

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
(Prof. Dr. med. B. Michael Ghadimi)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Beeinflussung des kanonischen Wnt-  
Signalwegs und ihre Auswirkungen auf  
die Radio- und  
Radiochemotherapieresistenz des  
Ösophaguskarzinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Karl Burkhard Schütz**

aus  
Jena

Göttingen 2023

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	PD Dr. med. M. Grade
Ko-Referent/in:	PD Dr. med. Leif Hendrik Dröge
Drittreferent/in:	Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 29.11.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Beeinflussung des kanonischen Wnt-Signalwegs und ihre Auswirkungen auf die Radio- und Radiochemotherapieresistenz des Ösophaguskarzinoms" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 23.10.2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Karl Schütz', written in a cursive style.

(Unterschrift)

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

Spitzner M, Emons G, Schutz KB, Wolff HA, Rieken S, Ghadimi BM, Schneider G, Grade M (2021): Inhibition of Wnt/beta-Catenin Signaling Sensitizes Esophageal Cancer Cells to Chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci* 22

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Formelverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.2 Grundlagen der Karzinogenese des Ösophaguskarzinoms .....	1
1.2.1 Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms.....	2
1.2.2 Karzinogenese des Adenokarzinoms .....	2
1.3 Lokalisation des Ösophaguskarzinoms.....	4
1.4 Diagnostik, TNM- Klassifikation und Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms .....	4
1.5 Therapie des Ösophaguskarzinoms .....	7
1.5.1 Endoskopische Therapie .....	7
1.5.2 Chirurgische und multimodale Therapiekonzepte .....	7
1.6 Vorarbeiten und klinische Problematik .....	8
1.7 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg .....	9
1.8 Fragestellung.....	11
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Material.....	12
2.1.1 Chemikalien.....	12
2.1.2 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial .....	13
2.1.3 Zellkulturreagenzien .....	14
2.1.4 Geräte.....	14
2.1.5 Transfektionsreagenzien und Kits .....	16
2.1.6 Vektoren und Plasmide.....	17
2.1.7 Antikörper.....	18
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	19
2.1.9 Computersoftware.....	22
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Zellkultur .....	22
2.2.2 Beeinflussung der Proteinexpression durch siRNA.....	26
2.2.3 XAV939.....	28
2.2.4 Zellviabilitätsassay .....	30
2.2.5 Dual-Luciferase-Reporter-Assay .....	32
2.2.6 Proteinchemische und immunologische Methoden .....	34

2.2.7	Koloniebildungstest .....	39
2.2.8	Statistik .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Charakterisierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Proteinexpressionsprofils und der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegaktivität in Ösophaguskarzinomzelllinien .....	45
3.2	Therapiesensibilisierung durch den Einsatz von siRNA gegen $\beta$ -Catenin .....	47
3.2.1	Bestimmung des optimalen RNAi- <i>Knockdown</i> -Zeitpunktes .....	47
3.2.2	Der Einsatz von RNA-Interferenz hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität .....	50
3.2.3	RNA-Interferenz-vermittelte Inhibierung von $\beta$ -Catenin beeinflusst die Radiochemotherapiesensibilität .....	54
3.3	Einsatz von fraktionierter Bestrahlung bei Wnt/ $\beta$ -Catenin-unabhängigen Zelllinien.....	58
3.4	Die Anwendung des kleinmolekularen Inhibitors XAV939.....	63
3.4.1	Dosis- und Zeitpunktermittlung .....	63
3.4.2	Einfluss von XAV939 auf die Zellviabilität .....	69
3.4.3	Effekt von XAV939 auf die Radiochemotherapiesensibilität.....	72
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
4.1	Axin2 – ein Indikator für die Wnt-Aktivität von Zellen.....	77
4.2	Inhibition von $\beta$ -Catenin durch siRNA induziert Radiosensibilität in Wnt/ $\beta$ -Catenin-aktiven Zelllinien .....	78
4.3	Fraktionierte Bestrahlung – Übertragung auf ein Modell in Anlehnung an die klinische Praxis .....	79
4.4	Inhibierung von $\beta$ -Catenin mittels XAV939 und Auswirkung auf die Radiosensibilität .....	80
4.5	Klinische Bedeutung und Ausblick .....	82
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Model der Karzinogenese.....	3
Abbildung 2: Schematische Übersicht des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs.....	10
Abbildung 3: Schematische Übersicht des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und Darstellung des XAV939 Wirkungsmechanismus.....	29
Abbildung 4: Reaktionsschema <i>Dual Luciferase Reporter Assay</i> .....	32
Abbildung 5: Schematische Darstellung des KBT für die Zelllinien FLO-1 und OAC-P4C.....	40
Abbildung 6: Schematische Darstellung des KBT mit Fraktionierter Bestrahlung für die Zelllinien Kyse-150 und Kyse-180 .....	41
Abbildung 7: Schematische Darstellung des KBT für die Zelllinien Kyse-180, FLO-1 und OAC-P4C mit XAV939.....	42
Abbildung 8: Übersichtsblot der verwendeten Zelllinien.....	45
Abbildung 9: Grund- und induzierbare Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs.....	46
Abbildung 10: Proteinexpressionsprofil von Kyse-150-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	47
Abbildung 11: Proteinexpressionsprofil von Kyse-180-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	48
Abbildung 12: Proteinexpressionsprofil von FLO-1-Zellen 48 h – 120 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	48
Abbildung 13: Proteinexpressionsprofil von OAC-P4C-Zellen 48 h – 120 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	49
Abbildung 14: Proteinexpressionsprofil von OE-19-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	49
Abbildung 15: Proteinexpressionsprofil von OE-33-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	50
Abbildung 16: Zellviabilität von Kyse-150 nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	51
Abbildung 17: Zellviabilität von Kyse-180 nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	51
Abbildung 18: Zellviabilität von FLO-1 nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	52
Abbildung 19: Zellviabilität von OAC-P4C nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	52
Abbildung 20: Zellviabilität von OE-19 nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	53
Abbildung 21: Zellviabilität von OE-33 nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	53
Abbildung 22: Koloniebildungstest von Kyse-150 und Bestrahlung 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	54
Abbildung 23: Koloniebildungstest von Kyse-180 und Bestrahlung 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	55
Abbildung 24: Koloniebildungstest von FLO-1 und Bestrahlung 72 h nach	

Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	56
Abbildung 25: Koloniebildungstest von OAC-P4C und Bestrahlung 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	56
Abbildung 26: Koloniebildungstest von OE-19 und Bestrahlung nach 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	57
Abbildung 27: Koloniebildungstest von OE-33 und Bestrahlung nach 24 h unter Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin.....	58
Abbildung 28: Koloniebildungstest von Kyse-150 und fraktionierte Bestrahlung, Beginn 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin. ....	59
Abbildung 29: Koloniebildungstest von Kyse-180 und fraktionierte Bestrahlung, Beginn 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin. ....	60
Abbildung 30: Koloniebildungstest von FLO-1 und fraktionierte Bestrahlung, Beginn 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin. ....	61
Abbildung 31: Koloniebildungstest von OAC-P4C bei fraktionierter Bestrahlung, Beginn 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen $\beta$ -Catenin. ....	62
Abbildung 32: Konzentrationsreihe Kyse-150 mit XAV939.....	64
Abbildung 33: Konzentrationsreihe Kyse-180 mit XAV939.....	65
Abbildung 34: Konzentrationsreihe FLO-1 mit XAV939.....	66
Abbildung 35: Konzentrationsreihe OAC-P4C mit XAV939. ....	67
Abbildung 36: Konzentrationsreihe OE-19 mit XAV939. ....	68
Abbildung 37: Konzentrationsreihe OE-33 mit XAV939. ....	69
Abbildung 38: Zellviabilitätsmessungen nach Inkubation mit XAV939. ....	70
Abbildung 39: Zellviabilitätsmessungen nach Inkubation mit XAV939. ....	71
Abbildung 40: Koloniebildungstest von Kyse-180 und Bestrahlung nach 144 h Inkubationszeit mit XAV939.....	72
Abbildung 41: Koloniebildungstest von FLO-1 und Bestrahlung nach 144 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.....	73
Abbildung 42: Koloniebildungstest von OAC-P4C und Bestrahlung nach 144 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.....	74
Abbildung 43: Koloniebildungstest von OE-19 und Bestrahlung nach 96 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.....	74
Abbildung 44: Koloniebildungstest von OE-33 und Bestrahlung nach 24 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.....	75



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für die klinische Einteilung des Ösophaguskarzinoms.....	5
Tabelle 2: Stadiengruppierungen der UICC für das Ösophaguskarzinom- Plattenepithelkarzinome.....	6
Tabelle 3: Stadiengruppierungen der UICC für das Ösophaguskarzinom- Adenokarzinome.....	6
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.....	12
Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchs- und Arbeitsmaterial.....	13
Tabelle 6: Verwendete Zellkulturreagenzien.....	14
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	14
Tabelle 8: Verwendete Transfektionsreagenzien und Kits.....	16
Tabelle 9: Verwendete siRNA mit Zielsequenz, Größe und Herstellerangaben.....	17
Tabelle 10: Verwendete Vektoren und Plasmide mit Größen- und Herstellerangaben.....	17
Tabelle 11: Verwendete Antikörper mit Verdünnungen und Inkubationsbedingungen.....	18
Tabelle 12: Coomassie Fixierlösung für Gele.....	19
Tabelle 13: Coomassie Färbelösung für Gele.....	19
Tabelle 14: Coomassie Entfärbelösung für Gele.....	19
Tabelle 15: Blockierpuffer für Western Blot Membranen, Lösungspuffer für Antikörper ..	20
Tabelle 16: Lösungspuffer für Antikörper.....	20
Tabelle 17: Nonidet® P40 Zellysepuffer (NP40).....	20
Tabelle 18: SDS-PAGE Sammelpuffer.....	20
Tabelle 19: SDS-PAGE Trenngelpuffer.....	21
Tabelle 20: 4x SDS-PAGE Ladepuffer.....	21
Tabelle 21: SDS-PAGE Laufpuffer.....	21
Tabelle 22: Western Blot Transferpuffer.....	22
Tabelle 23: Verwendete Computersoftware.....	22
Tabelle 24: Verwendete Zelllinien, ihr Ursprung und ihre Wachstumsbedingungen.....	23
Tabelle 25: Verwendete Zellkulturgefäße und die dazugehörigen Medium/PBS- und Trypsin-Volumina.....	24
Tabelle 26: Zielproteine mit zugehörigen Molekulargewichten in kD.....	36
Tabelle 27: Rezept für 2 Minigele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel.....	36
Tabelle 28: Zellzahlen, Verdopplungszeiten und KBT-Wachstumszeiten der verwendeten Zelllinien.....	39

## **Formelverzeichnis**

Formel 1: Formel zur Berechnung der Anwachseffektivität.....	43
Formel 2: Berechnung der normalisierten Überlebensfraktion.....	43

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serum-Albumin
$\beta$ -TrCP	<i><math>\beta</math>-transducin-repeat-containing protein</i>
CTNNB1	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1</i>
d	Tag
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GSK3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase 3-beta
Gy	Gray
h	Stunde
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
KBT	Koloniebildungstest
LEF1	<i>lymphoid enhancer-binding factor-1</i>
LRP5/6	<i>low-density-lipoprotein-related protein 5/6</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NP40	<i>Nonidet-P40 cell lysis buffer</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration
PVDF	Polyvinylidendifluorid
p-Wert	Signifikanzwert
RCT	Radiochemotherapie
RISC	<i>ribonucleic acid induced silencing complex</i>
RKI	Robert Koch Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Radiotherapie
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFRP1	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
T25	Zellkulturflasche mit 25 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche
T75	Zellkulturflasche mit 75 cm <sup>2</sup> 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>
TCF7L2	<i>Transcription factor 7-like 2</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TNM	<i>tumor, node, metastasis</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
WP	<i>well-plate</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Der Speiseröhrenkrebs steht mit ca. 456.000 Neuerkrankungen pro Jahr an 8. Stelle der Krebserkrankungen weltweit, ist die sechshäufigste Todesursache durch Krebserkrankungen und stellt damit ein weltweites gesundheitspolitisches Problem dar (Wong et al. 2018). In Deutschland zählt der Speiseröhrenkrebs zu den selteneren malignen Erkrankungen. Insgesamt erkranken Männer etwa vier Mal häufiger als Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 65 Jahre. Viele Ösophaguskarzinome werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, was sich in der niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 20 % widerspiegelt. Beim Ösophaguskarzinom werden zwei histologische Subtypen unterschieden: das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom, wobei ein Anteil von 60 % auf das Plattenepithelkarzinom entfallen. Für das Adenokarzinom des Ösophagus konnte in den letzten drei Jahrzehnten ein Anstieg der Inzidenzrate von bis zu 500 % in der westlichen Welt verzeichnet werden, sodass dieser histologische Subtyp mittlerweile ein Drittel der Krebserkrankungen des Ösophagus in Deutschland ausmacht (Corley et al. 2009; RKI 2013).

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms werden Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum gezählt. Der Barrett-Ösophagus als Folge chronischer, säurebedingter Schädigung des Ösophagus und die gastro-ösophageale-Refluxkrankheit sind Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Adenokarzinoms (Falk 2009). Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass auch das Geschlecht, das Alter, Übergewicht, eine Bestrahlung des Hals-Thorax-Bereiches, die ethnische Zugehörigkeit, die familiäre Prädisposition, Achalasie, Ösophagusdivertikel, der übermäßige Konsum von Betelnüssen und der Verzehr von zu wenig Obst und Gemüse eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Speiseröhrenkrebses spielen (Cogliano et al. 2011; Engel et al. 2003; Falk 2009).

## 1.2 Grundlagen der Karzinogenese des Ösophaguskarzinoms

Im Prinzip kann jede Zelle im menschlichen Körper maligne entarten. Als Grundvoraussetzung für diese komplexe und multifaktorielle Transformation muss eine Zelle zunächst sechs spezielle Eigenschaften erwerben: Apoptoseresistenz, Unabhängigkeit gegenüber externen Wachstumsfaktoren, Fähigkeit zur unlimitierten Replikation, Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren, Aufrechterhaltung der Versorgung durch Gefäßneubildung sowie Gewebeinvasivität mit Möglichkeit zur

Metastasenbildung (Hanahan und Weinberg 2000). Nach neueren Erkenntnissen sind zum Erwerb dieser Eigenschaften noch zwei weitere Ereignisse notwendig: Die Entwicklung von genomischer Instabilität, welche zu Mutationen und Chromosomenabberationen führt, und eine den Tumor begünstigende Entzündungsreaktion. Weiterhin gelten die Fähigkeit zur Vermeidung der Detektion und Destruktion durch das Immunsystem, die Deregulation von Signalwegen, sowie die Fähigkeit zur Rekalibrierung und Anpassung des Energiehaushalts der Tumorzelle als essentielle Faktoren im Prozess der Karzinogenese (Hanahan und Weinberg 2011).

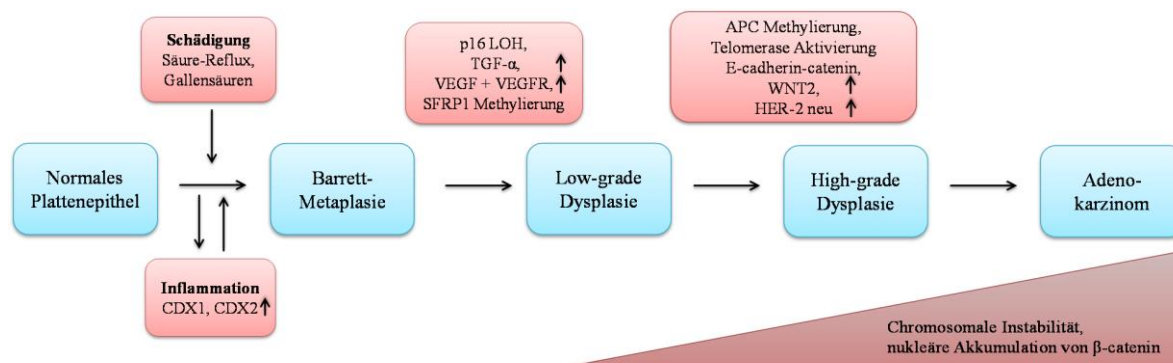
Der exakte Ablauf der Entstehung des Ösophaguskarzinoms ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Folgenden sollen kurz die Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms und des Adenokarzinoms dargestellt werden.

### 1.2.1 Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms

Es wird davon ausgegangen, dass das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus aus einer Vorgängerläsion, der „squamösen ösophagealen Dysplasie“, entsteht. Diese wird entsprechend der Histologie in ein mildes, fortgeschrittenes und schweres Stadium eingeteilt, wobei Letzteres mit dem *carcinoma in situ* gleichgesetzt werden kann (Taylor et al. 2013). Ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom (Day und Morson 1978), müssen für die Progression der Dysplasie zu einem Plattenepithelkarzinom bestimmte Zellregulationsmechanismen ausfallen. Neben dem in vielen Tumoren beobachteten Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 sowie diversen chromosomalen Aberrationen wurden unter anderem auch eine erhöhte Expression von *Axin2*, *GSK-3 $\beta$*  und *c-myc*, sowie erhöhte zytoplasmatische Level von  $\beta$ -Catenin gefunden, was eine Beteiligung des Wnt-Signalwegs vermuten lässt (Kimura et al. 1999; Salahshor et al. 2008; Stoner und Gupta 2001).

### 1.2.2 Karzinogenese des Adenokarzinoms

Im Jahr 1950 wurde erstmals von Norman Barrett die metaplastische Transformation des Plattenepithels des Ösophagus zu einem Zylinderepithel mit Kryptenarchitektur, ähnlich dem Gastrointestinaltrakt, beschrieben (Barrett 1950). 1953 fand man erste Hinweise darauf, dass eine mögliche Ursache der Barrett-Metaplasie die gastro-ösophageale-Refluxkrankheit (GERD) darstellt (Allison und Johnstone 1953). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Barrett-Metaplasie und dem Adenokarzinom des Ösophagus wurde 1975 spezifiziert (Naef et al. 1975). In Anlehnung an die Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom lässt sich, basierend auf den bisherigen endoskopischen, histologischen und molekulargenetischen Erkenntnissen, ein Model zur Karzinogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus erstellen (siehe Abbildung 1). Dies beschreibt jedoch nur einen Bruchteil der möglichen, die Karzinogenese bedingenden Faktoren, und es bedarf weiterer Forschung, um die genauen Mechanismen zu klären.



**Abbildung 1: Model der Karzinogenese.**

Von der Barrett-Metaplasie bis zum Adenokarzinom (adaptiert nach (Morales et al. 2002)). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Mit zunehmender Entartung des Plattenepithels kommt es zu vielfältigen molekulargenetischen Veränderungen (siehe Abbildung 1). Die genaue Reihenfolge ist jedoch noch nicht geklärt. Die wiederholte Schädigung des Plattenepithels durch Magensäure und Gallensaft führt zu einer Entzündungsreaktion im Gewebe und begünstigt die Transformation des Plattenepithels zu einer intestinalen Metaplasie, dem Barrett-Ösophagus. In Barrettösophagus-Biopsaten konnte eine erhöhte Expression von *CDX1* und *CDX2* nachgewiesen werden (Eda et al. 2003). Versuche in Mausmodellen haben gezeigt, dass *CDX1* und *CDX2* eine Rolle bei der intestinalen Differenzierung spielen (Mutoh et al. 2004). Der Verlust der Heterozygotität (LOH) der Tumorsuppressorgene *p16* und *TP53* tritt bereits in frühen Dysplasiestadien auf und befähigt die Zellen dazu, wachstumshemmenden Signalen zu entgehen und sich unbegrenzt zu vermehren, und macht sie resistent gegenüber Apoptose (Wang und Souza 2011). Durch Reaktivierung der Telomerasen wird die Fähigkeit zur unbegrenzten Replikation weiter verstärkt (Lord et al. 2000). Weiterhin wurden in Biopsaten erhöhte Werte des Wachstumsfaktors *TGF-α* gefunden, der für das Wachstum der Tumorzellen verantwortlich sein könnte (Jankowski et al. 1991). Erhöhtes Expressionslevel der Gefäßwachstumsfaktoren *VEGF* und *VEGFR* in der Barrett-Metaplasie weisen auf eine frühe Veränderung des Gefäßsystems hin (Auvinen et al. 2002). Mit fortschreitender Dysplasie nimmt die chromosomale Instabilität der Zellen zu, wodurch die Entwicklung einer Aneuploidie begünstigt wird (Wijnhoven et al. 2001). Neben den bereits erwähnten Veränderungen von *p16* und *TP53*, kommt es zu Promotormethylierungen der *adenomatous polyposis coli* (*APC*) und *secreted frizzled-related protein 1* (*SFRP1*) Gene. Eine vollständige Methylierung führt zu einer fehlenden Expression des Proteins (Clement et al. 2006; Kawakami et al. 2000). Der Verlust von *APC*, einem Schlüsselprotein des  $\beta$ -Catenin Destruktionskomplexes, und dem Wnt-Antagonisten *SFRP1* durch Promotormethylierung ist häufig, und deutet auf eine Beteiligung des Wnt-Signalwegs bei der Karzinogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus hin (Clement et al. 2006). Zusätzlich konnte eine Hochregulation von WNT2 während der Progression

von einer High-Grade-Dysplasie zu einem Adenokarzinom festgestellt werden (Clement et al. 2006). Interessanterweise nimmt in Ösophaguszellen mit steigender Dysplasie auch die Konzentration von  $\beta$ -Catenin, dem Schlüsseltransduktionsprotein des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, zu und es kommt zu einer vermehrten Anreicherung im Zellkern (Bian et al. 2000). Bei 15-30 % der Patienten mit Barrett-Metaplasie oder Adenokarzinom wurde außerdem eine Überexpression von HER-2/neu gefunden. Diese Überexpression korreliert mit einer schlechteren Prognose und könnte daher besonders bei Krankheitsfällen mit einer frühen Progression eine wichtige Rolle spielen (Rossi et al. 2009).

### **1.3 Lokalisation des Ösophaguskarzinoms**

Die Verteilung der Platten- und Adenokarzinome des Ösophagus ist sehr heterogen. Während Adenokarzinome zu 75 % im distalen Drittel des Ösophagus und am ösophagogastralen Übergang auftreten, können Plattenepithelkarzinome im gesamten Ösophagus lokalisiert sein. Der Großteil (ca. 80 %) der Plattenepithelkarzinome ist im mittleren und unteren Drittel des Ösophagus anzutreffen, wobei nur ungefähr 20 % den zervikalen Abschnitt befällt (Daly et al. 2000; Enzinger und Mayer 2003; Sarbia et al. 2004).

### **1.4 Diagnostik, TNM- Klassifikation und Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms**

Die Primärdiagnostik des Ösophaguskarzinoms umfasst die Anamnese, klinische Untersuchung sowie die Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) mit konsekutiver Probenentnahme zur histologischen Sicherung. Im Anschluss an die Diagnose eines Ösophaguskarzinoms erfolgt in der Regel das Staging. Mit der höchsten Sensitivität und Spezifität stellt der endoskopische Ultraschall das Mittel der ersten Wahl dar. Um ein möglichst exaktes prätherapeutisches Bild zu erhalten, wird zusätzlich eine Multidetektor-CT von Hals/Thorax/Abdomen durchgeführt. Eine PET/CT-Untersuchung sowie eine flexible Bronchoskopie können bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen in Erwägung gezogen werden (Leitlinienprogramm-Onkologie 2021).

Die klinische Einteilung der Ösophaguskarzinome erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale Contre le Cancer). Das "T" beschreibt die Infiltrationstiefe des Tumors, "N" beschreibt den Lymphknotenstatus, und "M" gibt Informationen über eine eventuelle Fernmetastasierung (siehe Tabelle 1). Nach der Klassifikation der Tumore können diese anschließend anhand der Stadien der UICC eingeteilt werden, und in Kombination mit dem Grad der Differenzierung (G1 – G4) und der Lokalisation des Tumors lässt sich eine prognostische Gruppe bilden, was



entscheidend für die spätere Therapie ist, wobei zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinomen des Ösophagus unterschieden wird (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3).

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation für die klinische Einteilung des Ösophaguskarzinoms (adaptiert nach (Wittekind 2020)).**

Primärtumor (T-Stadium)		Regionäre Lymphknoten (N-Stadium)		Fernmetastasen (M-Stadium)	
<b>TX</b>	Primärtumor nicht beurteilbar	<b>NX</b>	Beurteilung nicht möglich		
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor	<b>N0</b>	Kein Anhalt für Lymphknotenmetastasen	<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ	<b>N1</b>	Metastasen in 1 bis 2 regionären Lymphknoten	<b>M1</b>	Fernmetastasen
<b>T1</b>	Tumor infiltriert die Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submucosa	<b>N2</b>	Metastasen in 3 bis 6 regionären Lymphknoten		
<b>T1a</b>	Tumor infiltriert die Lamina propria oder Muscularis mucosae	<b>N3</b>	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten		
<b>T1b</b>	Tumor infiltriert die Submucosa			<b>pTNM: pathologische Klassifikation</b>	
<b>T2</b>	Tumor infiltriert die Muscularis propria			<b>pM1</b>	Fernmetastasen
<b>T3</b>	Tumor infiltriert die Adventitia			<b>pN0</b>	Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 7 oder mehr Lymphknoten
<b>T4</b>	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen				
<b>T4a</b>	Tumor infiltriert Pleura, Perikard oder Zwerchfell				
<b>T4b</b>	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea				

**Tabelle 2: Stadiengruppierungen der UICC für das Ösophaguskarzinom - Plattenepithelkarzinome nach dem TNM-Klassifikationssystem (adaptiert nach (Wittekind 2020)).**

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Klinisches Stadium - Plattenepithelkarzinome</b>			
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0, N1	M0
<b>II</b>	T2	N0, N1	M0
	T3	N0	M0
<b>III</b>	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
<b>IVA</b>	T4a, T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
<b>IVB</b>	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 3 Stadiengruppierungen der UICC für das Ösophaguskarzinom – Adenokarzinome nach dem TNM-Klassifikationssystem (adaptiert nach (Wittekind 2020)).**

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Klinisches Stadium - Adenokarzinome</b>			
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>IIA</b>	T1	N1	M0
<b>IIB</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T1	N2	M0
	T2	N1, N2	M0
	T3, T4a	N0, N1, N2	M0
<b>IVA</b>	T4b	N0, N1, N2	M0
	Jedes T	N3	M0
<b>IVB</b>	Jedes T	Jedes N	M1

## **1.5 Therapie des Ösophaguskarzinoms**

Die Therapie des Ösophaguskarzinoms ist hochkomplex und wird im Tumorboard anhand der aktuellen Leitlinien diskutiert. Im Folgenden wird daher nur eine kurze Übersicht gegeben.

### **1.5.1 Endoskopische Therapie**

Die Therapie des Adeno- und Plattenepithelkarzinoms richtet sich vor allem nach dem TNM-Status und weiteren histopathologischen Befunden. Bei oberflächlichen Mukosakarzinomen oder high-grade intraepithelialen Neoplasien im Plattenepithel und Barrett-Ösophagus ist die endoskopische Resektion die Therapie der Wahl, vorausgesetzt der Tumor hat noch nicht die Lymph- oder Blutgefäße infiltriert, es ist morphologisch keine Ulzeration sichtbar, der Tumor ist noch gut differenziert und hat die Submukosa noch nicht durchbrochen. Als bevorzugtes Resektionsverfahren hat sich besonders die endoskopische Submukosadisektion (ESD) bewährt, mit der gute R0-Resektionsraten möglich sind (Ishihara et al. 2008; Probst et al. 2013). Zur Senkung der Rate metachroner Neoplasien wird eine thermische Ablation (Radiofrequenzablation oder Argon-Plasma-Koagulation) der verbleibenden metaplastischen Schleimhaut angeschlossen. Da das Risiko von Rezidiven nach erfolgreicher endoskopischer Resektion, speziell bei Barrettneoplasien, noch bis zu 30 % beträgt, sollen lebenslang Kontroll-Endoskopien erfolgen (zunächst erstmalig nach 3 Monaten, dann für 2 Jahre jeweils halbjährlich und anschließend lebenslang jährliche Kontrollen) (Ell et al. 2000; Leitlinienprogramm-Onkologie 2021).

### **1.5.2 Chirurgische und multimodale Therapiekonzepte**

Das Ziel der chirurgischen Therapie ist die möglichst vollständige Entfernung des Tumors (R0 = Resektionsränder tumorfrei) mit den dazugehörigen Lymphknoten und, wenn nötig, beteiligten Nachbarstrukturen (en-bloc). Die chirurgische Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Halsbereich wurde auf Grund der erheblichen postoperativen Nebenwirkungen zu Gunsten der definitiven Radiochemotherapie weitgehend verlassen. Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome der Kategorie cT2N0M0 können mit einem alleinigen chirurgischen Ansatz kurativ behandelt werden. Bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenem Adeno- oder Plattenepithelkarzinom ist primär eine neoadjuvante Radiochemotherapie (5-FU + Cisplatin) indiziert (van Hagen et al. 2012). Alternativ kann auch eine Kombination von Carboplatin und Paclitaxel oder das FOLFOX Schema (Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin) angewandt werden (Conroy et al. 2014). Für das lokal fortgeschrittene Adenokarzinom des Ösophagus hat sich mittlerweile als zweiter Therapiestandard die perioperative Chemotherapie etabliert. Diese beinhaltet eine Kombination aus neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie nach dem FLOT-

Schema (5-FU/Folinsäure/Oxaliplatin/Docetaxel) und kommt in kurativer Intention zum Einsatz, gefolgt von der chirurgischen Resektion (Al-Batran et al. 2019). In einer Meta-Analyse von Kranzfelder et al. wurde gezeigt, dass ein intrathorakales cT3/cT4 Plattenepithelkarzinom auch ohne Operation kurativ mit einer definitiven Radiochemotherapie behandelt werden kann (Kranzfelder et al. 2011). Allgemein ist eine definitive Radiochemotherapie, laut dem Leitlinienprogramm-Onkologie 2021, für alle Patienten mit chirurgisch, oder funktionell inoperablen Tumoren indiziert. Dazu zählt im weitesten Sinne auch das Plattenepithelkarzinom des zervikalen Ösophagus.

## 1.6 Vorarbeiten und klinische Problematik

Wie aus Kapitel 1.5 hervorgeht, stellt die Radiochemotherapie neben der radikal chirurgischen Resektion eine der Hauptbehandlungsmodalitäten des fortgeschrittenen Ösophaguskarzinoms dar. Jedoch treten Lokalrezidive und Fernmetastasen noch immer in gehäufter Maß auf, was einen Hauptgrund für die unbefriedigende Überlebensrate darstellt (Sjoquist et al. 2011; van Hagen et al. 2012). Als primäre Ursache für das Behandlungsversagen wird die Radiochemotherapieresistenz angesehen (Linkous und Yazlovitskaya 2012).

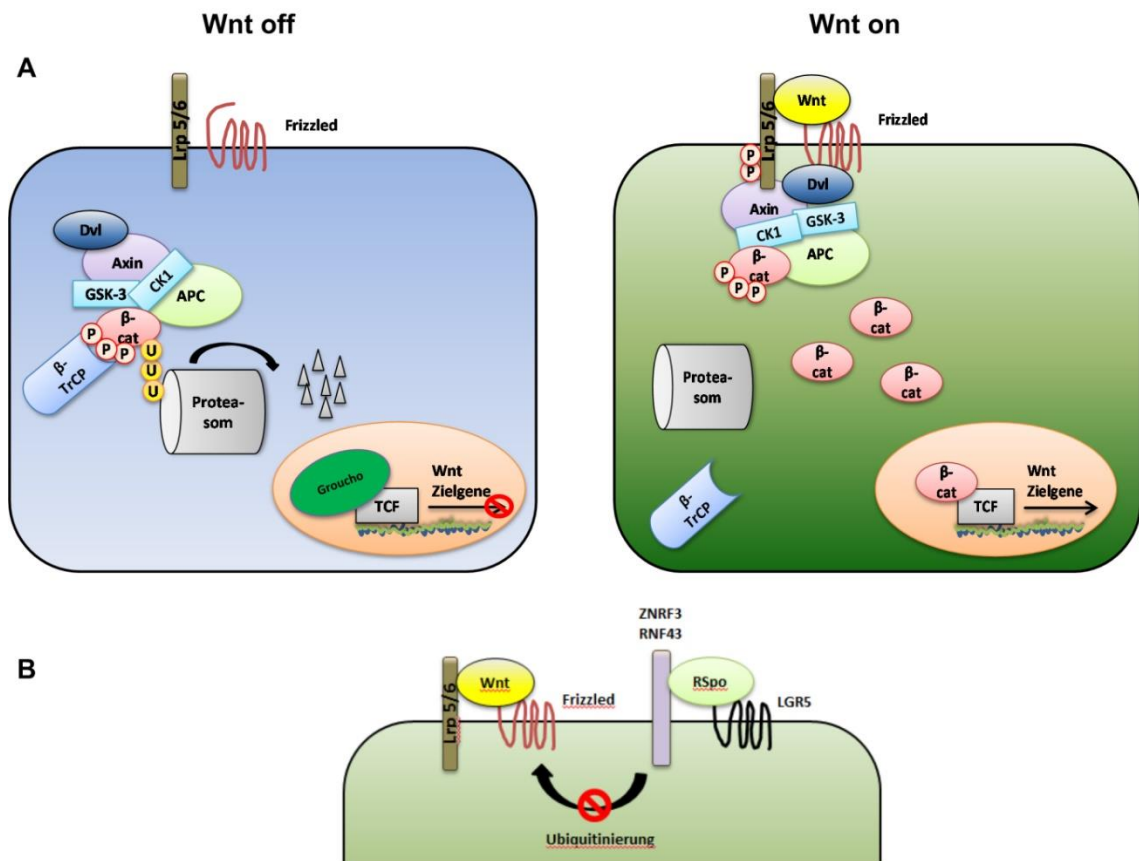
Eine ähnliche Problematik existiert beim Rektumkarzinom (Grade et al. 2012). Deshalb wurden in unserer Arbeitsgruppe Genexpressionsprofile von Rektumbiopsien therapieresistenter und sensibler Rektumkarzinome erstellt. Dabei war unter anderem der *transcription factor 7-like 2 (TCF7L2)*, ein Schlüsselprotein des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, bei den resistenten Tumoren signifikant erhöht (Ghadimi et al. 2005). Anschließend konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Wnt-Transkriptionsfaktor *TCF7L2* und der Radiotherapieresistenz von Rektumkarzinomzellen festgestellt werden (Kendziorra et al. 2011). In einer nachfolgenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von  $\beta$ -Catenin, dem Schlüssel-Signalprotein des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, ebenfalls eine Radiosensibilisierung der Tumorzellen bewirkt (Emons et al. 2017).

Für das Ösophaguskarzinom konnten Li et al. (2010) zeigen, dass bestrahlungsresistente Karzinome eine deutlich erhöhte Expression von *lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1)* und *CTNNB1*, zwei kritischen Genen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, aufweisen. *CTNNB1* kodiert für  $\beta$ -Catenin und *LEF1* ist ein "downstream Target" des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs (Li HZ et al. 2010).

