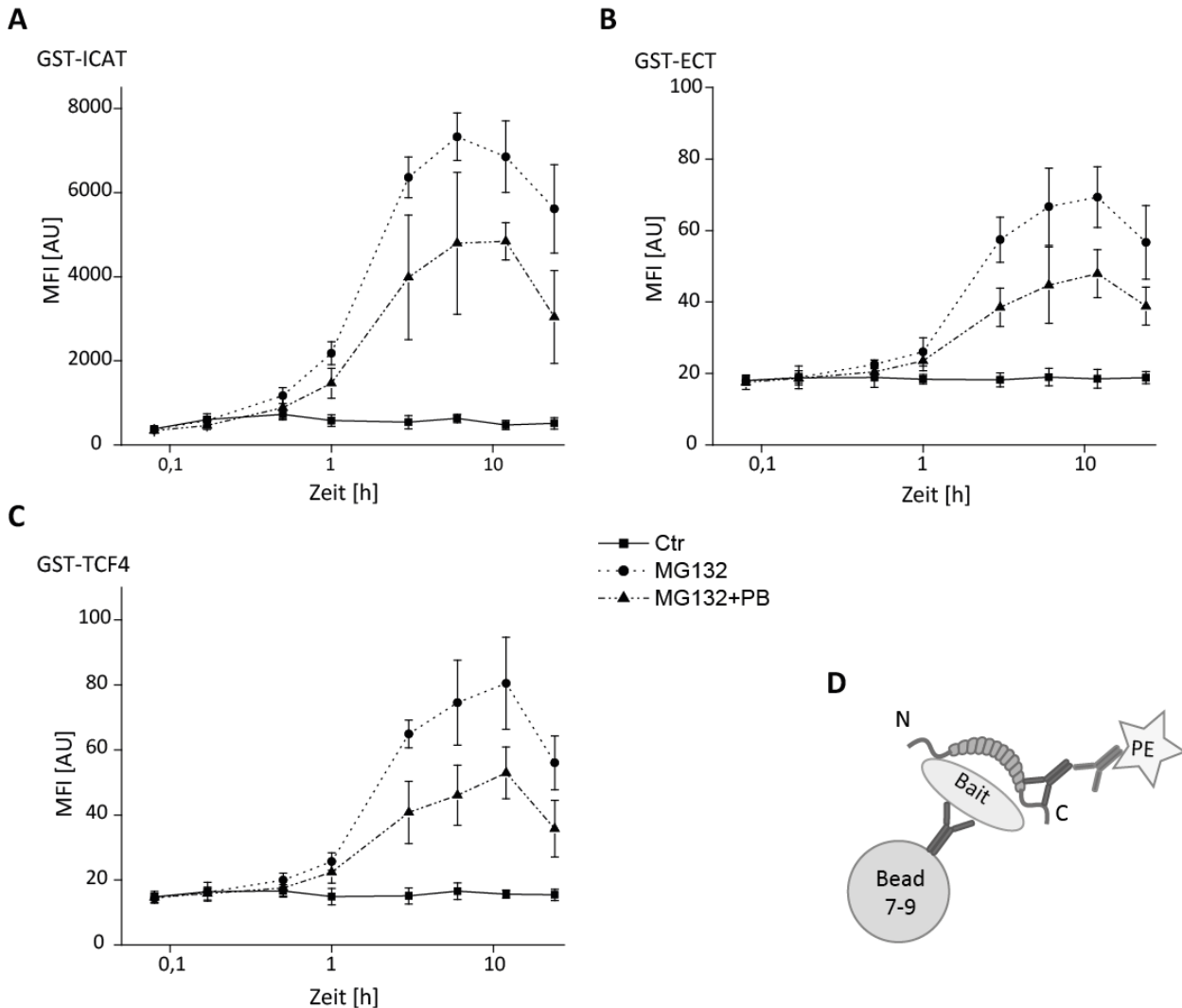


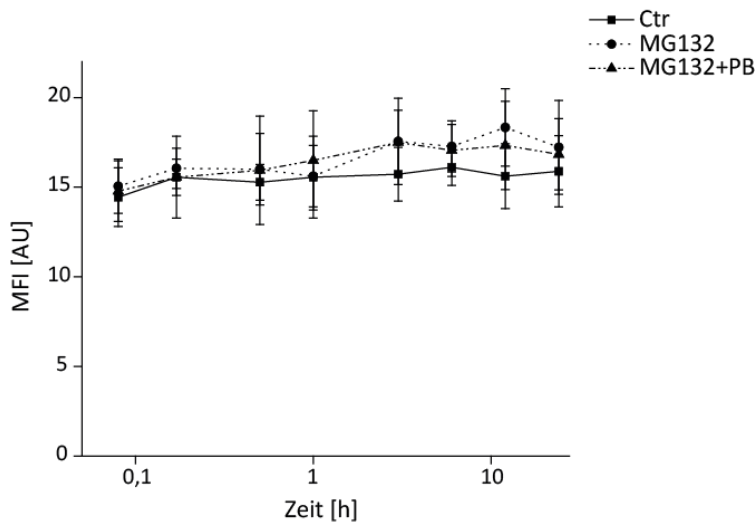
Abbildung 19: Zeitliche Änderung des zur Bindung „freien“ β -Catenins in 70.4 K15 Zellen .

Die Zellen wurden mit 1 μ M des Proteasom-Inhibitors MG132 alleine (MG132) oder in Kombination mit 3 mM Phenobarbital (MG132+PB), oder mit DMSO (Ctr) als Kontrolle über verschiedene Zeiträume (5, 30, 60, 180, 360, 720 und 1440 min) behandelt. Anschließend wurden 20 μ g Gesamtprotein in einem Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay analysiert. Dabei wurden wie in der schematischen Darstellung des Sandwich-Immunoassays gezeigt (D), verschiedene immobilisierte GST-Fusionsproteine als Fänger-Proteine (Bait-Proteine) (GST-ICAT (A), GST-ECT (B) und GST-TCF4 (C) und ein C-Terminal bindender Antikörper gegen β -Catenin verwendet. Durch einen sekundären, PE-konjugierten Antikörper konnte die Bindung von β -Catenin detektiert werden. Die detektierten Signale wurden als Mittelwerte und Standardabweichung (n=3) in MFI (A-C) dargestellt.

Durch diese Protein-Interaktionen konnte „freies“ β -Catenin detektiert werden. Die Interaktion mit dem Fusionsprotein GST-ICAT zeigte dabei das stärkste Signal. Nach Behandlung mit MG132

stieg die Menge an „freiem“ β -Catenin im Vergleich zur Kontrolle bis zu einem Maximum nach 6 h Behandlung an und fiel danach ab. Die Kombinations-Behandlung mit MG132 und Phenobarbital zeigte insgesamt geringere Mengen von „freiem“ β -Catenin im Vergleich zur MG132-Behandlung (Abbildung 19 A). Die Fusionsproteine GST-ECT (Abbildung 19 B) und GST-TCF4 (Abbildung 19 C) zeigten ein ähnliches Bild, wobei die Gesamtsignalstärke deutlich schwächer war. Das membrangebundene β -Catenin konnte durch eine μ CoIP detektiert werden (Abbildung 20).

A



B

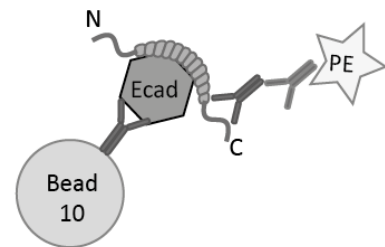


Abbildung 20: Zeitliche Änderung des an E-Cadherin gebundenen β -Catenins in 70.4 K15 Zellen.

Die Zellen wurden mit 1 μ M des Proteasom-Inhibitors MG132 alleine (MG132) oder in Kombination mit 3 mM Phenobarbital (MG132+PB), oder mit DMSO (Ctr) als Kontrolle über verschiedene Zeiträume (5, 30, 60, 180, 360, 720 und 1440 min) behandelt. Anschließend wurden 20 μ g Gesamtprotein in einem Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay analysiert. Dabei wurden wie in der schematischen Darstellung des Sandwich-Immunoassays gezeigt (**B**) ein immobilisierter E-Cadherin spezifischer und ein C-terminal bindender Antikörper gegen β -Catenin verwendet. Durch einen sekundären, PE-konjugierten Antikörper konnte die Bindung von β -Catenin detektiert werden. Die detektierten Signale wurden als Mittelwerte und Standardabweichung (n=3) in MFI (**A**) dargestellt.

Dabei konnte keine Veränderung durch MG132 oder MG132+Phenobarbital beobachtet werden.

5.1.4 Einfluss von Phenobarbital auf die Protein-Protein-Interaktion von β -Catenin

Die Analysen mit dem Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay zeigten Änderungen der verschiedenen phosphorylierten Formen von β -Catenin und Unterschiede der Protein-Protein-Interaktionen. Um einen möglichen direkten Einfluss von Phenobarbital auf die Protein-Protein-Interaktion zu überprüfen wurden die immobilisierten Fusionsproteine mit rekombinantem β -Catenin und unterschiedlichen Konzentrationen Phenobarbital (0,3 mM, 3 mM und 30 mM) in Assay-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das gebundene β -Catenin detektiert.

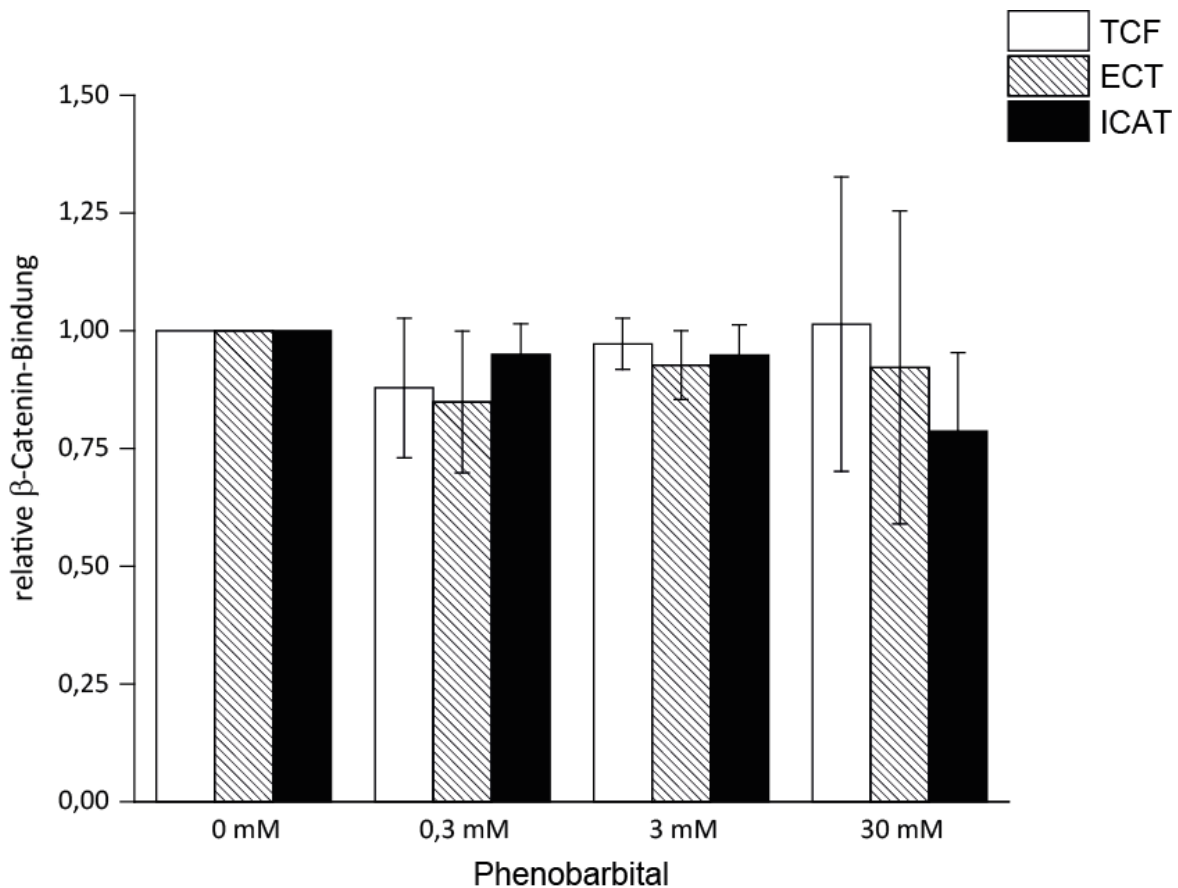


Abbildung 21: Einfluss von Phenobarbital auf die Protein-Protein-Interaktion von β -Catenin.

Dabei wurde die relative β -Catenin-Bindung an den Fusionsproteinen GST-TCF, GST-ECT und GST-ICAT nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Phenobarbital (0,3 mM, 3 mM und 30 mM) in Assay-Puffer bestimmt. Das an den Fusionsproteinen gebundene rekombinante β -Catenin wurde in einem Mikrosphären-basierten Protein-Protein-Interaktions-Assay detektiert und auf die Kontroll-Behandlung (0 mM Phenobarbital) normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

Wie in Abbildung 21 gezeigt konnte keine Änderung der β -Catenin-Bindung an die Interaktionspartner durch Inkubation mit Phenobarbital erreicht werden. Erst in der höchsten Dosierung konnte ein Effekt auf die Interaktion mit GST-ICAT gezeigt werden dieser liegt allerdings unter 25%. Bei den *bait*-Proteinen GST-TCF4 und GST-ECT kam es zu keiner klaren Änderung des Bindungsverhaltens. Des Weiteren wiesen die Messung bei der höchsten Dosis Phenobarbital (30 mM) starke Schwankungen auf.

5.1.5 Untersuchung der Aktivität des Wnt-Signalwegs

Um zu überprüfen ob die durch Phenobarbital induzierte Verringerung des β -Catenin-Proteinspiegels einen negativen Einfluss auf den Wnt-Signalweg hat, wurden 70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen über 24 h mit den Proteasom-Inhibitoren MG132 (MG132) und Bortezomib (B) zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Kombination mit Phenobarbital behandelt. Durch den stabil transfizierten β -Catenin-sensitiven STF-Reportervektor konnte die Aktivität des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs gemessen werden.

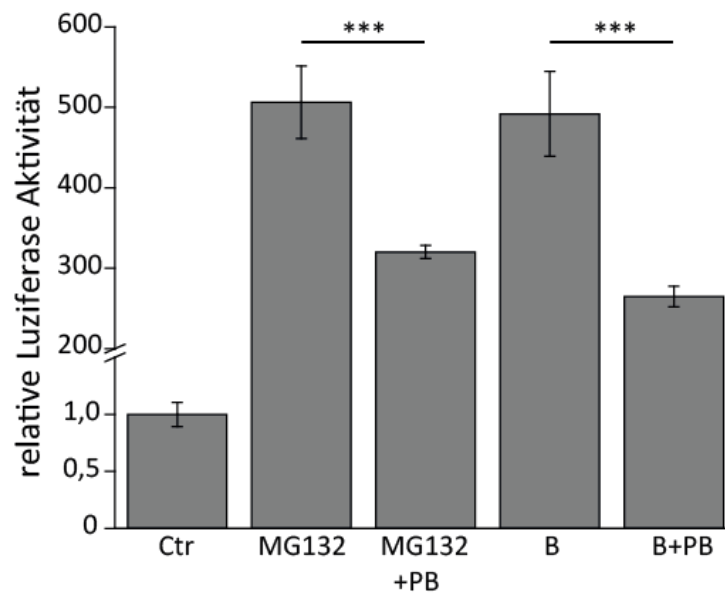


Abbildung 22: Einfluss von Proteasom-Inhibitoren und Phenobarbital auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg

70.4 K15-Zellen wurden über 24 h mit den Proteasom-Inhibitoren 1 μ M MG132 (MG132) und 1 μ M Bortezomib (B), alleine oder in Kombination mit 3mM Phenobarbital (PB) sowie DMSO als Kontrolle (Ctr) behandelt. Um mögliche zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Signale auf die Zellvitalität (AlamarBlue-Assay) bezogen und auf die Kontrollbehandlung normiert; Mittelwerte und Standardabweichung (n=2 unabhängige Experimente, jeweils in n=3 Replikaten) sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001) wurden berechnet.

Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die gemessenen Luziferase-Signale auf die durch einen AlamarBlue-Assay bestimmte Zellvitalität bezogen. Die relative Luziferase-Aktivität wurde durch Normierung auf die Kontrollbehandlung errechnet. Nach der Behandlung mit den beiden Proteasom-Inhibitoren konnte eine deutliche Aktivierung des Wnt-Signalwegs beobachtet

werden; dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital um ca. 40 % reduziert.

Um störende Effekte durch die vergleichsweise unspezifische Proteasom-Inhibition auszuschließen wurde eine spezifische Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs verwendet. Aus diesem Grund wurde in dem folgenden Experiment die stabil transfizierte Zelllinie 70.4 Mo K50 eingesetzt [144]. Diese Zelllinie exprimiert eine in der regulatorischen N-terminalen Domäne mutierte Form von β -Catenin.

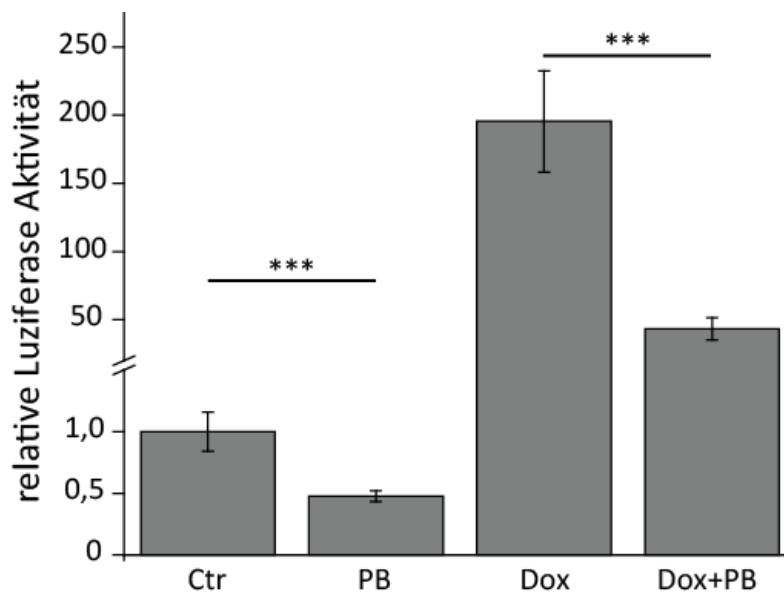


Abbildung 23: Einfluss von S33Y β -Catenin und Phenobarbital auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.

70.4 Mo K50-Zellen wurden über 24 h mit 10 μ g/ mL Doxycyclin (Dox) zur Aktivierung der Expression von β -Catenin S33Y, 3 mM Phenobarbital (PB), einer Kombination aus 10 μ g/ mL Doxycyclin und 3mM Phenobarbital (Dox+PB) sowie H₂O als Kontrolle (Ctr) behandelt. Um mögliche zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Signale auf die Zellvitalität (AlamarBlue-Assays) bezogen und auf die Kontrollbehandlung normiert. Mittelwerte und Standardabweichung (n=3) sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001) wurden berechnet.

