

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Etablierung eines stabil induzierbaren
Protein *Knockdown*-Systems für β -Catenin
in kolorektalen Tumorzellen und Identifikation von
Dickkopf-4 als neues Zielgen des Wnt-Signalweges.**



Sebastian Baehs
aus Weimar / Thüringen

2007

Erklärung:

Diese Arbeit wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von PD Frank Kolligs betreut und von Prof. Dr. Angelika M. Vollmar vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 21. Juni 2007

Sebastian Baehs

Dissertation eingereicht am: 25. Juni 2007

1. Gutachter PD Frank T. Kolligs

2. Gutachter Prof. Dr. Angelika M. Vollmar

Mündliche Prüfung am: 24. Juli 2007

1	EINLEITUNG	1
1.1	HINTERGRUND UND ZIEL DER ARBEIT	3
1.2	DAS KOLOREKTALE KARZINOM	5
1.3	WNT-PROTEINE UND IHRE REZEPTOREN	6
1.3.1.1	Die Familie der Wnt-Proteine	6
1.3.1.2	Die Rezeptoren der Wnt-Proteine	7
1.3.1.3	Wnt-vermittelte Signalwege	7
1.3.2	Drosophila <i>Armadillo</i> und dessen Homologe	8
1.3.3	Der kanonische Wnt-Signalweg	10
1.3.3.1	Der kanonische Wnt-Signalweg im Überblick	10
1.3.3.2	Der <i>Deconstruction Complex</i>	11
1.3.3.3	Wnt vermittelte Prozesse im Kern	14
1.4	ANTAGONISTEN DES WNT-SIGNALWEGS	15
1.4.1	Die Familie der Dickkopf-Proteine	16
1.5	WNT-SIGNALWEG UND TUMORENTWICKLUNG	18
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	ZELLKULTUR	23
2.1.1	Zelllinien	23
2.1.2	Zellkulturtechniken	24
2.1.2.1	Passagierung und Einsatz der Zellen	24
2.1.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.2	WESTERN BLOT ANALYSE	25
2.2.1	Material und Lösungen	25
2.2.2	Proteinbestimmung und Probenvorbereitung	27
2.2.3	Elektrophorese, Tank Blot und Immunodetektion	27
2.3	PROLIFERATION UND ZYTOTOXIZITÄT <i>VIA</i> MTT	28
2.4	BESTIMMUNG VON DNS-FRAGMENTIERUNG	29
2.4.1	Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung (FACS)	29
2.4.2	Propidiumiodid Färbung (Nicoletti)	29
2.4.3	Analyse der DNS-Fragmentierung	29
2.4.4	Nicoletti Hintergrund	30
2.5	TRANSFEKTION VON <i>SMALL INTERFERING RNA</i>	31
2.5.1	Material und Lösungen	31
2.5.1.1	Transfektion von siRNA	33
2.6	TRANSFEKTION VON PLASMID DNS	34
2.6.1	Reportergeren Assay	34
2.6.2	Stabile Transfektion	36
2.6.2.1	Bestimmung der Selektionsbedingungen	36
2.6.2.2	Generierung stabil transfizierter Zellklone	36
2.7	KLONIERUNG DER SHRNA-EXPRESSIONSPLASMIDE	37
2.7.1.1	Material und Lösungen	38

2.8	KLONIERUNG DER DKK4 REPORTERGEN-KONSTRUKTE	40
2.9	AFFYMETRIX MICROARRAY ANALYSE.....	42
2.9.1	Aufbau des Experiments.....	42
2.9.1.1	RNA-Isolierung	42
2.9.1.2	cDNA-Synthese, Microarray und bioinformatische Auswertung	43
2.10	REAL TIME RT-PCR.....	44
2.10.1	Material und Lösungen	44
2.10.2	Probenvorbereitung	44
2.10.2.1	Reverse Transkription	44
2.10.3	Real Time RT-PCR	45
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1	HINTERGRUND DER ARBEIT	49
3.2	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON siRNA.....	50
3.2.1	Etablierung von siRNA gegen β - und γ -Catenin.....	50
3.2.1.1	Western Blot Analyse.....	51
3.2.1.2	TOPflash Reportergenanalyse	52
3.2.1.3	Proliferation und Zellviabilität.....	53
3.2.1.4	Analyse der DNS-Fragmentierung	55
3.2.2	Neue siRNA Sequenzen gegen β -Catenin	56
3.2.2.1	Analyse der Proteinspiegel und DNA-Fragmentierung	56
3.2.3	Neue siRNA Sequenzen gegen γ -Catenin	60
3.2.3.1	Analyse der Proteinspiegel und der DNS-Fragmentierung.....	60
3.3	STABIL INTEGRIERTE UND INDUZIERBARE SHRNA.....	62
3.3.1	Etablierung der Linien HT-29TR und SW-480TR	62
3.3.1.1	Auswertung der TET-Repressor Expression	63
3.3.2	Generierung des shRNA Expressionsvektors.....	64
3.3.2.1	Einfluss der shRNA Orientierung auf die <i>silencing</i> Effizienz.....	64
3.3.2.2	Etablierung der Linien SW-480 TR β _I und β _IVrev	66
3.4	ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS VON β -CATENIN HERABREGULIERTEN ZELLEN.....	70
3.5	UNTERSUCHUNG VON DICKKOPF-4 (DKK4)	72
3.5.1	Bestätigung der Microarray Daten	72
3.5.1.1	S33Y β -Catenin abhängige Expression von DKK4	75
3.5.2	Promoteranalysen der humanen Dickkopf Gene.....	76
3.5.2.1	Etablierung von DKK4 Reportergen-Konstrukten	77
3.5.2.2	Untersuchungen mit rekombinantem DKK4 und Wnt3a Protein.....	82
4	DISKUSSION.....	85
4.1	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON siRNA.....	87
4.1.1	Etablierung von β - und γ -Catenin siRNA.....	88
4.2	STABIL INDUZIERBARE SHRNA IN SW-480	92
4.3	POTENTIELLE β -CATENIN ZIELGENE	94
4.3.1	Dickkopf4 als neues β -Catenin Zielgen	95

	ZUSAMMENFASSUNG	99
5	ANHANG	103
	5.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	105
	5.2 FIRMENVERZEICHNIS	107
6	REFERENZEN	109
	6.1 PUBLIKATIONEN.....	117
	6.1.1 Originalarbeiten	117
	6.1.2 Abstracts	117
7	DANKSAGUNG.....	119
8	LEBENS LAUF	123

1 Einleitung

1.1 HINTERGRUND UND ZIEL DER ARBEIT

Das kolorektale Karzinom ist nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung in der westlichen Welt. Mindestens 50% der westlichen Bevölkerung entwickeln bis zum 70. Lebensjahr ein Adenom. Das Lebenszeitrisiko, am kolorektalen Karzinom zu erkranken, liegt bei 5-6%, das Durchschnittsalter zur Zeit der Diagnose bei 65 Jahren. Durch Früherkennung von Adenomen mittels regelmäßiger Kontrollen des Kolons *via* Koloskopie könnte das persönliche Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln und daran zu versterben, zwar drastisch gesenkt werden, dennoch wird diese stetig angemahnte Empfehlung nur von einem kleinen Teil der Berechtigten wahrgenommen. Auch Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, wie Bewegungsarmut und Übergewicht sowie mangelnde Zufuhr an Vitaminen, Mineral- und Ballaststoffen, tragen zu einem erhöhten persönlichen Risiko bei. Verbunden mit einer stetig steigenden Lebenserwartung ist anzunehmen, dass die Fallzahlen dieser Tumorerkrankung weiter steigen werden.

