

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie

(Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-
Signalwegs für die Radiotherapieresistenz
des Rektumkarzinoms sowie von
Normalgewebe am Beispiel von
RPE-1-Zellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Janneke Möller

aus Hannover

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	PD Dr. med. M. Grade
Ko-Referent:	Prof. Dr. rer. nat. D. Kube
Drittreferent:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
Datum der mündlichen Prüfung:	03.11.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Radiotherapieresistenz des Rektumkarzinoms sowie von Normalgewebe am Beispiel von RPE-1-Zellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Emons G, Spitzner M, Reineke S, Möller J, Auslander N, Kramer F, Hu Y, Beissbarth T, Wolff HA, Rave-Frank M, et al. (2017): Chemoradiotherapy Resistance in Colorectal Cancer Cells is Mediated by Wnt/beta-catenin Signaling. *Mol Cancer Res* 15, 1481-1490

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.2	Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.....	1
1.3	Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.....	2
1.4	Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	4
1.5	Mechanismen der Radiochemotherapiesensibilität.....	6
1.6	Klinische Problematik und Vorarbeiten.....	6
1.7	Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg.....	8
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien	15
2.1.4	Zellkulturreagenzien	17
2.1.5	Vektoren.....	18
2.1.6	Antikörper	18
2.1.7	Kits.....	19
2.1.8	Computer-Software.....	19
2.1.9	Puffer und Lösungen.....	20
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur.....	24
2.2.2	Konditionieren von Wnt3a-haltigem Medium.....	27
2.2.3	Western Blot	28
2.2.4	Transfektion	36
2.2.5	Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1 ..	37
2.2.6	Dual-Luciferase [®] Reporter Assay.....	38
2.2.7	Vorversuche zur Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a.....	45
2.2.8	Koloniebildungsversuch	46
3	Ergebnisse	53
3.1	Auswahl der Zelllinie RPE-1	53
3.2	Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a	54

3.2.1	Ergebnisse der Vorversuche zur Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a.....	54
3.2.2	Ergebnisse der Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a	55
3.3	Ergebnisse der Etablierung der Lipofektion der Zelllinie RPE-1 mit XtremeGene HP DNA Transfection Reagent	59
3.4	Ergebnisse der Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1	60
3.4.1	Transiente Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y).....	61
3.4.2	Stabile Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y)	62
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
4	Diskussion	65
4.1	Die Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a führt zu einer Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz der Zellen	66
4.2	Die Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in RPE-1-Zellen führt zu einer Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz der Zellen.....	68
4.3	Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz verschiedener Tumorentitäten	69
4.4	Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz von Normalgewebe.....	71
4.5	Ausblick	73
5	Zusammenfassung.....	76
6	Anhang	77
7	Literaturverzeichnis.....	78
	Abbildungsverzeichnis.....	85
	Tabellenverzeichnis	87
	Formelverzeichnis.....	87
	Danksagung.....	88

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APT	Aminoglykosid-3'-Phosphotransgenase
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
CBBG	Coomassie Brilliant Blau G-250
CCD	<i>charge-coupled device</i> , Ladungskopplungsspeicher
CK1	Casein-Kinase 1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Chemotherapie
d	Tag
Da	Dalton
dd	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , erhöhte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EV	<i>empty vector</i>
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i> , familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
FOP	<i>far-from-optimal Tcf-binding site</i>
Fz	<i>frizzled</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
Gy	Gray
HDAC1	<i>histone deacetylase 1</i> , Histon-Deacytelase 1

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> , hereditäres nicht polyposisassoziertes kolorektales Karzinomsyndrom
KBV	Koloniebildungsversuch
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
KRK	kolorektales Karzinom
LEF	<i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
LRP5/6	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
NP40	<i>Nonidet-P40 buffer</i> , Zellysepuffer
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , salzhaltiger Phosphatpuffer
PME	partielle mesorektale Exzision
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RCT	Radiochemotherapie
RG	Reagiergefäß
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> , Zellysepuffer
RL	Renilla
RPE	<i>retinal pigment epithelial</i> , retinales Pigmentepithel
Rt	Raumtemperatur
RT	Radiotherapie
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMAD	<i>S-mothers against decapentaplegic</i>
T225er	Zellkulturflasche mit 225 cm ² Wachstumsfläche
T25er	Zellkulturflasche mit 25 cm ² Wachstumsfläche
T75er	Zellkulturflasche mit 75 cm ² Wachstumsfläche
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Salzlösung mit Trispuffer
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> + 0,1% Tween [®] 20, Salzlösung mit Trispuffer + 0,1% Tween [®] 20
TCF	<i>T cell-specific transcription factor</i>

TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TME	totale mesorektale Exzision
TOP	<i>optimal Tcf-binding site</i> , Plasmid mit TCF-Bindungsstellen
ü. N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
Wnt	<i>wingless type MMTV integration site</i>
WP	Well-Platte
β -TrCP	<i>β-Transducin-repeat-containing protein</i>

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Nach Angaben der globalen Krebsstatistik 2018 ist das kolorektale Karzinom bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste Krebsneuerkrankung mit insgesamt rund 1,8 Millionen Neuerkrankungen weltweit (Bray et al. 2018).

Risikofaktoren für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen sind Tabak- und Alkoholkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel, ballaststoffarme Ernährung sowie regelmäßiger Konsum von rotem Fleisch. Auch das Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms bei einem Verwandten ersten Grades erhöht das Risiko, selbst an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Kaatsch et al. 2015). In etwa 5% der Fälle tritt das kolorektale Karzinom im Rahmen von genetischen Syndromen wie beispielsweise dem hereditären nicht polyposisassoziierten kolorektalen Karzinomsyndrom (HNPCC) oder der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) auf (Emons et al. 2015; Gala und Chung 2011).

1.2 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Bei der Tumorgenese im Allgemeinen handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem nach und nach verschiedene genetische Alterationen unterschiedliche Wachstumsvorteile der Zelle bewirken, wodurch sich letztendlich ein invasiver Tumor entwickelt (Foulds 1954; Hanahan und Weinberg 2000; Nowell 1976). Nach Hanahan und Weinberg weisen ein Großteil der malignen Tumoren folgende sechs Grundeigenschaften auf: Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, Vermeidung des programmierten Zelltods (Apoptose), Aufrechterhaltung der Angiogenese sowie Gewebsinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000). Später benannten Hanahan und Weinberg (2011) noch zwei weitere Eigenschaften von Tumorzellen: Umprogrammierung des Energiestoffwechsels der Zelle und Umgehen der Immunabwehr. Sie postulierten, dass dem Erwerb dieser Tumoreigenschaften die Mechanismen von genomischer Instabilität und chronischer Entzündung sowie ein

durch den Tumor aus scheinbar normalen Zellen kreierte Mikromilieu zugrunde liegen (Hanahan und Weinberg 2011).

Bezüglich der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms ist bekannt, dass die meisten kolorektalen Karzinome innerhalb von vielen Jahren auf dem Boden eines Adenoms entstehen. Die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz ist erstmalig von Day und Morson beschrieben worden (Day und Morson 1978) und stellt ein genetisches Progressionsmodell dar. Im Verlauf konnten den morphologischen Veränderungen genetische Alterationen zugeordnet werden, deren Abfolge und Vollständigkeit jedoch gewissen Variationen unterliegen (Emons et al. 2015; Fearon 2011; Fearon und Vogelstein 1990). In Abbildung 1 ist die Adenom-Karzinom-Sequenz schematisch und vereinfacht dargestellt.

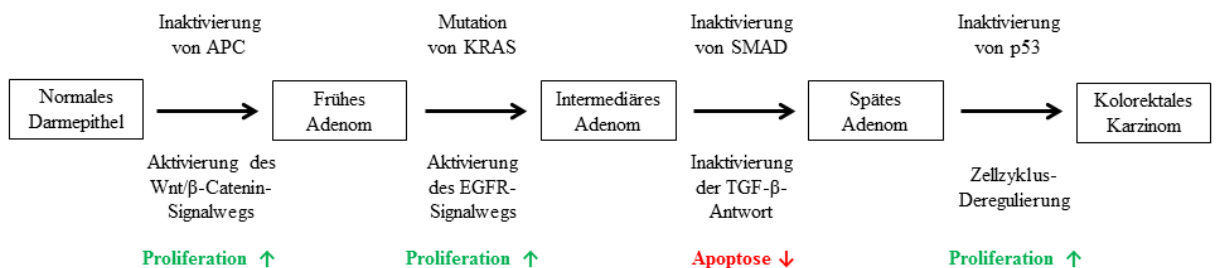


Abbildung 1: Schematische und vereinfachte Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz. Abkürzungen siehe Text. Modifiziert nach Fearon (2011).

Zu Beginn der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es zur Inaktivierung des *Adenomatous-polyposis-coli*(APC)-Tumorsuppressor-Gens, woraus eine Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und damit eine Hyperproliferation der Zelle folgt (siehe auch Kapitel 1.7 *Der Wnt/β-Catenin-Signalweg*). Im Verlauf folgen dann weitere Mutationen in beispielsweise dem *Kirsten-rat-sarcoma*(KRAS)-Gen, in den für die *S-mothers-against-decapentaplegic*(SMAD)-Familie kodierenden Genen und im Tumorsuppressor-Gen p53. Hieraus resultiert eine Steigerung der Proliferationsrate beziehungsweise eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptosesignalen, was einen Wachstumsvorteil für die Tumorzellen bedeutet (Emons et al. 2015; Fearon 2011).

1.3 Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Kolorektale Karzinome werden anhand der TNM-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* (UICC) eingeteilt. Hierbei steht das „T“ für die

Tumorinfiltrationstiefe, das „N“ für den Nodalstatus und das „M“ für Fernmetastasen. Hieraus ergibt sich eine Stadieneinteilung, die als Grundlage für die Therapieempfehlung und Prognoseabschätzung dient (s. Tabelle 1 und Tabelle 2).

Laut UICC handelt es sich um ein Rektumkarzinom, sofern der Abstand zwischen dem aboralen Rand des Karzinoms und der Anokutanlinie bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger beträgt. Proximal davon bis einschließlich im Bereich der Ileozökalklappe gelegene Karzinome werden als Kolonkarzinome definiert (Wittekind und Meyer 2010). Als lokal fortgeschritten wird ein Rektumkarzinom bezeichnet, wenn das Stadium der Tumorinfiltrationstiefe mindestens T3 beträgt oder der Nodalstatus positiv ist, jedoch keine Fernmetastasen vorliegen (Sauer et al. 2004). Dies entspricht einem UICC Tumorstadium II oder III.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.

T	Tis	Carcinoma in situ: Intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
	T1	Infiltration der Submukosa
	T2	Infiltration der Muscularis propria
	T3	Infiltration der Subserosa, nicht peritonealisiertes perikolisches/ perirektales Gewebe
	T4a	Infiltration des viszeralen Peritoneums
	T4b	Infiltration anderer Organe oder Strukturen
N	N0	Keine regionären LK
	N1	1-3 regionäre LK
	N2a	4-6 regionäre LK
	N2b	≥ 7 regionäre LK
M	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

LK: Lymphknotenmetastasen. Modifiziert nach (Wittekind 2017).

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
IV	Alle T	Alle N	M1

Modifiziert nach (Wittekind 2017).

1.4 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms ist komplex und nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Daher soll in diesem Kapitel lediglich ein vereinfachter Überblick entsprechend der Empfehlungen der *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom* gegeben werden.

Allgemein formuliert richtet sich die Therapieempfehlung beim kolorektalen Karzinom maßgeblich nach dem UICC-Stadium sowie der genauen Lokalisation des Tumors. Im klinischen Alltag sollte die optimale Behandlungsstrategie individuell für jeden Patienten im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz festgelegt werden.

Beim Kolonkarzinom wird, sofern ein kurativer Therapieansatz vorliegt, ein operatives Vorgehen angestrebt. Anschließend kann gegebenenfalls je nach UICC-Stadium und Risikoprofil eine Chemotherapie erfolgen (Leitlinienprogramm 2017).

Beim Rektumkarzinom ist für die chirurgische Therapie die Höhenlokalisierung des Tumors entscheidend. Bei im unteren und mittleren Drittel des Rektums gelegenen Tumoren wird eine tiefe anteriore Rektumresektion mit totaler mesorektaler Exzision

(TME) empfohlen, bei Infiltration des Analkanals oder der Sphinkteren erfolgt eine Rektumexstirpation. Liegt der Tumor im oberen Drittel des Rektums kann statt der tiefen anterioren Rektumresektion mit TME auch eine anteriore Rektumresektion mit partieller mesorektaler Exzision (PME) erwogen werden. Laut Leitlinie ist im UICC Stadium I die alleinige operative Therapie ausreichend. Bei lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen (UICC Stadium II und III) soll eine neoadjuvante Radiochemotherapie (Einzeldosis 1,8 Gy; Gesamtdosis 50,4 Gy) mit einem zeitlichen Intervall von sechs bis acht Wochen bis zur Operation erfolgen. Die neoadjuvante Radiochemotherapie sollte entweder 5-FU oder Capecitabin beinhalten. Sofern keine neoadjuvante Radiochemotherapie erfolgen konnte, ist ab UICC Stadium II eine adjuvante Radiochemotherapie indiziert (Leitlinienprogramm 2017). Im Leitlinienprogramm 2014 wurde bei erfolgter neoadjuvanter Radiochemotherapie zusätzlich eine postoperative adjuvante Chemotherapie empfohlen (Leitlinienprogramm 2014). Im aktuellen Leitlinienprogramm 2017 wird aufgrund der Datenlage jedoch weder eine Empfehlung für noch gegen eine adjuvante Chemotherapie nach erfolgter neoadjuvanter Radiochemotherapie ausgesprochen (Leitlinienprogramm 2017). Den Therapieempfehlungen bei lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen liegen maßgeblich die Ergebnisse der CAO/ARO/AIO-94 Studie der Deutschen Rektumkarzinom-Studiengruppe zugrunde (Sauer et al. 2004). In dieser randomisierten Studie wurde die präoperative mit der postoperativen Radiochemotherapie bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom verglichen. Sauer et al. (2004 und 2012) konnten zeigen, dass es bei Durchführung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie im Vergleich zu einer adjuvanten Therapie zu einer signifikanten Senkung der Lokalrezidivrate sowie der Toxizität kam. Außerdem konnte bei tiefsitzenden Rektumkarzinomen die Rate an sphinktererhaltenden Operationen gesteigert werden. Im Hinblick auf das Gesamtüberleben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Sauer et al. 2004; Sauer et al. 2012).

Bei einem bereits fernmetastasierten kolorektalen Karzinom (UICC Stadium IV) wird das therapeutische Vorgehen maßgeblich vom Allgemeinzustand des Patienten, von der Krankheitsausdehnung sowie von der Molekularbiologie des Tumors bestimmt. Es gibt durchaus Konstellationen, bei denen ein kuratives Therapiekonzept verfolgt werden kann, hierbei kommen unter anderem chirurgische Interventionen und eine intensive Chemotherapie zum Einsatz. In der Palliativsituation steht die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten im Vordergrund (Leitlinienprogramm 2017).

1.5 Mechanismen der Radiochemotherapiesensibilität

Das Ansprechen auf eine Radio(chemo)therapie ist beim Rektumkarzinom und auch bei anderen Tumorentitäten individuell sehr unterschiedlich. Daher sollen im Folgenden die bisher bekannten allgemeinen Mechanismen der Radiochemotherapiesensibilität kurz erläutert werden.

Bei soliden Tumoren wird der lokale Tumorzellschaden vorrangig durch die Strahlentherapie hervorgerufen. Die ionisierende Strahlung verursacht DNA-Schäden und führt damit zum Absterben der Zellen. Die Chemotherapie hingegen spielt lokal eine untergeordnete Rolle, sie dient jedoch als Sensibilisator für die Strahlentherapie (Grade et al. 2012).

Grade et al. (2012) führen folgende mögliche Begründungen für das insgesamt sehr heterogene Ansprechen auf eine Radio(chemo)therapie an: Die Strahlensensibilität hängt maßgeblich vom Stadium des Zellzyklus ab, in dem sich die Tumorzelle zum Zeitpunkt der Bestrahlung befindet. In den proliferativen Phasen sind Zellen deutlich sensibler als in degenerativen oder Ruhephasen, sodass Tumoren mit einer hohen Zellteilungsrate strahlensensibler sind als Tumoren mit wenig proliferierenden Zellen. Ferner sprechen Tumoren mit einem hohen Anteil von hypoxischen Tumorzellen schlechter auf eine Strahlentherapie an, da hier die Entstehung von DNA-schädigenden, chemischen Radikalen herabgesetzt ist. Außerdem trägt eine ausgeprägte Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden zur Vermittlung der Radio(chemo)therapieresistenz bei. Nicht zuletzt scheint jeder Patient eine individuelle, genetisch determinierte Radiochemotherapiesensibilität aufzuweisen (Grade et al. 2012).

1.6 Klinische Problematik und Vorarbeiten

Wie oben beschrieben, werden lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome leitliniengemäß mit neoadjuvanter Radiochemotherapie und anschließender Operation behandelt. Allerdings ist das Ansprechen auf diese Therapie sehr heterogen und reicht von kompletter Remission (*Responder*) bis hin zu vollständiger Resistenz (*Nonresponder*). Hieraus ergibt sich ein großes klinisches sowie sozioökonomisches Problem: Patienten mit *a priori* resistenten Tumoren werden einer kostenintensiven Therapie zugeführt und den Nebenwirkungen einer Bestrahlung und Chemotherapie ausgesetzt, ohne einen

Nutzen davon zu haben (Grade et al. 2012). Um möglichst allen Patienten eine für sie optimale Behandlung anbieten zu können, erscheint es sinnvoll, die Therapie zu individualisieren. Hierfür wäre es jedoch wichtig, vor Beginn der Therapie das Ansprechen auf die Therapie abschätzen zu können. Dabei spielt die Identifikation von prädiktiven Biomarkern eine entscheidende Rolle. Außerdem könnten mit Hilfe dieser Biomarker neue therapeutische molekulare Zielstrukturen erschlossen werden und so dazu beitragen, die Therapie des Rektumkarzinoms weiter zu optimieren (Grade et al. 2012; Liersch et al. 2010).

Um mögliche prädiktive Biomarker zu identifizieren, führte unsere Arbeitsgruppe zunächst Genexpressionsanalysen an Gewebeproben von lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen durch, die im Rahmen der prätherapeutischen Diagnostik gewonnen wurden. Nach erfolgter neoadjuvanter Radiochemotherapie und anschließender Operation wurde das Therapieansprechen histopathologisch beurteilt und die Patienten in zwei Gruppen (*Responder* und *Nonresponder*) eingeteilt. Der Vergleich der Genexpressionsprofile von *Respondern* und *Nonrespondern* ergab zwischen den beiden Gruppen ein signifikant unterschiedliches Expressionslevel für 54 Gene (Ghadimi et al. 2005). Bei einem der in den resistenten Tumoren hochregulierten Gene handelte es sich um den Transkriptionsfaktor TCF7L2, der im Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Schlüsselrolle spielt (s. Kapitel 1.7 *Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg*).

Anschließend erstellte unsere Arbeitsgruppe ein *in-vitro*-Modell mit zwölf humanen kolorektalen Tumorzelllinien. In Anlehnung an das klinische Therapieregime beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom wurden die Zelllinien mit 3 μ M 5-FU behandelt und mit einer Strahlendosis von 2 Gy bestrahlt. Nun wurde die Überlebensfraktion ermittelt (s. Anhangsabbildung 1) und die Ergebnisse mit dem initial erstellten Genexpressionsprofil korreliert. Die Auswertung deutete darauf hin, dass die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Bezug auf die Vermittlung der Radiochemotherapieresistenz eine zentrale Rolle spielen könnte (Spitzner et al. 2010). Daraufhin gelang es unserer Arbeitsgruppe zu zeigen, dass durch eine Herunterregulation des in den resistenten kolorektalen Tumorzelllinien SW480 und SW837 überexprimierten Transkriptionsfaktors TCF7L2, auch bekannt als TCF4, eine Radiotherapiesensitivierung der Zellen erfolgte (Kendziorra et al. 2011).

1.7 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt eine herausragende Rolle in der Embryonalentwicklung und ist auch für die Kontrolle der Homöostase von vielen Geweben im erwachsenen Organismus von wichtiger Bedeutung (Clevers 2006). Aberrante Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs trägt entscheidend zur Entstehung und zum Fortschreiten verschiedener Malignome, wie zum Beispiel dem kolorektalen Karzinom oder dem Mammakarzinom bei (Anastas und Moon 2013).

Zur Klärung der Entstehung des Begriffs „Wnt“ soll kurz auf die Anfänge der Erforschung des Wnt-Signalweges eingegangen werden. Das *wingless* Gen wurde erstmalig in der Spezies *Drosophila melanogaster* entdeckt (Sharma 1973) und spielt hier eine entscheidende Rolle bei der Segmentpolarisation der Larve (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). 1982 beschrieben Nusse und Varmus das Onkogen *Int-1*, an dessen Genlokus die DNA des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) vorrangig integriert wird, wodurch Mammakarzinome der Maus induziert werden (Nusse und Varmus 1982). Später konnte Rijsewijk zeigen, dass das Onkogen *Int-1* homolog zum *wingless* Gen ist (Rijsewijk et al. 1987). Aus den Begriffen *wingless* und *Int-1* wurde schließlich die Bezeichnung Wnt (*wingless type MMTV integration site*) geformt.

Die Familie der *Wnt* Gene kodiert für Glykoproteine, die als extrazelluläre Signalmoleküle fungieren und unter anderem den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren können (Clevers 2006; Nusse 2005), indem sie an den transmembranen heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus *Frizzled* (Fz) und *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP5/6), binden (Clevers und Nusse 2012). Wie in Abbildung 2a dargestellt, wird in Abwesenheit eines Wnt-Liganden cytoplasmatisches β -Catenin durch den β -Catenin Destruktionskomplex phosphoryliert, daraufhin durch das β -*Transducin-repeat-containing protein* (β -TrCP) ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Anschließend wird der β -Catenin Destruktionskomplex wieder frei und kann erneut cytoplasmatisches β -Catenin binden (Aberle et al. 1997; Li et al. 2012). Der β -Catenin Destruktionskomplex ist ein Multiproteinkomplex und besteht u. a. aus Axin, *adenomatous polyposis coli* (APC) sowie den Serin/Threonin-Kinasen Glykogen-Synthase-Kinase 3 α/β (GSK3) und Casein-Kinase 1 (CK1) (Clevers und Nusse 2012). Außerdem wird im Zellkern das Ablesen von Wnt-Effektorgenen unterdrückt, indem das Repressorprotein *Groucho* zusammen mit Transkriptionsfaktoren der *T cell-specific*

transcription factor (TCF)/*Lymphoid enhancer-binding factor* (LEF) Familie einen Repressorkomplex bildet (Anastas und Moon 2013; Cavallo et al. 1998).