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe in Verbindung mit den Entdeckungen von Li HZ et al. (2010) deuten darauf hin, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beim Ösophaguskarzinom einen potentiellen Angriffspunkt zur Überwindung von Radiotherapieresistenz darstellen könnte.

## 1.7 Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist ein evolutionär hochkonservierter Signalweg, und seine wesentlichen Merkmale sind bereits in frühen vielzelligen Organismen, wie z.B. *placozoa* (Plattentieren) vorhanden (Srivastava et al. 2008). Neben seiner Beteiligung bei der Embryonalentwicklung spielt der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auch eine wichtige Rolle bei der Gewebeselbsterneuerung und Stammzellregulation (Clevers et al. 2014; Petersen und Reddien 2009; Radtke und Clevers 2005). Die erste Beschreibung eines Wnt-Gens in Säugetieren gelang Anfang der 1980er Jahre mit der Identifizierung des Proto-Onkogens *Int-1* (später Wnt-1 genannt) in durch das *mouse mammary tumor virus* (MMVT) induzierten Mammakarzinomen (Nusse und Varmus 1982). Wenige Jahre zuvor wurde die Rolle des Segment-Polaritätsgen *Wingless* in der Flügelentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* erläutert (Nusslein-Volhard und Wieschaus 1980; Sharma und Chopra 1976). Später konnte eine Homologie zwischen *Int-1* und *Wingless* aufgedeckt werden (Rijsewijk et al. 1987). Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur wurde der Hybridname Wnt geschaffen (*wingless-related integration site*) (Nusse et al. 1991). Mit der Entdeckung von Mutationen im *adenomatous polyposis coli* Gen (*APC*) Anfang der 1990er Jahre bei Patienten mit einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP), einem hereditären Krebsyndrom, konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und der Krebsentstehung aufgedeckt werden (Kinzler et al. 1991). In den folgenden Jahren wurden weitere Wnt/ $\beta$ -Catenin-Gene entschlüsselt und ihre Bedeutung für diverse Krankheiten aufgezeigt. Mittlerweile werden Mutationen im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auf Grund seiner Bedeutung für die Differenzierung von Geweben und die Stammzellbiologie für die Entstehung von Karzinomen und vielen weiteren Krankheiten, wie z.B. *osteogenesis imperfecta* oder Typ II Diabetes, verantwortlich gemacht (Clevers und Nusse 2012; Grant et al. 2006; Kanazawa et al. 2004). Das Verständnis der genauen Vorgänge und Interaktionen zwischen den Wnt-Komponenten ist jedoch weiterhin unzureichend verstanden und deshalb noch Gegenstand aktueller Forschung (Clevers et al. 2014; Li VS et al. 2012; Willert und Nusse 2012).



**Abbildung 2: Schematische Übersicht des Wnt/β-Catenin-Signalwegs.**

A) Wnt/β-Catenin-Signalweg mit *on*- und *off*-Status. B) Darstellung der Wnt-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Wnt-Moleküle binden an die *frizzled*- und LRP5/6-Rezeptoren und aktivieren dadurch die Signalkaskade. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Abbildung 2 zeigt die Wnt-Rezeptoren und den Wnt/β-Catenin-Signalweg im *off*- (ohne Wnt-Stimulation) und *on*- (mit Wnt-Stimulation) Zustand. Das zentrale Schlüsselregulationselement des Wnt/β-Catenin-Signalwegs ist der β-Catenin-Destruktionskomplex, ein Multiproteinkonstrukt bestehend aus den Tumorsuppressoren *Axin* und *APC*, den Seronin/Threonin-Kinasen *Glykogen-Synthetase-Kinase 3* (GSK3β) und *Casein Kinase 1* (CK1) und der E3-Ubiquitin Ligase *β-Transducin-repeat-containing-protein* (β-TrCP). In Abwesenheit eines Wnt-Stimulus wird das zytoplasmatische β-Catenin konstant durch die Kinasen phosphoryliert, über die Interaktion mit β-TrCP anschließend polyubiquitiniert und dadurch der proteasomalen Degradation zugeführt (Stamos und Weis 2013). Mit Beginn des proteasomalen Abbaus wird der β-Catenin-Destruktionskomplex wieder frei und kann weitere β-Catenin Moleküle für die Degradation vorbereiten (Li VS et al. 2012). Durch den permanenten Abbau von β-Catenin wird somit eine Signaltransduktion verhindert. Der Transkriptionsrepressor *Groucho* blockiert zusätzlich die Transkription von Wnt-Zielgenen durch Komplexbildung mit *TCF* (Cavallo et al. 1998). Wenn nun ein Wnt-Signalmolekül an den heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus dem Transmembranrezeptor *frizzled* und dem *low-density lipoprotein receptor-related protein*

(LRP5/6), bindet, bewirkt das eine Konformitätsänderung des Rezeptorkomplexes mit Phosphorylierung von LRP5/6 durch GSK-3 und CK1 und konsekutiver Bindung von Axin, unter Vermittlung durch *dishevelled* (Dvl) (He et al. 2004; MacDonald und He 2012; Mao et al. 2001). Weiterhin dissoziiert  $\beta$ -TrCP vom  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplex ab, sodass  $\beta$ -Catenin zwar noch phosphoryliert, aber nicht mehr ubiquitiniert wird, und damit proteosomal nicht mehr abgebaut werden kann. Mit der Zeit wird der Komplex mit phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin gesättigt, sodass neu synthetisiertes, unphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin (aktiv) akkumuliert und in den Zellkern transloziert (Li VS et al. 2012). Durch Interaktion mit *T-cell specific transcription factor* (TCF) und *Lymphoid enhancer-binding factor-1* (LEF1) bewirkt  $\beta$ -Catenin die Transkription diverser Wnt-Zielgene (Behrens et al. 1996; Molenaar et al. 1996). Unter den vielen Wnt-induzierten Genen wird Axin2 als Bestandteil eines negativen Rückkopplungskreises häufig als Indikator für eine hohe Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs verwendet (Lustig et al. 2002).

## 1.8 Fragestellung

Wie bereits oben beschrieben, stellt die Therapieresistenz von Ösophaguskarzinomen ein erhebliches klinisches Problem dar. Der Identifizierung der zugrundeliegenden Mechanismen und Signalwege kommt daher eine wichtige Bedeutung zu. Wie bereits im Kapitel 1.6 beschrieben, bewirkt der  $\beta$ -Catenin-vermittelte Wnt-Signalweg eine Radiotherapieresistenz beim Rektumkarzinom. Li et al. (2010) berichteten über deutlich erhöhte Genexpressionsspiegel der zentralen Signalwegskomponenten *CTNNB1* und *LEF1* in radiotherapieresistenten Ösophaguskarzinomen (Li HZ et al. 2010).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auch im Ösophaguskarzinom eine mögliche Rolle bei der Vermittlung der Radiotherapieresistenz einnehmen und damit einen potentiellen Angriffspunkt für neue Therapiemethoden darstellen könnte. Für die vorliegende Promotionsarbeit stellen sich folgende Fragen:

- Bewirkt die Modulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs eine Veränderung der Radiochemotherapiesensibilität von Ösophaguskarzinomen?
- Stellt die Inhibierung des Signalwegs eine mögliche Therapieoption zur Überwindung der Therapie-Resistenz beim Ösophaguskarzinom dar?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Brilliant Blau R250 Tabletten	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
CellTiter-Blue® Reagent	Promega, Madison, WI, USA
Essigsäure 100 % Ph. Eur., reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, ROTIPURAN® ≥99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 M, pH = 8,0	Quality Biological Inc., Gaithersburg, MD, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hämalaun, Mayers	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Luminata™ Forte, Western HRP ( <i>horse raddish peroxidase</i> ) Substrate	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Marker, Magic Mark™ XP Western Standard	Invitrogen, Darmstadt
Marker, Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Methanol, ROTIPURAN® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver <i>Blotting grade</i> , Pulver, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natrium Deoxycholat ≥97 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ), reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) ≥99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10 % für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt
Nonidet® P40 (NP40)	AppliChem GmbH, Darmstadt



Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tabletten, PhosSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protease-Inhibitor Cocktail, Protease Block™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Roti® - Quant 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel30 Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 5 M	Merck KGaA, Darmstadt
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
XAV939	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom

## 2.1.2 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial

**Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchs- und Arbeitsmaterial**

Auslaufpipetten, serologisch	STARLAB GmbH, Hamburg
Einfrierröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Einmalreservoirs, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Filterpapier, Chromatography Paper 3MM Chr.	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, United Kingdom
Flüssigkeitsreservoirs, Rotilabo® PVC	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pasteurpipetten, glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitze (10 ml), für Multipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, Safe Seal-Tips® professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen, Tip One®	STARLAB GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen, Tip One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg
Platten, 12-Well, Cellstar®, steril	Greiner Bio-One, Solingen
Platten, 6-Well, Cyto One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg
Platten, 96-Well, Cyto One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg
Platten, 96-Well, HTS Transwell®, steril, schwarz	Corning Inc., Corning, NY, USA
Platten, 96-Well, white, for luminescence	Nunc, Roskilde, Dänemark
Reagiergefäße Biosphere® Safe Seal (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Reagiergefäße (2 ml und 5ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen, Falcon Tube (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Transfermembran, Roti®-PVDF, Filterporengröße 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Untersuchungshandschuhe Nitril® NextGen® (Größe S, M, L, XL)	Rösner, Mautby, Meditrade®, Kiefersfelden
Vakuumsfiltersystem rapid, PES Membrane 0,22 µM, 500 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen Cyto One® (25, 75 und 225 cm <sup>2</sup> )	STARLAB GmbH, Hamburg
Zellkulturflaschen T175, Standard	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellschaber, 300 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellspachtel, 195 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 2.1.3 Zellkulturreagenzien

**Tabelle 6: Verwendete Zellkulturreagenzien**

0,25 % Trypsin -EDTA (1x)	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Bad Stabil Konzentrat	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamine 200 mM in 0,85 % NaCl Solution	Boehringer Ingelheim GmbH & Co.KG, Ingelheim
Nährmedium, F-12 Nutrient Mixture (Ham) (1x)	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Nährmedium, RPMI-1640 Medium	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS), pH 7,2	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
<i>Trypan Blue Solution</i> 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 2.1.4 Geräte

**Tabelle 7: Verwendete Geräte**

Autoklav, HST 32/25	Zirbus technology GmbH, Bad Grund/Harz
---------------------	--

Bestrahlungsgerät, Xstrahl RS225 X-Ray irradiator	Gulmay Medical ltd., Camberley (Surrey), United Kingdom
CCD Kamera, ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden
<i>Colony counter</i> , eCount™	Heathrow Scientific® LLC, Nottingham, United Kingdom
Elektroblotter, semi-dry	Biometra GmbH, Göttingen
Elektroblotter, PerfectBlue™ Semi-Dry	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC professional	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim
<i>Freezing container</i> , 5100 Cryo 1 °C, „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresekammer, Minigel-Twin	Biometra GmbH, Göttingen
Glasplatte, ausgeschnitten, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen
Glasplatte, fixe Spacer, 1,0 mm, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen
Heißluftsterilisator, Heraeus ST6060	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Inkubator CO <sub>2</sub> , Incubator C200	Labotect GmbH, Göttingen
Inkubator, <i>water-jacketed incubator</i> 3250	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
Kämme (10- und 16-zähnig), für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Membranpumpe, Miniport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Mikroskop, invers, Leica DM IL	Leica AG, Wetzlar
Mikroskop, Leica S6 E	Leica AG, Wetzlar
Mikroskopkamera, High-speed Leica EC3	Leica AG, Wetzlar
Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader	Berthold Technologies, Bad Wildbad
<i>Multilabel plate reader</i> , Victor™ X4	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Netzgerät, PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Netzgerät, PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Netzgerät, Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
pH-Meter, PB-11	Sartorius AG, Göttingen
Pipette, elektrisch, 8-Kanal Research pro 50-1200 µl	Eppendorf AG, Hamburg

Pipette, Multipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer, accu-jet® & accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Präzisionswaage, BP 610	Sartorius AG, Göttingen
Präzisionswaage, ED224S	Sartorius AG, Göttingen
Schüttler, MS 3 digital	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Silikonabdichtung, 1,0 mm, für Minigel	Biometra GmbH, Göttingen
Sterilbank, Biowizard Xtra Line	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Sterilbank, SterilGARD Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transfektionsgerät, Nucleofector™ 2b Device	Lonza Cologne GmbH, Köln
Vortex Genie-2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Vortexer, IKA® MS1 Shaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad, GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Water Purification System, Milli-Q Reference Ultrapure	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Wippschüttler, WS42	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg/Versbach
Zählkammer, Neubauer improved	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Zentrifuge, Allegra X-30R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
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

### 2.1.5 Transfektionsreagenzien und Kits

**Tabelle 8: Verwendete Transfektionsreagenzien und Kits**

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

Dual-Luciferase® Reporter Assay System Enthält: Luciferase assay Buffer II, Luciferase assay Substrate, Passive Lysis Buffer 5x, Stop & Glo® Buffer, Stop & Glo® Substrate	Promega, Mannheim, Deutschland
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
X-tremeGENE HP-DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tabelle 9: Verwendete siRNA mit Zielsequenz, Größe und Herstellerangaben

Gen	Zielsequenz	Größe (BP)	Firma
siAllStarsNEG (siNEG)	CAGGGTATCGACGATTACAAA	21	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
siRNA gegen $\beta$ - Catenin #1: <i>CTNNB1_5-</i> <i>SI02662478</i>	CTCGGGATGTTTACAACCGAA	21	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
siRNA gegen $\beta$ - Catenin #2 (pool): <i>CTNNB1-J-</i> <i>003482-09-0002</i>	CAUCCUAGCUAUCGUUCUU	19	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
<i>CTNNB1-J-</i> <i>003482-12-0002</i>	GGUACGAGCUGCUAUGUUC	19	

### 2.1.6 Vektoren und Plasmide

Tabelle 10: Verwendete Vektoren und Plasmide mit Größen- und Herstellerangaben

Vektorbezeichnung	Größe (BP)	Firma
SuperTOPFlash: pTA-Luc	4800	Addgene, Cambridge, MA, USA
SuperFOPFlash: pTA-Luc	4800	
pCl-neo- $\beta$ Catenin S33Y	7803	
pRL-CMV Vector	4079	Promega, Madison, WI USA

## 2.1.7 Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Antikörper mit Verdünnungen und Inkubationsbedingungen

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Protein-gewicht (kDa)</b>	<b>Konzentrat-ion</b>	<b>Inkubations-Bedingungen</b>
<b>Anti-Actin (A2066), polyklonal</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	Kaninchen	42	1:2000 in 5 % Milch-TBST	2 h RT
<b>Anti-Active-β-Catenin (Anti-ABC), clone 8E7, monoklonal</b>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	Maus	92	1:4000 in 5 % Milch-TBST	ü.N. 4 °C
<b>Anti-β-Catenin (Carboxy-Terminal Antigen), polyklonal</b>	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Kaninchen	92	1:2000 in 5 % Milch-TBST	ü.N. 4 °C
<b>Anti-Axin 2 (76G6), monoklonal</b>	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Kaninchen	95,98	1:1000 in 5 % Milch-TBST	ü.N. 4 °C
<b>Anti-TCF7L2 (EP2033Y) (ab76151), monoklonal</b>	Abcam plc., Cambridge, United Kingdom	Kaninchen	68	1:10 000 in 5 % BSA-TBST	ü.N. 4 °C
<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Protein-gewicht (kDa)</b>	<b>Konzentrat-ion</b>	<b>Inkubations-Bedingungen</b>
<b>Polyclonal Antibody to Mouse IgG (H&amp;L) - HRP, R1253HRP</b>	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland	Kaninchen		1:30 000 in 5 % Milch-TBST	2 h RT

<b>Polyclonal Antibody to Rabbit IgG (H&amp;L) - HRP, R1364HRP</b>	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland	Ziege		1:30 000 in 5 % Milch- TBST	2 h RT
--	---	-------	--	-----------------------------------	--------

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Coomassie Fixierlösung für Gele

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

Tabelle 13: Coomassie Färbelösung für Gele

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

Tabelle 14: Coomassie Entfärbelösung für Gele

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

**Tabelle 15: Blockierpuffer für Western Blot Membranen, Lösungspuffer für Antikörper**

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

**Tabelle 16: Lösungspuffer für Antikörper**

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

**Tabelle 17: Nonidet® P40 Zellysepuffer (NP40)**

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

Reagenzien in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) lösen und pH-Wert auf 7,8 einstellen, dann ddH<sub>2</sub>O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 100 ml erreicht ist.

**Tabelle 18: SDS-PAGE Sammelpuffer**

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

Reagenzien in ddH<sub>2</sub>O lösen und pH-Wert auf 6,8 einstellen, dann ddH<sub>2</sub>O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 250 ml erreicht ist.



**Tabelle 19: SDS-PAGE Trenngelpuffer**

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

Reagenzien in ddH<sub>2</sub>O lösen und pH-Wert auf 8,8 einstellen, dann ddH<sub>2</sub>O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 250 ml erreicht ist.

**Tabelle 20: 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
SDS	8 %	0,8 g
Bromphenol Blau	0,4 %	0,04 g
ddH <sub>2</sub> O		0,2 ml

In 1 ml Aliquots bei -20 °C einfrieren.

**Tabelle 21: SDS-PAGE Laufpuffer**

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

Reagenzien in ddH<sub>2</sub>O lösen und pH-Wert auf 8,3 einstellen, dann ddH<sub>2</sub>O hinzufügen, bis das Zielvolumen von 1000 ml erreicht ist.

**Tabelle 22: Western Blot Transferpuffer**

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

Mit ddH<sub>2</sub>O vermischen, bis das Zielvolumen von 1000 ml erreicht ist.

## 2.1.9 Computersoftware

**Tabelle 23: Verwendete Computersoftware**

Grapher™ 8	Golden Software Inc., Golden, CO, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, NY, USA
KaleidaGraph Vers. 4.1.0	Synergy Software, Reading, PA, USA
Adobe Reader XI	Adobe, San Jose, CA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

In dieser Studie wurden 6 humane Ösophaguskarzinom-Zelllinien verwendet. Diese wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen, in den dafür vorgesehenen Medien kultiviert und nach den empfohlenen Protokollen behandelt. Eine genaue Auflistung der Zelllinien sowie ihrer spezifischen Wachstumsbedingungen befindet sich Tabelle 24. Sämtliche Zellkulturarbeit wurde an der Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Arbeitsmaterialien wie Eppendorf-Gefäße, Pasteur-Pipetten, Pipettenspitzen und Kulturgefäße wurden vor Benutzung autoklaviert oder waren steril verpackt. Als Nährmediumzusätze kamen 1 % Glutamin und 10 % FBS zur Anwendung. Letzteres wurde vorher für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Zur Behandlung der Zellen wurden die Medien sowie das PBS im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Das Wachstum der Zellen wurde viermal pro Woche mikroskopisch beurteilt und je nach Konfluenz das Medium gewechselt oder ein Zellsplit durchgeführt.

Für Versuche wurden stets Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet und einem Passagestadium von 4 bis 12.

**Tabelle 24: Verwendete Zelllinien, ihr Ursprung und ihre Wachstumsbedingungen**

Zelllinie	Ursprung	Histologischer Typ	♂/ ♀	Medium	Wachstum	Inkubation	Katalog Nr.
Kyse-150	Oberer Ösophagus	Plattenepithel Karzinom	♀	RPMI-1640 + Ham's F12	adhärent	5 % CO <sub>2</sub> + 37 °C	ACC-375 (DSMZ 2013b)
Kyse-180	Mittlerer Ösophagus	Plattenepithel Karzinom	♂	RPMI-1640	adhärent	5 % CO <sub>2</sub> + 37 °C	ACC-379 (DSMZ 2013a)
FLO-1	Ösophagus	Adenokarzinom	♂	RPMI-1640	adhärent	5 % CO <sub>2</sub> + 37 °C	ACC-698 (DSMZ 2013d)
OAC-P4C	Cardia-Ösophagus	Adenokarzinom	♂	RPMI-1640	adhärent	5 % CO <sub>2</sub> + 37 °C	ACC-704 (DSMZ 2013c)
OE-19	Cardia-Ösophagus	Adenokarzinom	♂	RPMI-1640	adhärent	5 % CO <sub>2</sub> + 37 °C	ACC-700 (DSMZ 2013f)
OE-33	Cardia-Ösophagus	Adenokarzinom	♀	RPMI-1640	adhärent	5 % CO <sub>2</sub> + 37 °C	ACC-706 (DSMZ 2013e)

### 2.2.1.1 Zellsplit

Die Zellen wurden „passagiert“, sobald sie eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten. Dem liegt zu Grunde, dass es bei zu dicht wachsenden Zellen zu Konkurrenz um Wachstums- und Nährstoffe kommt und weiterhin durch Zell-Zell-Interaktionen das Zellwachstum sowie die Morphologie beeinträchtigt werden kann (Lindl 2002).

Zuerst wurden die benötigten Reagenzien PBS, Trypsin-EDTA und das Zellmedium auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um eventuell noch vorhandene Spuren von serumhaltigen Medium zu entfernen, welche die Wirkung von Trypsin beeinträchtigen können (Lindl 2002). Danach wurde das PBS abgesaugt, und die Zellen mit 0,25 % Trypsin-EDTA Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert, um ein Lösen der adhären Zellen zu bewirken. Nun erfolgte die Kontrolle unter einem Zellkulturmikroskop, ob sich die Zellen gelöst hatten. Bei unzureichendem Erfolg wurden die restlichen Zellen durch vorsichtiges Klopfen gelöst. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in Medium und eine Zentrifugation bei 800 U/min für 5 min. Das Zellpellet wurde mit Medium resuspendiert

und ein Teil der Zellen im entsprechenden Splittverhältnis in eine Zellkulturflasche überführt. Diese wurde für maximal drei Passagen verwendet. Nach 15 Wachstumspassagen wurden die Zellen nach unseren laboreinheitlichen Standards nicht mehr für Experimente benutzt und es erfolgte die Entsorgung.

### 2.2.1.2 Mediumwechsel

Werden Zellen in Kultur gehalten, kommt es mit der Zeit aufgrund des zelleigenen Stoffwechsels zu einem Verbrauch der im Medium enthaltenen Nährstoffbestandteile, und es fallen Stoffwechselendprodukte an. Zum Erhalt des Wachstums und der Vitalität der Zellen muss daher regelmäßig ein Mediumwechsel erfolgen (Lindl 2002).

Die in den folgenden Experimenten verwendeten Zelllinien wachsen relativ schnell. Daher erfolgte in der Regel der Mediumwechsel alle zwei Tage. Unter dem Mikroskop wurde deshalb zuvor die Konfluenz, Morphologie und Vitalität der Zellen beurteilt. Nach Erwärmen des Mediums auf 37 °C wurde anschließend das alte Medium abgesaugt und in Abhängigkeit von der verwendeten Flaschengröße frisches Medium hinzugefügt. Eine genaue Auflistung der Flaschengrößen und ihrer dazugehörigen Medienvolumina findet sich in Tabelle 25.

**Tabelle 25: Verwendete Zellkulturgefäße und die dazugehörigen Medium/PBS- und Trypsin-Volumina**

Kulturgefäßgröße (cm <sup>2</sup> )	Medium/PBS Volumen (ml)	0,25 % Trypsin-EDTA Volumen (ml)
0,32 (96WP)	0,1	0,01-0,02
3,8 (12WP)	1	0,1-0,2
9,6 (6WP)	3	0,5
25	5	0,5
75	10	1
175	20	2
225	30	3

### 2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl an Zellen genau zu bestimmen, mussten die adhärennten Zellen zunächst in eine Suspension gebracht werden (siehe Kapitel 2.2.1.1). Die Suspension wurde 1:10 mit einer Trypanblaulösung vermischt, und anschließend wurden 10 µl pro Kammerfenster in eine Neubauerzählkammer gegeben. Das Trypanblau färbt nur tote Zellen an, weil die Membran toter Zellen durchlässig für den Farbstoff ist. So wurde sichergestellt, dass nur lebende Zellen gezählt wurden. Unter 100-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop wurden die Zellen in den 8 Kammern gezählt und daraus das arithmetische Mittel bestimmt, welches multipliziert mit dem Faktor 10<sup>5</sup> die Zellzahl pro Milliliter ergab.

#### **2.2.1.4 Zellen auftauen**

Zur Aufbewahrung und Lagerung wurden die Zelllinien bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt, anschließend mit einer Transferpipette in ein 15 ml Röhrchen mit vorgewärmtem Medium überführt und für 5 min bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das resultierende Zellpellet mit 5 ml Nährmedium vorsichtig resuspendiert und abschließend in eine T25-Zellkulturflasche überführt und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Nach einem Tag erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Zellen auf Morphologie, Vitalität und Konfluenz. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurde entweder ein Mediumwechsel durchgeführt, oder die Zellen in eine T75-Zellkulturflasche überführt.

#### **2.2.1.5 Zellen einfrieren**

Wenn man mit Zellen über einen längeren Zeitraum Experimente durchführt oder sie für einen späteren Zeitpunkt aufbewahren möchte, so gibt es die Möglichkeit der Kryokonservierung. Hierbei werden Zellen in ein DMSO-haltiges Medium eingefroren und können bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf unbestimmte Zeit gelagert werden, weil bei dieser Temperatur keinerlei biochemische Reaktionen mehr stattfinden (Lindl 2002). Das DMSO verhindert dabei die Dehydratation der Zellen sowie die Eiskristallbildung, indem es das Zellwasser bindet (Lindl 2002).

Für die folgenden Experimente wurden für alle verwendeten Zelllinien "Stockkulturen" angelegt, damit immer die gleichen Zellen für die Experimente zur Anwendung kamen. Zunächst wurden die Zellen in Suspension gebracht (siehe 2.2.1.1). Währenddessen wurde das für die jeweilige Zelllinie empfohlene Einfriermedium hergestellt, versetzt mit 20 % FBS, 1 % Glutamin und 10 % DMSO. Nach Absaugen des Überstandes und suspendieren des Zellpellets mit dem Einfriermedium wurde die Zellsuspension in 1 ml Einfrierröhrchen aliquotiert. Verwendet wurden in der Regel T75-Flaschen mit einer Konfluenz von 70-80 %. Anschließend wurden die verschlossenen und beschrifteten Einfrierröhrchen in eine spezielle, vorher mit Isopropanol präparierte Einfrierbox transferiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 24 h gelagert. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer in die  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  Tiefkühltruhe.

Eine Erfolgskontrolle erfolgte nach spätestens 4 Tagen. Hierfür wurden in der Regel 3 verschiedene Zellaliquots wie in 2.2.1.4 beschrieben in Kultur gebracht und über mehrere Tage deren Wachstumsverhalten beobachtet, um eventuelle Veränderungen oder Kontaminationen ausschließen zu können.

## 2.2.2 Beeinflussung der Proteinexpression durch siRNA

Ribonukleinsäure (englisch *RNA* für *ribonucleid acid*) ist ein Polynukleotid, bestehend aus einer Kette von vielen Nukleotiden. In biologischen Zellen ist die RNA an der Umsetzung genetischer Information in Proteine beteiligt (Translation, Transkription, Proteinbiosynthese und dient zur Übertragung von Informationen in Form einer *messenger RNA* (mRNA). Daneben gibt es weitere spezielle RNA-Typen für diverse Regulationsvorgänge einer Zelle.

Grundlage für Experimente mit *small interfering RNA* (siRNA) ist ein natürlicher posttranskriptioneller Regulations- und Schutzmechanismus von Zellen, genannt "RNA Interferenz", der es ihnen ermöglicht ihr Genom vor exogener RNA von (z. B. Viren) zu schützen (Elbashir et al. 2001). Zentrales Element ist das RNase-III Enzym Dicer, das aus einer doppelsträngigen RNA Bruchstücke mit einer Länge von ~20 Basenpaaren ausschneidet. Diese RNA-Fragmente werden als siRNA bezeichnet und sind gekennzeichnet durch einen 2-Nukleotid Überhang am 3'-Ende sowie eine Phosphatgruppe am 5'-Ende. In Zusammenspiel mit dem *RNA induced silencing complex* (RISC) bewirken sie eine Anlagerung und Ausrichtung der komplementären RNA-Sequenzen. Durch Endonukleaseaktivität des RISC wird die gebundene Ziel-messenger-*ribonucleid-acid* (mRNA) daraufhin ungefähr in der Mitte gespalten und die RNA-Fragmente werden abgebaut. Daraus resultiert ein Abbruch der Translation (Caplen und Mousses 2003).

Für die Experimente wurde kommerziell erhältliche siRNA verwendet. Für eine genaue Auflistung der siRNA wird auf Tabelle 9 verwiesen. Drei verschiedene, gegen  $\beta$ -Catenin gerichtete, siRNA kamen zur Anwendung. Als Negativkontrolle wurde eine siRNA (siNeg) ohne bekannte Komplementarität zu einem menschlichen Gen verwendet.

In den folgenden Kapiteln werden zwei Methoden der Transfektion vorgestellt, die einen Transfer der siRNA in die Zielzellen ermöglichen.

### 2.2.2.1 Transfektion durch Elektroporation

Bei der Elektroporation, erstmalig 1984 von Potter et al. beschrieben, wird durch einen kurzen aber starken Stromimpuls die Zellmembran durchlässig und so der Transfer von Desoxyribonukleinsäure (englisch *DNA* für *desoxy ribonucleid acid*) oder RNA in eine Zelle ermöglicht (Potter et al. 1984). Für die Transfektion wurden ausschließlich sterile, DNase- und RNase-freie Pipettenspitzen, Reagenzgefäße sowie das *Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V* und das Transfektionsgerät, *Nucleofector™ 2b Device* von Lonza sowie das vorinstallierte Programm T-30 verwendet. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank verrichtet.

Zunächst wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben in Suspension gebracht, eingezählt und  $1 \times 10^6$  Zellen auf ein 50 ml Röhrchen aufgeteilt und bei 700 U/min für 5 min zentrifugiert. Währenddessen wurden in separaten 1,5 ml Reagiergefäßen 1,25  $\mu$ l

siRNA vorgelegt und ein 1,5 ml Reagiergefäß mit 1 ml RPMI-1640 Medium darin auf 37 °C vorgewärmt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet vorsichtig mit 100 µl *Nucleofector® Solution* vermischt und blasenfrei in die Elektroporationsküvette überführt. Daraufhin wurde das T-30 Programm initiiert und nach Abschluss die transfizierten Zellen vorsichtig, ohne den an der Oberfläche schwimmenden Zelldetritus aufzunehmen, mit einer Transferpipette in das vorgewärmte RPMI-1640 Medium gegeben und für 15 min bei 37 °C ruhen gelassen. Dadurch konnten die Zellen ihre Poren wieder verschließen und somit erhöhte sich die Zellviabilität (Gehl 2003). Anschließend konnten die Zellen für weitere Experimente verwendet werden oder es erfolgte die Aussaat auf eine T-25 Flasche und Inkubation im Brutschrank.

Im Rahmen der Elektroporation wurde stets darauf geachtet, dass die Zeitgrenze von 15 min für den Kontakt zwischen der *Nucleofector® Solution* und den Zellen eingehalten wurde, damit die Zellen möglichst wenig geschädigt werden (Lonza 2008).

#### **2.2.2.2 Transfektion mit Lipid**

Kernelement der *lipofection* sind die kationischen Liposomen. Das Lipid bildet durch seine positiven Ladungen mit den negativ geladenen Phosphatresten der RNA einen Lipid-RNA-Komplex. Durch die überwiegend positive Ladung des Komplexes kann dieser mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren und so die siRNA in das Zytoplasma abgeben werden (Felgner et al. 1987). Für diese Experimente wurden DNase- und RNase-freie Pipettenspitzen und Reagiergefäße verwendet wurden. Alle Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank.

Im Folgenden wird die Methode der reversen Transfektion anhand eines Versuchs beispielhaft erklärt. Zunächst wurden das Lipid (*Lipofectamine® RNAiMAX Reagent*) und die diversen siRNA's in separaten Reagiergefäßen mit auf 37 °C vorgewärmtem, serumfreiem Medium verdünnt, da das Serum die Komplexbildung stört und auch vom Hersteller serumfreies Medium empfohlen wird (Life-technologies-Invitrogen 2013). Für die Komplexbildung wurden das siRNA-Medium und das Lipid-Medium in eine 6-Well-Titerplatte pipettiert, sodass sich am Ende 12 µl Lipid und 7,2 µl siRNA in jedem Well befanden. Dies entsprach einer siRNA Konzentration von 10 nM pro Well. Anschließend wurden die Zellen in Suspension gebracht (siehe 2.2.1.1), eingezählt und mit 20 % FBS-haltigen Medium versetzt, damit die finale Konzentration wieder 10 % ergab. Nach 15 min Inkubationszeit für die Komplexbildung erfolgte der Transfer von  $9 \times 10^4$  Zellen pro Well (Life-technologies-Invitrogen 2013). Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert und konnten dann für weitere Experimente verwendet werden.

### 2.2.2.3 Vorversuche mit si $\beta$ -Catenin

Insgesamt kamen drei verschiedene siRNA mit unterschiedlichen Zielsequenzen gegen die kodierende mRNA für  $\beta$ -Catenin zur Anwendung: die singuläre siRNA gegen  $\beta$ -Catenin bezeichnet als si#1 sowie die Kombination von zwei siRNAs gegen  $\beta$ -Catenin in einem *pool*, als si#2 bezeichnet (siehe Tabelle 9). Die bereits erwähnte siNeg diente als Negativkontrolle. Hintergrund der Kombination waren die Erkenntnisse von Jackson et al. (2003), dass eine siRNA neben dem gewünschten Zieltranskript auch noch an andere mRNAs, deren Sequenz zu der eigentlichen Ziel-mRNA sehr ähnlich ist, binden und deren Expression supprimieren kann. Diese Effekte werden als *Off-target*-Effekte bezeichnet (Jackson et al. 2003). Die Kombination von zwei siRNA in einem *pool* erhöht einerseits die Spezifität, dass das gewünschte Protein nicht transkribiert wird und reduziert durch "Verdünnung" der siRNA *Off-target*-Effekte.