Deshalb besteht großer Bedarf, molekularbiologische Zusammenhänge, die an der Entstehung von Darmkrebs beteiligt sind, tief greifender zu verstehen, um darauf basierend neue Diagnostik- und Therapieoptionen entwickelt zu können.

Der kanonische Wnt-Signalweg ist der bestverstandene von insgesamt drei verschiedenen Wnt-Signalwegen, die durch Interaktionen von Wnt-Proteinen mit Frizzled-Rezeptoren vermittelt werden. Neben der Embryonalentwicklung ist der kanonische Wnt-Signalweg auch an der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beteiligt. Dementsprechend führt die Fehlregulation des Wnt-Signalwegs, sei es in die eine oder andere Richtung, zur Entstehung verschiedenster Krankheitsbilder.

Bezogen auf das Kolon führt die stetige Aktivierung Wnt-vermittelter Genexpression durch Mutationen von am Wnt-Signalweg beteiligten Genen zur nachfolgenden Entartung von Darmepithelzellen und zur Entwicklung von Darmkrebs. Der kausale Zusammenhang zwischen dem kanonischen Wnt-Signalweg und der Entstehung von kolorektalen Tumoren wurde erstmals im bis heute weit akzeptierten *Vogelstein-Model* hergestellt. Dieses Modell beschreibt die Aneinanderreihung von spezifischen vorausgegangenen Mutationen als Voraussetzung für die Entartung einer normalen, gesunden Darmepithelzelle über den Status des Adenoms bis hin zum Karzinom.

Eine zentrale Bedeutung wurde dabei der Erhöhungen des β -Catenin Proteinspiegels zugesprochen. Im Zusammenspiel mit vor Abbau schützenden Mutationen kann dieses als Wnt-abhängiger Transkriptionsfaktor fungierende Protein nachfolgend zur stetigen, pathophysiologischen Transkription Wnt- β -Catenin-abhängiger Gene, wie z.B. des Onkogens c-myc und zur Entstehung kolorektaler Karzinome führen. Entwicklungsgeschichtlich geht β -Catenin aus dem Gen *Armadillo* hervor, das sich in Säugern in zwei einzelne Gene, β - und γ -Catenin, welche untereinander bereichsweise hochkonservierte Regionen aufweisen, geteilt hat. γ -Catenin vermittelt ebenfalls im Wnt-Signalweg die Transkription von Wnt-Zielgenen. Über die differentielle Bedeutung und Funktion beider Catenine im Wnt-Signalweg ist bisher nur wenig bekannt.

Der Begriff RNA-Interferenz umschreibt das Phänomen der post-transkriptionellen Senkung (*Silencing*) von Proteinen mittels doppelsträngiger RNA (dsRNA). Hierbei kristallisierten sich in den letzten Jahren besonders die Vorteile der Nutzung von kurzer, 19-22nt langer, doppelsträngiger RNA, sogenannter *short interfering RNA* (siRNA) heraus. Diese siRNA Sequenzen führen zu einem basenspezifisch Abbau, der für ein Protein kodierenden mRNA (*Silencing*). Diese Technik kann sowohl zeitlich limitiert (transient) als auch dauerhaft (stabil) sowie stabil-induzierbar genutzt werden.

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung der durch β - und γ -Catenin vermittelten Effekte auf Kolonkarzinomzellen. Dafür wurden RNAi basierende Protein-*Knockdown*-Systeme sowohl für β - als auch γ -Catenin in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien etabliert und angewandt. Eingebunden in die klinische Forschergruppe 128, konnte diese Technik zur Identifikation autoregulatorischer β -Catenin Zielgene mit Hilfe von *DNA Microarrays* genutzt werden. Die Validierung der Daten und nachfolgende Charakterisierung der ermittelten Zielgene sowie deren genaue Regulierungsmechanismen durch β -Catenin stellen den zweiten Schwerpunkt der Arbeit dar.

1.2 DAS KOLOREKTALE KARZINOM

Das kolorektale Karzinom ist eine der Haupttodesursachen bei Tumorerkrankungen weltweit und in Westeuropa. Die Inzidenz variiert sehr breit in Abhängigkeit verschiedener sozio-ökonomischer Faktoren. In der Vergangenheit konnten im Vergleich zu westlich geprägten Regionen der Welt - also Westeuropa, den USA, Neu Seeland und Australien - in Asien, Afrika und Lateinamerika deutlich niedrigere Fallzahlen beobachtet werden. Aktuelle Studien zeigen auch, dass die Migration von Niedrig- in Hochrisikogebiete mit zügiger Erhöhung des persönlichen Darmkrebsrisikos einhergeht. Diese Untersuchungen stellen den Zusammenhang zwischen Umweltbelastung und Lebensgewohnheiten sowie der Wahrscheinlichkeit, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, her¹. Epidemiologische Studie zeigten, dass verschiedene Bestandteile der aktuellen westlichen Ernährungsgewohnheiten, wie fettreiche Kost, rotes Fleisch und zu geringe Zufuhr an Vitaminen und Mineralstoffen, Risikofaktoren darstellen, während durch ausgewogene, ballaststoffreiche Kost mit hohem Anteil an Obst und Gemüse das individuelle Risiko gesenkt werden kann. Für viele Mineralstoffe und Spurenelemente, beispielsweise für Magnesium, Vitamin D und Kalzium, wurden in Bezug auf Darmkrebs protektive Eigenschaften beschrieben^{2,3}. Ernährungsunabhängig werden Kalziumabsorption und -homöostase zusätzlich durch körperliche Ertüchtigung positiv beeinflusst. Niedrige Folsäure und Vitamin_{B12}-Spiegel können direkt mit DNS-Methylierung in Verbindung gebracht werden und führen darüber zu erhöhtem Krebsrisiko⁴. Übermäßiger Alkoholkonsum führt zu verringerter Folsäureaufnahme bei verstärktem Abbau sowie Exkretion und kann somit ebenfalls mit erhöhtem Darmkrebsrisiko in Verbindung gebracht werden⁴.