Bindet hingegen, wie in Abbildung 2b dargestellt, ein Wnt-Ligand wie Wnt1 oder Wnt3a an den *Frizzled*/LRP-Rezeptorkomplex, wird das Protein *Dishevelled* (Dvl) aktiviert (Anastas und Moon 2013) und die intrazelluläre Domäne von LRP5/6 durch die Kinasen GSK3 und CK1 phosphoryliert, woran wiederum Axin aus dem β -Catenin-Destruktionskomplex bindet (He et al. 2004; Mao et al. 2001). Diese Vorgänge führen zu einer Inhibierung der Ubiquitinierung von β -Catenin durch β -TrCP, wodurch phosphoryliertes β -Catenin nicht mehr proteasomal abgebaut werden kann. Hieraus resultiert eine Sättigung des β -Catenin Destruktionskomplexes mit β -Catenin, in Folge dessen aktives (unphosphoryliertes) β -Catenin im Cytoplasma akkumuliert und in den Zellkern gelangt (Li et al. 2012). Im Zellkern kommt es zu einer Interaktion zwischen β -Catenin und Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie, was zum Ablesen von diversen Wnt-Effektorgen führt (Behrens et al. 1996; Molenaar et al. 1996).

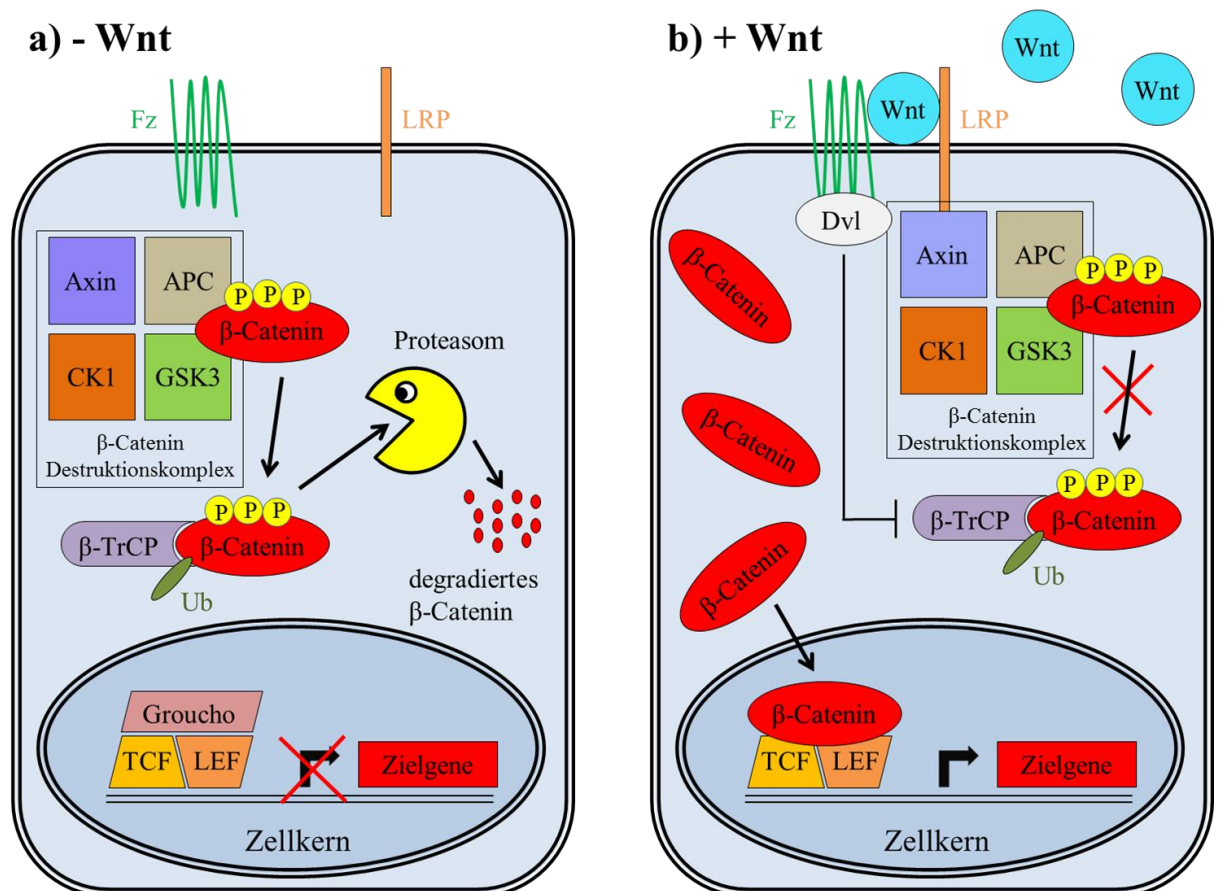


Abbildung 2: Schematische und vereinfachte Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bei a) Abwesenheit eines Wnt-Liganden und b) Bindung eines Wnt-Liganden. P = Phosphatrest, Ub = Ubiquitin. Für Details und weitere Abkürzungen siehe Text. Modifiziert nach Fearon (2011).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg kommt bei der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms eine Schlüsselrolle zu (Markowitz und Bertagnolli 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmalig einen möglichen Zusammenhang zwischen der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und der Radio(chemo)therapieresistenz kolorektaler Karzinome herstellen. Eine zentrale Komponente im Wnt/ β -Catenin-Signalweg stellt der Transkriptionsfaktor TCF7L2 dar (s. Kapitel 1.7 *Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg*). Wie oben beschrieben, haben bisherige Forschungsergebnisse gezeigt, dass eine Herunterregulation von TCF7L2 in *a priori* resistenten kolorektalen Tumorzelllinien eine Radiotherapieresistenz vermitteln kann (Kendziorra et al. 2011). Bisher ist jedoch unklar, ob dieser Effekt auf eine TCF7L2-spezifische Funktion zurückzuführen ist oder der gesamte Wnt/ β -Catenin-Signalweg für die Resistenzvermittlung verantwortlich ist.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob es sich bei der Vermittlung der Radio(chemo)therapieresistenz um eine TCF7L2-inhärente Funktion handelt oder diese durch die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im Allgemeinen vermittelt wird. Ferner sollte geprüft werden, ob es sich um einen auf Tumorzelllinien beschränkten Mechanismus handelt oder aber auch nicht-maligne Zellen durch eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs resistenter werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav, HST 32/25	Zirbus technology GmbH, Bad Grund/ Harz, Deutschland
Bestrahlungsgerät Xstrahl RS225 X-Ray irradiator	Gulmay Medical ltd, Camberley (Surray), United Kingdom
CCD Kamera ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden
Elektroblotter, semi-dry	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Freezing Container, 5100 Cryo 1°C, "Mr. Frosty"	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gelelektrophorese-Kammer für Agarose Gele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer Minigel-Twin	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasplatte, ausgeschnitten, mit geradem Schliff, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasplatte, fixe Spacer, 1,0mm, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubator CO ₂ Incubator C200	Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubator Heraeus Function line	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Inkubator Water-Jacketed Incubator 3250	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
Kämme (10- und 16-zähnig), für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Membranpumpe Miniport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Mikroplattenleser Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop Leica S6 E	Leica, Wetzlar, Deutschland

Material und Methoden

Mikroskop, invers, Leica DM IL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera, High-speed Leica EC3	Leica, Wetzlar, Deutschland
MiniTrans Illuminator, UV imager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Netzgerät PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
pH-Meter PB-11	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Pipette, elektrisch (25-300µL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette, elektrisch, 8-Kanal Research pro 50-1200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette, Multipette [®] Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten „Eppendorf Reference“ (variabel) (0,1-2,5; 0,5-10; 2-20; 10-100; 50-200 und 100-1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet [®]	Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040, Heidolph	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Präzisionswaage BP 610	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage ED224S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttler MS 3 digital	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Silikonabdichtung, 1,0 mm, für Minigel SNAP i.d. [™]	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Spectrophotometer NanoDrop [®] ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Sterilbank SterilGARD Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator SONOPULS HD 3100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Victor [™] X4 Multilabel Plate Reader	PerkinElmer, Waltham, MA, USA

Vortexer IKA [®] MS1 Shaker	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Vortexer Lab dancer	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Vortexer Vortex Genie 2 G-560 E	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wasserbad GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400 R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge, Mini, Rotilabo [®]	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmal-Reagenzreservoir	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier Chromatography Paper 3MM Chr.	Whatman [™] GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, United Kingdom
Flüssigkeitsreservoirs Rotilabo [®] PVC	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kryo-Röhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Neubauer Zählkammer improved 0,0025mm ²	Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten Glas (150 und 230 mm)	Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10 ml), für Multipette [®] Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Safe Seal-Tips [®] professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen Tip One [®] (10, 200 und 1000 µl), steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Pipettenspitzen Tip One [®] (10, 200, 300 und 1000 µl)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäß Biosphere [®] Safe Seal (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Spritzen, Original-Perfusor [®] (50 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Transfermembran, Immobilon [®] -P Membran, PVDF, Filterporengröße 0,45 µm	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Transferpipette (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Vakuumfiltersystem „rapid“, PES Membrane 0,22 µm, 250 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen Cyto One [®] mit Filterkappe (25, 75 und 225 cm ²)	STARLAB GmbH, Hamburg Deutschland
Zellkulturflaschen Cyto One [®] mit Schnellverschluss (25, 75 und 225 cm ²)	STARLAB GmbH, Hamburg Deutschland
Zellkulturplatten, 12 Well, Cellstar [®] , steril	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Zellkulturplatten, 24 Well, Cyto One [®] , steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatten, 6 Well, Cyto One [®] , steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatten, 96 Well Cyto One [®] , steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatten, 96 Well, weiß, für <i>Dual-Luciferase[®] Reporter Assay</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

Zellspachtel TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Chemikalien

1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol (Isopropanol)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose, UltraPure™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNA Ladder Quick Load® 1kb	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Essigsäure 100% Ph. Eur.,reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, ROTIPURAN® ≥99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5M, pH=8,0	QualityBiological Inc., Gaithersburg, MD, USA
GelRed™, 10.000x	Biotium, Köln, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hämalaun, Mayers	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Laufpuffer NuPAGE® MES SDS Runningbuffer (20x)	Invitrogen™ by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Loading Dye (6x) für Agarose Gele	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

Material und Methoden

Marker, Magic Mark™ XP Western Standard	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Marker, Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Methanol, ROTIPURAN®, ≥99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Deoxycholat ≥97% (titration)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃), reinst	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl), ≥99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10% für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonidet® P40 (NP40) (Ersatzprodukt)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tabletten; PhosSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protease-Inhibitor Cocktail; Protease Block™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Roti®-Quant 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel30 Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl) 5M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Zellkulturreagenzien

0,25% Trypsin -EDTA (1x)	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Antibiotikum, G 418-BC (Genetizin), flüssig (gebrauchsfertig), steril	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bad Stabil Konzentrat	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamine 200 mM in 0,85% NaCl Solution	Boehringer/Ingelheim Bioproducts Partnership, Veviers, Belgien
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃ -Lösung (7,5%)	Biochrom AG, Berlin; Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Trypan Blue solution 0,4%	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Zellkulturmedium, Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Zellkulturmedium, (1:1) Dulbecco´s Modified Eagle Medium : F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12)	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Zellkulturmedium, F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Zellkulturmedium, Leibovitz´s L-15 Medium	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Zellkulturmedium, McCoy´s 5A Medium	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Zellkulturmedium, Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom
Zellkulturmedium, RPMI-1640 Medium	Gibco [®] by life technologies [™] , Paisley, United Kingdom

2.1.5 Vektoren

Luc Positiv Control CCS-PCL, Vektor aus Signal Reporter Assay Kit, enthält MonsterGFP	Qiagen, Hilden, Deutschland
pCI-neo Mammalian Expression Vector, <i>empty vector</i>	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pCI-neo-b-cat S33Y, Vektor für mutiertes β -Catenin (S33Y)	Addgene, Cambridge, MA, USA
pRL-CMV Vector, Renilla Luciferase Control Reporter Plasmid	Promega Corporation, Madison, WI, USA
SuperFopFlash Reporter Plasmid	Addgene, Cambridge, MA, USA
SuperTopFlash Reporter Plasmid	Addgene, Cambridge, MA, USA

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Anti-Actin (A2066)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-Active- β -catenin (Anti-ABC), clone 8E7	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Anti-Axin 2 (76G6)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Anti-Histone Deacetylase 1 (HDAC1) (2062)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Anti-TCF7L2 antibody (EP2033Y) (ab76151)	Abcam plc., Cambridge, United Kingdom
Anti- β -Catenin (Carboxy-Terminal Antigen)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA

Sekundärantikörper

Polyclonal Antibody to Mouse IgG (H&L) - HRP, R1253HRP	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
Polyclonal Antibody to Rabbit IgG (H&L) - HRP, R1364HRP	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland

2.1.7 Kits

Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent GE Healthcare UK Limited,
Buckinghamshire, United Kingdom

Enthält:

- Solution A (luminol solution)
- Solution B (peroxide solution)

Dual-Luciferase® Reporter Assay System Promega Corporation, Madison, WI, USA

Enthält:

- Luciferase Assay Substrate
- Passive Lysis Buffer, 5X
- Luciferase Assay Buffer II
- Stop & Glo® Substrate
- Stop & Glo® Buffer

Pierce® BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Enthält:

- BCA Reagent A
- BCA Reagent B
- Albumin Standard Ampullen, 2mg/mL

2.1.8 Computer-Software

Adobe Reader X	Adobe, San Jose, CA, USA
EndNote X4	Thomson Reuters, New York, NY, USA
Grapher™ 8	Golden Software, Inc., Golden, CO, USA
KaleidaGraph Vers. 4.1.0	Synergy Software, Reading, PA, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

2.1.9 Puffer und Lösungen

Tris-buffered saline Puffer (TBS)

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 1000 ml</u>
Tris ultrapure	50 mM	6,057 g
NaCl	150 mM	8,766 g

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 7,5 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 1000 ml erreicht ist.

Tris-buffered saline + 0,1% Tween[®] 20 Puffer (TBS-T)

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 1000 ml</u>
TBS		999 ml
Tween [®] 20	0,1%	1 ml

Nonidet[®] P40 Zellysepuffer (NP40)

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 100 ml</u>
1 M Tris ultrapure	50 mM	5 ml
5 M NaCl	150 mM	3 ml
Nonidet [®] P40 (NP40)	1%	1 ml

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 7,8 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 100 ml erreicht ist.

Folgende Komponenten werden direkt vor Gebrauch zum NP40 Puffer hinzugegeben:

Protease-Inhibitor; Protease Block[™] im Verhältnis 1:100

Phosphatase-Inhibitor; PhosSTOP im Verhältnis 1:10

1 M DTT im Verhältnis 1:10

Radioimmunoprecipitation assay Zellysepuffer (RIPA)

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 100 ml</u>
Tris ultrapure	50 mM	606 mg
NaCl	150 mM	877 mg
Natrium Deoxycholat	0,5%	500 mg
Nonidet® P40	1%	1 ml
0,5 M EDTA, pH = 8,0	2 mM	400 µl

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 8,0 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 100 ml erreicht ist.

Folgende Komponenten werden direkt vor Gebrauch zum RIPA Puffer hinzugegeben:

Protease-Inhibitor; Protease Block™ Verhältnis 1:100

Phosphatase-Inhibitor; PhosSTOP im Verhältnis 1:10

Zellysepuffer A (für Auftrennung der Proteine in die Cytosol- und Kernfraktion)

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 100 ml</u>
HEPES	100 mM	2,38 g
MgCl ₂	1,5 mM	30,5 mg
KCl	10 mM	74,5 mg

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 7,9 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 100 ml erreicht ist.

Folgende Komponenten werden direkt vor Gebrauch zum Zellysepuffer A hinzugegeben:

Protease-Inhibitor; Protease Block™ Verhältnis 1:100

Phosphatase-Inhibitor; PhosSTOP im Verhältnis 1:10

Zellysepuffer B (für Auftrennung der Proteine in die Cytosol- und Kernfraktion)

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 100 ml</u>
HEPES	20 mM	476 mg
MgCl ₂	15 mM	305 mg
NaCl	420 mM	2,45 g
EDTA	0,2 mM	7,44 mg
Glycerol	25%	25 ml
Nonidet [®] P40	1%	1 ml
Natrium Deoxycholat	0,5%	500 mg

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 7,9 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 100 ml erreicht ist.

Folgende Komponenten werden direkt vor Gebrauch zum Zellysepuffer B hinzugegeben:

Protease-Inhibitor; Protease Block[™] Verhältnis 1:100

Phosphatase-Inhibitor; PhosSTOP im Verhältnis 1:10

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 250 ml</u>
Tris ultrapure	1 M	30,29 g

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 6,8 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 250 ml erreicht ist.

SDS-PAGE Trenngelpuffer

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 250 ml</u>
Tris ultrapure	1,5 M	45,43 g

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 8,8 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 250 ml erreicht ist.

SDS-PAGE Ladepuffer (4x)

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 10ml</u>
0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8	250 mM	5 ml
Glycerin	40%	4 ml
β-Mercaptoethanol	8%	0,8 ml
Bromphenol Blau	0,4%	0,04 g
SDS	8%	0,8 g
ddH ₂ O		0,2 ml

In 1 ml Aliquots bei -20 °C einfrieren.

Western Blot Transferpuffer

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 1000 ml</u>
Tris ultrapure	48 mM	5,8 g
Glyzin	39 mM	2,9 g
SDS-Lösung, 10%	0,037%	3,7 ml
Methanol	20%	200 ml

ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 1000 ml erreicht ist.

Blockierpuffer für Western Blot Membranen

Konventionell

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 100 ml</u>
TBS-T		100 ml
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	5%	5 g

SNAP i.d.

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 100 ml</u>
TBS-T		100 ml
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	0,1%	0,1 g

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Vorbemerkung

Die Arbeit in der Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden entweder vor Gebrauch autoklaviert oder waren nach Herstellerangaben steril verpackt.

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und ggf. 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Für Zelllinien, die mit CO₂ kultiviert werden mussten, wurden Zellkulturflaschen mit Filterkappe verwendet.

Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden mit 1% L-Glutamin 200mM in 0,85% NaCl-Lösung und 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FBS) supplementiert. Weitere Zusätze zu bestimmten Zellkulturmedien werden gesondert beschrieben.

Eine Übersicht über verwendete Volumina von Zellkulturmedium, PBS und 0,25% Trypsin-EDTA in Bezug auf die Zellkulturflaschen und -platten unterschiedlicher Größe bietet Tabelle 3.

Tabelle 3: Volumina von Zellkulturmedium, PBS und 0,25% Trypsin-EDTA in Bezug auf die Größe des verwendeten Zellkulturgefäßes.

Zellkulturgefäß	Medium (in ml)	PBS (in ml)	Trypsin (in ml)
96-Well-Platte	0,1	0,1	0,035
12-Well-Platte	1	1	0,25
6-Well-Platte	3	3	0,5
T25-Zellkulturflasche	5	5	0,5
T75-Zellkulturflasche	10	10	1
T225-Zellkulturflasche	30	30	3

Wenn im Folgenden nicht anders beschrieben, wurden vor Gebrauch die Zellkulturmedien und das PBS auf 37°C, das 0,25% Trypsin-EDTA auf Raumtemperatur erwärmt.

2.2.1.2 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden hTERT-immortalisierte retinale Pigmentepithelzellen (RPE-1) (Bodnar et al. 1998) sowie die Zelllinien L Cells und L Wnt-3A (Willert et al. 2003)

verwendet, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Holger Bastians (Institut für Molekulare Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt wurden. Sämtliche Zelllinien wuchsen adhärent. RPE-1-Zellen wurden entsprechend der Empfehlungen der ATCC im Zellkulturmedium DMEM/F-12 kultiviert. Für die Zelllinien L Cells und L Wnt-3A wurde ebenfalls DMEM/F-12 Medium verwendet, da in späteren Experimenten RPE-1-Zellen mit Medienüberständen dieser Zelllinien behandelt werden sollten (s. Kapitel 2.2.2 *Konditionieren von Wnt3a-haltigem Medium*). Weitere Details zu den Wachstumsbedingungen und die ATCC-Katalognummer der einzelnen Zelllinien können Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien, ihre Wachstumsbedürfnisse und ATCC-Katalog-Nummer.

Zelllinie	♂/♀	Zellkulturmedium	CO₂	ATCC Nr.
RPE-1	♀	DMEM/F-12 (1:1) + 0,35% NaHCO ₃	5% CO ₂	CRL-4000
L Cells	♂	DMEM/F-12 (1:1)	5% CO ₂	CRL-2648
L Wnt-3A	♂	DMEM/F-12 (1:1) + 0,4 mg/ml Geneticin	5% CO ₂	CRC-2647

2.2.1.3 Kultivierung von kryokonservierten Zellen

Die Zellen wurden bei -150°C in Kryo-Röhrchen gelagert. Nach circa zweiminütigem Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Transferpipette in ein 15 ml Röhrchen mit 10 ml Zellkulturmedium überführt. Das Röhrchen wurde kurz invertiert und anschließend 5 min bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in eine T25 Zellkulturflasche überführt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst drei Mal passagiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.2.1.4 Wechsel des Zellkulturmediums

Das Zellkulturmedium muss in regelmäßigen Abständen gewechselt werden. Wird es zu häufig gewechselt, werden von den Zellen in das Zellkulturmedium abgegebene Wachstumsstoffe zu schnell entfernt. Wird es zu selten gewechselt, nimmt die Konzentration der Nährstoffe im Zellkulturmedium ab und die Konzentration der zum Teil giftigen Stoffwechselprodukte der Zellen zu (Gstraunthaler und Lindl 2013). Das Zellkulturmedium wurde mehrmals wöchentlich gewechselt, indem das alte

Zellkulturmedium abgesaugt und anschließend frisches Zellkulturmedium hinzugegeben wurde. Verwendete Volumina können Tabelle 3 entnommen werden.

2.2.1.5 Passagieren der Zellen

Mit zunehmender Konfluenz der Zellen im Kulturgefäß verlangsamt sich deren Wachstum durch steigende Konkurrenz um Nährstoffe im Zellkulturmedium und direkte Kontaktinhibition durch benachbarte Zellen. Deswegen mussten die adhärenenten Zellen, wenn sie eine Konfluenz von >70% erreicht hatten, mittels Trypsin abgelöst und gesplittet werden. Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit PBS gespült, um Reste des Zellkulturmediums und divalente Kationen zu entfernen (Gstraunthaler und Lindl 2013). Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin–EDTA für 5-8 min bei 37°C inkubiert. Die nun vom Boden des Kulturgefäßes abgelösten Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen. Durch das im Zellkulturmedium enthaltene FBS wurde das Trypsin inhibiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 oder 50 ml Röhrchen überführt und bei 800 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit Zellkulturmedium resuspendiert und nur ein Teil der Zellsuspension wieder in das Kulturgefäß zurückgegeben. Die restlichen Zellen konnten in ein weiteres Kulturgefäß gegeben, für ein Experiment verwendet oder verworfen werden.

2.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden wie oben beschrieben vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 900 µl Trypan Blue Lösung (0,4%), die vorher im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt wurde, gemischt. 10 µl dieser Lösung wurden auf jede der beiden Seiten zwischen Zählkammer und Deckgläschen pipettiert. In acht Volumina von je 0,1 mm³ wurden die Zellen gezählt und hieraus das arithmetische Mittel gebildet. Die Multiplikation dieses Mittelwertes mit dem Faktor 10⁵ ergibt die Konzentration der Zellen pro ml Zellsuspension.

