

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie

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

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Relevanz des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die
Radiotherapieresistenz des kolorektalen Karzinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sebastian Reineke

aus

Bad Oldesloe

Göttingen 2015

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	PD Dr. med. M. Grade
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. T. Pukrop
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. M. Dobbstein
Tag der mündlichen Prüfung:	03.08.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.2	Grundlagen der Entstehung kolorektaler Karzinome	1
1.3	Lokalisation des kolorektalen Karzinoms	2
1.4	TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms	3
1.5	Prävention und Therapie des kolorektalen Karzinoms	4
1.5.1	Prävention	4
1.5.2	Therapie des Kolonkarzinoms	5
1.5.3	Therapie des Rektumkarzinoms	5
1.6	Klinische Problematik und Vorarbeiten.....	7
1.7	Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg	8
1.8	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	11
2.1.2	Chemikalien.....	12
2.1.3	Geräte.....	13
2.1.4	Zellkulturreagenzien	15
2.1.5	Transfektionsreagenzien	16
2.1.6	siRNAs	16
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	17
2.1.8	Kits.....	19
2.1.9	Computer-Software.....	20
2.1.10	Antikörper	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Zellkultur.....	22
2.2.1.1	Zellen auftauen	22
2.2.1.2	Mediumwechsel.....	23
2.2.1.3	Subkultivierung	23
2.2.1.4	Zellen einfrieren	24
2.2.1.5	Zellzahlbestimmung.....	24

2.2.2	Herstellung von Medium mit löslichem Wnt3a	25
2.2.3	SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung.....	26
2.2.3.1	Zellgewinnung, Zellyse und Proteinisolation.....	26
2.2.3.2	SDS-PAGE.....	29
2.2.3.3	Western Blot.....	29
2.2.3.4	Gel-Färben.....	30
2.2.3.5	Immunfärbung	31
2.2.4	RNA-Interferenz	32
2.2.4.1	Transfektion der siRNAs	32
2.2.4.2	Vorversuche mit si β -Catenin.....	33
2.2.5	Der kleinmolekulare Inhibitor XAV939	34
2.2.5.1	Vorversuche mit XAV939	34
2.2.6	Das lösliche Signalprotein Wnt3a	35
2.2.6.1	Test des konditionierten Mediums	36
2.2.6.2	Vorversuche mit Wnt3a	36
2.2.7	Koloniebildungstest	36
2.2.7.1	Koloniebildungstest nach Transfektion	38
2.2.7.2	Koloniebildungstest unter der Behandlung mit XAV939 bzw. Wnt3a	38
2.2.7.3	Auswertung eines Koloniebildungstests	39
3	Ergebnisse	41
3.1	siRNA gegen β -Catenin	41
3.1.1	siRNA gegen β -Catenin in SW480.....	42
3.1.2	siRNA gegen β -Catenin in SW837.....	43
3.1.3	siRNA gegen β -Catenin in LS1034	44
3.2	Behandlung mit XAV939	46
3.2.1	Behandlung von SW480 mit XAV939	46
3.2.2	Behandlung von SW837 mit XAV939	48
3.2.3	Behandlung von LS1034 mit XAV939.....	51
3.2.4	Behandlung von RPE mit XAV939.....	53
3.3	Behandlung mit Wnt3a	57
3.3.1	Test des konditionierten RPMI-1640 Mediums	57
3.3.2	Behandlung von LS1034 mit Wnt3a	58
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	59
4	Diskussion	60

4.1	Klinische Problematik.....	60
4.2	siRNA-vermittelte Inhibition von β -Catenin führt zu einer Radiotherapiesensibilisierung in kolorektalen Karzinomzellen.....	61
4.3	XAV939 inhibiert die Expression von aktivem β -Catenin und führt teilweise zu einer Radiotherapiesensibilisierung.....	62
4.3.1	Deutung der Ergebnisse mit kolorektalen Karzinomzelllinien	63
4.3.2	Deutung der Ergebnisse mit der Normalzelllinie RPE	65
4.4	Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist in LS1034 nicht durch Wnt3a zu stimulieren.....	66
4.5	Klinische Bedeutung und Ausblick	68
5	Zusammenfassung	70
6	Anhang	71
7	Literaturverzeichnis	72
8	Abbildungsverzeichnis.....	82
9	Tabellenverzeichnis	85
10	Formelverzeichnis.....	86

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erklärung</u>
5-FU	5-Fluoruracil
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
BSA	bovines Serum-Albumin
β -TrCP	<i>β-Transducin-repeat-containing protein</i>
CID	<i>β-Catenin inhibitory domain</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
g	Gramm
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
Gy	Gray
h	Stunden
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
KBT	Koloniebildungstest
KFO179	Klinische Forschergruppe 179
LEF1	<i>lymphoid enhancer-binding factor-1</i>
LK	Lymphknoten
LRP5/6	<i>low-density-lipoprotein-related protein 5/6</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NP40	Nonidet-P40-Puffer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
p-Wert	Signifikanzwert
RIPA	<i>radio immuno precipitation assay buffer</i>
RISC	<i>ribonucleic acid induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Radiotherapie
rtPCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>short hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMAD4	<i>S-mothers against decapentaplegic homolog 4</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>
TBS-T	<i>Tris buffered saline + 0,1 % Tween</i>
TCF	<i>T-cell specific transcription factor</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TME	<i>total mesocolic excision</i>
TNM	<i>tumor, node, metastasis</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
WP	Well-Platte

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das kolorektale Karzinom stellt mit rund 63.000 Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2010 ein großes gesundheitspolitisches und sozioökonomisches Problem dar (Krebs in Deutschland 2013). In der Statistik der Sterbefallzahlen bei Krebserkrankungen steht Dickdarmkrebs bei Männern an zweiter und bei Frauen an dritter Stelle, die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei rund 65 % (Krebs in Deutschland 2013).

Faktoren, die mit einem deutlich erhöhten Risiko für kolorektale Karzinome assoziiert wurden, sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen und das Auftreten von kolorektalen Karzinomen bei Verwandten ersten Grades. Weitere Risikofaktoren sind ein erhöhter *body mass index* (BMI), Zigarettenrauchen, geringe körperliche Aktivität, hoher Konsum roten Fleisches sowie zu geringer Konsum von Früchten und Gemüse (Johnson et al. 2013).

Etwa 5 % der Erkrankungen sind auf ein familiäres genetisches Syndrom zurückzuführen. Hierzu zählen das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinomsyndrom (HNPCC), auch Lynch-Syndrom genannt, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und seltenere Syndrome wie zum Beispiel (z.B.) das hyperplastische Polyposis-Syndrom (HPS), das juvenile Polyposis-Syndrom (JPS) und das Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) (Emons et al. 2013, Gala und Chung 2011).

1.2 Grundlagen der Entstehung kolorektaler Karzinome

Die Entstehung maligner Tumoren im Allgemeinen ist äußerst komplex und bedarf nach Hanahan und Weinberg sechs Grundvoraussetzungen: Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, Umgehung der Apoptose, Fähigkeit zur unendlichen Teilung, Blutversorgung durch (Neo-)Angiogenese sowie Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000). Als wichtige Voraussetzungen hierfür werden genomische Instabilität, genetische Mutationen sowie chronische Entzündung betrachtet. Als ergänzende unabdingbare Faktoren der Karzinogenese gelten die Anpassung des Energiemetabolismus der Zellen, die Deregulation von Signalwegen sowie das Verhindern einer Immunreaktion (Hanahan und Weinberg 2000, Hanahan und Weinberg 2011).

Für das kolorektale Karzinom ist das Modell der 1978 erstmalig beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz allgemein anerkannt und Grundlage der heutigen Präventionsprogramme (siehe Kapitel 1.5.1) (Day und Morson 1978). Das hieraus entwickelte genetische Progressionsmodell besagt, dass ein Karzinom über Zwischenschritte in Jahren bis Jahrzehnten aus einem Adenom entsteht, wofür verschiedene genetische Veränderungen zusammenkommen müssen. Sowohl die Reihenfolge als auch die Vollständigkeit der Mutationen unterliegen dabei gewissen Variationen (Emons et al. 2013, Fearon 2011, Fearon und Vogelstein 1990).

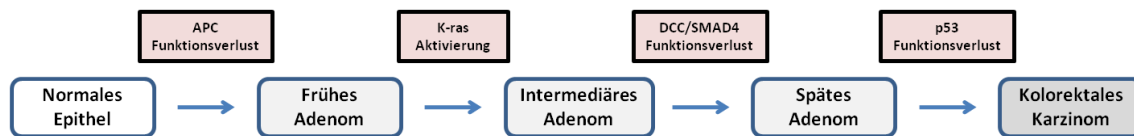


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz mit den wesentlichen genetischen Veränderungen in der Entwicklung eines Karzinoms aus normalem Epithel (modifiziert nach Fearon 2011, S. 499). Für Details und Abkürzungen siehe Text.

In Abbildung 1 ist die Adenom-Karzinom-Sequenz stark vereinfacht und schematisch dargestellt. Der Funktionsverlust des *adenomatous polyposis coli*-Gens (APC) führt zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit daraus folgender Steigerung der Proliferation. Einen ähnlichen Effekt hat auch die Aktivierung des *Kirsten rat sarcoma*-Gens (k-ras). Mutation beziehungsweise (bzw.) Deletion des *deleted in colorectal cancer*-Gens (DCC) bzw. SMAD4 führen zur Inhibierung der Apoptose und der Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Faktoren. Der p53-Funktionsverlust begünstigt das Überleben der mutierten Zellen (Fearon 2011). Weiteres Charakteristikum kolorektaler Karzinome ist das Auftreten typischer chromosomaler Veränderungen während der Karzinogenese (Cancer-Genome-Atlas-Network 2012). Dazu zählen sowohl ein Zugewinn (+7, +20q, +8q, +13q) als auch ein Verlust (-4q, -8p, -18q) von ganzen Chromosomen bzw. chromosomalen Abschnitten (Grade et al. 2006a). Die Anzahl der Chromosomenabschnitte und die Expression der jeweiligen Gene, die auf betroffenen Chromosomenabschnitten liegen, korrelieren dabei zumeist positiv miteinander (Grade et al. 2006b, Grade et al. 2007).

1.3 Lokalisation des kolorektalen Karzinoms

Das Auftreten kolorektaler Karzinome ist ungleichmäßig auf die jeweiligen Organabschnitte verteilt. Gut 60 % liegen aboral der linken Kolonflexur, hiervon circa (ca.) die Hälfte im Rektum und dem rektosigmoidalen Übergang (Phipps et al. 2013). Das Rektum ist dabei definiert als die letzten 16 cm des Enddarms, gemessen mit einem starren Rektoskop von der Anokutanlinie (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Die genaue Verteilung zeigt Tabelle 1.

Tumorlokalisation	Anteil in %
Zäkum	15
Kolon ascendens	11
Rechte Kolonflexur	3
Kolon transversum	6
Linke Kolonflexur	3
Kolon descendens	4
Kolon sigmoideum	25
Rektosigmoidaler Übergang	10
Rektum	23

Tabelle 1: Anatomische und prozentuale Verteilung kolorektaler Karzinome (Daten aus Phipps et al. 2013, S. 3142).

1.4 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Die klinische Einteilung des kolorektalen Karzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* (UICC). Das Akronym TNM steht dabei für T - Tumorinfiltration, N - Lymphknotenbefall (engl.: *node*) und M - Metastasen.

T – Infiltrationstiefe des Primärtumors		N – Regionäre Lymphknoten (LK)		M – Fernmetastasen	
<u>TX</u>	Beurteilung nicht möglich	<u>NX</u>	Beurteilung nicht möglich		
<u>T0</u>	Kein Anhalt für Primärtumor	<u>N0</u>	Keine regionären LK-Metastasen	<u>M0</u>	Keine Fernmetastasen
<u>Tis</u>	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria, Muscularis mucosae <u>nicht</u> durchbrochen				
<u>T1</u>	Infiltration der Submucosa	<u>N1</u>	<u>N1a</u> Metastase in 1 regionärem LK <u>N1b</u> Metastasen in 2-3 regionären LK <u>N1c</u> Satelliten in Subserosa oder perirektalem Fettgewebe ohne regionäre LK-Metastasen	<u>M1</u>	<u>M1a</u> Metastase(n) auf ein Organ beschränkt <u>M1b</u> Metastasen in ≥ 1 Organ oder Peritoneum
<u>T2</u>	Infiltration der Muscularis propria	<u>N2</u>	<u>N2a</u> Metastasen in 4-6 regionären LK <u>N2b</u> Metastasen in ≥ 7 regionären LK		
<u>T3</u>	Infiltration <u>durch</u> Muscularis propria in Subserosa oder nicht peritonealisiertes, perikolisches oder perirektales Gewebe				
<u>T4</u>	<u>T4a</u> Perforation des Peritoneum viscerale <u>T4b</u> Infiltration anderer Organe oder Strukturen				

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Wittekind und Meyer 2010, S. 96-98).

Nach einer Operation wird die klinische Einteilung pathologisch reevaluiert und dann mit dem Zusatz „p“ bezeichnet (Wittekind und Meyer 2010). Für eine aussagekräftige Beurteilung des N-Status wird die Beurteilung von mindestens 12 Lymphknoten gefordert (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Tabelle 2 zeigt die Kriterien der TNM-Klassifikation. Anschließend erfolgt die Stadieneinteilung nach der Klassifikation der UICC (siehe Tabelle 3). Diese ist Grundlage für eine Prognoseabschätzung und die Entscheidung über die Therapie.

<u>UICC-Stadium</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>M</u>
<u>0</u>	Tis	N0	M0
<u>I</u>	T1, T2	N0	M0
<u>IIA</u>	T3	N0	M0
<u>IIB</u>	T4a	N0	M0
<u>IIC</u>	T4b	N0	M0
<u>IIIA</u>	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
<u>IIIB</u>	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
<u>IIIC</u>	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
<u>IVA</u>	Jedes T	Jedes N	M1a
<u>IVB</u>	Jedes T	Jedes N	M1b

Tabelle 3: Stadieneinteilung der UICC für das kolorektale Karzinom nach dem TNM-Klassifikationssystem (modifiziert nach Wittekind und Meyer 2010, S. 96-98).

1.5 Prävention und Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Vorgaben des Leitlinienprogramms Onkologie 2013 zur Therapie des kolorektalen Karzinoms sind komplex, entsprechend sollte die Festlegung der Therapie in der interdisziplinären Tumorkonferenz erfolgen. Im Folgenden wird daher lediglich ein stark vereinfachter Überblick über die Therapiestrategien gegeben.

1.5.1 Prävention

Aufgrund der unter Kapitel 1.1 aufgeführten hohen Fallzahlen und der sozioökonomischen Bedeutung der Erkrankung gibt es ein Präventionsprogramm zur Vorsorge (Primär-) und Früherkennung (Sekundärprävention) des kolorektalen Karzinoms. Danach wird ab Vollendung des 50. Lebensjahres eine komplette Koloskopie für alle Menschen empfohlen.

Bei unauffälligem Befund sollte eine Wiederholung nach 10 Jahren erfolgen. Alternativ kann ein jährlicher Test auf fäkales okkultes Blut (FOBT) durchgeführt werden, falls eine Koloskopie nicht möglich ist. Bei Patienten, die Risikofaktoren für ein kolorektales Karzinom aufweisen, erfolgt eine engmaschigere Kontrolle. Wird bei einer Koloskopie ein Polyp entdeckt, sollte dieser abgetragen und anschließend histologisch untersucht werden. Sind in der Histologie keine Neoplasiekriterien zu erkennen, so braucht keine besondere Nachsorge zu erfolgen. Werden ein oder mehrere Adenome diagnostiziert, so sollte in Abhängigkeit von deren Anzahl eine Kontrollkoloskopie nach 3 bis 5 Jahren erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.5.2 Therapie des Kolonkarzinoms

Grundlage der Therapie des Kolonkarzinoms ist in der Regel die chirurgische Entfernung des Primärtumors, gegebenenfalls (ggf.) *en-bloc* mit anderen Organen. Dabei ist die R0-Resektion (Resektionsränder sind mikroskopisch tumorfrei) stets anzustreben. Die Entscheidung über eine weitere postoperative Therapie erfolgt nach den UICC-Stadien. Im UICC-Stadium I wird keine adjuvante Therapie empfohlen, ab Stadium II kann je nach Risikoprofil eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden. Im Stadium III ist eine adjuvante Chemotherapie indiziert. Grundsätzlich gibt es keine Altersbeschränkung für eine adjuvante Chemotherapie, es sind jedoch einige Kontraindikationen zu beachten (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.5.3 Therapie des Rektumkarzinoms

Auch beim Rektumkarzinom erfolgt die Therapie stadienabhängig. Anhand der Höhenlokalisation entscheidet sich das chirurgische Vorgehen. In den unteren zwei Dritteln des Rektums erfolgt eine tiefe anteriore Rektumresektion mit totaler mesorektaler Exzision (TME), bei Sphinkterinfiltration eine Rektumexstirpation. Im oberen Drittel kann eine tiefe anteriore Rektumresektion mit TME oder eine anteriore Rektumresektion mit partieller mesorektaler Exzision (PME) durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Im UICC-Stadium I besteht die Behandlung aus einer reinen chirurgischen Resektion (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Die Therapie der lokal fortgeschrittenen Stadien II und III war Gegenstand der CAO/ARO/AIO-94-Phase-III-Studie der Deutschen Rektumkarzinom-Studiengruppe. Hierin wurden randomisiert prä- und postoperative Radiochemotherapie miteinander verglichen (Sauer et al. 2004, Sauer et al. 2012), und die Ergebnisse hieraus bestimmen maßgeblich die aktuelle Leitlinie für diese Stadien

(Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Laut Leitlinie sollte der chirurgischen Resektion in den Stadien II und III eine neoadjuvante (=präoperative) Radiochemotherapie vorangestellt werden. Diese senkt signifikant das Risiko für Lokalrezidive gegenüber einem adjuvanten (=postoperativen) Therapieansatz (Sauer et al. 2004, Sauer et al. 2012). Zusätzlich ist die neoadjuvante der adjuvanten Radiochemotherapie in der Compliance, der Toxizität und der Rate an sphinktererhaltenden Operationen bei tiefem Rektumkarzinom überlegen (Sauer et al. 2004, Sauer et al. 2012). Überraschenderweise ist das tumorfreie Überleben im Vergleich beider Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Gemäß Leitlinie ist im Abstand von 4 - 6 Wochen nach der Operation eine adjuvante Chemotherapie indiziert. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Therapieabfolge bei den UICC-Stadien II und III.

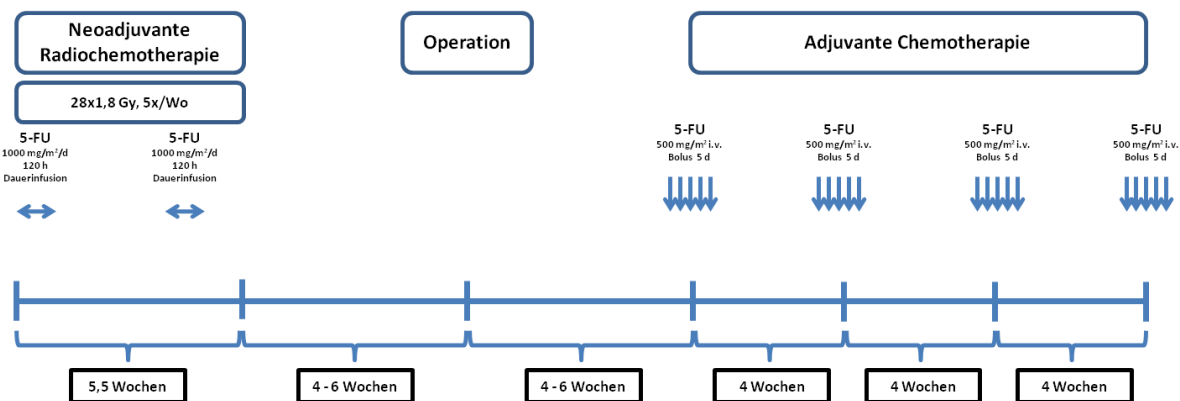


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms UICC-Stadium II/III mit den Hauptkomponenten neoadjuvante Radiochemotherapie, Operation und adjuvante Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie 2013, Sauer et al. 2004). Die detaillierte Erläuterung findet sich im Text.

In einer Situation mit Fernmetastasen (Stadium IV) ist das therapeutische Vorgehen beim Kolon- wie beim Rektumkarzinom komplex und muss an die individuelle Situation des Patienten angepasst werden. Im interdisziplinären Tumorboard wird eine Therapiestrategie erarbeitet. Diese kann, sollte eine R0-Resektion möglich sein, die primäre Resektion der Metastasen beinhalten. In einigen Fällen kann auch eine zusätzliche Chemotherapie oder Bestrahlung notwendig sein (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Die Behandlung des kolorektalen Karzinoms ist auch weiterhin Gegenstand aktueller Untersuchungen (Gaedcke et al. 2011, Rödel et al. 2012, Rödel et al. 2014).

1.6 Klinische Problematik und Vorarbeiten

Wie in Kapitel 1.5.3 erläutert, ist beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom die neoadjuvante Radiochemotherapie entscheidender Bestandteil des Behandlungsplans. Das klinische Ansprechen der Karzinome hierauf ist jedoch äußerst heterogen. Es reicht von kompletter Regression (*Responder*) bis zu kompletter Resistenz (*Nonresponder*) mit Tumorwachstum unter der Radiochemotherapie (Grade et al. 2012). Klinische Bedeutsamkeit erlangt dies unter anderem (u.a.) dadurch, dass ein niedriger histopathologischer Regressionsgrad nach neoadjuvanter Radiochemotherapie (*Nonresponder*) mit einem geringeren tumorfreien Überleben der Patienten einhergeht als ein hoher Regressionsgrad (Fokas et al. 2014, Rödel et al. 2005). Zudem werden einige Patienten so einer nebenwirkungsreichen Therapie zugeführt, ohne dass sie hiervon profitieren (Grade et al. 2012). Die beschriebene Heterogenität des klinischen Ansprechens auf die neoadjuvante Radiochemotherapie macht es notwendig, die Therapieregime entsprechend zu individualisieren, um für jeden Patienten das Optimum zu erreichen (Liersch et al. 2010). Wichtige Schritte hierfür sind die Identifikation prädiktiver Marker für das klinische Ansprechen sowie neuer therapeutischer Zielstrukturen für eine optimierte Therapie (Grade et al. 2012).

In einem ersten Schritt hierbei wurden von unserer Arbeitsgruppe Genexpressionsanalysen aus Gewebeproben von Rektumkarzinomen (Stadium II und III) durchgeführt, die im Rahmen der prätherapeutischen Diagnostik gewonnen wurden. Nachdem das Ansprechen der Karzinome auf die neoadjuvante Radiochemotherapie postoperativ histopathologisch beurteilt worden war, wurden die Genexpressionsprofile von *Respondern* und *Nonrespondern* verglichen. Es fanden sich 54 zwischen diesen zwei Gruppen differentiell exprimierte Gene (Ghadimi et al. 2005). An prominenter Stelle fand sich der *T-cell specific transcription factor 4* (TCF4), ein Schlüsseltranskriptionsfaktor im Wnt/ β -Catenin-Signalweg (siehe Kapitel 1.7), welcher in resistenten Tumoren hochreguliert war. In einem nächsten Schritt wurden zur Etablierung eines *in-vitro*-Modells 12 humane kolorektale Karzinomzelllinien mit 3 μ M 5-FU und einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy behandelt (Spitzner et al. 2010). Diese Kombination ist eng an das klinische Radiochemotherapie regime angelehnt (siehe Kapitel 1.5.3). Anschließend wurden die Überlebensfraktionen der Zelllinien bestimmt und mit dem prätherapeutischen Genexpressionsprofil korreliert (Anhangsabbildung 1 zeigt die Überlebensfraktionen aller 12 Zelllinien). Da die Verfügbarkeit immortalisierter Rektumkarzinomzelllinien begrenzt ist, wurden auch Zelllinien von Kolonkarzinomen

verwendet. Dabei sei jedoch auf die große Ähnlichkeit der transkriptionellen und chromosomalen Deregulation von Kolon- und Rektumkarzinomen verwiesen (Grade et al. 2006b, Grade et al. 2007). In der Analyse der 12 Zelllinien fanden sich u.a. Hinweise auf eine Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Radiochemotherapiesensibilität der Zelllinien (Spitzner et al. 2010). Nachfolgend konnte für den in resistenten Rektumkarzinomen überexprimierten Transkriptionsfaktor TCF4 (der Genlocus wird auch als TCF7L2 bezeichnet) von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Inhibierung mittels RNA-Interferenz zu einer Radiotherapiesensibilisierung von kolorektalen Karzinomzellen führte (Kendziorra et al. 2011). Da TCF4 ein elementarer Bestandteil des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist (Li et al. 2012), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine gezielte Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine Möglichkeit darstellen könnte, um die Radiotherapieresistenz der *Nonresponder* in Zukunft überwinden zu können.

1.7 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist in vielen Bereichen der embryonalen Entwicklung bedeutend. Zum Beispiel wird er als elementarer Bestandteil in der Entwicklung der anterioren bzw. posterioren Körperpole von achsensymmetrischen Vielzellern gesehen (Petersen und Reddien 2009). Mutationen in diesem in (fast) allen Spezies vorhandenen Signalweg werden ferner für die Entwicklung von Karzinomen des Darmes und vieler anderer Gewebe sowie das Entstehen hereditärer Erkrankungen verantwortlich gemacht (Clevers 2006, Markowitz und Bertagnolli 2009). Erste Beschreibungen des Gens *wingless* zeigten dessen Bedeutung für die Segmentpolarität in der Entwicklung der Drosophilalarve (Nusslein-Volhard und Wieschaus 1980). Das Gen *int-1* wurde kurze Zeit später als Onkogen in Mammakarzinomen der Maus entdeckt, induziert durch das *mouse mammary tumor virus* (MMTV), (Nusse und Varmus 1982). Später stellte sich heraus, dass das homologe Onkogen der Drosophila, *Dint-1*, und *wingless* identisch sind, woraus der fusionierte Name „Wnt“ entstand (Rijsewijk et al. 1987). In den letzten Jahrzehnten zählt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu den am meisten erforschten Signalwegen überhaupt (Clevers und Nusse 2012). Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs im *ON*- und *OFF*-Status. Im Ruhezustand sorgt der β -Catenin-Destruktionskomplex, bestehend aus Axin, APC sowie den Serin-/Threoninkinasen Glykogen-Synthase-Kinase 3 α/β (GSK3) und Casein Kinase 1 (CK1), für einen permanenten Abbau von β -Catenin und verhindert somit eine Signaltransduktion (Clevers und Nusse 2012).