Neben der Ernährung üben auch Bewegungsgewohnheiten großen Einfluss auf das persönliche Darmkrebsrisiko aus^{5,6}. Interessanterweise können selbst Patienten mit bereits erworbenem Darmkrebs ihre Überlebenschancen durch vermehrte Bewegung und Fitness positiv beeinflussen⁵. Eine vor kurzem veröffentlichte Kohortenstudie stellte sowohl bei Frauen als auch Männern einen Zusammenhang zwischen persönlichem Darmkrebsrisiko und dem metabolischen Syndrom her. Das metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch das Auftreten von mindestens drei der nachfolgenden Zustände: Bluthochdruck, Hypertriglycerinämie, übermäßigem Hüftumfang, einem zu Gunsten von *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Cholesterin verschobenen Spiegel an *High Density Lipoprotein* (HDL)-Cholesterin sowie Diabetes mellitus Typ II. Zudem konnten die Autoren belegen, dass mit zunehmender Anzahl und Intensität der o.g. Einzelzustände das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, stetig steigt, und schlussfolgerten daher, dass das metabolische Syndrom ein Marker für ein physiologisches Milieu darstellt, welches für Tumor Initiation, Verlauf und Prognose mit verantwortlich zeichnet⁷.

1.3 WNT-PROTEINE UND IHRE REZEPTOREN

1.3.1.1 DIE FAMILIE DER WNT-PROTEINE

Neben verschiedenen Prozessen der Embryonalentwicklung ist die Familie der Wnt-Proteine an der stetigen Erneuerung adulten Gewebes beteiligt. Wnt-Proteine sind dabei an vielfältigen Prozessen, wie Zellteilung, Differenzierung und Aufgabenzuweisung, beteiligt.

Ursprünglich in den frühen 80er Jahren unter der Bezeichnung *INT1* als Integrationsstelle für das murine Brustkrebsvirus in murinem virusinduzierten Brustkrebs beschrieben, konnte aufgrund hoher Sequenzhomologien die Verbindung zwischen dem murinen Onkogen *INT1* und dem Wingless-Gen *Wg* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* hergestellt werden. *Wg* wurde erstmals wegen seiner Funktion während der Larvenentwicklung beschrieben. Später verschmolzen in der Säugerterminologie *INT1* und *Wg* zu *Wnt*. Durch Sequenzierung konnten in Säugern 20 Wnt-Proteine identifiziert werden, das humane Genom kodiert für 19 verschiedene Wnts.

Die Familie der Wnt-Proteine zeigt ihre Gemeinsamkeit eher im Bereich der Sequenzhomologie als in ihren Funktionen. Sie lassen sich als abgesonderte cysteinreiche Glykoproteine charakterisieren, die als Kurzstrecken-Ligand wirken. Wnt-Proteine wirken als Morphogen, das sind lang anhaltende Signalpeptide, deren Aktivität durch den von ihnen selbst aufgebauten Gradienten bestimmt wird. Anders als aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und des N-terminalen Signal-Peptids zur Sekretion zu erwarten wäre, weisen Wnt-Proteine nur relativ schlechte Löslichkeiten auf. Der deutlich hydrophobe Charakter der Wnt-Proteine wird durch Palmylierung konservierter Cysteine realisiert⁸. Diese posttranskriptionelle Modifikation ist essentiell für die Funktionalität und Freisetzung der Wnt-Proteine und ist wahrscheinlich auch am Aufbau des Konzentrationsgradienten entlang der Krypten beteiligt. Hierbei interagieren die Wnt-Proteine über die Palmytyl-Reste mit Membranen und Lipidpartikeln, welche dann die Wnt-Proteine an intrazelluläre Transportvesikel binden⁹. Der Transport der Wnt-Proteine vom endoplasmatischen Retikulum aus der Zelle heraus wird von Transmembranproteinen Wntless/Evenness interrupted (Wls/Evi) vermittelt¹⁰.

1.3.1.2 DIE REZEPTOREN DER WNT-PROTEINE

Die Familie der Frizzled-Rezeptoren

Sowohl genetische als auch biochemische Daten bestätigen *Frizzled-Proteine* (FZ) als primäre Wnt-Rezeptoren. *Frizzleds* gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und bilden im Humanen eine aus rund zehn verschiedenen Proteinen bestehende Familie. Neben den für G-Protein gekoppelten Rezeptoren charakteristischen sieben Transmembrandomänen setzen sich die *Frizzled-Rezeptoren* aminoterminal aus einer langen extrazellulären cysteinreichen Domäne (*Cysteine Rich Ligand Sequestering Domain, CRD*) und einem carboxyterminal lokalisiertem zytosolischen Schwanz zusammen^{11,12}. Die Wnt-Proteine binden direkt an die CRD-Domäne der Frizzled-Rezeptoren. Große Komplexizität erfährt die Wnt-FZ-Interaktion durch die große Vielzahl verschiedener FZ und Wnt-Proteine sowie dadurch, dass einige Wnts an verschiedene FZs binden können und umgekehrt¹¹.

Low Density Lipoprotein Receptor-Related Proteins (LRP) 5/6

Für die Transduktion des Wnt-Signals sind neben der oben beschriebene Interaktion zwischen Wnt und *Frizzled* die Kooperation mit dem Rezeptor LRP5 bzw. LRP6 notwendig. Dadurch kommt es zur Rezeptor-Trimerisierung und Aktivierung Wnt-vermittelter Signalwege¹³. Die Expression dieses Korezeptors wird u.a. durch Chaperone reguliert¹⁴. Die Bedeutung des LRP-Rezeptors wird durch die unter 1.4.1 beschriebene Klasse der Dickkopf-Proteine unterstrichen, die Wnt durch Interaktion mit LRP antagonisieren¹⁵.

Heparan Sulfated Forms of Proteoglycans (HSPG)

HSPGs wurde neben der Funktion als Korezeptor auch die Stabilisierung der Wnt-Proteine und die Unterstützung bei der Präsentation auf Wnt-produzierenden Zellen zugeschrieben. Darüber hinaus übernehmen *HSPGs* auch Aufgaben beim Transport der Wnt-Proteine zwischen den Zellen¹⁶.