Diese Form wurde durch Austausch der Aminosäure Serin an der Position 33 zu Tyrosin (S33Y) gegenüber der durch GSK3 β vermittelten Phosphorylierung resistent und somit unempfindlich für den *destruction complex*-vermittelten Abbau. Die Expression von mutiertem S33Y β -Catenin kann in der Linie 70.4 Mo K50 durch die Behandlung mit Doxycyclin induziert werden. Um die Aktivität des Wnt-Signalwegs zu bestimmen wurde der STF-Reporter-Vektor transient transfiziert.

Die Behandlung mit Phenobarbital führte zu einer signifikanten Reduzierung des Luziferase-Signals im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Behandlung mit Doxycyclin konnte das Signal des β -Catenin-responsiven Reporter-Vektors um das ca. 200 fache gesteigert werden. Dieser Effekt ließ sich signifikant durch die zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital reduzieren. Um die Dosisabhängigkeit der durch Phenobarbital induzierten Verringerung des β -Catenin-responsiven Signals zu überprüfen, wurden 70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Phenobarbital (0,3 mM, 1 mM, 3 mM) behandelt. Als Positivkontrolle wurde der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg-Inhibitoren iCRT3 (20 μ M) eingesetzt. Dabei wurden die Zellen entweder mit der Substanz (Abbildung 24 A) oder in Kombination mit LiCl zur selektiven Inhibition der GSK3 β (Abbildung 24 B) behandelt (n=4).

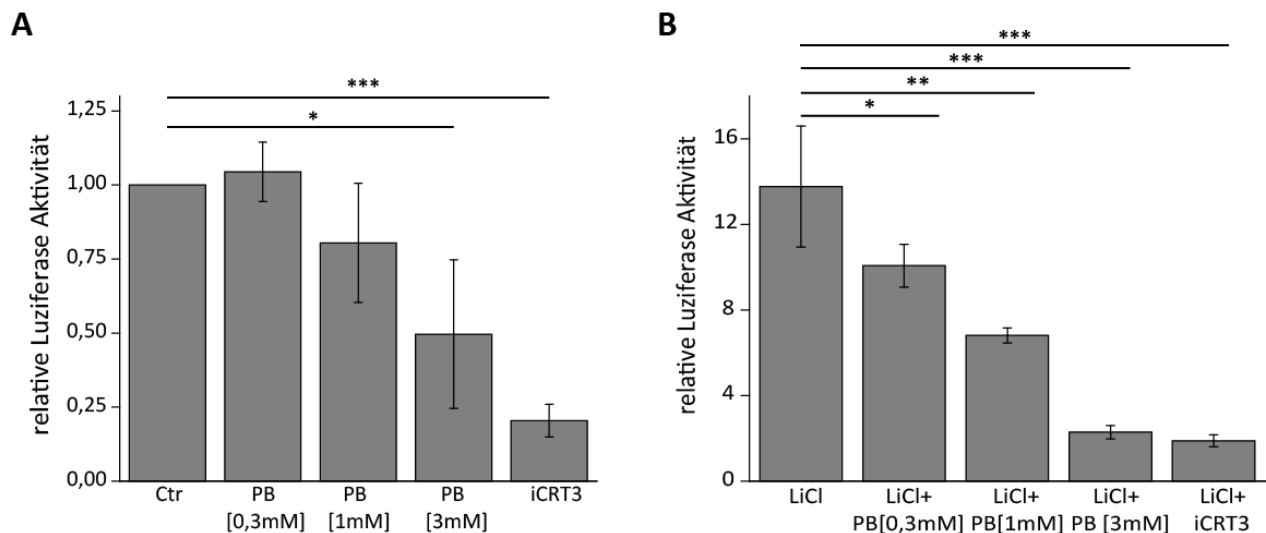


Abbildung 24: Einfluss von Phenobarbital auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg.

70.4 K15 Zellen wurden über 24 mit verschiedenen Konzentrationen (0,3 mM, 1 mM, 3 mM) Phenobarbital (PB) und dem Wnt-/ β -Catenin-Signalweg Inhibitor iCRT3 (20 μ M) in Einzelsubstanz-Behandlung (A) oder als Kombinations-Behandlung LiCl 15 mM (B) behandelt. Um mögliche zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Signale auf die Zellvitalität (AlamarBlue-Assays) bezogen und auf die Kontrollbehandlung normiert; Mittelwerte und Standardabweichung (n=4), sowie statistische Signifikanz nach Studets t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001) wurden berechnet.

Zur Steigerung des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs wurde die durch Doxycyclin Behandlung gesteuerte Expression von S33Y β -Catenin durch die Behandlung von LiCl ersetzt.

Dies ermöglichte die Verwendung der 70.4 K15 Zelllinie mit dem stabil transfizierten β -Catenin-sensitiven STF-Reportervektor, was im Vergleich zur transienten Transfektion des STF-

Reportervektors zu erhöhter Reproduzierbarkeit führte. Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die gemessenen Luziferase Signale auf die, durch einen AlamarBlue-Assay bestimmte, Zellvitalität bezogen. Die relative Luziferase-Aktivität wurde durch Normierung auf die Kontrollbehandlung errechnet. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Tamara Petrikat im Rahmen Ihrer Bachelor-Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Durch Phenobarbital-Behandlung kam es zu einer dosisabhängigen signifikanten Reduktion des STF-Signals um bis zu 50 % in der maximal verwendeten nicht zytotoxischen Dosis von 3 mM. Die Behandlung mit dem Wnt-/ β -Catenin-Signalweg-Inhibitor iCRT3 führte zu einer Reduktion des Wnt/ β -Catenin-Signals um 75 % verglichen mit der Kontroll-Behandlung. Dieser Effekt konnte auch bei der Kombinations Behandlung mit LiCl beobachtet werden, wobei die Inhibition durch die Behandlung mit 3 mM Phenobarbital vergleichbar mit der Behandlung von iCRT3 war: Beide Behandlungen führten zu einer signifikanten Reduktion des Wnt-/ β -Catenin Signals um ca. 80 %.

5.1.6 mRNA-Expressionsanalysen

Um den Einfluss von Phenobarbital auf die mRNA-Expression des Wnt-Zielgens Axin2 zu untersuchen, wurden 70.4 K15-Zellen zunächst für 24h mit 3mM Phenobarbital, 15 mM LiCl oder 15mM NaCl als Kontrolle behandelt. Anschließend wurde die RNA extrahiert und die relative mRNA-Expression via Light-Cycler-Analyse ermittelt. Die relative mRNA-Expression ist in Abbildung 25 dargestellt; diese wurde nach Pfaffl et al. 2001 [174] berechnet und auf die 18S rRNA-Expression normalisiert.

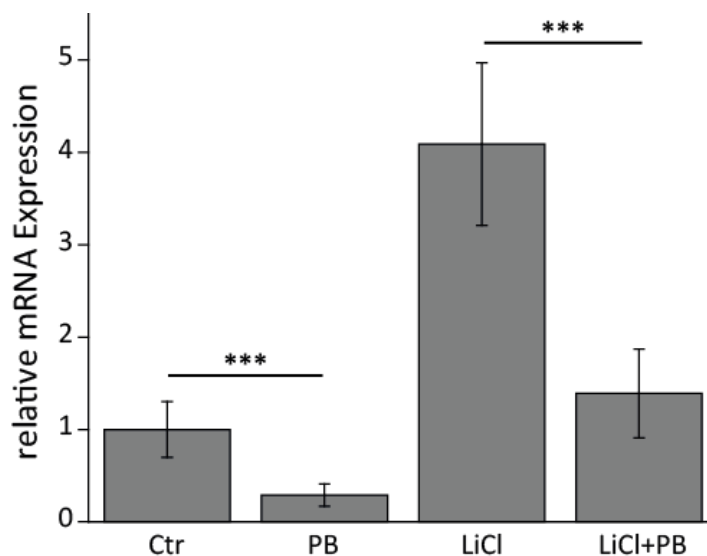


Abbildung 25: Relative mRNA Expression des β -Catenin-Zielgens Axin2

70.4 K15 Maus-Hepatoma-Zellen wurden über 24 h mit 3 mM Phenobarbital, 15 mM LiCl oder 15 mM NaCl behandelt. Die relative mRNA-Expression wurde nach Pfaffl et al. 2001 [174] berechnet und auf die 18S rRNA normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung (n=6) der relativen mRNA-Expression von Axin2. Die statistische Signifikanz wurde nach Student's t-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$) berechnet.

Nach Behandlung mit LiCl konnte eine deutliche Steigerung der Axin2 mRNA-Expression beobachtet werden. Die basale sowie die durch LiCl induzierte Expression von Axin2 mRNA wurde hingegen durch die Behandlung mit Phenobarbital signifikant reduziert.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass der Rezeptor CAR und die Zell-Zell-Kommunikation via GAP-Junctions eine entscheidende Rolle in dem Prozess der Kanzerogenese durch Phenobarbital in Mäusen spielt [114, 120, 121, 172, 173]. Um zu bestimmen, ob der beobachtete Effekte von Phenobarbital durch diese bekannten Zielstrukturen vermittelt wird, wurde das

verwendete Zellsystem auf die mRNA-Expression von CAR und Connexin32 sowie von RXR (dem Dimerisierungspartner von CAR) und den CAR-Zielgenen Cyp2B10 und Cyp2C im Vergleich zu Mausleber-Gewebe untersucht. Zu diesem Zweck wurden 70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen mit 3 mM Phenobarbital oder 15 mM NaCl über 24 h behandelt, die isolierte RNA wurde anschließend mittels RT-PCR untersucht. Die relative mRNA-Expression ist in (Abbildung 26) dargestellt; diese wurde nach Pfaffl et al. 2001 [39] berechnet und auf die 18S rRNA-Expression normalisiert. Anschließend wurde die relative mRNA-Expression auf die mRNA-Expression von Mauslebergewebe bezogen.

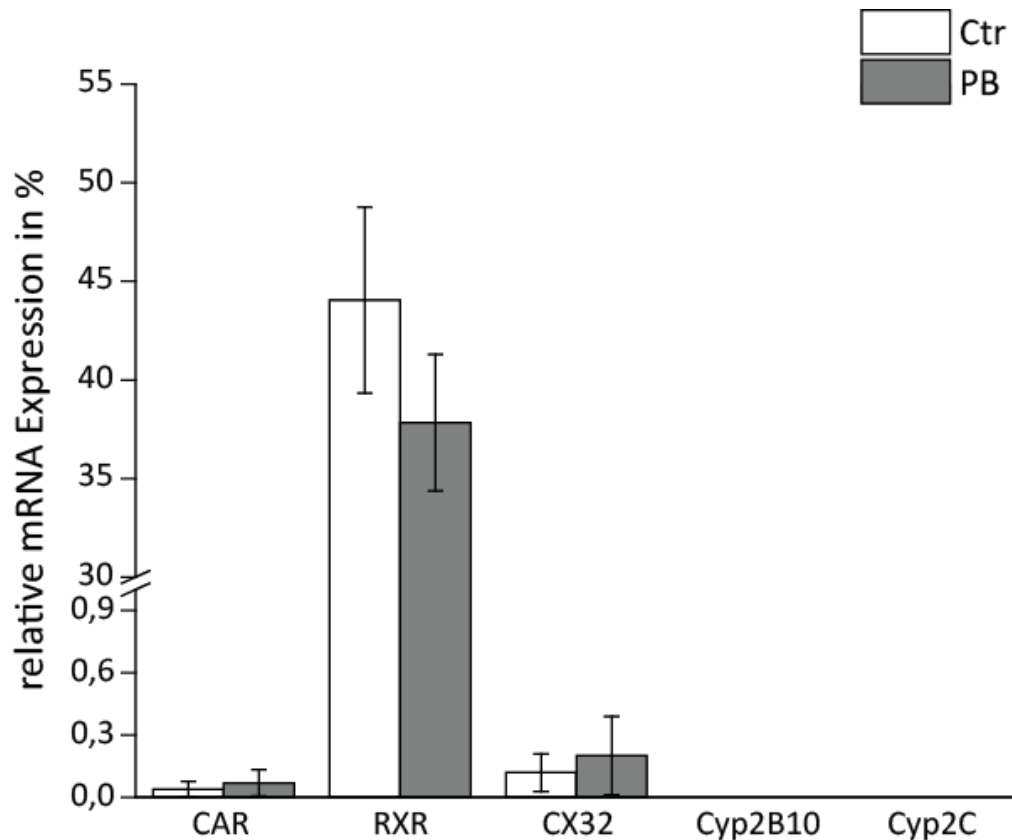


Abbildung 26: Relative mRNA Expression von CAR, RXR, Connexin32, Cyp2B10 und Cyp2C

70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen wurden über 24 h mit 3 mM Phenobarbital (PB) oder H₂O als Kontrolle (Ctr) behandelt. Die relative mRNA-Expression wurde nach Pfaffl et al 2001 [174] berechnet und auf die 18S rRNA normiert. Die relative mRNA-Expression von CAR, RXR, CX32, Cyp2B10 und Cyp2C wurde auf die relative mRNA Expression in C3H Mauslebergewebe bezogen. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichung (n=3).

Die Analyse der mRNA Expression von 70.4 K15 Maushepatom-Zellen im Vergleich zu Mauslebergewebe zeigte, dass die für die Tumorpromotion von Phenobarbital relevanten bekannten Proteine CAR und Connexin32 nicht in nennenswertem Maß exprimiert werden. RXR wird dagegen in 70.4 K15-Zellen exprimiert. Die mRNAs der RXR- und CAR-responsiven Proteine Cyp2B10 und Cyp2C [175-178] konnten nicht nachgewiesen werden.

5.1.7 Einfluss des CAR-Agonisten TCPOBOP auf den Wnt-Signalweg

Vorangegangene Studien haben hypertrophe/hyperplastische Effekte nach Phenobarbital-Behandlung auf die Leber gezeigt [172], diese Effekte werden wahrscheinlich über CAR vermittelt. Um auszuschließen dass diese über CAR vermittelten Mechanismen einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg haben, wurden 70.4 K15 Zellen über 24 h mit dem CAR-Agonisten 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]-benzen (TCPOBOP) behandelt [179]. Für die Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs wurde der GSK3 β -Inhibitor LiCl verwendet (Abbildung 27).

Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die gemessenen Luziferase-Signale auf die durch einen AlamarBlue-Assay bestimmte Zellvitalität bezogen. Die relative Luziferase-Aktivität wurde durch Normierung auf die Kontrollbehandlung errechnet

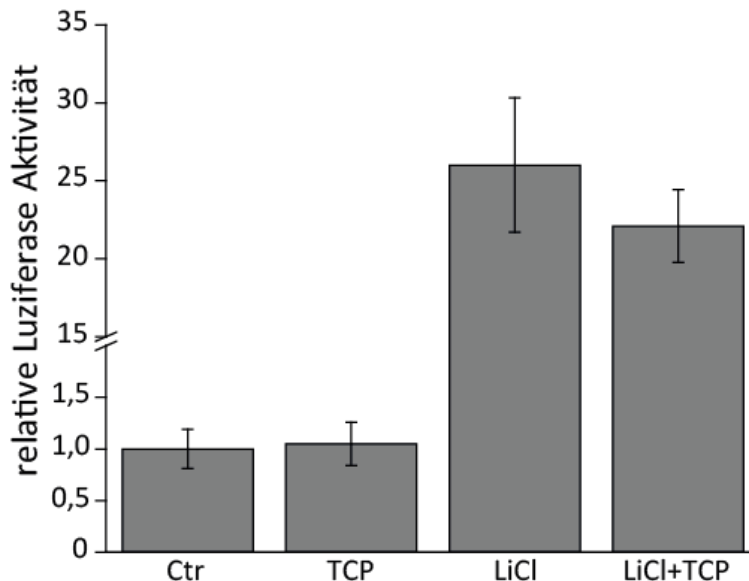


Abbildung 27: Einfluss von TC auf den Wnt-/ β -Catenin-Signalweg

70.4 K15 Zellen wurden über 24 h mit 10 μ M TCPOBOP und / oder 15 mM LiCl behandelt. Um mögliche zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Signale auf die Zellvitalität (AlamarBlue-Assays) bezogen und auf die Kontrollbehandlung normiert; Mittelwerte und Standardabweichung (n=4), sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001) wurden berechnet.

Dabei führte die Behandlung mit TCPOBOP zu keiner Reduktion des STF-Signals in der Einzelbehandlung. Nach Induktion des Wnt-Signalwegs durch LiCl kam es zu einer Steigerung der relativen Luziferase Aktivität, dieser Effekt konnte nicht signifikant durch TCPOBOP reduziert werden.

5.2 Einfluss von Phenobarbital auf Calpain

Eine weitere Wnt-unabhängige Regulation von β -Catenin ist die proteolytische Spaltung der N-terminalen regulatorischen Domäne von β -Catenin durch Calpaine [19, 61-63]. Die Isoformen mCalpain und μ Calpain sind Mitglieder der Superfamilie der intrazellulären Calcium-abhängigen Papain-ähnlichen Cystein-Protease Calpain [44]. Beide Isoformen bestehen aus einer großen katalytischen Untereinheit (80 kDa) und einer kleinen regulatorischen Untereinheit (28 kDa). Durch Abspaltung der N-terminalen Region von β -Catenin ist die Calpain-vermittelte Regulation unabhängig von dem Wnt-abhängigen β -Catenin-Signalweg regulierenden *destruction complex*.

5.2.1 mRNA Expression der Calpaine

Um den Einfluss von Phenobarbital auf die Expression der Calpaine zu untersuchen wurden mRNA-Expressionsanalysen in Zusammenarbeit mit Ferdinand Kollotzek im Rahmen seiner Master Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden 70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen mit 3 mM Phenobarbital über 24 h behandelt; die isolierte RNA wurde anschließend mittels RT-PCR untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde in Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von μ Calpaine und mCalpain dargestellt, diese wurde nach Pfaffl et al. 2001 [174] berechnet und auf die 18S rRNA-Expression normalisiert. Hierfür wurden Primer für verschiedene Spleiß-Varianten der Isoformen Calpain 1 & 2 verwendet: Für die große Untereinheit von μ Calpain (Calp1ges), die Transkriptionsvariante 1 der großen Untereinheit von μ Calpain (Calp1TV1), die Transkriptionsvariante 2 der großen Untereinheit von μ Calpain (Calp1TV2), die große Untereinheit von mCalpain (Calp2) und für die kleine Untereinheit von Calpain (CalpSm1).