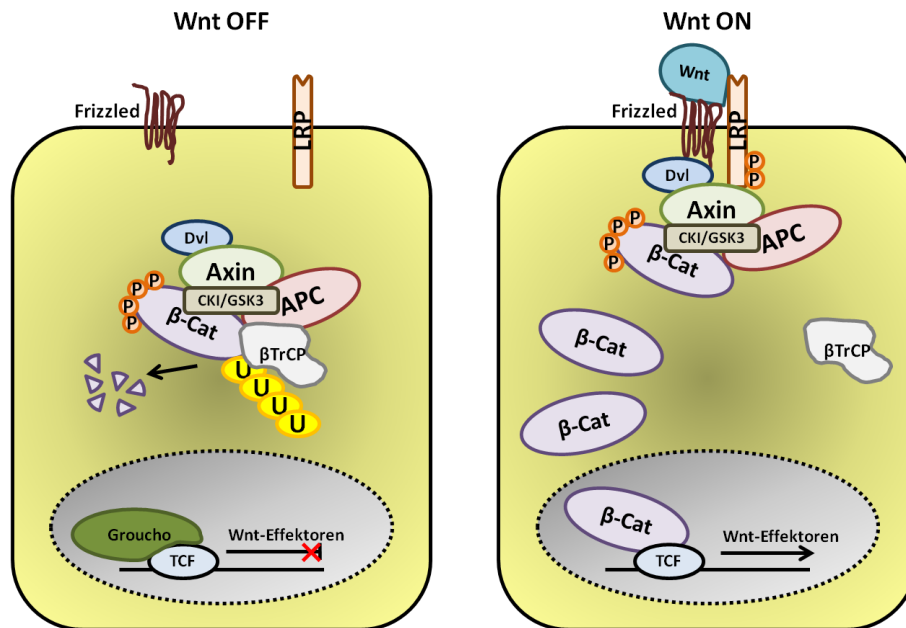


Abbildung 3: Wnt/β-Catenin-Signalweg im *ON*- und *OFF*-Status. Ohne Wnt-Ligand wird β-Catenin abgebaut, es erfolgt keine Signalweiterleitung. Bei Bindung eines Wnt-Liganden an den Rezeptor erfolgt eine Signaltransduktion mit Transkription von Wnt-Effektorgenen (modifiziert nach Li et al. 2012, S. 1251). Für Details und Abkürzungen siehe Text.

Die Degradation erfolgt proteasomal, abhängig von Phosphorylierungen von β-Catenin durch die Kinasen und daraus resultierender Polyubiquitinylierung durch das *β-Transducin-repeat-containing protein* (β-TrCP) (Clevers und Nusse 2012). Gleichzeitig wird durch den proteasomalen Abbau der β-Catenin-Destruktionskomplex wieder frei und kann weitere β-Catenin Proteine dem Abbau zuführen (Li et al. 2012). Zusätzlich verhindert der Transkriptionssuppressor *Groucho* im Nukleus über eine Interaktion mit Mitgliedern der TCF-Familie ein Ablesen von Wnt-Effektorgenen (Cavallo et al. 1998). Bindet ein Wnt-Ligand an den heterodimeren Rezeptor aus *Frizzled* (Fz) und *low-density-lipoprotein-related protein 5/6* (LRP5/6), so bindet Axin aus dem β-Catenin-Destruktionskomplex an den Rezeptor. Dies wird vermittelt durch Phosphorylierung von LRP5/6 (He et al. 2004, Mao et al. 2001), wofür *Dishevelled* (Dvl) ein wichtiger Kofaktor ist (Bilic et al. 2007). Zusätzlich dissoziiert β-TrCP vom β-Catenin-Destruktionskomplex. β-Catenin wird nun zwar noch phosphoryliert, aber nicht mehr durch β-TrCP vermittelt polyubiquitinyliert und somit nicht proteasomal abgebaut. Durch eine Sättigung des β-Catenin-Destruktionskomplexes akkumuliert unphosphoryliertes (aktives) β-Catenin und kann in den Kern translozieren (Li et al. 2012). Dort führt es über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktorkomplex *T-cell specific transcription factor/Lymphoid enhancer-binding factor-1* (TCF/LEF) zur Transkription einer großen Zahl von Wnt-Zielgenen (Li et al. 2012, Nusse 2013). Ein häufig verwendeter Indikator für eine hohe Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalwegs ist Axin2, welches Bestandteil eines negativen Rückkopplungsregelkreises ist (Lustig et al. 2002).

1.8 Fragestellung

Wie oben ausführlich dargestellt, stellt die Resistenz vieler Rektumkarzinome gegenüber der neoadjuvanten Radiochemotherapie ein großes klinisches Problem dar. Für den Transkriptionsfaktor TCF4 konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass dessen Inhibition zu einer Radiotherapiesensibilisierung in kolorektalen Karzinomzelllinien führt (Kendziorra et al. 2011). Interessanterweise ist TCF4 ein Schlüsseltranskriptionsfaktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Li et al. 2012), und dieser ist elementarer Bestandteil der kolorektalen Karzinogenese (Cancer-Genome-Atlas-Network 2012, Markowitz und Bertagnolli 2009). Somit beschrieb unsere Arbeitsgruppe als erste einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg und der Radio(chemo)therapieresistenz von kolorektalen Karzinomen (Kendziorra et al. 2011). Es werden jedoch gleichzeitig β -Catenin-unabhängige und zelltypabhängige Funktionen von Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie beschrieben (Grumolato et al. 2013, Wallmen et al. 2012). Daher blieb bisher ungeklärt, ob es sich bei der Resistenzvermittlung um eine TCF4-spezifische Funktion handelt oder ob der Wnt/ β -Catenin-Signalweg entscheidenden Einfluss hat. Für diese Arbeit ergaben sich hieraus folgende Fragen:

- Handelt es sich bei der Vermittlung der Radiotherapieresistenz um eine TCF4-spezifische Beobachtung oder eine Funktion des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs?
- Stellt die Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine zukünftige Therapieoption zur Sensibilisierung radiotherapieresistenter Rektumkarzinome dar?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Auslaufpipetten, serologisch	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Einfrierröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Einmalreagenzreservoirs, steril	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
Pasteurpipetten, Glas	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®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Platten, 12-Well, Cellstar®, steril	Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Platten, 6-Well, Cyto One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Platten, 96-Well, Cyto One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäße 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, Falcon Tube (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Transfermembran, Immobilon®-P Membran, Polyvinylidenfluorid (PVDF), Filterporengröße 0,45 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Vakuumfiltersystem rapid, PES Membrane 0,22 µM, 250 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen Cyto One [®] (25, 75 und 225 cm ²)	STARLAB GmbH, Hamburg Deutschland
Zellschaber, 300 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellspachtel, 195 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.2 Chemikalien

1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Brilliant Blau R250 Tabletten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, 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), 0,5 M, pH = 8,0	Quality Biological Inc., Gaithersburg, MD, USA
Glyzin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mayers Hämalalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminata [™] Forte, <i>Western horse raddish peroxidase (HRP) Substrate</i>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
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, pulver, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Natrium Deoxycholat ≥ 97 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumazid (NaN_3), reinst	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) $\geq 99,5$ %	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)	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) 5 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
XAV939	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom

2.1.3 Geräte

Autoklav, HST 32/25	Zirbus technology GmbH, Bad Grund/ Harz, Deutschland
Bestrahlungsgerät, Xstrahl RS225 X-Ray irradiator	Gulmay Medical ltd., Camberley (Surrey), United Kingdom
<i>Charge-coupled device</i> (CCD) Kamera, ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden
Colony Counter, eCount [™]	Heathrow Scientific [®] LLC, Nottingham, United Kingdom
Elektroblotter, semi-dry	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Freezing Container, 5100 Cryo 1 °C, „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresekammer, Minigel-Twin	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasplatte, ausgeschnitten, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasplatte, fixe Spacer, 1,0 mm, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Heißluftsterilisator, Heraeus ST6060	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Inkubator CO ₂ , Incubator C200	Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland
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
Mikroskop, invers, Leica DM IL	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop, Leica S6 E	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera, High-speed Leica EC3	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Multilabel Plate Reader, Victor™ X4	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
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, 8-Kanal Research pro 50-1200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette, Multipette [®] Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer, accu-jet [®]	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, 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	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Sterilbank, SterilGARD Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transfektionsgerät, Nucleofector™ 2b Device	Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 3100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vortexer, IKA® MS1 Shaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad, GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Water Purification System, Milli-Q Reference Ultrapure	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Wippschüttler, WS42	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg/ Versbach, Deutschland
Zählkammer, Neubauer improved	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, 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

2.1.4 Zellkulturreagenzien

0,25 % Trypsin -EDTA (1x)	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Antibiotikum, G 418-BC (Genitizin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bad Stabil Konzentrat	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetal Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

L-Glutamine 200 mM in 0,85 % NaCl Solution	Boehringer Ingelheim GmbH & Co.KG, Ingelheim, Deutschland
Nährmedium, (1:1) Dulbecco´s Modified Eagle Medium : F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12)	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Nährmedium, Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Nährmedium, Leibovitz´s L-15-Medium	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Nährmedium, RPMI-1640-Medium	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.5 Transfektionsreagenzien

Amaya™ Cell Line Nucleofector™ Kit V (25 RCT)	Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
Enthält:	
Nucleofector-Solution	
Elektroporationsküvetten	
Pipetten	

2.1.6 siRNAs

siRNA gegen β -Catenin (# 1)	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
siRNA gegen β -Catenin (# 2)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
siRNA gegen β -Catenin (# 3)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
siAllStarsNEG	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland

2.1.7 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 doppelt destilliertem Wasser (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.

Radio Immuno Precipitation 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.

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.

4x SDS-PAGE-Ladepuffer

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 10 ml</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.

SDS-PAGE-Laufpuffer

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 1000 ml</u>
Tris ultrapure	25 mM	3,03 g
Glyzin	192 mM	14,41 g

Reagenzien in ddH₂O lösen und pH-Wert auf 8,3 einstellen, dann ddH₂O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 1000 ml erreicht ist.

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, Lösungspuffer für Antikörper

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

Lösungspuffer für Antikörper

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 10 ml</u>
TBS-T		10 ml
Bovines Serum Albumin	5 %	0,5 g

Coomassie-Fixierlösung für Gele

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 1000 ml</u>
Methanol	50 %	500 ml
Eisessig	10 %	100 ml
ddH ₂ O	40 %	400 ml

Coomassie-Färbelösung für Gele

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 1000 ml</u>
Methanol	50 %	500 ml
Coomassie Brilliant Blue	0,05 %	500 mg
Eisessig	10 %	100 ml
ddH ₂ O	40 %	400 ml

Coomassie-Entfärbelösung für Gele

<u>Reagenzien</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Für 1000 ml</u>
Methanol	5 %	50 ml
Eisessig	7 %	70 ml
ddH ₂ O	88 %	880 ml

2.1.8 Kits

Pierce[®] Bicinchoninic Acid Assay (BCA) Protein Assay Kit Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Enthält:

BCA Reagent A

BCA Reagent B

Albumin Standard Ampullen, 2 mg/ml

2.1.9 Computer-Software

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

2.1.10 Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Proteingewicht (kDa)</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Lösungspuffer</u>	<u>Inkubationszeit (h)</u>	<u>Temperatur (°C)</u>
Anti-Actin (A2066)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	Kaninchen	42	1:2000	5 % Milch-TBS-T	2	Raum- temperatur
Anti-Active- β -Catenin (Anti-ABC), clone 8E7	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	Maus	92	1:4000	5 % Milch-TBS-T	über Nacht	4
Anti-Axin 2 (76G6)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Kaninchen	95/98	1:1000	5 % Milch-TBS-T	über Nacht	4
Anti- β -Catenin (Carboxy-Terminal Antigen)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Kaninchen	92	1:2000	5 % Milch-TBS-T	über Nacht	4
<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Proteingewicht (kDa)</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Lösungspuffer</u>	<u>Inkubationszeit (h)</u>	<u>Temperatur (°C)</u>
Polyclonal Antibody to Mouse IgG (H&L) - HRP, R1253HRP	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland	Kaninchen		1:30.000	5 % Milch-TBS-T	2	Raum- temperatur
Polyclonal Antibody to Rabbit IgG (H&L) - HRP, R1364HRP	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland	Ziege		1:30.000	5 % Milch-TBS-T	2	Raum- temperatur

Tabelle 4: Verwendete Antikörper mit Verdünnungen und Inkubationsbedingungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in den von der *American Type Culture Collection* (ATCC) empfohlenen Medien bei 37 °C, gegebenenfalls mit 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂), kultiviert und in Anlehnung an die empfohlenen Protokolle behandelt. Die genauen Wachstumsbedingungen der einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 5 aufgeführt. Alle Medien wurden mit 10 % fetalem bovinem Serum (FBS) und 1 % Glutamin versetzt und vor der Verwendung, genau wie das *phosphate buffered saline* (PBS), auf 37 °C vorgewärmt. Bei Abweichungen vom empfohlenen Medium wird explizit darauf hingewiesen. Sämtliche Zellkulturarbeit wurde an einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal pro Woche mikroskopisch beurteilt und je nach Wachstumsdichte das Medium gewechselt oder die Zellen gesplittet. Dadurch wurden die Zellen stets in einer logarithmischen Wachstumsphase gehalten.

<u>Zelllinie</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Organ</u>	♂/♀	<u>Medium</u>	<u>CO₂</u>	<u>ATCC Nr.</u>
SW480	Mensch	Kolon	♂	Leibovitz's L-15	Raumluft	CCL-228
LS1034	Mensch	Zäkum	♂	RPMI-1640	5 % CO ₂	CRL-2158
SW837	Mensch	Rektum	♂	Leibovitz's L-15	Raumluft	CCL-235
hTERT RPE-1	Mensch	Retina	♀	DMEM:F-12 + 0,35 % NaHCO ₃	5 % CO ₂	CRL-4000
L-Cells	Maus	Fibroblast	♂	DMEM	5 % CO ₂	CRL-2648
L-Cells Wnt3a	Maus	Fibroblast	♂	DMEM + G 418 (0,4 mg/ml)	5 % CO ₂	CRL-2647

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien mit einigen Charakteristika und ihren Wachstumsbedingungen (ATCC 2007, ATCC 2011, ATCC 2012, ATCC 2013a, ATCC 2013b, ATCC 2013c)

2.2.1.1 Zellen auftauen

Zur Langzeitasservation wurden alle Zelllinien bei -150 °C gelagert. Aufgetaut wurden sie in einem Wasserbad mit 37 °C und im direkten Anschluss mithilfe einer Transferpipette in ein 15-ml-Röhrchen mit 10 ml Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 800 U/min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet vorsichtig in 5 ml Medium resuspendiert und in eine T25er Flasche überführt.

Nach einem Tag wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und in Abhängigkeit von der Konfluenz entweder das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen oder die Zellen gesplittet. Das genaue Vorgehen hierbei wird im Folgenden beschrieben. Bevor die Zellen für Experimente verwendet wurden, wurden sie mindestens dreimal passagiert.

2.2.1.2 Mediumwechsel

Die Nährstoffbestandteile, die im Medium enthalten sind, werden von den Zellen mit der Zeit verbraucht und Stoffwechselendprodukte akkumulieren, folglich muss regelmäßig frisches Medium auf die Zellen in Kultur gegeben werden (Lindl 2002).

Sofern bei der mikroskopischen Beurteilung der Zellen die Konfluenz bei maximal 50 % lag und die Erfahrung zeigte, dass die Zellen bis zur nächsten Beurteilung 2-3 Tage später nicht über 80 % konfluent sein würden, so wurde nur das Medium gewechselt.

Bei den adhärennten Zellen wurde dazu das alte Medium abgesaugt und in Abhängigkeit von der Kulturgefäßgröße zwischen 0,1 ml und 30 ml frisches Medium hinzugefügt.

Die genaue Auflistung der Medienvolumen in Abhängigkeit von der Flaschengröße ist in Tabelle 6 aufgeführt.

<u>Kulturgefäßgröße (cm²)</u>	<u>Medium/PBS Volumen (ml)</u>	<u>0,25 % Trypsin-EDTA Volumen (ml)</u>
0,32 (96-Well-Platte (WP))	0,1	0,01-0,02
3,8 (12-WP)	1	0,1-0,2
9,6 (6-WP)	3	0,5
25	5	0,5
75	10	1
225	30	3

Tabelle 6: Verwendetes Medium/PBS-Volumen und Trypsin-EDTA-Volumen für verschiedene Kulturgefäßgrößen.

2.2.1.3 Subkultivierung

Erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 70-80 %, wurden sie gesplittet. Hintergrund ist, dass es bei zu dichtem Kontakt zwischen den Zellen zu Zell-Zell-Interaktionen mit Veränderung der Morphologie und Wachstumseigenschaften, Kontaktinhibition sowie zur Konkurrenz um Wachstumsfaktoren und Nährstoffe kommen kann (Lindl 2002).

Zunächst wurde das alte Medium mittels Absaugen entfernt und im Anschluss die Zellen mit PBS ohne Kalzium und Magnesium gewaschen, um freie Magnesium- und Kalziumionen sowie Serumreste zu entfernen. Anschließend wurde das PBS wieder abgesaugt. Geringste Serumreste können durch darin enthaltene Proteaseinhibitoren das Trypsin, eine Endopeptidase, inaktivieren. Zusätzlich führen Proteine aus dem Serum zu einer kompetitiven Inhibition des Enzyms (Lindl 2002). Nun erfolgte eine Inkubation mit 0,25 % Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für ca. 5 min, um die adhärennten Zellen zu lösen. Dabei komplexiert das EDTA die verbliebene Kalzium- und Magnesiumionen, die Trypsin inhibieren können und wichtig für Zell-Zellkontakte sind. Nach visueller Kontrolle des Loslösens der Zellen aus dem Verband wurden die Zellen in Medium suspendiert und

anschließend eine dem Wachstumsverhalten der Zellen angepasste Fraktion in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Hiernach wurde die Zellsuspension für 5 min bei 800 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgte die Resuspension der Zellen in Medium und das Rückführen in die Kulturflasche.

2.2.1.4 Zellen einfrieren

Grundsätzlich wurden nur Zellen eingefroren, die seit ihrem eigenen Auftauen nicht öfter als sieben Mal passagiert wurden.

Zunächst wurde die Einfrierbox mit 100 % Isopropanol gefüllt. Dieses hat die Eigenschaft, in der -80 °C-Tiefkühltruhe relativ gleichmäßig mit ca. 1 °C pro min abzukühlen. Zusätzlich wurde das Einfriermedium vorbereitet. Hierzu wurde das normale Kulturmedium für die jeweilige Zelllinie verwendet und mit 1 % Glutamin, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20 % FBS versetzt. Das DMSO reduziert dabei die Eiskristallbildung und verhindert eine teilweise Austrocknung der Zelle durch die niedrigen Temperaturen, indem es sich mit dem Zytoplasma mischt. Das Serum hat ebenfalls einen Schutzeffekt für die Zellen (Lindl 2002). Nach den Vorbereitungen wurden die Zellen zunächst mithilfe von 0,25 % Trypsin-EDTA in Suspension gebracht (siehe Kapitel 2.2.1.3), anschließend bei 800 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und dann mit dem vorbereiteten Einfriermedium resuspendiert. Aus einer ca. 70-90 % konfluenten T75er Flasche wurden die Zellen auf 3-4 Einfrierröhrchen aufgeteilt. Pro Einfrierröhrchen wurde dann 1 ml Zellsuspension verwendet. Um toxische Effekte des DMSO bei Raumtemperatur gering zu halten, wurden die verschlossenen Röhrchen schnellstmöglich in die Einfrierbox gestellt, danach die Zellen für 24 h im -80 °C-Kühlschrank herunter gekühlt und am nächsten Tag in die -150 °C-Kühltruhe überführt.

Einige Tage nach dem Einfrieren wurden die Zellen aus einem Einfrierröhrchen als Kontrolle wieder aufgetaut. Es wurde das Anwachsverhalten über einige Tage beobachtet, um sicherzustellen, dass die Zellen ihr Wachstumsverhalten nicht geändert haben oder untergegangen waren.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Zunächst erfolgte eine Suspension der Zellen mithilfe von 0,25 % Trypsin-EDTA, wie unter Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, dann die Zentrifugation, das Absaugen des Überstandes und schließlich die Resuspension der Zellen in Medium.

Die gelösten Zellen wurden 1:10 in Trypanblau verdünnt und anschließend 10 µl pro Kammerfenster in die Neubauerzählkammer gegeben. Danach wurde das arithmetische Mittel der 8 Leukozytenzählfelder gebildet und mit dem Faktor 10^5 auf Zellzahl pro Milliliter hochgerechnet, mit der dann, je nach Bedarf, weitergearbeitet werden konnte.

2.2.2 Herstellung von Medium mit löslichem Wnt3a

Ziel der Medienkonditionierung war es, Medienüberstand mit dem löslichen Signalprotein Wnt3a zu gewinnen. Wnt3a kann an den heterodimeren Oberflächenrezeptor aus *Frizzled* und LRP5/6 binden und somit eine Signalkaskade initiieren (siehe Abbildung 3) (Shibamoto et al. 1998). Zur Herstellung von Wnt3a-haltigem Medium wurden murine Fibroblastenzellen (L-Cells) genutzt, die durch einen stabil integrierten Vektor Wnt3a produzieren und ins Medium sezernieren ((+) Wnt3a Medium) (ATCC 2007). Als Kontrolle wurde stets Medienüberstand von unveränderten L-Cells verwendet ((-) Wnt3a Medium) (ATCC 2007). Es wurde Wnt3a-haltiges Medium basierend auf den Nährmedien DMEM-F12 und RPMI-1640 hergestellt.

Der gesamte Konditionierungsvorgang dauerte ca. 6-8 Tage. Die im Folgenden beschriebene Prozedur erfolgte parallel für Wildtyp-L-Cells und L-Cells Wnt3a und wurde zum Teil gleichzeitig in mehreren Kulturflaschen durchgeführt, um das Volumen des gewonnenen Medienüberstandes zu erhöhen.

Am ersten Tag wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet und in Kulturflaschen mit 225 cm² Wachstumsfläche (T225er) in DMEM ausgesät. Unter normalen Kulturbedingungen befinden sich die L-Cells Wnt3a in einem mit Genitizin (G-418) versetzten Selektionskulturmedium (siehe Tabelle 5). Dieses kann zur Selektion der vektortragenden L-Cells genutzt werden, da der Vektor auch ein Resistenzgen gegen Genitizin enthält (ATCC 2007). Ab dem genannten Schritt befanden sich die L-Cells Wnt3a nicht mehr in Selektion durch Genitizin, da dieses aufgrund mangelnder Resistenz bei den später behandelten Zellen nicht in den hergestellten Medienüberstand gelangen durfte. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und 50 ml des zu konditionierenden Mediums auf die Zellen gegeben. Nun folgte eine 2 - 4 tägige Inkubation, bis der Zellrasen eine Konfluenz von nahezu 100 % erlangte. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Medium mittels Überführen in ein steriles Röhrchen gewonnen, durch 50 ml frisches Medium ersetzt und die Zellen wurden erneut inkubiert. Das gewonnene Medium wurde 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet verworfen. Die so gewonnene Charge I des konditionierten Mediums wurde zunächst bei 4 °C gelagert und 3 Tage später mit Charge II

weiterverwendet. Charge II wurde analog zu Charge I drei Tage hiernach gewonnen und die Zellen wurden im Anschluss verworfen. Die so gewonnenen Chargen I und II wurden gemischt, mithilfe eines Vakuumfiltrationssystems filtriert und bei 4 °C gelagert. So entstanden insgesamt je 100 ml Medium (-)/(+) Wnt3a.

Bei der späteren Verwendung wurden die konditionierten Medien stets im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium gemischt, da sich das Medium (-)/(+) Wnt3a bereits ca. 3 Tage mit Zellen in Kultur befand und somit Nährstoffe fehlten bzw. Stoffwechselendprodukte akkumulierten.

2.2.3 SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung

Bei Gelelektrophorese, Western Blot und der Immunfärbung erfolgt eine Auftrennung von Proteinen nach Größe und anschließende Visualisierung. Dabei dient die Intensität eines Chemilumineszenzsignals als semiquantitatives Maß für die Proteinmenge. Vorangestellt ist diesem Prozess die Zellgewinnung, Zellyse und Proteinisolation.

2.2.3.1 Zellgewinnung, Zellyse und Proteinisolation

Den Zellen wurde zunächst in einem Waschschrift PBS hinzugegeben um Mediumreste zu entfernen und anschließend wurden sie durch Zugabe von 100 - 200 µl Lysepuffer und mechanisches Abkratzen mit dem Zellkulturspachtel direkt im Zellkulturgefäß lysiert. Das gewonnene Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Reagiergefäß überführt.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Lysepuffer verwendet, das weitere Vorgehen erfolgte wie unter Kapitel *Nonidet[®] P40-Lysepuffer* und Kapitel *Radio Immuno Precipitation Assay-Lysepuffer* beschrieben.

Nonidet[®] P40-Lysepuffer

Zur Vorbereitung des Nonidet[®] P40 (NP40) -Lysepuffers wurden diesem die in Tabelle 7 aufgeführten Komponenten zugesetzt.

<u>Reagenz</u>	<u>Im Verhältnis</u>
Dithiothreitol (DTT)	1:10
PhosSTOP	1:10
Proteinaseinhibitorcocktail	1:100

Tabelle 7: Zusätze für NP40-Lysepuffer.