1.3.1.3 WNT-VERMITTELTE SIGNALWEGE

Gegenwärtig geht man davon aus, dass durch Wnt-FZ-Interaktion drei verschiedene Signalwege aktiviert werden können: der kanonische Wnt-Signalweg, der nicht-kanonische *Planar Cell Polarity* Signalweg (PCP) sowie der Wnt/Ca²⁺-Signalweg. Traditionell werden Wnt-Proteine auf Basis ihre Aktivitäten in Zelllinien oder *in vivo* Assays in zwei Klassen unterteilt, die kanonischen und nicht-kanonischen Wnts. Kanonische Wnts (z.B. Wnt1, Wnt3a, Wnt8) aktivieren durch Stabilisierung von β -Catenin die Transkription von TCF/LEF Zielgenen. Nicht-kanonische Wnts (z.B. Wnt4, Wnt5a und Wnt11) aktivieren den *Planar Cell Polarity* sowie den Wnt/Ca²⁺-Signalweg. Interessanterweise sind nicht-kanonische Wnts in der Lage, kanonische Wnts zu antagonisieren¹⁷. Des Weiteren sind einige

Wnt-Proteine in Abhängigkeit vom gebundenen Frizzled-Rezeptors in der Lage, sowohl kanonische als auch nicht-kanonische Signalwege zu aktivieren¹⁸. Der am besten verstandene kanonische Wnt-Signalweg aktiviert die nukleären Funktionen von β -Catenin und führt zur Expression von β -Catenin/TCF Zielgenen, die an der Regulation von Zellproliferation, Gewebshomöostase, Zellüberleben und Zelldifferenzierung beteiligt sind. Durch Mutationen oder epigenetische Veränderungen wie, z.B. Promotermethylierung, hervorgerufene Deregulierungen des Wnt-Signalwegs können mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden, darunter auch der Entwicklung von Tumoren. Da unsere Gruppe an der kolorektalen Karzinogenese interessiert ist, fokussieren wir uns in dieser Arbeit auf den kanonischen Wnt-Signalweg, auf den sich nachfolgend der Begriff Wnt-Signalweg stets bezieht.

1.3.2 DROSOPHILA ARMADILLO UND DESSEN HOMOLOGE

Das *Armadillo*-Gen der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* spaltet sich im Genom der Wirbeltiere in zwei unabhängige Gene β - und γ -Catenin auf, die für zwei eigenständige, aber miteinander verwandte Proteine kodieren und auch unter der Bezeichnung *Armadillo-like Proteins (ALP)* bekannt sind^{19,20}. β -Catenin und γ -Catenin weisen in der zentralen Region eine gemeinsame, zu 76% identische Struktur, bestehend aus 12 *Armadillo Repeats*, welche aus jeweils 42 Aminosäuren bestehen, auf²⁰⁻²². Dagegen liegen aminoterminal- als auch carboxyterminale Domäne nur zu 41-57% bzw. 15-29% identisch vor^{20,22} (Abbildung 1.1).

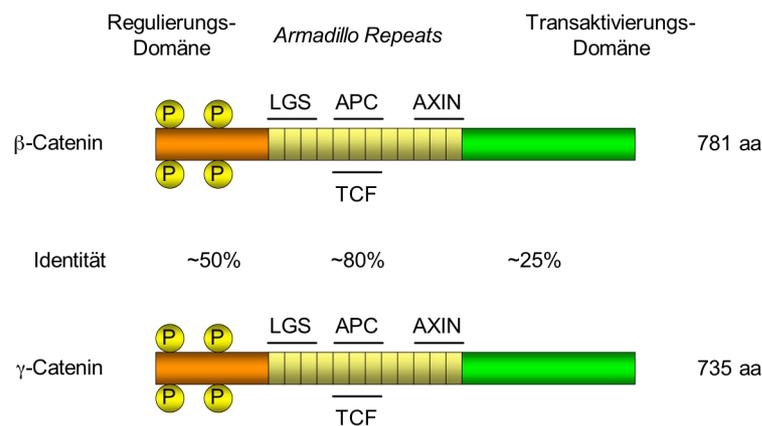


Abbildung 1.1 β -Catenin und γ -Catenin im Vergleich.

Aminoterminal zeigen sowohl β - als auch γ -Catenin hochkonservierte Domänen für GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung²³. Auch die Stabilität von γ -Catenin scheint durch Phosphorylierung beeinflusst zu werden. Die Überexpression von Axin, einem Mitglied des *Deconstruction Complex*, führte zur Verringerung der γ -Catenin Proteinspiegel²⁴. Auch konnte gezeigt werden, dass neben β -Catenin auch γ -Catenin mit Axin und β -TrCP interagiert²⁵.

Wie unter 1.3.3 besprochen wird β -Catenin sehr eng im Wnt-Signalweg reguliert. Auch γ -Catenin vermittelt im Wnt-Signalweg und wird über Interaktion mit dem Tumorsuppressor APC abgebaut²⁶. Während ca. 10% der kolorektalen Tumoren Mutationen im β -Catenin Gen aufweisen, wurden für γ -Catenin bisher keine Mutationen in primären Tumoren berichtet^{20,27}. Die Funktion von γ -Catenin bei der Tumorentwicklung ist umstritten. Während einige Autoren Wildtyp γ -Catenin onkogene Funktionen zuschreiben, vermuten andere in γ -Catenin einen Tumorsuppressor^{20,26,28,29}. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von γ -Catenin das Wachstum von Tumoren sowohl inhibiert als auch verstärkt^{26,29}. Unstrittig ist, dass sich die Halbwertszeit des β -Catenin Proteins durch Punktmutationen von GSK3 β -Phosphorylierungsstellen (S33Y, S37A) deutlich erhöht, während die Stabilität von γ -Catenin durch analoge Mutationen weniger beeinflusst wird (S28A)^{20,27}.

Sowohl β - als auch γ -Catenin können nur mit Hilfe von HMG-Box Proteinen der TCF/LEF-Familie an die DNS binden. Demzufolge ergab sich die Fragestellung, ob γ -Catenin mit der gleichen Affinität wie β -Catenin an TCF bindet. Hier liegen sowohl Daten vor, die vergleichbare Affinitäten für beide Catenine postulieren, als auch Daten, die zeigen, dass γ -Catenin mit deutlich niedrigerer Affinität an TCF bindet^{20,30}. Ein anderes Modell zeigt, dass β - und γ -Catenin zwar mit gleicher Affinität an LEF1 binden, die Interaktion von LEF1 mit der DNS aber durch γ -Catenin gehemmt wird³¹. Vergleichbare Untersuchungen existieren für TCF4. Hier konnte gezeigt werden, dass zum einen TCF4 über verschiedene Regionen mit β - und γ -Catenin interagiert, und dass durch CKI vermittelte Phosphorylierung von TCF4 nur die Bindung zu γ -Catenin beeinflusst wird³². Des Weiteren existiert ein Opfer-Modell, das davon ausgeht, dass durch die Überexpression von γ -Catenin der Abbau von β -Catenin verlangsamt wird und somit γ -Catenin indirekt die Transkription β -Catenin abhängiger Gene verstärkt³⁰. Es erscheint auch möglich, dass γ -Catenin in Abhängigkeit von β -Catenin die Aktivierung TCF-vermittelter Transkription unterschiedlich beeinflusst. So ist γ -Catenin in der Lage, in β -Catenin defizienten Linien die Transkription zu aktivieren³³. Gesichert ist, dass β - und γ -Catenin an verschiedenen Stellen mit der carboxyterminalen Domäne von TCF4 interagieren^{32,34}.