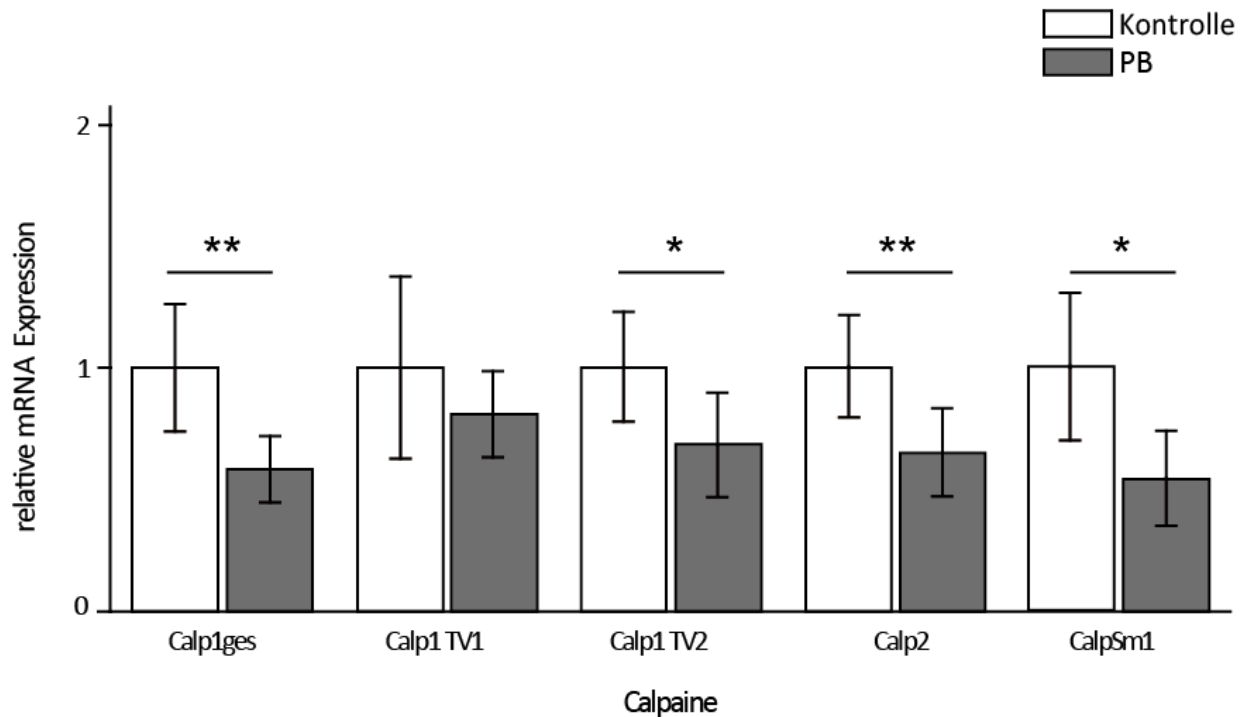


Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von μ Calpaine und mCalpain

70.4 K15 Maus-Hepatoma-Zellen wurden über 24 h mit 3 mM Phenobarbital behandelt. Die relative mRNA-Expression wurde nach Pfaffl et al. 2001 [174] berechnet und auf die 18S rRNA normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung (n=6) der relativen mRNA-Expression der verschiedenen Spleiß-Varianten der großen μ Calpain-Untereinheit (Calp1ges, Calp1TV1 und Calp1TV2), der kleinen Untereinheit (CalpSm1) sowie der großen Untereinheit von mCalpain (Calp2). Die statistische Signifikanz wurde nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001) berechnet [20].

Nach Behandlung mit Phenobarbital konnte eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression der großen (Calp1ges, Calp1TV2) und kleinen (CalpSm1) Untereinheit von μ Calpain sowie der großen Untereinheit des mCalpains (Calp2) im Vergleich zur Kontrollbehandlung beobachtet werden.

5.2.2 Assay zur Messung der Calpain-Aktivität von Abcam

Um eine mögliche Änderung der Calpain-Aktivität zu untersuchen wurde ein käuflicher Assay von Abcam verwendet. 70.4 K15-Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital (3 mM), dem Calcium-Chelator BAPTA (2,5 μ M; Positivkontrolle für die Inhibition von Calpain) oder mit DMSO behandelt und anschließend analysiert.

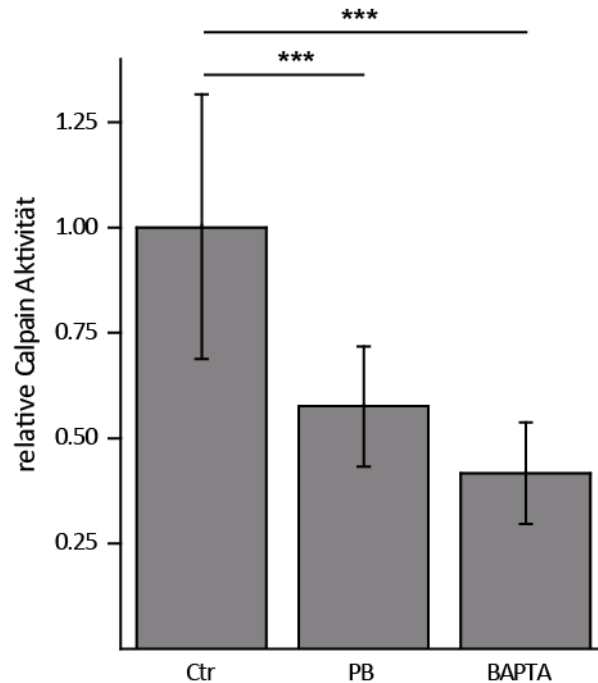


Abbildung 29: Relative Calpain-Aktivität (Abcam)

70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital 3 mM (PB), dem Calcium-Chelator BAPTA (2,5 μ M) und DMSO als Kontrolle (Ctr) behandelt. Anschließend wurde die Calpain-Aktivität unter Verwendung des Calpain Aktivitäts Assays von Abcam ermittelt. Die relative Calpain-Aktivität bezogen auf die Kontrollbehandlung, Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) sowie die statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001) wurden berechnet [20].

Dabei wurden die eingesetzten Probenmengen auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Die gemessenen Signale wurden auf die Kontroll-Behandlung bezogen, die relative Calpain-Aktivität ist in Abbildung 29 dargestellt. Nach Behandlung mit Phenobarbital kam es zu einer signifikanten Reduzierung der relativen Calpain-Aktivität um ca. 40 % und nach der Behandlung mit BAPTA um ca. 50 %.

5.2.3 Assay zur Messung der Calpain-Aktivität von Merck Millipore

Um eine mögliche Änderung der Calpain-Aktivität zu untersuchen wurde ein zweiter käuflicher Assay von Abcam verwendet. 70.4 K15-Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital (3 mM), dem Calcium-Chelator BAPTA (2,5 μ M; Positivkontrolle für die Inhibition von Calpain) oder DMSO (15 mM) behandelt und anschließend analysiert.

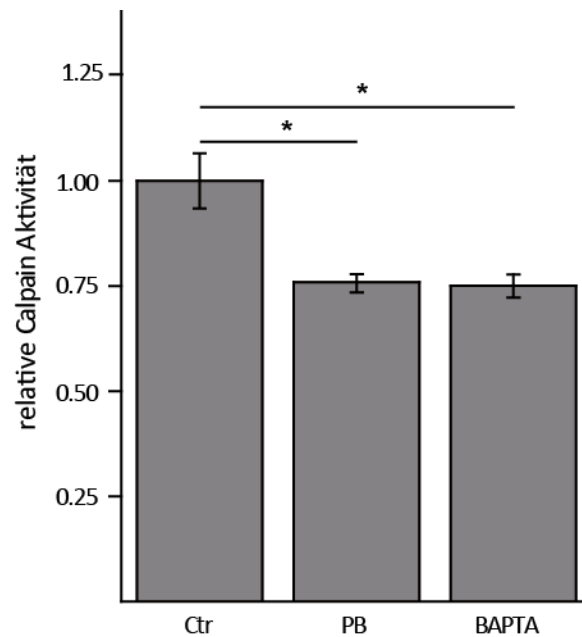


Abbildung 30: Relative Calpain Aktivität (Millipore)

70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital 3 mM (PB), dem Calcium-Chelator BAPTA (2,5 μ M) und DMSO als Kontrolle (Ctr) behandelt. Anschließend wurde die Calpain-Aktivität unter Verwendung des Calpain Activity Assays von Abcam ermittelt. Die relative Calpain-Aktivität bezogen auf die Kontrollbehandlung, Mittelwerte und Standardabweichung (n=4) sowie die statistische Signifikanz nach Student's t-Test (* $p \leq 0,05$) wurden berechnet [20].

Dabei wurden die eingesetzten Proben Mengen auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Die gemessenen Signale wurden auf die Kontroll-Behandlung bezogen, die relative Calpain Aktivität wurde in Abbildung 30 dargestellt. Nach Behandlung mit Phenobarbital oder BAPTA kam es zu einer signifikanten Reduzierung der relativen Calpain Aktivität um ca. 25 %. Im Vergleich zum Aktivitäts-Assay von Abcam zeigte der Assay von Millipore eine geringere Sensitivität bei einer besseren Reproduzierbarkeit und einer deutlich geringeren Inter- und Intraassay-Varianz.

5.2.4 Western Blot-Analysen

In weiterführenden Westernblot Analysen wurden die Lysate aus 5.2.2 und 5.2.3 verwendet, um die Änderung des cytosolischen Calpain-Spiegels auf Proteinebene zu beobachten (Abbildung 31). Als Positivkontrolle (+Ctr) wurde 1 µg rekombinantes Calpain eingesetzt.

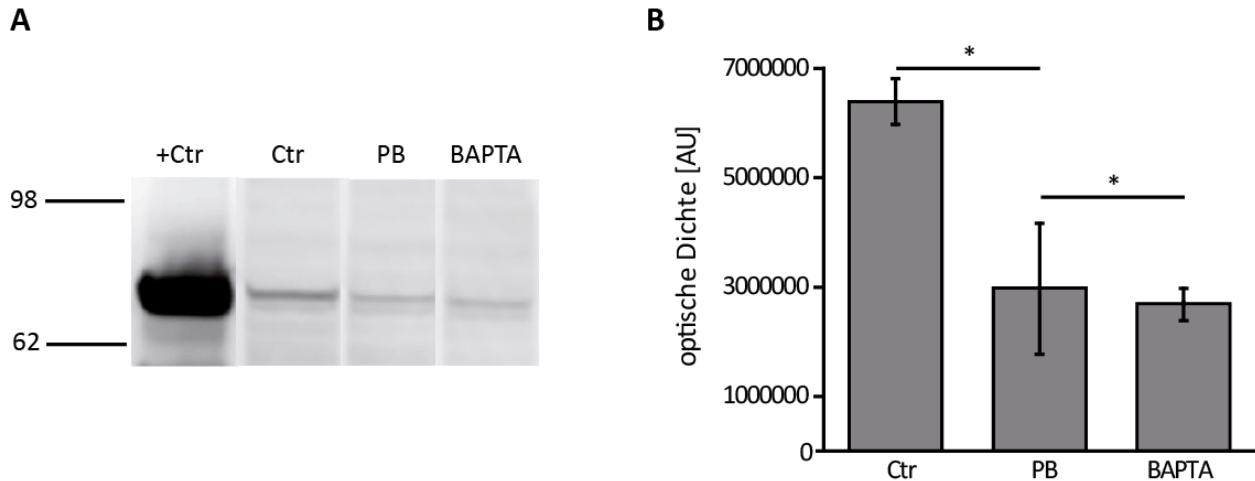


Abbildung 31: Änderung der Calpain-Menge.

Western Blot Analyse (A) und densitometrische Auswertung (B) von 70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen nach Behandlung mit 3 mM Phenobarbital (PB), dem Calcium-Chelator BAPTA (2,5 µM) (BAPTA) und DMSO als Kontrolle (Ctr) über 24 h. Aufgetragen wurden 25 µg Gesamtprotein und 1 µg rekombinantes Calpain als Positivkontrolle (+Ctr). Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p ≤ 0,05) wurden berechnet [20].

Es konnten nur geringe Mengen an endogenem Calpain detektiert werden (Abbildung 31 A), wobei das cytosolische Calpain durch Behandlung mit Phenobarbital und BAPTA reduziert werden konnte. Densitometrische Analysen der Western Blots (n=3) zeigten eine signifikante Reduktion des cytosolischen Calpains um bis zu 50 %.

Um die Calpain-Aktivität indirekt zu untersuchen wurden die endogenen Substrate β-Catenin (Abbildung 32 A) und EGFR (Abbildung 32 C) in Western Blot-Analysen untersucht. Nach Behandlung mit Phenobarbital konnte eine Reduktion des „nicht geschnittenen“ β-Catenins beobachtet werden, wobei die Reduktion des durch Calpain proteolytisch gespaltenen β-Catenins (mit Pfeil gekennzeichnet) deutlich stärker ausgeprägt war. Durch densitometrische Auswertung (Abbildung 32) konnte eine signifikante Reduktion von über 90 % der verkürzten Form des β-Catenins gezeigt werden. Die Behandlung mit BAPTA führte

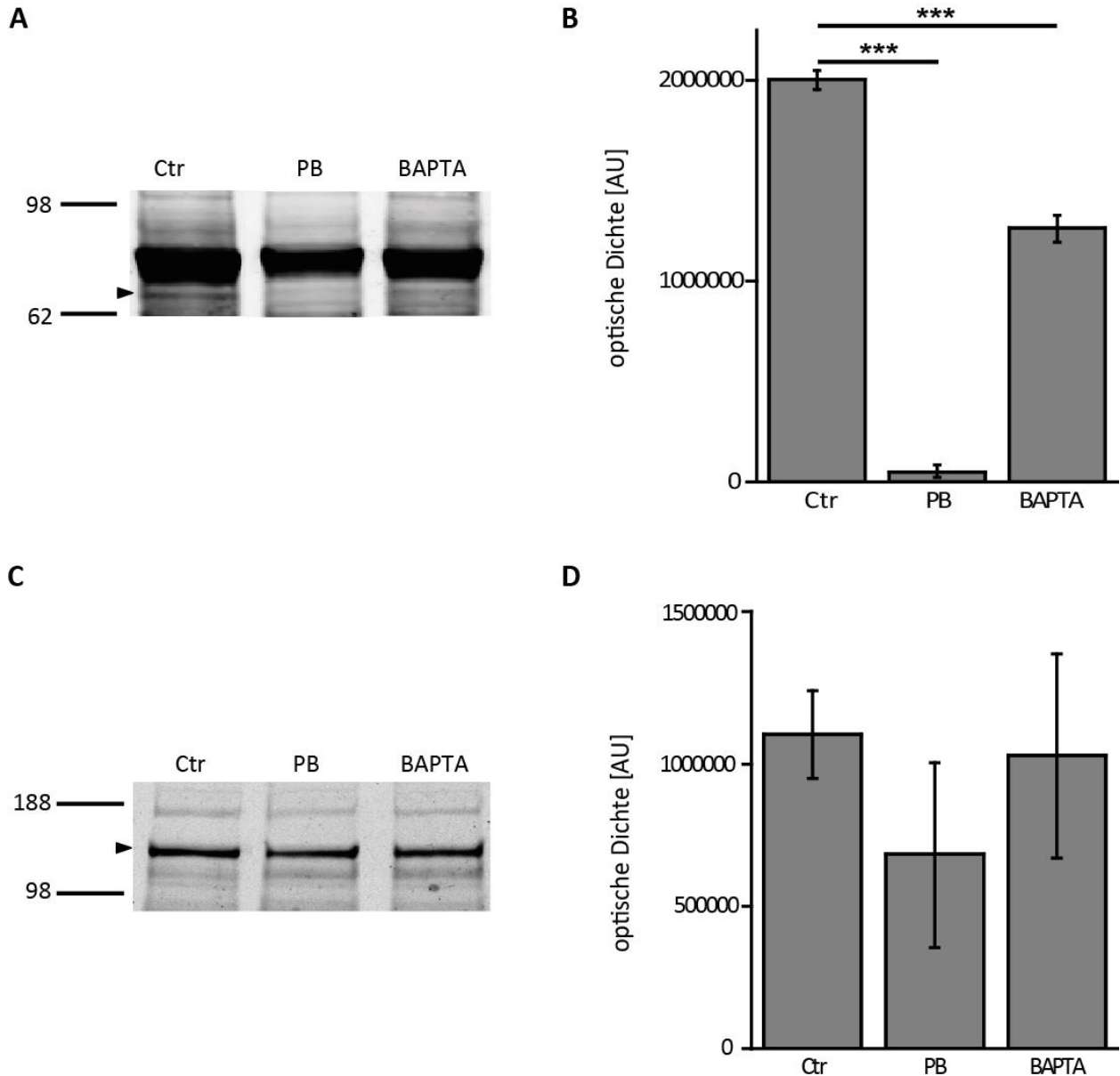


Abbildung 32: Western Blot Analyse der Calpain Substrate β -Catenin und EGFR.

Western Blot-Analyse (**A, C**) und densitometrische Auswertung (**B, D**) von 70.4 K15 Maus-Hepatoma-Zellen nach Behandlung mit 3 mM Phenobarbital (PB), dem Calcium-Chelator BAPTA (2,5 μ M) (BAPTA) und DMSO als Kontrolle (Ctr) über 24 h. Aufgetragen wurden 25 μ g Gesamtprotein und 1 μ g rekombinantes Calpain als Positivkontrolle (+Ctr). Beobachtet wurden die entstandenen Fragmente nach proteolytischer Spaltung der endogenen Substrate von Calpain, β -Catenin (**A, B**) und EGFR (**C, D**). Mittelwerte und Standardabweichungen ($n=3$) sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$) wurden berechnet [20].

zu einer signifikanten Reduktion der verkürzten Form des β -Catenins, hatte aber keinen Einfluss auf das ungeschnittene β -Catenin. Die Behandlung mit Phenobarbital und BAPTA führte bei der proteolytischen Spaltung des EGFR zu einer Verringerung, die allerdings nicht statistisch signifikant war (Abbildung 32 C, D).

5.2.5 Einfluss von Calpain-Inhibitoren auf den Wnt-Signalweg

Um zu überprüfen ob die negative Beeinflussung des Wnt-Signalwegs über die Inhibition von Calpain durch Phenobarbital vermittelt wird, kamen in einem Luziferase Assay verschiedene Calpain Inhibitoren zum Einsatz.

Die Versuche wurde in Zusammenarbeit mit Tamara Petrikat im Rahmen Ihrer Bachelor Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden 70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen über 24 h mit verschiedenen Calpain-inhibierenden Substanzen, nämlich den direkten Calpain-Inhibitoren PD150606 und Calpain Inhibitor XI sowie dem Calcium-Chelator BAPTA, entweder einzeln (Abbildung 18 A) oder in Kombination mit Phenobarbital (Abbildung 18 B), LiCl (Abbildung 18 C) oder Phenobarbital und LiCl (Abbildung 18 D) behandelt (n=6).

Durch den stabil transfizierten β -Catenin-sensitiven STF-Reportervektor konnte die Aktivität des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs gemessen werden. Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die gemessenen Luziferase Signale auf die durch einen AlamarBlue-Assay bestimmte Zellvitalität bezogen. Die relative Luziferase-Aktivität wurde durch Normierung auf die Kontrollbehandlung errechnet.

Nach Behandlung mit dem Calcium-Chelator BAPTA oder mit PD150606 konnte keine Reduzierung der Wnt-/ β -Catenin-Aktivität festgestellt werden. Nach Behandlung mit dem Calpain Inhibitor XI kam es zu einer geringen Reduktion des STF-Signals; diese war mit der Inhibition durch Phenobarbital nicht vergleichbar (Abbildung 18 A). In der Kombinations-Behandlung mit Phenobarbital konnte der inhibierende Effekt nicht verstärkt werden (Abbildung 18 B).