Die zugegebenen Reagenzien dienen dem Schutz vor Proteinabbau durch Phosphatasen und Proteasen sowie der Reduktion von Disulfidbrücken (DTT) innerhalb der Proteine (Cleland 1964), die ein entscheidender Bestandteil der Tertiärstruktur sind. Nachdem die Zellen

mithilfe des Lysepuffers vom Gefäßboden gelöst wurden, folgte eine 45-60 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 10.000 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt und das Pellet verworfen. Die so gewonnene Proteinsuspension konnte dann bei -80 °C gelagert oder direkt weiter verwendet werden.

Bei Verwendung des NP40-Lysepuffers erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mithilfe des Verfahrens nach Bradford (Compton und Jones 1985). Hierbei wurden Triplikate einer Standardkurve von je 50 µl mit definierten Konzentrationen einer Lösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) sowie Triplikate von Verdünnungen (1:100 und 1:200) der zu messenden Proben auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde ihnen 200 µl einer kommerziellen Roti[®] Quant-Reagenz zugegeben und für 5 min inkubiert. Es folgte die photometrische Messung der Extinktion der jeweiligen Proben bei 595 nm. Hintergrund ist hierbei die Umwandlung des Coomassie Blau Farbstoffes aus der Roti[®] Quant Reagenz von der kationischen in die anionische Form durch Interaktion mit Proteinen. Dies bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm (Compton und Jones 1985). Mithilfe der Extinktionswerte der Standardkurve mit bekannter Proteinkonzentration - nach Subtraktion des Leerwertes - konnte unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges in diesem Wertebereich mittels linearer Regression eine Steigung ermittelt werden. Anhand dieser konnten nach der linearen Steigungsformel die Konzentrationen der Proteinsuspensionen berechnet werden. Durch die Verwendung von Triplikaten sowohl der Standardkurve als auch der Proteinverdünnungen und Bestimmung der Mittelwerte, konnten Abweichungen durch Pipettierungenauigkeiten sowie Messfehler des Gerätes deutlich reduziert werden. Mithilfe der so bestimmten Proteinkonzentrationen konnte das Suspensionsvolumen berechnet werden, das für eine definierte Proteinmasse von 10 µg bzw. 20 µg für die Gelelektrophorese auf das Gel aufgetragen werden musste.

Radio Immuno Precipitation Assay-Lysepuffer

Bei Verwendung des Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA) -Lysepuffers wurden zunächst die Zusätze in Tabelle 8 hinzugegeben.

<u>Reagenz</u>	<u>Im Verhältnis</u>
PhosSTOP	1:10
Proteinaseinhibitorcocktail	1:100

Tabelle 8: Zusätze für RIPA-Lysepuffer.

Nach dem Lösen der Zellen mit RIPA-Lysepuffer wurde die Suspension 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine mechanische Zellyse mithilfe eines Ultraschallhomogenisators, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf Eis für 20 min. Schließlich wurde die Suspension für 20 min bei 13.300 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand als Proteinsuspension gewonnen und das Pellet verworfen. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung der einzelnen Proben wurde nun eine *bicinchoninic acid assay* (BCA) Messung durchgeführt, da im RIPA-Puffer Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten ist. SDS stört die Nachweisreaktion im Bradfordtest, sodass dieser nicht verwendet werden konnte (Compton und Jones 1985). Im Unterschied zum beschriebenen Bradford-Verfahren wurden 200 µl eines BCA-Reagenz statt der Roti[®] Quant-Reagenz sowie eine Wellenlänge von 544 nm für die photometrische Messung verwendet. Für die Absorption sind bei diesem Verfahren zwei Reaktionen nötig. Zuerst reagieren zweifach positiv geladene Kupferionen mit den Peptidbindungen der Proteine in alkalischem Milieu zu einfach positiv geladenen Kupferionen. Diese Reaktion wird Biuret-Reaktion genannt. Die einfach positiv geladenen Kupferionen werden dann von der Bicinchoninsäure komplexiert und es entsteht ein stabiler, farbiger Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm (Smith et al. 1985). Aus Praktikabilitätsgründen wurde die Absorption bei 544 nm gemessen, was nach den Angaben des Herstellers kein Problem darstellt (Thermo-Scientific 2011).

Die Berechnung des Ladevolumens der Proteinsuspension erfolgte wie unter Kapitel *Nonidet[®] P40-Lysepuffer* bereits beschrieben.

Proteindenaturierung

Zur Denaturierung der Proteine wurden diese bei 95 °C für 5 min erhitzt. Um die Proteine bei der anschließenden Gelelektrophorese nur nach dem Molekulargewicht zu separieren, wurden sie vor dem Erhitzen mit einem SDS-haltigen Ladepuffer im Verhältnis 1:4 (ein Teil Ladepuffer auf 3 Teile Protein) versetzt. Dieser sorgt durch das anionische Tensid für eine gleichsinnige negative Ladung aller Proteine, die proportional zur Länge und somit zum Molekulargewicht des Proteins ist. Zusätzlich spaltet das SDS nicht kovalente Bindungen und hat somit denaturierende Eigenschaften (Shapiro et al. 1967).

Die so vorbereiteten, linearisierten Proteine konnten nun bei -80 °C gelagert oder mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Es wurde das Verfahren der eindimensionalen, diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Durch die verschiedenen pH-Werte in Sammel- und Trenngel ergeben sich scharfe Banden vor dem Eintritt der Proteine in das Trenngel. Da das Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine im Bereich von 42 bis 98 kDa lag, wurde ein 8 % Gel gewählt. Für die genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 9.

<u>Reagenzien</u>	<u>Trenngel 8 %</u>	<u>Sammelgel</u>
ddH ₂ O	9,3 ml	3,4 ml
Rotiphorese [®] Gel30	5,3 ml	830 µl
	Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH = 8,8) 5,0 ml	Sammelgelpuffer (1,0 M Tris, pH = 6,8) 630 µl
SDS-Lösung, 10 %	200 µl	50 µl
APS, 10 %	200 µl	50 µl
TEMED	20 µl	5 µl

Tabelle 9: Rezept für 2 Minigele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel. Optional können zum Sammelgel 75 µl Bromphenolblau-Lösung hinzugefügt werden, um die Beladung des Gels zu erleichtern.

Das Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt und der Laufpuffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Geltaschen vorsichtig ausgespült, um etwaige Gelreste zu entfernen. Die durch das Aufkochen und den Ladepuffer denaturierten Proteine wurden in einer Masse von 10 - 20 µg in die Geltaschen geladen. Zum Abschätzen der Proteingröße und des Fortschritts der Auftrennung wurde ein farbiger Standard-Marker (*Broad Range*) mit geladen. Anschließend wurde ein konstanter Strom von 20 - 30 mA pro Gel bei variabler Spannung angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine von der Kathode zur Anode mit vom Molekulargewicht abhängiger Geschwindigkeit wanderten. Der Elektrophoreseprozess wurde beendet, sobald die durch den blauen Ladepuffer bedingte Lauffront an der Unterkante des Gels herauslief.

2.2.3.3 Western Blot

Bevor die Proteine mittels Immunfärbung und Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden konnten, mussten sie aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran übertragen werden. Im Gel würden die Proteine innerhalb kürzester Zeit eluieren, was auf der Membran nicht passiert.

Dazu wurde das Verfahren des *semi-dry transfer* angewendet. Die Schichtung ist in Abbildung 4 zu sehen.

Kathode (-)
3x Filterpapier
Gel
PVDF-Membran
3x Filterpapier
Anode (+)

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schichtung zwischen Kathode und Anode beim Western Blot.

Bevor der Transfer begonnen werden konnte, musste die PVDF-Membran mit Methanol für 10 s aktiviert, danach 5 min in ddH₂O gewaschen und anschließend, genau wie das Gel, für 15 min in Transferpuffer inkubiert werden. Das Methanol im Transferpuffer und bei der Membranaktivierung dient dazu, die Dissoziation des SDS von den Proteinen zu begünstigen und dadurch die Affinität der PVDF-Membran für Proteine zu erhöhen (Mozdzanowski et al. 1992). Das Filterpapier dient als Austrocknungsschutz während des Transfervorgangs und wurde ebenfalls für 15 min in Transferpuffer benetzt.

Für den Proteintransfer wurde ein konstanter Strom von 100 mA pro Stapel bei variabler Spannung für eine Stunde angelegt. Dabei folgen die negativ geladenen Proteine dem elektrischen Feld auf die Membran.

Nach dem Transfervorgang wurde die Membran zunächst für 5 min in *Tris buffered saline*-Puffer (TBS) gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur, bzw. über Nacht bei 4 °C, mit 5 % Milch TBS-T inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Dies reduziert unspezifische Bindungen der Antikörper.

2.2.3.4 Gel-Färben

Während des Proteintransfers wurden nicht alle Proteine aus dem Gel gelöst. Die auf dem Gel verbliebenen Proteine wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau auf dem Gel gefärbt, um den Erfolg des Transferprozesses und die Beladung zu kontrollieren. Dazu wurden die Proteine zunächst auf dem Gel für 30 min mit einer Fixierlösung am Eluieren gehindert und anschließend über Nacht gefärbt. Am nächsten Tag folgten zwei Waschvorgänge zu je 15 min in der Fixierlösung und eine anschließende Inkubation in einer Entfärbelösung, bis sich die Proteinbanden deutlich vor dem hellen Hintergrund kontrastierten. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind unter Kapitel 2.1.7 zu finden.

2.2.3.5 Immunfärbung

Nach dem Blockiervorgang wurde die Membran in Abhängigkeit davon, welche Proteine untersucht werden sollten, in Streifen geschnitten. Diese enthielten jeweils die Banden eines Proteingrößenbereiches von ca. 10-15 kDa (z.B. 30-45 und 75-90 kDa). Der bereits erwähnte *Broad Range*-Marker diente dabei als Orientierungshilfe. Hintergrund ist, dass je Membranstreifen stets nur ein Antikörper verwendet wurde. Nach dem Schneiden wurde die Membran über Nacht bei 4 °C bzw. für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert, der spezifische Epitope mit seinem Fab-Teil auf dem Protein von Interesse bindet. Diese Antikörper wurden vom Hersteller durch eine in einem Wirtstier provozierte Immunreaktion gegen das spezifische Epitop gewonnen. Eine genaue Auflistung der verwendeten Antikörper findet sich im Materialteil in Tabelle 4.

Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und schließlich für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser zweite Antikörper ist gegen den wirtsspezifischen Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte wieder ein Waschschrift für 3 x 5 min in TBS-T und danach eine Zwischenlagerung der Membran in TBS bis zur Detektion.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nun mithilfe einer *charge-coupled device* (CCD) - Kamera vom Typ LAS 4000 und dem *Luminata™ Forte Western HRP Substrate*. Dazu wurde auf die Membran mit dem Protein, dem Primär- und Sekundärantikörper ca. 200 µl der Luminata™-Lösung gegeben. Die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase bewirkt hierbei über mehrere Zwischenschritte die Oxidation von Luminol. Dies bewirkt eine Lumineszenz, die mithilfe der Kamera erkannt wird. Dieser Effekt wird durch variable Zusätze des Herstellers massiv verstärkt (Thorpe et al. 1985).

Sollten zwei Proteine sehr ähnlicher Größe, beispielsweise Axin2 (95/98 kDa) und aktives β -Catenin (92 kDa) gefärbt werden, die auf demselben Membranstück lagen, so wurde nach der Detektion des Signals für das erste Protein das Membranstück für 5 min mit 1 molarer Natronlauge inkubiert und danach für 3 x 5 min in TBS-T gewaschen. Die Natronlauge bewirkt das Lösen der Primär- und Sekundärantikörper von ihren Epitopen. Der Erfolg wurde durch erneute Signalbestimmung mit der Chemilumineszenzkamera bestätigt, indem kein Signal mehr detektierbar war. Danach konnte eine erneute Inkubation mit einem zweiten Primärantikörper erfolgen (siehe oben, (s.o.)). In allen Immunfärbungen wurde Aktin als Proteinladekontrolle gefärbt.

2.2.4 RNA-Interferenz

Bei Experimenten mit *small interfering RNAs* (siRNA) wird ein natürlicher, posttranskriptioneller Regulations- und Schutzmechanismus der Zelle genutzt. Die RNase *Dicer* spaltet aus doppelsträngiger RNA Fragmente von ca. 21 Nukleotiden Länge, sogenannte siRNAs. Diese sind charakterisiert durch einen 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende sowie eine 5'-Phosphatgruppe und können zusammen mit dem *RNA-induced silencing complex* (RISC) an komplementäre *messenger RNA* (mRNA) -Sequenzen binden. Die gebundene mRNA wird über die Endonukleaseaktivität des RISC etwa in der Mitte der gebundenen Sequenz gespalten. Durch diese Spaltung der mRNA und den anschließenden Abbau der RNA-Fragmente wird eine Translation verhindert (Caplen und Mousses 2003).

Kommerziell angebotene siRNAs, wie die hier verwendeten siRNAs gegen β -Catenin, binden ebenfalls an den RISC, führen zu einem Abbau ihrer komplementären mRNA-Sequenz und bewirken hierdurch eine effektive Herunterregulation dieses Genproduktes (Caplen und Mousses 2003).

Als Kontrolle diente eine in ihrer Basenabfolge nicht-komplementäre siRNA-Negativkontrolle (siAllStarsNEG), die an keine mRNA bindet. Die siRNAs wurden per Elektroporation in die Zelle gebracht (siehe Kapitel 2.2.4.1). Anschließend wurden die Zellen wieder bei 37 °C inkubiert und konnten nach mindestens 24 h Inkubation für weitere Versuche verwendet werden.

2.2.4.1 Transfektion der siRNAs

Ziel einer Transfektion ist es, Genexpressionsvektoren oder siRNAs transient in eine Zelle zu bringen. Dazu wurde ein chemisch-physikalisches Verfahren, die Elektroporation, verwendet. Bei der Elektroporation wird durch eine kurzzeitige, hohe Spannung die Zellmembran durchgängig gemacht und so einem DNA-Fragment oder anderen Kleinstpartikeln der Eintritt in den Zellkern ermöglicht (Potter et al. 1984). Für die Zelllinien SW480, SW837 und LS1034 wurden im Labor bereits etablierte Protokolle aus früheren Versuchen verwendet. Es wurden das *Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V* und das vorinstallierte Programm T30 eingesetzt (Spitzner et al. 2014). Für die Versuche wurden ausschließlich sterile, DNase und RNase freie Pipettenspitzen, Reagiergefäße usw. verwendet und die Arbeit erfolgte unter der Sterilbank.

Die Zellen wurden, wie unter Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, in Suspension gebracht und pro geplante Elektroporation 1×10^6 bzw. 4×10^6 (LS1034) Zellen in ein 50-ml-Röhrchen gegeben.

Nun wurden die Zellen bei 700 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100 µl *Nucleofector*[®] *Solution* resuspendiert. Während des Zentrifugierens waren 2,5 µl bzw. 5 µl (LS1034) siRNA je geplante Elektroporation in ein 1,5-ml-Reagiergefäß vorgelegt worden. Die Zellsuspension in 100 µl *Nucleofector*[®] *Solution* wurde nun zur siRNA in das Reagiergefäß gegeben, kurz gemischt und anschließend blasenfrei in die Elektroporationsküvette überführt. Es erfolgte die Elektroporation mit dem T30-Programm. Hiernach wurden die transfizierten Zellen vorsichtig, ohne den an der Oberfläche schwimmenden Zelldetritus, in 1 ml vorgewärmtem RPMI-1640-Medium aufgenommen und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut für 5 min mit 700 U/min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen wurden in L-15 bzw. RPMI-Medium in eine 6-Well-Platte überführt. Nach vorsichtigen Schwenkbewegungen zum Verteilen der Zellen wurden diese im Brutschrank inkubiert. Es war zu beachten, dass die Zellen sich nicht länger als 15 min in der reinen *Nucleofector*[®] *Solution* befanden (Lonza 2006).

2.2.4.2 Vorversuche mit siβ-Catenin

Zunächst erfolgten Vorversuche, um den Zeitpunkt mit der minimalen Proteinexpression von aktivem β-Catenin nach der Transfektion mit einer siRNA zu finden. Es wurden drei verschiedene siRNAs gegen β-Catenin eingesetzt, wovon zwei aus experimentellen Gründen in einem „pool“ kombiniert wurden (siehe Anhangstabelle 1). Die Verwendung mehrerer siRNAs mit verschiedenen Zielsequenzen auf der selben Ziel mRNA diene dabei der Reduktion des Risikos, dass das Ergebnis ein Resultat von ungewollten Effekten, sogenannten *off-target* Effekten, ist (Pei und Tuschl 2006). Konkret können einzelne Sequenzen einer mRNA (teilweise) homolog zu Sequenzen anderer mRNAs sein. Werden mehrere siRNAs mit verschiedenen Zielsequenzen gegen eine mRNA verwendet und beobachtet man vergleichbare Effekte, so senkt dies die Wahrscheinlichkeit, dass der Effekt durch *off-target* Effekte auf genannten (teilweise) homologen mRNAs verursacht wurde (Cullen 2006, Pei und Tuschl 2006). Als Negativkontrolle diene siAllStarsNEG, die an keine mRNA bindet. Für die Vorversuche wurden 1×10^6 bzw. 4×10^6 Zellen der Zelllinien SW480, SW837 und LS1034, wie unter Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, transfiziert, anschließend in 6-Well-Platten gesetzt, bei 37 °C inkubiert und nach 24 h, 48 h, 72 h, und 96 h Proteine der Zellen isoliert. Anschließend wurde nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot eine Immunfärbung von aktivem β-Catenin, Axin2 und Aktin durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1 dargestellt.

2.2.5 Der kleinmolekulare Inhibitor XAV939

XAV939 ist ein kleinmolekularer Inhibitor und kommt prinzipiell einem therapeutischen Ansatz näher als die RNA-Interferenzversuche. Er inhibiert die Tankyrasen 1 und 2, die unter Normalbedingungen für einen ubiquitinvermittelten Abbau von Axin im Proteasom sorgen. Durch Inhibition der Tankyrase kommt es im Umkehrschluss zu einer Stabilisierung von Axin (Huang et al. 2009). Axin als dosislimitierender Bestandteil des sogenannten β -Catenin-Destruktionskomplexes sorgt zusammen mit APC und GSK3 β für eine Phosphorylierung von β -Catenin und führt damit zur Polyubiquitylierung und zum proteasomalen Abbau hiervon (Nakamura et al. 1998, Salic et al. 2000).

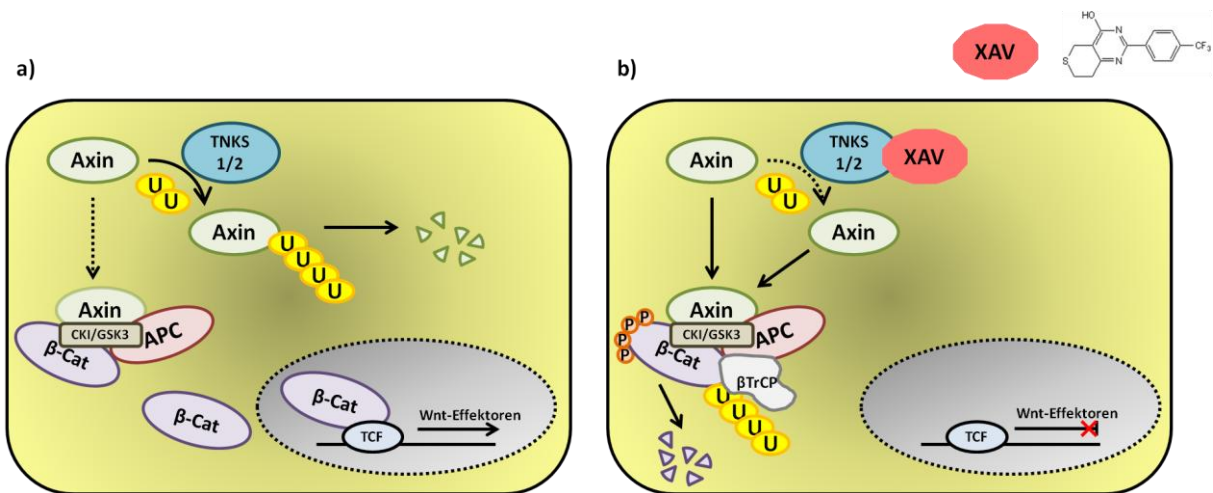


Abbildung 5: Schematische Darstellung des XAV939-Wirkungsmechanismus mit Strukturformel von XAV939 (Tocris 2012). a) Proteasomaler Abbau von Axin unter Normalbedingungen, vermittelt durch die Tankyrasen. Aktives β -Catenin kann in den Kern translozieren und eine Signaltransduktion bewirken. b) Axin-Stabilisierung durch die XAV939-vermittelte Inhibition der Tankyrasen. Der Destruktionskomplex phosphoryliert β -Catenin und dieses wird proteasomal abgebaut (modifiziert nach Huang et al. 2009, Nakamura et al. 1998). Für Details und Abkürzungen siehe Text.

Insgesamt führt XAV939, wie in Abbildung 5 zu sehen, zu einer Stabilisierung von Axin durch Abbauehemmung und zu einer verstärkten Degradation von β -Catenin durch Zunahme des proteasomalen Abbaus (Huang et al. 2009). Der verstärkte Abbau von β -Catenin führt zu einer Unterbrechung der Signaltransduktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg (siehe Abbildung 5) (Huang et al. 2009).

2.2.5.1 Vorversuche mit XAV939

Zunächst erfolgte bei den Versuchen mit XAV939 eine Bestimmung des optimalen Zeitpunkts und der wirksamsten Dosis. Als Kriterien für einen guten Zeitpunkt und eine gute Konzentration wurden ein möglichst deutlich sichtbarer Anstieg des Axins bzw. Absinken des β -Catenins in der Immunfärbung und gleichzeitig eine positive Korrelation zwischen Dosis und Wirkung festgelegt. Da der Tankyraseinhibitor in DMSO gelöst wird und dieses in

höheren Konzentrationen zelltoxisch sein kann, sollte eine möglichst niedrige XAV939-Konzentration gefunden werden, bei der jedoch trotzdem ein möglichst guter Effekt erkennbar ist.

Dazu wurden definierte Zellzahlen der zu untersuchenden Zelllinie in XAV939- bzw. DMSO-haltiges Medium mit verschiedenen Konzentrationen gesetzt und das Gesamtprotein der Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten isoliert. Anschließend wurde nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot eine Immunfärbung von aktivem β -Catenin, Axin2 und Aktin durchgeführt. DMSO ist das Lösungsmittel für XAV939 (Tocris 2012) und somit als Negativkontrolle geeignet um zu zeigen, dass ein Effekt nicht auf einer Wirkung des Lösungsmittels beruht. Die genauen Versuchsdurchführungen variierten für die verschiedenen Zelllinien leicht und sind im Folgenden detailliert aufgeführt.

Für alle Versuche mit SW480 mit dem Ziel der Zellisolation zur Proteingewinnung wurden 1×10^6 SW480-Zellen je Well in eine 6-Well-Platte gesetzt. Zunächst erfolgte die Isolation nach 6 h, 24 h und 48 h Inkubation, und es wurde mit einer Konzentration von 10 μ M XAV939 und einer DMSO-Kontrolle begonnen. Anschließend erfolgte noch eine Konzentrationsfindung mit 0,25 - 20 μ M XAV939 bei einer Inkubationszeit von 48 h. Die Ergebnisse sind unter Kapitel 3.2.1 zu finden. Bei den Versuchen mit SW837 wurden für die Zellisolation stets 1×10^6 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte gesetzt. Hier wurden direkt Konzentrationsreihen von 4 - 20 μ M XAV939 mit den Inkubationszeiten 48 h, 72 h und 96 h durchgeführt. Anschließend erfolgte noch eine Konzentrationsreihe mit 0,25 - 5 μ M XAV939 zum Zeitpunkt 96 h. Die Ergebnisse sind unter Kapitel 3.2.2 zu finden. Für die Vorversuche mit LS1034 wurden 5×10^5 Zellen je Well in eine 6-Well-Platte gesetzt. Es erfolgten Konzentrationsreihen mit 0,25 - 20 μ M XAV939 bei Inkubationszeiten von 24 - 96 h. Die Ergebnisse sind unter Kapitel 3.2.3 zu finden.

Zur Optimierung bei retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) wurden 3×10^5 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte gesetzt. Es wurden relativ kurze Inkubationszeiten von 10 h, 24 h und 48 h mit den Konditionen 0,5 μ M, 4 μ M und 10 μ M XAV939 und DMSO als Kontrolle getestet. Die Ergebnisse sind unter Kapitel 3.2.4 zu finden.

2.2.6 Das lösliche Signalprotein Wnt3a

Das lösliche Signalprotein Wnt3a gehört zu den Wnt/ β -Catenin-Signalweg-stimulierenden Liganden des heterodimeren Oberflächenrezeptors aus *Frizzled* und LRP5/6 (siehe Abbildung 3) (MacDonald et al. 2009). Janneke Möller konnte in ihrer Doktorarbeit bereits zeigen, dass

eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit Wnt3a zu einer Zunahme der Radiotherapieresistenz der Normalzelllinie RPE führt. Mithilfe von Wnt3a-sezernierenden L-Cells wurde RPMI-1640-Medium hergestellt, das Wnt3a enthält (siehe Kapitel 2.2.2). Damit wurde im Umkehrversuch zu den Inhibitionsexperimenten die Auswirkung einer externen Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf die Radiotherapieresistenz der Karzinomzelllinie LS1034 untersucht.

2.2.6.1 Test des konditionierten Mediums

Zunächst musste nachgewiesen werden, dass das hergestellte RPMI-1640-Medium Wnt3a enthält. Hierzu wurden die Wildtyp-L-Cells verwendet (siehe Kapitel 2.2.2). Eine Inkubation mit Wnt3a führt zu einer gesteigerten Expression von aktivem β -Catenin in diesen Zellen (Shibamoto et al. 1998). Es wurden $3,5 \times 10^5$ Wildtyp-L-Cells pro Well in eine 6-Well-Platte gesetzt und für 10 h bzw. 24 h mit dem konditionierten Medium (+ Wnt3a) bzw. mit dem Kontrollmedium (- Wnt3a) inkubiert. Anschließend wurde nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot eine Immunfärbung von aktivem β -Catenin und Aktin durchgeführt. Das Ergebnis ist in Kapitel 3.3.1 dargestellt.