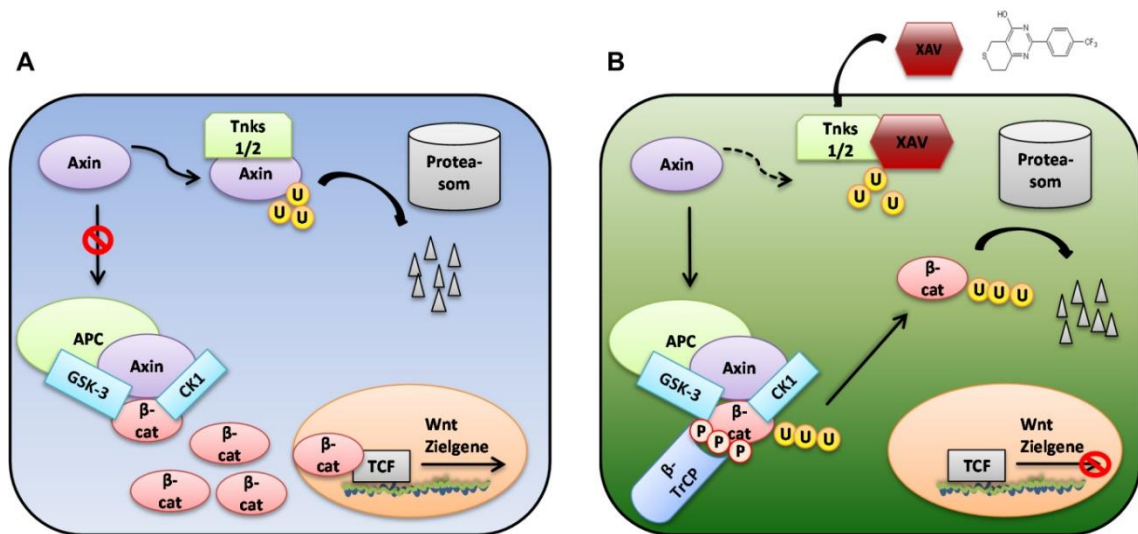
Aufgrund des individuellen Zellmetabolismus und Wachstumsverhaltens jeder Zelllinie und der Tatsache, dass es sich um eine transiente Transfektion handelt, galt es zunächst den optimalen Zeitpunkt für einen erfolgreichen *Knockdown* zu finden. Dafür wurden die Zellen wie in 2.2.2.1 beschrieben transfiziert, in 6-Well-Titerplatten gesetzt und bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellernte von Kyse-150, Kyse-180, OE-19 und OE-33 nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Bei den etwas langsamer wachsenden FLO-1 und OAC-P4C wurden die Zellen erst nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h isoliert. Anschließend wurden die Proteine nach Quantifizierung in einem Immunoblot gegen Aktin, Axin2, aktives  $\beta$ -Catenin und gesamtes  $\beta$ -Catenin gefärbt. Die Ergebnisse sind in 3.2 dargestellt. Um eine mögliche Beeinträchtigung des Zellmetabolismus seitens der siRNA ausschließen zu können, wurden wie im Kapitel 2.2.4.1 beschrieben Zellviabilitätsassays durchgeführt.

### 2.2.3 XAV939

XAV939, ein kleinmolekularer Inhibitor von Tankyrasen, bietet im Vergleich zu den Experimenten mit siRNA einen möglichen Ansatz für eine zukünftige klinische Anwendung (Huang et al. 2009). Die Hauptwirkung dieses Inhibitors besteht in der Stabilisation von Axin2. Dies geschieht über eine Hemmung der zellständigen Tankyrasen 1 und 2, die unter Normalbedingungen Axin2 dem Ubiquitin-vermittelten Abbau zuführen würden (Huang et al. 2009). Axin2 wird eine zentrale Rolle im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zugeschrieben (Lustig et al. 2002). Es ist Schlüsselbestandteil des  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplexes und bewirkt als dosislimitierender Faktor in Kombination mit APC, GSK3 $\beta$ , CK1, PP2A und  $\beta$ -TrCP die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und den damit verbunden proteasomalen Abbau desselben (Nakamura et al. 1998; Salic et al. 2000; Stamos und Weis 2013). Die durch XAV939 induzierte, erhöhte Axin2-Konzentration und der damit verbundene verstärkte Abbau von  $\beta$ -Catenin bewirken eine Unterbrechung der Signalkaskade im Wnt/ $\beta$ -Signalweg. Abbildung 3 zeigt



eine schematische Übersicht des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und Darstellung des XAV939-Wirkmechanismus.



**Abbildung 3: Schematische Übersicht des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und Darstellung des XAV939 Wirkungsmechanismus mit Strukturformel von XAV939 (Tocris 2012).**

**A)** Normaler Ablauf in einer Zelle. Die Tankyrasen bewirken über eine Ubiquitinylierung von Axin dessen proteosomale Degradierung. Das freie und aktive  $\beta$ -Catenin kann in den Kern translozieren und induziert dort eine Signaltransduktion über Interaktion mit TCF. **B)** Nach Zugabe von XAV939 kommt es zu einer XAV939-vermittelten Inhibition der Tankyrasen 1/2 und dadurch zu einer Stabilisierung von Axin. Der Destruktionskomplex bestehend aus APC, Axin, CK1, GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -TrCP phosphoryliert  $\beta$ -Catenin, dass dann der proteosomalen Degradation zugeführt wird (frei nach (Huang *et al.* 2009; Nakamura *et al.* 1998)).

### 2.2.3.1 Vorversuche mit XAV939

Um eine optimale Dosis und den Zeitpunkt der maximalen Wirkung des Inhibitors zu evaluieren wurden mittels Immunoblot die Veränderungen der Proteinkonzentrationen von Axin2 und  $\beta$ -Catenin nach Zugabe des Inhibitors bestimmt. Aufgrund des in 2.2.3 beschriebenen Wirkmechanismus wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem Axin2 vermehrt exprimiert wurde und/oder  $\beta$ -Catenin vermindert nachzuweisen war. Dabei galt die Devise: Minimale Dosis mit maximalem Effekt, da der in DMSO gelöste Tankyraseninhibitor XAV939 in höheren Dosen die Zellviabilität beeinträchtigen kann (Afifi *et al.* 2014).

Zur genaueren Untersuchung der Auswirkungen von XAV939 auf den Zellmetabolismus wurden Zellviabilitätsassays durchgeführt. Weitere Erläuterungen dazu sind in Kapitel 2.2.4.2 aufgeführt.

Als Ausgang diente eine 10 mM Stock-Konzentration, die auf 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Als Lösungsmittel wurde DMSO verwendet (Tocris 2012). Die Stock-Lösungen konnten separat für die Experimente verwendet werden und wurden nach Benutzung entsorgt, um einem möglichen Wirkungsverlust von

XAV939, der durch mehrmalige Auftau- und Einfrierzyklen eintreten könnte, entgegenzuwirken.

Die XAV939-Konzentrationen für die verschiedenen Zelllinien wurden in Anlehnung an bereits erfolgte Experimente in unserem Labor variiert (Reineke 2015). Dementsprechend erfolgten Konzentrationsreihen von 1-15  $\mu\text{M}$  XAV939 bei einer Inkubationszeit von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h und 144 h. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel von XAV939, DMSO. Insgesamt gab es 6 verschiedene Konditionen. Für jeden Zeitpunkt wurde eine 6-Well-Titerplatte verwendet, in welche die Inhibitor- bzw. DMSO-haltigen Medien und die Zellen pipettiert wurden. Die Zellzahlen variierten pro Zelllinie und Zeitpunkt. Für Kyse-150 und Kyse-180 wurden  $2 \times 10^5$  Zellen für den 24 h und 48 h Zeitpunkt gesetzt. Für 72 h, 96 h und 120 h wurden  $1 \times 10^5$  Zellen gesetzt und für 144 h  $7,5 \times 10^4$  Zellen. Bei OAC-P4C und FLO-1 wurden zum 24 h Zeitpunkt jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Für die restlichen Zeitpunkte wurden identisch viele Zellmengen verwendet wie bei Kyse-150 und Kyse-180. Bei der Zelllinie OE-19 wurden bei 24 h  $3 \times 10^5$  Zellen gesetzt, bei 48 h und 72 h jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen, zum 96 h Zeitpunkt  $1 \times 10^5$  Zellen und bei 120 h und 144 h jeweils  $7,5 \times 10^4$  Zellen pro Well.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen isoliert. Anschließend erfolgten die *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese* (SDS-PAGE), ein Westernblot und eine Immunmarkierung der Proteine gegen Aktin, aktives  $\beta$ -Catenin, total  $\beta$ -Catenin und gegen Axin2. Die Ergebnisse sind ab Kapitel 3.4 aufgeführt.

#### 2.2.4 Zellviabilitätsassay

Um auszuschließen, dass es durch siRNA oder XAV939 zu ungewollten, antiproliferativen Effekten kommt, wurde die Zellviabilität nach Transfektion bestimmt. Hierfür kam der *CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay* (Firma: Promega) zur Anwendung. Dieser enthält Resazurin, ein dunkelblauer Farbstoff, der ein geringes Fluoreszenz-Potenzial aufweist. Durch vitale und metabolisch aktive Zellen wird Resazurin irreversibel in seine pinke und stark fluoreszierende Form, genannt Resorufin, verstoffwechselt. Das dadurch entstehende Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und kann fluorometrisch erfasst werden (Riss und Moravec 2003). Um die Interferenz der Fluoreszenz-Signale zwischen den Proben so gering wie möglich zu halten, kamen ausschließlich schwarze 96-Well-Titerplatten mit durchsichtigem Boden zur Anwendung. Es wurde stets darauf geachtet, das *CellTiter-Blue<sup>®</sup>* Reagenz nicht zu lange Lichteinflüssen auszusetzen (Riss und Moravec 2003). Alle Versuche wurden in technischen Triplikaten und biologischen Replikaten ( $n \geq 3$ ) durchgeführt.

#### 2.2.4.1 Zellviabilitätsassay mit siRNA

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit kam die in Kapitel 2.2.2.2 beschriebene *lipofection* als Transfektionsmethode der Wahl zum Einsatz. Hierfür wurden die Zellen zuerst geerntet und eingezählt (siehe Kapitel 2.2.1.1). Währenddessen wurden die erforderlichen Mengen an Lipid und siRNA wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben vorbereitet. Anschließend wurden auf einer 96-Well-Titerplatte für jede Zelllinie 3000 Zellen á 50 µl pro Well ausgesetzt und auf der 6-Well-Titerplatte zur Proteinisolation je nach Zelllinie zwischen  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^5$  Zellen. Die Außenwells wurden mit jeweils 100 µl Medium pro Well befüllt und dienten neben dem Verdunstungsschutz auch zur Berechnung der Eigenfluoreszenz des Mediums. Anschließend wurden die 96-Well-Titerplatten mit den verschiedenen Zelllinien bei 37 °C für die jeweils notwendige Dauer inkubiert und danach der Messung zugeführt. Analog dazu wurde das Protein wie in 2.2.6.1 beschrieben aus der 6-Well-Titerplatte isoliert und in einem Western Blot visualisiert. Für die Messung wurde das CellTiter-Blue<sup>®</sup> Reagenz pro Well im Verhältnis 1:5 pipettiert und die Platte erneut für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des Fluoreszenzsignals bei einer Wellenlänge zwischen 560/590 nm in einem Multititerplattenlesegerät (*Victor X4 Light Multilabel Reader*). Die Berechnung der Fluoreszenz-Werte erfolgte so: Zunächst wurde aus dem Signal der Wells mit Zellkulturmedium ein Durchschnittswert ermittelt. Dieser Hintergrundwert (Eigenfluoreszenz des Mediums) wurde von allen Proben abgezogen. Aus den, in Triplikaten gesetzten, Proben wurden die jeweiligen Mittelwerte berechnet. Diese wurden ins Verhältnis zu dem Referenzwert siNeg gesetzt. Die unbehandelte Reihe und die Lipid Reihe dienten als zusätzliche Negativkontrollen. Die beiden siRNA's siPLK und siCell Death wurden als Positivkontrollen mitgeführt, da sie zytotoxisch wirken und dadurch einen Abfall der gemessenen Zellviabilität bedingen.

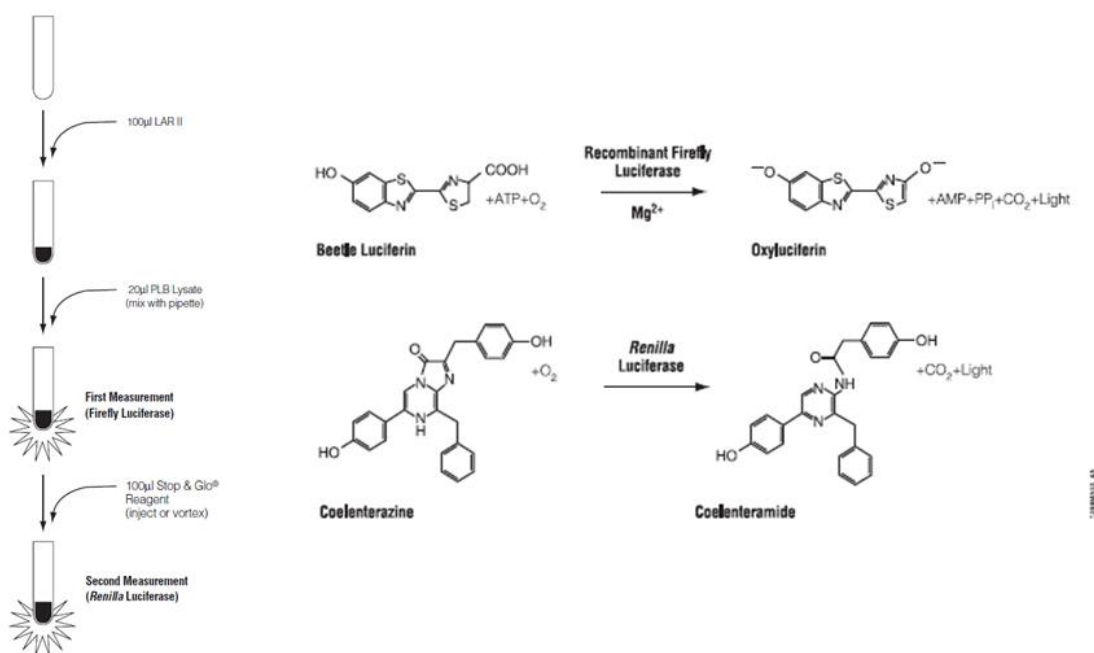
#### 2.2.4.2 Zellviabilitätsassay mit XAV939

Zunächst wurde der XAV939 10 mM Stock seriell auf verschiedene 1,5 ml Reagiergefäße verdünnt, sodass am Ende eine Konzentrationsreihe mit doppelter Konzentration von 0,2 µM bis 80 µM XAV939 resultierte. Anschließend wurde die zu analysierende Zelllinie wie unter Punkt 2.2.1.1 beschrieben gesplittet, eingezählt und auf eine Zellzahl zwischen 500 – 2000 Zellen pro Well eingestellt. Von den verschiedenen XAV939-Konzentrationen wurden 50 µl pro Well in technischen Triplikaten pipettiert. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle eine Reihe mit dem Lösungsmittel DMSO pipettiert. Nach Vorlegen des Inhibitors wurden 50 µl der, vorher für jede Linie berechneten, Zellsuspension pro Well pipettiert. Die Außenwells wurden mit jeweils 100 µl Medium pro Well befüllt und dienten neben dem Verdunstungsschutz auch zur Berechnung der Eigenfluoreszenz des Mediums. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit von 96 h,

120 h oder 144 h bei 37 °C, erfolgte die Messung und Auswertung wie oben in 2.2.4.1 beschrieben.

### 2.2.5 Dual-Luciferase-Reporter-Assay

Der *Dual-Luciferase-Reporter-Assay* ist eine effiziente und sensitive Methode, um unter anderem die Genexpression oder physiologische Vorgänge in eukaryotischen Zellen zu beurteilen. Kernelemente sind die Firefly- (*Photinus pyralis*) und Renilla- (*Renilla reniformis*) Luciferasen, deren Lumineszenzsignal als ein Maß für die Aktivität der zu untersuchenden Signalwege dient (Promega 2011). Die biochemischen Vorgänge sind in Abbildung 4 illustriert.



**Abbildung 4: Reaktionsschema Dual Luciferase Reporter Assay.**

Alle Messungen, sowie die Zugabe des *Stop & Glo® Reagenz*, erfolgten mit dem *Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader*. Nach Lyse der Zellen mit dem *passive Lysis Buffer* und Zugabe von *Luciferase assay reagent II* (LAR II) wird das entstehende Lumineszenzsignal erfasst. Die Injektion von *Stop & Glo® Reagenz* unterdrückt die Lumineszenz der Firefly Luciferase und katalysiert konkomitant die Reaktion der Renilla Luciferase. Das neu entstehende Lumineszenz Signal wird daraufhin gemessen. (adaptiert nach (Promega 2011)).

Zur Untersuchung der Wnt-Aktivität der verwendeten Zelllinien wurde der TOPFlash/FOPFlash Reporter Assay verwendet. Der TOPFlash Vektor hat 6 TCF/LEF-Bindestellen, die mit einem Promotor für die Luciferaseexpression gekoppelt ist. Bei dem FOPFlash Vektor sind diese 6 Bindestellen mutiert, sodass keine Interaktion möglich ist. Daher dient der FOPFlash Vektor als Negativkontrolle. Ist der Wnt/β-Catenin-Signalweg in Zellen aktiv, interagiert TCF/LEF mit den Bindestellen des Vektors und Firefly

Luciferase wird exprimiert (Staal et al. 2002). Das entstehende Lumineszenz-Signal ist damit ein direktes Maß für die Wnt-Aktivität von Zellen.

Neben der Beurteilung der basalen Wnt-Aktivität einer Zelllinie kann auch die Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs gemessen werden. Hierfür wurden die Zellen neben den *TOPFlash*/*FOPFlash* Vektoren noch zusätzlich mit dem Vektor  $\beta$ -Catenin-S33Y transfiziert, der für eine mutierte und permanent aktive Form von  $\beta$ -Catenin codiert. Durch die S33Y-Mutation wird die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin am Serin-33 Rest durch *GSK3 $\beta$*  verhindert und somit kann die Ubiquitinierung und Degradation nicht stattfinden (Sun et al. 2000).

Es wurden alle Zellen neben den eben genannten Vektoren noch zusätzlich mit dem pRL-CMV *Renilla* Vektor kotransfiziert. Dieser enthält eine Luciferase, die konstitutiv und unabhängig vom Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg exprimiert wird. Daher dient die *Renilla* Luciferase der Normalisierung und kann als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz und Zellviabilität herangezogen werden (Sherf et al. 1996).

Für die Transfektion der Vektoren wurden Zellen mit einer Zelllinien-spezifischen Zellzahl (Kyse-180, FLO-1, OE-19, OAC-P4C:  $1 \times 10^5$  Zellen; Kyse-150, OE-33:  $1,5 \times 10^5$  Zellen) auf eine 12-Well-Titerplatte ausgesetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion per Lipid (*X-tremeGENE HP-DNA Transfection Reagent*) mit dem *TOPFlash* Plasmid oder dem *FOPFlash* Plasmid (1000 ng: FLO-1, OAC-P4C, Kyse-150; 500 ng: OE-33; 250 ng: OE-19, Kyse-180). Das Lipid zu DNA-Plasmid Verhältnis betrug 1:1 (OE-19: 1:2). Um die Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zu testen wurden die Zellen neben den *TOPFlash* und *FOPFlash* Vektoren noch zusätzlich mit jeweils 250–1000 ng von dem mutierten  $\beta$ -Catenin Vektor (pCl-neo- $\beta$ -Catenin S33Y) transfiziert. Zusätzlich erfolgte die Kotransfektion aller Proben mit 12,5–50 ng des *Renilla* Luciferase Plasmids (pRL-CMV). Es folgte eine weitere Inkubation im Brutschrank für 24 h, um die Luciferase-Expression zu ermöglichen. Anschließend wurde das Protein unter Zugabe des *passive lysis buffers* gewonnen. Hierfür wurden die Zellen zuerst mit 4 °C kaltem PBS gewaschen, der Überstand abgesaugt und anschließend 100–150  $\mu$ l des, vorher mit sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünntem, *passive lysis buffers*, in jedes Well gegeben. Das so gewonnene Lysat wurde nun für zwei Zyklen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die dabei entstehenden Scherkräfte durch Eiskristallbildung sorgen in Kombination mit dem *passive lysis buffer* für eine schnelle Lyse der Zellbestandteile. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren und konnten in den nächsten zwei Wochen für Messungen verwendet werden. Nach Aufbereitung der Proben wurden 100  $\mu$ l des LAR II (*Luciferase assay Reagent II*) in die Wells einer weißen 96-Well-Titerplatte vorgelegt und anschließend 20  $\mu$ l der zu untersuchenden Probe hinzugegeben. Zusätzlich wurde das *Stop & Glo® Reagenz* frisch angesetzt. Es erfolgte die Messung in einem Mithras LB 940 Microplate Reader mit Injektionssystem. Zuerst wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase erfasst. Nach

Injektion des *Stop & Glo® Reagenz* (enthält unter anderem Coelenterazine, das Substrat der *Renilla*-Luciferase) erfolgte die Messung des Lumineszenzsignals der *Renilla* Luciferase. Von allen gemessenen Werten wurde das Hintergrundsignal des LAR II subtrahiert und es erfolgte eine Normalisierung der *Firefly*-Aktivität gegenüber der *Renilla*-Aktivität. Die TCF/LEF-Aktivität wurde durch das Verhältnis von *TOPFlash* zu *FOPFlash* berechnet. Zur Beurteilung der Aktivierbarkeit wurde das Verhältnis zwischen *TOPFlash*/*FOPFlash* mit und ohne mutiertem  $\beta$ -Catenin berechnet. Alle Experimente wurden unabhängig voneinander mindestens drei Mal (Biologische Replikate) mit je drei technischen Replikaten durchgeführt.

## 2.2.6 Proteinchemische und immunologische Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden Methoden vorgestellt die es ermöglichen, Proteine semiquantitativ photometrisch zu bestimmen, sie nach Größe aufzutrennen und anschließend gezielt durch Antikörpermarkierung zu visualisieren.

### 2.2.6.1 Präparation der Proteine und quantitative Proteinbestimmung

Für alle Proteinisolationen wurde der NP40-Lysepuffer verwendet. Eine genaue Zusammensetzung findet sich im Kapitel 2.1.8. Vor jeder Isolation wurde eine kalkulierte Menge des NP40-Lysepuffer entnommen und ihm zusätzlich DTT und PhosSTOP im Verhältnis 1:10 zugesetzt und Proteinaseinhibitorcocktail im Verhältnis 1:100. Dadurch wird durch letztere Substanzen verhindert, dass die Proteine durch zellständige Phosphatasen und Proteasen abgebaut werden. Weiterhin bewirkt DTT eine Schwächung der Tertiärstruktur von Proteinen, indem es die Disulfidbrücken reduziert und verhindert, dass sich diese erneut zwischen Cystinresten ausbilden können (Cleland 1964). Dies ist wichtig, damit die Proteine in ihrem denaturierten Zustand bleiben und sich später entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld verteilen.

Zunächst galt es die Zellen für die Proteingewinnung vorzubereiten. Es wurden dafür zwei verschiedene Methoden angewandt. Bei der ersten Methode wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben in Suspension gebracht und bei 5 min für 800 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das resultierende Pellet mit 1 ml PBS gewaschen, in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und für 5 min bei 2000 U/min erneut zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes konnte das Pellet mit dem NP40-Lysepuffer lysiert werden.

Die zweite Methode wurde zur Proteinisolation aus adhären in 6-Well-Titerplatten wachsenden Zellen angewandt: Zuerst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Nachfolgend wurde je nach Zellmenge 100-200  $\mu$ l NP40-Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach 5 min Einwirkzeit wurden die Zellen mechanisch mittels Zellschaber gelöst und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Nach Zugabe des Lysepuffers zu dem Zellpellet wurde die Suspension für ca. 45 min auf Eis

inkubiert, anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C für 10 min bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit den darin gelösten Proteinen in ein 1,5 ml Reagiergefäß transferiert. Das resultierende Pellet aus Zelldetritus wurde verworfen. Die gewonnene Proteinsuspension konnte nun bei -80 °C gelagert werden oder direkt für die quantitative Proteinbestimmung herangezogen werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Verfahren nach Bradford angewandt (Bradford 1976). Wichtigster Bestandteil ist der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau, der durch Interaktion mit Proteinen von seiner kationischen Form in eine anionische Form übergeht. Grund hierfür ist die Farbstoffproteinbildung der basischen Seitenketten von den Aminosäuren mit dem Farbstoff. Dadurch resultiert eine Änderung des Absorptionsmaximums von 365 nm auf 595 nm (Bradford 1976), visuell sieht man einen Farbumschlag von Rot nach Blau. Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaft des Farbstoffs mit basischen Seitenketten zu reagieren und dem Fakt, dass diverse Proteine einen unterschiedlich hohen Anteil an basischen Aminosäuren aufweisen, ist es nötig die Konzentrationen an einer Standardkurve zu kalibrieren. Hierfür wurden BSA-Konzentrationen von 0-100 µg/ml als Triplikate von je 50 µl auf eine 96-Well-Titerplatte pipettiert, die als Standard dienen. Analog wurden Triplikate von Verdünnungen (1:50 – 1:200) der zu untersuchenden Proteinproben pipettiert. Darauf folgend wurden 200 µl des Roti-Quant-Reagenz von Sigma in jedes Well hinzugegeben und das Ganze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei 595 nm in einem *Victor X4 Light Multilabel Reader*. Nach Bestimmung der BSA-Standardgeraden konnte anhand dieser die Proteinkonzentration, der zu untersuchenden Proben, berechnet werden.

Bevor die Proben für die SDS-Page verwendet werden konnten, mussten die Proteine zuerst denaturiert werden. Dafür wurden die Proben mit einem SDS-Ladepuffer im Verhältnis 1:4 versetzt (1 Teil Ladepuffer und 3 Teile Protein). Das SDS, ein anionisches Detergens, spaltet nichtkovalente Bindungen in der Tertiärstruktur von Proteinen und denaturiert diese. Zusätzlich bringt es die Proteine analog ihres Molekulargewichts in einen negativen Ladezustand. Das im Ladepuffer enthaltene Mercaptoethanol bewirkt eine Spaltung von Disulfidbrücken in den Proteinen. Bromphenolblau wird als Farbstoff zur Markierung genommen. Nach Zugabe des Ladepuffers wurden die Proteinproben für 5 min bei 95 °C erhitzt, wodurch der Denaturierungsprozess komplettiert wurde. Anschließend wurden die Proteine für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) weiterverwendet.

### 2.2.6.2 SDS PAGE

Das angewandte Verfahren der diskontinuierlichen SDS-PAGE dient dazu, Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die Diskontinuität beschreibt einerseits die

unterschiedlichen pH-Werte zwischen den Gelpuffern und dem Laufpuffer, andererseits die Diskrepanz der Porengrößen zwischen Trenn- und Sammelgel. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung an die Gelelektrophoresekammer wandern die, durch SDS negativ geladenen Proteine, von der Kathode zur Anode. Dabei ist die Geschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld abhängig von ihrem Molekulargewicht. Eine Auflistung der zu untersuchenden Proteine und ihrer Molekulargewichte findet sich in untenstehender Tabelle 26.

**Tabelle 26: Zielproteine mit zugehörigen Molekulargewichten in kD**

Protein	Molekulargewicht in kD
Aktin	42
TCF7L2	68
Active- $\beta$ -Catenin	92
Total- $\beta$ -Catenin	92
Axin2	95, 98

Entsprechend der zu erfassenden Molekulargewichte und aus Erfahrungen von vorherigen Experimenten wurde ein 10 % Gel gewählt. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist der Tabelle 27 zu entnehmen.

**Tabelle 27: Rezept für 2 Minigele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel.**

Um die Beladung des Gels zu erleichtern, kann optional 50  $\mu$ l einer Bromphenolblau-Lösung hinzugefügt werden.

Reagenzien	Trenngel 10 %, 20 ml	Sammelgel 5 %, 5 ml
ddH <sub>2</sub> O	7,9 ml	3,4 ml
Rotiphorese® Gel30	6,7 ml	0,83 ml
Puffer	Trenngelpuffer (1,5M Tris, pH = 8,8) 5 ml	Sammelgelpuffer (1 M Tris, pH =6,8) 0,63 ml
SDS-Lösung 10 %	200 $\mu$ l	50 $\mu$ l
APS 10 %	200 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Alle Gele wurden selbst gegossen. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt, indem ddH<sub>2</sub>O, Rotiphorese, Puffer und die SDS-Lösung unter Rühren vermischt wurden. Zum Schluss wurden APS und TEMED hinzugegeben. APS bewirkte dabei eine Aktivierung der



Polymerisierung des Acrylamids und TEMED beschleunigte diesen Prozess noch weiter. Anschließend wurde die Mischung zwischen zwei Glasplatten gegossen und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert, damit das Gel polymerisierte. Währenddessen wurde analog zur Herstellung des Trenngels das Sammelgel angesetzt, mit 50 µl Bromphenolblau als Zusatz, um das Beladen des Gels später zu erleichtern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Sammelgel über das Trenngel gegossen und Kämme zwischen die Glasplatten gesteckt, um Beladungstaschen zu schaffen. Es erfolgte die Inkubation für weitere 30 min bei Raumtemperatur. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und der Laufpuffer hinzugegeben. Daraufhin wurden die Kämme entfernt, die entstandenen Taschen mit Laufpuffer gespült und mit 10-20 µg Protein beladen. Als Standard-Marker zur Einordnung der Proteingrößen diente der *Broad Range Marker*. Pro Gel wurde eine Spannung von 20 mA angelegt. Der Prozess der Gelelektrophorese wurde beendet, wenn die rote *Broad Range Marker* Bande (Höhe ca. 40 kD) sich ungefähr 1 cm vor dem Ende des Gels befand.

### 2.2.6.3 Westernblot

Durch das sogenannte Westernblot-Verfahren werden die vorher in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert und immobilisiert. Anschließend können die Proteine durch Immundetektion (siehe 2.2.6.4) visualisiert werden (Towbin et al. 1979). Durch Erzeugen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode. Deshalb wurde die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode ausgerichtet.

Es wurde das Verfahren des semi-dry Blots angewandt. Hierzu wurde zuerst die PVDF-Membran, durch Waschen in 100 % Methanol für 10 Sekunden, aktiviert, anschließend für 5 min in ddH<sub>2</sub>O inkubiert und daraufhin für 15 min im Transferpuffer ruhen gelassen. Die Gele wurden vorsichtig von den Glasplatten mit einem angefeuchteten Spatel abgelöst und ebenfalls für 15 min im Transferpuffer gelagert. Analog wurde mit den Filterpapieren verfahren. Anschließend wurden drei Filterpapiere über der Anode platziert und die PVDF-Membran darübergerlegt. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und abschließend mit drei Filterpapieren zu der im Deckel sich befindenden Kathode hin bedeckt. Mit einer Rolle wurden Luftblasen sowie überschüssige Flüssigkeit aus den Filterpapieren gepresst. Der Proteintransfer erfolgte mit 100 mA pro Gel bei variabler Spannung für 1 h.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran für 5 min in TBS gewaschen. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen von Antikörpern an der Membran, erfolgte eine Schwenkinkubation in Milch-TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur (Johnson et al. 1984). Das Gel wurde in eine Fixierlösung transferiert, für 30 min inkubiert und anschließend mit einer Coomassie-Lösung über Nacht gefärbt. Am nächstens Tag erfolgten zwei

Waschgänge erneut mit Fixierlösung für je 15 min und abschließend der Transfer des Gels in eine Entfärbelösung. In der Regel stellten sich nach 1 Stunde deutliche Banden auf dem Gel dar, die als Überreste von zurückgebliebenem Protein interpretiert werden konnten und als Ladekontrolle dienten.

#### 2.2.6.4 Immundetektion der Proteine

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen gibt es die Möglichkeit der Immundetektion. Hierfür werden Antikörper verwendet, die mit ihren Fab-Teilen an die Antigene des gesuchten Proteins binden. Diese werden als Primärantikörper bezeichnet und stammen aus Wirtstieren, die mit Epitopen des Proteins infiziert wurden. Die Sekundärantikörper stammen aus einem anderen Wirt als die Primärantikörper und binden daher mit ihren Fab-Segmenten gegen die wirtsspezifische Fc-Region der Primärantikörper. Zusätzlich sind die Sekundärantikörper mit einer Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase konjugiert (Gallagher et al. 2008). Nach erfolgtem Blockiervorgang wurden die Membranen erneut in TBS transferiert und unter einem Flüssigkeitsfilm auf einem Metallblock in Streifen geschnitten, um mehrere Proteine zur gleichen Zeit zu detektieren. Als Orientierungshilfe diente dabei der *Broad Range Marker*. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranstreifen mit dem Primärantikörper, entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Eine detaillierte Auflistung der Antikörper mitsamt den Inkubationsbedingungen und Verdünnungen ist der Tabelle 11 zu entnehmen.

Nach der Entfernung der Primärantikörper wurde die Membran 3x für 5 min mit TBS-T gewaschen, um überflüssige und nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für weitere 2 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran wieder 3x für 5 min mit TBS-T gewaschen und danach in TBS zwischengelagert.

Zur Sichtbarmachung der durch die Antigen-Antikörperkomplexe markierten Proteine wurde Chemilumineszenz genutzt, bei der durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlung in Form von Licht emittiert wird. Dieses Licht wurde mit Hilfe einer CCD-Kamera (LAS 4000) detektiert. Als Substrat für die chemische Reaktion diente das *Luminata™ Forte Western HRP Substrate*. Hiervon wurde auf den zu untersuchenden Membranstreifen 200 µl der Substratlösung pipettiert, mit einer Plastikfolie blasenfrei bedeckt und anschließend das emittierte Lichtsignal mit Hilfe der Kamera detektiert wird. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung in der Gelelektrophorese diente Aktin, das als Strukturprotein in allen Zellen ubiquitär exprimiert wird.

Um Proteine ähnlicher Größe auf einer Membran detektieren zu können, müssen gebundene Antikörper von der Membran entfernt werden. Hierzu wurde die Membran für 5 min in 1 M Natronlauge inkubiert und anschließend 3x für 5 min in TBS-T gewaschen.

Anschließend erfolgte eine Erfolgskontrolle unter der CCD-Kamera, ob kein Signal mehr nachzuweisen war. Danach wurde die Membran wieder mit Milch blockiert und konnte erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden.

### 2.2.7 Koloniebildungstest

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob eine Beeinflussung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs durch siRNA-vermittelte Inhibierung oder durch Inhibition mit XAV939 eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung bewirkt. Zur Beurteilung dessen wurde der Koloniebildungstest (KBT) durchgeführt. Grundlage und Beurteilungskriterium des KBT ist die Fähigkeit der Zelle, unter externen Einflüssen wie ionisierender Strahlung oder zytotoxischen Agenzien, ihre Integrität zu behalten, sich zu vermehren und eine Kolonie zu bilden (Puck und Marcus 1956). Eine Kolonie muss dabei aus wenigstens 50 Zellen bestehen. Damit muss eine Zelle mindestens sechs Teilungszyklen vollzogen haben und es ist sehr wahrscheinlich, dass sie damit die Fähigkeit der „unbegrenzten Replikation“ erlangt hat (Franken et al. 2006; Puck und Marcus 1956).

Für den KBT wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase gerntet und je nach Zelllinie und Bestrahlungsdosis zwischen 200 und 2000 Zellen als Einzelzellen pro Well in eine 6-Well-Titerplatte gesetzt. Als Kontrolle wurde für jede Zelllinie eine separate 6-Well-Titerplatte mitgeführt, die keiner Strahlung ausgesetzt war (0 Gy). Die Verdopplungszeiten der Zelllinien in Tabelle 28 sind der Literatur entnommen. Die optimalen Zellzahlen und Wachstumszeiten wurden in unserer Arbeitsgruppe zuvor etabliert.