2.2.1.7 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung kommen nur Zellen in Frage, die sich in einer niedrigen Passage und in der Logphase des Wachstums befinden.

Zunächst wurde ein spezielles Einfriermedium hergestellt. Grundlage dieses Mediums bot das Zellkulturmedium für die jeweilige Zelllinie. Die Zusammensetzung lässt sich Tabelle 5 entnehmen.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Einfriermediums.

Reagenzien	Endkonzentration	Für 50 ml
Zellkulturmedium		40 ml
FBS	20%	5 ml
DMSO	10%	5 ml

Wie oben beschrieben, wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst, in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zügig auf bereitstehende Kryo-Röhrchen aufgeteilt. Diese wurden für 24 Stunden bei -80°C im Freezing Container, der ein langsames und regelmäßiges Abkühlen der Zellsuspension von $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ermöglicht, und anschließend dauerhaft bei -150°C gelagert.

2.2.2 Konditionieren von Wnt3a-haltigem Medium

Das Konditionieren von Zellkulturmedium dient dazu, Medienüberstand zu erzeugen, in dem das lösliche Signalmolekül Wnt3a enthalten ist. Diese Methode wurde bisher in unserem Labor nicht verwendet und wurde von mir in Anlehnung an das von der ATCC empfohlene Protokoll etabliert (ATCC 2007). Zum Erzeugen von Wnt3a-haltigem Medium wurde die murine Zelllinie L Wnt-3A verwendet. Hierbei handelt es sich um L Cells, die mit einem Wnt-3A Expressionsvektor transfiziert wurden und aufgrund dessen das biologisch aktive Protein Wnt3a sezernieren. Der Vektor enthält ebenfalls ein Resistenzgen gegen Geneticin, sodass zur Selektion vektortragender L Cells mit $0,4\text{ mg/ml}$ Geneticin versetztes DMEM/F-12 Medium verwendet wurde (ATCC 2007). Als Kontrolle zum Medienüberstand der L Wnt-3A-Zellen diente Medienüberstand, der von Zellen der Wildtypvariante der L Cells gewonnen wurde. Die Wildtypvariante der L Cells wurden in DMEM/F12 Medium kultiviert (siehe auch Tabelle 4). Im Folgenden wird von den L Wnt-3A-Zellen gewonnener Medienüberstand als (+) Wnt3a Medium und von den L Cells gewonnener Überstand als (-) Wnt3a Medium bezeichnet.

Zum Konditionieren des (+) und (-) Wnt3a Mediums wurden die Zellen aus einer nahezu konfluent bewachsenen T75- in eine T225-Zellkulturflasche im Verhältnis 1:10 gesplittet. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und in jede T225-Zellkulturflasche 50 ml frisches, zu konditionierendes DMEM/F-12 Medium gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurde auch für die Zellen der Linie L Wnt-3A DMEM/F-12 Medium ohne Geneticin verwendet, da später mit (+) Wnt3a Medium behandelte Zellen keine Resistenz gegen Geneticin aufwiesen. Sobald die Zellen nach ca. 3 Tagen eine Konfluenz von nahezu 100% erreicht hatten, wurde das Medium in 50 ml Röhrchen überführt und bei 2000 U/min für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der als Charge I bezeichnete Medienüberstand wurde bei 4°C aufbewahrt. Es wurde erneut in jede T225-Zellkulturflasche 50 ml DMEM/F-12 Medium gegeben und nach weiteren 3 Tagen Inkubation wurde analog zu Charge I die zweite Charge des konditionierten Mediums gewonnen. Die Zellen wurden nun verworfen. Das Medium der Charge I und II wurde im Verhältnis 1:1 gemischt, mittels eines Vakuumfiltrationssystems filtriert und bei 4°C gelagert. Auf diese Weise konnten pro T225-Zellkulturflasche 100 ml Medium konditioniert werden.

In späteren Experimenten wurden Zellen der Linie RPE-1 mit dem konditionierten Medium behandelt. Bevor das konditionierte Medium auf die Zellen gegeben wurde, ist es im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium gemischt worden. So wurden im konditionierten Medium verbrauchte Nährstoffe ersetzt und akkumulierte Stoffwechselprodukte verdünnt.

2.2.3 Western Blot

Der Western Blot, auch Immunoblot genannt, bezeichnet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, die anschließend im Rahmen der Immunfärbung mittels spezifisch bindender Antikörper detektiert und visualisiert werden können. Dem Western Blot vorgeschaltet sind die Methoden der Zellgewinnung, Zelllyse und Proteinextraktion, die Bestimmung der Proteinkonzentration und die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der das Proteingemisch in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt wird.

2.2.3.1 Zellgewinnung

Zur Zellgewinnung für spätere Proteinextraktion wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt: Die Zellen wurden entweder chemisch durch Trypsinierung oder mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst. Es wurde darauf geachtet, dass innerhalb eines Experimentes nur eine der beiden Methoden zum Einsatz kam.

Zur Zellgewinnung mittels Trypsinierung wurde zunächst vorgegangen wie in Kapitel 2.2.1.5 *Passagieren der Zellen* beschrieben. Allerdings wurde nach dem Zentrifugieren das Zellpellet anstatt in Zellkulturmedium in 1 ml 4°C kaltem PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des PBS konnte das Zellpellet optional für einige Tage bei -20°C gelagert werden, bevor die Zellen lysiert wurden.

Um die Zellen mechanisch vom Boden des Zellkulturgefäßes abzulösen, wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und so viel 4°C kaltes PBS auf die Zellen gegeben, dass der Boden des Zellkulturgefäßes gleichmäßig benetzt war. Dann wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in Suspension gebracht. Nun konnte wie oben beschrieben weiter verfahren werden.

2.2.3.2 Zellyse und Proteinextraktion

Um Protein aus Zellen isolieren zu können, müssen diese lysiert werden. Je nach Experiment kamen verschiedene Zellysepuffer zum Einsatz: RIPA-Puffer, NP40-Puffer oder als Puffer A und B bezeichnete Lysepuffer, sofern eine Auftrennung der Proteine in die Cytosol- und Kernfraktion erforderlich war. Zur genauen Zusammensetzung der Puffer siehe Kapitel 2.1.9 *Puffer und Lösungen*.

Sobald die Zellyse durch Resuspension des Zellpellets mit Zellysepuffer beginnt, setzen auch die Prozesse der Proteolyse, Dephosphorylierung und Denaturierung ein. Diese können erheblich verlangsamt werden, wenn die Proben während der gesamten Zeit auf Eis gelagert werden und Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren zeitnah vor Gebrauch des Zellysepuffers hinzugegeben werden. Außerdem wurde DTT zum NP40-Puffer hinzugegeben. DTT reduziert Disulfidbrücken im Protein, die zur Stabilisierung der Tertiärstruktur der Proteine beitragen (Cleland 1964). Die Konzentration dieser Zusätze kann ebenfalls dem Kapitel 2.1.9 *Puffer und Lösungen* entnommen werden.

Bei Verwendung des RIPA-Puffers wurde das resuspendierte Zellpellet zunächst für 20 min auf Eis gelagert. Dann erfolgte mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators eine

mechanische Zellyse durch ständiges Aneinanderstoßen der Zellen. Hieran schloss sich eine weitere Inkubation von 20 min auf Eis an. Nun wurde die Zellsuspension bei 4°C und 13.300 U/min für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Das auf diese Weise gewonnene Zellysat konnte nun optional bei -80°C gelagert werden.

Bei Verwendung des Zellysepuffers NP40 wurde das resuspendierte Zellpellet für eine Stunde auf Eis inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension bei 4°C und 10.000 U/min für 10 min zentrifugiert. Mit dem Überstand und Zellpellet wurde wie eben beschrieben verfahren.

Sollte eine Auftrennung der Proteine in die Cytosol- und Kernfraktion erfolgen, wurde das Zellpellet in eiskaltem Puffer A resuspendiert und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Nun wurde die Zellsuspension bei 2000 U/min für 1 min zentrifugiert. Der Überstand stellt die Cytosolfraktion dar und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in eiskaltem Puffer B resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 13.000 U/min für 2 min. Der Überstand entspricht der Kernfraktion und wurde ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

In Abhängigkeit des verwendeten Zellysepuffers kamen unterschiedliche photometrische Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration zum Einsatz. Wurden der RIPA-Puffer verwendet oder erfolgte eine Auftrennung der Proteine in die Cytosol- und Kernfraktion, wurde ein BCA (Bicinchoninsäure) Assay (Smith et al. 1985) durchgeführt. Bei Gebrauch des NP40-Puffers erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford 1976).

Beim BCA-Assay beruht die Messung der Proteinkonzentration auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch je ein Elektron aus der Peptidbindung von Proteinen. Die einwertigen Kupfer-Ionen bilden dann mit je zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen violetten Chelatkomplex. Somit verhält sich die Konzentration des Chelatkomplexes proportional zur Proteinkonzentration. Demzufolge kann mittels Bestimmung der Absorption des Chelatkomplexes auf die Proteinkonzentration geschlossen werden (Smith et al. 1985).

Es wurde das Kit „Pierce® BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. In eine 96-Well-Platte wurden Triplikate zu je 25 µl sowohl des

zehnfach verdünnten Zelllysates als auch einer BSA-Verdünnungsreihe (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/ml) pipettiert. Hierzu wurden jeweils 200 µl der alkalischen BCA-Lösung (BCA Reagent A: BCA Reagent B des Kits im Verhältnis 50:1) gegeben. Die 96-Well-Platte wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen konnte die Extinktion bei 544 nm gemessen werden. Mit Hilfe der Extinktionswerte der BSA-Verdünnungsreihe konnte die Proteinkonzentration der verwendeten Zelllysate berechnet werden.

Die Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 (CBBG) an Protein. Bindet CBBG an ein Protein, so wird der Farbstoff von seiner kationischen in seine anionische Form überführt und sein Absorptionsmaximum verschiebt sich von 365 auf 595 nm. Die Absorptionsänderung bei 595 nm ist über weite Bereiche proportional zur Proteinkonzentration und wird deswegen gemessen. Da SDS einen Störfaktor in diesem Assay darstellt, kann er nicht bei Verwendung von RIPA-Puffer angewandt werden (Bradford 1976).

Zunächst wurden 2 unterschiedliche Verdünnungen (1:100 und 1:200) des Zelllysates hergestellt. Dann wurden in eine 96-Well-Platte Triplikate zu je 50 µl sowohl der verdünnten Zelllysate als auch einer BSA-Verdünnungsreihe (0, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 µg/ml) pipettiert. Hierzu wurden jeweils 200 µl des CBBG-haltigen, verdünnten Roti[®]-Quants (2 Teile Roti[®]-Quant 5x Konzentrat und 5,5 Teile ddH₂O) gegeben. Nach 5 min konnte die Extinktion bei 595 nm gemessen werden. Mit Hilfe der Extinktionswerte der BSA-Verdünnungsreihe konnte wiederum die Proteinkonzentration der verwendeten Zelllysate berechnet werden.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die verschiedenen linearisierten Proteine eines Zelllysats durch Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander separiert werden. Aufgrund ihrer negativen Ladung (s.u.) wandern die Proteine von der Kathode zur Anode. Kleine Proteine wandern schneller durch das Gel als große. Proteine mit identischem Molekulargewicht wandern gleich schnell und lagern sich zu sogenannten Banden zusammen.

Für die SDS-PAGE müssen die Proteine zuvor denaturiert werden. Hierzu wurde das Zelllysate mit SDS-PAGE Ladepuffer (4x) (s. Kapitel 2.1.9 *Puffer und Lösungen*) im

Verhältnis 4:1 (3 Teile Zellysate auf 1 Teil Ladepuffer) gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Das im Ladepuffer enthaltene SDS hat ebenfalls denaturierende Eigenschaften, da es nichtkovalente Bindungen zerstört. Außerdem verleiht das SDS den Proteinen eine negative Ladung proportional zur Proteinelänge. Somit wird die Eigenladung der Proteine maskiert und die Auftrennung während der SDS-PAGE erfolgt allein anhand des Molekulargewichts der linearisierten Proteine (Shapiro et al. 1967).

Es kam eine eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE mit Gelen, die aus einem Trenn- und dem darauf geschichteten Sammelgel bestanden, zum Einsatz. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels betrug 8%, da die nachzuweisenden Proteine ein Molekulargewicht von 42-96 kDa aufwiesen. Die Zusammensetzung der Gele kann Tabelle 6 entnommen werden. Die angegebenen Volumina sind ausreichend für die Herstellung von zwei Gelen.

Tabelle 6: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels.

Reagenzien	Trenngel 8%	Sammelgel
ddH ₂ O	9,3 ml	3,4 ml
Rotiphorese [®] Gel 30 Lösung	5,3 ml	830 µl
Trenngelpuffer (1,5M Tris, pH=8,8)	5,0 ml	—
Sammelgelpuffer (1,0M Tris, pH=6,8)	—	630 µl
SDS-Lösung, 10%	200 µl	50 µl
APS, 10%	200 µl	50 µl
TEMED	20 µl	5 µl

Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde es aufrecht in der Gelelektrophorese-Kammer positioniert, die Kammer mit NuPAGE[®] MES SDS Laufpuffer (1x) gefüllt und die Taschen des Gels sorgsam ausgespült. Nun wurden 10 bzw. 20 µg der aufgekochten Proteine in die Taschen des Gels geladen. Die hierfür benötigten Volumina wurden durch den BCA-Assay bzw. die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ermittelt. Parallel zu den Proben wurden zwei verschiedene Marker, die sich in Banden mit bekanntem Molekulargewicht auftrennen, aufgetragen. Der farbige Broad Range Marker half bei der Beurteilung des optimalen Endpunktes der Elektrophorese und

später beim Schneiden der PVDF-Membran (siehe Kapitel 2.2.3.6 *Immunfärbung*). Der vom Zweitantikörper detektierte Magic Marker diente der Abschätzung der Proteingröße direkt auf dem Western Blot. War das Gel beladen, wurde ein konstanter Strom von 30 mA pro Gel bei variabler Spannung angelegt. Wenn die zu analysierenden Proteine sich mit möglichst großem Abstand zueinander aufgetrennt hatten, wurde die Elektrophorese durch Ausschalten der Stromquelle beendet.

2.2.3.5 Proteintransfer

Beim Proteintransfer werden die mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Methode wird als Western Blot bezeichnet.

Es wurde das Verfahren des Semi-dry Western Blots angewandt. Die PVDF-Membran wurde 10 sec in 100% Methanol aktiviert, 5 min in ddH₂O und anschließend 15 min in Western Blot Transferpuffer (1x) inkubiert. Das Gel wurde ebenfalls 15 min in Western Blot Transferpuffer (1x) inkubiert. Nun wurden in dieser Reihenfolge übereinander 3 Lagen Chromatographie-Papier, die PVDF-Membran, das Gel und nochmals 3 Lagen Chromatographie-Papier auf die Anodenplatte des Elektrobloppers geschichtet. Darüber wurde die Kathodenplatte des Elektrobloppers platziert. Das Chromatographie-Papier wurde vor Gebrauch in Western Blot Transferpuffer (1x) getränkt. Es diente als Pufferreservoir, damit Gel und Membran während des Blot-Vorgangs nicht austrockneten. Für eine Stunde wurde ein Strom von 100 mA pro Gel angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die PVDF-Membran wanderten.

2.2.3.6 Immunfärbung

Bei der Immunfärbung werden die Proteine von Interesse, die sich nach erfolgreichem Proteintransfer auf der PVDF-Membran befinden, mittels spezifisch bindender Antikörper gefärbt. Mit Hilfe des Broad Range Markers konnte die Membran zerteilt werden, sodass parallel die Färbung verschiedener Proteine möglich war, solange sie sich deutlich in ihrem Molekulargewicht und damit ihrer Position auf der Membran unterschieden.

Zunächst wurden freie Bindungsstellen der Membran, aufgrund derer es zu unspezifischer Antikörperbindung kommen könnte, mit in TBS-T Puffer (1x) gelöstem, fettarmen Milchpulver blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem gegen ein

bestimmtes Epitop des Proteins von Interesse gerichteten Primärantikörpers. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T Puffer (1x) schloss sich die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper an. Wiederum wurde die Membran drei Mal mit TBS-T Puffer (1x) gewaschen. Abschließend erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden unter Verwendung des Kits „Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent“ und einer CCD Chemilumineszenz-kamera vom Typ LAS 4000. Die Kamera detektierte die Chemilumineszenzreaktion von Luminol, welche durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-peroxidase katalysiert wird.

Die Immunfärbung erfolgte entweder konventionell oder mit Hilfe des SNAP i.d.® Systems. Beim SNAP i.d.® System werden Blockierpuffer, TBS-T Puffer (1x) und die Antikörperlösungen direkt durch die PVDF-Membran gesaugt, woraus stark verkürzte Inkubationszeiten resultieren. Nach der konventionellen Methode erfolgte das Blockieren der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur (Rt) mit 5% Milch-TBS-T (1x) und die Dauer der Waschvorgänge mit TBS-T Puffer (1x) betrug drei mal 5 min. Bei Anwendung des SNAP i.d.® Systems erfolgte das Blockieren mit 0,1% Milch-TBS-T (1x) und dauerte genau wie die einzelnen Waschschrte nur wenige Sekunden. Die verwendeten Antikörper mit ihren jeweiligen Verdünnungen und Inkubationsbedingungen können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Für die Immunfärbung verwendete Antikörper mit Verdünnungen, Lösungspuffer und Inkubationsbedingungen.

	Antikörper	Wirtstier	Konventionell			SNAP i.d.		
			Verdünnung	Lösungspuffer	Inkubationsbedingungen	Verdünnung	Lösungspuffer	Inkubationsbedingungen
Primärantikörper	Anti-Actin	Kaninchen	1:8000	5% Milch-TBS-T	ü. N. bei 4°C	1:1500	0,1% Milch-TBS-T	10 min bei Rt
	Anti-Active- β -catenin	Maus	1:4000	5% Milch-TBS-T	ü. N. bei 4°C	1:1000	0,1% Milch-TBS-T	10 min bei Rt
	Anti-Axin 2	Kaninchen	1:1000	5% Milch-TBS-T	ü. N. bei 4°C	Nicht etabliert		
	Anti-HDAC1	Kaninchen	1:1000	5% Milch-TBS-T	ü. N. bei 4°C	Nicht etabliert		
	Anti-TCF7L2	Kaninchen	1:10000	5% BSA-TBS-T	ü. N. bei 4°C	1:5000	1% BSA-TBS-T	10 min bei Rt
	Anti- β -Catenin	Kaninchen	1:2000	5% Milch-TBS-T	ü. N. bei 4°C	Nicht etabliert		
Sekundärantikörper	Anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:30000	5% Milch-TBS-T	2h bei Rt	1:2000	0,1% Milch-TBS-T	10 min bei Rt
	Anti-Maus IgG	Kaninchen	1:30000	5% Milch-TBS-T	2h bei Rt	1:20000	0,1% Milch-TBS-T	10 min bei Rt

Für Details und Abkürzungen siehe Text.

2.2.4 Transfektion

Bei der Transfektion handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Genexpressionsvektoren in Zellen eingebracht werden. Hierbei kam die Methode der Lipofektion zur Anwendung, die im Folgenden näher beschrieben wird. Es wurde ausschließlich an der Sterilbank gearbeitet und steriles, DNase und RNase freies Material verwendet.

Die Methode der Lipofektion beruht darauf, dass kationische Lipide mit den anionischen Phosphatgruppen der in die Zellen einzubringenden DNA aufgrund von ionischer Wechselwirkungen Komplexe bilden. Diese Komplexe können durch ihren Lipidanteil mit der Zellmembran verschmelzen, wodurch die DNA in die Zellen eingeschleust wird (Felgner et al. 1987). Die Lipofektion kam sowohl zur Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1 als auch im Rahmen des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays zum Einsatz.

2.2.4.1 Etablierung der Lipofektion der Zelllinie RPE-1 mit „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“

Da in unserem Labor noch kein Protokoll zur Lipofektion der Zelllinie RPE-1 vorlag, wurde dieses in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an die Herstellerangaben für eine 12-Well-Platte etabliert. Während der Etablierungsphase wurde der „Luc Positiv Control“ Vektor aus dem „Cignal Reporter Assay Kit“ von Qiagen verwendet. Dieser Vektor enthält „MonsterGFP“. Bei erfolgreicher Transfektion wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert. Wird das GFP durch blaues bzw. ultraviolettes Licht angeregt, so wird grünes Licht emittiert, wobei für die Fluoreszenz keine exogenen Substrate oder Cofaktoren benötigt werden. Somit stellt das grüne Leuchten, welches 24 Stunden nach Transfektion visuell mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes bestimmt werden kann, ein gutes Maß der Transfektionseffizienz dar (Chalfie et al. 1994).

Die Lipofektion der Zelllinie RPE-1 wurde im Hinblick auf die Parameter Anzahl der zu setzenden Zellen, Verhältnis von DNA zu Lipid und Verwendung von FBS-freiem oder FBS-haltigem Medium optimiert.

Zunächst wurde die Anzahl der in eine 12-Well-Platte zu setzenden Zellen, bei der die Zellen nach 24 Stunden eine Konfluenz von ca. 50% aufweisen, ermittelt. Aus

Erfahrung innerhalb unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass bei 50% Konfluenz die Transfektionseffizienz am höchsten ist. Hierzu wurden in jeweils ein Well einer 12-Well-Platte 75.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 und 500.000 Zellen gesetzt und die Konfluenz der Zellen nach 24 Stunden mikroskopisch beurteilt.

Nach Ermittlung der optimalen Anzahl der zu setzenden Zellen wurde das Verhältnis von zu transfizierender DNA zu „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“ variiert. Pro 1 µg DNA wurden entweder 1, 2, 3 oder 4 µL „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“ verwendet. Als Lösungsmittel diente FBS-freies DMEM/F-12 Medium. Die Transfektion wurde 24 Stunden nach Setzen der Zellen in FBS-haltiges Nährmedium durchgeführt.

Außerdem wurde die Transfektionseffizienz unter Verwendung von FBS-freiem Nährmedium getestet. Hierzu wurde das FBS-haltige DMEM/F-12 Medium 24 Stunden nach Setzen der Zellen gegen FBS-freies DMEM/F-12 Medium ausgetauscht. Die Transfektion erfolgte dann 48 Stunden nach Setzen der Zellen. Wiederum wurde das Verhältnis von DNA zu „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“ wie eben beschrieben variiert.

Die Transfektionseffizienz wurde, wie einleitend erläutert, 24 Stunden nach Transfektion fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

2.2.5 Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1

Es wurden Zellen der Linie RPE-1 mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y stabil transfiziert, was zu einer Überexpression von mutiertem, konstitutiv aktivem β -Catenin (S33Y) führt. Mutiertes β -Catenin (S33Y) kann durch die Mutation Serin (S) 33 zu Tyrosin (Y) nicht GSK3-abhängig phosphoryliert und somit auch nicht proteasomal abgebaut werden, sodass es zu einer Akkumulation von aktivem β -Catenin kommt. Hierdurch wird die Endstrecke des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs stark aktiviert (Morin et al. 1997; Xue et al. 2015). Als Negativkontrolle wurden RPE-1-Zellen mit dem *empty vector* pCI-neo Mammalian Expression Vector stabil transfiziert. Die Selektion der vektortragenden Zellen erfolgte mit 800 µg/ml G-418 (s.u.). Der Transfektionserfolg wurde mittels Dual-Luciferase[®] Reporter Assay gemessen (s. Kapitel 2.2.6 *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay*). Letztlich wurde mit diesen Zelllinien ein Koloniebildungsversuch durchgeführt (s. Kapitel 2.2.8 *Koloniebildungsversuch*).