2.2.6.2 Vorversuche mit Wnt3a

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Inkubation der LS1034-Zellen mit Wnt3a-enthaltendem Medium zu einer Stimulation der Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin führt. Für den Versuch wurden 5×10^5 LS1034-Zellen je Well in eine 6-Well-Platte gesetzt und für 24 bis 96 h mit RPMI (-)/(+) Wnt3a inkubiert. Anschließend wurden aktives β -Catenin, Axin2 und Aktin im Western Blot bestimmt. Das Ergebnis ist in Kapitel 3.3.2 dargestellt.

2.2.7 Koloniebildungstest

Um die Fähigkeit von Zellen, Bestrahlungsschäden zu überwinden und anschließend Kolonien zu bilden, zu messen und zu quantifizieren, wurde ein sogenannter Koloniebildungstest (KBT) durchgeführt. Die Fähigkeit von Einzelzellen Kolonien zu bilden, gilt als gutes Maß für ihre Fähigkeit, jegliche Art von Manipulation oder Stress, wie zum Beispiel eine Bestrahlung, zu überwinden (Puck und Marcus 1955). In den durchgeführten KBTs wurden stets eine oder mehrere behandelte Zellpopulation(en) mit einer Kontrolle

verglichen, um die Auswirkung der Behandlung auf die Radiotherapieresistenz der Zellen zu bestimmen. Es wurden Zellzahlen zwischen 200 und 12000 Zellen je Well (siehe Tabelle 10) als Einzelzellen in 3 ml Medium, gegebenenfalls unter Behandlungsbedingungen, in eine 6-Well-Platte gesetzt.

		<u>Zellzahl/Well</u>			
		<u>SW480</u>	<u>SW837</u>	<u>LS1034</u>	<u>RPE</u>
<u>Dosis (Gy)</u>	0	250 - 400	500 - 800	500 - 3000	200
	1	250 - 400	500 - 800	500 - 3000	200
	2	250 - 400	500 - 800	500 - 3000	400
	4	500 - 800	1000 - 1600	750 - 6000	600
	6	750 - 1200	1500 - 2400	1000 - 9000	800
	8	1000 - 1600	2000 - 3200	1250 - 12000	1000
<u>Verdopplungszeit (h)</u>		32	64	25	19
<u>KBT-Wachstumszeit (d)</u>		9 - 11	15 - 17	10	6

Tabelle 10: Zellzahlen für den Koloniebildungstest, Verdopplungszeiten und KBT-Wachstumszeiten für die Zelllinien SW480, LS1034, SW837 und RPE.

Die optimalen Zellzahlen und Wachstumszeiten für die jeweiligen Zelllinien sind in Tabelle 10 dargestellt und wurden von unserer Arbeitsgruppe in der Vergangenheit etabliert. Die Verdopplungszeiten stammen aus der Literatur (ATCC 2013c, Spitzner et al. 2010).

Nach 24 h Adhärenzzeit wurden die Zellen mit Dosen von 0 bis 8 Gy bei einer Dosisleistung von 2 Gy/min bestrahlt (Geräteeinstellungen: 200 kV, 15 mA, Filter: 0,5 mm Kupfer, Tischhöhe: 351 mm). Einen Tag danach erfolgte gegebenenfalls ein Mediumwechsel. Da sich die Zellen innerhalb der Adhärenzzeit noch nicht wieder teilen konnten, handelte es sich in der Regel um Kolonien aus Einzelzellen. Nach dem Bestrahlen wurden die Zellen zwischen 6 und 17 Tagen (siehe Tabelle 10) unter optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert (Franken et al. 2006). Bei Inkubationszeiten über sieben Tage wurde nach der Hälfte der Zeit 1 ml Nährmedium/Well hinzugegeben, um optimale Wachstumsbedingungen zu garantieren. Schließlich wurden die gewachsenen Kolonien nach Absaugen des Nährmediums durch Zugabe von 70 % Ethanol für 20 min fixiert, das Ethanol wurde wieder entfernt und die Platten wurden getrocknet. Zum Färben mit Hämalaunblau (bei SW480 Kristallviolett) wurden die Kolonien für 5 min mit der Färbelösung bedeckt, anschließend gespült und getrocknet (Rave-Frank et al. 2007). Für die verschiedenen Zelllinien und Behandlungen variierten die genauen Bedingungen jeweils leicht. Sie sind im Folgenden für jede einzelne Kombination detailliert dargestellt.

2.2.7.1 Koloniebildungstest nach Transfektion

Bei den siRNA-Versuchen mit SW480, SW837 und LS1034 war der Ablauf wie in Abbildung 6 zu sehen.



Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinien SW480, SW837 und LS1034 nach Transfektion mit siRNA.

Die Zellen wurden transfiziert (siehe Kapitel 2.2.4), nach 24 h als Einzelzellen gesetzt und wiederum nach einem Tag Adhärenzzeit erfolgte die Bestrahlung (RT=Radiotherapie). Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.7.2 Koloniebildungstest unter der Behandlung mit XAV939 bzw. Wnt3a

Im Folgenden sind die Versuchsprotokolle für die Behandlung der Zelllinien mit XAV939 bzw. Wnt3a kurz erläutert. In Abbildung 7 ist der beschriebene Versuchsablauf für die Zelllinie RPE und die Behandlung mit XAV939 schematisch dargestellt. Die Zellen wurden als Einzelzellen in Medium mit XAV939 ausgesetzt, nach 24 h bestrahlt und der KBT nach 6 Tagen abgestoppt. Zum Zeitpunkt 48 h erfolgte ein Mediumwechsel um das XAV939 zu entfernen.



Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinie RPE bei der Behandlung mit XAV939.

Bei den Zelllinien SW837 und LS1034 waren für die Behandlung mit XAV939 bzw. Wnt3a (LS1034) Zeiträume von über 24 h bis zum Bestrahlungszeitpunkt nötig (siehe Kapitel 3.2.2, Kapitel 3.2.3 und Kapitel 3.3.2), weswegen zunächst 3 Millionen Zellen in einer T75er Flasche für 48 bis 72 h vorbehandelt wurden. Anschließend wurden diese unter Behandlungs-/Kontrollbedingungen in die 6-Well-Platten gesetzt und 24 h später bestrahlt (s.o.). Einen Tag nach der Bestrahlung erfolgte gegebenenfalls ein Mediumwechsel auf normales Nährmedium (siehe Abbildung 8).

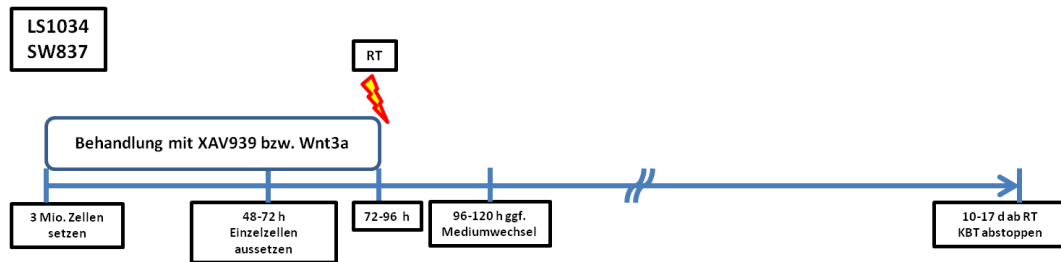


Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinien LS1034 und SW837 bei der Behandlung mit XAV939 bzw. mit Wnt3a.

Der Ablauf für die Zelllinie SW480 war etwas anders. Der etablierte optimale Bestrahlungszeitpunkt für die Behandlung mit XAV939 (siehe Kapitel 3.2.1) war 48 h nach Behandlungsbeginn. Wäre die Adhärenzzeit in den 6-Well-Platten auf 48 h erhöht worden, wäre es zu einer Teilung der Zellen vor der Bestrahlung gekommen, was eine Vergleichbarkeit mit anderen Versuchen erschweren würde. Gleichzeitig war es bei diesem Versuch aber auch nicht möglich, die Zellen nach nur 24 h Behandlung wieder aus dem Zellverband zu lösen und in die 6-Well-Platten zu setzen, da hierbei die Gefahr bestand, dass zu viele Zellen untergehen. Aus diesen Gründen wurde folgendes Protokoll etabliert:

Die Zellen wurden für 48 h analog zum Protokoll für SW837 und LS1034 mit XAV939 behandelt. Anschließend wurden sie, wie unter Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, aus dem Zellverband gelöst, und eine Zellsuspension mit definierter Konzentration wurde hergestellt. Nun erfolgte eine schrittweise Bestrahlung der im 15-ml-Röhrchen befindlichen Zellen. Dies bedeutete, dass zunächst die Zellen für die 0-Gy-Platte gesetzt wurden und die restlichen mit 1 Gy bestrahlt wurden. Danach wurden die bestimmten Zellzahlen in die 1-Gy-Platte gesetzt und anschließend die noch im Röhrchen befindlichen Zellen wieder mit 1 Gy bestrahlt, die Zellen in die 2-Gy-Platte gesetzt usw. (gesamtes Protokoll siehe Abbildung 9). Dabei wurde ein kumulativer Effekt die Einzelstrahlendosen bei kurzem Intervall zwischen den Bestrahlungszeitpunkten vorausgesetzt (Warren und Whipple 1923).

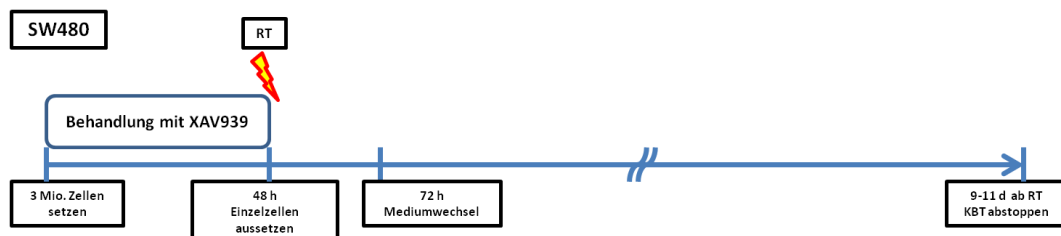


Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinie SW480 bei der Behandlung mit XAV939.

2.2.7.3 Auswertung eines Koloniebildungstests

Bei der mikroskopischen Auswertung wurden Zellverbände von mindestens 50 Einzelzellen als Kolonien gewertet (Franken et al. 2006), was 5-6 Teilungszyklen entspricht. Dies wird als

Marker für die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung angesehen und unterscheidet somit valide zwischen überlebenden Zellen und stark geschädigten Zellen (Franken et al. 2006). Zur Berechnung der Überlebensfraktion wurde wie folgt vorgegangen:

Zunächst wurde die Anwachseffektivität (AE) für jede Kondition berechnet (Formel 1).

$$AE = \frac{\text{Mittelwert(Anzahl der Kolonien in der 0 Gy Platte, } n \geq 3)}{\text{gesetzte Zellzahl bei 0 Gy}}$$

Formel 1: Berechnung der Anwachseffektivität (Franken et al. 2006).

Für jede einzelne Bestrahlungsdosis und Kondition wurde nun die normalisierte Überlebensfraktion (nÜF) berechnet (Formel 2).

$$n\ddot{U}F = \frac{\frac{\text{Mittelwert(Anzahl der Kolonien in der } x \text{ Gy Platte, } n \geq 3)}{\text{gesetzte Zellzahl bei } x \text{ Gy}}}{\text{Anwachseffektivität}}$$

Formel 2: Berechnung der normalisierten Überlebensfraktion (Franken et al. 2006).

Durch die Normalisierung mithilfe der Anwachseffektivität wurden Ungenauigkeiten beim Zellen einzählen minimiert und die Überlebensfraktion ohne Bestrahlung (0 Gy) wurde als 1 gesetzt. Dabei war es wichtig, dass die gesetzten Zellen für die Platten von 0 - 8 Gy aus einem Röhrchen je Kondition mit einer Zellsuspension einer definierten Konzentration stammten. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung erfolgte eine Zellisolation aus den zu vergleichenden Gruppen, um mittels Immunfärbung den Behandlungseffekt zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu bestätigen. Diese Versuche wurden als technische Triplikate und biologische Replikate ($n \geq 3$) durchgeführt. Von den normalisierten Überlebensfraktionen der biologischen Replikate wurde nun der Mittelwert berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung durch Dr. Frank Kramer, Institut für Medizinische Statistik, Universität Göttingen. Hierbei wurde ein multiples lineares Regressionsmodell herangezogen. Dabei war die normalisierte Überlebensfraktion die abhängige Variable, mit den unabhängigen Variablen Bestrahlungsdosis, Behandlungsgruppe (behandelt oder Kontrolle) und biologisches Replikat. Mithilfe einer Varianzanalyse wurden zwei verschiedene Modelle verglichen. Das erste enthielt die Bestrahlungsdosis und das Replikat und das zweite zusätzlich einen Behandlungseffekt und eine Behandlungs- Bestrahlungsdosisinteraktion. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen (Kendziorra et al. 2011).

3 Ergebnisse

Die Radiochemotherapieresistenz des Rektumkarzinoms stellt ein großes klinisches Problem dar. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Inhibition des Transkriptionsfaktors TCF4 zu einer Sensibilisierung kolorektaler Karzinomzelllinien gegenüber einer Radiotherapie führt (Kendziorra et al. 2011). TCF4 ist ein Haupttranskriptionsfaktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, es werden aber auch andere Funktionen beschrieben.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Radiotherapieresistenz in kolorektalen Karzinomzelllinien vermittelt, und ob die Inhibition dieses Signalwegs eine zukünftige Therapieoption darstellt. Dazu wurde zunächst die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs selektiv per RNA-Interferenz gegen β -Catenin inhibiert. Anschließend wurden Zellen mit dem kleinmolekularen Wnt/ β -Catenin-Inhibitor XAV939 behandelt. Im Umkehrexperiment wurden Zellen zur Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit Wnt3a behandelt.

3.1 siRNA gegen β -Catenin

Das Protein β -Catenin ist ein entscheidender Bestandteil des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Durch eine Hemmung der Translation von β -Catenin mittels RNA-Interferenz (siehe Kapitel 2.2.4) wird die Signaltransduktion an einer Schlüsselstelle unterbrochen und die Transkription der Zielgene dieses Signalwegs wird eingeschränkt (siehe Abbildung 3). Die Versuche wurden in den Zelllinien SW480, SW837 und LS1034 durchgeführt. SW480 ist eine humane Kolonkarzinomzelllinie und gilt als Prototyp einer Wnt/ β -Catenin-aktiven Zelllinie (de la Roche et al. 2014, Kohler et al. 2009, Korinek et al. 1997, Sadot et al. 2002). SW837 ist eine relativ radiotherapieresistente, humane Rektumkarzinomzelllinie mit aktivem Wnt/ β -Catenin-Signalweg (siehe Tabelle 5 und Anhangsabbildung 1). Diese beiden Zelllinien wurden bereits in früheren Experimenten erfolgreich verwendet und sind mit ihren Eigenschaften und Wachstumsbedingungen in unserer Arbeitsgruppe gut etabliert (Camps et al. 2013, Grade et al. 2011, Kendziorra et al. 2011, Spitzner et al. 2014). Zudem weisen beide Zelllinien die typischen chromosomalen und transkriptionellen Veränderungen kolorektaler Karzinome auf (Camps et al. 2009, Camps et al. 2013, Grade et al. 2007). Als dritte Zelllinie wurde die Kolonkarzinomzelllinie LS1034 gewählt, die im Vergleich zu SW480 und SW837 eine hohe Proteinexpression von Axin2 besitzt (siehe Anhangsabbildung 2). Ein hohes

Expressionslevel von Axin2 (Bestandteil eines negativen Rückkopplungsregelkreises des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs) weist auf eine relativ hohe Grundaktivität des Signalwegs hin. LS1034 eignet sich zudem aufgrund ihres Wachstumsverhaltens und der Verdopplungszeit (siehe Tabelle 10) gut für die durchgeführten Versuche. Die Zelllinie weist im Vergleich zu den anderen Karzinomzelllinien eine mittlere Radiotherapieresistenz auf (vergleichbar mit SW480, siehe Anhangsabbildung 1) und ist somit prinzipiell für Stimulations- und Inhibitionsexperimente geeignet.

3.1.1 siRNA gegen β -Catenin in SW480

Die Vorversuche zur Findung des optimalen Zeitpunktes wurden, wie unter Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 10 zeigt, dass nach siRNA-Transfektion die Proteinexpression von aktivem β -Catenin und Axin2 deutlich geringer ist als bei der Kontrolle siNeg. Der Effekt ist zu allen Zeitpunkten vergleichbar stark erkennbar.

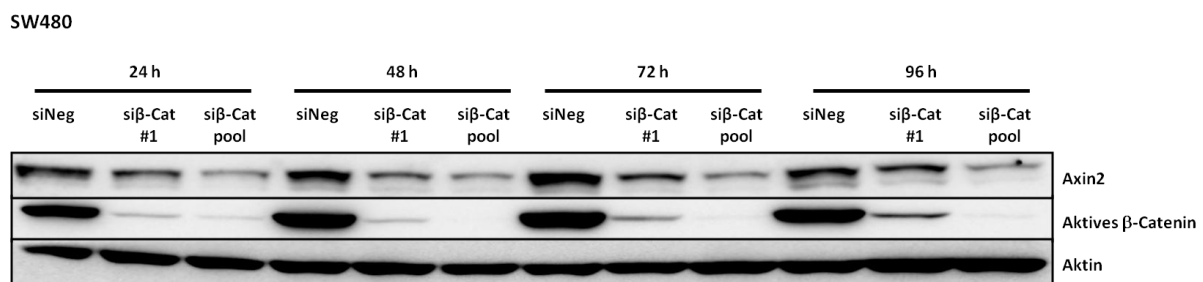


Abbildung 10: Zeitreihe SW480 mit si β -Catenin (si β -Cat). Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zellysaten 24 - 96 h nach Transfektion der siRNAs. Zu jedem Zeitpunkt ist eine deutliche Abnahme von Axin2 und aktivem β -Catenin beim Vergleich siNeg gegen si β -Catenin #1 bzw. pool zu sehen.

Anschließend wurde untersucht, ob die Abnahme der Proteinexpression von aktivem β -Catenin auch zu einer Veränderung der Radiotherapiesensibilität führt. Dazu wurde ein Koloniebildungstest, wie unter Kapitel 2.2.7.1 beschrieben, durchgeführt. Als Zeitpunkt für die Radiotherapie wurde 48 h nach Transfektion gewählt. Der KBT wurde für die Konditionen si β -Catenin #1, si β -Catenin pool und siNeg durchgeführt. Abbildung 11 a zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt die Proteinexpression von aktivem β -Catenin und Axin2 im Vergleich mit der Kontrolle (siNeg) deutlich erniedrigt ist. Abbildung 11 b zeigt in den si β -Catenin-Gruppen eine deutlich stärkere Abnahme der Überlebensfraktion mit steigender Bestrahlungsdosis als in der siNeg Kontrolle.

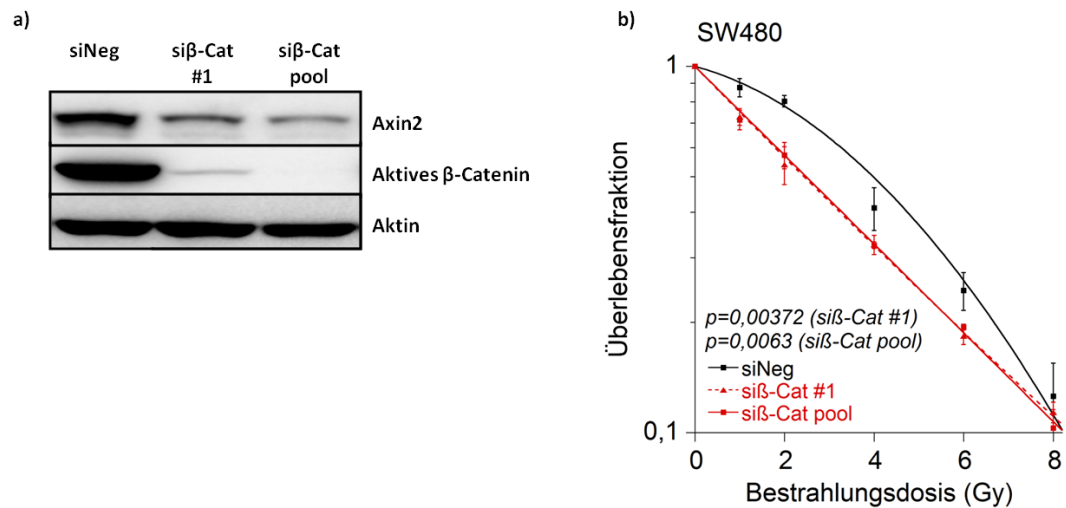


Abbildung 11: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes der siRNA auf Proteinebene 48 h nach Transfektion. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW480 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen siNeg (Kontrolle, schwarz), si β -Catenin #1 (si β -Cat #1, rot gestrichelt) und si β -Catenin pool (si β -Cat pool, rot) (n = 3).

Die statistische Auswertung ergab für si β -Catenin #1 einen p-Wert von 0,00372 im Vergleich mit der Kontrolle, für si β -Catenin pool ergab sich ein p-Wert von 0,0063. Zusätzlich wurden beide experimentellen Gruppen zusammengefasst und im Vergleich mit der Kontrolle betrachtet. Hier ergab sich für den Vergleich si β -Catenin gegen siNeg ein p-Wert von $2,73 \times 10^{-5}$. Die Herunterregulation von aktivem β -Catenin mittels siRNA führt somit zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung von SW480.

3.1.2 siRNA gegen β -Catenin in SW837

Die Zeitreihe für die Zelllinie SW837 wurde analog zum Experiment mit SW480 (siehe oben) durchgeführt. Abbildung 12 zeigt, dass nach Transfektion der siRNAs gegen β -Catenin die Proteinexpression von aktivem β -Catenin und Axin2 deutlich geringer ist, als bei der Kontrolle siNeg. Der Effekt ist zu allen Zeitpunkten vergleichbar stark erkennbar.

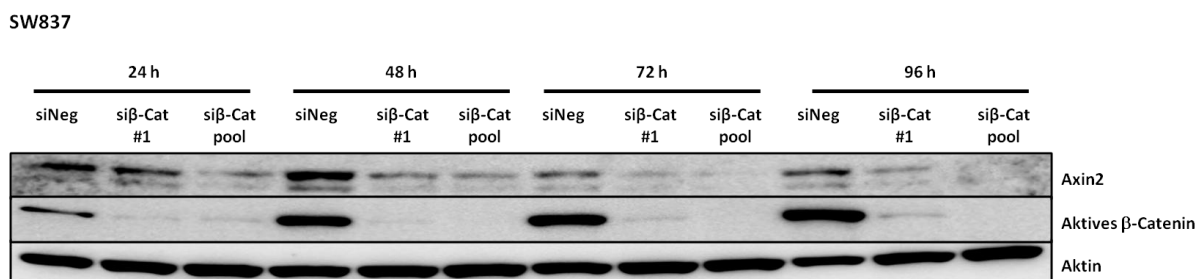


Abbildung 12: Zeitreihe SW837 mit si β -Catenin (si β -Cat). Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zellysaten 24 - 96 h nach Transfektion der siRNAs. Zu jedem Zeitpunkt ist eine deutliche Abnahme von Axin2 und aktivem β -Catenin beim Vergleich siNeg gegen si β -Catenin #1 bzw. pool zu sehen.

Im Anschluss wurde analog zum vorigen Experiment mit SW480 ein KBT mit den gleichen Eckdaten durchgeführt. Abbildung 13 a bestätigt die Abnahme der Proteinexpression von aktivem β -Catenin und Axin2 48 h nach Transfektion von si β -Catenin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Abbildung 13 b lässt erkennen, dass die Überlebensfraktion mit steigender Bestrahlungsdosis in den si β -Catenin-Gruppen deutlich stärker abnimmt als in der siNeg Kontrolle.

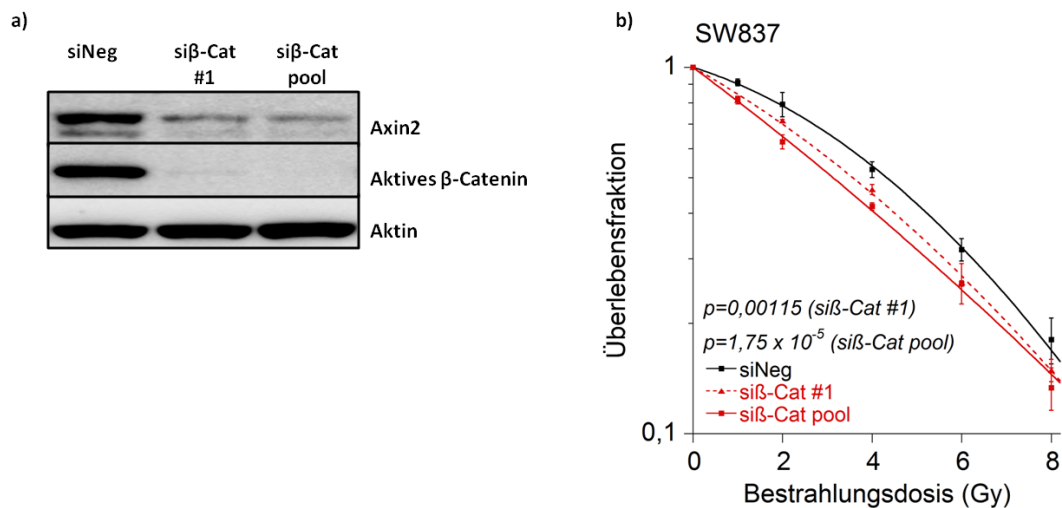


Abbildung 13: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes der siRNA auf Proteinebene 48 h nach Transfektion. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW837 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen siNeg (Kontrolle, schwarz), si β -Catenin #1 (si β -Cat #1, rot gestrichelt) und si β -Catenin pool (si β -Cat pool, rot) (n = 3).