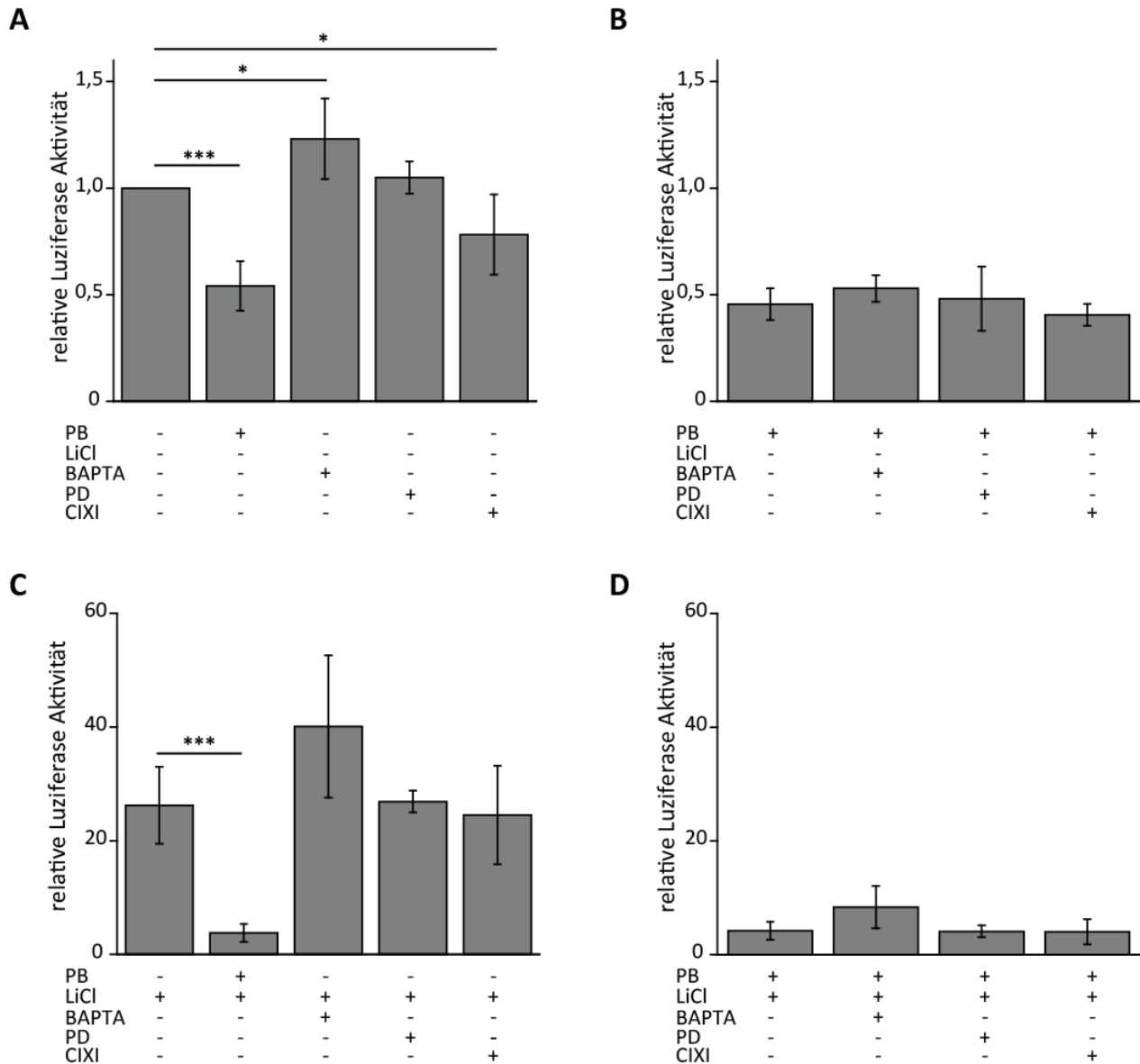


Abbildung 33: Effekt verschiedener Calpain-Inhibitoren, LiCl und Phenobarbital auf den Wnt- / β -Catenin-Signalweg.

70.4 K15-Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital (3 mM) (PB), dem Chelator BAPTA (2,5 μ M) (BAPTA), dem Calpain Inhibitor PD150606 (25 μ M) (PD) und dem Calpain Inhibitor XI (50 μ M) (CIXI) in Einzelsubstanz-Behandlung (**A**) oder als Kombinations-Behandlung mit Phenobarbital (PB) (**B**), LiCl (15 mM) (**C**) oder mit Phenobarbital (PB) und LiCl behandelt. Um mögliche zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Signale auf die Zellvitalität (AlamarBlue-Assays) bezogen und auf die Kontrollbehandlung normiert; Mittelwerte und Standardabweichung (n=6), sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001) wurden berechnet.

In Kombination mit LiCl (Abbildung 18 C) und somit einer zusätzlichen Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalwegs, oder in Kombination mit LiCl und Phenobarbital (Abbildung 18 D) konnte kein signifikanter Einfluss der Calpain-inhibierenden Substanzen festgestellt werden.

5.3 Einfluss von Phenobarbital auf Src

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Phenobarbital als potenzieller Ligand des EGFR [85] die EGFR-vermittelte Aktivierung der Src-Kinase inhibiert. Die Src aktiviert wiederum den Initiationsfaktor EIF4E und ist so in der Lage die Translation zu regulieren [91]. Im Folgenden soll überprüft werden ob Phenobarbital über diesen Weg in der Lage ist die Src-vermittelte Translation zu inhibieren.

5.3.1 Assay zur Messung der Src-Aktivität

Um den Einfluss von Phenobarbital auf die Aktivität der gesamten Src-Familie zu untersuchen wurde der nicht Radioaktive ProFluor® Src-Family Kinase Assay von Promega verwendet. 70.4 K15 Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital (3 mM) oder dem Src-Inhibitor I (10 μ M) behandelt. Die eingesetzten Probenmengen wurden auf die Gesamtproteinkonzentration normiert. Der reziproke Wert der gemessenen Signale wurden auf die Kontroll-Behandlung bezogen (n=3), die relative Src-Aktivität ist in Abbildung 34 dargestellt.

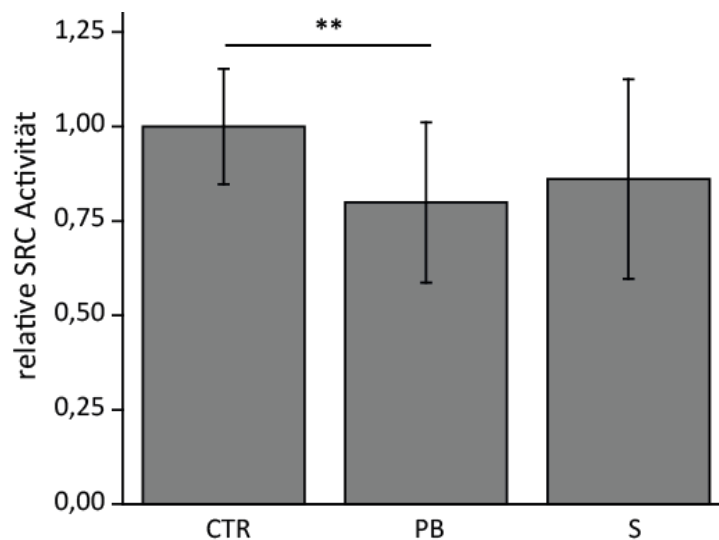


Abbildung 34: Relative Src-Aktivität (ProFluor®Src-Family Kinase Assay)

70.4 K15 Maus-Hepatom-Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital (3 mM) (PB), dem Src-Inhibitor I (10 μ M) (S) und DMSO als Kontrolle (Ctr) behandelt. Anschließend wurde die Src-Aktivität unter Verwendung des ProFluor®Src-Family Kinase Assay von Promega ermittelt. Die relative Src-Aktivität bezogen auf die Kontrollbehandlung, Mittelwerte und Standardabweichung (n=3) sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (**p \leq 0,01) wurden berechnet.

Nach Behandlung mit Phenobarbital konnte eine signifikante Reduktion der Src-Aktivität um ca. 25 % beobachtet werden. Diese war vergleichbar mit der Inhibition des als Positivkontrolle verwendeten Src-Inhibitors I.

5.3.2 Einfluss von Src- und EGFR-Inhibitoren auf den Wnt-Signalweg

Um zu überprüfen ob die negative Beeinflussung des Wnt-Signalwegs durch Phenobarbital über die Inhibition von Src oder EGFR nachgeahmt werden kann, wurden in einem Luziferase-Assay verschiedene Src- (Abbildung 35) und EGFR-Inhibitoren (Abbildung 36) eingesetzt.

Die Versuche wurde in Zusammenarbeit mit Tamara Petrikat im Rahmen Ihrer Bachelor Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden 70.4 K15 Maus-Hepatoma-Zellen über 24 h mit verschiedenen Src- und EGFR-inhibierenden Substanzen, nämlich den direkten Src-Inhibitor Src-Inhibitor I (10 μ M), den EGFR-Inhibitoren Gefitinib (2 μ M) und Erlotinib (2 μ M) sowie Phenobarbital (3 mM) behandelt, als Einzel-Behandlung oder in Kombination mit LiCl (15 mM) (n=6).

Durch den stabil transfizierten β -Catenin sensitiven STF-Reportervektor konnte die Aktivität des Wnt-/ β -Catenin Signalwegs beobachtet werden. Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die gemessenen Luziferase Signale auf die, durch einen AlamarBlue-Assay bestimmte Zellvitalität, bezogen. Die relative Luziferase Aktivität wurde durch Normierung auf die Kontrollbehandlung errechnet.

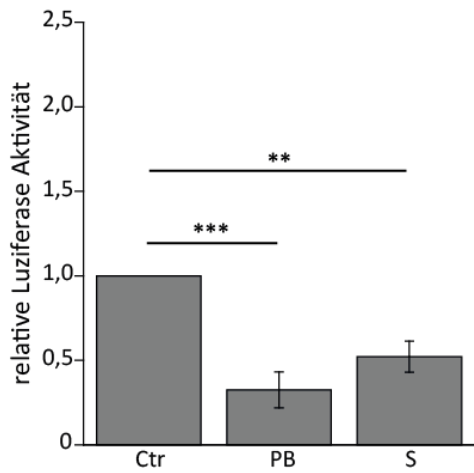
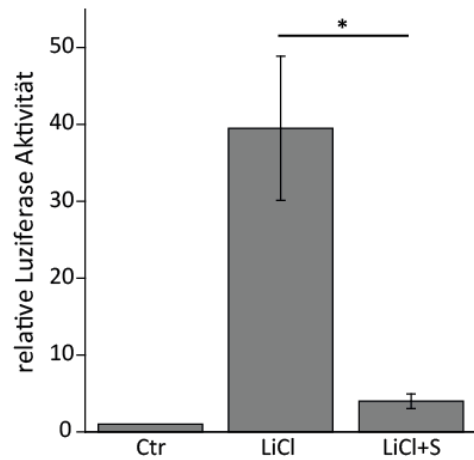
A**B**

Abbildung 35: Effekt von Src-Inhibitoren, LiCl und Phenobarbital auf den Wnt- / β -Catenin-Signalweg.

70.4 K15-Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital (3 mM) (PB) und den Src-Inhibitoren Src-Inhibitor I (10 μ M) (S), in Einzelsubstanz-Behandlung (A) oder als Kombinations-Behandlung mit LiCl (15 mM) (B) behandelt. Um mögliche zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Signale auf die Zellvitalität (AlamarBlue-Assays) bezogen und auf die Kontrollbehandlung normiert; Mittelwerte und Standardabweichung (n=6) sowie die statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001) wurden berechnet.

Nach Behandlung mit dem Src-Inhibitor I konnte eine signifikante Reduktion des STF-Signals beobachtet werden; dieser Effekt war vergleichbar mit der Inhibition durch Phenobarbital-Behandlung (Abbildung 35 A). Auch in der Kombinations-Behandlung mit LiCl zeigte der Src-Inhibitor I im Vergleich zu LiCl eine signifikante Inhibition des STF Signals (Abbildung 35 B).

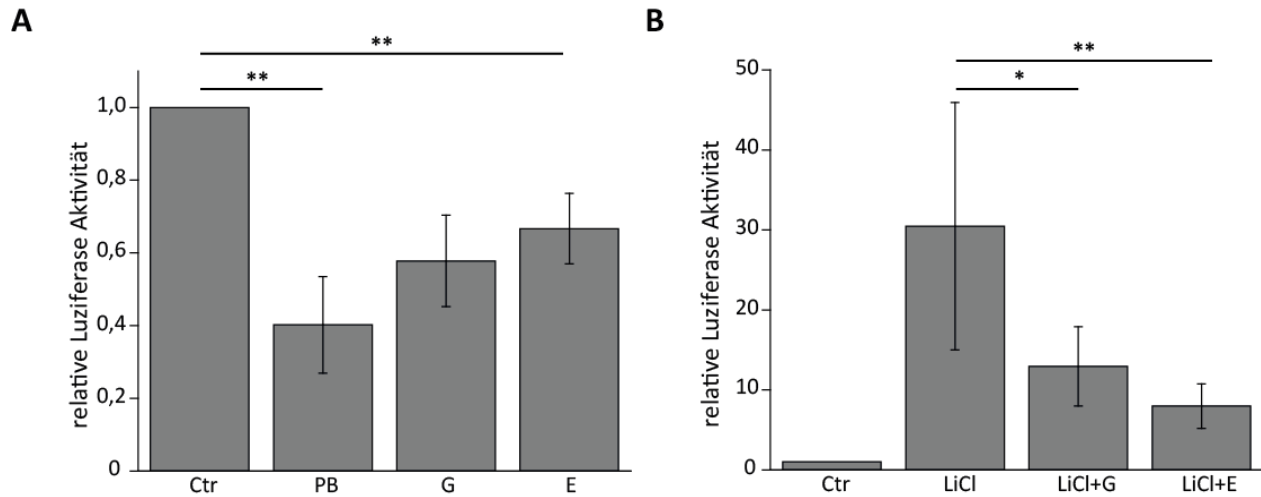


Abbildung 36: Effekt von EGFR-Inhibitoren, LiCl und Phenobarbital auf den Wnt- / β -Catenin-Signalweg

70.4 K15 Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital (3 mM) (PB), den EGFR-Inhibitoren Gefitinib (2 μ M) (G) und Erlotinib (2 μ M) (E), in Einzelsubstanz-Behandlung (**A**) oder als Kombinations-Behandlung mit LiCl (15 mM) (**B**) behandelt. Um mögliche zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die Signale auf die Zellvitalität (AlamarBlue-Assays) bezogen und auf die Kontrollbehandlung normiert; Mittelwerte und Standardabweichung (n=6), sowie die statistische Signifikanz nach Student's t-Test (*p \leq 0,05; **p \leq 0,01) wurden berechnet.

Die Behandlung mit den EGFR-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib führte zu einer signifikanten Abnahme des STF-Signals; diese war nicht so stark wie die durch Phenobarbital hervorgerufene Abnahme (Abbildung 36 A). Beide Inhibitoren zeigten in Kombination mit LiCl eine signifikante Reduktion des STF-Signals (Abbildung 36 B) im Vergleich zu der LiCl-Behandlung.

5.4 Einfluss von Phenobarbital auf die β -Catenin-Synthese

Nachdem zwar ein Einfluss von Phenobarbital auf die Calpain-Aktivität, jedoch keine Auswirkungen der Substanz auf den Abbau von β -Catenin festgestellt werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, welchen Einfluss Phenobarbital auf die Proteinbiosynthese von β -Catenin ausübt.

5.4.1 mRNA Expression von β -Catenin

Zunächst wurde untersucht ob Phenobarbital in der Lage ist, die mRNA, Expression von *Ctnnb1* (das Gen, das β -Catenin codiert) zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden 70.4 K15-Zellen zunächst für 24 h mit 3 mM Phenobarbital behandelt. Anschließend wurde die RNA extrahiert und die relative mRNA-Expression via Light-Cycler Analyse ermittelt. Die relative mRNA-Expression ist in Abbildung 37 dargestellt; diese wurde nach Pfaffl et al 2001 berechnet und auf die 18S rRNA Expression normalisiert.

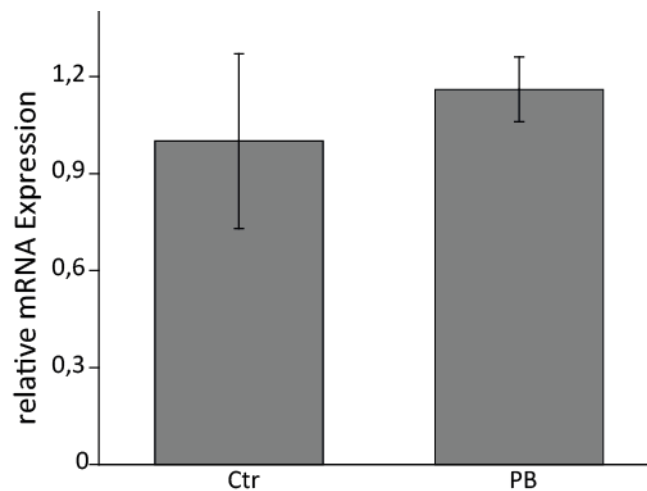


Abbildung 37: Relative mRNA-Expression von *Ctnnb1*

70.4 K15 Maus-Hepatoma Zellen wurden über 24 h mit Phenobarbital 3 mM, oder NaCl 15 mM behandelt als Kontrolle behandelt. Die relative mRNA Expression wurde durch die crossing point Analyse und die PCR Effizienz nach (Pfaffl et al 2001) [174] berechnet und auf die 18S rRNA normiert. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichung (n=6) der relativen mRNA-Expression von *Ctnnb1*. Die statistische Signifikanz wurde nach Student's t-Test berechnet.

Nach Behandlung mit Phenobarbital konnte keine Änderung der exprimierten *Ctnnb1*-mRNA beobachtet werden (Abbildung 37).

5.4.2 Hemmung der Proteinbiosynthese von β -Catenin durch Cycloheximid

Um zu überprüfen ob Phenobarbital die Translation von β -Catenin beeinflusst, wurden 70.4 K15-Zellen mit Cycloheximid und Phenobarbital behandelt, wobei der Translationshemmer Cycloheximid die Aktivität der Peptidyltransferase an der 60S-Untereinheit der Ribosomen hemmt [180]. Ist der Einfluss von Phenobarbital in der Proteinbiosynthese von β -Catenin verankert, sollte dieser durch die Hemmung des Ribosoms verloren gehen.

Aus diesem Grund wurden die Zellen über unterschiedliche Zeiträume hinweg behandelt, wobei die Zellen entweder über einen bestimmten Zeitraum mit Cycloheximid vorbehandelt wurden und somit Cycloheximid (6 h, 24 h) länger auf die Zellen einwirken konnte als Phenobarbital (3 h, 12 h), oder Cycloheximid (6 h, 24 h) und Phenobarbital (6 h, 24 h) wurden zeitgleich zusammen eingesetzt.

Die relative Gesamtmenge von β -Catenin (Abbildung 38 A) und die relative Menge der verschiedenen phosphorylierten Spezies des Proteins (Abbildung 38 B-F) wurden über einen Sandwich-Immunoassay ermittelt (n=3). Um cytosolisches „freies“ β -Catenin zu bestimmen wurden die Interaktion zwischen den GST-Fusionsproteinen GST-ICAT, GST-ECT und GST-TCF4 und β -Catenin in einem Protein-Protein-Interaktions-Assay untersucht (n=3) (Abbildung 39).

Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die ermittelten MFI Messwerte auf die, durch einen AlamarBlue-Assay bestimmte Zellvitalität bezogen. Die relative β -Catenin Menge wurde durch Normierung auf die Kontrollbehandlung berechnet.

Nach Behandlung mit Cycloheximid kam es zu einer leichten zeitabhängigen Reduktion der detektierten Gesamtmenge von β -Catenin bezogen auf die Kontrolle. Die zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital führte zu keiner weiteren Reduktion der detektierten Gesamtmenge von β -Catenin bezogen auf die Cycloheximid-Behandlung (Abbildung 38 A).