Zur Transfektion wurden 190.000 RPE-1-Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte gesetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Lipofektion. Es wurden 2,5 µl „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“ und 2,5 µg DNA (pCI-neo-b-cat S33Y oder pCI-neo) in FBS-freiem DMEM/F-12 Medium gelöst und nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur tröpfchenweise in die Wells pipettiert. Die 6-Well-Platte wurde vorsichtig geschwenkt und im Brutschrank platziert.

Zur Selektion der vektortragenden Zellen erfolgte 24 Stunden nach Transfektion ein Wechsel des Zellkulturmediums auf DMEM/F-12 Medium, das mit 800 µg/ml Geneticin versetzt wurde. Die Konzentration des Geneticins zur Selektion von RPE-1-Zellen war im Labor bereits bekannt. Geneticin gehört zur Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika und ist ein Derivat des Neomycins. Es hemmt die zelluläre Proteinbiosynthese durch Störung der ribosomalen Funktion, was zum Absterben der Zelle führt (Bar-Nun et al. 1983). Die Vektoren pCI-neo-b-cat S33Y und pCI-neo enthalten beide das Neomycin-Resistenzgen Neo, welches für eine Aminoglykosid-3'-Phosphotransgenase (APT) kodiert. Durch die APT wird Geneticin an den Hydroxylgruppen phosphoryliert und somit die Interaktion des Antibiotikums mit den Ribosomen gehemmt (Davies und Jimenez 1980; Hadfield et al. 1990). Daraus resultiert, dass sowohl alle nicht-vektortragenden Zellen als auch alle vektortragenden Zellen, die den Vektor nicht oder nicht korrekt ablesen durch Geneticin angegriffen werden. Alle vektortragenden Zellen, die den Vektor korrekt ablesen und eine funktionsfähige APT synthetisieren, werden so selektioniert.

Die transfizierten Zellen wurden fortan dauerhaft mit diesem Selektionsmedium behandelt. Auf diese Weise konnte eine stabile Zelllinie aus den Zellen gezüchtet werden, bei denen die Transfektion mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y bzw. pCI-neo erfolgreich und der Vektor funktionsfähig war. Im Folgenden werden RPE-1-Zellen, die den Vektor pCI-neo-b-cat S33Y tragen als RPE-1-S33Y Zellen bezeichnet, mit dem *empty vector* pCI-neo transfizierte RPE-1-Zellen werden RPE-1-EV Zellen genannt.

2.2.6 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay

Der Dual-Luciferase[®] Reporter Assay dient dem quantitativen Nachweis der Transkriptionsaktivität des TCF/β-Catenin-Komplexes und ist damit eine Methode zur Messung der Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalwegs *in vitro*.

Zur Messung der Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes erfolgte zunächst die transiente Transfektion der Zellen mit dem SuperTopFlash oder dem als Negativkontrolle fungierenden SuperFopFlash Reporter-Plasmid. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz erfolgt die Kotransfektion mit dem Renilla-Luciferase-Reporter-Plasmid (Barker und Clevers 2006). 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen. Im Anschluss wurden die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität mittels eines Luminometers ausgelesen. Hierbei zeigt die normalisierte Firefly-Luciferase-Aktivität die Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes an.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Dual-Luciferase[®] Reporter Assay zur Messung der Stimulierbarkeit des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bei drei verschiedenen Experimenten durchgeführt (s. Tabelle 8). Es wurde jeweils die Änderung der normalisierten Firefly-Luciferase-Aktivität in Bezug zur entsprechenden Negativkontrolle bestimmt. In Experiment 1 wurden RPE-1-Zellen mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y transient transfiziert, was zu einer Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) führt. Als Negativkontrolle fungierten RPE-1-Zellen, die mit dem *empty vector* pCI-neo transient transfiziert wurden. In Experiment 2 wurde der Dual-Luciferase[®] Reporter Assay mit stabil transfizierten Zellen der Linie RPE-1-S33Y durchgeführt, Zellen der Linie RPE-1-EV dienten als Negativkontrolle (s. Kapitel 2.2.5 *Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1*). Im 3. Experiment wurden RPE-1-Zellen mit (+) Wnt3a Medium behandelt, die Negativkontrolle stellten mit (-) Wnt3a behandelte RPE-1-Zellen dar (s. Kapitel 2.2.2 *Konditionieren von Wnt3a-haltigem Medium*).

Tabelle 8: Durchgeführte Experimente, bei denen die Stimulierbarkeit des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Dual-Luciferase[®] Reporter Assay gemessen wurde.

	Hauptexperiment	Negativkontrolle
Experiment 1 transiente Transfektion von RPE-1-Zellen	β -Catenin (S33Y)	<i>empty vector</i>
Experiment 2 stabile Zellpopulation	RPE-1-S33Y	RPE-1-EV
Experiment 3 Behandlung von RPE-1-Zellen	(+) Wnt3a	(-) Wnt3a

Für Details und Abkürzungen siehe Text.

2.2.6.1 Lipofektion der Zellen im Rahmen des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays

Für jedes der oben beschriebenen Experimente wurden Zellen in je vier Wells einer 12-Well-Platte benötigt, wovon jeweils zwei Wells auf das Hauptexperiment und zwei Wells auf die Negativkontrolle entfielen. Insgesamt waren also Zellen in 12 Wells erforderlich, sodass in acht Wells RPE-1-Zellen (Experiment 1 und 3), in zwei Wells RPE-1-S33Y Zellen und in die verbleibenden zwei Wells RPE-1-EV Zellen gesetzt wurden (Experiment 2). Zur Veranschaulichung s. Abbildung 3. Die Anzahl der gesetzten Zellen betrug 75.000 pro Well. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion. Hierzu wurde in insgesamt sechs 1,5 ml Reagiergefäße jeweils FBS-freies DMEM/F-12 Medium vorgelegt und nacheinander die zu transfizierende DNA und das „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“ hinzugefügt. Pro 1 µg DNA wurde 1 µl „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“ verwendet. Das SuperTopFlash und das SuperFopFlash Reporter Plasmid sowie die Vektoren pCI-neo-b-cat S33Y und pCI-neo lagen in einer Konzentration von 100 ng/µl, der Vektor pRL-CMV lag in einer Konzentration von 10 ng/µl vor. Die genaue Zusammensetzung der Ansätze kann Tabelle 9 entnommen werden. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Lipid-DNA-Komplexe formen konnten. Während der Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen durchgeführt. In Experiment 3 wurden RPE-1-Zellen mit (+)/(-) Wnt3a Medium behandelt. Folglich wurde in zwei der Wells mit RPE-1-Zellen (+) Wnt3a Medium, in zwei weitere Wells (-) Wnt3a Medium gegeben. Sowohl (+) als auch (-) Wnt3a Medium wurde vorher mit 50% frischem DMEM/F-12 Medium supplementiert. (s. Kapitel 2.2.2 *Konditionieren von Wnt3a-haltigem Medium*). Zur Veranschaulichung s. Abbildung 3. Bei allen anderen Zellen wurde beim Wechsel des Zellkulturmediums das übliche Medium verwendet. Nun folgte die Transfektion. Wie oben beschrieben, wurden für jedes der drei Experimente Zellen in vier Wells einer 12-Well-Platte benötigt. Die Zellen im ersten Well eines jeden Hauptexperiments wurden mit dem SuperTopFlash Reporter Plasmid, die Zellen im zweiten Well wurden mit dem SuperFopFlash Reporter Plasmid transfiziert. Analog wurde mit den Zellen der Negativkontrollen verfahren. Bei Experiment 1 wurden die Zellen zusätzlich mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y bzw. dem *empty vector* pCI-neo transient transfiziert. Deswegen wurden für dieses Experiment Einfach-Reaktionsansätze angefertigt, für die Experimente 2 und 3 konnten 4-fach-Reaktionsansätze verwendet werden (s. Tabelle 9).

Zur Transfektion wurden aus Reagiergefäß (RG) 1 (TOP) jeweils 100 µl in je ein Well der Hauptexperimente und Negativkontrollen der Experimente 2 und 3 tröpfchenweise pipettiert. Mit RG 2 (FOP) wurde analog verfahren. Die Reagiergefäße 3 bis 6 waren alle für das Experiment 1 bestimmt, es wurden 100 µl auf je eines der vier Wells gegeben. Eine Übersicht hierzu bietet Abbildung 3. Die Farben in Abbildung 3 finden sich zur Veranschaulichung der Verteilung der Reaktionsansätze in Tabelle 9 wieder. Die 12-Well-Platte wurde für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen zur Vorbereitung auf den Dual-Luciferase[®] Reporter Assay lysiert.

Material und Methoden

Tabelle 9: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Lipofektion der Zelllinien RPE-1 und RPE-1-S33Y/EV im Rahmen des Dual-Luciferase® Reporter Assays.

Substanz	RG 1 TOP (4-fach)	RG 2 FOP (4-fach)	RG 3 TOP + ev	RG 4 FOP + ev	RG 5 TOP + β- Catenin	RG 6 FOP + β- Catenin
FBS-freies DMEM/F-12 Medium	400 µL	400 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
SuperTopFlash Reporter Plasmid	2000 ng	-	500 ng	-	500 ng	-
SuperFopFlash Reporter Plasmid	-	2000 ng	-	500 ng	-	500 ng
pCI-neo-b-cat S33Y	-	-	-	-	500 ng	500 ng
pCI-neo (ev)	-	-	500 ng	500 ng	-	-
pRL-CMV	200 ng	200 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent	2 µL	2 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL

Die Farben der einzelnen Reaktionsansätze finden sich in Abbildung 3 wieder. RG: Reagiergefäß, ev: *empty vector*.

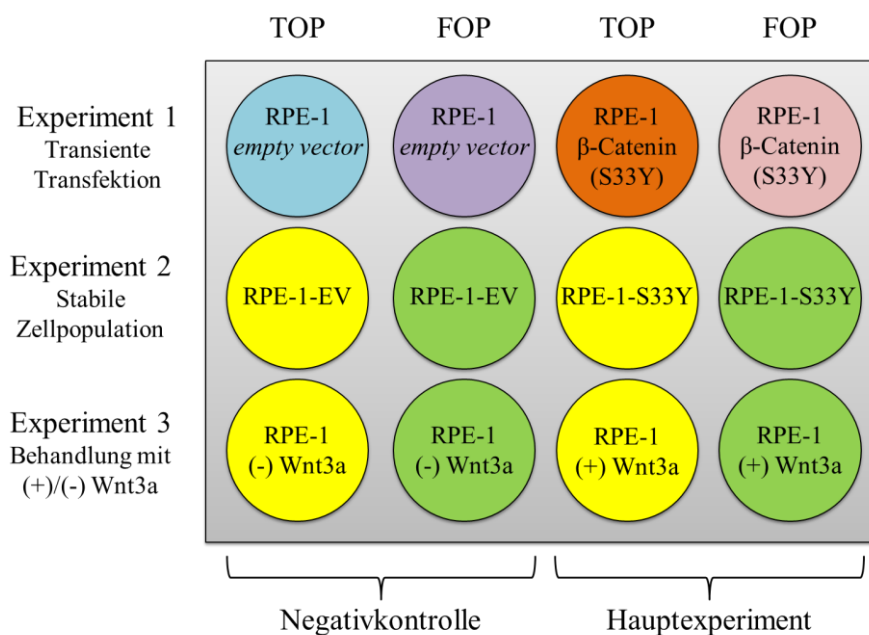


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer 12-Well-Platte für die Lipofektion der Zelllinien RPE-1 und RPE-1-S33Y/EV im Rahmen des Dual-Luciferase® Reporter Assays. Für Details und Abkürzungen siehe Text.

2.2.6.2 Auswertung des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays

Wie oben beschrieben, wurden Zellen im Rahmen des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays entweder mit dem SuperTopFlash Reporter Plasmid oder mit dem als Negativkontrolle fungierendem SuperFopFlash Reporter Plasmid transient transfiziert. Das SuperTopFlash Reporter Plasmid verfügt über sechs aktive TCF-Bindungsstellen, die die Transkription des aus dem Glühwürmchen stammenden Firefly-Luciferase-Gens steuern (Kendziorra et al. 2011). Bei Bindung des TCF/ β -Catenin-Komplexes an die TCF-Bindungsstellen wird proportional zur Menge des gebundenen TCF/ β -Catenin-Komplexes die Firefly-Luciferase exprimiert. Diese setzt in Gegenwart von Mg^{2+} und O_2 in einer ATP-abhängigen, als Biolumineszenz bezeichneten Reaktion, Beetle Luciferin zu Oxyluciferin unter Emission von sichtbarem Licht um (s. Abbildung 4). Die Intensität des Lichtsignals kann mittels eines Luminometers gemessen werden und korreliert mit der Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes und damit der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Beim SuperFopFlash Reporter Plasmid hingegen sind die sechs TCF-Bindungsstellen mutiert und inaktiviert, sodass der TCF/ β -Catenin-Komplex nicht binden kann. Somit fungiert das SuperFopFlash Reporter Plasmid als Negativkontrolle mittels dessen die nicht-spezifische Aktivierung des Reporterplasmids bestimmt werden kann (Barker und Clevers 2006).

Weiterhin erfolgte eine Koftransfektion aller Zellen mit dem pRL-CMV Vektor, welcher eine konstitutive und damit vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg unabhängige Expression der Renilla-Luciferase ermöglicht. Somit bot die Renilla-Luciferase ein Maß für die Transfektionseffizienz und Zellviabilität und konnte deswegen zur Normalisierung genutzt werden (Barker und Clevers 2006). Die durch die Renilla-Luciferase katalysierte Biolumineszenzreaktion kann ebenfalls Abbildung 4 entnommen werden.

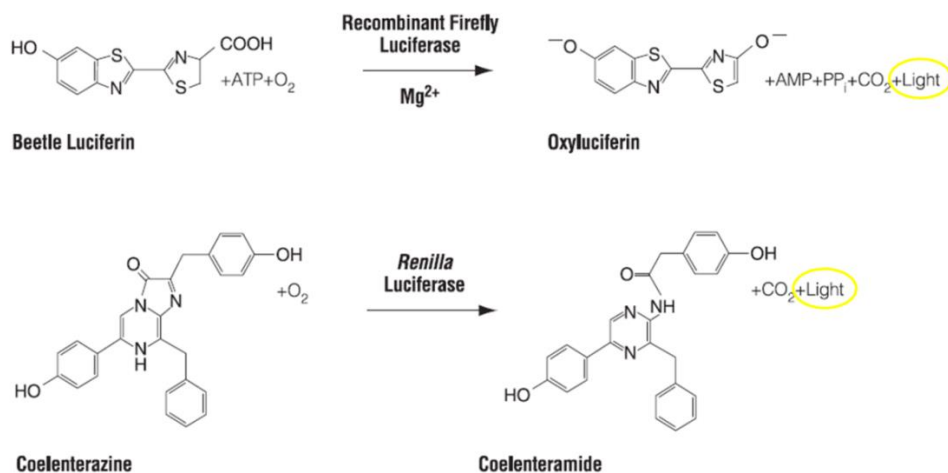


Abbildung 4: Von der Firefly- und Renilla-Luciferase katalysierte Biolumineszenzreaktionen. Modifiziert nach (Promega 2006).

In Vorbereitung auf den Dual-Luciferase[®] Reporter Assay wurden die Zellen nach erfolgter Transfektion und 24-stündiger Inkubation im Brutschrank lysiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 150µl Passiv-Lyse-Puffer (1x) in jedes Well gegeben. Nun wurden die Zellen unter Zuhilfenahme einer Pipettenspitze aus dem Well gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wurde zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend wieder erwärmt. Für den Dual-Luciferase[®] Reporter Assay wurde das Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System der Firma Promega verwendet. Die Reagenzien wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. In eine weiße 96-Well-Platte wurden pro Well je 100µl Luciferase Assay Reagent II vorgelegt. Hierzu wurden je 20µl Zelllysate gegeben, wobei mit technischen Triplikaten gearbeitet wurde. Die Messung der durch die Reaktion der Firefly-Luciferase entstandenen Lumineszenz erfolgte mittels des Mikroplattenlesers Mithras LB 940. Durch Zugabe von je 100µl Stop & Glo (1x) pro Well wurde die Reaktion der Firefly-Luciferase abgestoppt und die der Renilla-Luciferase induziert. Die Lumineszenz wurde wiederum durch den Mikroplattenleser Mithras LB 940 gemessen. Die gemessene Firefly-Luciferase-Aktivität wurde anhand der zugehörigen Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert (s. Formel 1a). Die Bestimmung der TCF/ β -Catenin-Aktivität erfolgte durch die Berechnung der Ratio zwischen den normalisierten SuperTopFlash und SuperFopFlash Werten (s. Formel 1b). Die Steigerungsfähigkeit der TCF/ β -Catenin-Aktivität wurde ermittelt, indem die Ratio zwischen den SuperTopFlash/SuperFopFlash-Verhältnissen der oben beschriebenen Hauptexperimente und der entsprechenden Negativkontrolle gebildet wurde (s. Formel 1c). Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und unabhängig voneinander drei Mal wiederholt.

- a) Normalisierung der Firefly-Luciferase-Aktivität

$$\frac{\text{Firefly} - \text{Luciferase Aktivität}}{\text{Renilla} - \text{Luciferase Aktivität}}$$

- b) Bestimmung der TCF/ β -Catenin-Aktivität

$$\frac{\text{SuperTopFlash der normalisierten Firefly} - \text{Luciferase Aktivität}}{\text{SuperFopFlash der normalisierten Firefly} - \text{Luciferase Aktivität}} \quad \text{kurz:} \quad \frac{TOP}{FOP}$$

- c) Steigerungsfähigkeit der TCF/ β -Catenin-Aktivität

$$\frac{\text{Hauptexperiment} \frac{TOP}{FOP}}{\text{Negativkontrolle} \frac{TOP}{FOP}}$$

Formel 1: Berechnungen im Rahmen des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays. Details und Abkürzungen siehe Text.

2.2.7 Vorversuche zur Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a

Ziel der Vorversuche mit RPE-1-Zellen und (+) Wnt3a Medium war die Vorbereitung eines Koloniebildungsversuches, bei dem der Einfluss einer Behandlung mit (+) Wnt3a Medium auf die Radio(chemo)therapieresistenz von RPE-1-Zellen untersucht werden sollte (s. Kapitel 2.2.8 *Koloniebildungsversuch*). In den Vorversuchen wurde zunächst getestet, ob eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Zellen der Linie RPE-1 durch die Behandlung mit (+) Wnt3a Medium erreicht werden kann, und bei welcher Behandlungsdauer der Effekt am stärksten ist. Die Wirkungsweise von Wnt3a ist in Kapitel 3.2.2 *Ergebnisse der Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a* beschrieben. Als Kontrolle diente der Nachweis von Axin 2 mittels Western Blot. Es wurden 400.000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte gesetzt und die Zellen für wenige Tage inkubiert, bis der Zellrasen eine Konfluenz von nahezu 100% erreicht hatte. Dann erfolgte ein Medienwechsel auf (+) bzw. (-) Wnt3a Medium. Letzteres fungierte als Kontrolle. Nach 6, 9 und 24 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Proteinisolation erfolgte mit RIPA-Puffer (s. Kapitel 2.2.3.2 *Zellyse und Proteinextraktion*). Anschließend wurde sowohl die für einen Koloniebildungsversuch erforderliche Anzahl der zu setzenden Zellen pro Well einer 6-Well-Platte als auch die Wachstumsdauer ermittelt. Hierzu wurden zwischen 100 und 1600 RPE-1-Zellen pro Well in DMEM/F-12 Medium mit 0,35% NaHCO₃ gesetzt und am Folgetag mit einer Dosis von 0, 1, 2, 4, 6 oder 8 Gy bestrahlt. Ab dem dritten Tag nach Bestrahlung wurden die Zellen täglich mikroskopisch

beurteilt. Sobald die gewachsenen Kolonien aus mindestens 50 Zellen bestanden, wurden die Kolonien mit 70% Ethanol fixiert und anschließend mit Hämalaunblau gefärbt (s. Kapitel 2.2.8 *Koloniebildungsversuch*). Die gefärbten Kolonien wurden mikroskopisch beurteilt und für jede Bestrahlungsdosis die optimale Anzahl der zu setzenden Zellen bestimmt, bei der sich nach Bestrahlung zwar ausreichend Kolonien gebildet hatten, das Well jedoch nicht überwuchert war (s. Tabelle 10).

2.2.8 Koloniebildungsversuch

Der Koloniebildungsversuch (KBV) ist ein Verfahren zur Messung der Strahlensensibilität von Zellen. Es wird die Fähigkeit der Zellen untersucht, nach Bestrahlung aus einzelnen Zellen eine Kolonie zu bilden (Rave-Fränk et al. 2007). Diese Methode eignet sich gut zur Bestimmung des Potentials von Zellen, beispielsweise durch Bestrahlung induzierte DNA-Schäden zu überwinden (Puck und Marcus 1955). Als Kolonie wurde eine Ansammlung von mindestens 50 Zellen gewertet. So wurde sichergestellt, dass der Zellteilungszyklus mindestens sechs Mal durchlaufen wurde, was Zeichen der unbegrenzten Teilungsfähigkeit von Zellen darstellt. Auf diese Weise war es möglich, überlebende Zellen von stark geschädigten Zellen zu unterscheiden (Puck und Marcus 1956).

In dieser Arbeit wurden die Zellen im Rahmen des KBVs zum einen ausschließlich bestrahlt, wodurch die alleinige Radiotherapieresistenz der Zellen getestet wird, zum anderen wurde die Bestrahlung mit dem Chemotherapeutikum 5-FU kombiniert, womit Rückschlüsse auf die Radiochemotherapieresistenz der Zellen gezogen werden können. Der KBV wurde sowohl mit RPE-1-S33Y/EV Zellen, als auch mit RPE-1-Zellen, die mit (+)/(-) Wnt3a Medium behandelt wurden, durchgeführt. Die experimentellen Konditionen können Tabelle 10 entnommen werden. Alle Koloniebildungsversuche wurden in technischen Triplikaten durchgeführt und unabhängig voneinander drei Mal wiederholt (biologische Triplikate).

Tabelle 10: Experimentelle Konditionen für die Koloniebildungsversuche mit den Zelllinien RPE-1-S33Y/EV und RPE-1.

Zelllinie	Behandlung	Anzahl zu setzender Zellen						Wachstumsdauer
		0 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	
RPE-1-S33Y/EV	-	300	450	600	1200	1800	2400	6 Tage
RPE-1	+/- Wnt3a	200	200	200	600	800	1000	6 Tage

Details und Abkürzungen siehe Text.