**Tabelle 28: Zellzahlen, Verdopplungszeiten und KBT-Wachstumszeiten der verwendeten Zelllinien**

		Zellzahl/Well					
		FLO-1	OAC-P4C	OE-19	OE-33	Kyse-150	Kyse-180
<b>Dosis (Gy)</b>	<b>0</b>	500	500	500	750	250	200
	<b>1</b>	500	500	500	750	250	200
	<b>2</b>	500	500	500	750	250	200
	<b>4</b>	500	500	1000	1500	250	400
	<b>6</b>	1000	1000	1500	2250	250	600
	<b>8</b>	1500	1000	2000	3000	250	800
<b>Verdopplungszeit (h)</b>		40 – 50	35 - 50	50 - 60	30	20-25	40-50
<b>KBT-Wachstumszeit (d)</b>		7	9	11	7	7	7

Für einen besseren Vergleich zur Karzinomtherapie in der klinischen Praxis wurden die Zellen neben der primären Bestrahlung (RT) zusätzlich mit dem Chemotherapeutikum und *Radiosensitizer* 5-Fluoruracil (5-FU) behandelt (RCT) (Byfield 1989). Acht Stunden nach der Aussaat der Zellen wurden 3  $\mu\text{M}$  5-FU in das Zellkulturmedium der RCT-Kondition gegeben. Nachdem sich die Zellen für 24 h bei 37 °C in Inkubation befanden, wurde die Adhärenz geprüft und es erfolgte die Bestrahlung bei einer Dosis von 1 Gy/min (200 kV, 15 mA, Filterplatte: 0,5 mm Kupfer). Anschließend wurden die Zellen wieder bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 8 h wurde das Medium in allen 5-FU-Wells ausgetauscht und bei Experimenten mit XAV939 erfolgte in allen Wells mit dem Inhibitor ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden zwischen 7 und 11 Tage inkubiert. Bei Erreichen der ermittelten Wachstumszeit wurde das Medium abgesaugt und die Kolonien mit 70 % Ethanol für 20 min fixiert. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und die Platten zum Trocknen aufgestellt. Zur eindeutigen Visualisierung der Kolonien erfolgte die Färbung mit Hämalaunblau - Lösung. Hierfür wurden die Kolonien mit der Färbelösung für 5 min bedeckt, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Leitungswasser für 5 min inkubiert und getrocknet (Spitzner et al. 2014). Aufgrund der großen Variation im Versuchsablauf zwischen den einzelnen Zelllinien und den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen, werden diese im Folgenden detailliert dargestellt.

### 2.2.7.1 Koloniebildungstest mit siRNA

Für die Experimente mit siRNA war der Ablauf für FLO-1 und OAC-P4C wie in Abbildung 5 gezeigt. Der optimale Zeitpunkt der Bestrahlung lag für diese beiden Zelllinien bei 72 h (siehe Kapitel 3.3.1).

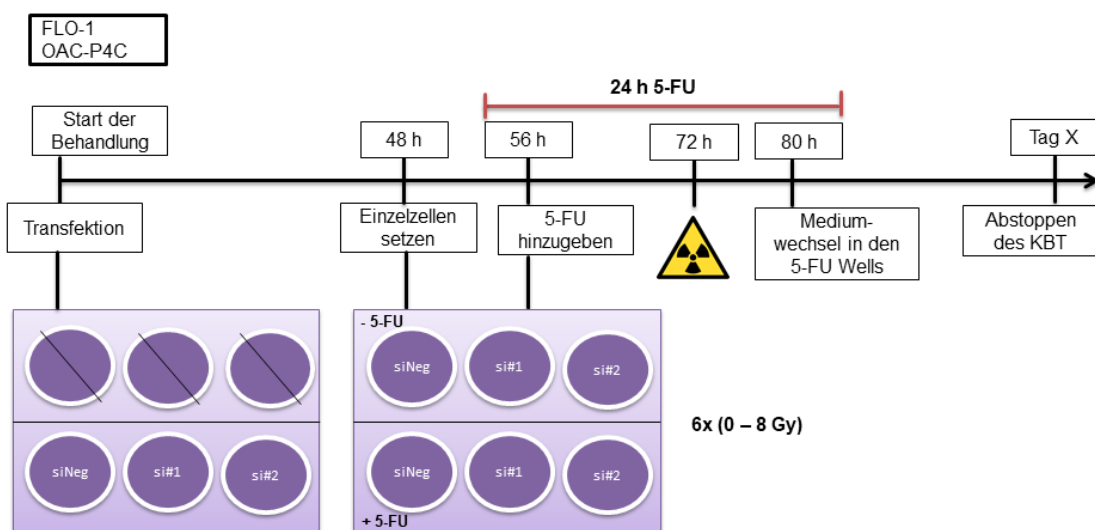
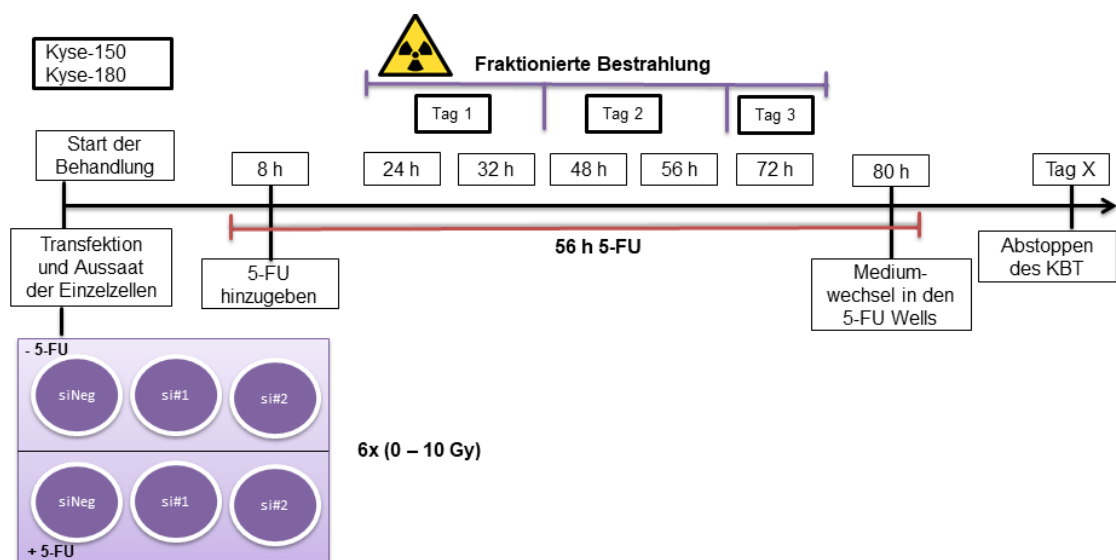


Abbildung 5: Schematische Darstellung des KBT für die Zelllinien FLO-1 und OAC-P4C

Nach der Transfektion der Zellen mit siRNA (siehe Kapitel 2.2.2) wurden diese zunächst ausgesät und inkubiert. Nach 48 h erfolgte die Aussaat der Einzelzellen für den eigentlichen KBT. Weitere 8 h später wurde das 5-FU hinzugegeben. Zum 72 h Zeitpunkt wurden die Zellen bestrahlt und 8 h später ein Mediumwechsel in den 5-FU Wells vorgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 7 d für FLO-1, sowie 9 d für OAC-P4C, erfolgte wie weiter oben bereits beschrieben die Fixation und Färbung der Kolonien. Für die Zelllinien Kyse-150, Kyse-180 und OE-33 war der etablierte optimale Bestrahlungszeitpunkt 24 h nach Transfektion (siehe Kapitel 3.2.1). Die Einzelzellen wurden direkt nach Transfektion ausgesetzt, 8 h danach das 5-FU hinzugegeben und am nächsten Tag bestrahlt. Anschließend wurde nach einer Gesamtwirkdauer von 24 h das 5-FU mit einem Mediumwechsel entfernt. Alle drei Zelllinien wurden nach 7 d Inkubationszeit der Fixation und Färbung zugeführt. Für OE-19 betrug der optimale Bestrahlungszeitpunkt 48 h nach Transfektion. Nach 11 d Inkubationszeit erfolgte die Fixation und Färbung.

### 2.2.7.2 Koloniebildungstest mit siRNA und fraktionierter Bestrahlung

Um die Therapie in der Klinik besser nachbilden zu können wurden die Zellen, anstatt mit einer einzelnen Dosis, zusätzlich fraktioniert bestrahlt. In der Abbildung 6 ist der Versuchsablauf für die Linien Kyse-150 und Kyse-180 beispielhaft illustriert. Der optimale Zeitpunkt der Bestrahlung nach Transfektion betrug wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben 24 h.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des KBT mit Fraktionierter Bestrahlung für die Zelllinien Kyse-150 und Kyse-180

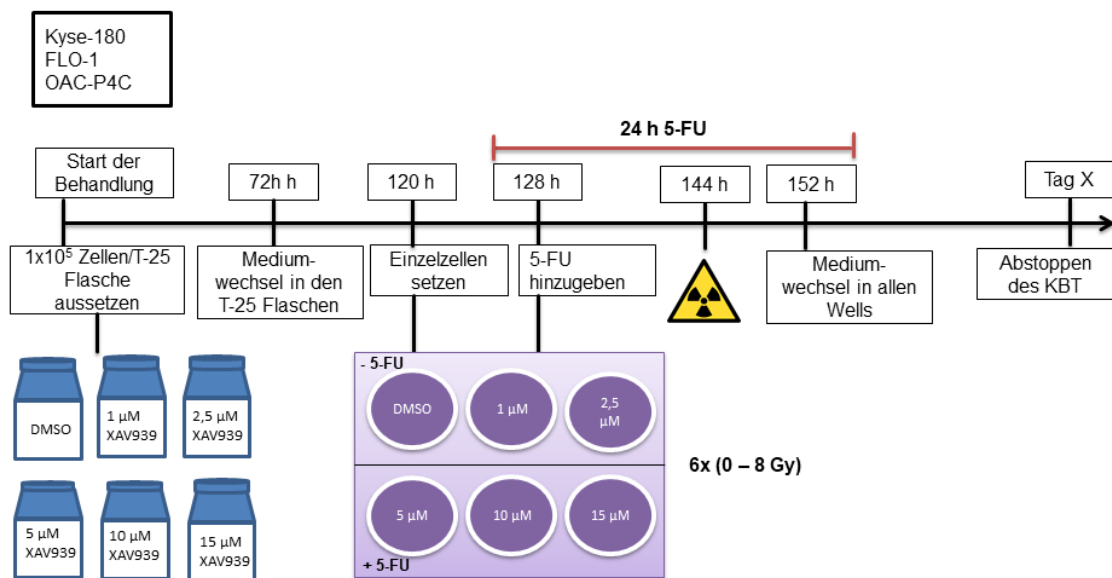
Die Zellen wurden transfiziert, als Einzelzellen ausgesetzt und 8 h später erfolgte die Hinzugabe von 5-FU. Zum 24 h Zeitpunkt begann die fraktionierte Bestrahlung. Es wurde pro Zeitpunkt mit einer Gesamtdosis von 2 Gy bestrahlt, sodass am Ende eine additive

Dosis von 10 Gy vorlag (72 h). Das 5-FU wurde wegen seiner Wirkung als *Radiosensitizer* über den gesamten Zeitraum der fraktionierten Bestrahlung in den Wells belassen und erst 8 h nach Beendigung derselben, mit einem Mediumwechsel entfernt. Nach 7 d Inkubation wurden die entstandenen Kolonien mit 70 % Ethanol fixiert und gefärbt.

Mit den Zelllinien FLO-1 und OAC-P4C wurde analog verfahren, nachdem sie wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben, vorbehandelt worden waren.

### 2.2.7.3 Koloniebildungstest unter Behandlung mit XAV939

Für den Koloniebildungstest mit XAV939 wurde wie in der Abbildung 7 illustriert verfahren.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des KBT für die Zelllinien Kyse-180, FLO-1 und OAC-P4C mit XAV939**

Für eine optimale Wirkung von XAV939 waren Behandlungszeiten von bis zu 144 h für Kyse-180, FLO-1 und OAC-P4C (siehe Kapitel 3.4.1) nötig. Daher wurden zunächst  $1 \times 10^5$  Zellen in einer T-25 Flasche für 120 h vorbehandelt (Sechs T-25 Flaschen, da sechs Konditionen). Nach 72 h erfolgte ein Mediumwechsel und bei zu hoher Konfluenz ggf. ein Zellsplit. Nach einer Inkubationsdauer von 120 h wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben aus dem Zellverband gelöst und als Einzelzellen für den KBT ausgesät. Das 5-FU wurde nach 8 h in die dafür vorgesehen Wells gegeben, nachdem die Adhärenz der Einzelzellen überprüft wurde. Am nächsten Tag erfolgte zum 144 h Zeitpunkt die Bestrahlung der Zellen und nach weiteren 8 h Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel in allen Wells zur Entfernung des Inhibitors, sowie des Chemotherapeutikums, vorgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 7 d für Kyse-180 und FLO-1 sowie 9 d für OAC-P4C erfolgte wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben die Fixation und Färbung der Kolonien. Mit den Zelllinien OE-19 und OE-33 wurde analog wie oben

beschrieben verfahren, jedoch mit angepassten Zeiten, da die optimale Wirkung von XAV939 für OE-19 bei 96 h und für OE-33 bei 72 h einsetzte.

#### 2.2.7.4 Auswertung des Koloniebildungstests

Die Kolonien wurden mit einem Binokular-Auflichtmikroskop gezählt. In die Evaluation gingen alle Kolonien mit einer Mindestzellzahl von 50 Zellen ein.

Zunächst galt es die Anwachseffektivität (AE) der Zellen zu berechnen. Diese ist ein Maß für die Fähigkeit von Zellen, adhärente Kolonien zu bilden. Sie wurde wie folgt berechnet:

$$AE = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Kolonien (0 Gy, n = 3)}}{\text{Anzahl der gesetzten Zellen (0 Gy)}}$$

**Formel 1: Formel zur Berechnung der Anwachseffektivität.** Adaptiert nach (Franken et al. 2006)

Die so erhaltene Anwachseffektivität wurde zur Berechnung der Überlebensfraktion herangezogen, indem jede einzelne Bestrahlungsdosis und Kondition gegen die Anwachseffektivität bei 0 Gy normalisiert wurde. Die Berechnung der Überlebensfraktion erfolgte folgendermaßen:

$$\text{Überlebensfraktion} = \frac{\text{Mittelwert der gezählten Kolonien (x Gy, n = 3)}}{\text{Anzahl der gesetzten Zellen (x Gy) * AE}}$$

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

Durch die Normalisierung wurden Ungenauigkeiten beim Einzählen der Zellen negiert aber auch das differente Anwachsverhalten der Zellen mitberücksichtigt. Die Überlebensfraktion bei 0 Gy wurde stets als 1 gesetzt.

Die berechneten Überlebensfraktionen der verschiedenen Bestrahlungsdosen wurden in einer "Bestrahlungsdosis-Überlebenskurve" dargestellt (Franken et al. 2006). Hierfür wurden Mittelwerte aus den biologischen Replikaten (n=3) gebildet und ihre jeweiligen Standardfehler berechnet. Die Darstellung der Werte erfolgte mit Hilfe des Programms KaleidaGraph über das linear quadratische Modell (Bloomer und Adelstein 1982).

Bei allen Koloniebildungstests erfolgte zum Zeitpunkt der Bestrahlung eine Proteinisolation, um den Behandlungseffekt zum Bestrahlungszeitpunkt mittels Westernblot-Analyse zu bestätigen. Alle Versuche wurden mit technischen Triplikaten unabhängig voneinander drei Mal durchgeführt.

### 2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. rer. nat. Melanie Spitzner, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universität Göttingen. Die statistische Berechnung der Zellviabilitätsassays sowie der *dual-luciferase-reporter-assays* erfolgte anhand des t-Test für unabhängige Stichproben in dem Programm *Microsoft Excel*, die graphische Darstellung in dem Programm *Grapher*. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen (Spitzner et al. 2021). Die statistische Berechnung der gewonnenen Daten aus den Koloniebildungstests erfolgte mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung (englisch: ANOVA two factor with replication) in dem Programm *Microsoft Excel* mit dem Add-in "*Data analysis*". Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen (Spitzner et al. 2021).

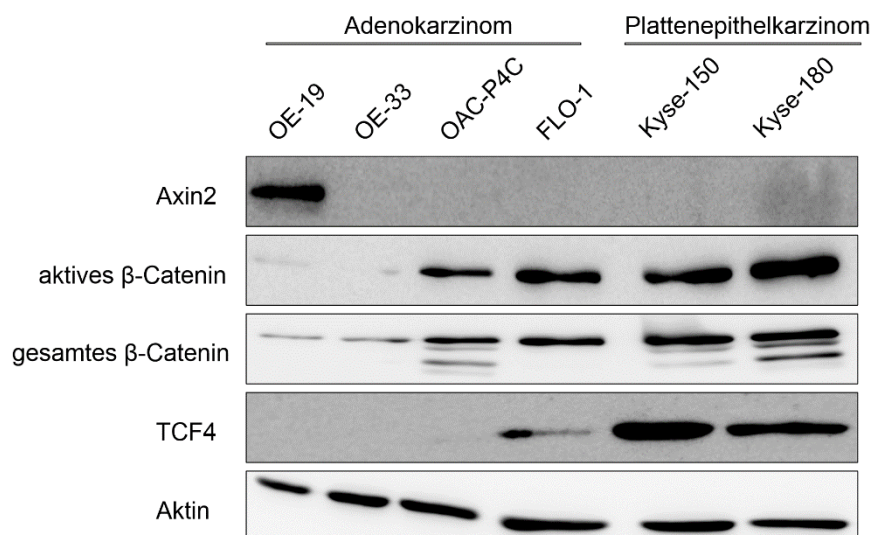


### 3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen der Radiotherapieresistenz von Ösophaguskarzinomen und der Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs besteht. Hierzu erfolgte eine Inhibierung des Signalweges mittels RNA-Interferenz sowie durch einen kleinmolekularen Inhibitor XAV939. Anschließend wurde per KBT der Einfluss der Herunterregulation von  $\beta$ -Catenin auf die Strahlensensibilität der Tumorzellen gemessen.

#### 3.1 Charakterisierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Proteinexpressionsprofils und der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegaktivität in Ösophaguskarzinomzelllinien

Zunächst wurden 6 Ösophaguszelllinien erworben und diese per Western Blot hinsichtlich ihres Expressionsprofils von relevanten Proteinen des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs untersucht (siehe Abbildung 8).



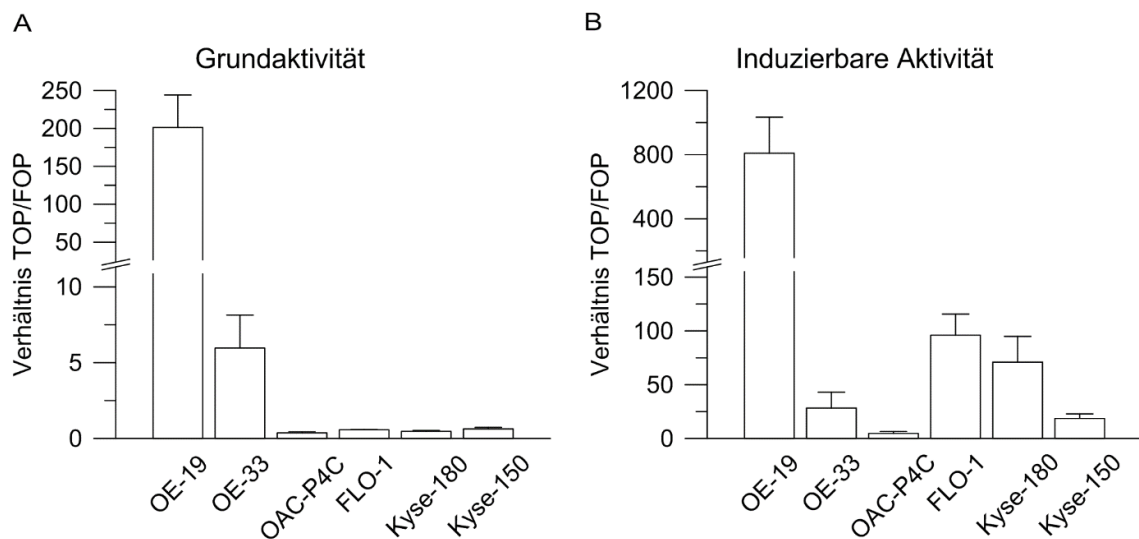
**Abbildung 8: Übersichtsblot der verwendeten Zelllinien.**

Immunfärbung von Axin2, aktives  $\beta$ -Catenin, gesamtes  $\beta$ -Catenin, TCF4 und Aktin.

Von besonderem Interesse war die Expression von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin, die entscheidende Signaltransduktoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs sind (Behrens et al. 1996; Molenaar et al. 1996), sowie Axin2. Letzteres ist ein wichtiger Indikator für die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs (Lustig et al. 2002; Nakajima et al. 2003). Die Auftragsreihenfolge der Zelllinien erfolgte entsprechend ihrem Proteinexpressionsprofil von der niedrigsten bis zur höchsten  $\beta$ -Catenin-Konzentration, beginnend mit OE-19 und endend mit Kyse-180. Auf Grund der variablen Expression der relevanten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegproteine, erfolgte im nächsten Schritt eine

Untersuchung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Wnt-Aktivität und Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs auf Transkriptionsebene.

Der Dual-Luciferase-Reporter-Assay (*TOPFlash/FOPFlash reporter assay*) gilt als Standard um die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität einer Zelle anhand der transkriptionellen *TCF/LEF-reporter* Aktivität zu messen (Korinek et al. 1997). Die verwendeten Zelllinien wurden bezüglich ihrer Wnt-Aktivität und Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs geprüft. Es erfolgte wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben die Transfektion der Zellen mit den verschiedenen Reporterplasmiden und anschließend die Messung und Analyse des Luciferase-Signals.



**Abbildung 9: Grund- und induzierbare Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs.**

**A)** Gemessene Grundaktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. **B)** Gemessene induzierbare Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs nach Kotransfektion mit dem Vektor pCl-neo- $\beta$ -Catenin S33Y. Verwendete Ösophaguszelllinien FLO-1, OAC-P4C, OE-19, Kyse-150 und Kyse-180. Zur besseren Veranschaulichung enthalten beide Y-Achsen einen Achsenbruch.

Abbildung 9A zeigt, dass OE-33 (5-fach) und OE-19 (200-fach), im Vergleich zu den anderen Zelllinien, eine hohe bis sehr hohe Wnt/ $\beta$ -Catenin-Grundaktivität aufweisen. Hinsichtlich der Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bietet sich ein heterogenes Bild (Abbildung 9B): Die bereits hohe Wnt/ $\beta$ -Catenin-Grundaktivität von OE-19 konnte durch Induktion noch weiter gesteigert werden (800-fach). Alle anderen Zelllinien, außer OAC-P4C, zeigten eine induzierbare Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs.

Aufgrund der Ergebnisse des Übersichtsblots sowie des Dual-Luciferase-Reporter Assay wurden die Zelllinien für die weiterführenden Experimente ausgewählt. Bei den Adenokarzinomzelllinien wurden OE-19 und OE-33 wegen ihrer hohen Grundaktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, FLO-1 aufgrund der hohen induzierbaren Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ausgewählt. Bei der Zelllinie OAC-P4C sollte untersucht

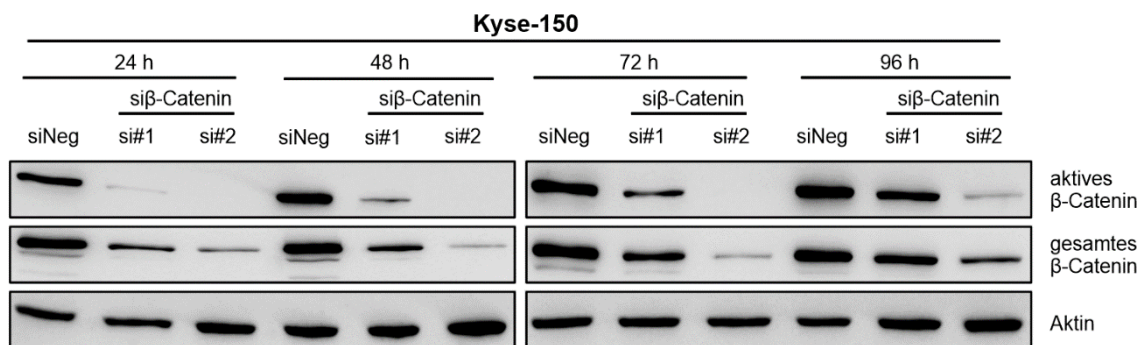
werden, ob eine Modulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs trotz nicht vorhandener Grundaktivität einen Effekt auf die Radiochemotherapiesensibilität hat.

Die beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien Kyse-150 und Kyse-180 wurden auf Grund der sehr hohen Expression von  $\beta$ -Catenin sowie der potentiellen Induzierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs für weiterführende Experimente ausgewählt.

## 3.2 Therapiesensibilisierung durch den Einsatz von siRNA gegen $\beta$ -Catenin

### 3.2.1 Bestimmung des optimalen RNAi-Knockdown-Zeitpunktes

Den funktionellen Versuchen mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin wurden zunächst Versuche zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für einen effektiven *Knockdown* vorangestellt. Der Versuchsaufbau wurde wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Abbildung 10 zeigt das Proteinexpressionsprofil von Kyse-150-Zellen für 24 h bis 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin. Es ist eine deutliche Herunterregulation der Proteinexpression von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin bei 24 h und 48 h im Vergleich siNeg zu si#1 und si#2 zu erkennen. Dieser Effekt ist jedoch bei Verwendung von si#1 bei 72 h und 96 h nur noch schwach ausgeprägt. Somit war die Herunterregulation der Proteinexpression mittels RNA-Interferenz für beide siRNAs nur für den Zeitpunkt 24 h und 48 h erfolgreich. Der Effekt war bei 24 h am stärksten ausgeprägt, sodass dieser Zeitpunkt für die Experimente verwendet wurde.

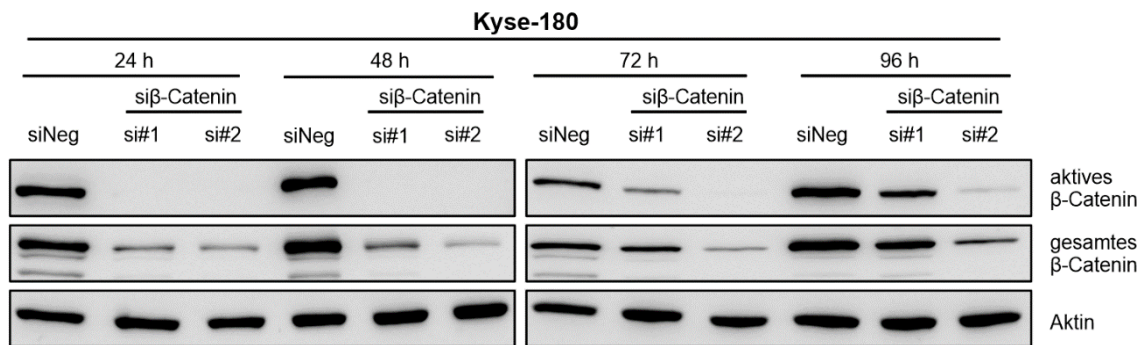


**Abbildung 10: Proteinexpressionsprofil von Kyse-150-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

Immunfärbung nach Proteinisolierung zu den angegebenen Zeitpunkten gegen Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin.

Analog zu dem Vorversuch mit Kyse-150 wurde die Zeitreihe von Kyse-180 durchgeführt. In der Abbildung 11 ist zu erkennen, dass 24 h und 48 h nach Transfektion mit siRNA#1 und #2 gegen  $\beta$ -Catenin, die Proteinexpression von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin deutlich geringer ist im Vergleich zu siNeg. Dieser Effekt ist für si#1 ab 72 h aufgehoben und bei si#2 ab 96 h nur noch schwach ausgeprägt. Die Herunterregulation

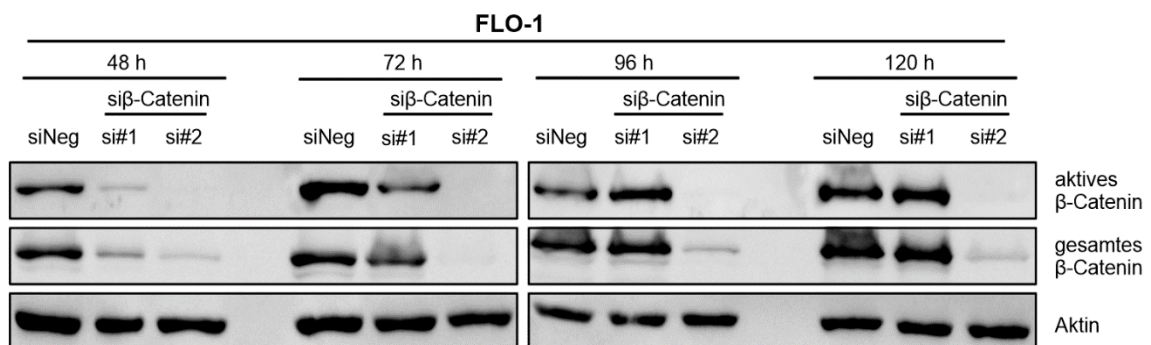
mittels RNA-Interferenz war somit für 24 h und 48 h erfolgreich. Bei der Zelllinie Kyse-180 war der Effekt bei 24 h am stärksten ausgeprägt, sodass dieser Zeitpunkt für die Experimente verwendet wurde.



**Abbildung 11: Proteinexpressionsprofil von Kyse-180-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

Immunfärbung nach Proteinisolierung zu den angegebenen Zeitpunkten gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin.

Die Experimente zur Zeitpunktfindung in den Adenokarzinomzelllinien nach Behandlung mit siRNA gegen β-Catenin erfolgten auf dieselbe Weise. In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass die Expressionslevel von aktivem und gesamtem β-Catenin 48 h und 72 h nach Transfektion von FLO-1 mit den siRNA's gegen β-Catenin deutlich geringer sind im Vergleich siNeg zu siβ-Catenin. Der Effekt ist ab 96 h für si#1 nicht mehr vorhanden, für si#2 jedoch bis zum 120 h Zeitpunkt noch nachweisbar. Eine erfolgreiche Herunterregulation mittels RNA-Interferenz war somit für beide siRNAs nur für den 48 h- und 72 h-Zeitpunkt nachweisbar. Es wurde aus zellkulturtechnischen Gründen der 72 h-Zeitpunkt für die anschließenden Experimente verwendet.

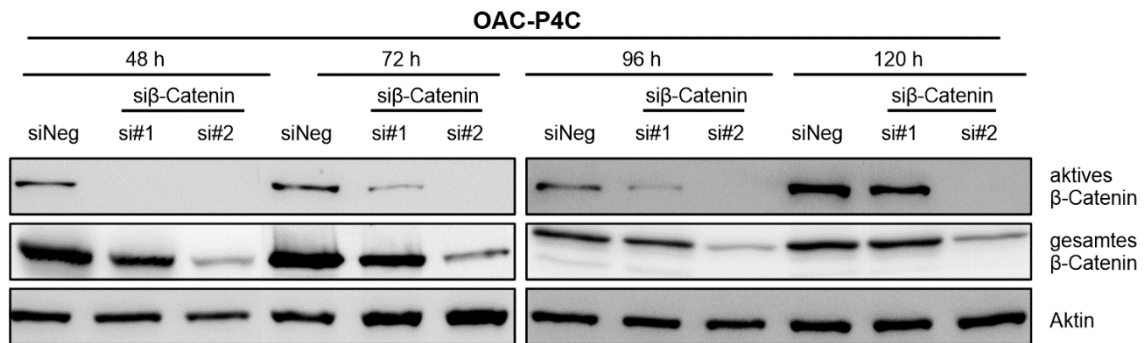


**Abbildung 12: Proteinexpressionsprofil von FLO-1-Zellen 48 h – 120 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

Immunfärbung nach Proteinisolierung zu den angegebenen Zeitpunkten gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin.

Die Abbildung 13 zeigt die Zeitreihe von OAC-P4C 48 h – 120 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin. Es ist eine deutliche Herunterregulation von aktivem β-Catenin bei 48 h, 72 h und 96 h im Vergleich siNeg zu siβ-Catenin zu erkennen. Der Effekt ist für

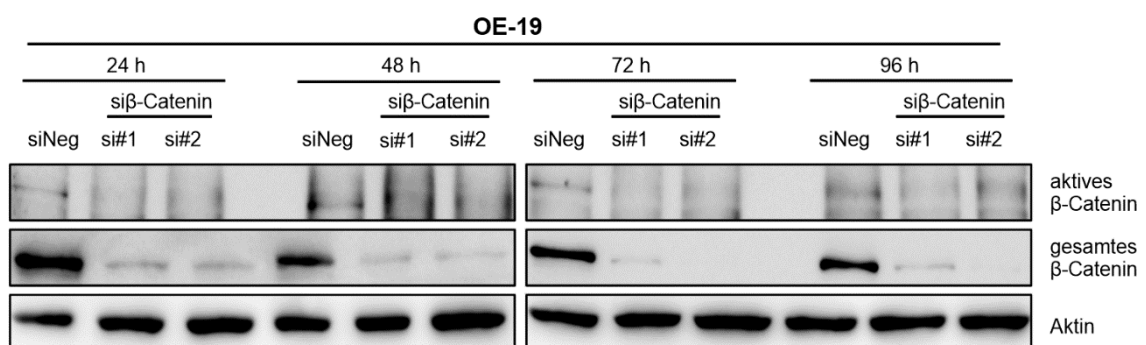
si#1 bei 120 h wieder aufgehoben. Für gesamtes  $\beta$ -Catenin war ein Effekt der Herunterregulation immer nur bei der si#2 nachweisbar. Somit war die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin mittels RNA-Interferenz für beide siRNAs für 48 h, 72 h und 96 h nachweisbar. Der 72 h-Zeitpunkt wurde als optimaler *Knockdown*-Zeitpunkt ausgewählt.



**Abbildung 13: Proteinexpressionsprofil von OAC-P4C-Zellen 48 h – 120 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

Immunfärbung nach Proteinisolierung zu den angegebenen Zeitpunkten gegen Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin.

Die Zeitreihe von OE-19 mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Proteinexpressionslevel von aktivem  $\beta$ -Catenin sind nahezu nicht nachweisbar. Es ist jedoch eine deutliche Abnahme von gesamtem  $\beta$ -Catenin beim Vergleich siNeg zu si $\beta$ -Catenin zu erkennen. Der Effekt ist zu allen Zeitpunkten vergleichbar stark erkennbar, nimmt ab 48 h Stunden aber sogar noch zu. Eine erfolgreiche Herunterregulation mittels RNA-Interferenz war somit für alle Zeitpunkte nachweisbar. Für die nachfolgenden Experimente wurde der 48 h Zeitpunkt gewählt.