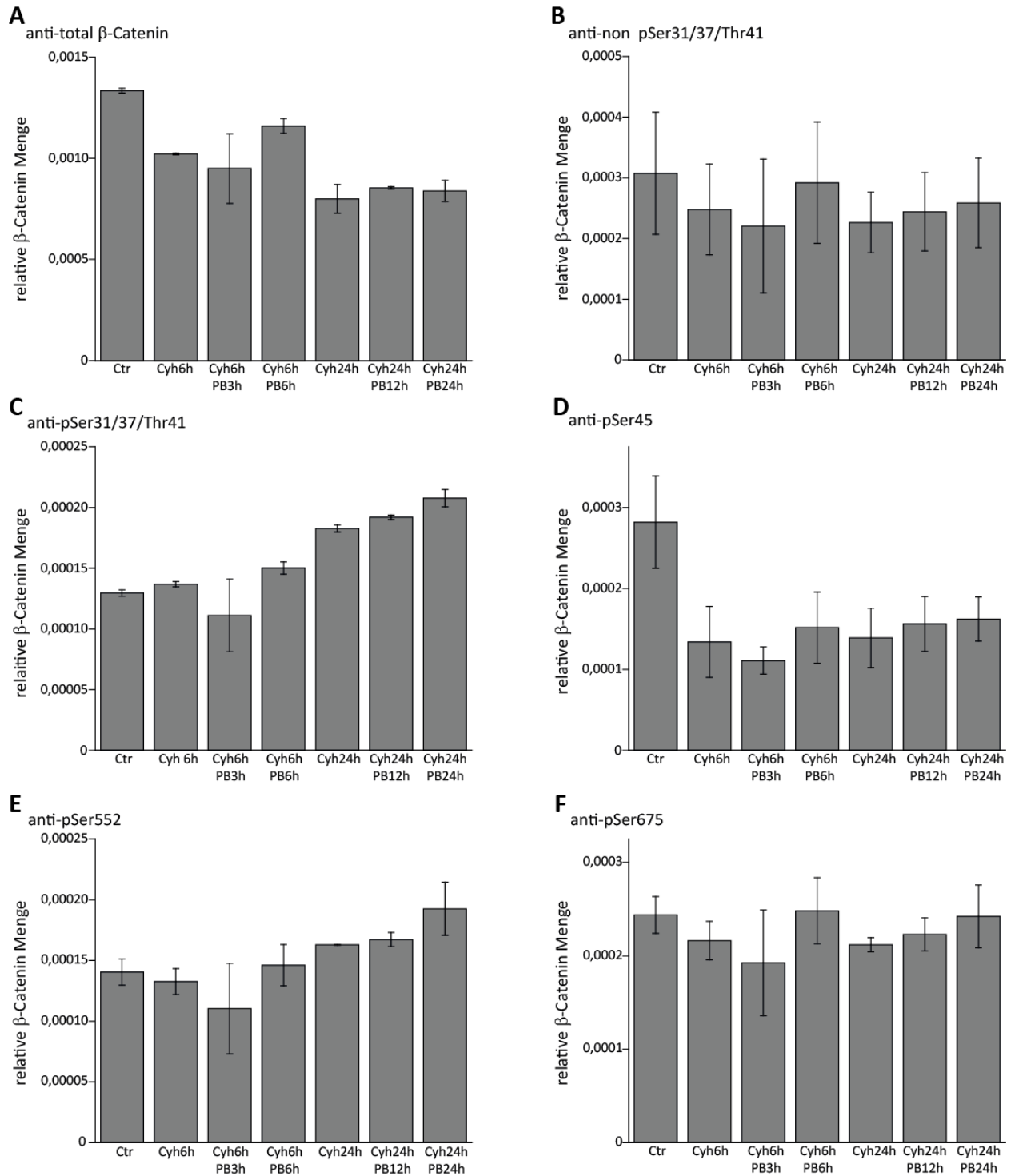


Abbildung 38: Mikrosphären-basierter Sandwich-Immunoassay (Sandwich-Immunoassay).

Die Zellen wurde mit $0,33 \mu\text{M}$ des Translationshemmer Cycloheximid (Cyh) und 3 mM Phenobarbital (PB) oder DMSO (Ctrl) als Kontrolle über verschiedene Zeiträume (PB: 3 h ,6 h, 12 h, 24 h; Cyh: 6 h, 24 h) behandelt. Anschließend wurden $20 \mu\text{g}$ Gesamtprotein in einem Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay analysiert. Dabei wurden ein immobilisierter pan-spezifischer gegen β -Catenin (**A**) und verschiedene nicht-kovalent immobilisierte phosphospezifische (anti-pSer33/ 37/ Thr41 (**B**), anti-non pSer33/ 37/ Thr41 (**C**), anti-pSer45 (**D**), anti-pSer552 (**E**) und anti-pSer675 (**F**) sowie ein C-terminal bindender Antikörper gegen β -Catenin verwendet, durch einen sekundären

PE-konjugierter Antikörper konnte die Bindung von β -Catenin detektiert werden. Die detektierten Signale, Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3) wurden in MFI (A-F) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde nach Student's t-Test berechnet.

Die Analyse der verschiedenen phosphorylierten Formen von β -Catenin zeigte ebenfalls teilweise starke Effekte nach Cycloheximid-Behandlung in Bezug auf die Kontrollbehandlung, so kam es zu einem Abfall von über 50 % des gebundenen pSer45 β -Catenin (Abbildung 38 D) nach Cycloheximid-Behandlung. Auch dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital nicht beeinflusst. So hatte die Behandlung mit Cycloheximid und Phenobarbital keinen Einfluss die Proteinmengen der pSer33/ 37/ Thr41 (Abbildung 38 B), non pSer33/ 37/ Thr41 (Abbildung 38C), pSer552 (Abbildung 38 E) und pSer675 (Abbildung 38 F) Phosphorylierungsformen des β -Catenins.

Der Einfluss von Cycloheximid und Phenobarbital auf die im Protein-Protein-Interaktions-Assay detektierte Menge von „freiem“ β -Catenin ist in Abbildung 39: Mikrosphären-basierter Sandwich-Immunoassay (Protein-Protein-Interaktions Assay). dargestellt. So konnte nach 24 h Cycloheximid-Behandlung ein leichter Anstieg von „freiem“ β -Catenin durch TCF4 (Abbildung 39A) und die cytosolische Domäne des ECT (Abbildung 39 B) gebunden werden; die zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital hatte keinen Einfluss. Die durch GST-ICAT (Abbildung 39 C) gebundene Menge an „freiem“ β -Catenin wurde durch die Cycloheximid-Behandlung deutlich reduziert, eine zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital hatte keinen Effekt verglichen mit einer Behandlung ausschließlich mit Cycloheximid.

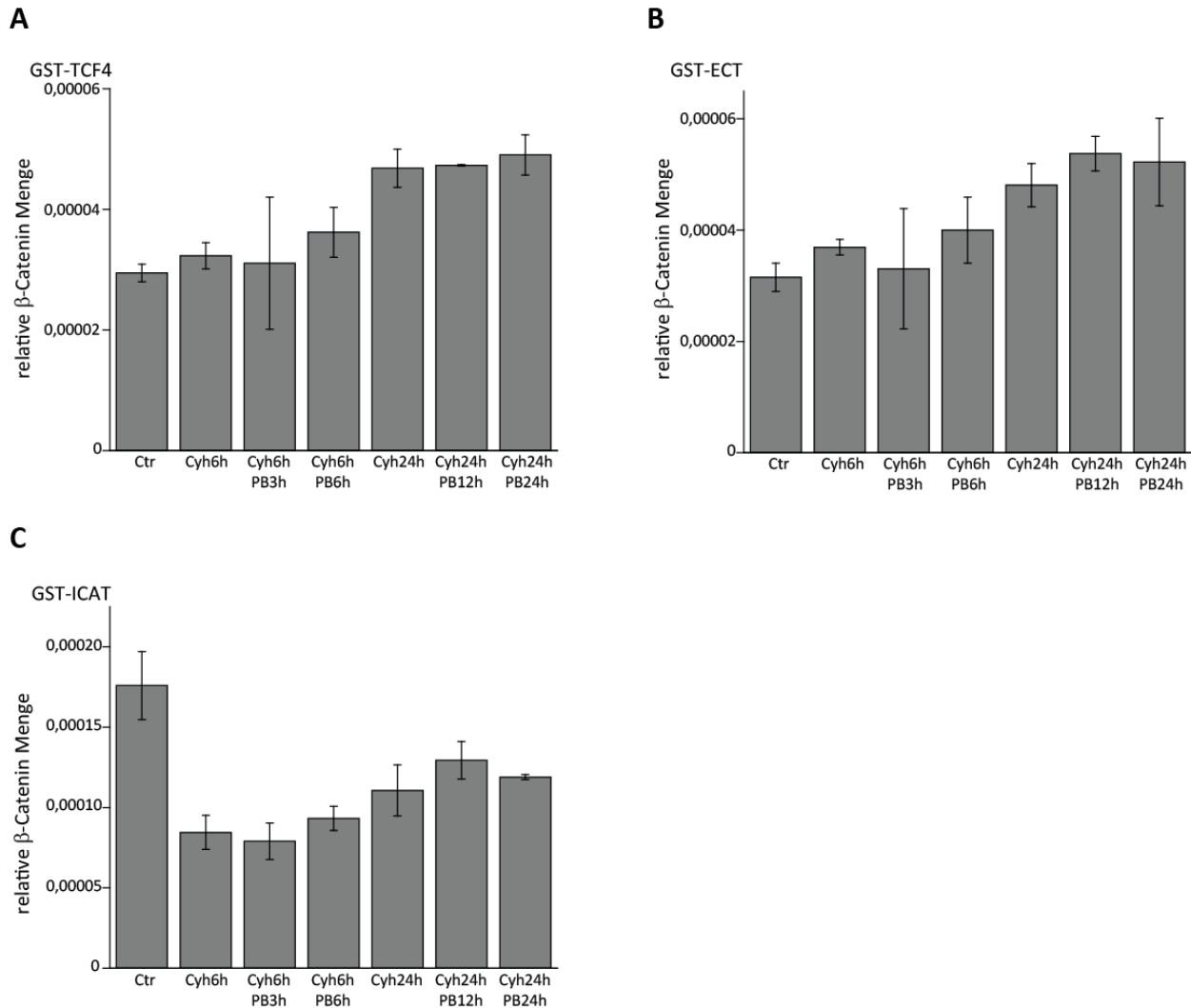


Abbildung 39: Mikrosphären-basierter Sandwich-Immunoassay (Protein-Protein-Interaktions Assay).

Die Zellen wurde mit $0,33 \mu\text{M}$ des Translationshemmers Cycloheximid (Cyh) und 3 mM Phenobarbital (PB) oder DMSO (Ctr) als Kontrolle über verschiedene Zeiträume (PB: 3 h ,6 h, 12 h, 24 h; Cyh: 6 h, 24 h) behandelt. Anschließend wurden $20 \mu\text{g}$ Gesamtprotein in einem Mikrosphären-basierten β -Catenin-Assay analysiert. Für den Protein-Protein-Interaktions Assay wurden verschiedene immobilisierte GST-Fusionsproteine als Fänger-Proteine (Bait-Proteine) (GST-TCF4 (A), GST-ECT (B) und GST-ICAT (C)) sowie ein C-Terminal bindender Antikörper gegen β -Catenin verwendet. Durch einen sekundären PE-konjugierten Antikörper konnte die Bindung von β -Catenin detektiert werden. Die detektierten Signale sind als Mittelwerte und Standardabweichung ($n=3$) in MFI (A-C) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde nach Student's t-Test berechnet.

5.4.3 Untersuchung der Neusynthese von β -Catenin

Nachdem keine Änderung der mRNA Expression von *Ctnnb1* durch Phenobarbital beobachtet wurde und gezeigt werden konnte, dass die Reduktion der β -Catenin-Proteinmenge durch Phenobarbital durch zusätzliche Behandlung mit Cycloheximid aufgehoben werden konnte, wurde in einem Pulsed-SILAC-Assay die Neusynthese von β -Catenin bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden 70.4 K15-Zellen während der Behandlung in einem speziellen Nährmedium inkubiert, dieses enthielt Isotopen-markierte Aminosäuren, wobei Lysine und Arginine mit unterschiedlichen Molekulargewichten eingesetzt wurden. Die Kontroll-Behandlung wurde mit „schweren“-Aminosäuren und die Substanz-Behandlung mit „mittel-schweren“ Aminosäuren inkubiert.

Die Zellen wurden mit 3 mM Phenobarbital (PB), 1 μ M MG132 (MG132), 3 mM Phenobarbital+ 1 μ M MG132 (MG132+PB) oder der jeweiligen Kontrollbehandlung (Ctr) zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 12 h, 24 h) behandelt (in biologischen Triplikaten). Anschließend wurden die Lysate der behandelten Zellen zusammen mit den Zellen der Kontroll-Behandlung in einer tryptischen Proteolyse eingesetzt und das zu analysierende Peptid aus je 10 μ g Gesamtprotein mittels der TXP-Strategie angereichert.

Die gesuchten Peptide wurden mittels tSIM-MS (targeted Single Ion Monitoring) detektiert und via Pinpoint 1.4 analysiert. Die Synthese-Rate wurde berechnet und in Abbildung 40: dargestellt. Dabei wurde die Signalstärke des gemessenen „mittelschweren“ Peptids aus der Behandlung auf das Signal des „schweren“ Peptids aus der Kontroll-Behandlung bezogen.

Nach 6 h Behandlung mit Phenobarbital kam es zu einer Steigerung der Syntheserate von β -Catenin um ca. 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Dieser zeitabhängige Effekt ging nach 24 h Behandlung fast vollständig zurück. Durch die Behandlung mit MG132 kam es zu einer deutlichen Steigerung des neu synthetisierten β -Catenins um ca. 300 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Doppel-Behandlung mit MG132 und Phenobarbital dagegen zeigte eine um 33 % geringere Steigerung der Neusynthese von β -Catenin im Vergleich zur MG132-Behandlung nach 6 h Behandlung. Auch dieser Effekt war zeitabhängig, so stellte sich nach 24 h Behandlung ein ähnliches Verhältnis der Neusyntheserate wie in der MG132-Behandlung ein.

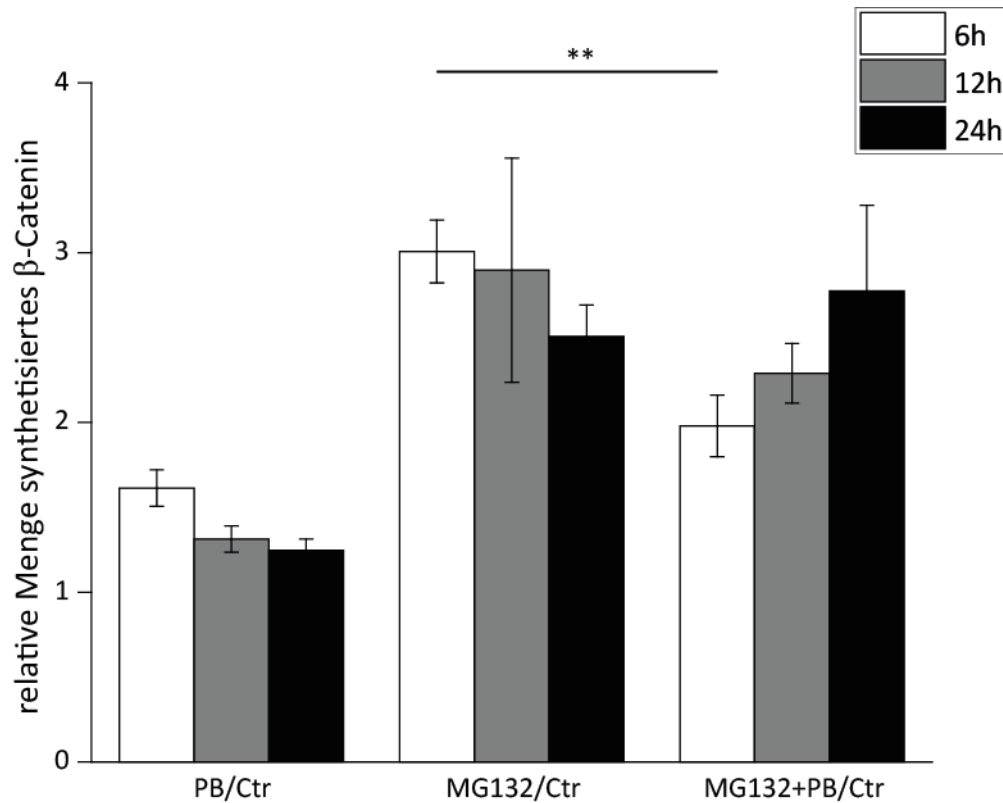


Abbildung 40: Messung der Neusyntheserate von β -Catenin (Pulsed SILAC).

70.4 K15-Zellen wurden mit 3 mM Phenobarbital (PB), 1 μ M MG132 (MG132), 3 mM Phenobarbital + 1 μ M MG132 (MG132+PB) oder der jeweiligen Kontrollbehandlung (Ctr) zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 12 h, 24 h) behandelt. Die Lysate wurden auf die Proteinkonzentration normiert. Die Lysate der behandelten Zellen wurden zusammen mit den Lysaten der jeweiligen Kontrollbehandlung in einer tryptischen Proteolyse eingesetzt und das zu analysierende Peptid aus je 10 μ g Gesamtprotein mittels der TXP-Strategie angereichert. Das gesuchte Peptid wurde mittels tSIM-MS detektiert und mit Hilfe der Pinpoint 1.4 Software analysiert. Die relative β -Catenin-Syntheserate wurde durch Normierung der gemessenen Signalstärke der Behandlung auf die jeweilige Kontrolle errechnet. Mittelwerte und Standardabweichung (biologische Triplikate) sowie statistische Signifikanz nach Student's t-Test (** $p \leq 0,01$) wurden berechnet.

6 Diskussion

Krebs gilt als die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [1]. Dabei handelt es sich nicht um eine herkömmliche Erkrankung mit nur einer Ursache. So steigt die Häufigkeit der meisten Krebserkrankungen mit dem Alter deutlich an, da die Wahrscheinlichkeit einer spontan auftretenden Mutation mit der Anzahl der Zellteilungen zunimmt und so direkt mit dem Lebensalter verknüpft ist. Allerdings können auch eine Reihe von Umweltfaktoren und Chemikalien an Prozessen wie Initiation und Promotion beteiligt sein und so zu einer chemischen Kanzerogenese führen [4]. Auch wenn die Anwendung des Antikonvulsivums Phenobarbital an Bedeutung verliert, gilt Phenobarbital als Modellsubstanz eines nicht genotoxischen Kanzerogens in Nagetieren [118, 119], wobei die Humanrelevanz umstritten ist.

Bei dem tumorpromovierenden Prozess durch Phenobarbital scheint das Protein β -Catenin eine wichtige Rolle zu spielen. Die chronische Gabe von 0,05 % Phenobarbital in der Nahrung führt nach einer initialen DEN-Injektion in Mäusen zu einer Ausbildung von hepatozellulären Tumoren; dabei handelt es sich zu ca. 90 % um eosinophile Adenome. Diese Tumore zeichnen sich unter anderem durch Mutationen des *Ctnnb1*-Gens aus, welche zu einer Stabilisierung von β -Catenin und somit zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen [114, 115]. Für den tumorpromovierenden Effekt von Phenobarbital sind auch die Proteine CAR und Connexin 32 von Bedeutung. So konnte nach Behandlung mit Phenobarbital kein kanzerogener Effekt in Connexin 32- oder CAR-Knockout-Mäusen beobachtet werden [120, 122].