2.2.8.1 Koloniebildungsversuch mit der Zelllinie RPE-1-S33Y/EV

In der Zelllinie RPE-1-S33Y wird mutiertes β -Catenin (S33Y), welches nicht abgebaut wird, überexprimiert, wodurch die Endstrecke des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs stark aktiviert wird (Morin et al. 1997). Die Zelllinie RPE-1-EV wurde mit einem *empty vector* transfiziert und diente als Negativkontrolle (s. Kapitel 2.2.5 *Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1*).

Je nach Bestrahlungsdosis wurden zwischen 300 und 2400 Einzelzellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesetzt (s. Tabelle 10). 24 Stunden später erfolgte die Bestrahlung (Radiotherapie (RT)) mit Dosen von 0 bis 8 Gy bei einer Dosisleistung von 2 Gy/min (Geräteeinstellungen: 200 kV, 15 mA, Filter: 0,5 mm Kupfer, Tischhöhe: 351 mm). 6 Tage nach Bestrahlung bzw. 7 Tage nach Setzen der Zellen wurde der KBV abgestoppt (s. Abbildung 5a). In einer zweiten Variante des KBVs wurden die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung mit dem Chemotherapeutikum 5-FU behandelt (Radiochemotherapie (RCT)). Beim Setzen der Zellen wurde wie oben beschrieben vorgegangen. Acht Stunden später wurde 5-FU in einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ in das Medium der Zellen hinzugefügt. Die Bestrahlung erfolgte weitere 16 Stunden später, also ebenfalls 24 Stunden nach Setzen der Zellen, zu oben beschriebenen Konditionen. 8 Stunden nach Bestrahlung erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums, mit dem auch das 5-FU entfernt wurde. Insgesamt betrug die Behandlungsdauer der Zellen mit 5-FU 24 Stunden. 6 Tage nach der Bestrahlung wurde der KBV abgestoppt (s. Abbildung 5b).

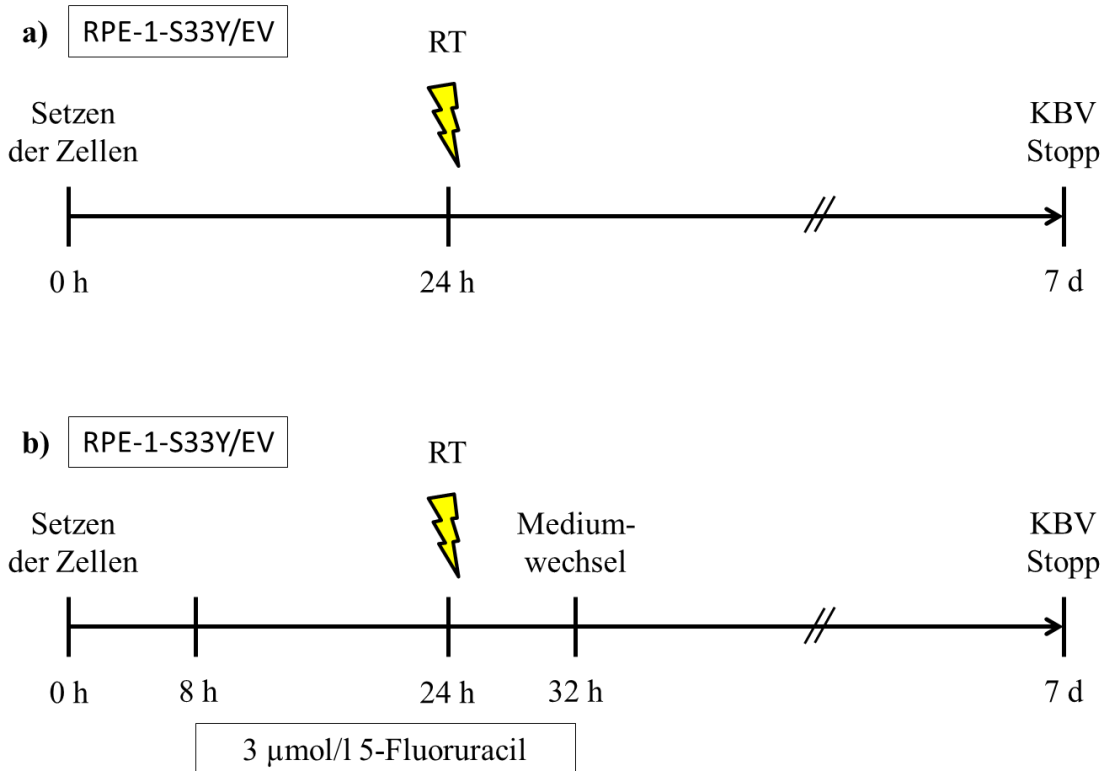


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf des KBVs mit der Zelllinie RPE-1-S33Y/EV. a) Radiotherapie (RT), b) Radiochemotherapie (RCT). Für Details und Abkürzungen siehe Text.

2.2.8.2 Koloniebildungsversuch mit der Zelllinie RPE-1 unter Behandlung mit (+)/(-) Wnt3a Medium

Zellen der Linie RPE-1 wurden mit (+) Wnt3a Medium behandelt. Wnt3a ist ein löslicher Ligand des *Frizzled*-Rezeptors, durch dessen Bindung der Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiviert wird (Cajanek et al. 2010). Als Negativkontrolle fungierten RPE-1-Zellen, die mit (-) Wnt3a Medium behandelt wurden (s. Kapitel 2.2.2 *Konditionieren von Wnt3a-haltigem Medium*). Bevor das konditionierte Medium auf die Zellen gegeben wurde, wurde es zu gleichen Teilen mit frischem DMEM/F-12 Medium gemischt. Der KBV wurde mit RPE-1-Zellen in vier verschiedenen Varianten durchgeführt. Entweder wurden die Zellen ausschließlich bestrahlt (RT) oder zusätzlich mit 5-FU behandelt (RCT). Außerdem wurde sowohl im Rahmen der RT als auch der RCT die Behandlungsdauer mit dem konditionierten Medium variiert (s. Abbildung 6).

Je nach Bestrahlungsdosis wurden zwischen 200 und 1000 Einzelzellen pro Well (s. Tabelle 10) in eine 6-Well-Platte und gesetzt und für 24 Stunden mit entweder (+) oder (-) Wnt3a Medium inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass im Medium 0,35% NaHCO_3 als pH-Wert-Puffer enthalten war (s. auch Tabelle 4). Nach der Inkubationszeit erfolgte die Bestrahlung (RT) der Zellen mit Dosen von 0 bis 8 Gy bei

einer Dosisleistung von 2 Gy/min (Geräteeinstellungen: s.o.). Die Zeitspanne von 24 Stunden Inkubationsdauer mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium war zuvor in den Vorversuchen mit RPE-1-Zellen ermittelt worden (s. Kapitel 3.2.1 *Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a*). Acht Stunden nach der Bestrahlung wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums vorgenommen und das konditionierte Medium durch DMEM/F-12 Medium ersetzt. Sechs Tage nach Bestrahlung wurde der KBV abgestoppt (s. Abbildung 6a). In einer zweiten Variante des KBVs wurde vorgegangen wie oben beschrieben, nur dass der Wechsel des Zellkulturmediums nach der Bestrahlung unterlassen wurde, sodass die Behandlung mit dem konditioniertem Medium bis zum Abstoppen des KBVs andauerte (s. Abbildung 6b). Wurden die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung noch mit 5-FU behandelt (RCT), wurde wie oben beschrieben vorgegangen. 5-FU wurde in einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ 8 Stunden nach Setzen der Zellen hinzugegeben und nach 24 Stunden wurden die Zellen bestrahlt. 8 Stunden nach Bestrahlung wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt, um das 5-FU wieder von den Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden für die Restdauer des KBVs entweder in DMEM/F-12 Medium kultiviert (s. Abbildung 6c) oder aber erneut mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium behandelt (s. Abbildung 6d). 6 Tage nach der Bestrahlung wurde der KBV abgestoppt.

2.2.8.3 Fixieren und Färben der Zellkolonien

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt und die inzwischen gebildeten Kolonien durch vorsichtiges Hinzufügen von 70% Ethanol fixiert. Nach 20 Minuten wurde das Ethanol abgesaugt und die Platten getrocknet. Anschließend wurden die Kolonien zum Färben für 5 Minuten mit Hämalaunblau bedeckt, dann gespült und letztlich getrocknet (Rave-Fränk et al. 2007). Die eingefärbten Kolonien konnten nun mikroskopisch gezählt werden.

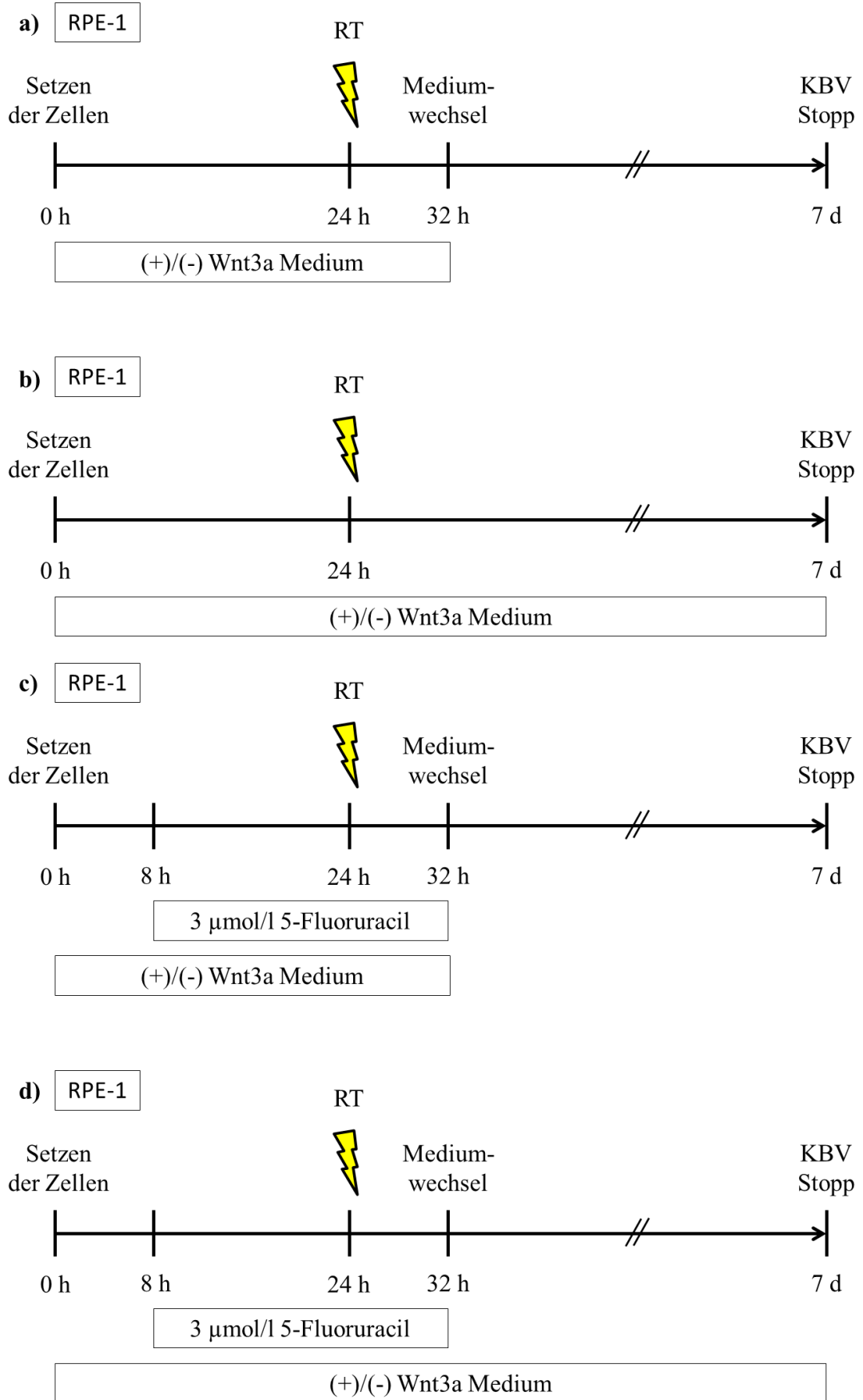


Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf des KBVs mit der Zelllinie RPE-1. a) Radiotherapie (RT) und Behandlung mit (+)/(-) Wnt3a bis 8 h nach Bestrahlung, b) RT und Behandlung mit (+)/(-) Wnt3a bis zum Abstoppen des KBVs, c) Radiochemotherapie (RCT) und Behandlung mit (+)/(-) Wnt3a bis 8 h nach Bestrahlung, d) RCT und Behandlung mit (+)/(-) Wnt3a bis zum Abstoppen des KBVs. Für Details und Abkürzungen siehe Text.

2.2.8.4 Auswertung der Koloniebildungsversuche

Zur Berechnung der Überlebensfraktion der unterschiedlich behandelten Zellen wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden die Mittelwerte der technischen Triplikate ermittelt. Dann wurde die Anwachseffizienz (AE) der Zellen für jede Kondition und jedes biologische Replikat mit Hilfe der jeweiligen nicht bestrahlten Platte bestimmt (siehe Formel 2). Die Anwachseffizienz quantifiziert die Fähigkeit der Zellen adhären Kolonien zu bilden.

$$AE = \frac{\text{Mittelwert der Anzahl der Kolonien in der 0 Gy Platte}}{\text{Anzahl der gesetzten Zellen bei 0 Gy}}$$

Formel 2: Berechnung der Anwachseffizienz

Weiterhin wurde für jede Kondition, jede Bestrahlungsdosis und jedes biologische Replikat die Überlebensfraktion errechnet (siehe Formel 3). Durch die Überlebensfraktion wird ausgedrückt, wie viele Zellen jeder Kondition in der Lage waren, eine Kolonie zu bilden.

$$\text{ÜF (\%)} = \frac{\frac{\text{Mittelwert der Anzahl der Kolonien in der } x \text{ Gy Platte}}{\text{Anzahl der gesetzten Zellen bei } x \text{ Gy}}}{\text{Anwachseffizienz}} \times 100$$

Formel 3: Berechnung der Überlebensfraktion.

Durch die Normalisierung der Überlebensfraktion auf die Anwachseffizienz werden mögliche Einflüsse der unterschiedlichen Behandlung auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen, die nicht direkt auf die veränderte Radio(chemo)therapieresistenz zurückzuführen sind, nicht in die Berechnung der Überlebensfraktion mit einbezogen. Die Überlebensfraktion der nicht bestrahlten Zellen beträgt somit immer 100%.

Die statistische Auswertung der Koloniebildungsversuche wurde zu großen Teilen von Frank Kramer (Institut für Medizinische Statistik, Universität Göttingen) durchgeführt. Es kam ein multiples lineares Regressionsmodell zur Anwendung, in dem die normalisierte Überlebensfraktion die abhängige Variable und die Bestrahlungsdosis, die Behandlungsgruppe (Kontrollgruppe oder behandelte Gruppe) und das biologische Replikat die unabhängigen Variablen darstellten. Es wurden zwei verschiedene Modelle mittels Varianzanalyse verglichen. Die Modelle beinhalteten entweder die

Bestrahlungsdosis und das Replikat oder zusätzlich einen Behandlungseffekt und einen Interaktionsterm zwischen Behandlung und Bestrahlungsdosis. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen (Kendziorra et al. 2011).

3 Ergebnisse

Wie in Kapitel 1.6 *Klinische Problematik und Vorarbeiten* beschrieben, konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass RCT-resistente Rektumkarzinome gegenüber sensiblen Karzinomen eine erhöhte Expression des Wnt-Transkriptionsfaktors TCF7L2 aufweisen (Ghadimi et al. 2005). Daraufhin konnte gezeigt werden, dass durch eine Herunterregulation von TCF7L2 in den kolorektalen Tumorzelllinien SW480 und SW837 eine Strahlensensibilisierung der Zellen erfolgt (Kendziorra et al. 2011). Gegenstand dieser Arbeit war es nun zu untersuchen, ob dieser Einfluss auf die Radiochemotherapieresistenz ausschließlich durch TCF7L2, oder auch durch die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vermittelt wird. Außerdem sollte geprüft werden, ob dieser Effekt auf Tumorzelllinien beschränkt ist, oder aber auch auf nicht-maligne Zellen übertragbar ist. Hierzu wurde der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Normalzelllinie RPE-1 zum einen extern mittels Wnt3a, zum anderen intern via Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen im Rahmen eines Koloniebildungsversuchs bestrahlt und ggf. zusätzlich mit dem Chemotherapeutikum 5-FU behandelt.

3.1 Auswahl der Zelllinie RPE-1

Bei der Zelllinie RPE-1 handelt es sich um eine epitheliale Normalzelllinie, die sehr strahlensensibel ist (Emons et al. 2017). RPE-1-Zellen sind hTERT-immortalisiert und verfügen sowohl über einen stabilen Karyo- als auch Genotyp (Bodnar et al. 1998; Jiang et al. 1999). Die Immunfärbung in Abbildung 7 zeigt die Proteinausstattung von RPE-1-Zellen im Vergleich zu einigen ausgewählten kolorektalen Tumorzelllinien. Das Expressionslevel von Axin2 korreliert mit der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, da bei Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Expression von Axin2 im Rahmen einer negativen Rückkopplungsschleife hochreguliert wird (Lustig et al. 2002). Somit weist die sehr geringe Proteinexpression von Axin2 in RPE-1-Zellen auf eine niedrige Grundaktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs hin (s. Abbildung 7). Dementsprechend eignen sich RPE-1-Zellen gut für die Experimente der vorliegenden Arbeit, bei der die Auswirkungen einer Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radio(chemo)therapieresistenz untersucht wurden.

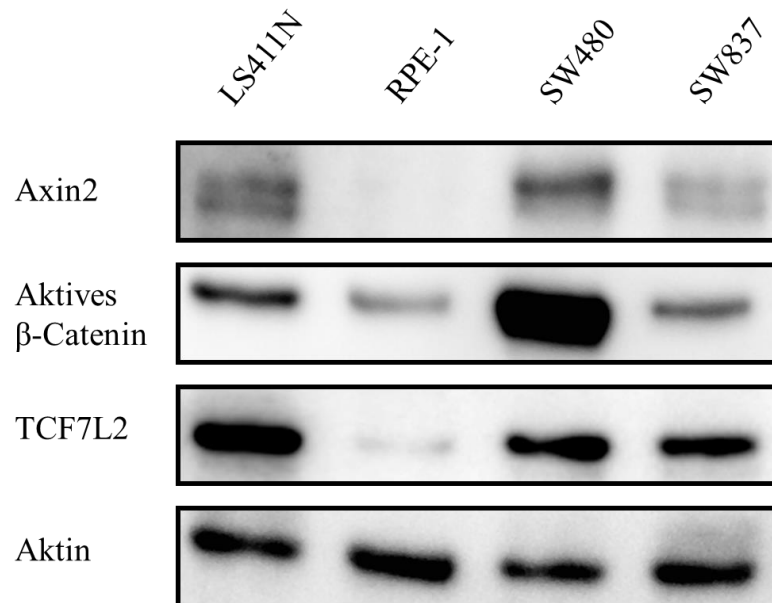


Abbildung 7: Proteinexpression der Zelllinie RPE-1 im Vergleich zu den kolorektalen Tumorzelllinien LS411N, SW480 und SW837. Immunfärbung von Axin2, aktivem β -Catenin, TCF7L2 und Aktin.

3.2 Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a

Um zu testen, ob der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch in nicht-malignen, phänotypisch sowie genetisch weitestgehend unveränderten Zellen eine Radio(chemo)therapieresistenz vermittelt, wurde die epitheliale Normalzelllinie RPE-1 zunächst mit Wnt3a stimuliert und anschließend bestrahlt sowie ggf. zusätzlich mit 5-FU behandelt. Die Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde einerseits per Western Blot via Induktion von Axin2, andererseits per Dual-Luciferase[®] Reporter Assay ermittelt. Die Auswirkungen auf die Radio(chemo)therapieresistenz der Zellen wurde in Koloniebildungsversuchen untersucht (s. Kapitel 3.2.2 *Ergebnisse der Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a*).

3.2.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a

In Vorbereitung auf eben genannte Versuche wurde wie in Kapitel 2.2.7 *Vorversuche zur Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a* beschrieben vorgegangen. Es wurde getestet, ob eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in RPE-1-Zellen durch die Behandlung mit (+) Wnt3a Medium erreicht werden kann, und bei welcher

Behandlungsdauer der Effekt am größten ist. Als Auslesekontrolle diente der Nachweis von Axin2 mittels Western Blot. Als Negativkontrolle fungierten RPE-1-Zellen, die mit (-) Wnt3a Medium behandelt wurden. Wie Abbildung 8 zeigt, ist das Expressionslevel von Axin2 nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit Wnt3a am höchsten. Aufgrund dessen erfolgte die Zellyse im Rahmen des Dual-Luciferase[®] Reporter Assays bzw. die Bestrahlung der Zellen im Rahmen der Koloniebildungsversuche nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit Wnt3a.

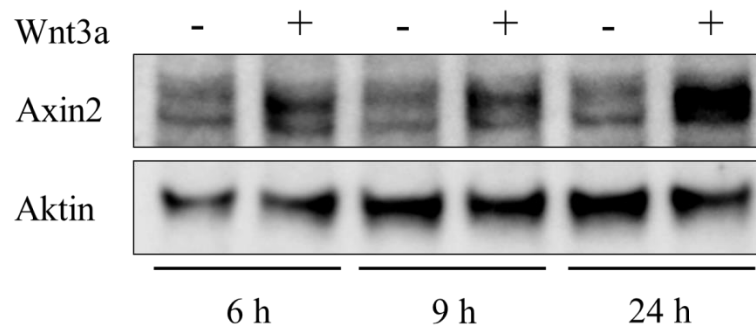


Abbildung 8: Behandlung von RPE-1-Zellen mit (+)/(-) Wnt3a Medium für 6, 9 und 24 h. Immunfärbung von Axin2 und Aktin. Nach 24-stündiger Behandlungsdauer mit Wnt3a ist das Expressionslevel von Axin2 am höchsten. Für Details und Abkürzungen siehe Text.

Weiterhin wurde sowohl die für einen Koloniebildungsversuch erforderliche Anzahl der zu setzenden Zellen als auch die optimale Wachstumsdauer ermittelt (s. hierzu Tabelle 10 in Kapitel 2.2.8 *Koloniebildungsversuch*).

3.2.2 Ergebnisse der Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a

Um eine externe Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu erzielen, wurden RPE-1-Zellen mit Wnt3a-haltigem Zellkulturmedium ((+) Wnt3a Medium) behandelt. Wnt3a ist ein löslicher Ligand des *Frizzled*-Rezeptors, durch dessen Bindung der Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiviert wird (Cajanek et al. 2010). Als Negativkontrolle fungierten RPE-1-Zellen, die mit (-) Wnt3a Medium behandelt wurden (s. Kapitel 2.2.2 *Konditionieren von Wnt3a-haltigem Medium*).