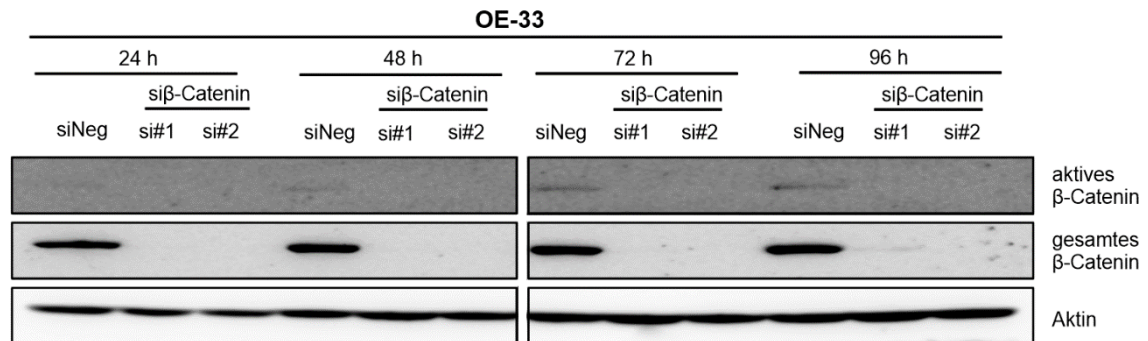


**Abbildung 14: Proteinexpressionsprofil von OE-19-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

Immunfärbung nach Proteinisolierung zu den angegebenen Zeitpunkten gegen Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin.

In Abbildung 15 ist die Zeitreihe von OE-33 mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin dargestellt. Analog zu der Zeitreihe mit OE-19 sind auch hier die Proteinexpressionslevel von aktivem  $\beta$ -Catenin nahezu nicht nachweisbar (sehr lange Belichtungszeit, daher ist der

Kontrast so hoch). Es ist aber eine deutliche Herunterregulation vom gesamten  $\beta$ -Catenin beim Vergleich siNeg zu si $\beta$ -Catenin zu erkennen. Der Effekt ist zu allen Zeitpunkten vergleichbar stark erkennbar. Eine erfolgreiche Herunterregulation mittels RNA-Interferenz war somit für alle Zeitpunkte nachweisbar. Für die nachfolgenden Experimente wurde der 24 h Zeitpunkt gewählt.



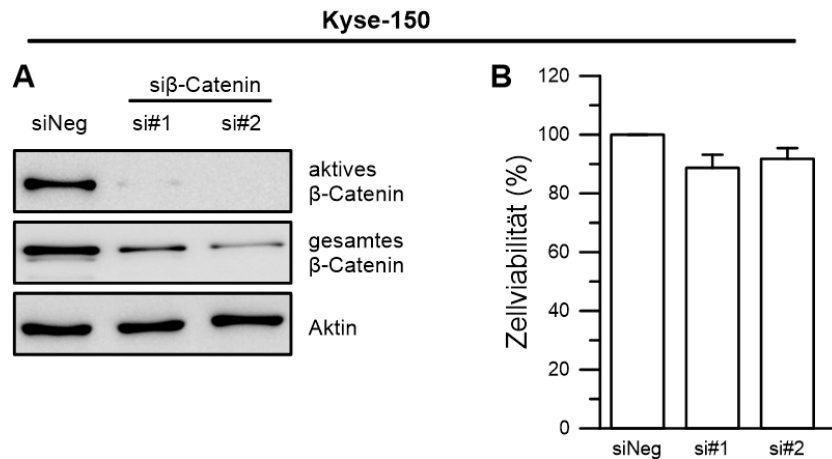
**Abbildung 15: Proteinexpressionsprofil von OE-33-Zellen 24 h – 96 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

Immunfärbung nach Proteinisolation zu den angegebenen Zeitpunkten gegen Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin.

### 3.2.2 Der Einsatz von RNA-Interferenz hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität

Um eine relevante Beeinträchtigung des Zellmetabolismus durch die siRNAs ausschließen zu können, wurden im Anschluss an die Zeitreihen Zellviabilitätstests durchgeführt. Der in Abbildung 16 A dargestellte Westernblot bestätigt die erfolgreiche Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin 24 h nach siRNA Transfektion in Kyse-150. Abbildung 16 B zeigt die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays von Kyse-150 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin. Es ist keine signifikante Einschränkung der Zellviabilität durch si#1 und si#2 nachweisbar (si#1:  $p = 0,065$ ; si#2:  $p = 0,089$ ).

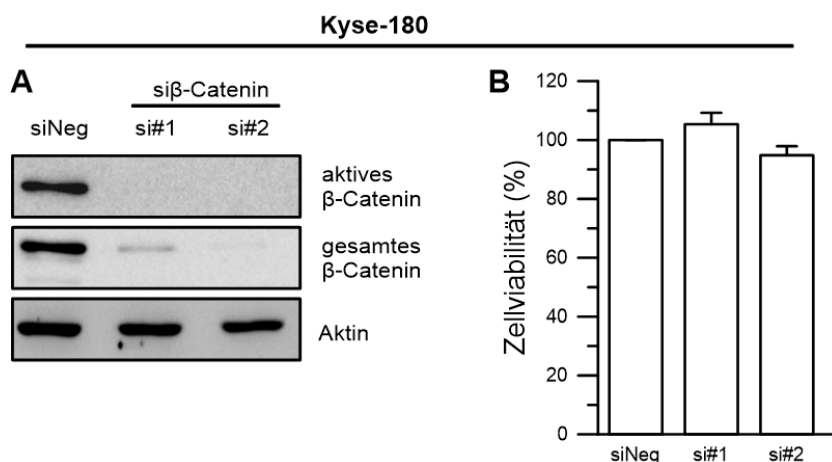




**Abbildung 16: Zellviabilität von Kyse-150 nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

**A)** Westernblot-Kontrolle: Immunfärbung gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 24 h. **B)** Messung der Viabilität per *Celltiter blue assay* nach 24 h (n = 3)

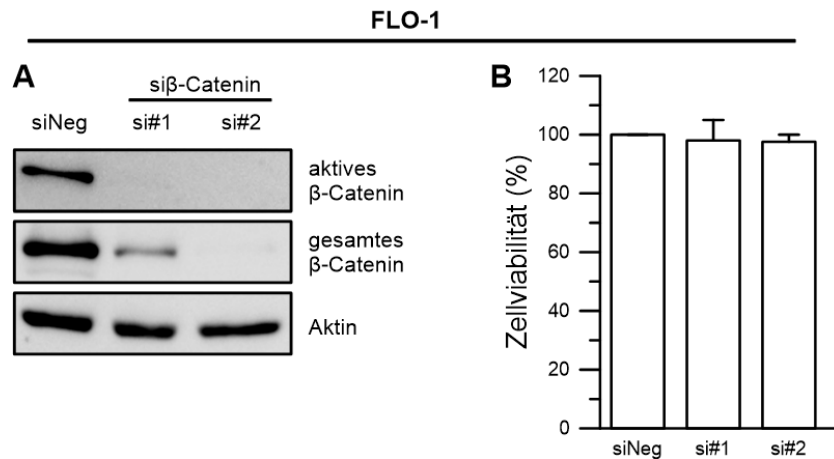
Abbildung 17 A bestätigt die deutliche Abnahme von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich siβ-Catenin zu siNeg zum 24 h-Zeitpunkt in Kyse-180. Abbildung 17 B zeigt die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays von Kyse-180 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin. Es ist keine signifikante Einschränkung der Zellviabilität durch si#1 und si#2 zu erkennen (si#1:  $p = 0,576$ ; si#2:  $p = 0,004$ ).



**Abbildung 17: Zellviabilität von Kyse-180 nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

**A)** Westernblot-Kontrolle: Immunfärbung gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 24 h. **B)** Messung der Viabilität per *Celltiter blue assay* nach 24 h (n = 3).

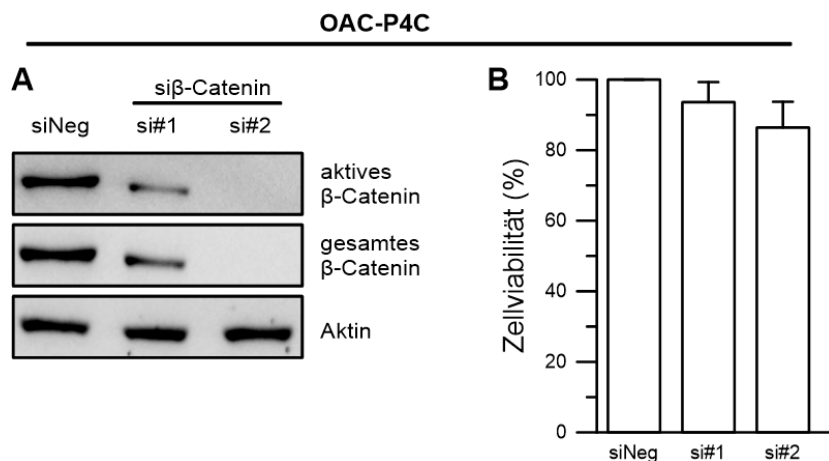
Analog zu den Zellviabilitätstests in den Plattenepithelkarzinomzelllinien, wurden diese auch für die Adenokarzinomzelllinien durchgeführt. In Abbildung 18 werden die Ergebnisse für FLO-1 dargestellt. Abbildung 18 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich siβ-Catenin zu siNeg zum 72 h-Zeitpunkt. Abbildung 18 B zeigt den Zellviabilitätsassay von FLO-1 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin. Es ist keine signifikante Einschränkung der Zellviabilität durch si#1 und si#2 zu erkennen (si#1:  $p = 0,790$ ; si#2:  $p = 0,372$ ).



**Abbildung 18: Zellviabilität von FLO-1 nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

A) Westernblot-Kontrolle: Immunfärbung gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 72 h. B) Messung der Viabilität per *Celltiter blue assay* nach 72 h (n = 3).

Folgend werden in Abbildung 19 die Ergebnisse für OAC-P4C dargestellt. Abbildung 19 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich siβ-Catenin zu siNeg zum 72 h-Zeitpunkt. Abbildung 19 B zeigt den Zellviabilitätsassay von OAC-P4C 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin. Es ist keine signifikante Einschränkung der Zellviabilität durch si#1 und si#2 zu erkennen (si#1:  $p = 0,499$ ; si#2:  $p = 0,175$ ).



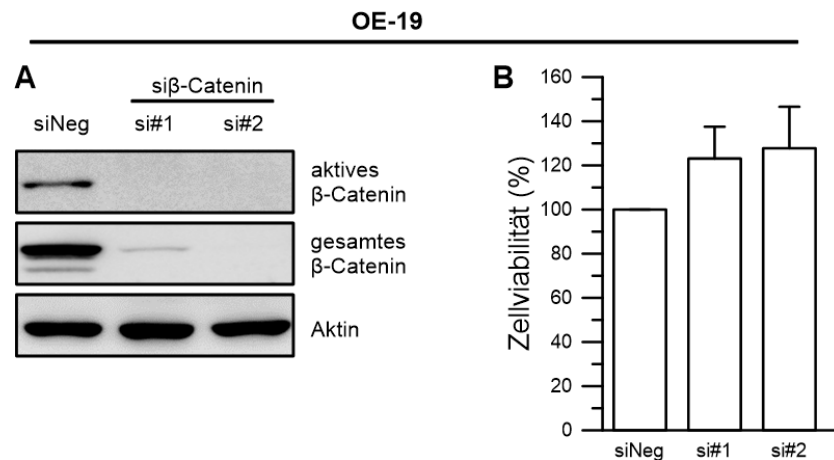
**Abbildung 19: Zellviabilität von OAC-P4C nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

A) Westernblot-Kontrolle: Immunfärbung gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 72 h. B) Messung der Viabilität per *Celltiter blue assay* nach 72 h (n = 3).

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse für die Zelllinie OE-19. Abbildung 20 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich siβ-Catenin zu siNeg zum 48 h-Zeitpunkt. Abbildung 20 B zeigt den Zellviabilitätsassay von OE-19 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin. Es ist keine Einschränkung der Viabilität,



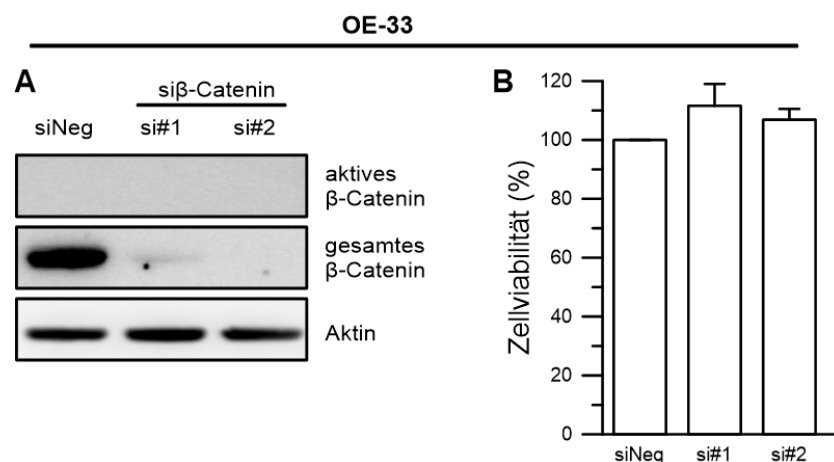
sondern sogar eine leichte Steigerung der Zellviabilität durch si#1 und si#2 zu beobachten (si#1:  $p = 0,883$ ; si#2:  $p = 0,935$ ).



**Abbildung 20: Zellviabilität von OE-19 nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

A) Westernblot-Kontrolle: Immunfärbung gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 48 h. B) Viabilität per *Celltiter blue assay* nach 48 h ( $n = 3$ ).

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse für OE-33 dargestellt. Abbildung 21 A bestätigt die Abnahme von gesamtem β-Catenin im Vergleich siβ-Catenin zu siNeg zum 24 h-Zeitpunkt. Eine Anfärbung von aktivem β-Catenin unter normaler Belichtungszeit gelang nicht da es, wie in Abbildung 15 bereits dargestellt, im Grundzustand der Zelle fast nicht nachweisbar war. Es ist jedoch eine deutliche Abnahme der Proteinexpression von gesamtem-β-Catenin im Vergleich siNeg zu si#1 und si#2 zu sehen. Abbildung 21 B zeigt die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays von OE-33, 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin. Es ist keine signifikante Einschränkung der Zellviabilität durch si#1 und si#2 zu erkennen (si#1:  $p = 0,196$ ; si#2:  $p = 0,175$ ).

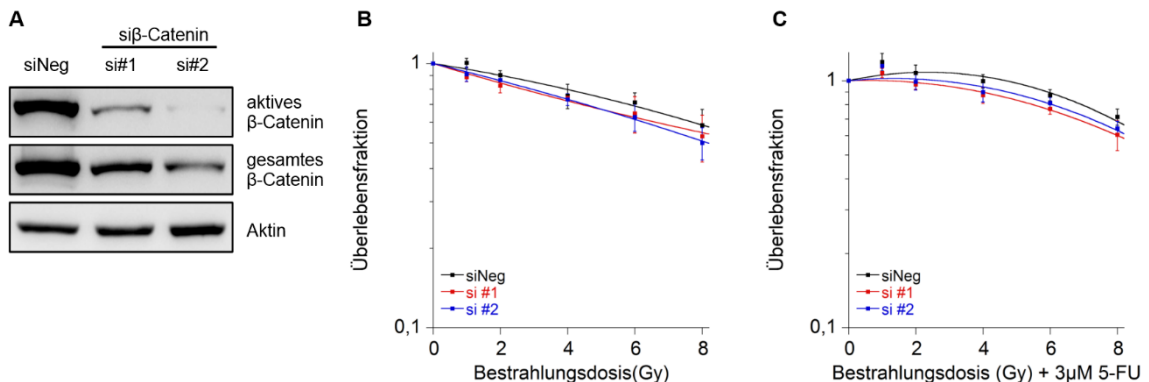


**Abbildung 21: Zellviabilität von OE-33 nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

A) Westernblot-Kontrolle: Immunfärbung gegen Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 24 h. B) Viabilität per *Celltiter blue assay* nach 24 h ( $n = 3$ ).

### 3.2.3 RNA-Interferenz-vermittelte Inhibierung von $\beta$ -Catenin beeinflusst die Radiochemotherapiesensibilität

Als nächstes wurde untersucht, ob die Expressionsreduktion von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin durch RNA-Interferenz zu einer Veränderung der Radiotherapiesensibilität in Plattenepithel- und Adenokarzinomlinien führt. Hierfür wurde ein Koloniebildungstest wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse des Koloniebildungstests mit Kyse-150 aufgeführt. Abbildung 22 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si $\beta$ -Catenin zu siNeg 24 h nach Transfektion. Die Abbildung 22 B und C zeigen die Überlebensfraktionen aller Konditionen unter Strahlentherapie alleine sowie mit Radiochemotherapie. Die statistische Auswertung für die Bestrahlungsgruppe ergab einen signifikanten Unterschied in der Koloniebildungsfähigkeit zwischen der mit si $\beta$ -Catenin #1 und siNeg behandelten Gruppe. Für si $\beta$ -Catenin #2 bestand kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Kontrolle (siNeg) (si#1:  $p = 0,139$ ; si#2:  $p = 0,131$ ). Die Hinzugabe von 5-FU bewirkte eine signifikante Änderung der Koloniebildungsfähigkeit von si#1 im Vergleich mit der Kontrollgruppe (si#1:  $p = 0,010$ ; si#2:  $p = 0,430$ ). Die Behandlung mit siRNA nach RCT führte also nur bei Verwendung der siRNA#1 zu einer Sensibilisierung von Kyse-150, aber aufgrund der sehr hohen Gesamtresistenz gegenüber einer RT bzw. RCT, kann man bei dieser Zelllinie nicht von einem nennenswerten Effekt ausgehen.

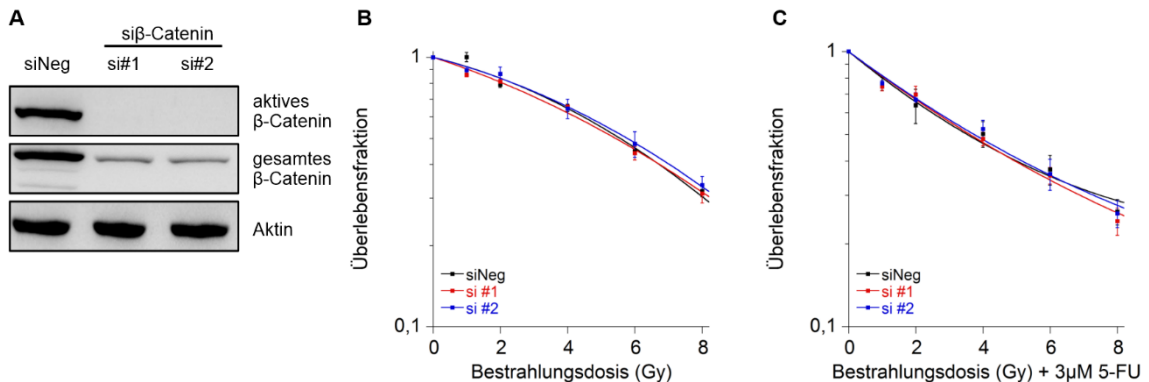


**Abbildung 22: Koloniebildungstest von Kyse-150 und Bestrahlung 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

A) Kontrolle per Westernblot: Immunfärbung von Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 24 h. B) Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und C) Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot) und si#2 (blau) ( $n = 3$ ).

Anschließend wurde für Kyse-180 ebenfalls ein KBT mit dem gleichen Versuchsaufbau durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zu sehen. Abbildung 23 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si $\beta$ -Catenin zu siNeg zum 24 h-Zeitpunkt der Bestrahlung. In den Abbildung 23 B und C stellt sich ein gleichmäßiger Abfall der Überlebensfraktion aller Konditionen dar. Die statistische

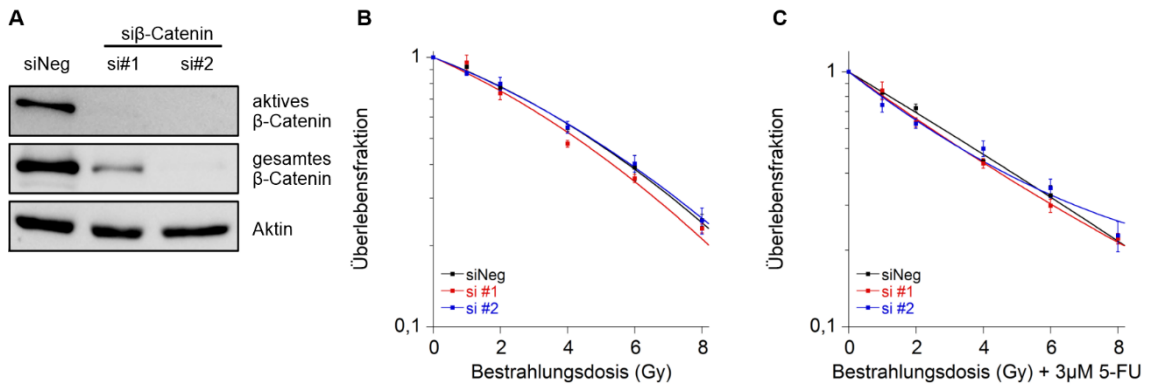
Auswertung für die Bestrahlungsgruppe ergab keinen signifikanten Unterschied in der Koloniebildungsfähigkeit zwischen den mit si $\beta$ -Catenin #1 und si $\beta$ -Catenin #2 behandelten Gruppen und der Kontrolle (siNeg) (si#1:  $p = 0,071$ ; si#2:  $p = 0,088$ ). Die Hinzugabe von 5-FU bewirkte ebenfalls keine signifikante Änderung der Koloniebildungsfähigkeit der zu untersuchenden Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (si#1:  $p = 0,585$ ; si#2:  $p = 0,264$ ). Demnach bewirkt die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin durch siRNA keine Veränderung der Radiosensibilität von Kyse-180.



**Abbildung 23: Koloniebildungstest von Kyse-180 und Bestrahlung 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

A) Kontrolle per Westernblot: Immunfärbung von Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 24 h. B) Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und C) Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot) und si#2 (blau) ( $n = 3$ ).

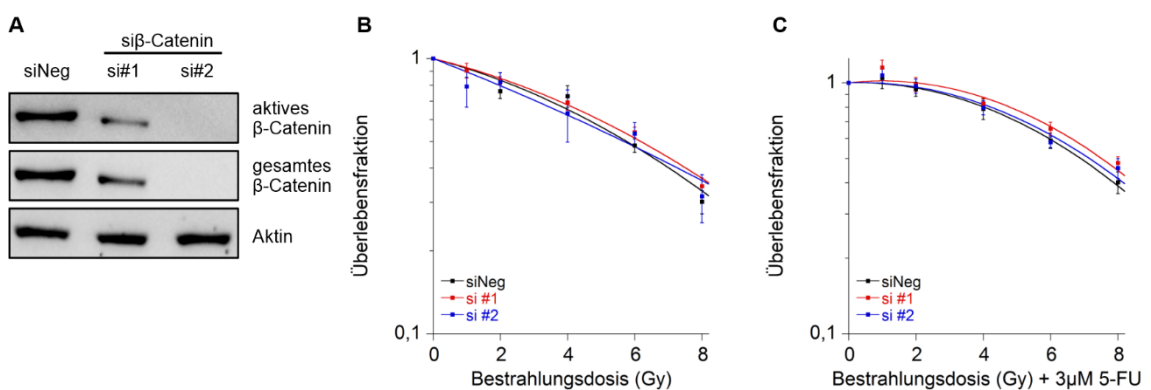
In Abbildung 24 sind die Ergebnisse des Koloniebildungstests mit FLO-1 aufgeführt. Abbildung 24 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si $\beta$ -Catenin zu siNeg zum Zeitpunkt der Bestrahlung (72 h). Die Abbildung 24 B zeigt eine gleichmäßige Abnahme der Überlebensfraktionen aller Konditionen mit steigender Bestrahlungsdosis. Die Kombination von Bestrahlung und 5-FU hat keinen Effekt auf die Überlebensfraktion (Abbildung 24 C). Die statistische Auswertung erfolgte für si $\beta$ -Catenin #1 (si#1) und si $\beta$ -Catenin pool (si#2) jeweils im Vergleich mit der Kontrolle (siNeg). Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Für si#1 ergab sich ein  $p$ -Wert von 0,243 und für si#2 ein  $p$ -Wert von 0,880. Die Hinzugabe von 5-FU führte ebenfalls zu keiner signifikanten Radiosensibilisierung (si#1:  $p = 0,159$ ; si#2:  $p = 0,709$ ). Die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin via siRNA hat somit keine Auswirkungen auf die Radiosensibilität von FLO-1.



**Abbildung 24: Koloniebildungstest von FLO-1 und Bestrahlung 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 72 h. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot) und si#2 (blau) ( $n = 3$ ).

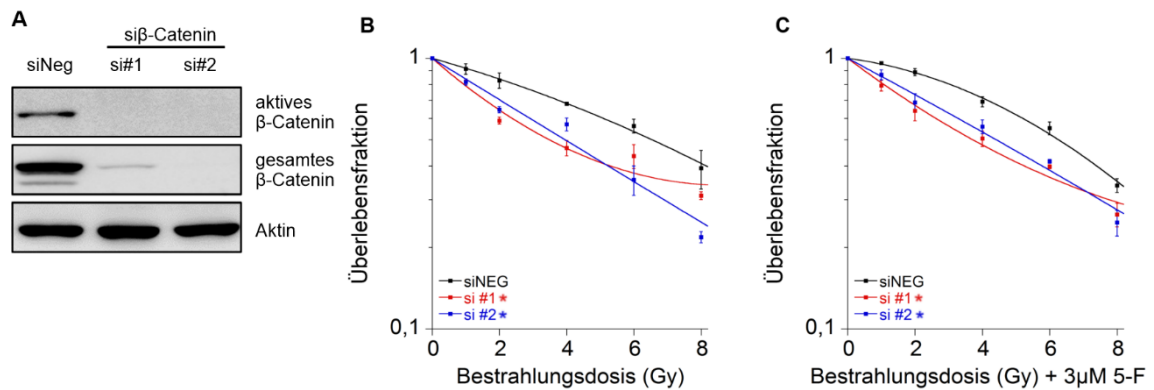
Als nächstes wurde der KBT mit OAC-P4C durchgeführt. In Abbildung 25 A stellt sich wieder eine Herunterregulation von aktivem- und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si $\beta$ -Catenin zu siNeg zum Zeitpunkt der Bestrahlung dar (72 h). Abbildung 25 B zeigt eine Abnahme der Überlebensfraktionen aller Konditionen mit steigender Bestrahlungsdosis. Die Kombination von Bestrahlung und 5-FU hat keinen Effekt auf die Überlebensfraktion (Abbildung 25 C). Die statistische Auswertung erfolgte für si $\beta$ -Catenin #1 (si#1) und si $\beta$ -Catenin pool (si#2) jeweils im Vergleich mit der Kontrolle (siNeg). Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Für si#1 ergab sich ein  $p$ -Wert von 0,263 und für si#2 ein  $p$ -Wert von 0,955. Die Hinzugabe von 5-FU führte ebenfalls zu keiner signifikanten Radiochemotherapiesensibilisierung (si#1:  $p = 0,341$ ; si#2:  $p = 0,137$ ). Somit bewirkt auch bei OAC-P4C die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin durch siRNA keine Veränderung der Radiosensibilität.



**Abbildung 25: Koloniebildungstest von OAC-P4C und Bestrahlung 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 72 h. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot) und si#2 (blau) ( $n = 3$ ).

Der KBT für OE-19 erfolgte analog zu FLO-1 und OAC-P4C. Ein Nachweis der Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si $\beta$ -Catenin zu siNeg zum Zeitpunkt der Bestrahlung (48 h), ist in Abbildung 26 A dargestellt. Abbildung 26 B lässt erkennen, dass die Überlebensfraktionen von si#1 und si#2 mit steigender Strahlendosis deutlich stärker abnehmen, als die der siNeg-Kontrolle. Auch in Abbildung 26 C unter Bestrahlung und Behandlung mit 5-FU, lässt sich ein ähnlicher Effekt feststellen. Die statistische Auswertung erfolgte für si $\beta$ -Catenin #1 (si#1) und si $\beta$ -Catenin pool (si#2) jeweils im Vergleich mit der Kontrolle (siNeg). Für si#1 ergab sich ein  $p$ -Wert von  $8,267 \times 10^{-6}$  und für si#2 ein  $p$ -Wert von  $5,921 \times 10^{-6}$ . Unter Hinzugabe von 5-FU zeigte sich ebenfalls eine signifikante Radiosensibilisierung (si#1:  $p = 1,580 \times 10^{-7}$ ; si#2:  $p = 1,069 \times 10^{-5}$ ). Somit führt die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin mittels siRNA zu einer signifikanten Radio- und Radiochemotherapiesensibilisierung der Zelllinie OE-19.

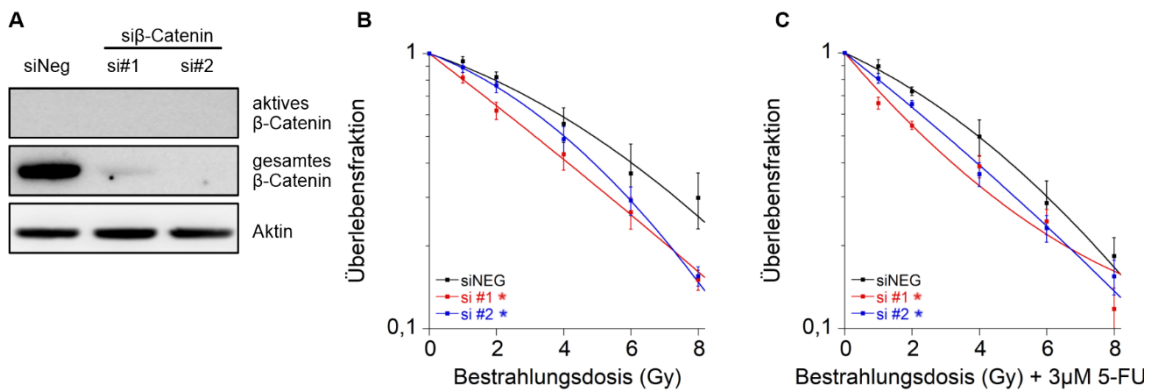


**Abbildung 26: Koloniebildungstest von OE-19 und Bestrahlung nach 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 48 h. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot) und si#2 (blau) ( $n = 3$ ).

Zuletzt erfolgte der KBT für OE-33. Ein Nachweis der Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si $\beta$ -Catenin zu siNeg zum Zeitpunkt der Bestrahlung (24 h) ist in Abbildung 27 A dargestellt. Aus Abbildung 27 B ist ersichtlich, dass die Überlebensfraktionen von si#1 und si#2 mit steigender Strahlendosis deutlich stärker abnehmen, als die der siNeg-Kontrolle. Auch in Abbildung 27 C, unter Bestrahlung und Behandlung mit 5-FU, kann man einen ähnlichen Effekt feststellen. Die statistische Auswertung erfolgte analog den Vorgängerversuchen. Für si#1 ergab sich ein  $p$ -Wert von 0,0014 und für si#2 ein  $p$ -Wert von 0,0426 im Vergleich mit siNeg. Unter Hinzugabe von 5-FU zeigte sich eine signifikante Steigerung der Radiochemotherapiesensibilisierung (si#1:  $p = 4,869 \times 10^{-5}$ ; si#2:  $p = 0,013$ ). Somit führt die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin mittels siRNA zu einer signifikanten

Radiotherapiesensibilisierung der Zelllinie OE-33. Die Hinzugabe von 5-FU als Radiosensitizer führt ebenso zu einer signifikanten Steigerung der Radiochemotherapiesensibilisierung.



**Abbildung 27: Koloniebildungstest von OE-33 und Bestrahlung nach 24 h unter Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin.**

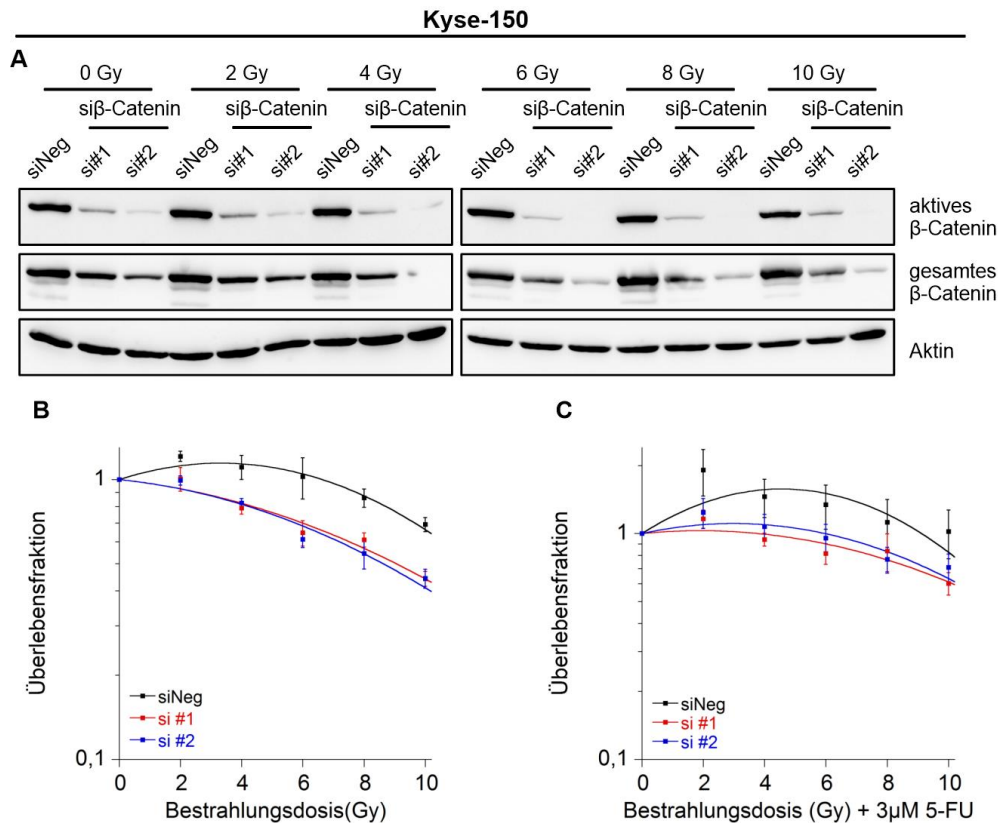
**A)** Immunfärbung von Aktin, aktives und gesamtes β-Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 24 h. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot) und si#2 (blau) (n = 3).

### 3.3 Einsatz von fraktionierter Bestrahlung bei Wnt/ β-Catenin-unabhängigen Zelllinien

In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Beeinflussung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs durch RNA-Interferenz zu einer Radiochemotherapiesensibilisierung bei den Zelllinien OE-33 und OE-19 führt. Bisher fanden diese Experimente unter singulärer Bestrahlung statt. In Anlehnung an das in der klinischen Praxis verwendete Modell, wurde in den *a priori* stark resistenten Tumorzellen der Wnt/β-Catenin-Signalweg durch den Einsatz von RNAi inhibiert und diese anschließend durch fraktionierte Bestrahlung behandelt (siehe Protokoll in Kapitel 2.2.7.2). Zusätzlich wurde zu jedem Bestrahlungszeitpunkt Protein isoliert, um die Herunterregulation von aktivem und gesamtem β-Catenin durch die siRNA gegen β-Catenin auf Proteinebene zu bestätigen. Hintergrund dieses Experiments war die Annahme, dass die Tumorzellen noch während ihrer Regenerationsphase von erneuter ionisierender Strahlung getroffen, und damit mehr DNA-Schäden zugefügt werden können. Es wurden bewusst die Zelllinien Kyse-150, Kyse-180, FLO-1 und OAC-P4C gewählt, da die die Modulation des Wnt/β-Catenin-Signalwegs hier bisher keinen Effekt gezeigt hatte und dies nun unter dem Aspekt der fraktionierten Bestrahlung näher evaluiert werden sollte.