Die statistische Auswertung erfolgte analog zum vorigen Experiment, es wurden je eine si β -Catenin-Gruppe mit der Kontrolle und einmal zusammengefasst si β -Catenin mit der Kontrolle verglichen. Für si β -Catenin #1 ergab sich ein p-Wert von 0,00115, für si β -Catenin pool war $p = 1,75 \times 10^{-5}$. Bei der zusammengefassten Berechnung betrug der p-Wert $2,76 \times 10^{-6}$. Die Herunterregulation von aktivem β -Catenin mit si β -Catenin führt somit zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung von SW837.

3.1.3 siRNA gegen β -Catenin in LS1034

Um den Einfluss der Herunterregulation von aktivem β -Catenin auf die Radiotherapiesensibilität kolorektaler Karzinomzelllinien weiter zu validieren wurde der Versuch in einer dritten Zelllinie durchgeführt.

Die Zeitreihe für die Zelllinie LS1034 erfolgte analog zu den Experimenten mit SW480 und SW837 (siehe oben). Abbildung 14 zeigt, dass nach Transfektion der siRNAs gegen β -Catenin die Proteinexpression von aktivem β -Catenin und Axin2 deutlich geringer ist, als bei der Kontrolle siNeg. Der Effekt ist zu allen Zeitpunkten vergleichbar.

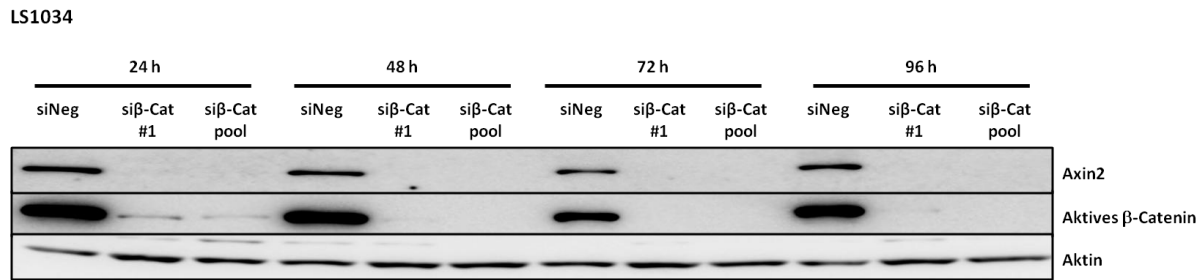


Abbildung 14: Zeitreihe LS1034 mit siβ-Catenin (siβ-Cat). Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β-Catenin aus Zelllysaten 24 - 96 h nach Transfektion der siRNAs. Zu jedem Zeitpunkt ist eine deutliche Abnahme von Axin2 und aktivem β-Catenin beim Vergleich siNeg gegen siβ-Catenin #1 bzw. pool zu sehen.

Anschließend wurde untersucht, ob die Abnahme der Proteinexpression von aktivem β-Catenin durch die RNA-Interferenz auch zu einer Veränderung der Radiotherapiesensibilität führt. Dazu wurde analog zu den vorigen Experimenten ein Koloniebildungstest durchgeführt. Als Zeitpunkt für die Radiotherapie wurde 48 h nach Transfektion gewählt. Der KBT wurde für die Konditionen siβ-Catenin #1, siβ-Catenin pool und siNeg durchgeführt. Abbildung 15 a zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt die Proteinexpression von aktivem β-Catenin und Axin2 im Vergleich mit der Kontrolle (siNeg) deutlich erniedrigt ist. Abbildung 15 b zeigt in den siβ-Catenin-Gruppen eine deutlich stärkere Abnahme der Überlebensfraktion mit steigender Bestrahlungsdosis als in der siNeg Kontrolle.

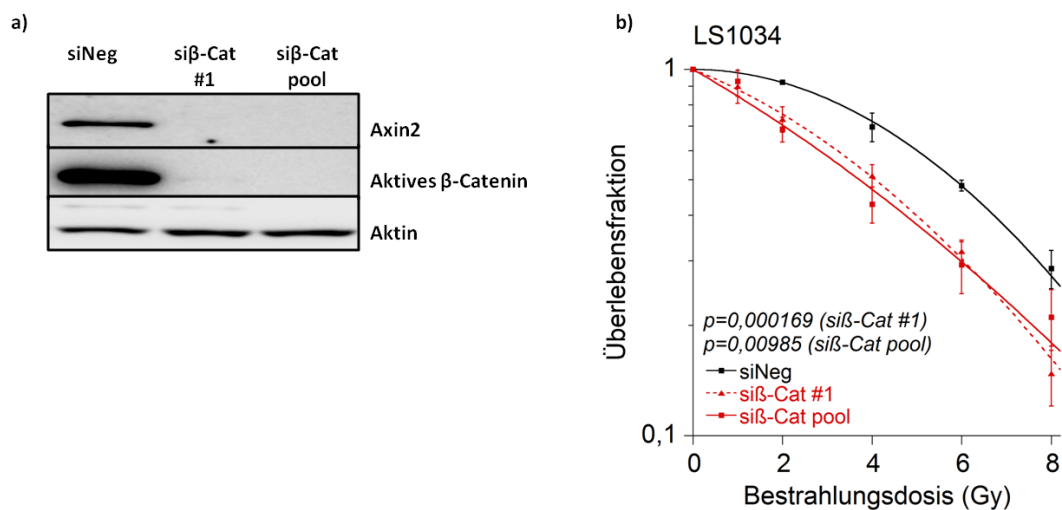


Abbildung 15: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes der siRNA auf Proteinebene 48 h nach Transfektion. b) Überlebensfraktion der Zelllinie LS1034 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen siNeg (Kontrolle, schwarz), siβ-Catenin #1 (siβ-Cat #1, rot gestrichelt) und siβ-Catenin pool (siβ-Cat pool, rot) (n = 3).

Die statistische Auswertung erfolgte wieder für siβ-Catenin #1, siβ-Catenin pool und die zusammengefasste Gruppe jeweils im Vergleich mit der Kontrolle. Für siβ-Catenin #1 ergab sich ein p-Wert von 0,000169, für siβ-Catenin pool ein p-Wert von 0,00985 und für die zusammengefasste Gruppe ergab sich ein p-Wert von 0,000119. Die Herunterregulation von

aktivem β -Catenin mit si β -Catenin in der Zelllinie LS1034 führt somit zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung.

3.2 Behandlung mit XAV939

Die siRNA-Versuche bestätigten die Relevanz des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Radiotherapieresistenz. Allerdings ist der klinische Einsatz von siRNAs bisher noch schwierig und problematisch. Daher war das nächste Ziel, die Ergebnisse mithilfe des kleinmolekularen Inhibitors XAV939 zu überprüfen, da dieser potentiell klinisch einsetzbar ist. Der Tankyraseinhibitor XAV939 führt, wie in Abbildung 5 zu sehen, durch Abbauhemmung zu einer Stabilisierung von Axin und durch Zunahme des proteasomalen Abbaus zu einer verstärkten Degradation von β -Catenin (Huang et al. 2009). Somit wird der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch XAV939 inhibiert.

3.2.1 Behandlung von SW480 mit XAV939

Bei den Versuchen mit XAV939 wurde ebenfalls mit der Zelllinie SW480 begonnen. Zunächst erfolgte eine Zeitpunkts- und Dosisfindung (siehe Kapitel 2.2.5.1). In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass zum Zeitpunkt 6 h weder Proteinlevel von Axin2 noch von aktivem β -Catenin zu detektieren sind. Nach 24 h Inkubation mit XAV939 ist eine Zunahme der Proteinlevel von Axin2 und eine leichte Abnahme der Proteinlevel von aktivem β -Catenin im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

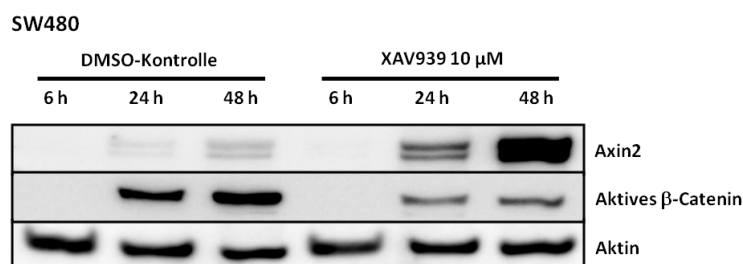


Abbildung 16: Zeitreihe SW480 mit XAV939. Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach 6 - 48 h Inkubation mit XAV939. Nach 48 h ist eine deutliche Stabilisierung von Axin2 und ein Abnahme von aktivem β -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu sehen.

Nach 48 h erfolgt eine deutliche Stabilisierung von Axin2 bei gleichzeitiger deutlicher Abnahme von aktivem β -Catenin. Somit ist die erwartete Wirkung des XAV939 bei der Zelllinie SW480 nach 48 h Inkubation mit XAV939 zu erkennen. Als nächstes erfolgte eine Optimierung der XAV939-Konzentration. Dazu wurde die bereits etablierte Inkubationszeit von 48 h verwendet und die XAV939-Konzentration von 0,25 bis 20 μ M variiert. Als

Kontrolle diente wieder eine Inkubation mit DMSO. Wie in Abbildung 17 zu erkennen, erfolgt ab einer Konzentration von 1 μM XAV939 eine Stabilisierung von Axin2 und eine Abnahme von aktivem β -Catenin im Vergleich zur Kontrolle.

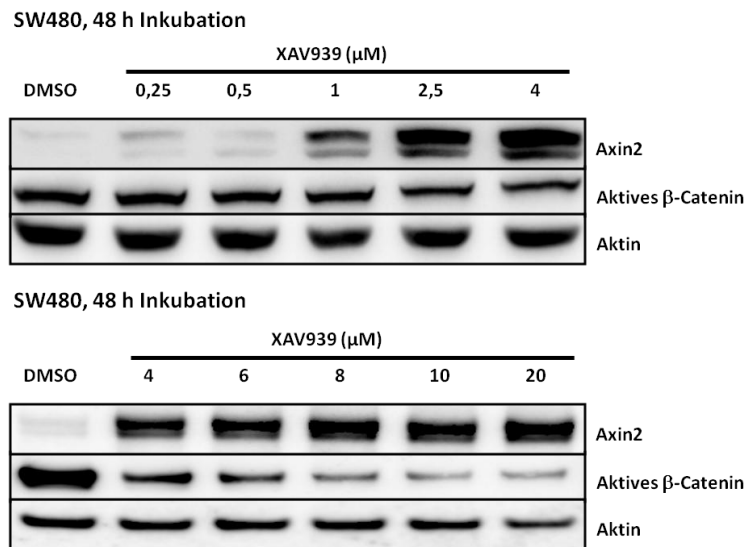


Abbildung 17: Konzentrationsreihe SW480 mit XAV939. Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach 48 h. Inkubation mit XAV939-Konzentrationen von 0,25 - 4 μM und von 4 - 20 μM . Ab einer Konzentration von 1 μM XAV939 ist eine Stabilisierung von Axin2 und eine Abnahme von aktivem β -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu erkennen.

Ab 10 μM XAV939 ist kein weiterer Anstieg der Proteinlevel von Axin2 mit steigender XAV939-Konzentration erkennbar, und auch die β -Catenin-Level verändern sich nicht mehr. Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung von SW480 mit XAV939 eine Stabilisierung von Axin2 und Degradation von aktivem β -Catenin erfolgt.

Im Anschluss wurde untersucht, ob diese Abnahme von aktivem β -Catenin auch zu einer Veränderung der Radiotherapiesensibilität führt. Dazu wurde analog zu den Experimenten mit siRNAs ein Koloniebildungstest durchgeführt (genaues Protokoll siehe Kapitel 2.2.7.2). Als Konditionen wurden 1 μM und 4 μM XAV939 sowie eine DMSO-Kontrolle gewählt. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die Behandlung mit XAV939 zu einer Abnahme der Überlebensfraktion von SW480 im Vergleich zur Inkubation mit DMSO führt. Gleichzeitig ist der Effekt bei der Behandlung mit 4 μM XAV939 etwas stärker als bei 1 μM . Die statistische Auswertung mit dem multiplen linearen Regressionsmodell ergab für die Behandlung von SW480 mit 1 μM XAV939 im Vergleich mit der Kontrolle einen p-Wert von 0,0116 und für die Behandlung mit 4 μM XAV939 einen p-Wert von 0,0112. Somit ist eine geringe, dosisabhängige und signifikante Radiotherapiesensibilisierung zu erkennen.

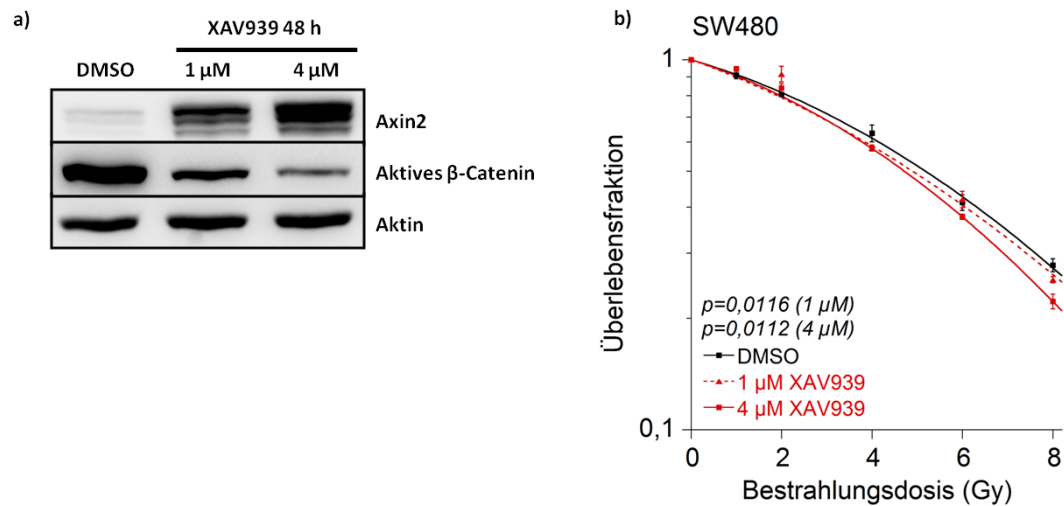


Abbildung 18: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW480 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen DMSO (Kontrolle, schwarz), 1 μ M XAV939 (rot gestrichelt) und 4 μ M XAV939 (rot) (n = 4).

Es ist Abbildung 18 zu entnehmen, dass die Radiotherapiesensibilisierung in diesem Experiment deutlich geringer ausfällt als bei den Versuchen mit siRNAs gegen β -Catenin (siehe Abbildung 11). Ferner zeigt Abbildung 18, dass die Kurven für die Überlebensfraktionen der behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe erst ab Bestrahlungsdosen von 4-6 Gy differieren.

3.2.2 Behandlung von SW837 mit XAV939

Als nächstes erfolgten die Versuche mit XAV939 mit der Zelllinie SW837. Es wurde zunächst erneut nach einem optimalen Zeitpunkt und einer optimalen XAV939-Konzentration gesucht. Mit der Erfahrung aus den SW480-Versuchen und dem Wissen, dass es sich bei SW837 um eine relativ langsam wachsende Zelllinie handelt (siehe Tabelle 10), wurden dieses Mal direkt Konzentrationsreihen von 4 bis 20 μ M XAV939 mit den Inkubationszeiten 48 h, 72 h und 96 h durchgeführt. Aus Abbildung 19 a geht hervor, dass zum Zeitpunkt 48 h die Proteinlevel von Axin2 mit der XAV939-Konzentration ansteigen. Die Proteinlevel des aktiven β -Catenins sinken im Vergleich zur Kontrolle für die XAV939-Konzentrationen von 4 bis 10 μ M. Bei 20 μ M sind sie höher als bei niedrigeren Konzentrationen.

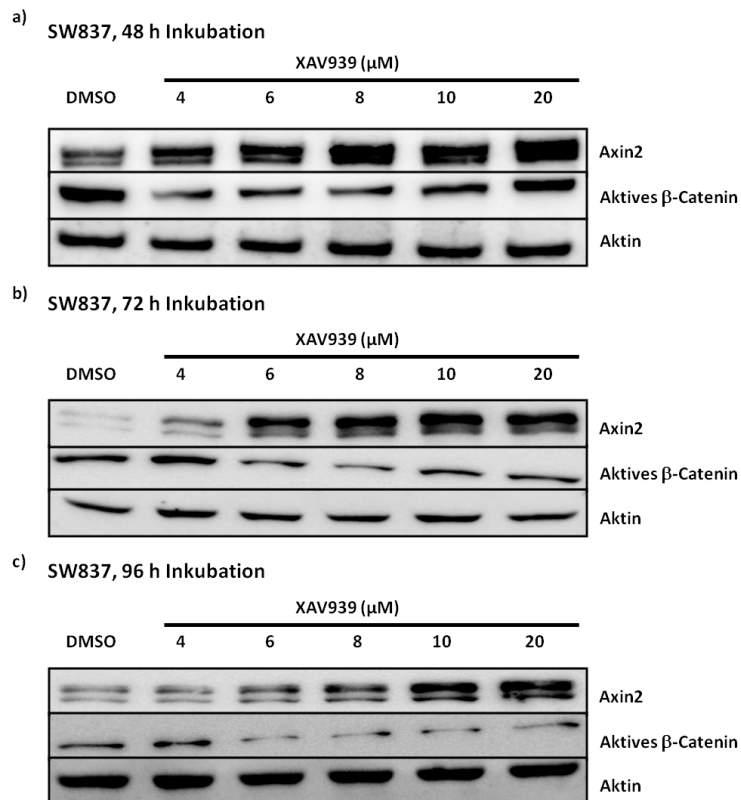


Abbildung 19: Konzentrationsreihe SW837 mit XAV939-Konzentrationen von 4 - 20 μM . Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach Inkubation mit XAV939. a) Zum Zeitpunkt 48 h ist eine XAV939-Dosis abhängige Stabilisierung von Axin2 zu erkennen. Für aktives β -Catenin ist eine Abnahme der Proteinlevel im Vergleich zur DMSO-Kontrolle für die Konzentrationen 4 - 10 μM zu erkennen, bei 20 μM steigt das aktive β -Catenin wieder. b), c) Zu den Zeitpunkten 72 und 96 h ist eine Stabilisierung von Axin2 und eine Abnahme von aktivem β -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit steigender XAV939-Konzentration zu erkennen.

In Abbildung 19 b und c ist eine Stabilisierung von Axin2 mit einer konsekutiven Reduktion der Level von aktivem β -Catenin mit steigender XAV939-Konzentration zu erkennen. Zum Zeitpunkt 96 h ist die Dosisabhängigkeit des Effekts am deutlichsten zu erkennen. Es erfolgte daher zur Bestimmung der optimalen XAV939-Dosis eine weitere Konzentrationsreihe mit 0,25 bis 5 μM XAV939 zu diesem Zeitpunkt.

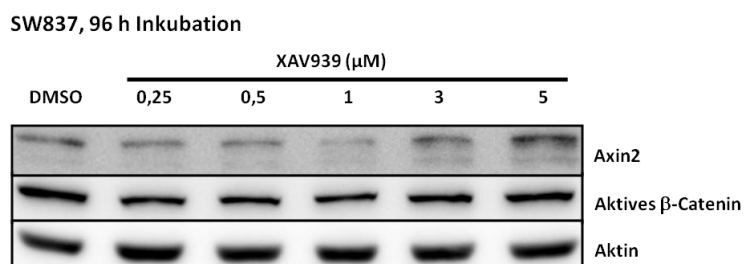


Abbildung 20: Konzentrationsreihe SW837 mit XAV939-Konzentrationen von 0,25 - 5 μM . Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach 96 h Inkubation mit XAV939. Es ist eine Stabilisierung von Axin2 und eine Abnahme von aktivem β -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mit steigender XAV939-Konzentration zu erkennen.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass auch bei niedrigen Konzentrationen von XAV939 eine leicht zunehmende Stabilisierung von Axin2 mit steigender Konzentration erfolgt. Die Proteinlevel von aktivem β -Catenin sind gegenüber der DMSO-Kontrolle reduziert.

Somit wurde auch für die Zelllinie SW837 gezeigt, dass XAV939 zu einer Stabilisierung von Axin2 und zu einem verstärkten Abbau von β -Catenin führt.

Nach der Optimierung sollte der Effekt der XAV939-Behandlung auf die Radiotherapiesensibilität untersucht werden. Dazu wurde wieder ein Koloniebildungstest durchgeführt (siehe Protokoll unter Kapitel 2.2.7.2). Als Konditionen wurden 5 μ M und 10 μ M XAV939 sowie eine DMSO-Kontrolle gewählt. In Abbildung 21 sind die Überlebensfraktionen für die Behandlung mit den XAV939-Konzentrationen 5 μ M und 10 μ M sowie für die Kontrolle dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass die Behandlung mit XAV939 im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle zu einer Abnahme der Überlebensfraktion mit steigender Bestrahlungsdosis führt.

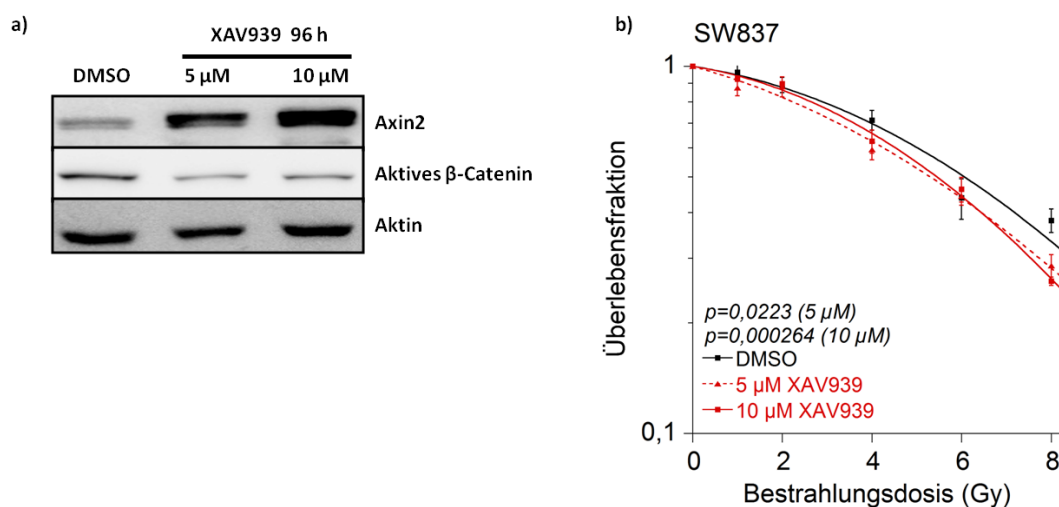


Abbildung 21: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW837 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen DMSO (Kontrolle, schwarz), 5 μ M (rot gestrichelt) und 10 μ M XAV939 (rot) (n = 3).

Die statistische Auswertung der Überlebensfraktionen ergab für die Behandlung von SW837 mit 5 μ M XAV939 im Vergleich mit der Kontrolle einen p-Wert von 0,0223. Für den Vergleich der mit 10 μ M XAV939 behandelten Gruppe mit der Kontrolle ergab sich ein p-Wert von 0,000264. Die Behandlung von SW837 mit XAV939 führt somit zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung der Zelllinie. Allerdings ist auch hier, wie bei SW480, der Effekt der Radiotherapiesensibilisierung deutlich geringer als bei den siRNA-Versuchen (siehe Abbildung 13). Eine deutliche Differenz in den Überlebensfraktionen zwischen den behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe ist lediglich bei Bestrahlungsdosen von 4 Gy und 8 Gy zu erkennen.

3.2.3 Behandlung von LS1034 mit XAV939

Wie bei den siRNA-Versuchen wurde auch bei der Behandlung mit XAV939 als drittes die Zelllinie LS1034 gewählt. Für LS1034 wurden, wie für SW480 und SW837 auch, zunächst eine optimale Inkubationszeit und eine optimale XAV939-Konzentration etabliert.

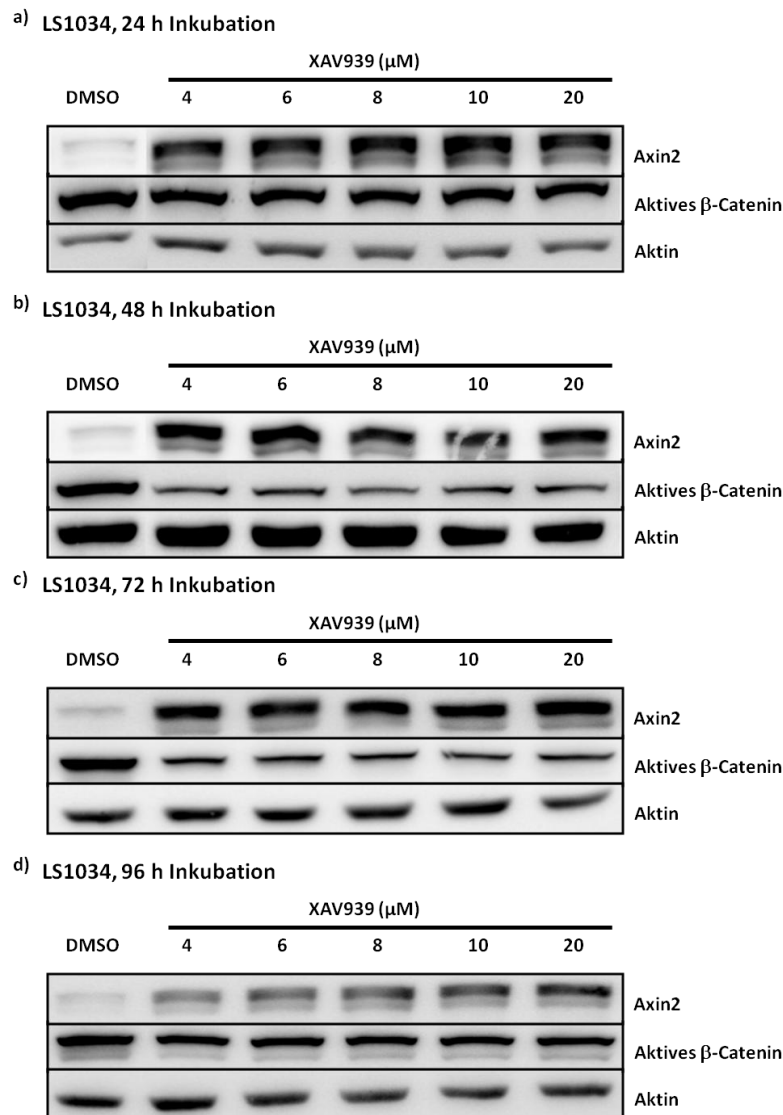


Abbildung 22: Konzentrationsreihen LS1034 mit XAV939-Konzentrationen von 4 - 20 μM . Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach Inkubation mit XAV939. a) Nach 24 h ist eine Stabilisierung von Axin2, aber noch keine Abnahme von aktivem β -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu erkennen. b), c) Nach 48 und 72 h ist sowohl eine Axin2-Stabilisierung als auch eine Abnahme von aktivem β -Catenin zu sehen. d) Die Inkubationszeit von 96 h zeigt noch eine Stabilisierung von Axin2, aber keine Abnahme von aktivem β -Catenin mehr.