Zunächst wurde das hergestellte (+) und (-) Wnt3a Medium, welches für den Dual-Luciferase[®] Reporter Assay und die Koloniebildungsversuche mit RPE-1-Zellen verwendet wurde, getestet. Hierzu wurden RPE-1-Zellen für 24 Stunden mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium inkubiert und anschließend lysiert. Die Proteine des Zellysats wurden

zum einen in eine Cytosol- und in eine Zellkernfraktion aufgetrennt, zum anderen als Gesamtprotein untersucht (s. Kapitel 2.2.3.2 *Zellyse und Proteinextraktion*). Wie die Immunfärbung in Abbildung 9 zeigt, wird durch eine 24-stündige Inkubation mit Wnt3a sowohl das Expressionslevel von Axin2 als auch von aktivem β -Catenin gesteigert. Die Histon-Deacetylase 1 (HDAC1) ist ein Marker für die Zellkernfraktion der Proteine.

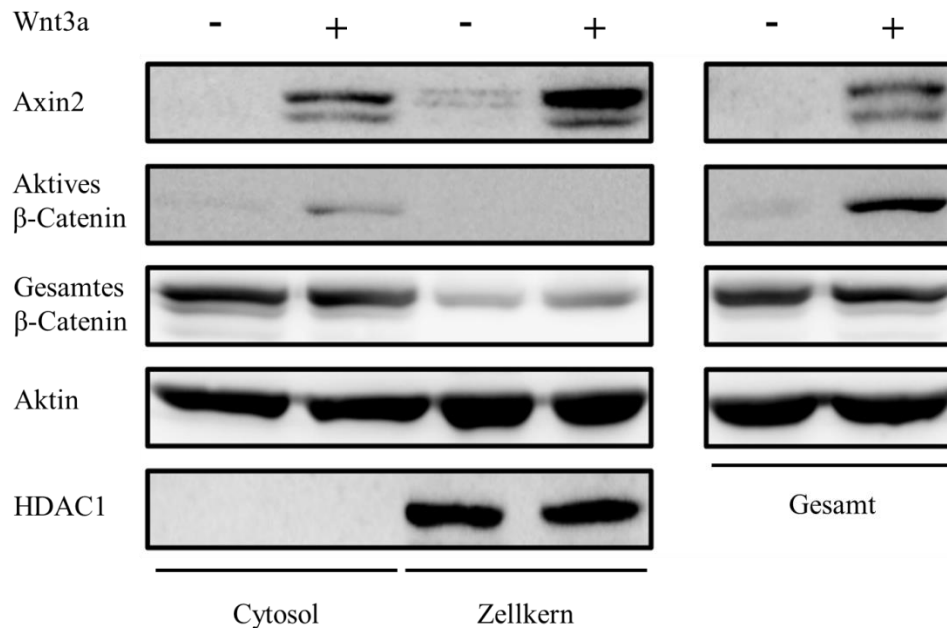


Abbildung 9: Gesteigerte Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin in RPE-1-Zellen, die für 24 h mit (+) Wnt3a Medium inkubiert wurden, im Vergleich zu RPE-1-Zellen, die für 24 h mit (-) Wnt3a Medium inkubiert wurden. Links: Auftrennung der Proteine in eine Cytosol- und Kernfraktion, rechts: Gesamtprotein. Immunfärbung von Axin2, aktivem β -Catenin, gesamtem β -Catenin, Aktin und HDAC1. Siehe auch Emons et al. (2017).

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Wnt3a auch zu einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führt, wurde ein Dual-Luciferase[®] Reporter Assay mit RPE-1-Zellen, die für 24 Stunden mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium behandelt wurden, durchgeführt (s. Kapitel 2.2.6 *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay*). Dieser ermittelt die Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes. Durch Bindung des TCF/ β -Catenin-Komplexes an das SuperTopFlash Reporter Plasmid erfolgt die Expression der Firefly Luciferase, wobei das Expressionslevel mit der Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes korreliert. Somit stellt die relative Luciferase-Aktivität ein quantitatives Maß für die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs dar.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Behandlung mit Wnt3a die Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes um ca. das 800-fache gesteigert wird ($p = 0,0105$) (s. Abbildung 10).

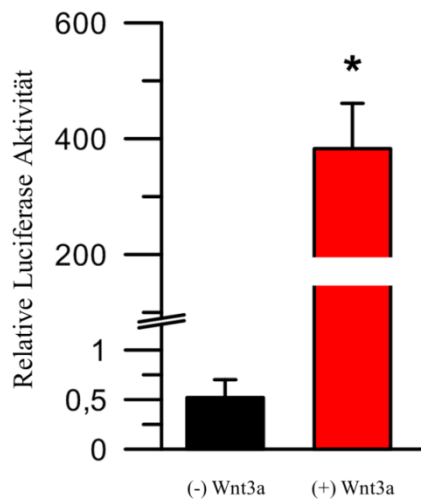


Abbildung 10: Dual-Luciferase[®] Reporter Assay mit RPE-1-Zellen, die für 24 h mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium behandelt wurden. Durch Behandlung mit Wnt3a wird die Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes um ca. das 800-fache gesteigert ($p = 0,0105$) ($n = 3$). Für Details und Abkürzungen siehe Text. Siehe auch Emons et al. (2017).

Nachfolgend wurde mit RPE-1-Zellen, die mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium behandelt wurden, ein Koloniebildungsversuch (KBV) durchgeführt (s. Kapitel 2.2.8 *Koloniebildungsversuch*). Hierbei wurden die Zellen entweder ausschließlich bestrahlt (RT) oder zusätzlich mit dem Chemotherapeutikum 5-FU behandelt (RCT). Zusätzlich wurde sowohl im Rahmen der RT als auch der RCT die Dauer der Behandlung mit dem konditionierten Medium variiert. Entweder wurde das konditionierte Medium 8 Stunden nach der Bestrahlung durch einen Wechsel des Zellkulturmediums entfernt, sodass die Behandlungsdauer 32 Stunden betrug, oder die Zellen wurden bis zum Abstoppen des KBVs mit konditioniertem Medium behandelt. In diesem Fall betrug die Behandlungsdauer 144 Stunden ausgehend vom Zeitpunkt der Bestrahlung der Zellen. Der genaue Versuchsablauf ist in Kapitel 2.2.8.2 *Koloniebildungsversuch mit der Zelllinie RPE-1 unter Behandlung mit (+)/(-) Wnt3a Medium* beschrieben. Abbildung 11 zeigt die Überlebensfraktion von RPE-1-Zellen, die entweder mit (+) oder (-) Wnt3a Medium behandelt worden sind, in Abhängigkeit der Strahlendosis. Die Grafen a) und b) stellen die Überlebensfraktion bei alleiniger Bestrahlung der Zellen dar (RT), die Grafen c) und d) zeigen die Überlebensfraktion bei Radiochemotherapie (RCT). Im linken Teil der Abbildung (Grafen a) und c)) wurden die Zellen bis 8 Stunden nach Bestrahlung mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium behandelt (Behandlungsdauer: 32 Stunden), im rechten Teil (Grafen b) und d)) wurde das konditionierte Medium bis zum

Abstoppen des KBVs auf den Zellen belassen (Behandlungsdauer ab Bestrahlung: 144 Stunden). Wie Abbildung 11 zeigt, wird durch die Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a sowohl die Strahlentherapieresistenz (32 h: $p = 0,000185$, 144 h: $p = 0,0102$) als auch die Radiochemotherapieresistenz (32 h: $p = 0,0000233$, 144 h: $p = 0,00211$) signifikant erhöht. Dieser Effekt tritt unabhängig von der hier getesteten Behandlungsdauer mit Wnt3a auf.

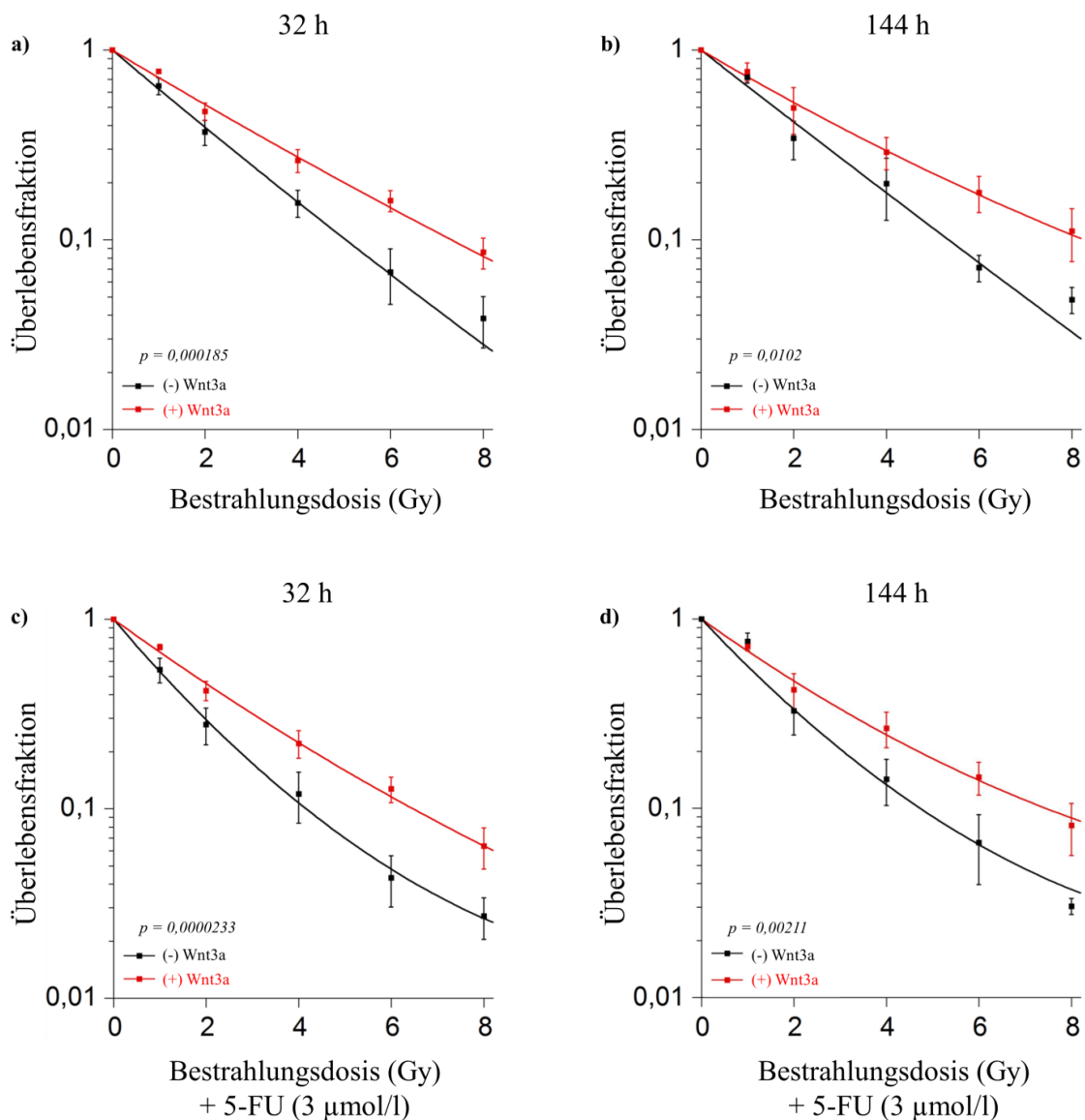


Abbildung 11: Überlebensfraktion der Zelllinie RPE-1 bei Behandlung mit (+) Wnt3a Medium (rote Linie) im Vergleich zur Behandlung mit (-) Wnt3a Medium (schwarze Linie) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis. a) RT, Behandlungsdauer mit (+)/(-) Wnt3a 36 Stunden ($n = 3$), b) RT, Behandlungsdauer mit (+)/(-) Wnt3a 144 Stunden ab Bestrahlung ($n = 3$), c) RCT, Behandlungsdauer mit (+)/(-) Wnt3a 36 Stunden ($n = 3$), d) RCT, Behandlungsdauer mit (+)/(-) Wnt3a 144 Stunden ab Bestrahlung ($n = 3$). Durch die Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a wird unabhängig von der Behandlungsdauer sowohl die Strahlentherapieresistenz als auch Radiochemotherapieresistenz der Zellen signifikant gesteigert. Für Details und Abkürzungen siehe Text. Siehe auch Emons et al. (2017).

3.3 Ergebnisse der Etablierung der Lipofektion der Zelllinie RPE-1 mit X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent

Wie in Kapitel 2.2.4 *Transfektion* beschrieben, wurde initial die Methode der Lipofektion der Zelllinie RPE-1 mit „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“ in Anlehnung an die Herstellerangaben für eine 12-Well-Platte etabliert. Die Methode wurde im Hinblick auf die Parameter Anzahl der zu setzenden Zellen, Verhältnis von DNA zu Lipid und Verwendung von FBS-freiem oder FBS-haltigem Zellkulturmedium optimiert. Als optimale Anzahl der zu setzenden Zellen ergab sich 75.000 Zellen pro Well, da bei dieser Anzahl die Zellen nach 24 Stunden eine Konfluenz von 50% aufwiesen. Bei 50% Konfluenz ist nach Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe die Transfektionseffizienz am größten. Die Etablierung der übrigen Parameter erfolgte unter Verwendung des für *green fluorescent protein* (GFP) kodierenden „Luc Positiv Control“ Vektors, sodass die Beurteilung der Transfektionseffizienz visuell durch die Intensität des grünen Leuchtens unter dem Fluoreszenzmikroskop 24 Stunden nach Transfektion bestimmt werden konnte (s. Kapitel 2.2.4 *Transfektion*). Wie Abbildung 12 zeigt, ergibt sich die höchste Transfektionseffizienz bei einem Verhältnis von 1 µg DNA zu 1 µg Lipid und der Verwendung von FBS-haltigem Zellkulturmedium.

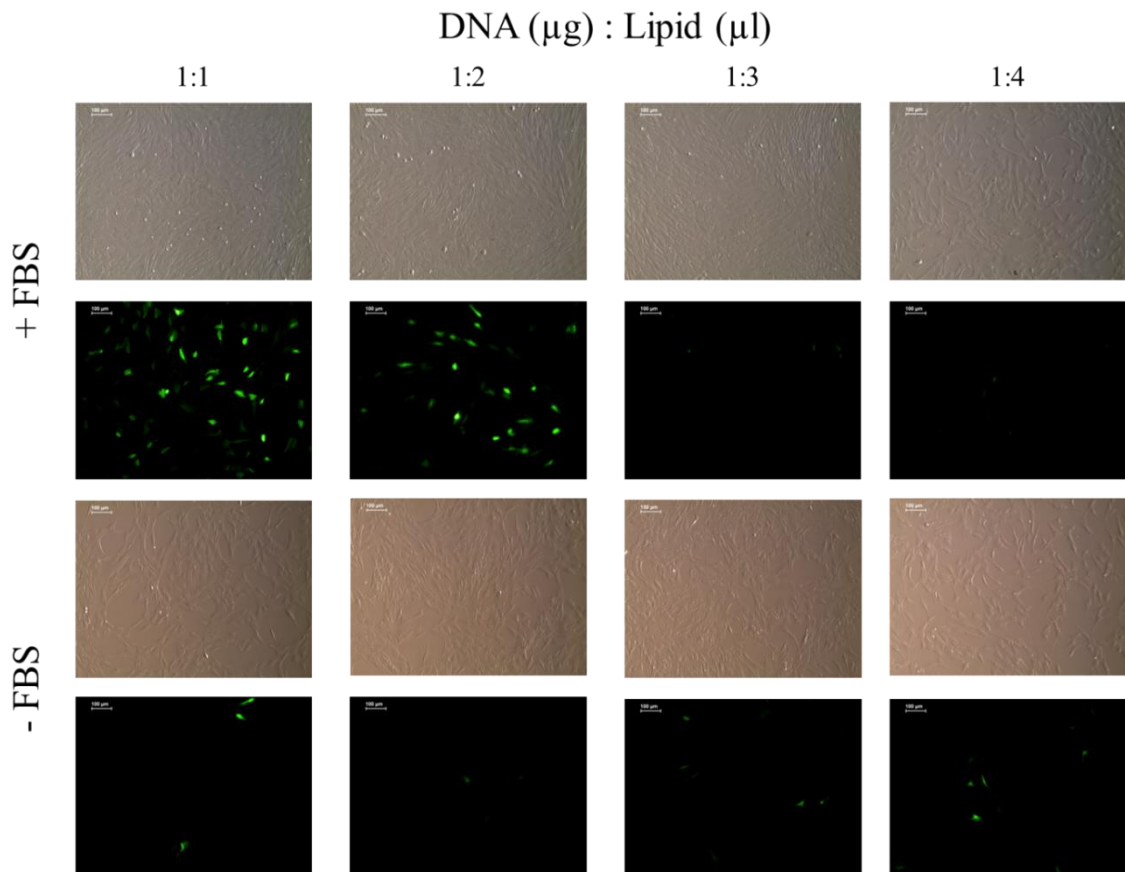


Abbildung 12: Etablierung der Lipofektion der Zelllinie RPE-1 mit „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“. Visuelle Beurteilung der Transfektionseffizienz 24 h nach Transfektion von RPE-1-Zellen mit dem für *green fluorescent protein* (GFP) kodierenden „Luc Positiv Control“ Vektor. Die größte Transfektionseffizienz ergibt sich bei einem Verhältnis von 1 μg DNA zu 1 μl Lipid und Verwendung von FBS-haltigem Zellkulturmedium. 1. und 3. Zeile: Lichtmikroskopische Bilder; 2. und 4. Zeile: fluoreszenzmikroskopische Bilder, dem jeweilig darüber dargestellten lichtmikroskopischen Ausschnitt entsprechend. + FBS: FBS-haltiges Zellkulturmedium, - FBS: FBS-freies Zellkulturmedium.

3.4 Ergebnisse der Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1

RPE-1-Zellen wurden zunächst transient, später auch stabil mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y transfiziert (s. Kapitel 2.2.6 *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay* und 2.2.5 *Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1*). Das Genprodukt dieses Vektors ist eine mutierte, konstitutiv aktive Form von β -Catenin (S33Y). Durch die Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) wird die Endstrecke des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs stark aktiviert (Morin et al. 1997). Als Negativkontrolle fungierten RPE-1-Zellen, die mit dem *empty vector* pCI-neo transfiziert wurden.

3.4.1 Transiente Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y)

RPE-1-Zellen wurden mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y bzw. dem *empty vector* pCI-neo transient transfiziert. Daraufhin zeigten Zellen, die mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y transfiziert wurden, ein deutlich höheres Expressionslevel von sowohl aktivem β -Catenin als auch gesamtem β -Catenin im Vergleich zu Zellen, die mit dem *empty vector* transfiziert wurden (s. Abbildung 13). Die Immunfärbung wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt.

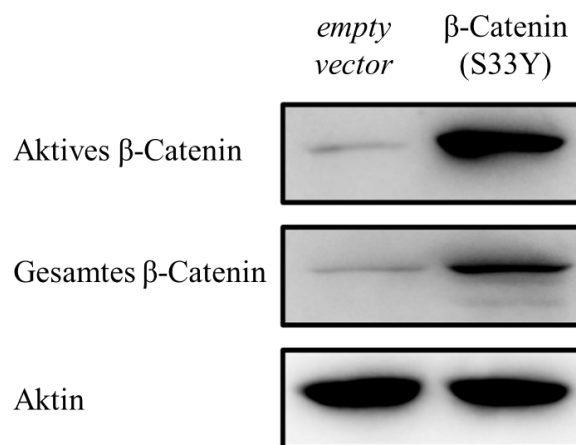


Abbildung 13: Gesteigerte Proteinexpression von aktivem und gesamtem β -Catenin in RPE-1-Zellen, die mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y transient transfiziert wurden, im Vergleich zu RPE-1-Zellen, die mit dem *empty vector* transient transfiziert wurden. Immunfärbung von aktivem β -Catenin, gesamtem β -Catenin und Aktin. Siehe auch Emons et al. (2017).

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von β -Catenin auch zu einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führt, wurde nun ein Dual-Luciferase[®] Reporter Assay durchgeführt (s. Kapitel 2.2.6 *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay*). Es wurde die relative Luciferase-Aktivität in RPE-1-Zellen, die zuvor mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y transient transfiziert wurden, gemessen. Als Negativkontrolle fungierten RPE-1-Zellen, die mit dem *empty vector* pCI-neo transient transfiziert wurden (s. Kapitel 2.2.6 *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay*). Abbildung 14 stellt dar, dass bei Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) die relative Luciferase-Aktivität in RPE-1-Zellen stark gesteigert wird ($p = 0,0002$). Somit konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) die Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes und damit die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in RPE-1-Zellen signifikant gesteigert wird.

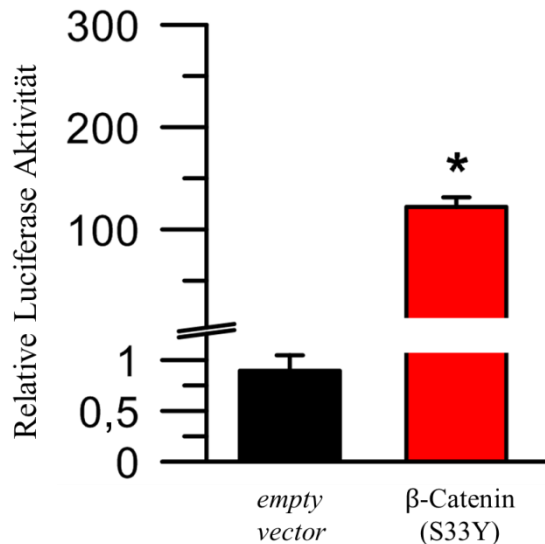


Abbildung 14: Dual-Luciferase[®] Reporter Assay der Zelllinie RPE-1, die mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y bzw. dem *empty vector* pCI-neo transient transfiziert wurden. Durch Überexpression von konstitutiv aktivem β -Catenin (S33Y) lässt sich die relative Luciferase-Aktivität in RPE-1-Zellen signifikant steigern ($p = 0,0002$) ($n = 3$). Für Details und Abkürzungen siehe Text. Siehe auch Emons et al. (2017).

3.4.2 Stabile Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y)

Da bei einer transienten Transfektion nie alle Zellen transfiziert werden, muss zur Etablierung stabiler Zellpopulationen eine Selektion erfolgen. Hierzu verfügt sowohl der Vektor pCI-neo-b-cat S33Y als auch der *empty vector* pCI-neo über das Resistenzgen Neo, das eine Geneticin(G-418)-Resistenz vermittelt. Dementsprechend werden durch ein Versetzen des Zellkulturmediums mit G-418 sowohl alle nicht-vektortragenden Zellen als auch alle vektortragenden Zellen, die den Vektor nicht oder nicht korrekt ablesen, abgetötet. Die daraus entstandenen stabilen Zellpopulationen wurden als RPE-1-S33Y bzw. RPE-1-EV bezeichnet. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 2.2.5 *Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1* beschrieben.

Mit den Zelllinien RPE-1-S33Y und RPE-1-EV wurde ebenfalls ein Dual-Luciferase[®] Reporter Assay durchgeführt (s. Kapitel 2.2.6 *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay*). Die Ergebnisse zeigen, dass bei stabiler Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) die Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes gegenüber der Kontrolle ebenfalls stark gesteigert wird ($p = 0,0017$) (s. Abbildung 15).