Zudem konnte beobachtet werden, dass Phenobarbital auf HCCs, in denen wenig bis kein Connexin 32 und CAR exprimiert wird, einen inhibierenden Einfluss ausübt. So führt die chronische Gabe von Phenobarbital zu weniger HCCs in Mäusen [117]. Auch Adenome, in denen durch die Mutation der Proto-Onkogene *Ha-ras* oder *B-raf* der *mitogen-activated protein*-Kinase (MAPK)-Signalweg aktiviert wurde, können durch die Gabe von Phenobarbital inhibiert werden; diese Tumore weisen ebenfalls geringere Mengen CAR im Vergleich zu Normalgewebe auf.

Auf Basis der aus der Literatur verfügbaren Daten erschien es daher möglich, dass Phenobarbital über eine Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs Einfluss auf die chemische Kanzerogenese nimmt. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Um den Einfluss von Phenobarbital auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu untersuchen wurde die Maus-Hepatom Zelllinie 70.4 K15 [142] verwendet. Ein CAR- oder Connexin 32-vermittelter Effekt durch Phenobarbital in dem verwendeten Zellsystem konnte ausgeschlossen werden, da beide Gene in 70.4-Zellen nicht exprimiert werden. Analysen auf Proteinebene zeigten, dass die Behandlung mit Phenobarbital zu einer Reduktion des cytosolischen und nukleär lokalisierten β -Catenins und somit zu einer Inhibition des Signalwegs führte. Dieser Effekt war unabhängig vom proteasomalen Abbau von β -Catenin, da der Effekt trotz Proteasom-Hemmung durch MG132 fortbestand. Um ein genaueres Bild über die Veränderungen zu erhalten wurde der Mikrosphären-basierte β -Catenin-Assay verwendet [152, 163]. Dieser ermöglicht die Detektion und die relative Quantifizierung verschiedener β -Catenin-Spezies in einer Probe. Der Mikrosphären-basierte β -Catenin-Assay besteht aus 3 verschiedenen Assay-Konfigurationen (Abbildung 11): Einem *Sandwich*-Immunoassay zur Erfassung der verschiedenen phosphorylierten Formen von β -Catenin durch auf Mikrosphären immobilisierte phosphospezifische Fänger-Antikörper, einem Protein-Protein-Interaktions-Assay zur Detektion von „freiem“ β -Catenin durch auf Mikrosphären immobilisierte Fänger-Proteine, sowie einer μ Co-Immunopräzipitation gegen die cytosolische Domäne von E-Cadherin um Membran-gebundenes β -Catenin zu detektieren. Durch die Möglichkeit der Miniaturisierung und der Messung mehrerer Analyten in einer Probe wurde die Untersuchung der zeitlichen Veränderung der verschiedenen β -Catenin-Formen über 24 h ermöglicht [152, 163, 164]. Dabei zeigte sich bei nahezu allen Analyten, dass es zu einer Reduktion aller analysierten phosphorylierten Formen von β -Catenin nach Behandlung mit Phenobarbital kam.

Da die Hemmung des Proteasoms eine unspezifische Inhibition des Abbaus der meisten Proteine nach sich zieht, führt dies zu einem Anstieg der Gesamtproteinmenge in der Zelle. Dieser Umstand ist mit einem nicht unerheblichen Maße mit Zellstress, Veränderung von Signalwegen und infolgedessen mit einer Beeinflussung der gesamten Zell-Physiologie verbunden. Um dies zu minimieren wurde der Abbau von β -Catenin spezifischer inhibiert. Zu diesem Zweck wurde eine Zelllinie (70.4 Mo K50) verwendet, welche ein in der regulatorischen C-terminalen Domäne mutierte Form von β -Catenin (S33Y) exprimiert. Diese mutierte Form ist unempfindlich gegenüber dem durch den *destruction complex* vermittelten Abbau. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Phenobarbital auf das β -Catenin-Signal unabhängig vom Phosphorylierungszustand des

SSTS-Motivs des β -Catenins ist. Als weitere experimentelle Vereinfachung wurde der GSK3 β -Inhibitor LiCl eingesetzt [149], wodurch eine transiente Transfektion des STF-Reporter-Vektors und ein damit assoziierter Fehler vermieden wurde. Auch der Effekt von LiCl konnte durch die Behandlung mit Phenobarbital reduziert werden. Es konnte ebenfalls eine Dosis-Wirkungs-Beziehung festgestellt werden, wobei die nicht cytotoxische Dosis von 3 mM Phenobarbital einen ähnlich ausgeprägten inhibierenden Effekt wie iCRT3, ein Modell-Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs, ausübte.

Durch weitere mRNA-Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Phenobarbital die Expression des Wnt-Zielgens *Axin2* inhibiert, aber keinen Einfluss auf die Expression der *Cttnb1* mRNA hatte. Damit konnten neben CAR- und Connexin 32-vermittelten Prozessen auch eine Inhibition der mRNA-Expression von *Cttnb1* und eine Steigerung des proteasomalen Abbaus über den *destruction complex* als Erklärung für die Abnahme des cytosolischen β -Catenin-Spiegels durch Phenobarbital ausgeschlossen werden. Infolge dessen konnte ebenfalls eine konventionelle, über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelte Regulation des cytosolischen β -Catenin-Spiegels als Ursache für den durch Phenobarbital beobachteten Effekt ausgeschlossen werden.

So rückte eine Wnt-unabhängige Regulation von β -Catenin durch Calpain in den Fokus. Die Isoformen μ Calpain und m Calpain sind Mitglieder der Superfamilie der intrazellulären Calcium-abhängigen Papain *like* Cystein Protease Calpain [44]. Die proteolytische Spaltung der N-terminalen regulatorischen Domäne von β -Catenin führt zu dessen Stabilisierung und macht es resistent gegen den durch den *destruction complex* vermittelten Abbau [19, 61-63].

Zunächst wurde der Einfluss von Phenobarbital auf die Expression der verschiedenen Isoformen μ Calpain und m Calpain und bekannter Spleiß-Varianten analysiert. Dabei zeigte sich, dass Phenobarbital die Expression der kleinen regulatorischen sowie die der beiden großen katalytischen Untereinheiten des μ Calpains und m Calpains inhibiert. Auch der cytosolische Calpain-Spiegel und die Calpain-Aktivität konnten durch die Behandlung mit Phenobarbital gesenkt werden. Allerdings hatte der Einsatz von Calpain-Inhibitoren in dem verwendeten Zellsystem keinen Einfluss auf den Wnt-Signalweg, obwohl die durch Calpain proteolytisch gespaltene und so aktivierte Form von β -Catenin vorlag [19]. Somit kann ein Einfluss von

Phenobarbital auf die Calpain-Aktivität nicht alleine für den beobachteten Effekt der Substanz auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg herangezogen werden.

Es ist nur wenig über den Einfluss von Phenobarbital auf Proteasen bekannt; so inhibiert Phenobarbital zwar die Enkephalinase-Aktivität [181], induziert aber die 93 kDa mikrosomalen calciumabhängigen Proteasen [182]. Ebenso konnte die transkriptionelle Induktion des Rt88 Calpains, wobei diese Isoform als Retina-spezifisch gilt [183], in Ratten-Hepatocyten beobachtet werden [184]. Im Zusammenhang mit Phenobarbital wird CAR als möglicher nukleärer Faktor im Falle der transkriptionellen Induktion von Cathepsin E angeführt [185]. Eine CAR-vermittelte Regulation ist in dem verwendeten Zellsystem aber nicht von Bedeutung, da in diesem keine Expression der CAR mRNA stattfindet. Eine mögliche Regulation der Expression von Calpain ist die Induktion über den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher wiederum über EGFR-vermittelte Signale reguliert wird [186]. EGFR wird in 70.4-Zellen exprimiert und es konnte nachgewiesen werden, dass Phenobarbital in der Lage ist mit dem EGF-Rezeptor zu interagieren [86]. Ein Einfluß von Phenobarbital auf AP-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, erscheint aber als Mechanismus einer Calpain-Regulation grundsätzlich als möglich.

Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src kann ebenfalls durch den EGFR reguliert werden [86, 187] und ist ihrerseits in der Lage, die Translation von β -Catenin zu beeinflussen [91]. So konnte in dem verwendeten Zellsystem gezeigt werden, dass sowohl EGFR-Inhibitoren als auch Src-Inhibitoren einen ähnlichen Effekt auf den Wnt-Signalweg aufweisen wie Phenobarbital.

Untersuchungen der Kinase-Aktivität der verschiedenen Mitglieder der Src-Familie nach Phenobarbital-Behandlung zeigten eine signifikante Reduktion. Dieser Effekt war nur mäßig stark ausgeprägt und somit geringer als es die vorangegangenen Analysen erwarten ließen. Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach dem Umstand geschuldet, dass der verwendete Assay zur Analyse der Aktivität der gesamten Src-Familie konzipiert wurde [168]. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass der Einfluss von Phenobarbital nach 24 h Stunden nicht mehr so stark ausgeprägt war. Ein ähnliches Bild zeigen die Ergebnisse der *pulsed*-SILAC-Analysen; so nahm der signifikante Effekt von Phenobarbital in der Kombinationsbehandlung mit MG132 auf β -Catenin über die Zeit hin ab. Ein deutlicher Einfluss von Phenobarbital war außerdem nur in Kombination mit MG132 zu beobachten. Letztendlich konnte die Reduzierung des cytosolischen β -Catenin-Spiegels durch Phenobarbital durch die Behandlung mit Cycloheximid vollständig

aufgehoben werden. Somit konnte gezeigt werden dass der Einfluss von Phenobarbital durch die Hemmung des Ribosoms verloren geht und der ursächliche Wirkmechanismus von Phenobarbital in der Biosynthese des β -Catenins begründet sein muss, wobei die Expression der *Ctnnb1* mRNA nicht beeinflusst wird. Demnach scheint die Inhibition des EGFR durch Bindung von Phenobarbital ausschlaggebend zu sein [86], was eine geringere Aktivität der Src-Kinase nach sich zieht [38, 85, 86, 187]. Dies wiederum führt zu einer verminderten Aktivität des eIF4E, wodurch die Translokation von *Ctnnb1* mRNA zum Ribosom vermindert wird [91] (Abbildung 41). So liegt die Vermutung nahe, dass Phenobarbital auf diesem Wege in der Lage ist, die Neusynthese von β -Catenin zu hemmen.

Diese neuen mechanistischen Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Phenobarbital könnten auch eine Erklärung für den *in vivo* beobachteten Effekt der Selektion von Adenomen sein, welche eine Mutationen aufweisen, die mit der Aktivierung des Wnt-Signalwegs insbesondere mit der Mutation des *Ctnnb1*-Gens assoziiert sind [114, 117, 121]. So ist es denkbar, dass die Verminderung der Src-vermittelten Translation einerseits und die Reduzierung der Calpain-vermittelten proteolytischen Abspaltung des SSTS-Motivs und die Src-vermittelten Stabilisierung durch die Phosphorylierung der Aminosäuren Thr 654 und Thr 333 andererseits zu einer negativen Beeinflussung des Wnt-Signalwegs durch Phenobarbital führen [19, 20, 38, 39, 62, 85, 86, 91].

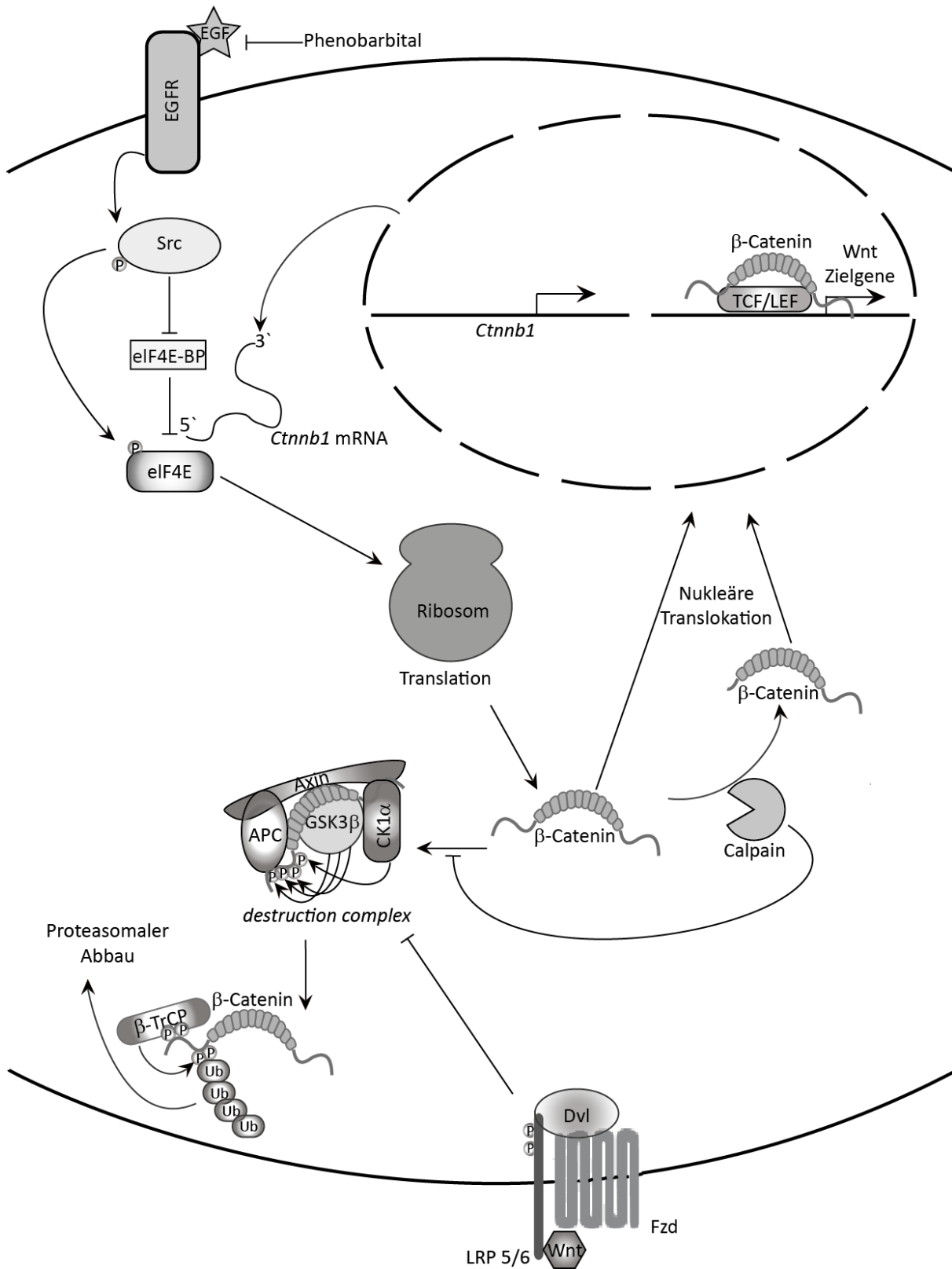


Abbildung 41: Einfluss der Src- und Calpain-Aktivität auf den Wnt-Signalweg.

In Abwesenheit des Wnt-Liganden wird β -Catenin durch den *destruction complex* für den proteasomalen Abbau markiert. In Anwesenheit des Wnt-Liganden findet eine Inhibition des

destruction complex statt; infolgedessen kann β -Catenin in der Zelle anreichern und als Co-Aktivator mit den TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren Wnt-responsive Gene aktivieren [17, 18]. Die proteolytische Abspaltung der N-terminalen regulatorischen Domäne von β -Catenin durch Calpaine führt ebenfalls zu einer Stabilisierung von β -Catenin und zu einer Steigerung der Expression der Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs [19, 61]. Durch die EGFR-vermittelte Aktivierung der Src-Kinase wird die Translokation der prozessierten *Ctnnb1* mRNA zum Ribosom über eIF4E gesteigert, infolge dessen kommt es zu einer Steigerung der β -Catenin-Biosynthese, diese wiederum kann durch Phenobarbital inhibiert werden [86, 91].

Es ist denkbar, dass der verminderte Abbau von β -Catenin in entarteten Zellen, in denen durch eine initiale Mutation die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs gesteigert wurde, zu einem Selektionsvorteil gegenüber Normalgewebe führen könnte, wenn davon ausgegangen wird, dass in dem gesamten Gewebe die Biosynthese von β -Catenin durch Phenobarbital gehemmt wird.

Somit würde der inhibierende Effekt des Phenobarbitals durch die Mutation des *Ctnnb1*-Gens weitestgehend aufgehoben werden. Des Weiteren weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass die proliferierende Wirkung des Phenobarbitals weitestgehend unabhängig von β -Catenin ist und somit von anderen Faktoren, wie CAR oder Connexin 32, vermittelt wird [120, 123, 135, 188].

Die Behandlung mit Phenobarbital führt nach 3 Tagen zu einer Hyperplasie der Leber in Nagetieren, wobei die Proliferation der Hepatocyten nach ca. 2 Wochen auf ein normales Maß zurück geht [189-194]. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei dem proliferierenden Effekt von Phenobarbital um ein kurzfristiges Ereignis handelt, dessen Wirkung nach kurzer Zeit nachlässt. Also hat Phenobarbital vor allem in der Frühphase der Entstehung von Adenomen einen promovierenden Effekt durch eine Steigerung der Proliferationsrate. Diese Annahme wird durch Untersuchungen *in vivo* gestützt; so konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass das Volumen der Adenome nach 9 Wochen der Promotion auch nach Absetzen von Phenobarbital weiterhin zunimmt.

Eine Proliferation konnte vor allem in Zellen beobachtet werden, welche durch immunhistologische Analysen als Glutamin-Synthetase (GS)-positiv klassifiziert wurden [195]. Dabei gilt die Expression von GS als ein verlässlicher Marker für die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der murinen Leber [196, 197]. Tiere in denen durch die Gabe von Tamoxifen das *Ctnnb1*-Gen entfernt wurde zeigten hingegen keine Steigerung der Proliferation nach der Beendigung der Phenobarbital-Behandlung [195]. Somit findet eine weitere Proliferation der Adenome nach Beendigung der Behandlung mit Phenobarbital nur dann statt, wenn in diesen bereits eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vorliegt.

Ein Großteil der mit DEN und Phenobarbital behandelten Tiere weisen Adenome auf, welche eine Mutation des *Ctnnb1*-Gens im Exon 3 aber keine Mutation in den *Ha-ras*-, *B-raf*- oder *Apc*-Genen tragen. Mäuse, in denen das *Apc*-Gen deletiert wurde, entwickeln vorwiegend basophile GS-negative Tumore, die keine Mutationen in den *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- oder *B-raf*-Genen aufweisen. Bei einer zusätzlichen Behandlung mit Phenobarbital entstehen in *Apc*-KO-Tieren überwiegend eosinophile GS-positive Tumore, die aber ebenfalls keine Mutation der *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- oder *B-raf*-Gene aufweisen. Durch die Gabe von Phenobarbital wurde die Tumor-Multiplizität erhöht und somit konnte auch eine Tumorpromotion in *Apc*-KO Tieren gezeigt werden [117]. Diese Beobachtung zeigt, dass im Fall der *Apc*-KO Tiere Adenome gefunden wurden, welche keine Mutation des *Ctnnb1*-Gens zeigten. Diese Adenome wiesen trotzdem einen Phänotyp auf, welcher einer konstitutiv aktivierenden Mutation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs entsprach.