Zusammenfassend ist die Datenlage für die Funktion von γ -Catenin im Wnt-Signalweg bisweilen unklar bis widersprüchlich, während die Funktionen und Regulation von β -Catenin tiefgründig und übereinstimmend bekannt sind. Daher werden die im Folgenden beschriebenen Prozesse anhand von β -Catenin erläutert.

1.3.3 DER KANONISCHE WNT-SIGNALWEG

Den ersten Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen kolorektaler Karzinogenese und dem Wnt-Signalweg lieferten die Beschreibung des APC-Gens (*Adenomatous Polyposis Coli*) in Patienten mit FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), einer das APC-Gen betreffenden Erbkrankheit, und die nachfolgende Beschreibung der Interaktion zwischen APC und β -Catenin³⁵⁻³⁷.

1.3.3.1 DER KANONISCHE WNT-SIGNALWEG IM ÜBERBLICK

In Abwesenheit von Wnt-Faktoren werden die Spiegel des freien, zytosolischen β -Catenins durch Interaktion mit dem *Deconstruction Complex*, der sich aus dem Tumorsuppressorprotein APC, den Phospho-Kinasen *Glycogen Synthetase Kinase-3 β* (GSK3 β) und *Caseine Kinase I* (CK1) sowie dem *Scaffold Protein* (Bindeprotein) AXIN zusammensetzt, streng reguliert. Im Zusammenspiel des *Deconstruction Complex* phosphoryliert die Kinase CK1 cytosolisches β -Catenin an Serin45 und ermöglicht damit die nachfolgenden Phosphorylierungen an Thyrosin41, Serin37 und Serin33 durch GSK3 β . Diese mehrfache Phosphorylierung von β -Catenin ist die Voraussetzung für die nachfolgende Ubiquitinierung durch die E3-Ubiquitin Ligase β -Trcp (*β -Transducin-Repeat-Containing Protein*), die β -Catenin für den Abbau im 26S-Proteasom kennzeichnet³⁸ (Abbildung 1.2, links).

Durch Wnt-vermittelte Aktivierung der Rezeptoren FZ und LRP kommt es zur Hemmung des *Deconstruction Complex* und zur Akkumulation von zytosolischem β -Catenin, welches sogleich in den Zellkern transloziert. β -Catenin selbst weist keine DNS-Bindedomäne auf und interagiert daher über die *High Mobility Group-Box* (HMG-Box) Proteine TCF/LEF mit der DNS. Nur in Verbindung mit diesem Komplex ist β -Catenin in der Lage als Transkriptionsfaktor die Expression von β -Catenin Zielgenen, darunter auch Onkogene, wie c-myc und CyclinD1, zu initiieren³⁸ (Abbildung 1.2, rechts).

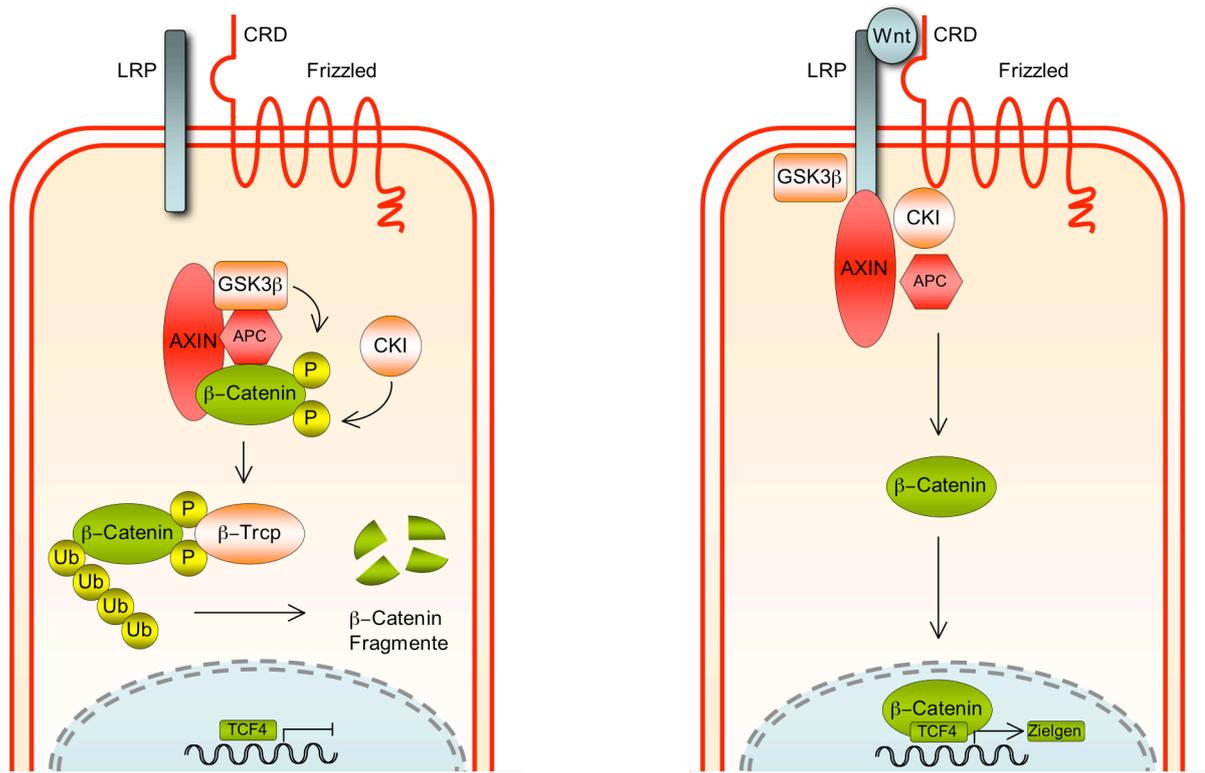


Abbildung 1.2 Der kanonische Wnt-Signalweg im Überblick.

1.3.3.2 DER DECONSTRUCTION COMPLEX

Lange Zeit galt das Tumorsuppressor-Protein APC, auch als *Gatekeeper* der kolorektalen Karzinogenese bekannt, als wichtigstes Mitglied im *Deconstruction Complex*. Dagegen sind die weitreichenden Funktionen der Kinasen CK1 und GSK3β sowie des in nur sehr geringer Menge vorliegenden *Scaffolds* Axin erst seit kurzem in den Fokus der Betrachtung gerückt.

Das Scaffold-Protein AXIN

Lange Zeit wurde AXIN nur die Rolle eines Bindeglieds (*Scaffold*), das für den Zusammenhalt aller zum *Deconstruction Complex* gehörenden Partner verantwortlich zeichnet, zugeschrieben. Neue Untersuchungen beschrieben AXIN darüber hinaus zum einen auch als hochaktiven molekularen *Shuttle*, das β-Catenin aus dem Zellkern heraus befördert. Des Weiteren wurde Axin auch als zytosolischer Anker von β-Catenin diskutiert³⁹. Bekannt ist, dass Axin in etwa 1000-fach geringerer Menge im Zytosol vorliegt als andere Komponenten des Signalwegs, inklusive β-Catenin. Daher ist die Funktion als Anker eher umstritten. Die genaue Rolle von Axin bei der Translokation von β-Catenin in den Kern bzw. wieder heraus ist noch ungeklärt⁴⁰.