Abbildung 22 zeigt die Konzentrationsreihen mit 4 bis 20 μM XAV939 für Inkubationszeiten von 24 bis 96 h. Die Abbauehemmung von Axin2 ist zu allen betrachteten Zeitpunkten und mit allen Konzentrationen von XAV939 zu erkennen. Eine deutliche Abnahme der Proteinlevel von aktivem β -Catenin gegenüber der DMSO-Kontrolle ist bei den Inkubationszeiten 48 h und 72 h zu sehen. Um wieder die geringste Konzentration zu finden, bei der eine Inhibition sichtbar ist, wurden Konzentrationsreihen mit 0,25 bis 4 μM XAV939 mit den

Inkubationszeiten 48 h, 72 h und 96 h durchgeführt (siehe Abbildung 23). Es bestätigte sich auch bei den niedrigeren XAV939-Konzentrationen das Bild aus den vorherigen Versuchen: Eine Inkubation der LS1034-Zellen mit XAV939 für 72 h zeigte die besten, dosisabhängigen Effekte des XAV939. Nach 96 h Inkubation wurde aktives β -Catenin durch die Behandlung mit XAV939 nicht mehr deutlich verstärkt abgebaut.

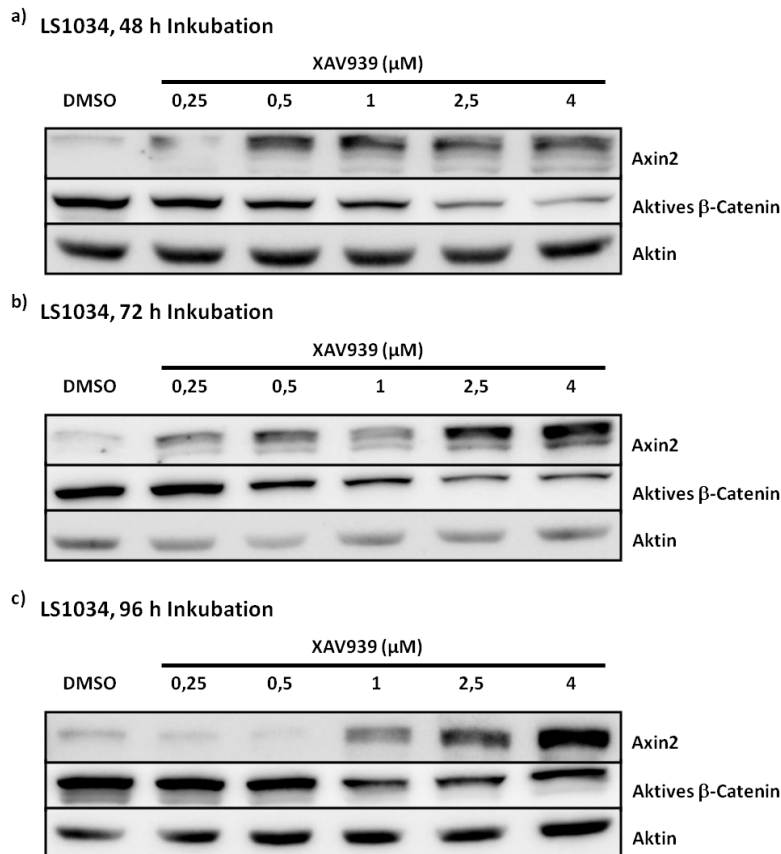


Abbildung 23: Konzentrationsreihen LS1034 mit XAV939-Konzentrationen von 0,25 - 4 μ M. Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach Inkubation mit XAV939. a), b) Nach 48 und 72 h ist sowohl eine Axin2-Stabilisierung als auch eine Abnahme von aktivem β -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu sehen. c) Die Inkubationszeit von 96 h zeigt noch eine Stabilisierung von Axin2, aber eine weniger deutliche Abnahme von aktivem β -Catenin.

Somit wurde auch für die Zelllinie LS1034 gezeigt, dass XAV939 zu einer Stabilisierung von Axin2 und zu einem verstärkten Abbau von β -Catenin führt. Wie bei den Experimenten mit SW480 und SW837 wurde auch mit LS1034 ein Koloniebildungstest durchgeführt. Als Konditionen für den KBT wurden 0,5 μ M und 4 μ M XAV939 und eine DMSO-Kontrolle gewählt (siehe Protokoll unter Kapitel 2.2.7.2). Abbildung 24 zeigt, dass sich die Überlebensfraktion bei Behandlung der Zelllinie LS1034 mit XAV939 im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle kaum ändert. Die Immunfärbung bestätigt die dosisabhängige Stabilisierung von Axin2 und Abnahme der Proteinlevel von aktivem β -Catenin zum Bestrahlungszeitpunkt.

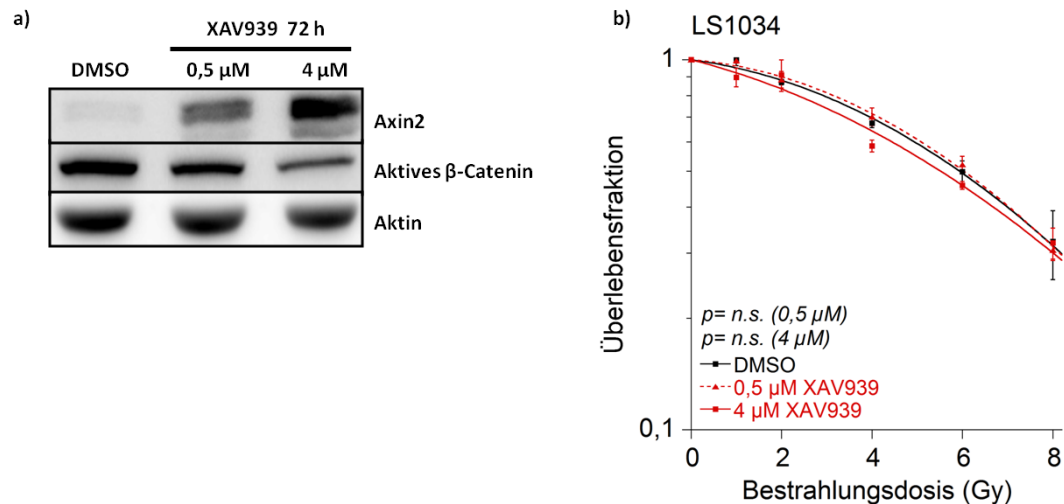


Abbildung 24: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie LS1034 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen DMSO (Kontrolle, schwarz) 0,5 µM (rot, gestrichelt) und 4 µM XAV939 (rot) (n = 3) (n.s. = nicht signifikant).

Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied in der Koloniebildungsfähigkeit zwischen den mit 0,5 µM bzw. 4 µM XAV939 behandelten Gruppen und der Kontrolle (0,5 µM: $p = 0,999$; 4 µM: $p = 0,883$). Die Behandlung mit XAV939 führt also zu keiner Radiotherapiesensibilisierung von LS1034.

3.2.4 Behandlung von RPE mit XAV939

Um die generelle Bedeutung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs für die Radiotherapiesensitivität von Zellen zu untersuchen, wurden die Versuche mit XAV939 auch in retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) durchgeführt. Diese immortalisierte, nicht maligne Zelllinie wurde gewählt, da derzeit keine allgemein zugängliche, transfizierbare, nicht maligne, immortalisierte Dickdarmmukosazelllinie verfügbar ist.

Die Vorversuche waren vergleichbar mit denen für SW480, SW837 und LS1034. Es wurden für verschiedene Inkubationszeiten (10 h, 24 h, 48 h) verschiedene XAV939-Konzentrationen (0,5 µM, 4 µM, 10 µM) mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. In Abbildung 25 wird deutlich, dass trotz Behandlung mit dem Axin2-stabilisierenden Tankyraseinhibitor XAV939 zu keinem Zeitpunkt Proteinlevel von Axin2 zu detektieren sind. Die Proteinlevel von aktivem β-Catenin sind zum Zeitpunkt 10 h gegenüber der DMSO-Kontrolle nicht verändert, unabhängig von der XAV939-Konzentration.

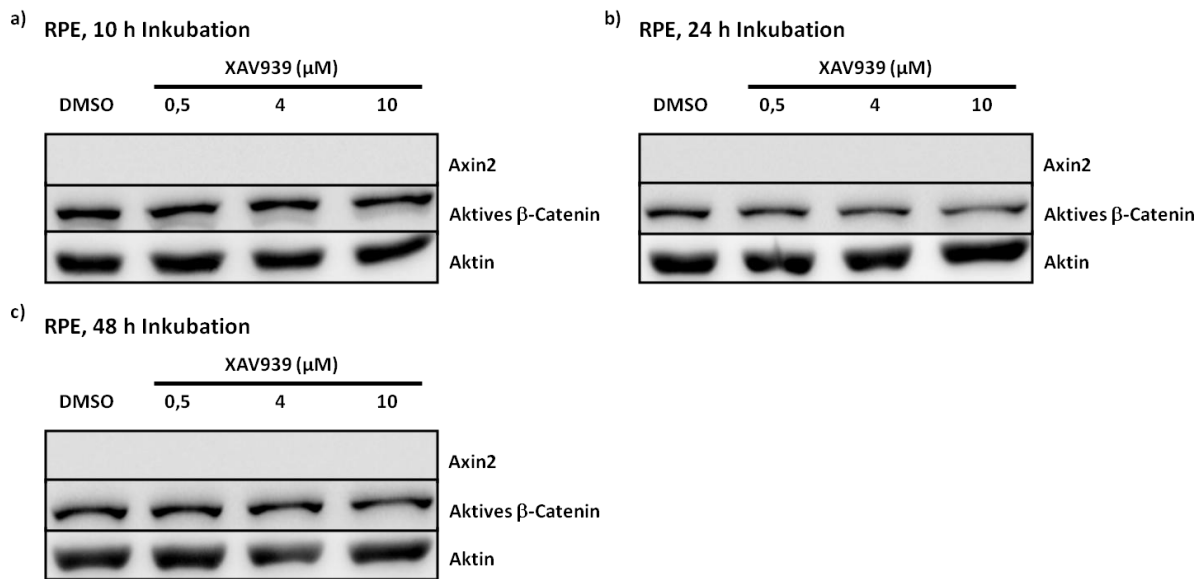
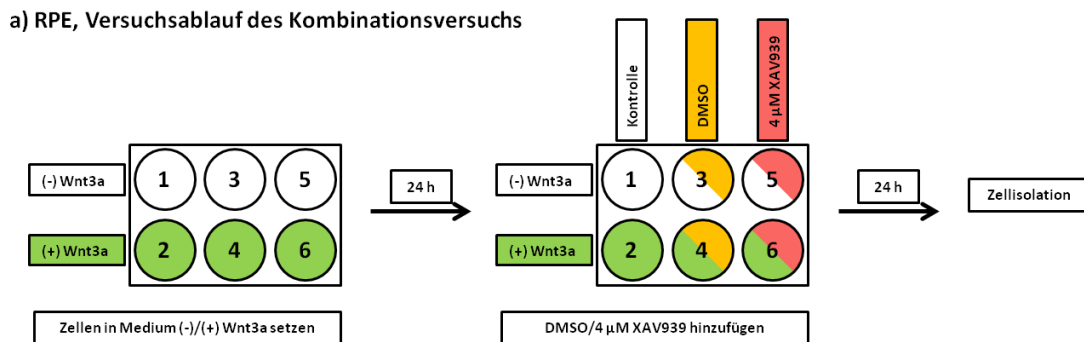


Abbildung 25: Konzentrationsreihen RPE mit XAV939. Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β-Catenin aus Zelllysaten nach Inkubation mit XAV939-Konzentrationen von 0,5 µM, 4 µM und 10 µM. a), b), c) Unabhängig von der Inkubationszeit und der XAV939-Konzentration ist kein Axin2 detektierbar. a) Nach 10 h ist keine Veränderung in den Proteinlevel von aktivem β-Catenin erkennbar. b), c) Nach 24 h und 48 h ist eine dezente Abnahme des aktiven β-Catenins mit steigender XAV939-Konzentration im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu erkennen.

Zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h ist mit steigender XAV939-Konzentration eine schwache Abnahme der Proteinlevel von aktivem β-Catenin im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Problematisch war, dass in der Immunfärbung kein Axin2 detektierbar war, dieses für den Wirkmechanismus von XAV939 aber essenziell ist (vergleiche Kapitel 2.2.5). Somit konnte keine verlässliche Aussage darüber gemacht werden, ob das beobachtete Absinken der Proteinlevel von aktivem β-Catenin (siehe Abbildung 25) auf einer direkten Wirkung des XAV939 beruht. Um die Axin-β-Catenin-Achse weiter zu untersuchen, erfolgte ein Kombinationsversuch. Dabei wurde auf Erkenntnisse der Doktorarbeit von Janneke Möller aus unserer Arbeitsgruppe zurückgegriffen. Sie konnte zeigen, dass eine Inkubation von RPE-Zellen mit dem löslichen Signalprotein Wnt3a zu einer Stimulation des Wnt/β-Catenin-Signalwegs führt und damit auch zu einer Zunahme der Proteinexpression von Axin2 (näheres zum Wirkmechanismus von Wnt3a unter Kapitel 2.2.6). Die Idee zur Durchführung des Kombinationsversuches war nun folgende: RPE-Zellen werden mit Wnt3a behandelt, so dass sie Axin2 exprimieren. In einem zweiten Schritt werden diese Zellen mit XAV939 behandelt. Sofern sich nach Behandlung mit XAV939 einen Anstieg von Axin2 durch die degradationshemmende Wirkung von XAV939 sowie ein Absinken der Proteinlevel von aktivem β-Catenin zeigt, wäre bestätigt, dass XAV939 auch in der Zelllinie RPE wirken kann. Konkret wurde wie folgt vorgegangen: 3×10^5 RPE-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte zunächst für 24 h mit (-)/(+) Wnt3a-Medium inkubiert. Nach 24 h wurde DMSO/4 µM XAV939 hinzugegeben bzw. die Zellen so belassen und wieder 24 h inkubiert. So entstanden

6 verschiedene Konditionen. Anschließend erfolgte die Zellisolation für die Immunfärbung. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 26 a detailliert dargestellt.



b) RPE, Kombination Wnt3a und XAV939

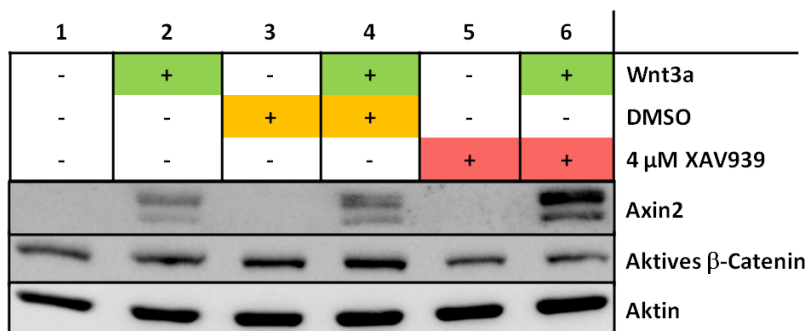


Abbildung 26: Kombination Wnt3a und XAV939. a) Versuchsablauf: RPE-Zellen wurden zunächst mit (-)/(+) Wnt3a-Medium inkubiert und anschließend mit DMSO/4 µM XAV939 behandelt. b) Immunoblot: Die Inkubation mit (+) Wnt3a führt zu einem Anstieg der Proteinlevel von Axin2 und aktivem β-Catenin im Vergleich zu (-) Wnt3a. Die Zugabe von 4 µM XAV939 führt zu einer weiteren Zunahme der Axin2-Level und hebt die Wnt3a Wirkung auf das aktive β-Catenin auf.

Abbildung 26 b zeigt: Der Vergleich der Konditionen 1 und 2 sowie 3 und 4 zeigt eine Zunahme der Proteinexpression von Axin2 und eine leichte Zunahme des aktiven β-Catenins bei Inkubation mit Wnt3a. Somit wurde der Wnt/β-Catenin-Signalweg in RPE durch Inkubation mit Wnt3a stimuliert (Bestätigung der Ergebnisse von Janneke Möller). DMSO hat keinen Einfluss hierauf. Werden die Konditionen 5 und 6 betrachtet, so ist auch hier eine Zunahme der Proteinlevel von Axin2 bei Inkubation mit Wnt3a zu erkennen. Gleichzeitig besteht hier kein Unterschied der Proteinlevel von aktivem β-Catenin. Der Wnt/β-Catenin-Signalweg stimulierende Effekt des Wnt3a wird durch die Inkubation mit XAV939 aufgehoben. Der Vergleich der Konditionspaare 5/6 mit den Paaren 1/2 und 3/4 zeigt, dass bei Inkubation mit XAV939 (zusätzlich zum Wnt3a) die Proteinlevel von Axin2 stärker ansteigen als ohne. Der Axin2-stimulierende Effekt von Wnt3a und der Axin2-stabilisierende Effekt von XAV939 addieren sich. Beim Vergleich der Konditionen 3 und 5 ist zu erkennen, dass bei Inkubation mit XAV939 die Proteinlevel von aktivem β-Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle abnehmen. Dies bestätigt die Beobachtungen aus Abbildung 25. Der Vergleich der

Konditionen 4 und 6 zeigt, dass mit Wnt3a vorbehandelte RPE-Zellen unter Inkubation mit XAV939 vermehrt Axin2 exprimieren und die Level des aktiven β -Catenins sinken. Diese Ergebnisse bestätigen die theoretischen Überlegungen zu diesem Kombinationsversuch (s.o.) und zeigen somit, dass XAV939 den stimulierenden Effekt des Wnt3a auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aufheben kann, und dass der kleinmolekulare Inhibitor somit auch in der nicht malignen Zelllinie RPE wirkt.

Um zu untersuchen, ob sich die Inkubation von RPE mit XAV939 auf die Radiotherapiesensibilität dieser Zellen auswirkt, wurde erneut ein KBT durchgeführt. Es wurde eine Inkubationszeit von 24 h und eine XAV939-Konzentration von 4 μ M im Vergleich mit der üblichen DMSO-Kontrolle gewählt (siehe Protokoll in Kapitel 2.2.7.2).

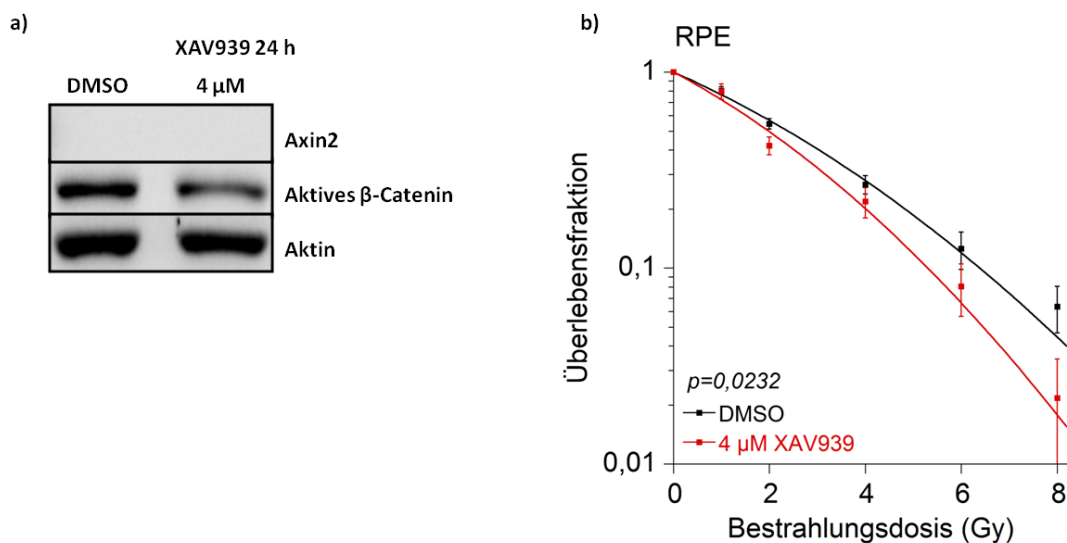


Abbildung 27: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie RPE in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen DMSO (Kontrolle, schwarz) und 4 μ M XAV939 (rot) (n = 3).

Die Immunfärbung in Abbildung 27 a bestätigt das Absinken der Proteinlevel von β -Catenin nach Zugabe von XAV939. Abbildung 27 b zeigt, dass die Überlebensfraktion bei den mit XAV939 behandelten Zellen mit steigender Bestrahlungsdosis deutlich schneller sinkt als bei der DMSO-Kontrolle (siehe Abbildung 27). Die statistische Auswertung ergab einen p-Wert von 0,0232. Die Behandlung mit 4 μ M XAV939 führt damit zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung der Normalzelllinie RPE.

3.3 Behandlung mit Wnt3a

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Radiotherapiesensibilität kolorektaler Karzinomzelllinien bei einer externen Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ändert. Janneke Möller konnte in ihrer Doktorarbeit bereits zeigen, dass durch eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit Wnt3a die Radiotherapieresistenz der Zelllinie RPE deutlich zunimmt.

Zunächst wurde ein Medium hergestellt, welches das Signalmolekül Wnt3a enthält (siehe Kapitel 2.2.2). Wnt3a ist als löslicher Ligand des heterodimeren Rezeptors aus *Frizzled* und LRP5/6 in der Lage, eine Signaltransduktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg auszulösen (siehe Abbildung 3) (MacDonald et al. 2009). Das Resultat ist eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des TCF/LEF-Komplexes, was zu einer erhöhten Produktion der Wnt-Zielgene führt. Als Indikator für eine erhöhte Wnt-Aktivität wurde eine Erhöhung der Expressionslevel von Axin2 und aktivem β -Catenin in der Immunfärbung gewählt (Lustig et al. 2002, Polakis 2007).

In den im Folgenden dargestellten Versuchen wurde nun versucht, diese erfolgreiche Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs von der Normalzelllinie RPE auf die bereits im vorherigen Versuch verwendete Karzinomzelllinie LS1034 zu übertragen. LS1034 wurde aus folgenden Gründen verwendet: Zur Vergleichbarkeit mit vorherigen Versuchen sollte eine bereits verwendete Zelllinie gewählt werden. SW480 exprimiert im Vergleich mit den anderen Zelllinien viel aktives β -Catenin (siehe Anhangsabbildung 2), weswegen eine weitere externe Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit Erhöhung der Expression dieses Proteins nicht sinnvoll erschien. SW837 ist bereits vergleichsweise radiotherapieresistent (siehe Anhangsabbildung 1), weswegen auch hier eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweg mit der Erwartung einer Radioresistenzzunahme nicht sinnvoll erschien. LS1034 weist eine mittlere Radiotherapieresistenz auf (vergleichbar mit SW480) und exprimiert deutlich weniger aktives β -Catenin als SW480.

3.3.1 Test des konditionierten RPMI-1640 Mediums

Wie in Kapitel 2.2.6.1 bereits erläutert, sind Wildtyp-L-Cells geeignet, um das hergestellte Medium auf Wnt3a-Gehalt zu untersuchen. Unter Einfluss von Wnt3a exprimieren die Zellen verstärkt aktives β -Catenin, was sich in der Immunfärbung nachweisen lässt (Shibamoto et al. 1998).

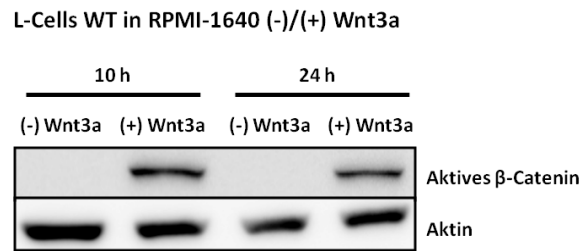


Abbildung 28: Wildtyp-L-Cells in RPMI-1640 (-)/(+) Wnt3a. Immunfärbung von Aktin und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach Inkubation für 10 h und 24 h. Aktives β -Catenin ist unter Inkubation mit Wnt3a gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht.

Abbildung 28 zeigt, dass unter Einwirkung des Wnt3a die Proteinexpression von aktivem β -Catenin deutlich ansteigt. Die Proteinexpressionslevel von Axin2 wurden in diesem Fall nicht untersucht, da diese Zellen kein Axin2 exprimieren (Shibamoto et al. 1998). Somit konnte gezeigt werden, dass das hergestellte Medium Wnt3a enthält.

3.3.2 Behandlung von LS1034 mit Wnt3a

Nachdem für das konditionierte RPMI-1640-Medium erfolgreich nachgewiesen worden war, dass es Wnt3a enthält und hierdurch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg stimuliert werden kann, sollte nun der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in LS1034 mit diesem stimuliert werden (siehe Kapitel 3.2.3). Die Durchführung ist in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben.

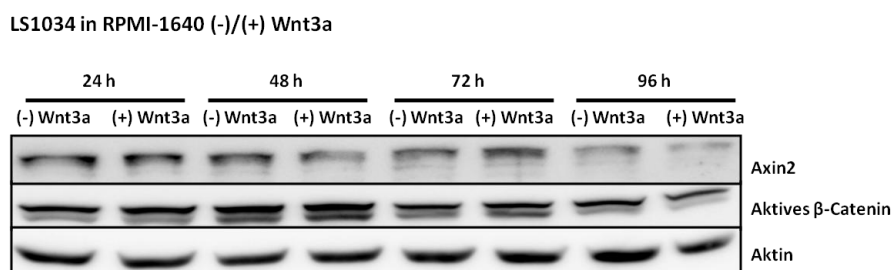


Abbildung 29: LS1034 in RPMI-1640 (-)/(+) Wnt3a. Immunfärbung von Aktin, Axin2 und aktivem β -Catenin aus Zelllysaten nach Inkubation für 24 - 96 h. Zu keinem Zeitpunkt lässt sich ein deutlicher Unterschied in der Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin in Abhängigkeit vom Medium erkennen.