In Abbildung 32 ist der KBT von Kyse-150 mit fraktionierter Bestrahlung 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen β-Catenin dargestellt. Die Abbildung 28 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich siβ-Catenin zu siNeg zu

jedem Zeitpunkt der Bestrahlung. Abbildung 28 B zeigt, dass die Behandlung mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin zu einer stärkeren Abnahme der Überlebensfraktionen im Vergleich zu der Kontrolle siNeg führt. Unter alleiniger Bestrahlung ergab sich für si#1 ein  $p$ -Wert von 0,002 und für si#2 ein  $p$ -Wert von 0,024. Abbildung 28 C zeigt die Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung unter Hinzunahme von 5-FU. Wie auch schon für RT gezeigt, konnte unter dieser Behandlung eine signifikante Radiochemotherapiesensibilisierung (si#1:  $p = 0,019$ ; si#2:  $p = 0,044$ ) nachgewiesen werden. Trotzdem weist diese Zelllinie immer noch einen insgesamt sehr resistenten Phänotyp auf.



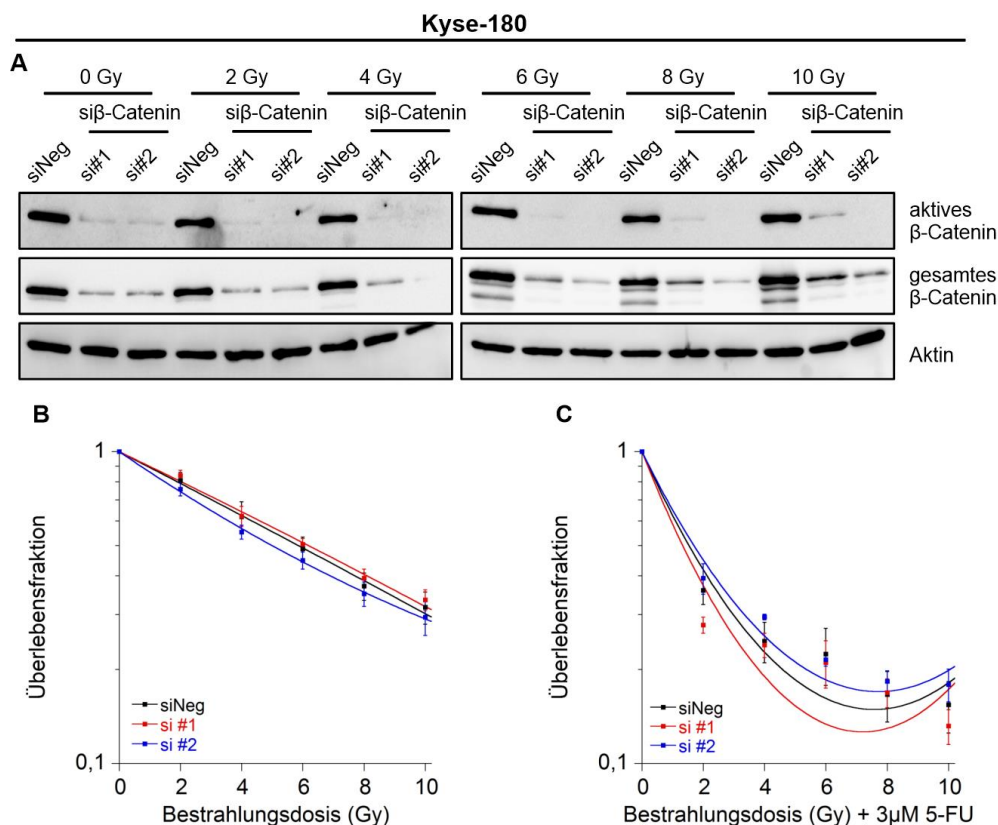
**Abbildung 28: Koloniebildungstest von Kyse-150 und fraktionierte Bestrahlung, Beginn 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten. Proteine wurden zu jedem Bestrahlungszeitpunkt isoliert. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot) und si#2 (blau). ( $n = 3$ ).

Die Ergebnisse des KBT von Kyse-180 mit fraktionierter Bestrahlung sind in Abbildung 29 dargestellt. Die Abbildung 29 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich siβ-Catenin zu siNeg zu jedem Zeitpunkt der Bestrahlung. Die Abbildung 29 B zeigt bei alleiniger Radiotherapie eine leichte Abnahme der Überlebensfraktion unter Behandlung mit si#2 im Vergleich mit siNeg, aber die Ergebnisse waren nicht signifikant (si#1:  $p = 0,502$ ; si#2  $p = 0,428$ ). Die Abbildung 29 C zeigt, dass eine Kombinationstherapie aus Bestrahlung und 5-FU bereits ab 2 Gy



Bestrahlungsdosis zu einem erheblichen Verlust der Überlebensfraktion aller Konditionen führt. Die Ergebnisse waren ebenfalls nicht signifikant (si#1:  $p = 0,116$ ; si#2:  $p = 0,120$ ). Somit hat die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung keine Auswirkung auf die Radiosensibilität von Kyse-180.



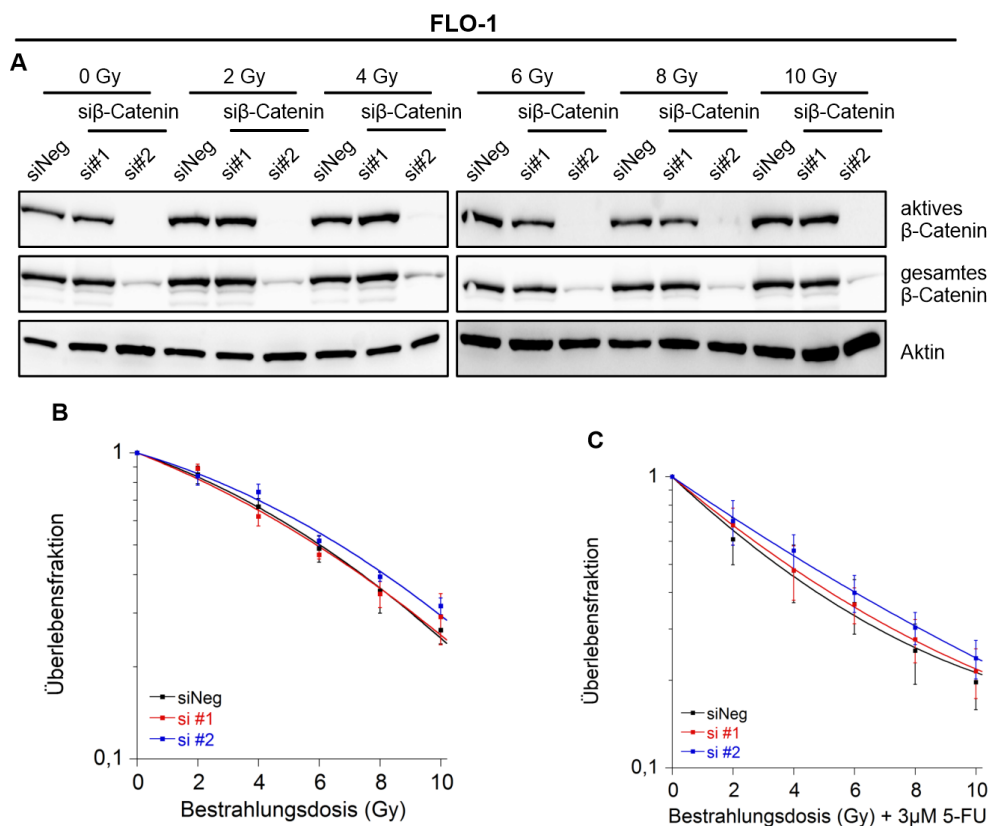
**Abbildung 29: Koloniebildungstest von Kyse-180 und fraktionierte Bestrahlung, Beginn 24 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten. Proteine wurden zu jedem Bestrahlungszeitpunkt isoliert. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot), si#2 (blau) ( $n = 3$ ).

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse des KBT von FLO-1 mit fraktionierter Bestrahlung dargestellt. Die Abbildung 30 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si#1 zu siNeg zu jedem Zeitpunkt der Bestrahlung. Für si#2 konnte zwar eine Reduktion, jedoch kein vollständiger *Knockdown* von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin erreicht werden. In Abbildung 30 B ist zu erkennen, dass die Behandlung mit si#2 unter Radiotherapie eine leichte Zunahme der Überlebensfraktion bewirkt im Vergleich zu siNeg. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (si#1:  $p = 0,498$ ; si#2  $p = 0,658$ ). Unter der Kombination aus Bestrahlung und 5-FU war dieser Effekt ähnlich ausgeprägt (Abbildung 30 C). Diese Ergebnisse waren auch nicht



signifikant (si#1:  $p = 0,813$ ; si#2:  $p = 0,792$ ). Somit hat die Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung keine Auswirkungen auf die Radiosensibilität von FLO-1.

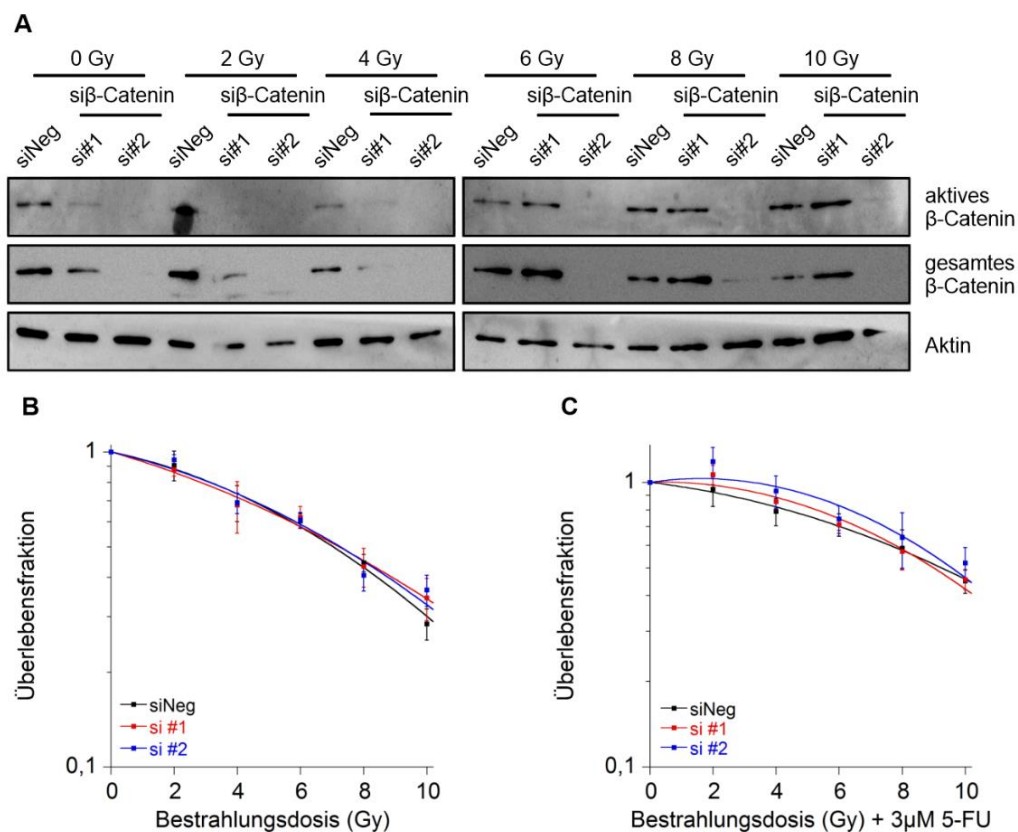


**Abbildung 30: Koloniebildungstest von FLO-1 und fraktionierte Bestrahlung, Beginn 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten. Proteine wurden zu jedem Bestrahlungszeitpunkt isoliert. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot), si #2 (blau) ( $n = 3$ ).

Die Ergebnisse des KBT von OAC-P4C mit fraktionierter Bestrahlung sind in Abbildung 31 zu sehen. Die Abbildung 31 A bestätigt durch Immunfärbung die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich si $\beta$ -Catenin zu siNeg zu den Bestrahlungsdosen von 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy. Ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung für 6 Gy ist nur noch für si #2 eine Herunterregulation von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin zu sehen. Abbildung 31 B lässt keinen Unterschied der Überlebensfraktionen aller Konditionen unter Radiotherapie erkennen. Es war kein signifikanter Effekt messbar (si#1:  $p = 0,495$ ; si#2:  $p = 0,324$ ). Die Kombination aus Bestrahlung und 5-FU bewirkte ebenfalls keine zusätzliche Verstärkung der Radiosensibilität, für si#2 sogar eher eine leichte Zunahme der Resistenz (Abbildung 31 C), (si#1:  $p = 0,213$ ; si#2:  $p = 0,032$ ). Nach Auswertung der Ergebnisse bewirkt die Herunterregulation von aktivem und gesamtem

$\beta$ -Catenin in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung keine Radiosensibilisierung von OAC-P4C. Die Kombination mit 5-FU bewirkt sogar eine leichte Resistenzentwicklung.



**Abbildung 31: Koloniebildungstest von OAC-P4C bei fraktionierter Bestrahlung, Beginn 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin.**

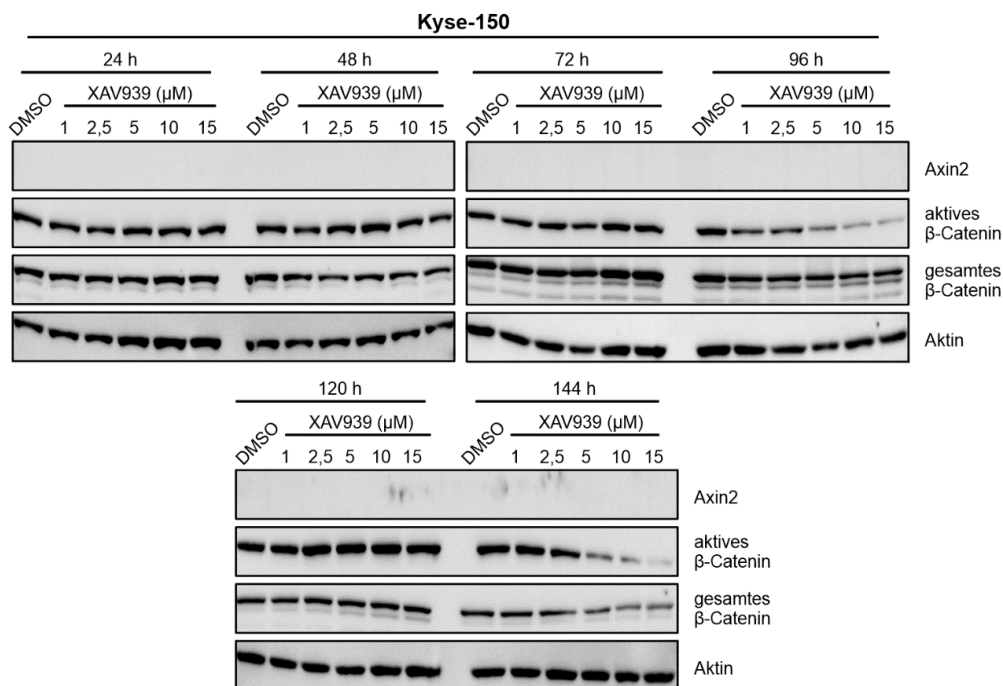
**A)** Immunfärbung von Aktin, aktives  $\beta$ -Catenin und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten. Proteine wurden zu jedem Bestrahlungszeitpunkt isoliert. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen siNeg (schwarz), si#1 (rot), si #2 (blau) (n = 3).

### **3.4 Die Anwendung des kleinmolekularen Inhibitors XAV939**

In den vorangegangenen Experimenten mit RNAi konnte die Relevanz des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalwegs für die Vermittlung von Radio-Chemotherapieresistenz bestätigt werden. Auf Grund klinisch schwieriger Anwendung der siRNA's, wurde sich für Versuche mit XAV939 entschieden. XAV939, ein kleinmolekularer Inhibitor von Tankyrasen, bietet im Vergleich zu den Experimenten mit siRNA einen möglichen Ansatz für eine zukünftige klinische Anwendung (Huang et al. 2009). Die Hauptwirkung dieses Inhibitors besteht in der Stabilisation von Axin2. Dadurch kommt es wiederum zu einer verstärkten Degradation von  $\beta$ -Catenin (Huang et al. 2009). Somit wird der Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibiert (Abbildung 3).

#### **3.4.1 Dosis- und Zeitpunktermittlung**

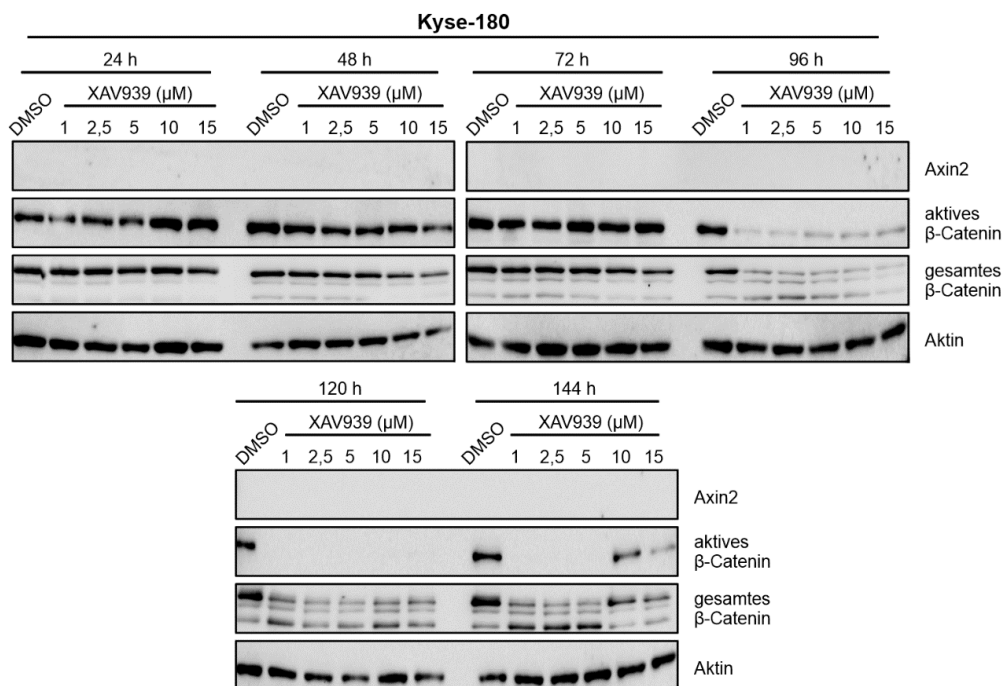
Für die Experimente mit XAV939 wurde mit den beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien Kyse-150 und Kyse-180 begonnen. Zunächst erfolgte die Ermittlung des optimalen Zeitpunkts und der richtigen Dosis (siehe Kapitel 2.2.3.1). Es wurden Inkubationszeiten von 24 h bis 144 h und Konzentrationen von 1  $\mu$ M - 15  $\mu$ M XAV939 gewählt. In Abbildung 32 ist die Konzentrationsreihe von Kyse-150 unter Inkubation mit XAV939 dargestellt. Axin2 ist über allen Zeitpunkten hinweg nicht per Immunodetektion nachweisbar. Von 24 h bis 72 h Inkubationszeit lässt sich keine Veränderung der Proteinexpression von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich XAV939 zu der Negativkontrolle DMSO detektieren. Zum 96 h Inkubationszeitpunkt ist mit steigender XAV939 Dosis eine Abnahme der Proteinexpression von aktivem und gesamtem  $\beta$  Catenin im Vergleich zu der Kontrolle zu erkennen. Der Effekt ist bei 120 h Inkubationszeit wieder aufgehoben, kommt aber nach 144 h wieder. Da der Zeitpunkt für die Folgeexperimente nicht eindeutig festgelegt werden konnte, wurde die Zelllinie nicht für Bestrahlungsexperimente mit XAV939 verwendet.



**Abbildung 32: Konzentrationsreihe Kyse-150 mit XAV939.**

Inkubation über 24 h – 144 h mit Konzentrationen von 1 µM – 15 µM XAV939 und anschließender Immunfärbung gegen Aktin, Axin2, aktives und gesamtes-β-Catenin.

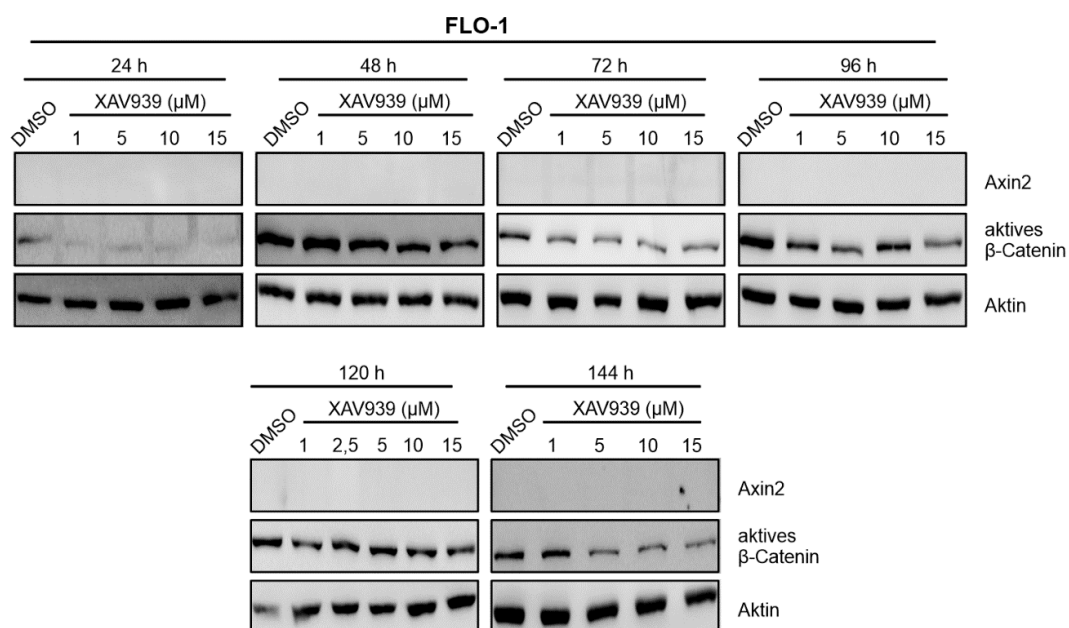
Für die Konzentrationsreihe von Kyse-180 wurde analog zu Kyse-150 verfahren. Abbildung 33 zeigt auch bei Kyse-180 in der Immunfärbung gegen Axin2 keine Expression was auf ein sehr geringes Expressionslevel hinweist. Zum 24 h Inkubationszeitpunkt ist eine leichte Abnahme von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich 1, 2,5 und 5 µM XAV939 zu DMSO festzustellen. Ab 48 h Inkubation ist der Effekt zusätzlich bei 10 und 15 µM XAV939 zu sehen. Zum 72 h Zeitpunkt sind die Proteinexpressionslevel von aktivem und gesamtem β-Catenin wieder angehoben, was vermutlich aber auf eine ungleiche Beladung der Proben zurückzuführen ist (Aktin ist in den XAV939-Proben deutlich stärker angefärbt als DMSO). Nach 96 h erfolgt eine deutliche und kontinuierliche Herunterregulation von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich XAV939 zu DMSO. Dieser Effekt hält bis 144 h an und ist dosisabhängig. Somit ist, trotz nicht messbaren Effektes auf Axin2, von einer Wirkung des Inhibitors ab 96h Inkubationszeit auszugehen. Für die Folgeexperimente mit Kyse-180 wurde der 144 h Zeitpunkt gewählt.



**Abbildung 33: Konzentrationsreihe Kyse-180 mit XAV939.**

Inkubation über 24 h – 144 h mit Konzentrationen von 1 µM – 15 µM XAV939 und anschließender Immunfärbung gegen Aktin, Axin2, aktives- und Gesamtes-β-Catenin.

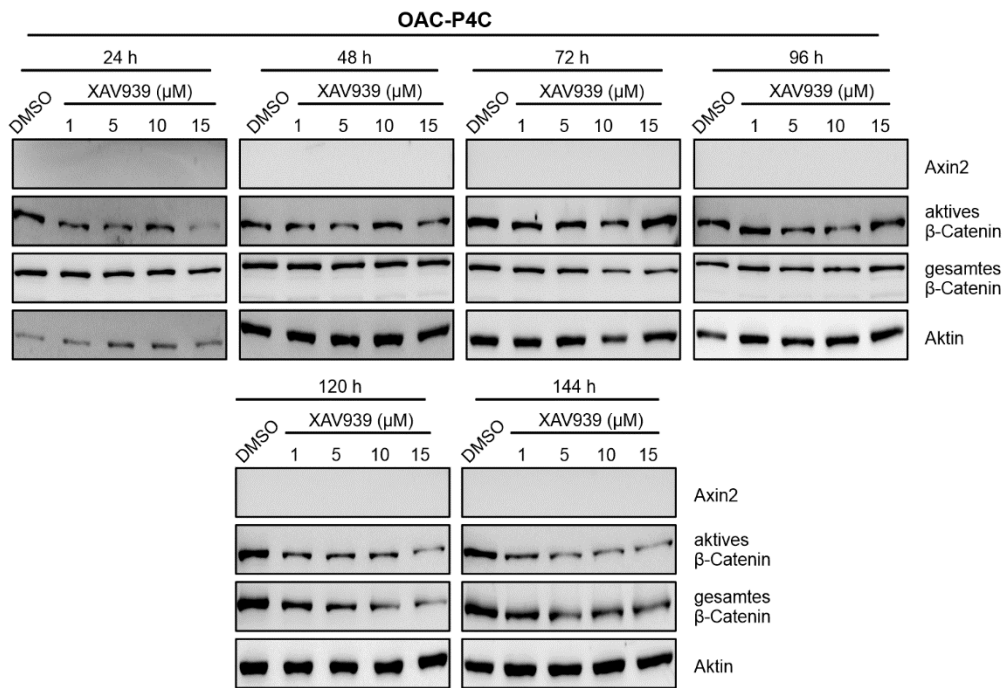
Analog den Vorversuchen mit den Plattenepithelkarzinomzelllinien erfolgten auch für die Adenokarzinomzelllinien Konzentrationsreihen für die Behandlung mit XAV939 (siehe Kapitel 2.2.3.1). Zur Vereinheitlichung und besseren Vergleichbarkeit erfolgten die Versuche mit denselben Konditionen wie für die Plattenepithelkarzinomzelllinien. In ist die Konzentrationsreihe von FLO-1 mit Inkubationszeiten von 24 h bis 144 h XAV939 dargestellt. Zum 24 h Zeitpunkt ist das aktive β-Catenin bei allen XAV939-Konzentrationen im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle vermindert. Dies scheint aber auf Grund des Aussehens der Banden ein Artefakt zu sein. Erst ab 120 h Inkubationszeit zeichnet sich eine leichte Abnahme des aktivem β-Catenin im Vergleich XAV939 zu der DMSO-Kontrolle ab. Dieser Effekt ist noch deutlicher nach 144 h Inkubationszeit mit XAV939 sichtbar, weshalb dieser Zeitpunkt für die Folgeexperimente verwendet wurde. Auf Grund technischer Schwierigkeiten und fehlerhafter Antikörpercharge konnte hier keine Immunfärbung gegen das gesamte β-Catenin erfolgen.



**Abbildung 34: Konzentrationsreihe FLO-1 mit XAV939.**

Inkubation über 24 h – 144 h mit Konzentrationen von 1 µM – 15 µM XAV939 und anschließender Immunfärbung gegen Aktin, Axin2 und aktives β-Catenin.

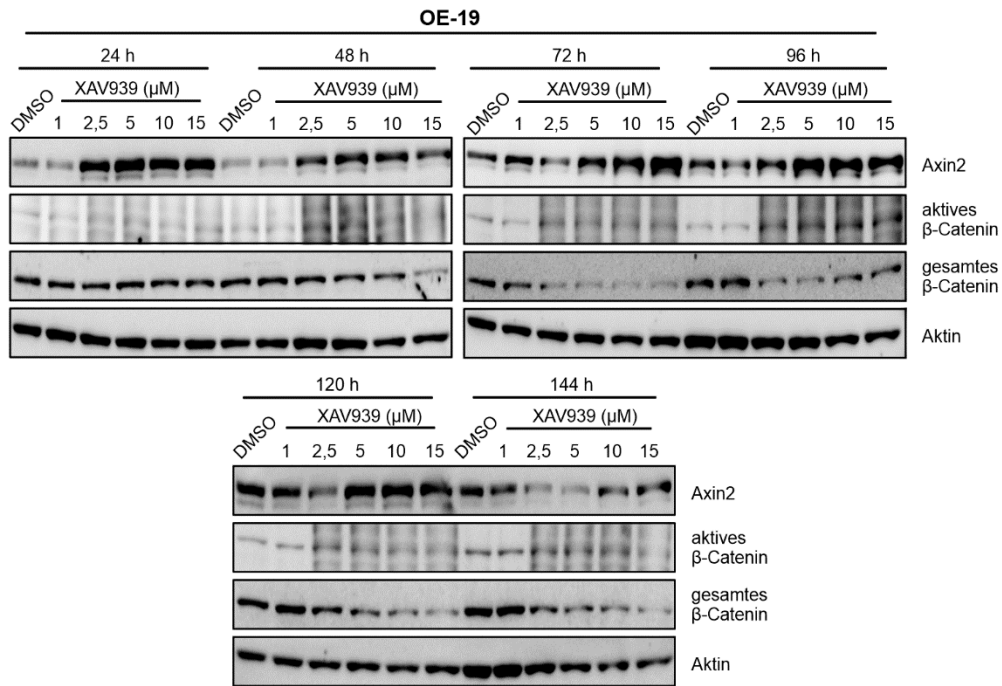
Als nächstes wurde die Konzentrationsreihe von OAC-P4C mit XAV939 erstellt. Es ließ sich keine Expression von Axin2 in der Immunfärbung nachweisen (Abbildung 40). Ab dem 96 h Inkubationszeit ist eine leichte Abnahme von aktivem und gesamtem β-Catenin im Vergleich XAV939 zur DMSO-Kontrolle erkennbar. Dieser Effekt nimmt mit weiterer Inkubationsdauer zu und ist bei 144 h Inkubationsdauer noch messbar. Somit ist, trotz nicht nachweisbaren Effektes auf Axin2, von einer Wirkung des Inhibitors bei einer Inkubationszeit zwischen 96 h bis 144 h auszugehen. Auf Grund der oben beschriebenen Beobachtungen wurde der 144 h Zeitpunkt für die Folgeexperimente verwendet.



**Abbildung 35: Konzentrationsreihe OAC-P4C mit XAV939.**

Inkubation über 24 h – 144 h mit Konzentrationen von 1 µM – 15 µM XAV939 und anschließender Immunfärbung gegen Aktin, Axin2, aktives und gesamtes-β-Catenin.

Bei der initialen Überprüfung der Ösophaguskarzinomzelllinien hinsichtlich ihres Proteinexpressionsprofils war OE-19 die einzige Zelllinie, die Axin2 aufwies (siehe Abbildung 8). Die Abbildung 36 zeigt eine zunehmende Stabilisierung von Axin2 mit steigender XAV939-Konzentration von 24 h bis 120 h im Vergleich XAV zur DMSO-Kontrolle. Zum Zeitpunkt 144 h nach Inkubation, nimmt die Proteinexpression von Axin2 wieder leicht ab. Die Proteinexpression von aktivem β-Catenin ist, auf Grund der ohnehin niedrigen Spiegel von aktivem β-Catenin im Nativ-Zustand der Zellen, nicht adäquat beurteilbar. Die Proteinexpression von gesamtem β-Catenin ist 24 h nach Inkubation noch unverändert. Nach 48 h Inkubationszeit ist ab 2,5 µM XAV eine Abnahme der Proteinexpression des totalen β-Catenin im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Ab 72 h Inkubationszeit ist dieser Effekt noch stärker ausgeprägt und hält bis 144 h an. Somit wurde gezeigt, dass XAV939 bei OE-19 zu einer Stabilisierung von Axin2 und zu einer Reduktion von gesamtem β-Catenin führt. Es wurde für die Folgeexperimente der 96 h Inkubationszeitpunkt gewählt.

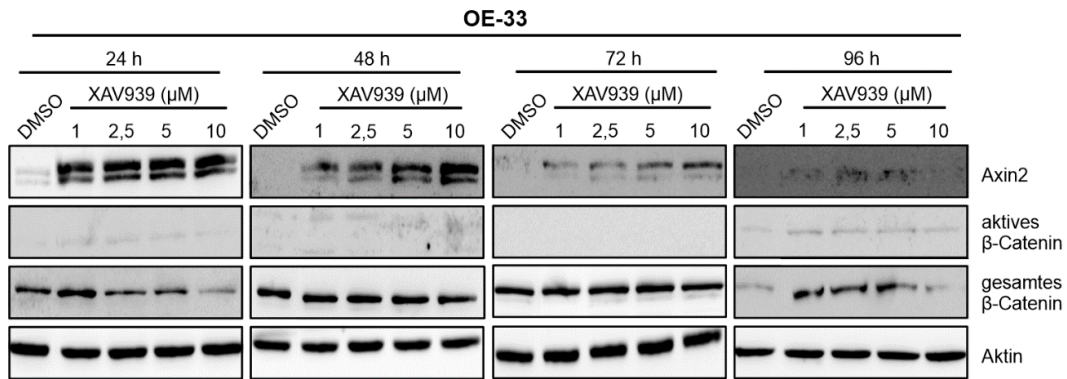


**Abbildung 36: Konzentrationsreihe OE-19 mit XAV939.**

Inkubation über 24 h - 144 h mit Konzentrationen von 1 µM – 15 µM XAV939 und anschließender Immunfärbung gegen Aktin, Axin2, aktives und gesamtes-β-Catenin.

In Abbildung 37 ist die Konzentrationsreihe von OE-33 unter Behandlung mit XAV939 dargestellt. Es zeigt sich eine zunehmende Stabilisierung von Axin2 mit steigender XAV939-Konzentration für den 24 h und 48 h Zeitpunkt im Vergleich XAV939 zur DMSO-Kontrolle. Danach nimmt die Axin2-Expression ab. Wie bei OE-19 ist auch bei OE-33 die Proteinexpression von aktivem β-Catenin auf Grund des niedrigen Proteinspiegels von aktivem β-Catenin im Nativ-Zustand der Zellen nicht adäquat beurteilbar. Die Proteinexpression von gesamtem β-Catenin ist bereits 24 h nach Inkubation reduziert im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle und korreliert mit aufsteigender XAV939-Konzentration. Nach 48 h Inkubationszeit ist der Effekt von XAV939 auf das gesamte β-Catenin im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr nachweisbar. Daher wurde für die Folgeexperimente der 24 h Zeitpunkt gewählt. Es wurde gezeigt, dass XAV939 bei OE-33 zu einer Stabilisierung von Axin2 und zu einer Reduktion von gesamtem β-Catenin führt.