Weitgehend akzeptiert ist, dass es durch Bindung von Wnt an den FZ-Rezeptor zur Senkung der Axin-Spiegel kommt. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Kinase GSK3 β , deren Aktivität durch Wnt gehemmt wird und die neben β -Catenin auch Axin phosphoryliert. Zum einen schützt die Phosphorylierung Axin vor Degradierung und zum anderen wird die Affinität für β -Catenin gesteigert. Deutlich komplexer stellt sich dieser Sachverhalt dar, wenn die zum Abbau von Axin führenden Mechanismen bedacht werden. Wnt vermittelte Phosphorylierung des LRP-Rezeptors durch GSK3 β und CK1 erzeugt eine induzierte Bindestelle für Axin⁴¹. Parallel wird DSH durch CK1 phosphoryliert und an den intrazellulären C-Terminus des Frizzled-Rezeptors gebunden. Durch Interaktion beider Proteine über die gemeinsame DIX-Domäne wird Axin an LRP gebunden⁴². In Folge dessen wird der gesamte *Deconstruction Complex* an die Membran rekrutiert, wo DSH zum einen die Stabilität Axins durch Inhibition der GSK3 β -vermittelten Phosphorylierung hemmt und zum anderen den direkten Abbau Axins durch Ubiquitinierung vermittelt^{40,42}. Der *Deconstruction Complex* ist damit nicht mehr funktionsfähig (Abbildung 1.3).

Definitiv stellt Axin die limitierende Komponente im *Deconstruction Complex* dar, so dass Änderungen des Axin-Spiegels den potentiell größten Einfluss auf die zytosolischen β -Catenin-Spiegel nehmen können⁴⁰. Des Weiteren vermittelt Axin im Gegensatz zu APC, DSH, GSK3 β und β -Catenin exklusiv im kanonischen Wnt-Signalweg und stellt eine Erklärungsmöglichkeit dar, wie der kanonische Signalweg von Änderungen der im Überfluss vorliegenden Proteine β -Catenin, APC, GSK3 β durch nicht-kanonische Signalwege abgegrenzt werden kann⁴³.

Die dualen Funktionen der Kinasen GSK3 β und CK1

Im Wnt-Signalweg wird β -Catenin durch das Zusammenspiel der Kinasen GSK3 β und CK1 phosphoryliert und dadurch für Ubiquitin-vermittelte Degradation freigegeben. Deshalb galten beide Kinasen lange Zeit als reine Inhibitoren des Wnt-Signalwegs. Im Zuge der Fokussierung auf Axin konnten für beide Kinasen weitere, duale und z.T. Wnt-aktivierende Funktionen gezeigt werden.

So wird für GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung die Stabilisierung von Axin und erhöhte Bindungsaffinität zu β -Catenin, also die Inhibierung des Wnt-Signalwegs, diskutiert. Andererseits wird durch CK1 und GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung des LRP-Rezeptors eine Bindestelle für Axin induziert, welche in Verbindung mit CK1-vermittelter DSH-Phosphorylierung sowohl zur Auflösung des *Deconstruction Complex* als auch zum Abbau von Axin führt, den Wnt-Signalweg also aktiviert^{41,44}. Zusammenfassend nehmen die CK1 und GSK3 β im Wnt-Signalweg eine Zwitterrolle ein. Auf der Ebene des *Deconstruction Complex* wirken sie als Antagonisten (Abbildung 1.3, links), auf Ebene der Rezeptoren als Aktivatoren des Wnt-Signalwegs (Abbildung 1.3, rechts).

APC

Neben seiner Funktion im *Deconstruction Complex* wird der Tumorsuppressor APC auch im Zusammenhang mit der nukleären Lokalisation von β -Catenin diskutiert. Dabei soll APC sowohl Funktionen im aktiven Transport von β -Catenin in als auch aus dem Kern heraus übernehmen⁴⁵. Dadurch, dass durch APC-Mutationen ein trunkiertes APC-Proteine exprimiert wird, welches die für den APC-vermittelten Export von β -Catenin essentielle *Nuclear Export Sequence* (NES) nicht mehr aufweist, kann diese Modell gestützt werden⁴⁶. Im Zusammenhang mit passiver Diffusion von β -Catenin in den Kern wird APC dagegen als Anker diskutiert, der β -Catenin im Zytosol zurückhalten soll³⁹. Die genaue Rolle von APC bei der Kernlokalisierung von β -Catenin bleibt weiter offen.