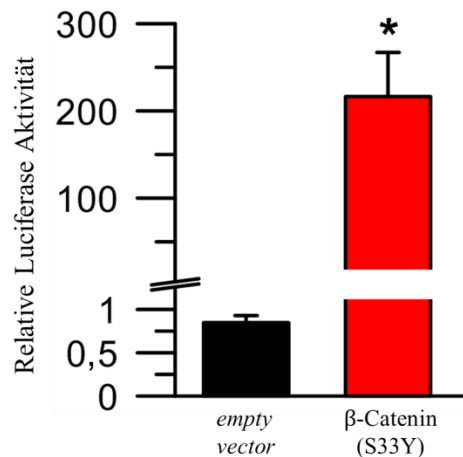


Abbildung 15: Dual-Luciferase[®] Reporter Assay der Zelllinien RPE-1-S33Y/EV, die zuvor mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y bzw. dem *empty vector* pCI-neo stabil transfiziert wurden. Durch stabile Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) wird die Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes um ca. das 250-fache gesteigert ($p = 0,0017$) ($n = 3$). Für Details und Abkürzungen siehe Text. Siehe auch Emons et al. (2017).

Um nun zu überprüfen, ob die Überexpression von β -Catenin und die damit einhergehende Aktivitätssteigerung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs Auswirkungen auf die Radio(chemo)therapieresistenz hat, wurde mit den Zelllinien RPE-1-S33Y und RPE-1-EV ein Koloniebildungsversuch durchgeführt (s. Kapitel 2.2.8 *Koloniebildungsversuch*). Hierbei wurden die Zellen entweder ausschließlich bestrahlt (RT) oder zusätzlich mit dem Chemotherapeutikum 5-FU behandelt (RCT). Wie Abbildung 16 zeigt, wird durch die stabile Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) sowohl die Strahlentherapieresistenz ($p = 0,0098$) als auch Radiochemotherapieresistenz ($p = 0,00187$) signifikant erhöht.

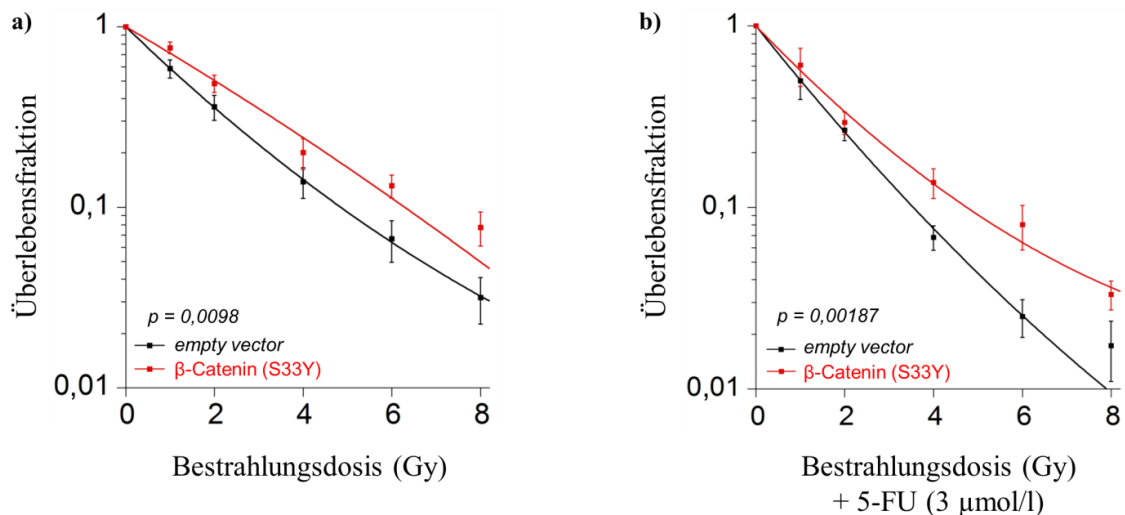


Abbildung 16: Überlebensfraktion der Zelllinie RPE-1-S33Y (rote Linie) im Vergleich zur Negativkontrolle (RPE-1-EV, schwarze Linie) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis. a) alleinige Bestrahlung der Zellen (n = 3), b) RCT (n = 3). Durch die stabile Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) wird sowohl die Strahlentherapieresistenz als auch Radiochemotherapieresistenz der Zellen signifikant gesteigert. Für Details und Abkürzungen siehe Text. Siehe auch Emons et al. (2017).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Normalzelllinie RPE-1 auf unterschiedliche Weise stimuliert. Einerseits erfolgte eine externe Stimulation mittels Wnt3a, einem physiologischen Liganden des *Frizzled*-Rezeptors, andererseits erfolgte eine interne Stimulation durch Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y), welches nicht abgebaut werden kann. Die erfolgreiche Aktivierung des Signalweges konnte jeweils durch eine deutliche Steigerung der relativen Luciferase-Aktivität im Reporter Assay nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl die Behandlung mit Wnt3a als auch die Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) zu einer gesteigerten Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin führt. In den Koloniebildungsversuchen wiesen sowohl mit Wnt3a behandelte RPE-1-Zellen, als auch RPE-1-Zellen, in denen mutiertes β -Catenin (S33Y) überexprimiert wurde, eine signifikant gesteigerte Radio(chemo)therapieresistenz auf. Somit legen die Ergebnisse nahe, dass die Radio(chemo)therapieresistenz der Zellen durch die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beeinflusst wird, und nicht alleinig durch TCF7L2. Außerdem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass dieser Effekt nicht nur auf kolorektale Tumorzelllinien beschränkt ist, sondern auch auf Normalzelllinien übertragbar ist.

4 Diskussion

Das lokal fortgeschrittene Rektumkarzinom (UICC Stadium II und III) wird leitliniengerecht mittels neoadjuvanter Radiochemotherapie mit anschließender Operation und ggf. adjuvanter Chemotherapie behandelt (Leitlinienprogramm 2017). Das Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie ist jedoch sehr heterogen und reicht von kompletter Remission (*Responder*) bis hin zu vollständiger Resistenz (*Nonresponder*). Für Patienten mit *a priori* resistenten Tumoren ist dies problematisch, da sie den potentiellen Nebenwirkungen einer Radiochemotherapie ausgesetzt sind, ohne von der Therapie zu profitieren. Demnach erscheint es sinnvoll, die Therapie zu individualisieren. Dies erfordert die Identifikation von prädiktiven Biomarkern. Außerdem müssen die molekularen Grundlagen der Radiochemotherapieresistenz besser verstanden werden. So könnten neue molekulare Zielstrukturen als potentielle therapeutische Ansatzpunkte erschlossen werden, um zukünftig eine Sensibilisierung von *a priori* resistenten Tumoren zu erwirken (Grade et al. 2012; Liersch et al. 2010).

Mit dieser Zielsetzung führte unsere Arbeitsgruppe Genexpressionsanalysen an Gewebeproben von lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen, die mittels neoadjuvanter Radiochemotherapie behandelt wurden, durch (Ghadimi et al. 2005). Der Vergleich der Genexpressionsprofile von *Respondern* und *Nonrespondern* ergab, dass in resistenten Tumoren der Transkriptionsfaktor TCF7L2, der im Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Schlüsselrolle einnimmt, hochreguliert ist (s. Kapitel 1.7 *Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg*). Weiterführend wurde ein *in-vitro*-Modell mit zwölf humanen kolorektalen Tumorzelllinien erstellt. In Analogie zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms wurden die Zellen einer Radiochemotherapie zugeführt (s. Anhangsabbildung 1). Die Korrelation der Überlebensfraktion mit den prätherapeutischen Genexpressionsprofilen der Zelllinien wies ebenfalls auf eine Abhängigkeit der Radiochemotherapieresistenz von der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs hin (Spitzner et al. 2010). In einer weiteren Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Herunterregulation des in den resistenten kolorektalen Tumorzelllinien SW480 und SW837 überexprimierten Transkriptionsfaktors TCF7L2 eine Strahlensensibilisierung der Zellen bewirkt (Kendziorra et al. 2011).

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei TCF7L2 um einen Schlüsseltranskriptionsfaktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, jedoch werden auch β -Catenin-unabhängige Funktionen beschrieben (Grumolato et al. 2013; Wallmen et al. 2012).

Daher war bisher unklar, ob die von Kendziorra et al. (2011) beschriebene Radiotherapiesensitivierung von kolorektalen Tumorzellen durch die Herunterregulation von TCF7L2 auf eine TCF7L2-spezifische Funktion zurückzuführen ist, oder aber durch eine Aktivitätsminderung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu erklären ist. Zudem ist es von grundlegendem Interesse, ob dieser Effekt auf Tumorzelllinien beschränkt ist, oder aber auch auf nicht maligne Zellen übertragbar ist.

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente mit der Normalzelllinie RPE-1 durchgeführt. Es wurde der Wnt/ β -Catenin-Signalweg zum einen extern mittels Wnt3a, zum anderen intern via Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) stimuliert. Anschließend wurde der Einfluss der Behandlung auf die Radio(chemo)sensibilität der Zellen getestet.

4.1 Die Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a führt zu einer Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz der Zellen

Um den Einfluss der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radio(chemo)therapieresistenz zu testen, wurden phänotypisch normale Epithelzellen (RPE-1-Zellen) mit Wnt3a-haltigem Zellkulturmedium behandelt (s. Kapitel 3.2.2 *Ergebnisse der Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a*). Wnt3a ist ein löslicher Ligand des *Frizzled*-Rezeptors, bei dessen Bindung eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erfolgt (Cajanek et al. 2010).

Nach Behandlung der RPE-1-Zellen mit Wnt3a Medium konnte mittels Western Blot eine deutlich erhöhte Proteinexpression von aktivem β -Catenin und Axin2 nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 9). Aktives β -Catenin ist essentieller Bestandteil der Signaltransduktionskette im Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Behrens et al. 1996; Molenaar et al. 1996) und auch eine erhöhte Expression von Axin2 zeigt eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs an (Lustig et al. 2002). Per Dual-Luciferase[®] Reporter Assay konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von RPE-1-Zellen mit Wnt3a zu einer deutlichen Steigerung der Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes führt (vergleiche Abbildung 10). Hieraus folgt, dass im

verwendeten Zellkulturmodell die Stimulation mit Wnt3a eine Aktivitätssteigerung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bewirkt.

Ähnliche Experimente wurden bereits früher beschrieben. Schon 1998 konnten Shibamoto et al. (1998) zeigen, dass eine Behandlung von L Cells mit löslichem Wnt3a zu einer Akkumulation von β -Catenin führt (Shibamoto et al. 1998). Yun et al. (2005) stimulierten die fibroblastische Zelllinie NIH3T3 mit Wnt3a und wiesen eine hierdurch erhöhte Expression von β -Catenin sowie eine gesteigerte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels eines Luciferase Assays nach (Yun et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus im Koloniebildungsversuch (s. Kapitel 2.2.8 *Koloniebildungsversuch*) gezeigt werden, dass mit Wnt3a stimulierte RPE-1-Zellen signifikant strahlenresistenter als unstimulierte RPE-1-Zellen sind. Dieser Unterschied zeigte sich auch nach Hinzunahme einer Behandlung mit 5-FU im Sinne einer Radiochemotherapie und war unabhängig von der Dauer der Wnt3a-Exposition (vergleiche Abbildung 11).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei der Normalzelllinie RPE-1 eine externe Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Wnt3a zu einer Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz führt. Die Resultate stehen im Einklang mit einigen Studien, die den Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz von verschiedenen Tumorentitäten und Normalgewebe untersucht haben; ausgewählte Studien werden im Folgenden in den entsprechenden Kapiteln besprochen. Es muss jedoch beachtet werden, dass für Wnt3a auch Effekte beschrieben sind, die unabhängig vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg auftreten (Acebron und Niehrs 2016). Um zu überprüfen, ob ein β -Catenin-unabhängiger Mechanismus der Vermittlung der Radio(chemo)therapieresistenz bei RPE-1-Zellen zu Grunde liegt, wurde in den nachfolgenden Experimenten der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in RPE-1-Zellen mittels Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) aktiviert.

4.2 Die Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in RPE-1-Zellen führt zu einer Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz der Zellen

Zur Verifizierung der bisherigen Annahme, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz bewirke, erfolgte in RPE-1-Zellen eine gezielte Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) durch Transfektion der Zellen (s. Kapitel 3.4 *Ergebnisse der Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) in der Zelllinie RPE-1*). Mutiertes β -Catenin (S33Y) ist konstitutiv aktiv. Durch die Mutation Serin (S) 33 zu Tyrosin (Y) kann es nicht GSK3-abhängig phosphoryliert und somit auch nicht proteasomal abgebaut werden, sodass es zu einer Akkumulation von aktivem β -Catenin kommt. Hierdurch wird die Endstrecke des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs stark aktiviert (Morin et al. 1997; Xue et al. 2015).

Nach transienter Transfektion der Zellen mit dem β -Catenin Vektor (S33Y) konnte per Western Blot ein erhöhtes Expressionslevel von aktivem und gesamtem β -Catenin nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 13). Die Funktionalität der Überexpression von β -Catenin im Sinne einer Aktivierung der Endstrecke des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde via Dual-Luciferase[®] Reporter Assay bestätigt; hier zeigte sich eine signifikante (ca. 100-fache) Steigerung der Transkriptionsaktivität des TCF/ β -Catenin-Komplexes (vergleiche Abbildung 14). Eine noch deutlichere Steigerung der Transkriptionsaktivität (ca. 250-fach) ergab der Dual-Luciferase[®] Reporter Assay bei RPE-1-Zellen mit einer stabilen Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) (vergleiche Abbildung 15). Dies lässt sich gut mit der nur partiellen Transfektionseffizienz bei transienter Transfektion erklären. Dementsprechend wird hierbei nur in einem Teil der Zellen mutiertes β -Catenin (S33Y) exprimiert und auch nur in diesem Anteil der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert. Zur Etablierung von stabilen Zellpopulationen erfolgte eine Selektion der transfizierten Zellen mit dem Antibiotikum Geneticin (G-418), wodurch resistenzvermittelt ausschließlich Zellen mit funktionsfähigem Vektor selektioniert wurden. Die Gesamtaktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs fällt somit bei der stabil transfizierten Zellpopulation im Vergleich zur transient transfizierten Zellpopulation stärker aus.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit per Koloniebildungsversuch ermittelt, dass RPE-1-Zellen, die mutiertes β -Catenin (S33Y) überexprimieren, deutlich strahlenresistenter sind als RPE-1-Zellen mit physiologischer β -Catenin Expression. Diese unterschiedliche Therapieresistenz bestand ebenfalls bei einer 5-FU-basierten Radiochemotherapie (vergleiche Abbildung 16).

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der Normalzelllinie RPE-1 eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu einer signifikanten Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz führt.

Dieses Ergebnis steht auch mit den Resultaten von Kendziorra et al. im Einklang, die den gewissermaßen umgekehrten Effekt nachweisen konnte. Kendziorra et al. beschrieben eine Radiotherapiesensitivierung von resistenten kolorektalen Tumorzellen durch die Herunterregulation von TCF7L2, einem Schlüsseltranskriptionsfaktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Kendziorra et al. 2011). Eine weitere interessante Studie wurde Ende 2017 von Wang et al. (2017) publiziert. Sie konnten zeigen, dass in Gliom-initiiierenden Zellen das zytosolische Protein Cyclophilin A die Interaktion zwischen β -Catenin und TCF7L2 steigert, was zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität führt, woraufhin sich eine gesteigerte Radiotherapieresistenz beobachten ließ (Wang et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es sich bei der Vermittlung der Radiotherapieresistenz eher nicht um eine TCF7L2-spezifische Funktion handelt, sondern vermutlich durch die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu erklären ist. Ferner weisen die Ergebnisse darauf hin, dass dieser Effekt nicht nur auf Tumorzellen beschränkt, sondern auch auf Normalzellen wie RPE-1 übertragbar ist.

4.3 Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz verschiedener Tumorentitäten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs sowohl durch Stimulation mit Wnt3a als auch durch Überexpression von konstitutiv aktivem β -Catenin (S33Y) in der epithelialen Normalzelllinie RPE-1 eine signifikante Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz bewirkt. Von großem Interesse ist jedoch auch der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-

Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz von Tumoren. Hiermit beschäftigen sich viele Forschergruppen und auf ausgewählte Publikationen soll im Folgenden eingegangen werden. Aus Studien unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs einen maßgeblichen Einfluss auf die Radio(chemo)therapieresistenz von kolorektalen Tumorzellen hat. So führt eine siRNA vermittelte Inhibierung von β -Catenin in den kolorektalen Tumorzelllinien LS1034, SW480 und SW837 zu einer Radio(chemo)therapiesensibilisierung (Emons et al. 2017). Die Vermittlung der Radiotherapieresistenz durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg scheint nicht nur auf kolorektale Karzinomzellen beschränkt zu sein, sondern wird auch für andere Tumorentitäten beschrieben. Beispielsweise fanden Yin et al. (2016) heraus, dass beim dreifach negativen Mammakarzinom eine Herunterregulation von β -Catenin zu einer Radiotherapiesensibilisierung der Zellen führt. Sowohl eine Behandlung der Mammakarzinomzellen mit Wnt3a als auch eine Überexpression von β -Catenin bewirke hingegen eine gesteigerte Radiotherapieresistenz (Yin et al. 2016). Cojoc et al. (2015) erforschten die Radiotherapieresistenz-vermittelnden Mechanismen beim Prostatakarzinom. Sie konnten zeigen, dass die Expression der Aldehyd-Dehydrogenase durch den β -Catenin/TCF-Transkriptionskomplex reguliert wird, wobei eine erhöhte Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität mit einer gesteigerten Radiotherapieresistenz vergesellschaftet war. Eine Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch den kleinemolekularen Inhibitor XAV939 bzw. durch siRNA vermittelte Inhibierung von β -Catenin resultierte in einer verminderten Expression der Aldehyd-Dehydrogenase und einer Radiotherapiesensibilisierung *a priori* resistenter Tumorzellen (Cojoc et al. 2015). Auch beim Glioblastom wurde eine Radiotherapiesensibilisierung durch die Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beobachtet (Kim et al. 2012). Ein weiteres Beispiel liefern Chang et al (2008), die die Radiotherapieresistenz von Kopf-Hals-Tumoren untersuchten. Sie beschreiben, dass durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Inhibition von GSK3 β die Radiotherapieresistenz der Tumorzellen gesteigert wird. Durch die Expressionssteigerung von COX-2, das Produkt eines Wnt-Effektorgens, wurde eine Induktion von Ku beobachtet. Ku ist maßgeblich an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt und das Ku-Expressionslevel ist mit der Radiotherapieresistenz von Tumorzellen assoziiert. Interessanterweise führte eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Zellen, in denen COX-2 herunterreguliert ist, weder zu einer Induktion von Ku noch zu einer Änderung der Radiotherapiesensibilität (HW Chang et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch für andere Tumorentitäten neben dem kolorektalen Karzinom eine Vermittlung der Radiotherapieresistenz durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg beschrieben ist. Somit stellt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch eine mögliche therapeutisch Zielstruktur dar, durch dessen Inhibierung eine Radiotherapiesensibilisierung von Tumorzellen erreicht werden könnte.

4.4 Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz von Normalgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radio(chemo)therapieresistenz der epithelialen Normalzelllinie RPE-1 untersucht. RPE-1-Zellen weisen eine geringe Grundaktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf und sind sehr strahlensensibel (Chen et al. 2012). Sie verfügen über einen stabilen Karyo- und Genotyp (Bodnar et al. 1998; Jiang et al. 1999). Daher eignen sie sich gut für experimentelle Arbeiten, bei denen Vorgänge und Eigenschaften von Normalgewebe untersucht werden sollen.

Unterschiedliche Studien haben bereits ergeben, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bei verschiedenen Tumorentitäten in einer Steigerung der Radiotherapieresistenz resultiert (s. Kapitel 4.3 *Der Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz verschiedener Tumorentitäten*). In dieser Arbeit wurde der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Normalzelllinie RPE-1 sowohl extern via Wnt3a als auch intern mittels Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) aktiviert. Die angeschlossenen Koloniebildungsversuche zeigten, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu einer signifikanten Steigerung der Radio(chemo)therapieresistenz führte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei der Vermittlung der Radiotherapieresistenz durch die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs um einen grundsätzlichen Mechanismus handelt, der nicht nur auf Tumorzellen beschränkt ist, sondern auch auf Normalgewebe übertragbar ist. Diese Erkenntnis ist von hoher klinischer Relevanz, da eine Radiotherapie zu erheblichen Nebenwirkungen durch Schädigung von Normalgewebe führen kann. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg könnte somit einen therapeutischen Ansatzpunkt zur Reduktion Radiotherapie-induzierter Nebenwirkungen darstellen.

In der Literatur finden sich bereits erste Hinweise, die genau diesen Ansatz verfolgen. So widmeten sich Hai et al. (2012) der Problematik, dass Patienten mit einem Tumor der Kopf-Hals-Region nach erfolgter Radiotherapie häufig an Mundtrockenheit aufgrund einer Schädigung der Speicheldrüsen leiden. Hai et al. (2012) etablierten ein präklinisches Modell, wobei sie transgene Mäuse mit induzierbarer Expression des Wnt-Liganden Wnt1 im Kopf-Hals-Bereich bestrahlten. Sie konnten zeigen, dass bei einer simultan zur Bestrahlung durchgeführten, transienten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Wnt1 die Radiotherapie-induzierte Hyposalivation vermindert werden konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch eine Radiotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren entstehenden Schäden der Speicheldrüsen durch eine transiente Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs reduziert werden könnten (Hai et al. 2012).

Auch Zhao et al. (2009) konnten in einem Mausmodell zeigen, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs das Auftreten von Radiotherapie-induzierter oraler Mukositis vermindert (Zhao et al. 2009).

Eine weitere Nebenwirkung einer Radiotherapie ist das Auftreten von Osteoporose im Strahlenfeld durch die Schädigung von Osteoblasten. Einer der strahleninduzierten Mechanismen, auf denen die Zellschädigung beruht, ist das Setzen von Doppelstrangbrüchen in der DNA. Chandra et al. (2015) konnten *in vitro* und *ex vivo* zeigen, dass eine Behandlung mit Parathormon die Radiotherapie-induzierte Apoptose von Osteoblasten hemmt, indem die Reparatur von DNA-Schäden gesteigert wird. Bei der Vermittlung dieser Prozesse ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg maßgeblich beteiligt. Genauer gesagt führt die Behandlung von Osteoblasten mit Parathormon nach erfolgter Bestrahlung zu einem erhöhten Gesamtlevel von β -Catenin und zu einer vermehrten Translokation von aktivem β -Catenin in den Zellkern. Aus der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs resultiert eine Induktion von Ku70, welches bei der Reparatur von DNA-Schäden eine entscheidende Rolle spielt. Auf diese Weise wird die Apoptoserate von Osteoblasten gesenkt und der Radiotherapie-induzierten Osteoporose entgegen gewirkt. Dieser durch die Behandlung mit Parathormon erzielte Effekt konnte durch eine Behandlung der zuvor bestrahlten Zellen mit Wnt3a repliziert werden: Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und daraus folgender Ku70-Induktion führte ebenfalls zu einer verminderten Apoptoserate (Chandra et al. 2015). Die Schlüsselrolle von Ku bei der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden ist auch von Chang et al. (2008) beschrieben worden (HW Chang et al. 2008) (s. Kapitel 4.3 *Der*

Einfluss des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz verschiedener Tumorentitäten). Chandra et al. (2015) postulieren, dass der Einsatz von Parathormon oder Wnt-Agonisten eine mögliche Therapie für Radiotherapie-induzierte Osteoporose darstellen könnte (Chandra et al. 2015).