Bei den Immunfärbungen in Abbildung 29 ist zu keinem Zeitpunkt eine eindeutige Induktion von Axin2 oder aktivem β -Catenin durch die Behandlung mit Wnt3a-haltigem Medium zu erkennen, obwohl die Fähigkeit des Mediums zur Stimulation des Signalwegs nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 3.3.1). Somit ließ sich für LS1034 auf diesem Wege keine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit Wnt3a nachweisen. Im nachfolgenden KBT zeigte sich daher erwartungsgemäß kein Unterschied in der Radiotherapiesensibilität der mit Wnt3a behandelten Zellen und der Kontrolle (siehe Abbildung 30).

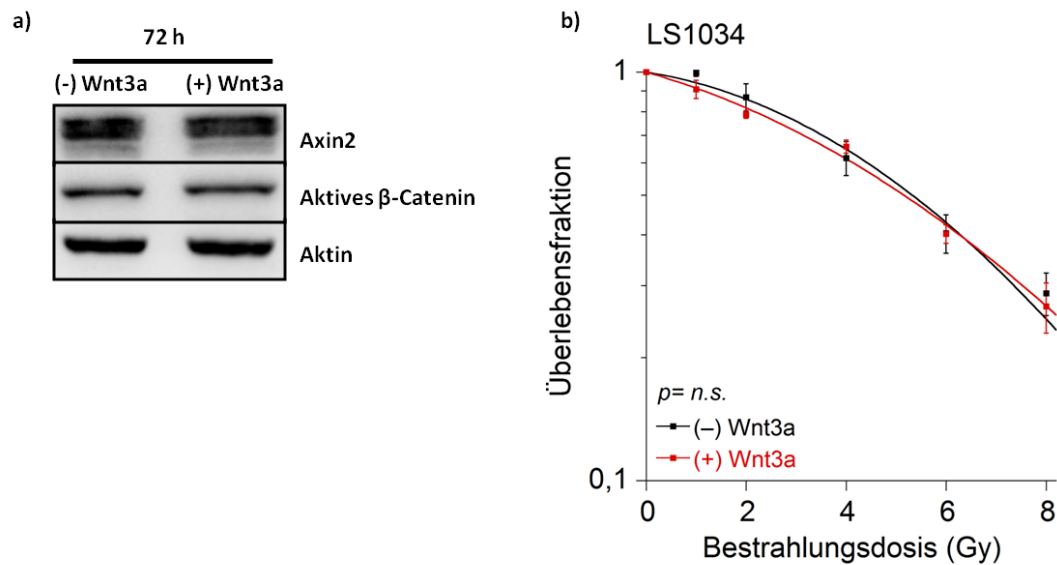


Abbildung 30: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von Wnt3a auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie LS1034 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit den Konditionen (-) Wnt3a (Kontrolle, schwarz) und (+) Wnt3a (rot) (n = 3).

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels RNA-Interferenz zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung der kolorektalen Karzinomzelllinien SW480, SW837 und LS1034 führt.
- Unter einer Behandlung mit dem kleinmolekularen Inhibitor XAV939 kommt es sowohl in kolorektalen Karzinomzelllinien (SW480, SW837 und LS1034) als auch in einer Normalzelllinie (RPE) zu einem Absinken der Proteinlevel von aktivem β -Catenin. Dies führt in den kolorektalen Karzinomzelllinien zu einer geringen, aber teilweise signifikanten Radiotherapiesensibilisierung. In der Normalzelllinie RPE führt die Behandlung mit XAV939 zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung.
- Durch eine Behandlung mit dem löslichen Signalprotein Wnt3a lässt sich der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Zelllinie LS1034 nicht stimulieren.

4 Diskussion

4.1 Klinische Problematik

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms, insbesondere des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms, hat sich in den letzten zwanzig Jahren drastisch verändert. Einen großen Beitrag hierzu haben die Studien der Deutschen Rektumkarzinom-Studiengruppe geleistet, insbesondere die CAO/ARO/AIO-94-Studie (Leitlinienprogramm Onkologie 2013, Sauer et al. 2012). Die Konsequenz aus diesen Untersuchungen war die Implementierung neuer Leitlinien für die Behandlung von Rektumkarzinomen der UICC-Stadien II und III. Das multimodale Therapiekonzept besteht heute aus einer 5-FU-basierten neoadjuvanten Radiochemotherapie, gefolgt von der chirurgischen Resektion und einer adjuvanten Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie 2013, Sauer et al. 2004). Es zeigte sich jedoch, dass das klinische Ansprechen auf diese neoadjuvante Radiochemotherapie äußerst heterogen ist. Es reicht von kompletter Regression (*Responder*) bis zu kompletter Resistenz (*Nonresponder*). Der Regressionsgrad bestimmt dabei maßgeblich die Prognose des Patienten (Fokas et al. 2014, Rödel et al. 2005). Somit stellt die Resistenz gegenüber der Radiochemotherapie ein bedeutendes klinisches Problem dar, das es im Rahmen einer Individualisierung der Therapieregime zu überwinden gilt (Liersch et al. 2010). Wesentliche Schritte des Konzepts der individuellen Tumorthherapie sind die Identifikation prädiktiver Marker für das klinische Ansprechen sowie neuer therapeutischer Ziele, um die Radiochemotherapieresistenz der Karzinome in Zukunft überwinden zu können (Grade et al. 2012).

In einer ersten Studie unserer Arbeitsgruppe hierzu wurden Genexpressionsanalysen aus Gewebeproben von Rektumkarzinomen durchgeführt, die im Rahmen der prätherapeutischen Diagnostik gewonnen wurden. Nach der durchgeführten Therapie wurde das Ansprechen der Karzinome histopathologisch beurteilt, zwei Gruppen (*Responder* und *Nonresponder*) gebildet und die prätherapeutische Genexpression dieser Gruppen verglichen (Ghadimi et al. 2005). Hierbei fanden sich 54 zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* differentiell exprimierte Gene. Differentiell exprimiert war u.a. TCF4, welches in resistenten Karzinomen hochreguliert war (Ghadimi et al. 2005). TCF4 ist, neben weiteren Funktionen, ein Schlüsseltranskriptionsfaktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Li et al. 2012). In einer weiteren Studie wurden 12 kolorektale Karzinomzelllinien mit einer aus der Klinik

adaptierten Radiochemotherapie (3 μ M 5-FU und 2 Gy) behandelt, die Überlebensfraktion bestimmt und diese mit dem prätherapeutischen Genexpressionsprofil korreliert. Wieder fanden sich Hinweise für eine Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Radiotherapiesensibilität (Spitzner et al. 2010). Anschließend wurde TCF4 mittels RNA-Interferenz in kolorektalen Karzinomzelllinien inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass dies zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung führte (Kendziorra et al. 2011). TCF4 gilt wie erwähnt als Schlüsseltranskriptionsfaktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, es werden aber auch β -Catenin-unabhängige Funktionen beschrieben (Grumolato et al. 2013, Wallmen et al. 2012). Aus diesem Grund galt es zu untersuchen, ob die beobachtete Vermittlung der Radiotherapieresistenz eine TCF4 spezifische Funktion ist, oder ob der Wnt/ β -Catenin-Signalweg hier eine entscheidende Rolle inne hat. Dieser ist, neben vielen Funktionen in der Embryonalentwicklung, bereits als elementarer Bestandteil der kolorektalen Karzinogenese etabliert (Cancer-Genome-Atlas-Network 2012, Markowitz und Bertagnoli 2009). Somit war die zweite Frage, ob die Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine zukünftige Therapieoption zur Sensibilisierung a priori resistenter Karzinome darstellt.

Zur Untersuchung der genannten Fragen wurde zunächst ein Schlüsselprotein des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, β -Catenin, in kolorektalen Karzinomzelllinien mittels RNA-Interferenz gezielt inhibiert und daraufhin die Radiotherapiesensibilität der Zellen untersucht. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit dem kleinmolekularen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs-Inhibitor XAV939 behandelt. Als drittes erfolgte eine Behandlung einer kolorektalen Karzinomzelllinie mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg stimulierenden Signalprotein Wnt3a.

4.2 siRNA-vermittelte Inhibition von β -Catenin führt zu einer Radiotherapiesensibilisierung in kolorektalen Karzinomzellen

Um die Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs für die Radiotherapiesensibilität zu untersuchen, wurde β -Catenin in den kolorektalen Karzinomzelllinien SW480, SW837 und LS1034 mittels RNA-Interferenz inhibiert. Zunächst wurden Immunfärbungen von Proteinen der transfizierten Zellen angefertigt, um den Erfolg der Inhibition von β -Catenin zu bestätigen. Im nächsten Versuchsschritt wurden Koloniebildungstests durchgeführt, um die Radiotherapiesensibilität der behandelten Zellen mit der Kontrollgruppe zu vergleichen (siehe Kapitel 3.1). Die Immunfärbungen zeigten für alle Zelllinien deutlich, dass die Transfektion der siRNAs zu einer Abnahme der Proteinexpressionslevel von aktivem- β -Catenin führte.

Dies ist entscheidender Signaltransduktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs (Behrens et al. 1996, Molenaar et al. 1996). Auch Axin2 als wichtiger Indikator für die Aktivität des Signalwegs (Lustig et al. 2002) wurde vermindert exprimiert (vergleiche Abbildung 10 und Abbildung 12). Die angeschlossenen Koloniebildungstests ergaben in allen drei Zelllinien eine signifikante Abnahme der Radiotherapieresistenz der mit si β -Catenin behandelten Zellen (vergleiche Abbildung 11, Abbildung 13 und Abbildung 15). Der beschriebene Effekt der Radiotherapiesensibilisierung bei der Herunterregulation von TCF4 (Kendziorra et al. 2011) lässt sich also mittels einer Inhibition an einer anderen Schlüsselstelle des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs nachvollziehen und bestätigen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg an der Vermittlung der Radiotherapieresistenz in kolorektalen Karzinomzelllinien beteiligt ist und einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellt. Diese Annahme deckt sich mit Beobachtungen anderer Autoren in anderen Tumorentitäten. So beobachteten Kim et al. 2012, dass auch in Glioblastomen durch eine Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Radiotherapiesensibilität der Tumorzellen signifikant erhöht werden kann (Kim et al. 2012). Ähnliches berichteten Lee et al. 2013. Sie fanden heraus, dass die Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in einer Zelllinie aus einem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (A549) ebenfalls zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung hiervon führte (Lee et al. 2013). Auch in Progenitorzellen in murinem Brustgewebe scheint der Wnt/ β -Catenin-Signalweg an der Vermittlung von Radiotherapieresistenz beteiligt zu sein (Woodward et al. 2007).

4.3 XAV939 inhibiert die Expression von aktivem β -Catenin und führt teilweise zu einer Radiotherapiesensibilisierung

Der klinische Einsatz von siRNAs ist bisher noch schwierig und problematisch. Daher war das nächste Ziel, die Ergebnisse mithilfe des kleinmolekularen Inhibitors XAV939 zu überprüfen, der potentiell klinisch einsetzbar ist. Mithilfe von XAV939 wurden die Proteinlevel von aktivem β -Catenin in den Zelllinien SW480, SW837, LS1034 und RPE gesenkt, die Effekte anhand von Immunfärbungen bestätigt und anschließend Koloniebildungstests durchgeführt (siehe Kapitel 3.2). XAV939 bewirkt dabei als Tankyraseinhibitor über eine Abbauehemmung von Axin die vermehrte Degradation von β -Catenin (siehe Abbildung 5) (Huang et al. 2009).

Die Immunfärbungen bestätigten für alle vier verwendeten Zelllinien, dass eine Inkubation mit XAV939 die Proteinlevel von Axin2 steigert und die von β -Catenin senkt. Dabei stiegen

die beobachteten Effekte größtenteils mit der verwendeten Dosis bis zum Erreichen eines Plateaus.

4.3.1 Deutung der Ergebnisse mit kolorektalen Karzinomzelllinien

Der beobachtete Effekt ist besonders interessant, da es sich bei SW480 (APC^{-/1338}), SW837 (APC^{-/1450}) und LS1034 (APC^{-/1309}) um Zelllinien mit Mutationen im APC-Gen handelt. Durch die Mutation bricht das veränderte APC-Protein an der benannten Aminosäureposition ab (Rowan et al. 2000). Laut Literatur ist die sogenannte *β-Catenin inhibitory domain* (CID), die Aminosäuren 1404 - 1466 des APCs, notwendig für die Degradation des β-Catenins durch den β-Catenin-Destruktionskomplex (Kohler et al. 2009). Von den drei Zelllinien weißt jedoch keine die CID vollständig auf, trotzdem erfolgt durch Abbauhemmung von Axin ein Abbau von β-Catenin. Dies könnte entweder für eine Restaktivität des β-Catenin-Destruktionskomplexes auch ohne vollständige CID oder einen alternativen Abbauweg sprechen. Kongruent hierzu ist die Beobachtung von Nakamura et al., dass eine Überexpression von Axin in SW480 zu einem massiven Abbau von β-Catenin führt (Nakamura et al. 1998). Eine β-Catenin modulierende Funktion von verkürzten APC-Proteinen bezüglich Expressionslevel und transkriptioneller Aktivität, wurde ebenfalls von anderen Autoren beschrieben (Chandra et al. 2012, Voloshanenko et al. 2013). Die von uns in den Immunfärbungen beobachtete Degradation von β-Catenin nach Behandlung von SW480 (APC^{-/1338}) mit XAV939 deckt sich mit den Ergebnissen zweier anderer Arbeitsgruppen (de la Roche et al. 2014, Huang et al. 2009). Trotz Mutationen in mindestens einem Bestandteil des β-Catenin-Destruktionskomplexes ist dieser also in der Lage, β-Catenin der Phosphorylierung, Polyubiquitylierung und der folgenden proteasomalen Degradation zuzuführen.

Die unter Behandlung mit XAV939 durchgeführten Koloniebildungstests zur Bestimmung der Radiotherapieresistenz der Zellen im Vergleich mit einer Kontrolle zeigten heterogene Ergebnisse. Für SW480 und SW837 zeigte sich, dass die Behandlung mit XAV939 die Radiotherapiesensibilität der Zellen signifikant erhöht. Allerdings waren die beobachteten Effekte nicht so deutlich wie die Ergebnisse aus den Versuchen mit den siRNAs gegen β-Catenin. Erst bei Bestrahlungsdosen ab 4 - 6 Gy zeigte sich eine leichte Differenz in der Überlebensfraktion zwischen behandelter und nicht behandelter Gruppe. Da bei beiden Experimenten aktives β-Catenin herunter reguliert wurde, waren vergleichbare Effekte

erwartet worden. Für LS1034 führte die Behandlung mit XAV939 zu keiner signifikanten Änderung der Überlebensfraktion bei Bestrahlung.

Diese Beobachtungen lassen mehrere mögliche Erklärungsansätze zu:

1. Da Tankyrasen nicht ausschließlich im Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine regulatorische Funktion haben, sondern eine Vielzahl anderer Signalwege beeinflussen (Guettler et al. 2011, Voronkov und Krauss 2013), könnte es sich um Wnt/ β -Catenin-unabhängige Wirkungen von XAV939 handeln. Diese könnten mit der Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs interferieren und dadurch den Effekt der Radiotherapiesensibilisierung in den Koloniebildungstests verringern.
2. Einen zweiten Erklärungsansatz liefert eine aktuelle Arbeit von de la Roche et al. Hierin wird berichtet, dass bei der Inkubation von SW480 mit XAV939 - analog zu unseren Ergebnissen - eine deutliche Reduktion der Proteinlevel von aktivem β -Catenin, vermittelt durch die Abbauehemmung von Axin, zu sehen ist. Allerdings war nur ein sehr geringes Absinken der transkriptionellen Aktivität des β -Catenins zu beobachten (de la Roche et al. 2014). Die Autoren zeigten, dass dies auf die Aktivität von LEF1 und B9L zurückzuführen ist, die beide in ihrer Expression stark vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg abhängig sind. Sie bewirken die Translokation von aktivem β -Catenin in den Kern (Behrens et al. 1996, Brembeck et al. 2004) und schützen es vor proteasomalem Abbau. Diese Abbauehemmung ist kompetitiv, da LEF1 zusammen mit B9L in einer ähnlichen Region an aktives β -Catenin bindet wie Axin und APC, jedoch mit einer deutlich höheren Affinität (Choi et al. 2006, Sampietro et al. 2006). Die Differenz zwischen sinkenden Proteinleveln von aktivem β -Catenin und gleichzeitig nahezu konstanter transkriptioneller Aktivität hiervon fanden de la Roche et al. jedoch nur für die Inkubation der chronisch Wnt/ β -Catenin-Signalweg-aktiven, APC-mutierten Zelllinie SW480 mit XAV939. Bei der Behandlung der APC-Wildtyp-Zelllinie HEK293T (stimuliert mit Wnt3a) mit XAV939 sank auch die transkriptionelle Aktivität des aktiven β -Catenins. Die beschriebene Publikation liefert eine naheliegende Begründung für die von uns beobachtete Inkongruenz zwischen niedrigen Proteinleveln des aktiven β -Catenins und nur leichter Radiotherapiesensibilisierung für die Zelllinie SW480. Der Erklärungsansatz von de la Roche et al. 2014, dass chronische Wnt/ β -Catenin-Signalweg-Aktivität zu einer erhöhten Expression von LEF1 und B9L führt, legt die Übertragung des Ansatzes auf die ebenfalls APC-mutierten Zelllinien SW837 und LS1034 nahe. Die Annahme einer nur geringen Senkung der transkriptionellen Aktivität des aktiven β -Catenins unter der Behandlung mit XAV939 kann die von uns

beobachteten geringen Effekte der Radiotherapiesensibilisierung mit nur teilweise signifikanten Ergebnissen gut erklären.

Der Erklärungsansatz über den LEF1/B9L-vermittelten Abbauschutz von aktivem β -Catenin widerspricht nicht den Beobachtungen und Schlussfolgerungen aus den RNA-Interferenzversuchen. Im Unterschied zur abbaufördernden Wirkung von XAV939 kommt es durch β -Catenin nicht zur Translation von β -Catenin. Somit ist hierbei ein Abbauschutz durch LEF1/B9L nicht relevant. Eine verringerte Proteinexpression von Axin2 ist Indikator für eine verringerte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Folglich kann für die β -Catenin-Experimente weiterhin davon ausgegangen werden, dass eine verminderte Proteinexpression von aktivem β -Catenin mit einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs gleichzusetzen ist. Die beschriebenen Ergebnisse passen somit gut zu der Hypothese, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Radiotherapieresistenz kolorektaler Karzinomzelllinien signifikant beeinflusst. Problematisch ist, dass Axin2 als Indikator für die Wnt/ β -Catenin-Signalweg-Aktivität durch die Abbauehemmung von Axin mittels XAV939 nicht zu Verfügung steht. Konkret wird ein Absinken der Proteinlevel von Axin2, als Hinweis auf eine verminderte β -Catenin/TCF/LEF-Interaktion, durch den XAV939-vermittelten Anstieg der Proteinlevel überlagert. Die Annahme, dass das Absinken der Proteinlevel von aktivem β -Catenin unter Einfluss von XAV939 gleichbedeutend mit einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist, wie es auch andere Autoren bisher beschrieben (Bao et al. 2012, Busch et al. 2013, Huang et al. 2009), muss kritisch überdacht werden. Hierbei könnte ein genauerer Vergleich der Proteinfractionen von aktivem β -Catenin in Zytosol und Kern hilfreich sein. Eine weitere experimentelle Überprüfung, z.B. mittels *real-time-polymerase chain reaction* (rtPCR) von Wnt-Indikatorgenen steht zudem in weiteren Versuchen in naher Zukunft an.

4.3.2 Deutung der Ergebnisse mit der Normalzelllinie RPE

Für die Normalzelllinie RPE ergab sich eine signifikante Radiotherapiesensibilisierung unter Behandlung mit 4 μ M XAV939. Die Beobachtung, dass die Proteinlevel des aktiven β -Catenins unter Behandlung mit XAV939 ohne eine messbare Stabilisierung von Axin sinken, war zunächst nur schwer mit dem bekannten Wirkmechanismus des kleinmolekularen Inhibitors vereinbar (siehe Abbildung 5). Der Kombinationsversuch mit einer Stimulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch Wnt3a und anschließender Behandlung mit XAV939 zeigte jedoch den erwarteten Anstieg der Proteinlevel von Axin2 (siehe Abbildung 26),

sodass beim ersten Versuch von einem sehr geringen Effekt auf das Axin2 unterhalb der Nachweisgrenze der Immunfärbung ausgegangen werden kann.

Da es sich bei RPE um eine Zelllinie mit geringer Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs handelt (Chen et al. 2012), ist auch der von de la Roche et al. gezeigte Effekt von LEF1/B9L an dieser Stelle vermutlich nicht relevant (siehe oben). Evidenz hierfür liefert eine Studie zur Untersuchung der epithelial-mesenchymalen Transition von RPE, welche zeigte, dass XAV939 erfolgreich den Wnt/ β -Catenin-Signalweg nach Stimulation wieder hemmen kann (Chen et al. 2012). Dies entspricht auch unseren Ergebnissen. In Zusammenschau mit unseren Beobachtungen lässt sich also sagen, dass trotz sehr niedriger Basisaktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Inhibition hiervon mit XAV939 die Proteinlevel von aktivem β -Catenin weiter senkt und die ohnehin schon hohe Radiotherapiesensibilität der Zelllinie noch weiter steigert. Die Beobachtung einer Radiotherapiesensibilisierung nach Wnt/ β -Catenin-Signalwegs-Inhibition in einer nicht-malignen Zelllinie untermauert die Annahme, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Radiotherapieresistenz vermittelt. Diese Ergebnisse liefern außerdem Hinweise, dass es sich um einen generellen Mechanismus handelt. Es besteht also die Möglichkeit, dass diese Radiotherapieresistenzvermittlung auch in anderen Tumorentitäten sowie in normalem, nicht mutiertem Gewebe eine Rolle spielt. Dies deckt sich mit der Beobachtung anderer Autoren, dass eine transiente Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs während der Bestrahlung einen protektiven Effekt auf Speicheldrüsen in einem Mausmodell hat (Hai et al. 2012).

4.4 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist in LS1034 nicht durch Wnt3a zu stimulieren

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Normalzelllinie RPE mit Wnt3a stimuliert. Hier zeigte sich durch die Inkubation mit Wnt3a ein Anstieg der Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin (vergleiche auch Abbildung 26) sowie eine deutliche Zunahme der Radiotherapieresistenz im durchgeführten KBT.

Im nächsten Schritt wurde nun die kolorektale Karzinomzelllinie LS1034 mit Wnt3a-haltigem Medium inkubiert, um den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu stimulieren. Dabei zeigte sich in der Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin - unabhängig von der Inkubationszeit - keine Änderung. Im anschließend durchgeführten KBT änderte sich die Radiotherapiesensibilität nicht (vergleiche Kapitel 3.3.2). Für das im Versuch mit LS1034

verwendete Medium mit Wnt3a konnte vorher gezeigt werden, dass es grundsätzlich in der Lage ist, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu stimulieren (siehe Kapitel 3.3.1).

Die Beobachtungen aus dem Versuch mit LS1034 und Wnt3a lassen darauf schließen, dass in der kolorektalen Karzinomzelllinie eine externe Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit Wnt3a nicht möglich ist. Hierfür gibt es zwei Erklärungsansätze:

1. Die Zelllinie LS1034 trägt eine Punktmutation im für das Protein *Dishevelled* kodierenden Gen DVL-1, welche zu einer *Missense*-Mutation (p.M312T) führt (The Broad-Institute 2013). *Dishevelled* ist ein wichtiges Signalprotein im Wnt/ β -Catenin-Signalweg, das für die Signaltransduktion bei Bindung eines Wnt-Liganden an den Oberflächenrezeptor bedeutend ist (Bilic et al. 2007) (siehe auch Abbildung 3). In Versuchen mit siRNA gegen DVL konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass in den kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116 und DLD1 die Herunterregulation von *Dishevelled* zu einer Abnahme der Wnt/ β -Catenin-Signalwegs-Aktivität führt (Voloshanenko et al. 2013). Dies unterstreicht, dass *Dishevelled* für eine intakte Signaltransduktion notwendig zu sein scheint. Bei einer Mutation im DVL-1-Gen wird somit ggf. diese Signaltransduktion gestört. Dies würde erklären, warum trotz Inkubation von LS1034 mit Wnt3a keine Veränderung der Proteinexpression von Axin2 und aktivem β -Catenin zu beobachten war. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurde also nicht stimuliert, und folglich änderte sich durch Wnt3a-Behandlung auch das Ansprechen der Zelllinie auf die Radiotherapie nicht.
2. Einen weiteren Erklärungsansatz liefert erneut die Publikation von Voloshanenko et al. (2013). Hierin postulieren die Autoren, dass kolorektale Karzinomzelllinien neben ihren aktivierenden Mutationen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg, zum Beispiel von APC oder β -Catenin, zusätzlich Wnt-Liganden (u.a. Wnt3a) benötigen und diese permanent exprimieren (Voloshanenko et al. 2013). Die Arbeitsgruppe belegt dies durch Inhibitionsexperimente, in denen siRNAs gegen Wnt3a die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs deutlich senken (Voloshanenko et al. 2013). Diese Beobachtung führt zu der Überlegung, dass durch eine permanente endogene Produktion von Wnt3a eine weitere exogene Zuführung hiervon über ein konditioniertes Medium keinen weiteren aktivierenden Effekt mehr haben kann, da die Oberflächenrezeptoren bereits gesättigt sind. Dies würde unsere Beobachtung erklären, dass die Inkubation von LS1034 mit Wnt3a-haltigem Medium zu keiner Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs führt (siehe oben). Ähnliche, aber gleichzeitig inkongruente Erkenntnisse publizierte eine andere Arbeitsgruppe. Sie inkubierten ebenfalls kolorektale Karzinomzelllinien mit

Wnt3a, konkret DLD1, LS174T und HCT116 (Li et al. 2012). Bei allen drei Zelllinien beobachteten sie bei Zugabe von Wnt3a einen Anstieg der Proteinlevel von phosphoryliertem LRP6, ein Hinweis für eine Aktivierung der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade (siehe Kapitel 1.7). In der Aktivitätsmessung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zeigte sich jedoch lediglich in HCT116 ein Aktivitätsanstieg, nicht in DLD1 und LS174T (Li et al. 2012). Diese Beobachtungen korrelieren nicht mit dem APC- oder β -Catenin-Mutationsstatus, da sowohl HCT116 als auch LS174T keine APC-Mutation sowie eine β -Catenin-Mutation im Codon 45 tragen (Rowan et al. 2000).