**Abbildung 37: Konzentrationsreihe OE-33 mit XAV939.**

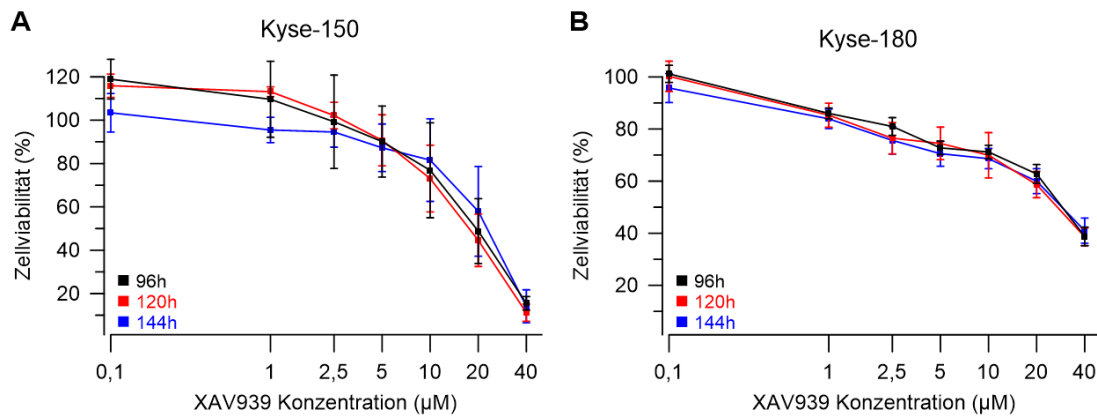
Inkubation über 24 h - 96 h mit Konzentrationen von 1 µM – 10 µM XAV939 und anschließender Immunfärbung gegen Aktin, Axin2, aktives und gesamtes-β-Catenin.

### 3.4.2 Einfluss von XAV939 auf die Zellviabilität

Nach Abschluss der Konzentrationsreihen zur Ermittlung eines optimalen Zeitpunkts erfolgten als nächster Schritt Zellviabilitätstests mit zuvor festgelegten Konzentrationen (0,1 µM – 40 µM XAV939) und Zeitpunkten (96 h, 120 h, 144 h), um mögliche Nebenwirkungen von XAV939 auf den Zellmetabolismus beurteilen zu können (siehe Kapitel 2.2.5.2). Als *Cut-off* wurde eine Zellviabilität von 70 – 80 % angenommen. Alle Werte darunter deuteten auf eine Einschränkung der Zellviabilität hin.

In Abbildung 38 A ist der Zellviabilitätstest von Kyse-150 dargestellt. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Konditionen 96 h (schwarz), 120 h (rot) und 144 h (blau) feststellen. Bis zu einer XAV939 Konzentration von 10 µM ist die Zellviabilität noch nicht eingeschränkt. Mit weiter steigenden XAV939-Konzentrationen von über 10 µM, sinkt die Zellviabilität jedoch erheblich. Somit konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von 0,1 bis 10 µM XAV939 für Kyse-150 mit den Zeitpunkten 96 h, 120 h und 144 h, keine relevante Einschränkung der Zellviabilität bewirken.

Der Zellviabilitätstest mit Kyse-180 wurde ebenso durchgeführt. Abbildung 38 B zeigt, dass der Zellmetabolismus von Kyse-180 bereits ab einer XAV939-Konzentration von 2,5 µM unter 80 % sinkt. Ein Unterschied zwischen den zeitlichen Konditionen ist nicht zu erkennen. Bei einer XAV939-Konzentration von 10 µM beträgt die Zellviabilität noch ungefähr 70 % ihres Ausgangswerts. Somit ist bis zu dieser Konzentration nicht mit einer wesentlichen Beeinträchtigung im Wachstumsverhalten der Zelllinie zu rechnen.

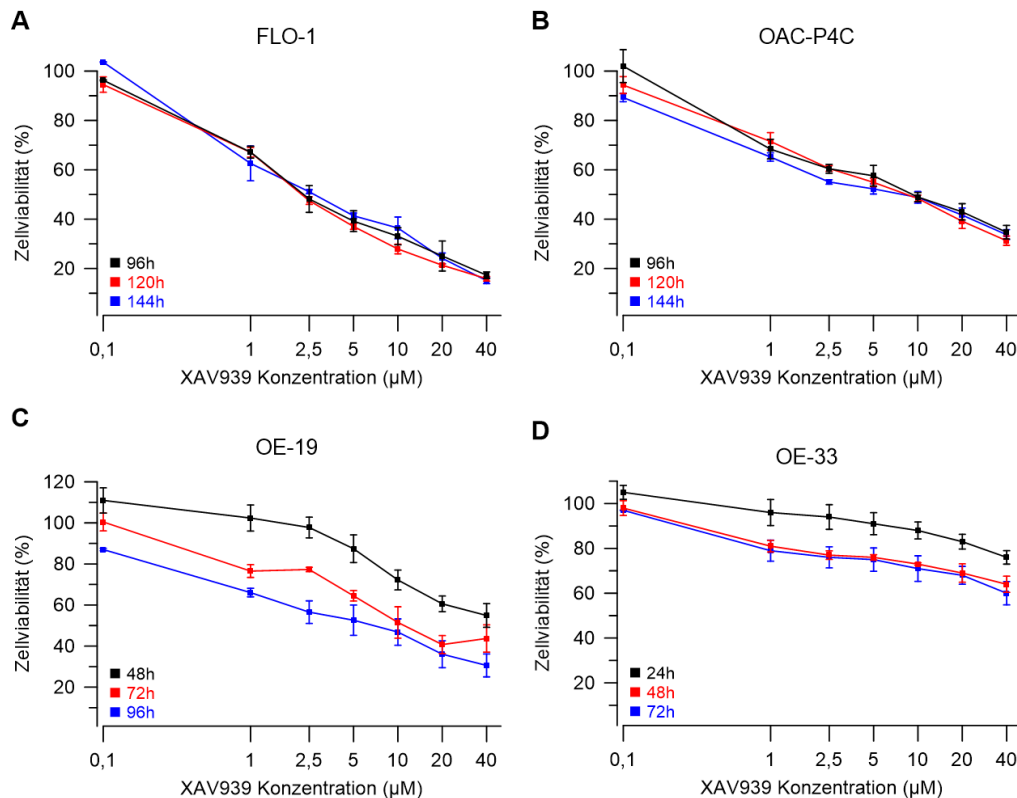


**Abbildung 38: Zellviabilitätsmessungen nach Inkubation mit XAV939.**

Messung der zellulären Viabilität per *Celltiter blue assay* von **A)** Kyse-150 und **B)** Kyse-180 nach 96 h (schwarz), 120 h (rot) und 144 h (blau) (n = 3).

In Abbildung 39 A ist der Zellviabilitätstest von FLO-1 aufgeführt. Zwischen den verschiedenen Zeiten ist kein Unterschied zu erkennen. Bereits ab einer Konzentration von 1 µM XAV939 ist eine deutliche Abnahme der Zellviabilität zu sehen. Mit steigender Konzentration von XAV939 nimmt die Zellviabilität sukzessive ab, sodass bei einer XAV-Konzentration von 10 µM die Zellviabilität nur noch ca. 40 % von ihrem Ausgangswert beträgt.

Abbildung 39 B zeigt den Zellviabilitätstest von OAC-P4C unter Behandlung mit XAV939. Zwischen den verschiedenen Zeiten ist kein Unterschied zu erkennen. Wie auch bei FLO-1, führt die Behandlung von XAV939 schon ab einer Dosis von 1 µM zu einer Reduktion der Viabilität um 30 %. Eine weitere Erhöhung der XAV-Konzentration geht mit einem kontinuierlichen Viabilitätsverlust einher. Bei einer Konzentration von 10 µM XAV939 beträgt die Zellviabilität noch ca. 50 % des Ausgangswertes. Somit führt die Behandlung von FLO-1 mit XAV939 dosisabhängig zu einer Einschränkung der zellulären Viabilität.



**Abbildung 39: Zellviabilitätsmessungen nach Inkubation mit XAV939.**

Messung der zellulären Viabilität per *Celltiter blue assay*: **A)** FLO-1 und **B)** OAC-P4C nach 96 h (schwarz), 120 h (rot) und 144 h (blau) (n=3); **C)** OE-19 nach 48 h (schwarz), 72 h (rot) und 96 h (blau) (n=3); **D)** OE-33 nach 24 h (schwarz), 48 h (rot) und 72 h (blau) (n = 3).

In Abbildung 39 C ist der Zellviabilitätstest von OE-19 unter Behandlung mit XAV939 dargestellt. Da der optimale Zeitpunkt der XAV939 Behandlung 96 h betrug, wurden hier als Konditionen 48 h, 72 h und 96 h gewählt. Es ist zu erkennen, dass nicht nur die Konzentration von XAV939, sondern auch die Dauer der Inkubation mit XAV939, Einfluss auf die Zellviabilität von OE-19 haben. So führt eine Inkubationsdauer von 48 h beispielsweise bei einer Dosis von 1 µM XAV939 zu keinerlei Viabilitätsverlust. Bei 72 h hingegen beträgt die Zellviabilität nur noch 80 % und bei 96 h nur noch 70 % vom Ausgangswert. Mit steigender XAV-Konzentration nimmt die Zellviabilität ab ebenfalls ab. Dieser Effekt ist für die 48 h Kondition (schwarzer Graph) leicht ausgeprägt und bei der 96 h Kondition (blauer Graph) am deutlichsten zu erkennen. So beträgt die Zellviabilität nach 96 h Inkubationszeit bei einer Dosis von 10 µM XAV939 nur noch ungefähr 50 % vom Ausgangswert. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Behandlung von OE-19 mit XAV939 zeit- und dosisabhängig zu einer Einschränkung der zellulären Viabilität führt.

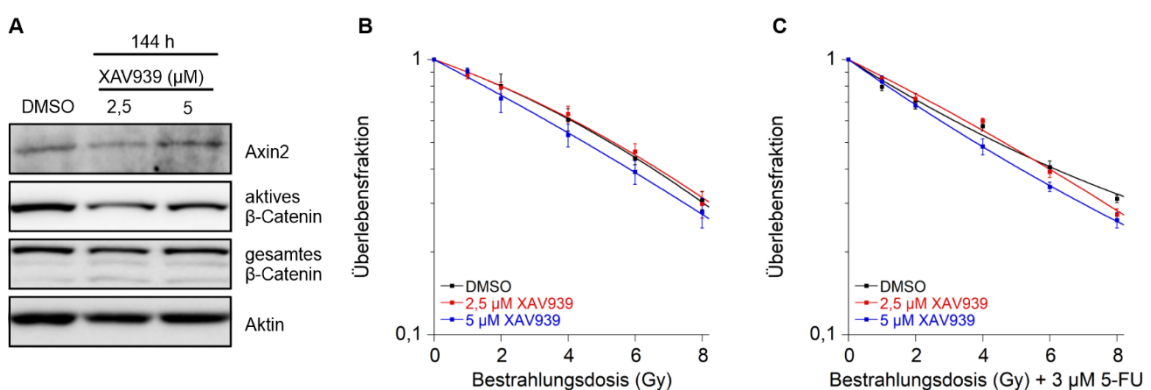
Abbildung 39 D stellt den Zellviabilitätstest von OE-33 unter Behandlung mit XAV939 dar. Als optimaler Zeitpunkt wurde 24 h gewählt. Deshalb erfolgte die Viabilitätstestung zu den Zeiten 24 h, 48 h und 72 h. Wie bereits bei OE-19 zu erkennen war, haben Zeit

und Konzentration von XAV939 ebenfalls bei OE-33 einen Einfluss auf die Zellviabilität. Der Zeiteffekt kann hier zwischen den Konditionen 24 h und 48 h/72 h beobachtet werden. Insgesamt zeigt OE-33 eine deutlich geringere Beeinträchtigung des Zellmetabolismus durch XAV939. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  XAV939 beträgt die Zellviabilität noch ca. 88 % des Ausgangswertes für 24 h vs. 73 % für 48 h und 72 h. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von OE-33 mit XAV939 zeit- und dosisabhängig zu einer mäßigen Einschränkung der zellulären Viabilität führt, welche aber keine Beeinflussung der nachfolgenden Versuche darstellt.

### 3.4.3 Effekt von XAV939 auf die Radiochemotherapiesensibilität

Nach Durchführung der Vorversuche sollte der Effekt der XAV939-Behandlung auf die Radiosensibilität untersucht werden. Hierfür wurden Koloniebildungstests durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.7.3). Aufgrund des inkonsistenten Effektes von XAV939 in der Zelllinie Kyse-150, wurde hier auf die Durchführung eines KBT verzichtet.

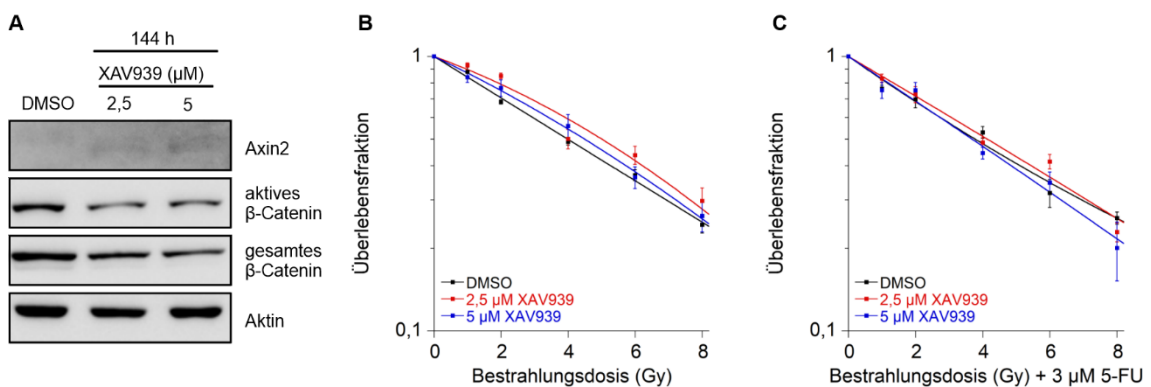
Die Ergebnisse des KBT mit Kyse-180 sind in Abbildung 40 illustriert. Als Konditionen wurden DMSO (Kontrolle), 2,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  XAV939 gewählt. Abbildung 40 A bestätigt die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Aus Abbildung 40 B lässt sich kein Unterschied in der Abnahme der Überlebensfraktion zwischen den einzelnen Konditionen erkennen (2,5  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,453$ ; 5  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,308$ ). Die Kombination von Bestrahlung mit 5-FU führt ebenfalls zu keinem nachweisbaren Effekt zwischen der Behandlung mit XAV939 und der DMSO-Kontrolle (Abbildung 40 C; 2,5  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,087$ ; 5  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,221$ ). Demnach führte die Behandlung von Kyse-180 mit XAV939 zu keiner Sensibilisierung gegenüber einer Radio- bzw. einer Radiochemotherapie.



**Abbildung 40: Koloniebildungstest von Kyse-180 und Bestrahlung nach 144 h Inkubationszeit mit XAV939.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, Axin2, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zellysaten, isoliert nach 144 h, zur Bestätigung des Effektes von XAV939 auf Proteinebene. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis + 5-FU mit den Konditionen DMSO (schwarz), 2,5  $\mu\text{M}$  XAV939 (rot), 5  $\mu\text{M}$  XAV939 (blau). ( $n = 3$ ).

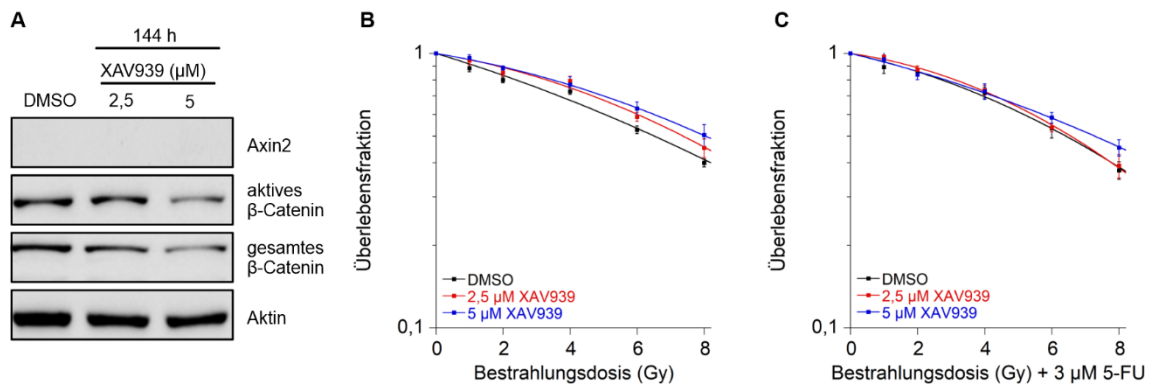
In der Abbildung 41 sind die Ergebnisse des KBT von FLO-1 mit XAV939 aufgeführt. In Abbildung 41 A bestätigt die Immunfärbung durch eine Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle die Wirkung des Inhibitors zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Bei der Radiotherapie lässt sich keine Sensibilisierung nach der Behandlung mit XAV939 erkennen (Abbildung 41 B; 2,5  $\mu$ M:  $p = 0,15$ ; 5  $\mu$ M:  $p = 0,247$ ). Überraschenderweise führte die Gabe von 2,5  $\mu$ M XAV939 mit anschließender Bestrahlung sogar zu einer leichten Resistenzvermittlung im Vergleich zur DMSO-behandelten Gruppe. Abbildung 41 C zeigt, dass auch der Einsatz einer Radiochemotherapie nach der Behandlung mit XAV939 zu keiner signifikanten Veränderung der Koloniebildungsfähigkeit der zu untersuchenden Gruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (2,5  $\mu$ M:  $p = 0,981$ ; 5  $\mu$ M:  $p = 0,779$ ) führt.



**Abbildung 41: Koloniebildungstest von FLO-1 und Bestrahlung nach 144 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, Axin2, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 144 h, zur Bestätigung des Effektes von XAV939 auf Proteinebene. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis + 5-FU der Zelllinie FLO-1 mit den Konditionen DMSO (schwarz), 2,5  $\mu$ M XAV939 (rot), 5  $\mu$ M XAV (blau) ( $n = 3$ ).

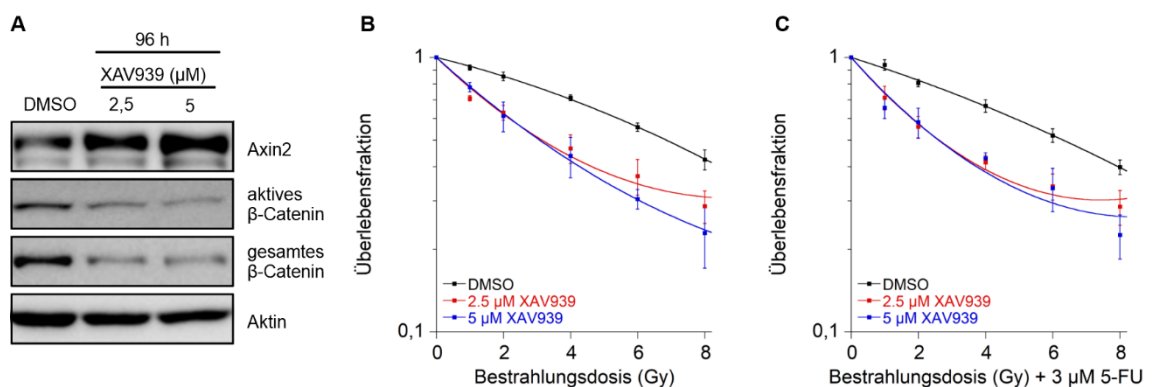
Als nächstes wurde der KBT für OAC-P4C nach Behandlung mit XAV939 durchgeführt. Abbildung 42 A bestätigt durch die Immunfärbung die Abnahme von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Bei alleiniger Radiotherapie führt die Behandlung mit XAV939 zu einer Resistenzentwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 42 B; 2,5  $\mu$ M:  $p = 0,074$ ; 5  $\mu$ M:  $p = 0,003$ ). In Abbildung 42 C lässt sich unter der Kombinationstherapie von Bestrahlung und 5-FU kein Unterschied in den Überlebensfraktionen zwischen den einzelnen Konditionen erkennen (2,5  $\mu$ M:  $p = 0,862$ ; 5  $\mu$ M:  $p = 0,690$ ). Demnach führt die Behandlung von OAC-P4C mit XAV939 zu keiner Radiosensibilisierung. Die Hinzugabe von 5-FU führt ebenfalls zu keiner signifikanten Radiochemotherapiesensibilisierung.



**Abbildung 42: Koloniebildungstest von OAC-P4C und Bestrahlung nach 144 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.**

A) Immunfärbung von Aktin, Axin2, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 144 h, zur Bestätigung des Effektes von XAV939 auf Proteinebene. B) Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und C) Überlebensfraktion in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis + 5-FU der Zelllinie OAC-P4C mit den Konditionen DMSO (schwarz), 2,5  $\mu$ M XAV939 (rot), 5  $\mu$ M XAV939 (blau) (n = 3).

In der Abbildung 43 ist der KBT von OE-19 nach Behandlung mit XAV939 dargestellt. Abbildung 43 A bestätigt durch die Immunfärbung zum Zeitpunkt der Bestrahlung eine Stabilisierung von Axin2 und den konsekutiven Abbau von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Der Abbildung 43 B ist zu entnehmen, dass es unter Radiotherapie zu einer stärkeren Abnahme der Überlebensfraktion der XAV-Konditionen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kommt (2,5  $\mu$ M:  $p < 0,001$ ; 5  $\mu$ M:  $p < 0,001$ ). Die Kombination von Bestrahlung und 5-FU führt bei der Behandlung mit XAV939 zu einer ähnlichen starken Abnahme der Überlebensfraktionen im Vergleich zu DMSO (Abbildung 43 C; 2,5  $\mu$ M:  $p < 0,001$ ; 5  $\mu$ M:  $p < 0,001$ ). Die Behandlung von OE-19 mit XAV939 führt somit zu einer signifikanten Radio- und Radiochemotherapiesensibilisierung.



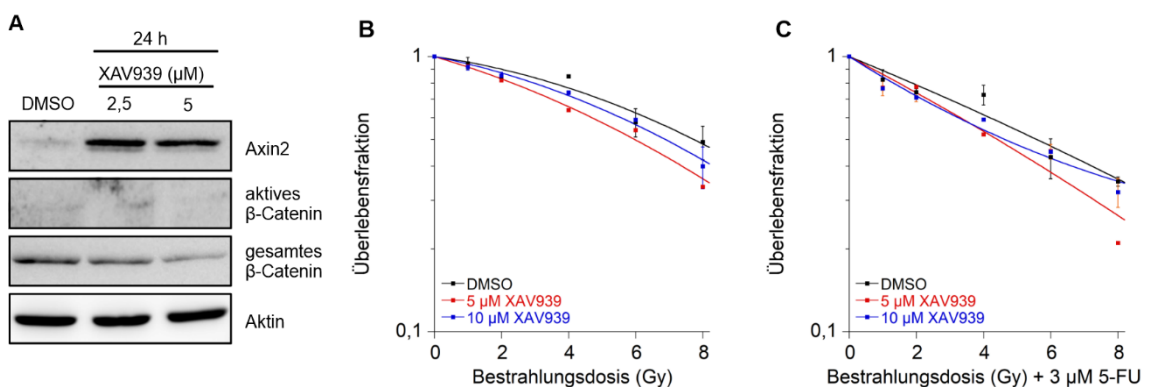
**Abbildung 43: Koloniebildungstest von OE-19 und Bestrahlung nach 96 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.**

A) Immunfärbung von Aktin, Axin2, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zelllysaten, isoliert nach 96 h. B) Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und C) Überlebensfraktion in



Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis + 5-FU der Zelllinie OE-19 mit den Konditionen DMSO (schwarz), 2,5  $\mu\text{M}$  XAV939 (rot), 5  $\mu\text{M}$  XAV939 (blau) ( $n = 3$ ).

In der Abbildung 44 ist der KBT von OE-33 nach Behandlung mit XAV939 dargestellt. Abbildung 44 A bestätigt durch die Immunfärbung zum Zeitpunkt der Bestrahlung eine Stabilisierung von Axin2 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. In Abbildung 44 B lässt sich erkennen, dass es unter Radiotherapie zu einer Sensibilisierung nach Hinzugabe von XAV939 (5  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,0001$ ; 10  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,012$ ) kommt. Die Kombination von Bestrahlung und 5-FU führte bei der Behandlung mit XAV939 zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier bewirkte die Behandlung von OE-33-Zellen mit XAV939 eine Therapiesensibilisierung im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle (Abbildung 44 C; 5  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,004$ ; 10  $\mu\text{M}$ :  $p = 0,046$ )).



**Abbildung 44: Koloniebildungstest von OE-33 und Bestrahlung nach 24 h Inkubationszeit mit XAV939 und Kontrolle per Westernblot.**

**A)** Immunfärbung von Aktin, Axin2, aktives und gesamtes  $\beta$ -Catenin aus Zellysaten, isoliert nach 24 h. **B)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. **C)** Überlebensfraktion in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis + 5-FU der Zelllinie OE-33 mit den Konditionen DMSO (schwarz), 5  $\mu\text{M}$  XAV939 (rot), 10  $\mu\text{M}$  XAV939 (blau) ( $n = 3$ ).

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die beschriebenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die hier untersuchten Ösophaguskarzinomzelllinien weisen eine unterschiedlich starke Aktivität und Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs auf.
2. Eine signifikante Radio(chemo)therapiesensibilisierung nach siRNA - basierter Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist nur in den beiden Wnt-aktiven Adenokarzinomzelllinien OE-19 und OE-33 festzustellen. Für die anderen beiden Adenokarzinomzelllinien (FLO-1 und OAC-P4C) sowie die beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien (Kyse-150 und Kyse-180) zeigte sich kein verbessertes Therapieansprechen.

3. Die Kombination von siRNA – basierter Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und fraktionierter Bestrahlung bewirkt nur bei Kyse-150 eine signifikante Radiosensibilisierung, bei allerdings immer noch sehr resistantem Phänotyp.
4. Die Behandlung mit dem *small-molecule* Inhibitor XAV939 führt in den Zelllinien OE-19 und OE-33 zu einer Stabilisierung von Axin2. Eine signifikante Radiosensibilisierung kann nur bei OE-19 und OE-33 beobachtet werden.
5. Der Effekt einer möglichen Radiosensibilisierung durch Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist abhängig von der basalen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität einer Zelle.



## 4 Diskussion

Die neoadjuvante oder definitive Radiotherapie oder Radiochemotherapie sowie die radikale chirurgische Resektion sind fester Bestandteil der Therapie des fortgeschrittenen Ösophaguskarzinoms. Jedoch treten Lokalrezidive und Fernmetastasen noch immer in gehäufter Weise auf, was einen Hauptgrund für die unbefriedigende Überlebensrate darstellt (Sjoquist et al. 2011; van Hagen et al. 2012).

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass ein erhöhtes Expressionsniveau von  $\beta$ -Catenin beim kolorektalen Karzinom und Pankreaskarzinom mit vermehrter Radiotherapieresistenz einhergeht (Wang L et al. 2013; Watson et al. 2010). Zudem führt eine Inhibierung von  $\beta$ -Catenin zu einer Radiotherapiesensibilisierung beim Pankreaskarzinom (Watson et al. 2010) und auch beim kolorektalen Karzinom (Emons et al. 2017).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs eine Radiotherapiesensibilisierung beim Ösophaguskarzinom bewirkt. Hierzu wurden sechs Ösophaguskarzinomzelllinien (zwei Plattenepithel- sowie vier Adenokarzinomzelllinien) untersucht. Als erstes wurde per Westernblot und *dual-luciferase-reporter-assay* die Aktivität und Aktivierbarkeit des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweges bestimmt. Anschließend wurde selektiv mittels RNA-Interferenz  $\beta$ -Catenin inhibiert und die Auswirkung auf die Radiotherapieresistenz der Zelllinien mittels Koloniebildungstest untersucht. In einem weiterführenden Experiment wurden die resistenten Zelllinien erneut mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin behandelt und anschließend fraktionierter Bestrahlung ausgesetzt. Abschließend wurde der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg durch den potentiell in der Klinik anwendbaren kleinmolekularen Inhibitor XAV939 moduliert.

### 4.1 Axin2 – ein Indikator für die Wnt-Aktivität von Zellen

Die Arbeitsgruppen von Lustig et al. (2002) und Nakajima et al. (2003) haben aufgezeigt, dass Axin2 ein Indikator für die Wnt-Aktivität von Zellen ist und besonders in Tumorzellen (Leber- und Rektumkarzinom) akkumuliert (Lustig et al. 2002; Nakajima et al. 2003).

Von den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien konnte nur bei zwei Zelllinien (OE-19 und OE-33) eine Expression von Axin2 per Westernblot nachgewiesen werden (siehe Proteinexpressionsprofil in Abbildung 8 und Abbildung 37). Darüber hinaus exprimieren beide Zelllinien nur geringe Protein-Level von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin. Dies ist konkordant mit den Ergebnissen von Nakamura et al. (1998), die beschreiben, dass ein erhöhter Axin2-Spiegel mit niedrigen Protein-Leveln von  $\beta$ -Catenin korreliert (Nakamura et al. 1998). Im Kontrast dazu weisen alle anderen hier untersuchten Zelllinien (OAC-P4C, FLO-1, Kyse-150, Kyse-180) keine, per Westernblot detektierbare,

Proteinexpression von Axin2 auf. Die Proteinexpressions-Level von aktivem und gesamtem  $\beta$ -Catenin sind heterogen und reichen von schwach (OAC-P4C) bis stark (Kyse-180). Diese Zelllinien scheinen, trotz der hohen  $\beta$ -Catenin Expressions-Level, wenig bis gar kein Axin2 zu bilden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Tumorzellen Veränderungen im Signalweg aufweisen, die die Axin2-vermittelte Feedbackhemmung des Signalweges außer Kraft setzen.

Als nächster Schritt erfolgte eine Untersuchung der Zelllinien bezüglich ihrer Wnt-Aktivität und Aktivierbarkeit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mit Hilfe des *Dual-luciferase--reporter-assay*. Wie aus dem Proteinexpressionsprofil bezüglich Axin2 bereits anzunehmen war, wiesen OE-19 und OE-33 mit Abstand die höchste Grundaktivität aller Ösophaguskarzinomzelllinien auf. In diesem Punkt stimmten unsere Beobachtungen mit denen von Lustig et al. (2002) überein (Lustig et al. 2002). Dagegen war bei OAC-P4C, FLO-1, Kyse-150 und Kyse-180 nahezu keine Grundaktivität nachweisbar. Hinsichtlich der Aktivierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalweges bot sich ein heterogenes Bild. Die Zelllinie FLO-1 zeigte eine 150-fach erhöhte, OE-19 und OE-33 eine 4-fach erhöhte und Kyse-180 eine 110-fach erhöhte induzierbare Aktivität. Bei den Zelllinien Kyse-150 und OAC-P4C ließ sich nur ein marginaler Anstieg der Aktivierbarkeit verzeichnen. Somit hat sich bestätigt, dass Axin2 auch in unserem Zellkulturmodell ein Indikator für die  $\beta$ -Catenin abhängige Wnt-Aktivität darstellt. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse aber auch, dass Axin2 als alleiniger Indikator zur Beurteilung der Wnt-Aktivität einer Zelle nicht ausreichend ist, sondern die Zusammenschau mehrerer Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Komponenten nötig ist, um eine vernünftige Aussage über die Wnt-Aktivität treffen zu können.

## **4.2 Inhibition von $\beta$ -Catenin durch siRNA induziert Radiosensibilität in Wnt/ $\beta$ -Catenin-aktiven Zelllinien**

Nachdem die Ösophaguskarzinomzellen hinsichtlich ihrer Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg Aktivität evaluiert und auf ihr Proteinexpressionsprofil untersucht wurden, erfolgte als nächster Schritt die Überprüfung der Bedeutung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs für die Radio- und Radiochemotherapie-resistenz. Dies gelang durch Inhibition von  $\beta$ -Catenin mittels siRNA. In den Immunfärbungen ließ sich für alle sechs Zelllinien nach Transfektion mit siRNA eine Abnahme von aktivem sowie gesamtem  $\beta$ -Catenin feststellen.  $\beta$ -Catenin stellt einen wichtigen Signaltransduktor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs dar (Behrens et al. 1996; Molenaar et al. 1996). In den darauffolgend durchgeführten Koloniebildungstests zeigte sich interessanterweise ein inhomogenes Bild. Die Zelllinien Kyse-150, Kyse-180, FLO-1 und OAC-P4C waren nach Transfektion mit siRNA gegen  $\beta$ -Catenin noch genauso resistent gegenüber einer Bestrahlung wie vorher. Im Kontrast dazu ließ sich bei OE-19 und OE-33 eine signifikante Abnahme der

Radio(chemo)therapieresistenz feststellen. Eine Korrelation dieser Ergebnisse mit den Resultaten des *Reporter-Assays* lässt folgende Schlussfolgerung zu: Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist bei *a priori* Wnt/ $\beta$ -Catenin-aktiven (hohe Grundaktivität) ösophagealen Karzinomzelllinien an einer Vermittlung von Radioresistenz beteiligt und stellt damit ein mögliches therapeutisches Angriffsziel dar. Diese Erkenntnisse decken sich mit Beobachtungen anderer Autoren. So berichteten Su et al. (2015) über eine Radiosensibilisierung von Kyse-150R – eine eigens etablierte radioresistente Zelllinie der Ösophaguskarzinomzelllinie Kyse-150 – durch Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mit Hilfe des kleinmolekularen Inhibitors FH535 (Su et al. 2015). Über ähnliche Ergebnisse berichteten Che et al. (2011). Auch hier gelang in der zuvor etablierten radioresistenten Ösophaguskarzinomzelllinie *Eca109R50Gy* eine signifikante Radiosensibilisierung durch Verwendung des kleinmolekularen Inhibitors NS398, welcher eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bewirkt (Che et al. 2011). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in anderen Tumorentitäten gemacht werden. So zeigten Cojoc et al. (2015), dass eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Prostatakarzinom-Vorgängerkzellen via siRNA gegen  $\beta$ -Catenin oder dem kleinmolekularen Inhibitor XAV939 eine signifikante Erhöhung der Radiotherapiesensibilität bewirkt (Cojoc et al. 2015).

In Glioblastomen konnte ebenfalls durch Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs die Radiotherapiesensibilität der Tumorzellen signifikant erhöht werden (Kim Y et al. 2012).

Eine weitere Schlussfolgerung der Ergebnisse dieser Doktorarbeit ist, dass eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mittels siRNA bei Ösophaguskarzinomzelllinien mit niedriger Wnt/ $\beta$ -Catenin-Grundaktivität (Kyse-150, Kyse-180, FLO-1, OAC-P4C) zu keiner Radio- und Radiochemosensibilisierung führt.

### **4.3 Fraktionierte Bestrahlung – Übertragung auf ein Modell in Anlehnung an die klinische Praxis**

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs nur in den Zelllinien OE-33 und OE-19 zu einer Radio(chemo)sensibilisierung führt. Bisher wurden alle Experimente als Einzelbestrahlung durchgeführt. In Anlehnung an die klinische Praxis erfolgte daher nun eine fraktionierte Bestrahlung in festgelegten Abständen über mehrere Tage mit einer repetitiven Strahlendosis. Hintergrund war die Annahme, dass die Tumorzellen noch während ihrer Regenerationsphase von erneuter ionisierender Strahlung getroffen würden, und damit mehr DNA-Schäden zugefügt werden können (Hall und Giaccia 2012).