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der Vermittlung der Radiotherapieresistenz durch die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wohl um einen grundsätzlichen Mechanismus handelt, der nicht nur auf Tumorzellen beschränkt ist, sondern auch auf Normalgewebe übertragbar ist. Somit könnte in Zukunft im Rahmen einer Radiotherapie die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in dem zu schonenden Normalgewebe eine mögliche Strategie darstellen, um Radiotherapie-induzierte Nebenwirkungen wie beispielsweise Xerostomie, Mukositis und Osteoporose zu minimieren.

4.5 Ausblick

Wie oben dargestellt, weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg bei der Vermittlung der Radiotherapieresistenz sowohl bei Tumoren als auch bei gesunden Zellen eine entscheidende Rolle spielt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Normalzelllinie RPE-1 zu einer Steigerung der Radio(chemo)-therapieresistenz *in vitro* führt. Weiterführend könnten diese Ergebnisse nun mittels *in vivo* Modellen getestet werden.

In der Klinik stellt die Manipulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit dem Zweck der Radiotherapiesensibilisierung von Tumorzellen bzw. zur Steigerung der Radiotherapieresistenz von Normalgewebe ein vielversprechendes therapeutisches Ziel dar. Bis dahin ist es jedoch noch ein weiter Weg.

Um einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt zu ermitteln, müssen zunächst die genauen molekularen Mechanismen, die bei aktiviertem Wnt/ β -Catenin-Signalweg zur gesteigerten Radiotherapieresistenz führen, weiter erforscht werden. Bisher konnten verschiedene DNA-Reparaturenzyme wie Ku und LIG4 identifiziert werden, deren Expression durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs gesteigert wird (Chandra et al. 2015; HW Chang et al. 2008; Jun et al. 2016). Weiterhin wird von einigen

Autoren beschrieben, dass durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von Zellen getriggert wird, die wiederum mit einer gesteigerten Radiotherapieresistenz vergesellschaftet ist (Marie-Egyptienne et al. 2013; Ning et al. 2019). Sollten in Zukunft ein oder mehrere therapeutische Angriffspunkte zur Manipulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs identifiziert werden, wird die möglichst zielgerichtete und spezifische Ansteuerung dieser Strukturen eine der Herausforderungen darstellen. Im Tumorgewebe wäre zur Radiotherapiesensibilisierung eine Aktivitätsminderung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs erstrebenswert, im Normalgewebe hingegen stellt die Aktivitätssteigerung des Signalwegs zur Minimierung von Nebenwirkungen und -effekten das Ziel dar. Eine ungerichtete Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Tumor- und Normalgewebe wäre möglicherweise gar kontraproduktiv.

Ein weiteres Bestreben in der Tumorthherapie ist es, den zu erwartenden Therapieerfolg mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen zu können. Mit der Zielsetzung eine individuell optimierte Therapie anbieten zu können, sind prospektive Studien und die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern erforderlich (Grade et al. 2012). Sollte sich zukünftig weiterhin bestätigen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg einen maßgeblichen Einfluss auf die Radiotherapieresistenz von Tumoren hat, könnten möglicherweise einzelne Schlüsselbestandteile des Signalwegs prätherapeutisch bestimmt und so gewonnene Erkenntnisse in die Therapieentscheidung mit einbezogen werden. Auch hierfür ist ein noch besseres Verständnis der Radiotherapieresistenzvermittelnden Mechanismen erforderlich.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Radiotherapieresistenz erforscht. Diese scheint jedoch nicht alleinig durch die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bestimmt zu werden. Beispielsweise liegt laut *The Cancer Genome Atlas* bei rund 93% der kolorektalen Karzinome eine aktivierende Mutation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vor (Cancer-Genome-Atlas-Network 2012), jedoch gehört nur knapp ein Viertel der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom zur Gruppe der therapieresistenten *Nonresponder* (Fokas et al. 2014). Dementsprechend müssen für die Vermittlung der Radiotherapieresistenz neben einer hohen Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs noch andere Mechanismen verantwortlich sein. Einen Überblick über bisher identifizierte, an der Radiotherapieresistenz-Vermittlung beteiligte Signalwege sowie die Bedeutung von Tumorstammzellen in diesem Zusammenhang bieten Chang et al. (2016) in ihrer Arbeit (L Chang et al. 2016).

Insgesamt erscheint die Entstehung von Radiotherapieresistenz sehr komplex und es handelt sich vermutlich um ein multifaktorielles Geschehen. Letztlich sind die genauen Mechanismen der Resistenzvermittlung noch nicht abschließend verstanden und werden weiter erforscht.

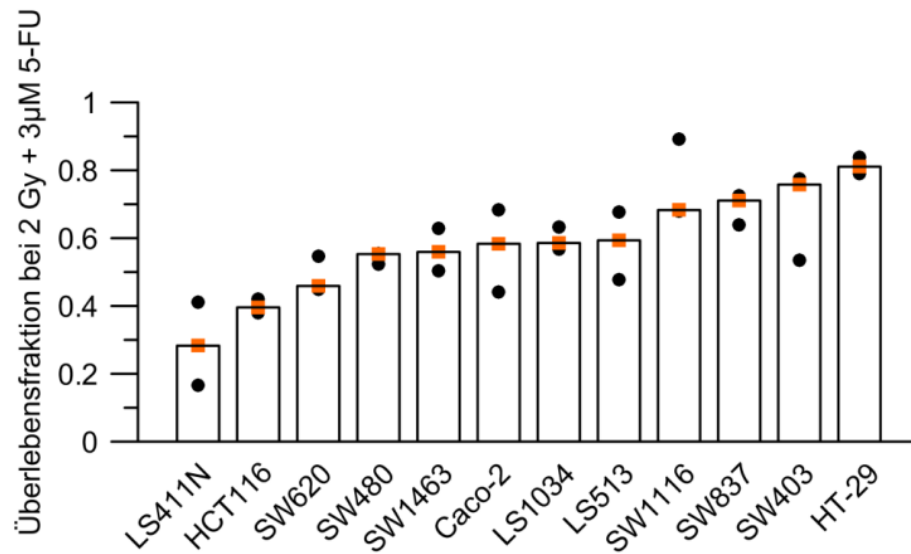
5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist weltweit eine der häufigsten Tumorentitäten (Torre et al. 2015). Die Standardtherapie beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom stellt eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit anschließender Operation dar (Leitlinienprogramm 2017). Das Ansprechen auf die Radiochemotherapie ist jedoch sehr heterogen und reicht von kompletter Remission bis hin zu vollständiger Resistenz. Folglich erhalten Patienten mit *a priori* resistenten Tumoren eine nebenwirkungsreiche und kostenintensive Therapie, ohne davon zu profitieren. Eine Individualisierung der Therapie erscheint daher sinnvoll. Hierfür ist ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der Therapieresistenz dringend erforderlich (Grade et al. 2012).

Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor TCF7L2 in Radiochemotherapie-resistenten Rektumkarzinomen hochreguliert ist (Ghadimi et al. 2005), welcher im Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine zentrale Rolle spielt (Arce et al. 2006). Kendziorra et al. beschrieben, dass eine verminderte Expression von TCF7L2 in den resistenten kolorektalen Tumorzelllinien SW480 und SW837 eine Radiotherapiesensibilisierung der Zellen bewirkt (Kendziorra et al. 2011).

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Vermittlung der Radio(chemo)therapieresistenz um eine TCF7L2-spezifische Funktion handelt oder diese durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt wird, wurde in dieser Arbeit der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in RPE-1-Zellen zum einen extern mittels Wnt3a, zum anderen intern via Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) stimuliert. Anschließend wurde die Radio(chemo)therapiesensibilität der Zellen ermittelt. Die Auswahl der Normalzelllinie RPE-1 erfolgte um zu testen, ob die Mechanismen der Resistenzvermittlung auch auf nicht-maligne Zellen übertragbar sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Wnt3a und durch Überexpression von mutiertem β -Catenin (S33Y) jeweils zu einer signifikant gesteigerten Radio(chemo)therapieresistenz von RPE-1-Zellen führt. Somit scheint die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Radio(chemo)therapieresistenz sowohl von Tumorzellen als auch nicht-malignen Zellen maßgeblich zu beeinflussen. Folglich stellt die gezielte Manipulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Tumorthherapie einen vielversprechenden Ansatz dar. Bis dahin gilt es die bisherigen Ergebnisse zu validieren, *in vivo* Modelle zu erstellen, klinische Studien durchzuführen und die Entstehung der Radio(chemo)therapieresistenz auf molekularer Ebene weiter zu erforschen.

6 Anhang



Anhangsabbildung 1: Überlebensfraktion der zwölf humanen kolorektalen Karzinomzelllinien nach Behandlung mit 3 µM 5-Fluoruracil und Bestrahlung mit einer Dosis 2 Gy. Das rote Quadrat stellt den Median aus drei unabhängigen Experimentensätzen dar. Details s. Kapitel 1.6 *Klinische Problematik und Vorarbeiten*. Modifiziert nach (Spitzner et al. 2010). Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

7 Literaturverzeichnis

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997): beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804

Acebron SP, Niehrs C (2016): beta-Catenin-Independent Roles of Wnt/LRP6 Signaling. *Trends Cell Biol* 26, 956-967

Anastas JN, Moon RT (2013): WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 11-26

Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006): Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25, 7492-7504

ATCC: Product Information Sheet for ATCC CRL-2647™. ATCC, Manassas 2007

Bar-Nun S, Shneyour Y, Beckmann JS (1983): G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta* 741, 123-127

Barker N, Clevers H (2006): Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 997-1014

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394-424

Cajanek L, Adlerz L, Bryja V, Arenas E (2010): WNT unrelated activities in commercially available preparations of recombinant WNT3a. *J Cell Biochem* 111, 1077-1079

Cancer Genome Atlas Network (2012): Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337

Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A (1998): Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-608

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805

- Chandra A, Lin T, Zhu J, Tong W, Huo Y, Jia H, Zhang Y, Liu XS, Cengel K, Xia B, et al. (2015): PTH1-34 blocks radiation-induced osteoblast apoptosis by enhancing DNA repair through canonical Wnt pathway. *J Biol Chem* 290, 157-167
- Chang HW, Roh JL, Jeong EJ, Lee SW, Kim SW, Choi SH, Park SK, Kim SY (2008): Wnt signaling controls radiosensitivity via cyclooxygenase-2-mediated Ku expression in head and neck cancer. *Int J Cancer* 122, 100-107
- Chang L, Graham P, Hao J, Ni J, Deng J, Bucci J, Malouf D, Gillatt D, Li Y (2016): Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance. *Oncotarget* 7, 11002-11017
- Chen HC, Zhu YT, Chen SY, Tseng SC (2012): Wnt signaling induces epithelial-mesenchymal transition with proliferation in ARPE-19 cells upon loss of contact inhibition. *Lab Invest* 92, 676-687
- Cleland WW (1964): Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry* 3, 480-482
- Clevers H (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480
- Clevers H, Nusse R (2012): Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205
- Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Trautmann F, Kunz-Schughart LA, Telegeev GD, Stakhovskiy EA, Walker JR, Simin K, Lyle S, et al. (2015): Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by beta-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res* 75, 1482-1494
- Davies J, Jimenez A (1980): A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am J Trop Med Hyg* 29, 1089-1092
- Day DW, Morson BC (1978): The adenoma-carcinoma sequence. *Major Probl Pathol* 10, 58-71
- Emons G, Ghadimi M, Grade M (2015): Allgemeine Grundlagen der Tumorbiologie in der Viszeralchirurgie. *Zentralbl Chir* 140, 74-82
- Emons G, Spitzner M, Reineke S, Möller J, Auslander N, Kramer F, Hu Y, Beissbarth T, Wolff HA, Rave-Frank M, et al. (2017): Chemoradiotherapy Resistance in Colorectal Cancer Cells is Mediated by Wnt/beta-catenin Signaling. *Mol Cancer Res* 15, 1481-1490
- Fearon ER (2011): Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 6, 479-507
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417

Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, Becker H, Ghadimi M, Mrak K, Merkel S, et al. (2014): Tumor regression grading after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol* 32, 1554-1562

Foulds L (1954): The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14, 327-339

Gala M, Chung DC (2011): Hereditary colon cancer syndromes. *Semin Oncol* 38, 490-499

Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Fuzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T, et al. (2005): Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23, 1826-1838

Grade M, Wolff HA, Gaedcke J, Ghadimi BM (2012): The molecular basis of chemoradiosensitivity in rectal cancer: implications for personalized therapies. *Langenbecks Arch Surg* 397, 543-555

Grumolato L, Liu G, Harembaki T, Mungamuri SK, Mong P, Akiri G, Lopez-Bergami P, Arita A, Anouar Y, Mlodzik M, et al. (2013): beta-Catenin-independent activation of TCF1/LEF1 in human hematopoietic tumor cells through interaction with ATF2 transcription factors. *PLoS Genet* 9, e1003603

Gstraunthaler G, Lindl T: *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage; Springer Spektrum, Berlin 2013

Hadfield C, Jordan BE, Mount RC, Pretorius GH, Burak E (1990): G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 18, 303-313

Hai B, Yang Z, Shanguan L, Zhao Y, Boyer A, Liu F (2012): Concurrent transient activation of Wnt/beta-catenin pathway prevents radiation damage to salivary glands. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83, e109-116

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004): LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677

Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, et al. (1999): Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21, 111-114

- Jun S, Jung YS, Suh HN, Wang W, Kim MJ, Oh YS, Lien EM, Shen X, Matsumoto Y, McCrea PD, et al. (2016): LIG4 mediates Wnt signalling-induced radioresistance. *Nat Commun* 7, 10994
- Kaatsch DP, Spix DC, Katalinic PDA, Hentschel DS, Luttmann DS, Stegmaier C, Caspritz DS, Christ DM, Ernst DA, Folkerts DJ, et al.: Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin 2015
- Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-Frank M, Emons G, Gaedcke J, Kramer F, Wolff HA, Becker H, Beissbarth T, et al. (2011): Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis* 32, 1824-1831
- Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Joo KM, et al. (2012): Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest* 92, 466-473
- Leitlinienprogramm Onkologie (2014): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) Langversion 1.1.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2017): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) Langversion 2.0.
- Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, et al. (2012): Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149, 1245-1256
- Liersch T, Gaedcke J, Grade M, Sprenger T, Conradi L, Becker H, Ghadimi BM (2010): Molekulare Marker zur Responseprädiktion beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom. Kommt die Individualisierung der Therapie? *Onkologie* 16, 779-788
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, et al. (2002): Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22, 1184-1193
- Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, et al. (2001): Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-809
- Marie-Egyptienne DT, Lohse I, Hill RP (2013): Cancer stem cells, the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and radioresistance: potential role of hypoxia. *Cancer Lett* 341, 63-72
- Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009): Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361, 2449-2460

Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H (1996): XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-399

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790

Ning X, Wang C, Zhang M, Wang K (2019): Ectopic Expression of miR-147 Inhibits Stem Cell Marker and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)-Related Protein Expression in Colon Cancer Cells. *Oncol Res* 27, 399-406

Nowell PC (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28

Nusse R (2005): Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15, 28-32

Nusse R, Varmus HE (1982): Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801

Promega: Technical Manual, Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Promega, Madison 2006

Puck TT, Marcus PI (1955): A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with HeLa Cells in Tissue Culture: The Use of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 432-437

Puck TT, Marcus PI (1956): Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 103, 653-666

Rave-Fränk M, Schmidberger H, Christiansen H, Boll C, Lehmann J, Weiss E (2007): Comparison of the combined action of oxaliplatin or cisplatin and radiation in cervical and lung cancer cells. *Int J Radiat Biol* 83, 41-47

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987): The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50, 649-657

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, et al. (2004): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351, 1731-1740

Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H, et al. (2012): Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 30, 1926-1933

- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. (1967): Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-820
- Sharma RP (1973): Wingless - a new mutant in *D. melanogaster*. *Dros Inf Serv* 50, 134
- Shibamoto S, Higano K, Takada R, Ito F, Takeichi M, Takada S (1998): Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling. *Genes Cells* 3, 659-670
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85
- Spitzner M, Emons G, Kramer F, Gaedcke J, Rave-Frank M, Scharf JG, Burfeind P, Becker H, Beissbarth T, Ghadimi BM, et al. (2010): A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78, 1184-1192
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015): Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87-108
- Wallmen B, Schrempp M, Hecht A (2012): Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/beta-catenin target gene expression. *Nucleic Acids Res* 40, 9455-9469
- Wang G, Shen J, Sun J, Jiang Z, Fan J, Wang H, Yu S, Long Y, Liu Y, Bao H, et al. (2017): Cyclophilin A Maintains Glioma-Initiating Cell Stemness by Regulating Wnt/beta-Catenin Signaling. *Clin Cancer Res* 23, 6640-6649
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R (2003): Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452
- Wittekind C (Hrsg.): *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley-VCH, Weinheim 2017
- Wittekind C, Meyer HJ (Hrsg.): *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2010
- Xue J, Chen Y, Wu Y, Wang Z, Zhou A, Zhang S, Lin K, Aldape K, Majumder S, Lu Z, et al. (2015): Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear beta-catenin degradation. *Nat Commun* 6, 6156
- Yin L, Gao Y, Zhang X, Wang J, Ding D, Zhang Y, Zhang J, Chen H (2016): Niclosamide sensitizes triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation in association with the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *Oncotarget* 7, 42126-42138
- Yun MS, Kim SE, Jeon SH, Lee JS, Choi KY (2005): Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J Cell Sci* 118, 313-322

Zhao J, Kim KA, De Vera J, Palencia S, Wagle M, Abo A (2009): R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/beta-catenin pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 2331-2336

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische und vereinfachte Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz.....	2
Abbildung 2:	Schematische und vereinfachte Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.	9
Abbildung 3:	Schematische Darstellung einer 12-Well-Platte für die Lipofektion der Zelllinien RPE-1 und RPE-1-S33Y/EV im Rahmen des Dual-Luciferase [®] Reporter Assays.	42
Abbildung 4:	Von der Firefly- und Renilla-Luciferase katalysierte Biolumineszenzreaktionen.....	43
Abbildung 5:	Zeitlicher Ablauf des KBVs mit der Zelllinie RPE-1-S33Y/EV.....	48
Abbildung 6:	Zeitlicher Ablauf des KBVs mit der Zelllinie RPE-1.....	50
Abbildung 7:	Proteinexpression der Zelllinie RPE-1 im Vergleich zu den kolorektalen Tumorzelllinien LS411N, SW480 und SW837. Immunfärbung von Axin2, aktivem β -Catenin, TCF7L2 und Aktin.	54
Abbildung 8:	Behandlung von RPE-1-Zellen mit (+)/(-) Wnt3a Medium für 6, 9 und 24 h. Immunfärbung von Axin2 und Aktin.	55
Abbildung 9:	Gesteigerte Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin in RPE-1-Zellen, die für 24 h mit (+) Wnt3a Medium inkubiert wurden, im Vergleich zu RPE-1-Zellen, die für 24 h mit (-) Wnt3a Medium inkubiert wurden.....	56
Abbildung 10:	Dual-Luciferase [®] Reporter Assay mit RPE-1-Zellen, die für 24 h mit (+) bzw. (-) Wnt3a Medium behandelt wurden.....	57
Abbildung 11:	Überlebensfraktion der Zelllinie RPE-1 bei Behandlung mit (+) Wnt3a Medium im Vergleich zur Behandlung mit (-) Wnt3a Medium in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis.....	58
Abbildung 12:	Etablierung der Lipofektion der Zelllinie RPE-1 mit „X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent“.	60
Abbildung 13:	Gesteigerte Proteinexpression von aktivem und gesamtem β -Catenin in RPE-1-Zellen, die mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y transient transfiziert wurden, im Vergleich zu RPE-1-Zellen, die mit dem <i>empty vector</i> transient transfiziert wurden.	61

Abbildung 14: Dual-Luciferase [®] Reporter Assay der Zelllinie RPE-1, die mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y bzw. dem <i>empty vector</i> pCI-neo transient transfiziert wurden.	62
Abbildung 15: Dual-Luciferase [®] Reporter Assay der Zelllinien RPE-1-S33Y/EV, die zuvor mit dem Vektor pCI-neo-b-cat S33Y bzw. dem <i>empty vector</i> pCI-neo stabil transfiziert wurden.	63
Abbildung 16: Überlebensfraktion der Zelllinie RPE-1-S33Y im Vergleich zur Negativkontrolle (RPE-1-EV) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis.	64
Anhangsabbildung 1: Überlebensfraktion der zwölf humanen kolorektalen Karzinomzelllinien nach Behandlung mit 3 μ M 5-Fluoruracil und Bestrahlung mit einer Dosis 2 Gy.	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.	3
Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.	4
Tabelle 3: Volumina von Zellkulturmedium, PBS und 0,25% Trypsin–EDTA in Bezug auf die Größe des verwendeten Zellkulturgefäßes.	24
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien, ihre Wachstumsbedürfnisse und ATCC- Katalog-Nummer.	25
Tabelle 5: Zusammensetzung des Einfriermediums.	27
Tabelle 6: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels.	32
Tabelle 7: Für die Immunfärbung verwendete Antikörper mit Verdünnungen, Lösungspuffer und Inkubationsbedingungen.	35
Tabelle 8: Durchgeführte Experimente, bei denen die Stimulierbarkeit des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels Dual-Luciferase [®] Reporter Assay gemessen wurde.	39
Tabelle 9: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Lipofektion der Zelllinien RPE-1 und RPE-1-S33Y/EV im Rahmen des Dual- Luciferase [®] Reporter Assays.	42
Tabelle 10: Experimentelle Konditionen für die Koloniebildungsversuche mit den Zelllinien RPE-1-S33Y/EV und RPE-1.	47

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnungen im Rahmen des Dual-Luciferase [®] Reporter Assays.	45
Formel 2: Berechnung der Anwachseffizienz.	51
Formel 3: Berechnung der Überlebensfraktion.	51

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Georg Emons sowie meinem Doktorvater PD Dr. Marian Grade für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Beide waren geradezu rund um die Uhr erreichbar und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. B. Michael Ghadimi als Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie. Ich freue mich, dass ich die Gelegenheit hatte, meine Doktorarbeit in dem spannenden und für Medizin und Gesellschaft äußerst relevanten Gebiet der Krebsforschung zu erstellen. Ich empfinde den gewonnen Eindruck der Forschungsarbeit sowie die unzähligen fachlichen Diskussionen als große Bereicherung. Daher möchte ich allen danken, die hierzu beigetragen haben. Namentlich sind dies Dr. Melanie Spitzner, Stefanie Müller, Jessica Eggert, Chan-Rong Lai, Sarah Wachenhausen, Dirk Weinert, Dr. Sebastian Dango, PD Dr. Hendrik Wolff, PD Dr. Tobias Pukrop, und Dipl.-Biol. Margret Rave-Fränk. Für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen bedanke ich mich bei Dr. Frank Kramer aus der Abteilung der Medizinischen Statistik. Abschließend möchte ich mich bei meinem Kollegen und guten Freund Dr. Sebastian Reineke für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor bedanken.