Dabei zeigt eine weitere Beobachtung den paradoxen Effekt des Phenobarbitals: in der *Apc*-KO Kontrollgruppe entwickelten sich basophile GS-negative Karzinome. Diese Entwicklung hin zum HCC wurde durch die Behandlung mit Phenobarbital gehemmt, die Ausbildung von eosinophilen GS-positiven Adenomen aber begünstigt [117, 198]. Die in *Apc*-KO Mäusen auftretenden HCC vereinten dabei Eigenschaften, wie sie entweder in Phenobarbital-promovierten und *Apc*-defizienten, also eosinophilen GS-positiven Adenomen, oder in basophilen GS-negativen Adenomen, welche sich durch eine Aktivierung des MAPK-Weg auszeichnen [199], auftraten. So zeigten die HCC trotz des basophilen GS-negativen Phänotyps einerseits einen deutlich erhöhten cytosolischen β -Catenin-Spiegel und eine erhöhte Expression der Wnt-Zielgene, andererseits eine Erhöhung der MAPK-regulierten Transkriptionsfaktoren Retinoblastom-Protein (RB) und *Ets domain-containing protein* (ELK1), wobei keine Mutation der *Ha-ras*- oder *B-raf*-Gene vorlag. Der massive Anstieg des nukleär lokalisierten β -Catenins könnte sowohl durch die Steigerung der Expression der *Ctnnb1* mRNA als auch durch die fehlende Expression der Cadherine, wodurch weniger β -Catenin an membrangebundene Strukturen rekrutiert wird, erklärt werden. So liegt die Vermutung nahe, dass β -Catenin ein Schlüsselprotein für die Entwicklung hin zum HCC darstellt. So könnte die in dieser Arbeit gezeigte inhibierende Wirkung von Phenobarbital auf den Wnt-Signalweg ein möglicher Erklärungsansatz für die HCC-protective Wirkung in APC-KO-Mäusen bieten, da die Proteine CAR und Connexin 32 in den HCCs, wie auch

in den 70.4 K15-Zellen, nicht exprimiert wurden [117, 200] und so als Mediatoren für den beobachteten Phenobarbital-Effekt ausgeschlossen werden können.

Wenn davon ausgegangen wird, dass der hier gezeigte Effekt der Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Phenobarbital, wie bereits oben diskutiert, im gesamten Gewebe vorherrscht, könnte dies zu einem Vorteil der *Ctnnb1*-mutierten Zellen gegenüber Normalgewebe führen. Zusätzlich könnten Tumorzellen durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel CAR-vermittelte Effekte zu einer weiteren Proliferation getrieben werden, was wiederum zu einer Selektion von β -Catenin-mutierten Adenomen führt. Gehen im Verlauf der Tumorentwicklung diese Proliferationsunterstützenden Effekte wie CAR oder Connexin32 verloren, könnte dies wiederum durch die Hemmung des Wnt-Signalwegs durch Phenobarbital zu einer Inhibition des Wachstums von HCCs führen, wenn nun die inhibitorische Wirkung überwiegt.

Über die Humanrelevanz von der in Nagetieren beobachteten tumorpromovierenden Effekten von Phenobarbital besteht seit einiger Zeit Uneinigkeit, wobei neue Erkenntnisse durch Untersuchungen an transgenen Mäusen, welche die humanen Rezeptoren CAR und *pregnane X receptor* (PXR) exprimieren, zeigten, dass eine Aktivierung der CAR-responsiven Gene sowie tumorpromovierende Effekte in der Leber auftraten [132, 140]. Somit kann der wahrscheinliche Hauptmechanismus der Phenobarbital-vermittelten tumorpromovierenden Wirkung ebenfalls über den humanen CAR und PXR in Erscheinung treten [139].

Auch wenn die Datenlage der humanen Studien eher als unklar anzusehen ist, stützen doch auch diese neuen Ergebnisse die Einschätzung der IARC, welche Phenobarbital als möglicherweise krebserregend für den Menschen mit der Kategorie 2 B klassifiziert [141]. Des Weiteren steht Phenobarbital in Verdacht zu einer reversiblen Hyperplasie des Zahnfleisches, der *gingival hyperplasia*, zu führen [201-203].

Der hier beschriebene Effekt, dass Phenobarbital den Wnt-Signalweg über eine Verminderung der β -Catenin-Biosynthese hemmt, konnte bisher weder *in vivo* noch *in vitro* beobachtet werden. Zusätzlich könnte *in vivo* auch die hier erstmals beschriebene Hemmung der proteolytischen Spaltung von β -Catenin durch Calpain [20] und somit eine Verminderung der β -Catenin-Stabilität [19, 62] eine Rolle spielen.

Die eingesetzten Mengen von 75-750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Phenobarbital in den *in vitro* Experimenten liegen zwar über den *in vivo* beobachteten Blut-Serum-Spiegeln von 15-70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in humanen oder

murinen Proben, allerdings wurde nicht die Konzentration von Phenobarbital in der Leber bestimmt [132, 133]. Somit könnte die Konzentration von Phenobarbital in der Leber möglicherweise höher und damit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich liegen, wie in den *in vitro* Experimenten; außerdem ist eine im Vergleich zum Organ *in vivo* geringere Empfindlichkeit des verwendeten *in vitro*-Systems möglich.

HCCs gehören weltweit zu den am häufigsten auftretenden Karzinomen, dabei zeichnen sich ca. 27 % dieser Karzinome durch eine Erhöhung des nukleären β -Catenin-Spiegels aus [204]. Neben Mutationen im *CTNNB1*-Gen konnten auch Mutationen der Wnt-Signalweg-assoziierten Supressorgene *Axin1* und *Axin2* sowie dem *fragile histidine triad (Fhit)* beobachtet werden [204, 205]. Eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs scheint somit nicht nur eine Rolle bei der Entstehung von HCC zu spielen, sondern auch mit der Bildung von Rezidiven nach Therapie und der Überlebensrate verknüpft zu sein; so legen retrospektive Kohorten-Studien einen Zusammenhang mit dem zellulären β -Catenin-Spiegel nahe [206].

Es stellt sich die Frage ob auch die anti-kanzerogenen Effekte von Phenobarbital für den Menschen eine Rolle spielen und ob insbesondere der inhibierende Effekt auf HCC auftritt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, inwieweit Phenobarbital β -Catenin beeinflusst. Dabei konnten zwei mögliche Mechanismen entschlüsselt werden, die zumindest Teilaspekte der komplexen Wirkmechanismen der aus der Literatur bekannten Effekte des Phenobarbitals erklären. Die hier gewonnen Erkenntnisse verbessern vor allem das Verständnis der paradoxen Effekte des Phenobarbitals und zeigen die Komplexität und das Zusammenspiel verschiedener und scheinbar unabhängiger Signalwege in der Chemikalien-induzierten Kanzerogenese.

7 Zusammenfassung

Das Antiepileptikum Phenobarbital gilt als Paradebeispiel eines nicht genotoxischen Kanzerogens, dessen Wirkung in Nagetieren unumstritten ist, im Menschen aber als nicht gesichert gilt.

Eine chronische Gabe von Phenobarbital führt zu einer Promotion von hepatozellulären Adenomen, die sich durch Mutationen des *Ctnnb1*-Gens auszeichnen, welche zu einer Stabilisierung von β -Catenin und somit zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen. Neben β -Catenin spielen auch die Proteine CAR und Connexin 32 eine essenzielle Rolle bei der tumorpromovierenden Wirkung von Phenobarbital. Paradoxerweise inhibiert Phenobarbital zudem die Ausbildung von HCCs, in denen wenig bis kein Connexin 32 und CAR exprimiert wird, aber eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch *in vitro* Versuche gezeigt werden, dass Phenobarbital in der Lage ist, die cytosolischen β -Catenin-Spiegel in Maus-Hepatomzellen zu reduzieren. Mit Hilfe der Luminex-Technologie konnte der zeitliche Verlauf des Einflusses von Phenobarbital auf die verschiedenen β -Catenin-Spezies beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine Inhibition der mRNA-Expression von *Ctnnb1* und eine Steigerung des proteasomalen Abbaus über den *destruction complex*, und somit eine konventionelle, über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelte Regulation, als Erklärung für die Abnahme des cytosolischen β -Catenin-Spiegels durch Phenobarbital ausgeschlossen werden. Durch Untersuchungen der Expression und Aktivität der cytosolischen Proteasen der Calpain-Familie konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung der N-terminalen regulatorischen Domäne von β -Catenin und somit die Stabilisierung des β -Catenins durch Phenobarbital vermindert wird. Letzten Endes scheint aber die Phenobarbital-vermittelte Inhibition der Src-Kinase und somit eine Reduktion der eIF4E-vermittelten Translation von β -Catenin ausschlaggebend für den beobachteten Effekt auf den Wnt / β -Catenin-Signalweg zu sein.

Die Unterdrückung des Wnt-Signalwegs durch die hier beschriebenen CAR-unabhängigen Mechanismen kann zum Verständnis der in der Literatur beschriebenen paradoxen Effekte von Phenobarbital und der Selektion bestimmter hepatozellulärer Tumore beitragen.

8 Literatur

1. Becker, N.a.H., S, *Krebsatlas-Krebsmortalität im Überblick- Die häufigsten Todesursachen in Deutschland 2012*. 2014.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Oliveira, P.A., et al., *Chemical carcinogenesis*. An Acad Bras Cienc, 2007. **79**(4): p. 593-616.
5. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 502-11.
6. Wang, X.Q., et al., *Oncogenic K-Ras regulates proliferation and cell junctions in lung epithelial cells through induction of cyclooxygenase-2 and activation of metalloproteinase-9*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(3): p. 791-800.
7. Giles, R.H., J.H. van Es, and H. Clevers, *Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1653**(1): p. 1-24.
8. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
9. Weinberg, R.A., *Tumor suppressor genes*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1138-46.
10. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
11. Rijsewijk, F., et al., *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. Cell, 1987. **50**(4): p. 649-57.
12. Kemler, R., *From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion*. Trends Genet, 1993. **9**(9): p. 317-21.
13. Kimelman, D. and W. Xu, *beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7482-91.
14. Roberts, D.M., et al., *Deconstructing the sscatenin destruction complex: mechanistic roles for the tumor suppressor APC in regulating Wnt signaling*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(11): p. 1845-63.
15. Liu, C., et al., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. **108**(6): p. 837-47.
16. Xing, Y., et al., *Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex*. Genes Dev, 2003. **17**(22): p. 2753-64.
17. Heuberger, J. and W. Birchmeier, *Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a002915.
18. Valenta, T., G. Hausmann, and K. Basler, *The many faces and functions of beta-catenin*. EMBO J, 2012. **31**(12): p. 2714-36.
19. Abe, K. and M. Takeichi, *NMDA-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression*. Neuron, 2007. **53**(3): p. 387-97.
20. Groll, N., et al., *Phenobarbital inhibits calpain activity and expression in mouse hepatoma cells*. Biol Chem, 2016. **397**(1): p. 91-6.
21. Davidson, G., et al., *Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 867-72.

22. Bilic, J., et al., *Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation*. *Science*, 2007. **316**(5831): p. 1619-22.
23. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
24. Molenaar, M., et al., *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. *Cell*, 1996. **86**(3): p. 391-9.
25. Riese, J., et al., *LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic*. *Cell*, 1997. **88**(6): p. 777-87.
26. Huber, O., et al., *Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1*. *Mech Dev*, 1996. **59**(1): p. 3-10.
27. Love, J.J., et al., *Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1*. *Nature*, 1995. **376**(6543): p. 791-5.
28. Wong, C.M., S.T. Fan, and I.O. Ng, *beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance*. *Cancer*, 2001. **92**(1): p. 136-45.
29. Schreiber, S., et al., *Phenotype of single hepatocytes expressing an activated version of beta-catenin in liver of transgenic mice*. *J Mol Histol*, 2011. **42**(5): p. 393-400.
30. Iwao, K., et al., *Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations*. *Cancer Res*, 1998. **58**(5): p. 1021-6.
31. Miyoshi, Y., et al., *Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis*. *Oncol Res*, 1998. **10**(11-12): p. 591-4.
32. Miyoshi, Y., et al., *Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3*. *Cancer Res*, 1998. **58**(12): p. 2524-7.
33. Murata, M., et al., *Accumulation of beta-catenin in the cytoplasm and the nuclei during the early hepatic tumorigenesis*. *Hepatol Res*, 2001. **21**(2): p. 126-135.
34. Piedra, J., et al., *p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(7): p. 2287-97.
35. Bustos, V.H., et al., *The first armadillo repeat is involved in the recognition and regulation of beta-catenin phosphorylation by protein kinase CK1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(52): p. 19725-30.
36. Brembeck, F.H., et al., *Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions*. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2225-30.
37. David, M.D., et al., *Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 16): p. 2718-30.
38. Yang, W., et al., *Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation*. *Nature*, 2011. **480**(7375): p. 118-22.
39. Roura, S., et al., *Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(51): p. 36734-40.
40. Rhee, J., et al., *Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(8): p. 883-92.

41. Fang, D., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11221-9.
42. van Veelen, W., et al., *beta-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis*. Gut, 2011. **60**(9): p. 1204-12.
43. Hino, S., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(20): p. 9063-72.
44. Goll, D.E., et al., *The calpain system*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 731-801.
45. Sorimachi, H. and K. Suzuki, *The structure of calpain*. J Biochem, 2001. **129**(5): p. 653-64.
46. Glading, A., D.A. Lauffenburger, and A. Wells, *Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(1): p. 46-54.
47. Perrin, B.J. and A. Huttenlocher, *Calpain*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(7): p. 722-5.
48. Fox, J.E., *On the role of calpain and Rho proteins in regulating integrin-induced signaling*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 385-91.
49. Kishimoto, A., et al., *Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain)*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 4088-92.
50. Schoenwaelder, S.M. and K. Burrige, *Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14359-67.
51. Martin, S.J., et al., *Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6425-8.
52. Saido, T.C., et al., *In situ capture of mu-calpain activation in platelets*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7422-6.
53. Hata, S., H. Sorimachi, and K. Suzuki, *[Structure and function of calpain superfamily]*. Seikagaku, 2001. **73**(9): p. 1129-40.
54. Tsuji, T., et al., *m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains*. Neurosci Lett, 1998. **248**(2): p. 109-12.
55. Nixon, R.a.M.P., *Calpain in the pathogenesis of Alzheimer*. Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease, 1999: p. 267-291.
56. Shields, D.C. and N.L. Banik, *Pathophysiological role of calpain in experimental demyelination*. J Neurosci Res, 1999. **55**(5): p. 533-41.
57. Shields, D.C., et al., *A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11486-91.
58. Bartus, R.T., et al., *Cortical ablation induces a spreading calcium-dependent, secondary pathogenesis which can be reduced by inhibiting calpain*. Exp Neurol, 1999. **155**(2): p. 315-26.
59. NEUMAN RW, M.F., MILLS AM, XU YA, ZHANG C, WELSH FA, AND SIMAN R, *Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia*. Exp Neurol, 2001. **170**: p. 27-35.
60. Mundo, E., et al., *The calpain-calpastatin system in obsessive-compulsive disorder*. Biol Psychiatry, 1997. **42**(3): p. 228-9.
61. Konze, S.A., et al., *Cleavage of E-cadherin and beta-catenin by calpain affects Wnt signaling and spheroid formation in suspension cultures of human pluripotent stem cells*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(4): p. 990-1007.

62. Lade, A., et al., *Calpain induces N-terminal truncation of beta-catenin in normal murine liver development: diagnostic implications in hepatoblastomas*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 22789-98.
63. Mancini, M., et al., *A calpain-cleaved fragment of beta-catenin promotes BCRABL1+ cell survival evoked by autophagy induction in response to imatinib*. Cell Signal, 2014. **26**(8): p. 1690-7.
64. Li, G. and R. Iyengar, *Calpain as an effector of the Gq signaling pathway for inhibition of Wnt/beta -catenin-regulated cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13254-9.
65. Parsons, S.J. and J.T. Parsons, *Src family kinases, key regulators of signal transduction*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7906-9.
66. Stehelin, D., et al., *DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA*. Nature, 1976. **260**(5547): p. 170-3.
67. Rous, P., *A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells*. J Exp Med, 1911. **13**(4): p. 397-411.
68. Rubin, H., *Quantitative relations between causative virus and cell in the Rous no. 1 chicken sarcoma*. Virology, 1955. **1**(5): p. 445-73.
69. Temin, H.M. and H. Rubin, *Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture*. Virology, 1958. **6**(3): p. 669-88.
70. Hunter, T. and B.M. Sefton, *Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1311-5.
71. Superti-Furga, G., et al., *Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src*. EMBO J, 1993. **12**(7): p. 2625-34.
72. Bar-Sagi, D., et al., *SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules*. Cell, 1993. **74**(1): p. 83-91.
73. Bolen, J.B., et al., *The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction*. FASEB J, 1992. **6**(15): p. 3403-9.
74. Cooper, J.A. and B. Howell, *The when and how of Src regulation*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1051-4.
75. Okada, M., *Regulation of the SRC family kinases by Csk*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(10): p. 1385-97.
76. Anderson, D., et al., *Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors*. Science, 1990. **250**(4983): p. 979-82.
77. Liu, X., et al., *Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain*. Oncogene, 1993. **8**(5): p. 1119-26.
78. Liu, X., et al., *The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5225-32.
79. Erpel, T., G. Superti-Furga, and S.A. Courtneidge, *Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions*. EMBO J, 1995. **14**(5): p. 963-75.
80. Boerner, R.J., et al., *Examination of the dephosphorylation reactions catalyzed by pp60c-src tyrosine kinase explores the roles of autophosphorylation and SH2 ligand binding*. Biochemistry, 1995. **34**(45): p. 14852-60.
81. Erpel, T. and S.A. Courtneidge, *Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(2): p. 176-82.

82. Hennipman, A., et al., *Tyrosine kinase activity in breast cancer, benign breast disease, and normal breast tissue*. *Cancer Res*, 1989. **49**(3): p. 516-21.
83. Ottenhoff-Kalff, A.E., et al., *Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product*. *Cancer Res*, 1992. **52**(17): p. 4773-8.
84. Irby, R.B. and T.J. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5636-42.
85. Meyer, S.A. and R.L. Jirtle, *Old dance with a new partner: EGF receptor as the phenobarbital receptor mediating Cyp2B expression*. *Sci Signal*, 2013. **6**(274): p. pe16.
86. Mutoh, S., et al., *Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling*. *Sci Signal*, 2013. **6**(274): p. ra31.
87. Gingras, A.C., et al., *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism*. *Genes Dev*, 1999. **13**(11): p. 1422-37.
88. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 913-63.
89. Sonenberg, N. and A.C. Gingras, *The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(2): p. 268-75.
90. Raught, B. and A.C. Gingras, *eIF4E activity is regulated at multiple levels*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. **31**(1): p. 43-57.
91. Karni, R., et al., *Active Src elevates the expression of beta-catenin by enhancement of cap-dependent translation*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(12): p. 5031-9.
92. Hauptmann, A., *Luminal bei Epilepsie*. *Münch Med Wochenschr*, 1912. **59**: p. 1907-9.
93. Kumbier, E., *Wie aus einem Schlafmittel ein Antiepileptikum wurde - Die Entdeckung der antiepileptischen Wirkung von Phenobarbital durch Alfred Hauptmann*. *Aktuelle Neurologie*, 2004. **31**: p. 302-306.
94. WHO, *WHO Model List of Essential Medicines*. 2012.
95. Kwan, P. and M.J. Brodie, *Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: a critical review*. *Epilepsia*, 2004. **45**(9): p. 1141-9.
96. Baldy-Moulinier M, C.A., D'Urso S *Therapeutic strategies against epilepsy in Mediterranean countries*. *Seizure*, 1998.
97. Dowling, P.M., *Update on therapy of canine epilepsy*. *Can Vet J*, 1999. **40**(8): p. 595-8.
98. Aktories, F., Hofmann, Starke, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2005. **9**.
99. Taverna, F.A., et al., *Sensitivity of AMPA receptors to pentobarbital*. *Eur J Pharmacol*, 1994. **267**(3): p. R3-5.
100. Burger, P.C. and P.B. Herdson, *Phenobarbital-induced fine structural changes in rat liver*. *Am J Pathol*, 1966. **48**(5): p. 793-809.
101. Argyris, T.S., *Liver growth associated with the induction of aminopyrine demethylase activity after phenobarbital treatment in adult male rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1968. **164**(2): p. 405-11.
102. Kunz, W.S., G. ; Schmid, W. ; Siess, M., *Lebervergrößerung durch Fremdstoffe*. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path.*, 1966. **254**: p. 470-488.