Beide Erklärungsansätze liefern begründete Hinweise, dass eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in LS1034 mit Wnt3a nicht funktionieren kann und folglich auch keine erhöhte Radiotherapieresistenz induziert werden kann.

4.5 Klinische Bedeutung und Ausblick

In der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg als entscheidender Faktor bekannt. APC, Bestandteil des β -Catenin-Destruktionskomplexes, ist einer der wichtigen Mutationsorte der Adenom-Karzinom-Sequenz (siehe Abbildung 1) (Fearon 2011) und 85 bis 94 % der kolorektalen Karzinome tragen Mutationen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Cancer-Genome-Atlas-Network 2012, Markowitz und Bertagnolli 2009). Neu ist allerdings, dass dieser eine Radiotherapieresistenz in kolorektalen Karzinomzellen vermittelt. Somit wurde durch unsere Untersuchungen dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine weitere biologische Bedeutung zugeordnet.

Neue Studien zeigen, dass die Anwendung des kleinmolekularen Inhibitors XAV939 in kolorektalen Karzinomzelllinien problematisch ist. Die Wnt/ β -Catenin-Signalweg-inhibierende Wirkung scheint nicht direkt mit der Reduktion der Proteinlevel von aktivem β -Catenin zu korrelieren (de la Roche et al. 2014). In aktuellen Arbeiten werden von unserer Arbeitsgruppe weitere kleinmolekulare Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf ihre Wirksamkeit und ihren Einfluss auf die Radiotherapieresistenz von kolorektalen Karzinomzelllinien getestet. Diese sollen wirksamer sein (JW55 und G007-LK, inhibieren Tankyrasen) oder haben andere Wirkmechanismen (LGK974, inhibiert *Porcupine*). Zudem sind sie oral bioverfügbar und somit für *in-vivo*-Versuche geeignet (Lau et al. 2013, Liu et al. 2013, Waaler et al. 2012). Es erscheint sinnvoll, die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beim Einsatz solcher Inhibitoren genauer zu untersuchen, z.B. mittels rtPCR-Analyse der Expression einer Reihe von Wnt-Effektorgenen, allen voran Axin2. Ferner könnte eine

Aktivitätsmessung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels TOP-FLASH/FOP-FLASH *dual luciferase reporter assay* weitere nützliche Informationen liefern. Auch die Übertragung der vielversprechenden *in-vitro* Ergebnisse auf *in-vivo*-Studien ist dringend notwendig und für die nahe Zukunft geplant.

Insgesamt scheint der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch seine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Radiotherapieresistenz in kolorektalen Karzinomzelllinien einen potentiellen, vielversprechenden neuen therapeutischen Angriffspunkt in einem Konzept der personalisierten Tumorthherapie darzustellen. Ein solches Konzept setzt die genaue Analyse von prätherapeutischem Material (Karzinom und normales Gewebe) voraus, um fundierte Entscheidungen für ein individuelles Vorgehen zu treffen (Grade et al. 2012). Bis zur klinischen Anwendung von Verfahren, die den Wnt/ β -Catenin-Signalweg modulieren und z.B. a priori resistente kolorektale Karzinome sensibler für die neoadjuvante Radiochemotherapie machen, bedarf es aber weiterhin intensiver Forschung und die Ermittlung der genauen zu Grunde liegenden Mechanismen. Problematisch ist zudem, dass 85 bis 94 % der kolorektalen Karzinome eine signalwegaktivierende Mutation im Wnt/ β -Catenin-Signalweg tragen (Cancer-Genome-Atlas-Network 2012, Markowitz und Bertagnolli 2009), aber nur rund 23 % den resistenten *Nonrespondern* zugeordnet werden können (rund 77 % zeigen einen mittleren bis hohen Tumorregressionsgrad) (Fokas et al. 2014). Somit ist eine hohe Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs anscheinend nicht der einzige Grund für die Radiotherapieresistenz kolorektaler Karzinome. Das Ziel zukünftiger Bemühungen muss daher sein, weitere potentielle therapeutische Angriffspunkte zu finden.

5 Zusammenfassung

Das Ansprechen primärer Rektumkarzinome auf eine präoperative Radiochemotherapie ist äußerst heterogen. Resistente Karzinome stellen aufgrund der schlechteren Prognose ein großes klinisches Problem dar. Ziel ist daher eine Individualisierung der Therapie und die Identifikation neuer therapeutischer Angriffspunkte, um resistente Tumoren für die Therapie zu sensibilisieren. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* TCF4, ein Transkriptionsfaktor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, differentiell exprimiert ist. Zudem führt die Herunterregulation von TCF4 in kolorektalen Karzinomzelllinien zu einer Radiotherapiesensibilisierung.

Um zu untersuchen, ob es sich um eine TCF4-spezifische Beobachtung handelt oder ob der Wnt/ β -Catenin-Signalweg Radiotherapieresistenz vermittelt, wurde dieser Signalweg in den Zelllinien SW480, SW837, LS1034 und RPE inhibiert. Anschließend wurde die Radiotherapieresistenz der Zellen untersucht.

Die Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mittels siRNA gegen β -Catenin führte zu einer signifikanten Radiotherapiesensibilisierung von SW480, SW837 und LS1034. Die Behandlung von kolorektalen Karzinomzelllinien und der Normalzelllinie RPE mit dem kleinmolekularen Wnt/ β -Catenin-Signalweg-Inhibitor XAV939 führte zum Teil zu einer Radiotherapiesensibilisierung.

Insgesamt scheint der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Radio(chemo)resistenz zu spielen und stellt somit ein potentielles therapeutisches Ziel für zukünftige Therapieansätze des Rektumkarzinoms dar. Zudem wurde dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine weitere biologische Bedeutung zugeordnet. Ziel zukünftiger Bemühungen ist die weitere Validierung dieser Ergebnisse, die Aufdeckung der zugrunde liegenden Mechanismen und die Übertragung in ein *in-vivo*-Modell.

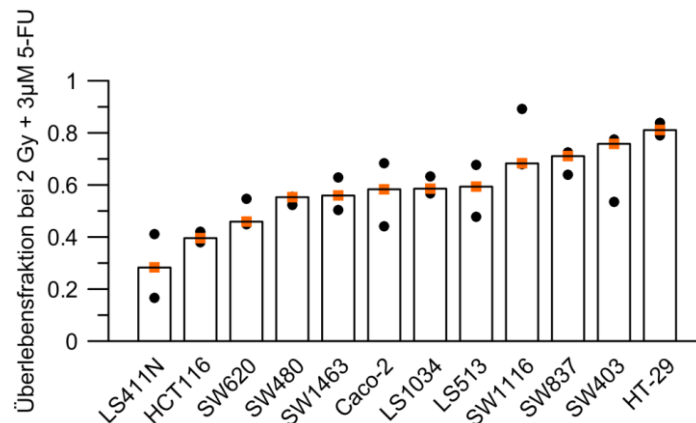
6 Anhang

Zielsequenzen der verwendeten siRNAs

<u>siRNA</u>	<u>Zielsequenz</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Notiz</u>
si β -Catenin # 1	CTCGGGATGTTTACAACCGAA	Qiagen N.V.	
si β -Catenin # 2	CAUCCUAGCUAUCGUUCU	Thermo Fisher Scientific Inc.	verwendet als pool
si β -Catenin # 3	GGUACGAGCUGCUAUGUUC	Thermo Fisher Scientific Inc.	
siAllStarsNEG	CAGGGTATCGACGATTACAAA	Qiagen N.V.	

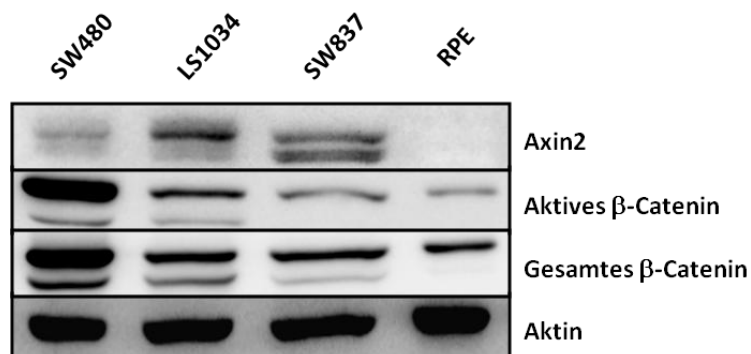
Anhangstabelle 1: Verwendete siRNAs, Zielsequenzen und Hersteller.

Überlebensfraktionen der 12 kolorektalen Karzinomzelllinien



Anhangsabbildung 1: Überlebensfraktion nach Behandlung mit 3 μ M 5-Fluoruracil und Bestrahlung mit 2 Gy. Das orange Quadrat stellt den Median aus drei unabhängigen Experimentensätzen dar. Die Zelllinien zeigen starke Unterschiede in der Antwort auf die Radiochemotherapie (modifiziert nach Spitzner et al. 2010).

In dieser Arbeit verwendete Zelllinien



Anhangsabbildung 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien. Immunfärbung von Aktin, gesamtem β -Catenin, aktivem β -Catenin und Axin2.

7 Literaturverzeichnis

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

ATCC: Product Information Sheet for ATCC CCL-228™. o. Verl., Manassas 2011

ATCC: Product Information Sheet for ATCC CRL-2158™. o. Verl., Manassas 2012

ATCC: Product Information Sheet for ATCC CCL-235™. o. Verl., Manassas 2013a

ATCC: Product Information Sheet for ATCC CRL-2648™. o. Verl., Manassas 2013b

ATCC: Product Information Sheet for ATCC CRL-4000™. o. Verl., Manassas 2013c

Bao R, Christova T, Song S, Angers S, Yan X, Attisano L (2012): Inhibition of tankyrases induces Axin stabilization and blocks Wnt signalling in breast cancer cells. *PLoS ONE* 7, e48670

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

Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C (2007): Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316, 1619-1622

Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004): Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18, 2225-2230

Busch AM, Johnson KC, Stan RV, Sanglikar A, Ahmed Y, Dmitrovsky E, Freemantle SJ (2013): Evidence for tankyrases as antineoplastic targets in lung cancer. *BMC Cancer* 13, 211

Camps J, Nguyen QT, Padilla-Nash HM, Knutsen T, McNeil NE, Wangsa D, Hummon AB, Grade M, Ried T, Difilippantonio MJ (2009): Integrative genomics reveals mechanisms of copy number alterations responsible for transcriptional deregulation in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 1002-1017

- Camps J, Pitt JJ, Emons G, Hummon AB, Case CM, Grade M, Jones TL, Nguyen QT, Ghadimi BM, Beissbarth T (2013): Genetic amplification of the NOTCH modulator LNX2 upregulates the WNT/beta-catenin pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 73, 2003-2013
- Cancer-Genome-Atlas-Network (2012): Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337
- Caplen NJ, Mousses S (2003): Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann N Y Acad Sci* 1002, 56-62
- 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
- Chandra SH, Wacker I, Appelt UK, Behrens J, Schneikert J (2012): A common role for various human truncated adenomatous polyposis coli isoforms in the control of beta-catenin activity and cell proliferation. *PLoS ONE* 7, e34479
- 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
- Choi HJ, Huber AH, Weis WI (2006): Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* 281, 1027-1038
- Cleland WW (1964): Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry (Mosc)* 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
- Compton SJ, Jones CG (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151, 369-374
- Cullen BR (2006): Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat Methods* 3, 677-681

- Day DW, Morson BC (1978): The adenoma-carcinoma sequence. *Major Probl Pathol* 10, 58-71
- de la Roche M, Ibrahim AE, Mieszczanek J, Bienz M (2014): LEF1 and B9L Shield beta-Catenin from Inactivation by Axin, Desensitizing Colorectal Cancer Cells to Tankyrase Inhibitors. *Cancer Res* 74, 1495-1505
- Emons G, Ghadimi M, Grade M (2013): Allgemeine Grundlagen der Tumorbologie in der Viszeralchirurgie. *Zentralbl Chir* online publiziert
- 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
- Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, Becker H, Ghadimi M, Mrak K, Merkel S (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
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315-2319
- Gaedcke J, Liersch T, Hess C, Becker H, Rödel C, Ghadimi BM (2011): [Rectal cancer: current status of multimodal therapy--when and how?]. *Zentralbl Chir* 136, 334-342
- 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 (2005): Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23, 1826-1838
- Grade M, Becker H, Liersch T, Ried T, Ghadimi BM (2006a): Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell Oncol* 28, 71-84
- Grade M, Ghadimi BM, Varma S, Simon R, Wangsa D, Barenboim-Stapleton L, Liersch T, Becker H, Ried T, Difilippantonio MJ (2006b): Aneuploidy-dependent massive

- deregulation of the cellular transcriptome and apparent divergence of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human rectal carcinomas. *Cancer Res* 66, 267-282
- Grade M, Hormann P, Becker S, Hummon AB, Wangsa D, Varma S, Simon R, Liersch T, Becker H, Difilippantonio MJ (2007): Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas. *Cancer Res* 67, 41-56
- Grade M, Hummon AB, Camps J, Emons G, Spitzner M, Gaedcke J, Hoermann P, Ebner R, Becker H, Difilippantonio MJ (2011): A genomic strategy for the functional validation of colorectal cancer genes identifies potential therapeutic targets. *Int J Cancer* 128, 1069-1079
- 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, Haremakei T, Mungamuri SK, Mong P, Akiri G, Lopez-Bergami P, Arita A, Anouar Y, Mlodzik M (2013): beta-Catenin-independent activation of TCF1/LEF1 in human hematopoietic tumor cells through interaction with ATF2 transcription factors. *PLoS Genet* 9, e1003603
- Guettler S, LaRose J, Petsalaki E, Gish G, Scotter A, Pawson T, Rottapel R, Sicheri F (2011): Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell* 147, 1340-1354
- Hai B, Yang Z, Shangguan 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

- Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S (2009): Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620
- Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA (2013): Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* 24, 1207-1222
- Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-Frank M, Emons G, Gaedcke J, Kramer F, Wolff HA, Becker H, Beissbarth T (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 (2012): Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest* 92, 466-473
- Kohler EM, Chandra SH, Behrens J, Schneikert J (2009): Beta-catenin degradation mediated by the CID domain of APC provides a model for the selection of APC mutations in colorectal, desmoid and duodenal tumours. *Hum Mol Genet* 18, 213-226
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997): Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787
- Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin 2013
- Lau T, Chan E, Callow M, Waaler J, Boggs J, Blake RA, Magnuson S, Sambrone A, Schutten M, Firestein R (2013): A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Res* 73, 3132-3144
- Lee SB, Gong YD, Park YI, Dong MS (2013): 2,3,6-Trisubstituted quinoxaline derivative, a small molecule inhibitor of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, suppresses cell proliferation and enhances radiosensitivity in A549/Wnt2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 431, 746-752
- Leitlinienprogramm Onkologie (2013): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) Langversion 1.0.

- Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T (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? *Onkologe* 16, 779-788
- Lindl T: Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002, 101, 104-105, 115-119
- Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, Kasibhatla S, Schuller AG, Li AG, Cheng D (2013): Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20224-20229
- Lonza: Nucleofector II Manual. o. Verl., Köln 2006
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W (2002): Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22, 1184-1193
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009): Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26
- Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L (2001): Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-809
- 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

- Mozdzanowski J, Hembach P, Speicher DW (1992): High yield electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 13, 59-64
- Nakamura T, Hamada F, Ishidate T, Anai K, Kawahara K, Toyoshima K, Akiyama T (1998): Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level. *Genes Cells* 3, 395-403
- Nusse R (2013), abgerufen am 04.03.2013 von http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes, hrsg. von Stanford University; Stanford
- 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
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801
- Pei Y, Tuschl T (2006): On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* 3, 670-676
- Petersen CP, Reddien PW (2009): Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139, 1056-1068
- Phipps AI, Chan AT, Ogino S (2013): Anatomic subsite of primary colorectal cancer and subsequent risk and distribution of second cancers. *Cancer* 119, 3140-3147
- Polakis P (2007): The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17, 45-51
- Potter H, Weir L, Leder P (1984): Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7161-7165
- 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
- Rave-Frank 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
- Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R (2005): Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 23, 8688-8696
- Rödel C, Hofheinz R, Liersch T (2012): Rectal cancer: state of the art in 2012. *Curr Opin Oncol* 24, 441-447
- Rödel C, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Graeven U, Hothorn T, Arnold D, Raab HR, Wittekind C, Hess CF (2014): Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin versus 5-fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 32, (suppl; abstr 3500)
- Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP (2000): APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3352-3357
- Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, Kam Z, Ben-Ze'ev A, Geiger B (2002): Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 115, 2771-2780
- Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW (2000): Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 5, 523-532
- Sampietro J, Dahlberg CL, Cho US, Hinds TR, Kimelman D, Xu W (2006): Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/Tcf4 complex. *Mol Cell* 24, 293-300
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF (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 (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
- 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 (2010): A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78, 1184-1192
- Spitzner M, Roesler B, Bielfeld C, Emons G, Gaedcke J, Wolff HA, Rave-Frank M, Kramer F, Beissbarth T, Kitz J (2014): STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 134, 997-1007
- The-Broad-Institute (2013), abgerufen am 11.03.2013 von <http://www.broadinstitute.org/ccl/search/searchResult>, hrsg. von Broad-Novartis; Cambridge, MA
- Thermo-Scientific: Instructions Pierce® BCA Protein Assay Kit. o. Verl., Waltham 2011
- Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985): Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* 31, 1335-1341
- Tocris: XAV939 Product Information. o. Verl., Bristol 2012

- Voloshanenko O, Erdmann G, Dubash TD, Augustin I, Metzsig M, Moffa G, Hundsrucker C, Kerr G, Sandmann T, Anchang B (2013): Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nat Commun* 4, 2610
- Voronkov A, Krauss S (2013): Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des* 19, 634-664
- Waalder J, Machon O, Tumova L, Dinh H, Korinek V, Wilson SR, Paulsen JE, Pedersen NM, Eide TJ, Machonova O (2012): A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res* 72, 2822-2832
- 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
- Warren SL, Whipple GH (1923): Roentgen Ray Intoxication : II. The Cumulative Effect or Summation of X-Ray Exposures Given at Varying Intervals. *J Exp Med* 38, 725-730
- Wittekind C, Meyer H: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2010
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM (2007): WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 618-623

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz mit den wesentlichen genetischen Veränderungen in der Entwicklung eines Karzinoms aus normalem Epithel.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Therapie des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms UICC-Stadium II/III.....	6
Abbildung 3: Wnt/ β -Catenin-Signalweg im <i>ON</i> - und <i>OFF</i> -Status.....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schichtung zwischen Kathode und Anode beim Western Blot.	30
Abbildung 5: Schematische Darstellung des XAV939-Wirkungsmechanismus mit Strukturformel von XAV939.....	34
Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinien SW480, SW837 und LS1034 nach Transfektion mit siRNA.....	38
Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinie RPE bei der Behandlung mit XAV939.	38
Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinien LS1034 und SW837 bei der Behandlung mit XAV939 bzw. mit Wnt3a.....	39
Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf des KBT für die Zelllinie SW480 bei der Behandlung mit XAV939.	39
Abbildung 10: Zeitreihe SW480 mit si β -Catenin (si β -Cat).....	42
Abbildung 11: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes der siRNA auf Proteinebene 48 h nach Transfektion. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW480 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.....	43
Abbildung 12: Zeitreihe SW837 mit si β -Catenin (si β -Cat).....	43
Abbildung 13: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes der siRNA auf Proteinebene 48 h nach Transfektion. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW837 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.....	44
Abbildung 14: Zeitreihe LS1034 mit si β -Catenin (si β -Cat).....	45

Abbildung 15: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes der siRNA auf Proteinebene 48 h nach Transfektion. b) Überlebensfraktion der Zelllinie LS1034 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	45
Abbildung 16: Zeitreihe SW480 mit XAV939.	46
Abbildung 17: Konzentrationsreihe SW480 mit XAV939.	47
Abbildung 18: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW480 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	48
Abbildung 19: Konzentrationsreihe SW837 mit XAV939-Konzentrationen von 4 - 20 μ M.	49
Abbildung 20: Konzentrationsreihe SW837 mit XAV939-Konzentrationen von 0,25 - 5 μ M.	49
Abbildung 21: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie SW837 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	50
Abbildung 22: Konzentrationsreihen LS1034 mit XAV939-Konzentrationen von 4 - 20 μ M.	51
Abbildung 23: Konzentrationsreihen LS1034 mit XAV939-Konzentrationen von 0,25 - 4 μ M.	52
Abbildung 24: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie LS1034 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	53
Abbildung 25: Konzentrationsreihen RPE mit XAV939.	54
Abbildung 26: Kombination Wnt3a und XAV939.	55
Abbildung 27: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von XAV939 auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie RPE in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	56
Abbildung 28: Wildtyp-L-Cells in RPMI-1640 (-)/(+) Wnt3a.	58
Abbildung 29: LS1034 in RPMI-1640 (-)/(+) Wnt3a.	58

Abbildung 30: a) Immunfärbung zur Bestätigung des beschriebenen Effektes von Wnt3a auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Bestrahlung. b) Überlebensfraktion der Zelllinie LS1034 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	59
Anhangsabbildung 1: Überlebensfraktion nach Behandlung mit 3 μ M 5-Fluoruracil und Bestrahlung mit 2 Gy.	71
Anhangsabbildung 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.	71

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anatomische und prozentuale Verteilung kolorektaler Karzinome	3
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	3
Tabelle 3: Stadieneinteilung der UICC für das kolorektale Karzinom	4
Tabelle 4: Verwendete Antikörper mit Verdünnungen und Inkubationsbedingungen.	21
Tabelle 5: Verwendete Zelllinien mit einigen Charakteristika und ihren Wachstumsbedingungen.....	22
Tabelle 6: Verwendetes Medium/PBS-Volumen und Trypsin-EDTA-Volumen für verschiedene Kulturgefäßgrößen.	23
Tabelle 7: Zusätze für NP40-Lysepuffer.	26
Tabelle 8: Zusätze für RIPA-Lysepuffer.	27
Tabelle 9: Rezept für 2 Minigele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel.....	29
Tabelle 10: Zellzahlen für den Koloniebildungstest, Verdopplungszeiten und KBT- Wachstumszeiten für die Zelllinien SW480, LS1034, SW837 und RPE.....	37
Anhangstabelle 1: Verwendete siRNAs, Zielsequenzen und Hersteller.	71

10 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Anwachseffektivität	40
Formel 2: Berechnung der normalisierten Überlebensfraktion.....	40

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all denen, die mir während der letzten Jahre den Rücken frei gehalten, mich an den richtigen Stellen angetrieben und gebremst und zu jeder Zeit zu mir gestanden haben und damit diese Arbeit erst ermöglichten.

Besonders möchte ich mich bei PD Dr. M. Grade für die Überlassung des spannenden Themas, interessante, freundschaftliche und produktive Gespräche und Diskussionen sowie die ständige Erreichbarkeit bedanken. Gleichsam besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. G. Emons, der ebenfalls immer für mich zu erreichen und da war und der auch in schwierigen Phasen stets positive und motivierende Worte fand. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi für die freundliche Aufnahme in seiner Klinik.

Nicht genug dankend erwähnen kann ich folgende Mitglieder der Klinischen Forschergruppe 179 (KFO179): Dr. M. Spitzner, Jessica Eggert, Stefanie Müller, Chan-Rong Lai, Sarah Wachenhausen, Dirk Weinert, die verschiedenen MTA-SchülerInnen und natürlich meine Kolleginnen Janneke Möller und Carolin Herzberg, mit denen ich viele Stunden im Labor verbringen, diskutieren, streiten und lachen durfte und die mir jederzeit bei Fragen, Problemen, Ungeschicken und Sorgen zur Seite standen.

Bei jeglichen statistischen und mathematischen Fragen konnte ich mich stets vertrauensvoll an Dr. F. Kramer aus der Medizinischen Statistik wenden, herzlichen Dank!

Vielen Dank auch an PD Dr. T. Pukrop, Dipl.-Biol. M. Rave-Fränk, PD Dr. H. Wolff und Dr. S. Dango für hilfreiche Hinweise und voranbringende Diskussionen.

Bei den Vertretern der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen bedanke ich mich für die finanzielle Förderung für 6 Monate im Rahmen des Stipendienprogramms „Gö4med“.

Lebenslauf

Als Sohn von Dr. Annette Marks-Reineke, geb. Marks, und Jürgen Reineke wurde ich am 08.03.1989 in Bad Oldesloe geboren.

Von 1995 bis 1999 besuchte ich die Grundschule Waffensen, anschließend zwei Jahre die Orientierungsstufe der Theodor-Heuss-Schule Rotenburg (Wümme). Von 2001 bis 2008 war ich Schüler des Ratsgymnasiums Rotenburg und legte dort 2008 meine Abiturprüfung ab.

Von Oktober 2008 bis November 2015 studierte ich Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen. Im Herbst 2010 bestand ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, im Herbst 2014 den Zweiten Abschnitt und am 17. November 2015 den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Seit dem Frühjahr 2011 wurde ich als Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert.

Mit den Experimenten für die vorliegende Arbeit begann ich im August 2012 im Teilprojekt 2 der KFO179 unter Leitung von PD Dr. M. Grade, in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen. Dabei wurde ich großzügigerweise im Rahmen des „Gö4med-Programms“ mit einem Forschungsstipendium der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen im Wintersemester 2012/2013 unterstützt.