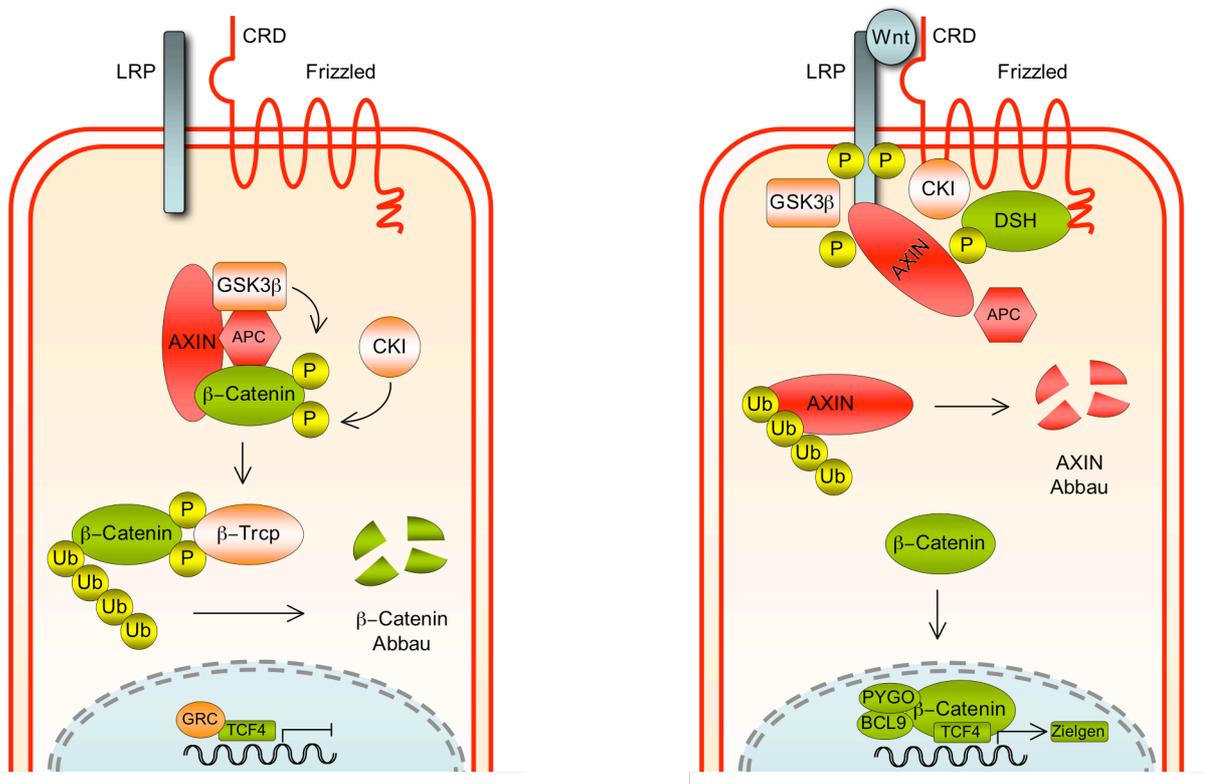


Abbildung 1.3 Der kanonische Wnt-Signalweg im Detail.

1.3.3.3 WNT VERMITTELTE PROZESSE IM KERN

Lange Zeit galt die Formierung des β -Catenin/TCF-DNS-Komplexes als der entscheidende Punkt im Wnt-Signaling. Berücksichtigt man, dass TCF überwiegend im Zellkern vorliegt, während β -Catenin nur nach Wnt-Aktivierung im Zellkern nachgewiesen werden kann, gewinnt die Lokalisation von β -Catenin als entscheidendes Schlüsselereignis an Bedeutung⁴⁷. Mit einer Masse von ca. 90 kDA und ohne *Nuclear Localization Sequence* (NLS) als auch *Nuclear Export Sequence* (NES) sollte β -Catenin eigentlich nicht passiv durch die Kernmembran diffundieren können, ist jedoch aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Importin- β in der Lage, direkt und ohne andere Partner mit nukleären Poren (*Nuclear Pore Complex*, NPC) zu interagieren und in den Kern einzutreten^{39,48}. Neben dem Modell der passiven und ungerichteten Diffusion von β -Catenin beschreibt das Modell von Townsley LGS/BC19 als zytosolischen und PYGO als nukleären Anker für β -Catenin^{39,49}. Darüber hinaus werden sowohl Axin als auch APC als *Shuttle* für β -Catenin diskutiert^{39,45,50,51}.

In Abwesenheit von Wnt-Proteinen agiert TCF in Kooperation mit Groucho als Transkriptions-Repressor⁵². Wnt-vermittelt akkumuliert β -Catenin im Zytosol und transloziert in den Kern. Dort verdrängt β -Catenin Groucho von TCF und wandelt so den Repressions- in den Aktivierungskomplex. Der C-Terminus von β -Catenin stellt eine starke Transaktivierungsdomäne dar und wird über die *High Mobility Group-Box* (HMG) des Transkriptionsfaktors TCF an die DNS gebunden. Die Interaktion zwischen TCF und β -Catenin wird durch zwei weitere Proteine vermittelt, Pygopus (PYGO) und *Legless* (LGS/BC19). Dabei verbindet LGS/BC19 PYGO mit dem N-Terminus von β -Catenin. Die Präsenz beider Proteine ist essentiell für die Transkription von β -Catenin-Zielgenen⁵³.

1.4 ANTAGONISTEN DES WNT-SIGNALWEGS

Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRP)

Die Familie der *SFRPs* umfasst bisweilen acht Proteine aus drei Subgruppen. Diese Proteine können als sezernierte ‚lösliche‘ Form der Frizzled-Rezeptoren verstanden werden und agieren durch Bindung der Wnt-Proteine, abgesehen von sFRP1, als Antagonisten des Wnt-Signalwegs. N-Terminal weisen *SFRPs* Homologien zur CRD-Domain der *Frizzled*-Rezeptoren auf, welche die Bindung von Wnt-Proteinen an den Rezeptor vermittelt. Über diese Domäne konkurrieren *SFRPs* und *Frizzleds* um die Bindung der Wnt-Proteine⁵⁴.

Es wurde gezeigt, dass in ca. 90% der kolorektalen Karzinome die Expression von *SFRPs* durch Promoter-Methylierung gesenkt wird und dass diese epigenetische Änderung bereits in frühen Stadien anzutreffen ist⁵⁵⁻⁵⁷. Des Weiteren kann die durch APC- oder β -Catenin-Mutation hervorgerufene Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch *SFRPs* wieder gesenkt werden⁵⁶.

Wnt Inhibitory Factor-1 (WIF-1)

Obwohl *WIF-1* keine Homologie zur FZ-CRD aufweist, wirken diese Proteine ebenfalls durch Bindung an Wnt-Proteine als Antagonist des Wnt-Signalwegs⁵⁴. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in ca. 80% der Adenome als auch früher kolorektaler Karzinome die Expression von *WIF-1* durch Promotermethylierung gesenkt ist⁵⁸. Darüber hinaus können TCF-abhängige Transkription, Wachstum, Koloniebildung sowie Matrix-unabhängiges Wachstum kolorektaler Karzinomzellen durch Reexpression von *WIF-1* gesenkt werden⁵⁸.

Cerberus (Cer)

Cerberus ist ein multivalenter *Growth-Factor Antagonist*, der ebenfalls durch Bindung der Wnt-Proteine den Wnt-Signalweg antagonisiert⁵⁴. Über die Bedeutung von Cerberus im kolorektalen Karzinom ist zur Zeit nichts bekannt.

Dickkopf-Proteine (DKKs)

Die Familie der DKK-Proteine wird unter 1.4.1 besprochen.

1.4.1 DIE FAMILIE DER DICKKOPF-PROTEINE

Die am besten charakterisierten Inhibitoren des Wnt-Signalwegs sind die Mitglieder der Familie der Dickkopf-Proteine (DKK). Dickkopf-Gene konnten nicht in wirbellosen Tieren, dafür aber in Wirbeltieren von Mäusen bis zum Menschen gefunden werden⁵⁹. Dickkopf-Proteine sind extrazellulär abgesonderte Wnt-Antagonisten, die nicht nach den bisher beschriebenen Grundsätzen funktionieren. Sie interagieren nicht mit dem Wnt-Rezeptor Frizzled, auch binden sie nicht an Wnt-Proteine, um so deren Interaktion mit ihren Rezeptoren zu verhindern⁶⁰. Die Charakterisierung des Frizzled-Korezeptors LRP ergab einen neuen potentiellen Interaktionspartner und es konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von DKK an einen weiteren Rezeptor, die Familie der Kremenproteine, die Internalisierung von LRP vermittelt wird (Abbildung 1.4). Ohne den als Frizzled Korezeptor agierenden LRP-Rezeptor können Wnt-Proteine nicht ihr Signal ins Zellinnere vermitteln⁶⁰. Interessanterweise ist die inhibitorische Funktion der DKK-Proteine an die Interaktion mit dem entsprechenden Kremen-Protein gekoppelt. Es wurde gezeigt, dass im Fall von DKK2 und DKK4 deren Funktion als Wnt-Inhibitor von der Interaktion mit Kremen2 abhängt⁶¹.