Interessanterweise war auch mit fraktionierter Bestrahlung bei den Zelllinien Kyse-180, FLO-1 und OAC-P4C, trotz Herunterregulation von  $\beta$ -Catenin, keine Zunahme der

Radio(chemo)therapiesensibilität zu verzeichnen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Vorgängerexperimenten und deuten darauf hin, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg für die Strahlenresistenz dieser Zelllinien nicht entscheidend ist. Vermutlich sind hier andere Signalwege für die Radioresistenzvermittlung zuständig. So konnten Ahn et al. (2014) in radioresistenten Lungen- und Ösophaguskarzinomzellen auch Gene des NOTCH- sowie des STAT3-Signalwegs nachweisen (Ahn et al. 2014). Spitzner et al. (2014) konnten in Experimenten zeigen, dass der STAT3-Signalweg eine Rolle bei der Vermittlung von Radiochemotherapieresistenz beim Rektumkarzinom spielt, und dass eine Inhibition dieses Signalwegs zu einer Steigerung der Radiotherapiesensibilität führt (Koerdel et al. 2021; Spitzner et al. 2014). Für den NOTCH-Signalweg konnte eine Rolle bei der Vermittlung von Radiotherapieresistenz bei Glioblastomen nachgewiesen werden, und dessen Inhibition bewirkte eine Radiosensibilitätssteigerung (Wang J et al. 2010). Es ist gut denkbar, dass die Zelllinien Kyse-180, FLO-1 und OAC-P4C möglicherweise einen dieser beiden oder noch unbekannte Signalwege nutzen.

Die Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mittels siRNA zeigte keinen Effekt für Kyse-150 unter Einzelbestrahlung, jedoch bewirkte die Anwendung von fraktionierter Bestrahlung eine Radiotherapiesensibilisierung. In der aktuellen Literatur wird berichtet, dass die Bestrahlung von Zellen eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bewirkt und die Zellen damit vor dem Zelltod bewahren kann. Dies geschieht über diverse Mechanismen: das Abfangen freier Sauerstoffradikale (oxidativer Stress), Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen und Verhinderung von Apoptose (Zhao et al. 2018a). Eine Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs und anschließende Bestrahlung kann somit zu einer Erhöhung der Strahlentherapiesensibilität in Tumorzellen führen. Die Verwendung von fraktionierter Bestrahlung kann diesen Effekt noch einmal um ein Vielfaches verstärken, indem die Tumorzelle wiederholt ionisierender Strahlung und damit eingehender Radikalbildung ausgesetzt ist. Dies führt zu erneuten DNA-Schäden, ferner können sich in Reparatur befindende Zellen weiter geschädigt werden (Kim MS et al. 2015).

Für zukünftige Experimente sollte eine genauere Untersuchung von singular und fraktioniert bestrahlten Zellen auf DNA-Doppelstrangbrüche erfolgen, um den Effekt der fraktionierten Bestrahlung zu objektivieren (Olive 2004).

#### **4.4 Inhibierung von $\beta$ -Catenin mittels XAV939 und Auswirkung auf die Radiosensibilität**

Da sich siRNAs im klinischen Einsatz als nicht praktikabel erwiesen haben, schlossen sich Experimente mit dem potentiell klinisch anwendbaren Inhibitor XAV939 an. XAV939 inhibiert Tankyrasen und bewirkt dadurch eine Abbauehemmung von Axin. Dies führt zu einer Degradation von  $\beta$ -Catenin (siehe Abbildung 3) (Huang et al. 2009). Die

Zelllinien Kyse-150, Kyse-180, FLO-1, OAC-P4C, OE-19 und OE-33 wurden daher mit XAV939 inkubiert, woraus eine Reduktion der Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin resultierte. Dieser Effekt wurde anhand von Immunfärbungen mittels Western Blot Verfahren bestätigt. Hiernach folgten Zellviabilitätsassays zur Prüfung einer möglichen Toxizität des Inhibitors, gefolgt von Koloniebildungstests (siehe Kapitel 3.4). Diese wurden analog zu den siRNA-Experimenten durchgeführt (Radiotherapie und Radiochemotherapie).

Die Immunfärbungen der verwendeten Zelllinien zeigten insgesamt heterogene Ergebnisse. Bei den Zelllinien OE-19 und OE 33 ließ sich ein Anstieg der Proteinlevel von Axin2 sowie eine Abnahme von  $\beta$ -Catenin nachweisen. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Experimenten (Emons et al. 2017). Bei den Zelllinien FLO-1, OAC-P4C und Kyse-180 bewirkte die Inkubation mit XAV939 interessanterweise keine im Western Blot nachweisbare Stabilisierung von Axin2, aber dennoch eine Abnahme der Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin. Ein Erklärungsansatz hierfür sind mögliche *off-target* Effekte von XAV939, die eine Abbauwirkung von  $\beta$ -Catenin über einen anderen Signalweg bewirken. Weiterhin muss beachtet werden, dass der Western Blot zwar eine sensitive Methode zum Nachweis von Proteinen darstellt, wobei jedoch auch hier Grenzen gesetzt sind. Für Zellen, welche gewisse Proteine im natürlichen Zustand kaum exprimieren, muss nicht zwingend der Nachweis per Western Blot gelingen. In diesem Fall resultierte nach Zugabe von XAV939 vermutlich dennoch eine Stabilisation von Axin2, unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots.

Die Koloniebildungstests zeigten, ähnlich der siRNA-Experimente, sehr heterogene Ergebnisse. Die Behandlung mit XAV939 führte bei den Zelllinien FLO-1, OAC-P4C und Kyse-180 zu keiner signifikanten Abnahme der Überlebensfraktion und damit auch zu keiner Radiotherapiesensibilisierung. In einigen Fällen führte sie vereinzelt sogar zu einer leichten aber nicht signifikanten Resistenzentwicklung. Für die Zelllinie OE-19 bewirkte die Behandlung mit XAV939 eine signifikante Steigerung der Radio(chemo)therapiesensibilität, während dieser Effekt bei der Zelllinie OE-33 mit der höheren eingesetzten XAV939-Konzentration (10  $\mu$ M) abnahm. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Arbeit von de la Roche et al. (2014), in welcher kolorektale Zelllinien mit Tankyraseinhibitoren inkubiert worden. Analog zu unseren Experimenten war ein Abfall des aktiven  $\beta$ -Catenin und eine Stabilisation von Axin2 zu beobachten, jedoch blieb die transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin bestehen (de la Roche et al. 2014). Als Ursache sehen die Autoren die beiden Wnt-induzierbaren Proteine LEF1 und B9L, welche eine Translokation von aktivem  $\beta$ -Catenin in den Zellkern bewirken und es damit vor proteasomalem Abbau bewahren (Behrens et al. 1996; Brembeck et al. 2004). Beide Proteine haben, im Gegensatz zu Axin2 und APC, eine 20- bis 50-fach höhere Affinität an aktives  $\beta$ -Catenin zu binden und dieses dadurch vor dem Abbau zu schützen (Choi et al. 2006; von Kries et al. 2000). Bei chronisch Wnt-aktiven Zelllinien fanden de la Roche et al. (2014) erhöhte Spiegel von LEF1 und B9L, die mit einer Tankyrase-

Unempfindlichkeit einhergehen. Speziell die kolorektale Zelllinie SW480 zeigte eine nahezu konstante transkriptionelle Aktivität, trotz sinkender Spiegel von aktivem  $\beta$ -Catenin unter Behandlung mit XAV939. Dieser Effekt war auch in Wnt-naiven Zellen reproduzierbar. Hierfür wurde zuvor der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ausreichend lange stimuliert. So konnten de la Roche et al. (2014) in HEK293T-Zellen eine Tankyrase-Unempfindlichkeit hervorrufen, nach zuvor 6-stündiger Inkubation mit Wnt3a. Beide Zelllinien exprimierten deutlich erhöhte Proteinlevel von LEF1. Eine selektive Herunterregulation von LEF1 bewirkte in beiden Zelllinien wieder ein Ansprechen auf Tankyrasen und die Verringerung der transkriptionellen Aktivität.

Die oben beschriebene Beobachtung, dass chronisch Wnt-aktive Zellen erhöhte Spiegel von B9L und LEF1 aufweisen und damit resistent gegenüber Tankyrasen sind legen nahe, dass es sich auch bei anderen Tumorentitäten so verhält. OE-33 weist eine erhöhte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Grundaktivität auf und gehört damit zu den chronisch Wnt-aktiven Zelllinien (vgl. Kapitel 3.1). Es ist davon auszugehen, dass mit steigender XAV939-Konzentration alle Tankyrasen einer Zelle inhibiert sind und die Axin2-Expressionlevel steigen. Dies könnte zu einer vermehrten Expression von B9L und LEF1 führen, damit aktives  $\beta$ -Catenin vor einer Transkriptionseinschränkung abschirmen und dadurch die abnehmende Radio(chemo)therapiesensibilisierung unter Behandlung mit der hohen XAV939-Konzentration gut erklären.

Diese Beobachtungen widersprechen nicht den Ergebnissen aus den RNA-Interferenzversuchen. Der Abbauschutz durch B9L/LEF1 von aktivem  $\beta$ -Catenin ist hier nicht relevant, da durch si $\beta$ -Catenin eine Blockade auf RNA-Ebene erfolgt. Somit kann weiterhin für die siRNA-Experimente davon ausgegangen werden, dass eine verminderte Expression von  $\beta$ -Catenin mit einer Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs einhergeht. In zukünftigen Experimenten sollte zusätzlich die Verteilung von aktivem  $\beta$ -Catenin in der Zelle näher untersucht werden. Ebenso wäre eine Überprüfung der transkriptionellen Aktivität nach erfolgter Behandlung mittels XAV939 oder si $\beta$ -Catenin sinnvoll.

## 4.5 Klinische Bedeutung und Ausblick

Das Ösophaguskarzinom ist eine der häufigsten Krebsarten weltweit. Die beiden vorherrschenden histologischen Subtypen sind mit ca. 70 % das Plattenepithelkarzinom und mit ca. 30 % das Adenokarzinom (Wang AH et al. 2014). Es ist mittlerweile anerkannt, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine wichtige Rolle in der Metastasenbildung, dem Krebswachstum sowie der Aggressivität von Ösophaguskarzinomen spielt (Chai et al. 2012). Weiterhin geben aktuelle Studien Hinweise darauf, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg an der Vermittlung von Radiotherapieresistenz beteiligt ist, jedoch sind die Mechanismen noch nicht vollständig verstanden (Zhao et al. 2018a). Ein wichtiger Bestandteil der Resistenzentwicklung ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Diese beschreibt einen zellulären

Prozess, bei dem Epithelzellen ihre Zellpolarität- und Verbindungen verlieren und sich in mesenchymale Stammzellen verwandeln, wodurch sie resistent gegenüber Hypoxie werden und DNA-Reparaturmechanismen sowie Wachstumsfaktor-Signalwege aktiviert werden (Kim E et al. 2014). Su et al. (2015) konnten zeigen, dass die EMT bei Ösophaguskarzinomen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Radiotherapieresistenz spielt, und dass dies in Abhängigkeit der Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs geschieht. Ferner konnten sie zeigen, dass eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs die EMT stoppt und die Ösophaguskarzinomzellen empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung macht (Su et al. 2015). Die EMT konnten auch Zhao et al. (2018b) in ihren Experimenten mit Ösophaguskarzinomzelllinien beobachten, und auch hier war die EMT mit einer deutlichen Zunahme der Radiotherapieresistenz vergesellschaftet. Weiterhin konnten sie nachweisen, dass radiotherapieresistente Zellen eine höhere Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs aufweisen, und dass sich diese Aktivität durch Bestrahlung noch weiter erhöht. Ferner konnten Zhao et al. (2018b) nachweisen, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg an der Aufrechterhaltung und Stimulierung von DNA-Reparaturmechanismen beteiligt ist und dadurch eine Radiotherapieresistenz induziert und aufrechterhält (Zhao et al. 2018b).

Dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg an der Vermittlung von Radio(chemo)therapieresistenz beteiligt ist, konnten wir in unserer Arbeit für das Ösophaguskarzinom zum Teil bestätigen (siehe Experimente mit OE-19 und OE-33). Problematisch ist die Anwendung des kleinmolekularen Inhibitors XAV939. In Studien wurde gezeigt, dass die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibierende Wirkung nicht direkt mit der Reduktion von  $\beta$ -Catenin zu korrelieren scheint (de la Roche et al. 2014). In unserer Arbeitsgruppe werden daher noch andere kleinmolekulare Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit gegenüber der Strahlentherapieresistenz getestet. Von diesen Inhibitoren wird sich eine höhere Effizienz versprochen. Zudem haben sie unterschiedliche Wirkmechanismen: JW55 und G007-LK inhibieren Tankyrasen, LGK974 inhibiert Porcupine. Weiterhin sind sie oral bioverfügbar (Lau et al. 2013; Liu et al. 2013; Waaler et al. 2012). Für zukünftige Versuche mit Inhibitoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs sollte die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs genauer untersucht werden, z.B. mittels *real-time polymerase chain reaction*. Weiterhin erscheint die Aktivitätsmessung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mittels des *dual luciferase reporter assays* vor und nach der Behandlung sinnvoll. Hierdurch könnte z.B. untersucht werden, ob eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mittels siRNA oder eines *small molecule* Inhibitor tatsächlich einen Effekt auf die gemessene oder induzierbare Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Aktivität von Karzinomzellen hat. Ferner ist eine Übertragung der *in-vitro* Ergebnisse auf Tiermodelle sinnvoll.

In den letzten Jahren wurde der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg intensiv erforscht und viele neue Erkenntnisse gewonnen. Insgesamt ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg an der

Vermittlung von Radio(chemo)therapieresistenz beim Ösophaguskarzinom beteiligt und stellt damit einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt für die personalisierte Tumorthherapie dar. Bis zur Anwendung in klinischen Studien bedarf es jedoch der Entwicklung weiterer prognostischer Tumormarker (Deng et al. 2015). Problematisch ist weiterhin, dass die Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bei nur zwei Zelllinien einen Effekt gezeigt hat, trotz der Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in der Tumorkaskade des Ösophaguskarzinoms und der hohen Mutationsrate von Signalweg-Proteinen (Wang X et al. 2016). Somit ist eine Deregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs offenbar nicht der alleinige Grund für eine Radio(chemo)therapieresistenzvermittlung beim Ösophaguskarzinom. Das Ziel zukünftiger Bemühungen sollte daher sein, weitere potentielle therapeutische Angriffspunkte zu finden.



## 5 Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom stellt die achthäufigste Tumorentität weltweit dar mit steigender Prävalenz. Neben der radikalen chirurgischen Resektion kommt der Radio(chemo)therapie, insbesondere bei lokal fortgeschrittenen Tumoren, eine herausragende Bedeutung zu. Leider ist das Ansprechen der Tumore auf die Radio(chemo)therapie heterogen. Ein Teil der Tumore weist eine hohe Strahlentherapieresistenz auf, was zu Nichtansprechen oder Rezidiven und damit einer schlechten Prognose führt. Der Überwindung der Strahlenresistenz durch Aufdeckung der zugrundeliegenden Mechanismen kommt daher eine hohe Bedeutung zu.

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *TCF7L2* (ein Transkriptionsfaktor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs) in radioresistenten kolorektalen Zellen übermäßig stark exprimiert ist, und dass eine Inhibierung von *TCF7L2* zu einer Radio(chemo)sensibilisierung führt. In weiterführenden Experimenten wurde gezeigt, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Radio(chemo)therapieresistenz spielt.

In dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Radio(chemo)therapieresistenz im Ösophaguskarzinom einnimmt. Hierfür erfolgten Experimente mit sechs Ösophaguskarzinomzelllinien verschiedenen Ursprungs: OE-19, OE33, OAC-P4C, FLO-1 (Adenokarzinom); Kyse-150, Kyse-180 (Plattenepithelkarzinom). Die Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mittels siRNA gegen  $\beta$ -Catenin führte zu einer signifikanten Radio(chemo)therapiesensibilisierung von OE-33 und OE-19. Die gleichzeitige Anwendung von fraktionierter Bestrahlung sowie Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs führte nur zu einer Verbesserung der Radio(chemo)therapiesensibilität für Kyse-150, welche aber immer noch einen sehr resistenten Phänotyp aufzeigt. Die Behandlung mit dem kleinmolekularen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg-Inhibitor XAV939 führte nur zu einer Radio(chemo)therapiesensibilisierung von OE-19 und OE-33.

Somit konnten wir zeigen, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine Rolle bei der Vermittlung von Radioresistenz in ausgewählten Ösophaguskarzinomzelllinien spielt, und dass die Beeinflussung des kanonischen Wnt-Signalwegs somit einen möglichen neuen therapeutischen Ansatz in der Behandlung des Ösophaguskarzinoms darstellen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

Afifi MM, Austin LA, Mackey MA, El-Sayed MA (2014): XAV939: from a small inhibitor to a potent drug bioconjugate when delivered by gold nanoparticles. *Bioconjug Chem* 25, 207-215

Ahn SJ, Choi C, Choi YD, Kim YC, Kim KS, Oh IJ, Ban HJ, Yoon MS, Nam TK, Jeong JU, et al. (2014): Microarray analysis of gene expression in lung cancer cell lines treated by fractionated irradiation. *Anticancer Res* 34, 4939-4948

Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, Kopp HG, Mayer F, Haag GM, Luley K, et al. (2019): Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet* 393, 1948-1957

Allison PR, Johnstone AS (1953): The oesophagus lined with gastric mucous membrane. *Thorax* 8, 87-101

Auvinen MI, Sihvo EI, Ruohtula T, Salminen JT, Koivistoinen A, Siivola P, Ronnholm R, Ramo JO, Bergman M, Salo JA (2002): Incipient angiogenesis in Barrett's epithelium and lymphangiogenesis in Barrett's adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 20, 2971-2979

Barrett NR (1950): Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg* 38, 175-182

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

Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT, Fontollet C, Benhattar J (2000): Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 114, 583-590

Bloomer WD, Adelstein SJ (1982): The mammalian radiation survival curve. *J Nucl Med* 23, 259-265

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

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

Byfield JE (1989): 5-Fluorouracil radiation sensitization — A brief review. *Investigational New Drugs* 7, 111-116

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

Chai J, Modak C, Ouyang Y, Wu SY, Jamal MM (2012): CCN1 Induces beta-Catenin Translocation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma through Integrin alpha11. *ISRN Gastroenterol* 2012, 207235

Che SM, Zhang XZ, Liu XL, Chen X, Hou L (2011): The radiosensitization effect of NS398 on esophageal cancer stem cell-like radioresistant cells. *Dis Esophagus* 24, 265-273

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* 3, 480-482

Clement G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman FT, Benhattar J (2006): Alterations of the Wnt signaling pathway during the neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Oncogene* 25, 3084-3092

Clevers H, Nusse R (2012): Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205

Clevers H, Loh KM, Nusse R (2014): Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346, 1248012

Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, et al. (2011): Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst* 103, 1827-1839

Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Trautmann F, Kunz-Schughart LA, Telegeev GD, Stakhovsky EA, Walker JR, Simin K, Lyle S, et al. (2015): Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by beta-Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Res* 75, 1482-1494

Conroy T, Galais MP, Raoul JL, Bouche O, Gourgou-Bourgade S, Douillard JY, Etienne PL, Boige V, Martel-Lafay I, Michel P, et al. (2014): Definitive chemoradiotherapy with FOLFOX versus fluorouracil and cisplatin in patients with oesophageal cancer (PRODIGE5/ACCORD17): final results of a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet Oncol* 15, 305-314

Corley DA, Kubo A, Levin TR, Block G, Habel L, Rumore G, Quesenberry C, Buffler P (2009): Race, ethnicity, sex and temporal differences in Barrett's oesophagus diagnosis: a large community-based study, 1994-2006. *Gut* 58, 182-188

Daly JM, Fry WA, Little AG, Winchester DP, McKee RF, Stewart AK, Fremgen AM (2000): Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study. *J Am Coll Surg* 190, 562-572; discussion 572-563

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

Deng F, Zhou K, Cui W, Liu D, Ma Y (2015): Clinicopathological significance of wnt/beta-catenin signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 3045-3053

DSMZ: Product information sheet for DSMZ ACC-379<sup>TM</sup>. hrsg., Braunschweig 2013a

DSMZ: Product information sheet for DSMZ ACC-375<sup>TM</sup>. hrsg., Braunschweig 2013b

DSMZ: Product information sheet for DSMZ ACC-704<sup>TM</sup>. hrsg., Braunschweig 2013c

DSMZ: Product information sheet for DSMZ ACC-698<sup>TM</sup>. hrsg., Braunschweig 2013d

DSMZ: Product information sheet for DSMZ ACC-706<sup>TM</sup>. hrsg., Braunschweig 2013e

DSMZ: Product information sheet for DSMZ ACC-700<sup>TM</sup>. hrsg., Braunschweig 2013f

Eda A, Osawa H, Satoh K, Yanaka I, Kihira K, Ishino Y, Mutoh H, Sugano K (2003): Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J Gastroenterol* 38, 14-22

Elbashir S, Lendeckel W, Tuschl T (2001): RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200

Ell C, May A, Gossner L, Pech O, Gunter E, Mayer G, Henrich R, Vieth M, Muller H, Seitz G, et al. (2000): Endoscopic mucosal resection of early cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 118, 670-677

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

Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, Gammon MD, Risch HA, Stanford JL, Schoenberg JB, Mayne ST, Dubrow R, Rotterdam H, et al. (2003): Population Attributable Risks of Esophageal and Gastric Cancers. *J Natl Cancer Inst* 95, 1404-1413

Enzinger PC, Mayer RJ (2003): Esophageal cancer. *N Engl J Med* 349, 2241-2252

Falk GW (2009): Risk factors for esophageal cancer development. *Surg Oncol Clin N Am* 18, 469-485

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

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315-2319

Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG (2008): Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 10, Unit 10 18

Gehl J (2003): Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177, 437-447

Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Fuzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T, et al. (2005): Effectiveness of gene expression profiling

for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23, 1826-1838

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

Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, et al. (2006): Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38, 320-323

Hall EJ, Giaccia AJ: *Radiobiology for the Radiologist*; 7. Auflage; LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business, Philadelphia 2012

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, et al. (2009): Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620

Ishihara R, Iishi H, Uedo N, Takeuchi Y, Yamamoto S, Yamada T, Masuda E, Higashino K, Kato M, Narahara H, et al. (2008): Comparison of EMR and endoscopic submucosal dissection for en bloc resection of early esophageal cancers in Japan. *Gastrointest Endosc* 68, 1066-1072

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-637

Jankowski J, McMenemin R, Hopwood D, Penston J, Wormsley KG (1991): Abnormal expression of growth regulatory factors in Barrett's oesophagus. *Clin Sci (Lond)* 81, 663-668

Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984): Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Analysis Techniques* 1, 3-8

Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, Tsunoda T, Takahashi A, Kashiwagi A, Tanaka Y, Babazono T, Matsuda M, Kaku K, et al. (2004): Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* 75, 832-843

Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, et al. (2000): Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 92, 1805-1811

Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-Frank M, Emons G, Gaedcke J, Kramer F, Wolff HA, Becker H, Beissbarth T, et al. (2011): Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis* 32, 1824-1831

Kim E, Youn H, Kwon T, Son B, Kang J, Yang HJ, Seong KM, Kim W, Youn B (2014): PAK1 tyrosine phosphorylation is required to induce epithelial-mesenchymal transition and radioresistance in lung cancer cells. *Cancer Res* 74, 5520-5531

Kim MS, Kim W, Park IH, Kim HJ, Lee E, Jung JH, Cho LC, Song CW (2015): Radiobiological mechanisms of stereotactic body radiation therapy and stereotactic radiation surgery. *Radiat Oncol J* 33, 265-275

Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Joo KM, et al. (2012): Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest* 92, 466-473

Kimura Y, Shiozaki H, Doki Y, Yamamoto M, Utsunomiya T, Kawanishi K, Fukuchi N, Inoue M, Tsujinaka T, Monden M (1999): Cytoplasmic beta-catenin in esophageal cancers. *Int J Cancer* 84, 174-178

Kinzler K, Nilbert M, Su L, Vogelstein B, Bryan T, Levy D, Smith K, Preisinger A, Hedge P, McKechnie D, et al. (1991): Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 661-665

Koerdel K, Spitzner M, Meyer T, Engels N, Krause F, Gaedcke J, Conradi LC, Haubrock M, Beissbarth T, Leha A, et al. (2021): NOTCH Activation via gp130/STAT3 Signaling Confers Resistance to Chemoradiotherapy. *Cancers (Basel)* 13

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<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787

Kranzfelder M, Schuster T, Geinitz H, Friess H, Buchler P (2011): Meta-analysis of neoadjuvant treatment modalities and definitive non-surgical therapy for oesophageal squamous cell cancer. *Br J Surg* 98, 768-783

Lau T, Chan E, Callow M, Waaler J, Boggs J, Blake RA, Magnuson S, Sambrone A, Schutten M, Firestein R, et al. (2013): A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Res* 73, 3132-3144

Leitlinienprogramm-Onkologie (2021): (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus, Langversion 3.0 - Oktober 2021, AWMF-Registriernummer: 021/023OL. 1-186

Li HZ, Gao XS, Xiong W, Zhao J, Zhang H, Zhou DM (2010): Identification of differentially expressed genes related to radioresistance of human esophageal cancer cells. *Chin J Cancer* 29, 882-888

Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, et al. (2012): Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149, 1245-1256

Life-technologies-Invitrogen (2013): Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol. 1, 1-2

Lindl T: Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen; 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002

Linkous AG, Yazlovitskaya EM (2012): Novel radiosensitizing anticancer therapeutics. *Anticancer Res* 32, 2487-2499

Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, Kasibhatla S, Schuller AG, Li AG, Cheng D, et al. (2013): Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20224-20229

Lonza (2008): General Protocol for nucleofection® of adherent cell lines. 1-7



Lord RV, Salonga D, Danenberg KD, Peters JH, DeMeester TR, Park JM, Johansson J, Skinner KA, Chandrasoma P, DeMeester SR, et al. (2000): Telomerase reverse transcriptase expression is increased early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. *J Gastrointest Surg* 4, 135-142

Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, et al. (2002): Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Mol Cell Biol* 22, 1184-1193

MacDonald BT, He X (2012): Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/beta-catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a007880

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, et al. (2001): Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-809

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

Morales CP, Souza RF, Spechler SJ (2002): Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet* 360, 1587-1589

Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Osawa H, Hakamata Y, Takeuchi T, Sugano K (2004): Cdx1 induced intestinal metaplasia in the transgenic mouse stomach: comparative study with Cdx2 transgenic mice. *Gut* 53, 1416-1423

Naef AP, Savary M, Ozzello L (1975): Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70, 826-835

Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H (2003): Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 88, 1734-1739

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 to Cells* 3, 395-403

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

Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H (1991): A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 64, 231

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

Olive PL (2004): Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol* 75, 355-373

Petersen CP, Reddien PW (2009): Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139, 1056-1068

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

Probst A, Maerkl B, Anthuber M, Messmann H (2013): Endoskopische Submukosadissektion (ESD) im Ösophagus. *Z Gastroenterol* 51, K233

Promega (2011): Technical Manual: Dual-Luciferase® Reporter Assay System. 1-26

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

Radtke F, Clevers H (2005): Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-1909

Reineke S: Relevanz des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs für die Radiotherapieresistenz des kolorektalen Karzinoms. Medizinische Dissertation Göttingen 2015

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

Riss T, Moravec R (2003): Introducing the CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay. *Promega Notes* 83, 10-13

Robert-Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2009/2010; Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. hrsg., Berlin 2013

Rossi E, Grisanti S, Villanacci V, Della Casa D, Cengia P, Missale G, Minelli L, Buglione M, Cestari R, Bassotti G (2009): HER-2 overexpression/amplification in Barrett's oesophagus predicts early transition from dysplasia to adenocarcinoma: a clinico-pathologic study. *J Cell Mol Med* 13, 3826-3833

Salahshor S, Naidoo R, Serra S, Shih W, Tsao MS, Chetty R, Woodgett JR (2008): Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol* 21, 271-281

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

Sarbia M, Becker KF, Hofler H (2004): Pathology of upper gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* 31, 465-475

Sharma RP, Chopra VL (1976): Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 48, 461-465

Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, Wood KV (1996): Dual-Luciferase® reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays. *Promega Notes* 57, 1-7

Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalberg JR, Simes RJ, Barbour A, Gebiski V, Australasian Gastro-Intestinal Trials G (2011): Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 12, 681-692

Spitzner M, Emons G, Schutz KB, Wolff HA, Rieken S, Ghadimi BM, Schneider G, Grade M (2021): Inhibition of Wnt/beta-Catenin Signaling Sensitizes Esophageal Cancer Cells to Chemoradiotherapy. *Int J Mol Sci* 22

Spitzner M, Roesler B, Bielfeld C, Emons G, Gaedcke J, Wolff HA, Rave-Frank M, Kramer F, Beissbarth T, Kitz J, et al. (2014): STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 134, 997-1007

Srivastava M, Begovic E, Chapman J, Putnam NH, Hellsten U, Kawashima T, Kuo A, Mitros T, Salamov A, Carpenter ML, et al. (2008): The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature* 454, 955-960

Staal FJT, Noort Mv, Strous GJ, Clevers HC (2002): Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated  $\beta$ -catenin. *EMBO Reports* 3, 63-68

Stamos JL, Weis WI (2013): The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a007898

Stoner GD, Gupta A (2001): Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 22, 1737-1746

Su H, Jin X, Zhang X, Zhao L, Lin B, Li L, Fei Z, Shen L, Fang Y, Pan H, et al. (2015): FH535 increases the radiosensitivity and reverses epithelial-to-mesenchymal transition of radioresistant esophageal cancer cell line KYSE-150R. *J Transl Med* 13, 104

Sun Y, Kolligs FT, Hottiger MO, Mosavin R, Fearon ER, Nabel GJ (2000): Regulation of beta -catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12613-12618

Taylor PR, Abnet CC, Dawsey SM (2013): Squamous dysplasia--the precursor lesion for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22, 540-552

Tocris (2012): XAV 939 Certificate of Analysis and Product Information. 1, 1-2

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354

van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ, et al. (2012): Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med* 366, 2074-2084

von Kries JP, Winbeck G, Asbrand C, Schwarz-Romond T, Sochnikova N, Dell'Oro A, Behrens J, Birchmeier W (2000): Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat Struct Biol* 7, 800-807

Waalder J, Machon O, Tumova L, Dinh H, Korinek V, Wilson SR, Paulsen JE, Pedersen NM, Eide TJ, Machonova O, et al. (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

Wang, Souza RF (2011): Biology of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 21, 25-38

Wang AH, Liu Y, Wang B, He YX, Fang YX, Yan YP (2014): Epidemiological studies of esophageal cancer in the era of genome-wide association studies. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5, 335-343

Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, Rich JN, Sullenger BA (2010): Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 28, 17-28

Wang L, Zhang XM, Li Z, Liu XJ, Chai J, Zhang GY, Cheng YF (2013): Overexpression of nuclear beta-catenin in rectal adenocarcinoma is associated with radioresistance. *World J Gastroenterol* 19, 6876-6882

Wang X, Zhou K, Wang B, Yan X, Liu X, Li Q, Ma Y (2016): Pathway analysis of esophageal squamous cell carcinoma using iTRAQ-based quantitative proteomic approach. *Int J Clin Exp Pathol* 9, 10491-10498

Watson RL, Spalding AC, Zielske SP, Morgan M, Kim AC, Bommer GT, Eldar-Finkelman H, Giordano T, Fearon ER, Hammer GD, et al. (2010): GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -Catenin Modulate Radiation Cytotoxicity in Pancreatic Cancer. *Neoplasia* 12, 357-365

Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN (2001): Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 233, 322-337

Willert K, Nusse R (2012): Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a007864

Wittekind C: TNM: Klassifikation maligner Tumoren; 8. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2020

Wong MCS, Hamilton W, Whiteman DC, Jiang JY, Qiao Y, Fung FDH, Wang HHX, Chiu PWY, Ng EKW, Wu JCY, et al. (2018): Global Incidence and mortality of oesophageal cancer and their correlation with socioeconomic indicators temporal patterns and trends in 41 countries. *Sci Rep* 8, 4522

Zhao Y, Tao L, Yi J, Song H, Chen L (2018a): The Role of Canonical Wnt Signaling in Regulating Radioresistance. *Cell Physiol Biochem* 48, 419-432

Zhao Y, Yi J, Tao L, Huang G, Chu X, Song H, Chen L (2018b): Wnt signaling induces radioresistance through upregulating HMGB1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis* 9, 433

## **Danksagung**

Zunächst gilt mein Dank an dieser Stelle meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Frau, die mir stets mit ihrem Verständnis und ihrer Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ebenso danke ich herzlich Herrn PD Dr. M. Grade für die Überlassung des interessanten Themas, seine wissenschaftliche Unterstützung in Form zahlreicher Ratschläge, Hilfe und Förderung, ohne die die Durchführung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Gleichsam danke ich meinem Betreuer Dr. G. Emons, der mir ebenfalls beratend zur Seite stand und der für meine Fragen und Anliegen ein offenes Ohr hatte. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med. B. M. Ghadimi für die freundliche Aufnahme in seiner Klinik. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. M. Spitzner bedanken für ihre tatkräftige Unterstützung und Anleitung im Labor. Dank schulde ich zudem den weiteren Mitgliedern der klinischen Forschergruppe 179: Jessica Eggert, Stefanie Müller, Chan-Rong Lai, Sarah Wachenhausen, Dirk Weinert, Birte Roesler sowie meinen Mitdoktoranden Phillip Jasper und Marta Soja für das angenehme Arbeitsklima.

## Lebenslauf

Als Sohn von Dr. med. Kristina Schütz, geb. Gellner, und Burkhard Manfred Günther Schütz wurde ich am 16.09.1989 in Jena geboren.

Von 1996 bis 1999 besuchte ich die 4. Grundschule Nordschule in Jena. Von 2000 bis 2008 war ich Schüler des christlichen Gymnasiums in Jena und legte dort 2008 meine Abiturprüfung ab. Von September 2008 bis Juni 2009 leistete ich Zivildienst am Universitätsklinikum Jena auf der St. 230 der Klinik für Unfall, - Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Von Oktober 2009 bis November 2016 studierte ich Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen. Im August 2011 bestand ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, im Frühjahr 2015 den zweiten Abschnitt und im November 2016 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Mit den Experimenten für die vorliegende Arbeit begann ich im Februar 2013 im Teilprojekt 2 der KFO179 (klinischen Forschergruppe 179) unter Leitung von PD Dr. M. Grade, in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen.

Seit dem Mai 2017 arbeite ich als Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Urologie und Andrologie des Klinikum St. Georg in Leipzig.

Am 17. August 2019 heiratete ich meine Frau Sina Schütz, geb. Gabriel. Am 13. Dezember desselben Jahres wurde unsere Tochter Charlotte Schütz geboren.

Seit dem April 2022 arbeite ich als Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Urologie des Klinikum Kassel. Am 01.03.2023 absolvierte ich erfolgreich die Facharztprüfung und bin seit diesem Tag als Facharzt für Urologie im Klinikum Kassel angestellt.