103. Peraino, C., et al., *Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat*. *Cancer Res*, 1973. **33**(11): p. 2701-5.
104. Ponomarev, V. and L.J. Mackey, *Tumours of the liver and biliary system*. *Bull World Health Organ*, 1976. **53**(2-3): p. 187-94.
105. Thorpe, E. and A.I. Walker, *The toxicology of dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone, -BHC and -DDE*. *Food Cosmet Toxicol*, 1973. **11**(3): p. 433-42.
106. Jones, H.B., T.C. Orton, and B.G. Lake, *Effect of chronic phenobarbitone administration on liver tumour formation in the C57BL/10J mouse*. *Food Chem Toxicol*, 2009. **47**(6): p. 1333-40.
107. Ward, J.M., *Increased susceptibility of livers of aged F344/NCr rats to the effects of phenobarbital on the incidence, morphology, and histochemistry of hepatocellular foci and neoplasms*. *J Natl Cancer Inst*, 1983. **71**(4): p. 815-23.
108. Ward, J.M., P. Lynch, and C. Riggs, *Rapid development of hepatocellular neoplasms in aging male C3H/HeNCr mice given phenobarbital*. *Cancer Lett*, 1988. **39**(1): p. 9-18.
109. Pereira, M.A., S.L. Herren-Freund, and R.E. Long, *Dose-response relationship of phenobarbital promotion of diethylnitrosamine initiated tumors in rat liver*. *Cancer Lett*, 1986. **32**(3): p. 305-11.
110. Pereira, M.A., et al., *Effect of phenobarbital on the development of liver tumors in juvenile and adult mice*. *J Natl Cancer Inst*, 1986. **77**(2): p. 449-52.
111. Diwan, B.A., et al., *Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine and its promotion by phenobarbital in C57BL/6NCr, C3H/HeNCrMTV- and DBA/2NCr mice*. *Carcinogenesis*, 1986. **7**(2): p. 215-20.
112. Lee, G.H., T. Ooasa, and M. Osanai, *Mechanism of the paradoxical, inhibitory effect of phenobarbital on hepatocarcinogenesis initiated in infant B6C3F1 mice with diethylnitrosamine*. *Cancer Res*, 1998. **58**(8): p. 1665-9.
113. Rumsby, P.C., et al., *Analysis of the Ha-ras oncogene in C3H/He mouse liver tumours derived spontaneously or induced with diethylnitrosamine or phenobarbitone*. *Carcinogenesis*, 1991. **12**(12): p. 2331-6.
114. Aydinlik, H., et al., *Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors*. *Oncogene*, 2001. **20**(53): p. 7812-6.
115. Strathmann, J., et al., *PCB 153, a non-dioxin-like tumor promoter, selects for beta-catenin (Catnb)-mutated mouse liver tumors*. *Toxicol Sci*, 2006. **93**(1): p. 34-40.
116. Dong, B., et al., *Activating CAR and beta-catenin induces uncontrolled liver growth and tumorigenesis*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 5944.
117. Braeuning, A., et al., *Tumor promotion and inhibition by phenobarbital in livers of conditional Apc-deficient mice*. *Arch Toxicol*, 2016.
118. Lee, G.H., *Paradoxical effects of phenobarbital on mouse hepatocarcinogenesis*. *Toxicol Pathol*, 2000. **28**(2): p. 215-25.
119. Whysner, J., P.M. Ross, and G.M. Williams, *Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion*. *Pharmacol Ther*, 1996. **71**(1-2): p. 153-91.

120. Moennikes, O., et al., *Lack of phenobarbital-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in connexin32-null mice*. *Cancer Res*, 2000. **60**(18): p. 5087-91.
121. Rignall, B., et al., *Tumor formation in liver of conditional beta-catenin-deficient mice exposed to a diethylnitrosamine/phenobarbital tumor promotion regimen*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(1): p. 52-7.
122. Yamamoto, Y., et al., *The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice*. *Cancer Res*, 2004. **64**(20): p. 7197-200.
123. Ross, J., et al., *Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane in vivo*. *Toxicol Sci*, 2010. **116**(2): p. 452-66.
124. Phillips, J.M., L.D. Burgoon, and J.I. Goodman, *The constitutive active/androstane receptor facilitates unique phenobarbital-induced expression changes of genes involved in key pathways in precancerous liver and liver tumors*. *Toxicol Sci*, 2009. **110**(2): p. 319-33.
125. Lamminpaa, A., et al., *Cancer incidence among patients using antiepileptic drugs: a long-term follow-up of 28,000 patients*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2002. **58**(2): p. 137-41.
126. Cerminara, C., et al., *Hepatocellular adenoma associated with long-term exposure to phenobarbital: a paediatric case report*. *Childs Nerv Syst*, 2012. **28**(6): p. 939-41.
127. White, S.J., A.E. McLean, and C. Howland, *Anticonvulsant drugs and cancer. A cohort study in patients with severe epilepsy*. *Lancet*, 1979. **2**(8140): p. 458-61.
128. La Vecchia, C. and E. Negri, *A review of epidemiological data on epilepsy, phenobarbital, and risk of liver cancer*. *Eur J Cancer Prev*, 2014. **23**(1): p. 1-7.
129. Holsapple, M.P., et al., *Mode of action in relevance of rodent liver tumors to human cancer risk*. *Toxicol Sci*, 2006. **89**(1): p. 51-6.
130. Bachmanov, A.A., et al., *Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains*. *Behav Genet*, 2002. **32**(6): p. 435-43.
131. Lagenstein, *Fieberkrämpfe Wandlung in der Berertung*. *Dt Ärzteblatt*, 1983. **80**.
132. Braeuning, A., et al., *Phenobarbital-mediated tumor promotion in transgenic mice with humanized CAR and PXR*. *Toxicol Sci*, 2014. **140**(2): p. 259-70.
133. Houghton, G.W., et al., *Brain concentrations of phenytoin, phenobarbitone and primidone in epileptic patients*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1975. **9**(1): p. 73-8.
134. Geter, D.R., et al., *Dose-response modeling of early molecular and cellular key events in the CAR-mediated hepatocarcinogenesis pathway*. *Toxicol Sci*, 2014. **138**(2): p. 425-45.
135. Yamamoto, M., et al., *Comparison of genomic and cDNA sequences of guinea pig CYP2B18 and rat CYP2B2: absence of a phenobarbital-responsive enhancer module in the upstream region of the CYP2B18 gene*. *J Biochem Mol Toxicol*, 2004. **18**(3): p. 124-30.
136. Hirose, Y., et al., *Comparison of the effects of the synthetic pyrethroid Metofluthrin and phenobarbital on CYP2B form induction and replicative DNA synthesis in cultured rat and human hepatocytes*. *Toxicology*, 2009. **258**(1): p. 64-9.
137. Parzefall, W., et al., *Testing for induction of DNA synthesis in human hepatocyte primary cultures by rat liver tumor promoters*. *Cancer Res*, 1991. **51**(4): p. 1143-7.
138. Hasmall, S.C. and R.A. Roberts, *The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics*. *Pharmacol Ther*, 1999. **82**(1): p. 63-70.

139. Elcombe, C.R., et al., *Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: A case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator*. Crit Rev Toxicol, 2014. **44**(1): p. 64-82.
140. Luisier, R., et al., *Phenobarbital induces cell cycle transcriptional responses in mouse liver humanized for constitutive androstane and pregnane x receptors*. Toxicol Sci, 2014. **139**(2): p. 501-11.
141. IARC, *Phenobarbital and its sodium salt*. IARC Monogr, 2001. **79**.
142. Kress, S., et al., *p53 mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors*. Mol Carcinog, 1992. **6**(2): p. 148-58.
143. Braeuning, A., et al., *Zonal gene expression in mouse liver resembles expression patterns of Ha-ras and beta-catenin mutated hepatomas*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(4): p. 503-7.
144. Zeller, E., et al., *Dual-specificity phosphatases are targets of the Wnt/beta-catenin pathway and candidate mediators of beta-catenin/Ras signaling interactions*. Biol Chem, 2012. **393**(10): p. 1183-91.
145. Xie, Q.W., et al., *Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4891-6.
146. Hecht, A., et al., *Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 18017-25.
147. Gottardi, C.J. and B.M. Gumbiner, *Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. R792-4.
148. Braeuning, A., et al., *Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes*. FEBS J, 2007. **274**(18): p. 4766-77.
149. Klein, P.S. and D.A. Melton, *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8455-9.
150. Lifetechnologies, *Lipofectamine® 2000 Reagent Protocol 2013*. 2013.
151. Clontech, *Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System User Manual*. 2008.
152. Luckert, K., et al., *Snapshots of protein dynamics and post-translational modifications in one experiment--beta-catenin and its functions*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(5): p. M110007377.
153. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
154. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
155. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
156. Ekins, R.P., *Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays*. Clin Chem, 1998. **44**(9): p. 2015-30.
157. Khan, I.H., et al., *Multiplex analysis of intracellular signaling pathways in lymphoid cells by microbead suspension arrays*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(4): p. 758-68.
158. Jones, R.B., et al., *A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 168-74.

159. Du, J., et al., *Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 77-83.
160. MacBeath, G., *Protein microarrays and proteomics*. Nat Genet, 2002. **32 Suppl**: p. 526-32.
161. Templin, M.F., et al., *Protein microarrays: promising tools for proteomic research*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2155-66.
162. Luminex, *Luminex® FLEXMAP 3D® Hardware User Manual*. 2009.
163. Groll, N., et al., *A bead-based multiplex sandwich immunoassay to assess the abundance and posttranslational modification state of beta-catenin*. Methods Mol Biol, 2015. **1295**: p. 441-53.
164. Poetz, O., et al., *Microsphere-based co-immunoprecipitation in multiplex*. Anal Biochem, 2009. **395**(2): p. 244-8.
165. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
166. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
167. Watanabe, R., et al., *Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4801-9.
168. Promega, *Technical Bulletin; ProFluor Src-Family Kinase Assay*. Instructions for use of products V1270 and V1271, 2009.
169. Schwanhauser, B., et al., *Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC*. Proteomics, 2009. **9**(1): p. 205-9.
170. Volk, S., et al., *Combining ultracentrifugation and peptide termini group-specific immunoprecipitation for multiplex plasma protein analysis*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(7): p. O111 015438.
171. Eisen, D., et al., *G protein-coupled receptor quantification using peptide group-specific enrichment combined with internal peptide standard reporter calibration*. J Proteomics, 2013. **90**: p. 85-95.
172. Braeuning, A., et al., *Gender-specific interplay of signaling through beta-catenin and CAR in the regulation of xenobiotic-induced hepatocyte proliferation*. Toxicol Sci, 2011. **123**(1): p. 113-22.
173. Braeuning, A., *Liver cell proliferation and tumor promotion by phenobarbital: relevance for humans?* Arch Toxicol, 2014. **88**(10): p. 1771-2.
174. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
175. Ding, X. and J.L. Staudinger, *The ratio of constitutive androstane receptor to pregnane X receptor determines the activity of guggulsterone against the Cyp2b10 promoter*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(1): p. 120-7.
176. Raucy, J.L., et al., *Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 475-82.
177. Lake, B.G., *Species differences in the hepatic effects of inducers of CYP2B and CYP4A subfamily forms: relationship to rodent liver tumour formation*. Xenobiotica, 2009. **39**(8): p. 582-96.
178. Martignoni, M., et al., *An in vivo and in vitro comparison of CYP gene induction in mice using liver slices and quantitative RT-PCR*. Toxicol In Vitro, 2006. **20**(1): p. 125-31.

179. Donthamsetty, S., et al., *Excessive hepatomegaly of mice with hepatocyte-targeted elimination of integrin linked kinase following treatment with 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene*. *Hepatology*, 2011. **53**(2): p. 587-95.
180. Ch'ih, J.J., et al., *Regulation of mammalian protein synthesis in vivo. Simulated transport of nuclear ribonucleoprotein complexes to the cytoplasm after cycloheximide treatment*. *Biochem J*, 1979. **178**(3): p. 643-9.
181. Mousa, S., S. Tjioe, and D. Couri, *Decreased enkephalinase activity following postnatal treatment with phenobarbital*. *Neuropharmacology*, 1985. **24**(1): p. 9-11.
182. Enomoto, K., et al., *Induction of a novel Ca²⁺-dependent serine protease in rat liver treated with various promoters of liver carcinogenesis*. *Toxicol Pathol*, 1987. **15**(1): p. 73-7.
183. Azuma, M., et al., *Identification and characterization of a retina-specific calpain (Rt88) from rat*. *Curr Eye Res*, 2000. **21**(3): p. 710-20.
184. Jessen, B.A., et al., *Assessment of hepatocytes and liver slices as in vitro test systems to predict in vivo gene expression*. *Toxicol Sci*, 2003. **75**(1): p. 208-22.
185. Page, J.L., S.C. Strom, and C.J. Omiecinski, *Regulation of the human cathepsin E gene by the constitutive androstane receptor*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **467**(1): p. 132-8.
186. Asangani, I.A., et al., *NRF-1, and AP-1 regulate the promoter of the human calpain small subunit 1 (CAPNS1) gene*. *Gene*, 2008. **410**(1): p. 197-206.
187. Feng, Q., et al., *Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(9): p. 945-56.
188. Moennikes, O., et al., *Hepatocarcinogenesis in female mice with mosaic expression of connexin32*. *Hepatology*, 2000. **32**(3): p. 501-6.
189. Argyns, *Stimulators, enzyme induction and control of liver growth*. Cold Spring Harbor conference on cell proliferation, 1774: p. 49-66.
190. Peraino, C., R.J. Fry, and E. Staffeldt, *Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene*. *Cancer Res*, 1971. **31**(10): p. 1506-12.
191. Peraino, C., et al., *Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat*. *Cancer Res*, 1975. **35**(10): p. 2884-90.
192. Barbason, H., C. Rassenfosse, and E.H. Betz, *Promotion mechanism of phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinogenesis cell kinetics effect*. *Br J Cancer*, 1983. **47**(4): p. 517-25.
193. Feo, F., et al., *Early stimulation of polyamine biosynthesis during promotion by phenobarbital of diethylnitrosamine-induced rat liver carcinogenesis. The effects of variations of the S-adenosyl-L-methionine cellular pool*. *Carcinogenesis*, 1985. **6**(12): p. 1713-20.
194. Eckl, P.M., et al., *Phenobarbital reduces EGF receptors and the ability of physiological concentrations of calcium to suppress hepatocyte proliferation*. *Carcinogenesis*, 1988. **9**(3): p. 479-83.
195. Singh, Y., et al., *Genetic ablation of beta-catenin inhibits the proliferative phenotype of mouse liver adenomas*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(1): p. 132-8.
196. Loeppen, S., et al., *Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital*. *Cancer Res*, 2002. **62**(20): p. 5685-8.

197. Chafey, P., et al., *Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway*. *Proteomics*, 2009. **9**(15): p. 3889-900.
198. Wolff, G.L., R.L. Morrissey, and J.J. Chen, *Amplified response to phenobarbital promotion of hepatotumorigenesis in obese yellow Avy/A (C3H x VY) F-1 hybrid mice*. *Carcinogenesis*, 1986. **7**(11): p. 1895-8.
199. Singh, Y., et al., *Selective poisoning of Ctnnb1-mutated hepatoma cells in mouse liver tumors by a single application of acetaminophen*. *Arch Toxicol*, 2013. **87**(8): p. 1595-607.
200. Marx-Stoelting, P., et al., *Tumor promotion in liver of mice with a conditional Cx26 knockout*. *Toxicol Sci*, 2008. **103**(2): p. 260-7.
201. Lafzi, A., R.M. Farahani, and M.A. Shoja, *Phenobarbital-induced gingival hyperplasia*. *J Contemp Dent Pract*, 2007. **8**(6): p. 50-6.
202. Sinha, S., et al., *Phenobarbitone induced gingival hyperplasia*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. **73**(5): p. 601.
203. Cornacchio, A.L., J.G. Burneo, and C.E. Aragon, *The effects of antiepileptic drugs on oral health*. *J Can Dent Assoc*, 2011. **77**: p. b140.
204. Ishizaki, Y., et al., *Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas*. *Int J Oncol*, 2004. **24**(5): p. 1077-83.
205. Weiske, J., K.F. Albring, and O. Huber, *The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of beta-catenin transcriptional activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(51): p. 20344-9.
206. Cheung, P.F., et al., *Hepatic cancer stem cell marker granulin-epithelin precursor and beta-catenin expression associate with recurrence in hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*, 2016.

9 Publikationsliste

Groll, N.; Sommersdorf, C.; Joos, TO.; Poetz, O. *A Bead-Based Multiplex Sandwich Immunoassay to Assess the Abundance and Posttranslational Modification State of β -Catenin*. *Methods Mol Biol*. 2015;1295:441-53.

Groll N, Emele F, Poetz O, Rothbauer U. *Towards multiplexed protein-protein interaction analysis using protein tag-specific nanobodies*. *Journal of proteomics*. 2015;127(Pt B):289-99. doi: 10.1016/j.jprot.2015.04.017.

Groll N, Kollotzek F, Goepfert J, Joos TO, Schwarz M, Braeuning A. *Phenobarbital inhibits calpain activity and expression in mouse hepatoma cells*. *Biol Chem*. 2016 Jan 1;397(1):91-6. doi: 10.1515/hsz-2015-0223.

Petzuch B, Groll N, Schwarz M, Braeuning A. *Application of HC-AFW1 Hepatocarcinoma Cells for Mechanistic Studies: Regulation of Cytochrome P450 2B6 Expression by Dimethyl Sulfoxide and Early Growth Response 1. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2015;43(11):1727-33. doi: 10.1124/dmd.115.064659.

Groll N, Petrikat T, Vetter S, Colnot S, Weiss F, Poetz O, et al. *Coordinate regulation of Cyp2e1 by beta-catenin- and hepatocyte nuclear factor 1alpha-dependent signaling*. *Toxicology*. 2016;350-352:40-8.

Sinnberg T, Makino E, Krueger M A, Velic A, Macek B, Rothbauer U, Groll N, Potz O, Czermel S, Niessner H, Meier F, Ikenberg K, Garbe C, Schittek B. *A Nexus Consisting of Beta-Catenin and Stat3 Attenuates BRAF Inhibitor Efficacy and Mediates Acquired Resistance to Vemurafenib*. 2016. *EBioMedicine* 8: 132-149.

Groll N, Petrikat T, Vetter S, Wenz C, Dengjel J, Gretzmeier C, Weiß F, Potz O, Joos TO, Schwarz M, Braeuning A. *Inhibition of beta-catenin signaling by phenobarbital in hepatoma cells in vitro*. Toxicology. 2016. doi: 10.1016/j.tox.2016.09.018.