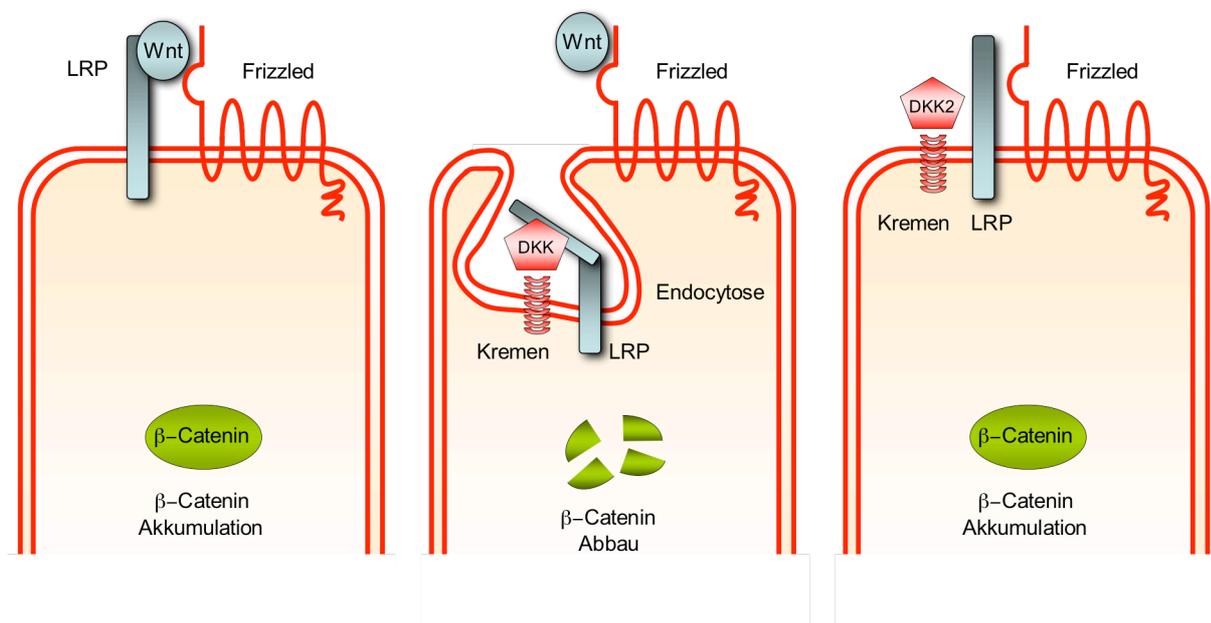


Abbildung 1.4 Die Dickkopf (DKK) Proteine interagieren mit Kremen-Rezeptoren.

Die Familie der Dickkopfproteine besteht aus vier glykosylierten, extrazellulär abgesonderten Proteinen, DKK1, DKK2, DKK4 und DKK4. Während für DKK1 und DKK4 inhibitorische Funktionen in Bezug auf den Wnt-Signalweg gezeigt werden konnten, fungiert DKK2 sowohl als Inhibitor als auch Induktor des Wnt-Signalwegs. Die Rolle von DKK3 ist bisher nicht geklärt⁶². Humane Dickkopf-Proteine beinhalten zwei cysteninreiche, familienintern hochkonservierte Bereiche⁶³.

DKK1 kann als bestuntersuchter Prototyp der DKK-Familie verstanden werden. Es wurde gezeigt, dass er durch Inhibition des Wnt- β -Catenin-*Signalings* als Tumorsuppressor fungiert, indem er mit hoher Affinität über transmembranäre Rezeptoren der Kremen-Familie an LRP bindet, was zur Endozytose des LRP-Rezeptors führt⁶⁴⁻⁶⁶ (Abbildung 1.4). Die Expression von DKK1 inhibiert Zelltransformation in Hela-Zellen⁶³. Interessanterweise konnte in Wilms-Tumoren deutlich gesteigerte DKK1-Expressionslevel nachgewiesen werden, was erstmals auf einen möglichen negativen *Feedback*-Mechanismus zwischen überschießendem Wnt-*Signaling* und DKK1-Expression hinwies⁶⁷.

Durch Promoteranalysen konnte diese Vermutung bestätigt werden. Diese charakterisierten DKK1 als direktes *Downstream-Target* von β -Catenin/TCF und p53 vermittelten Signalwegen^{68,69}. Für das kolorektalen Karzinom wurden erniedrigte DKK1-Spiegel beschrieben⁶⁸.

Im Fall des dual wirkenden Proteins DKK2 vermittelt Kremen2 abhängig von weiteren bisher nicht bekannten komplexen zellulären Zusammenhängen, ob DKK2 entweder als schwacher Aktivator oder Inhibitor des Wnt-Signalwegs agiert^{61,70,71}. Die Überexpression von DKK2 führt in *Xenopus* Embryonen zur schwachen Aktivierung des Wnt-Signalwegs, in HEK293 Zellen jedoch zur Senkung der Aktivität, wohingegen die Expression bestimmter DKK2-Mutanten im gleichen Zellmodell zur Aktivierung Wnt-vermittelter Signalwege führt^{70,71}.

Obwohl der Zusammenhang zwischen DKK3 und Wnt-Signalweg bisher noch nicht hergestellt werden konnte, wurde für DKK3 gezeigt, dass dieses Mitglied der Dickkopf-Familie als Tumorsuppressor fungiert. Diese Funktion vermittelt DKK3 über die Hemmung des Zellzyklus sowie des Tumorzellwachstums, der Aktivierung von Apoptose und über die Hemmung der Invasionsfähigkeit und Motilität von Tumorzellen⁷²⁻⁷⁴. Die Expression von DKK3, auch bekannt als *REIC* (*Reduced Expression in Immortalized Cells*), ist in zahlreichen Tumoren herabreguliert^{57,75,76}. Zudem scheint die Methylierung von DKK3 als prognostischer Marker geeignet⁷⁷. Während DKK1, DKK2 und DKK4 an LRP5/6 binden und hohe Homologien innerhalb der DNS-Sequenzen zeigen, bilden DKK3 und sein Verwandter *Soggy* (Dickkopf like 1, DKK11) eine Subklasse innerhalb der DKK-Familie⁷⁸. DKK3 und *Soggy*, binden nicht an LRP5/6 und zeigen nur geringe Homologie zu anderen Mitgliedern der DKK-Familie, während sie untereinander hochkonserviert sind^{15,59,65}.

Über die Funktion von DKK4 ist bisher nur wenig bekannt, doch konnte bisher gezeigt werden, dass die Wnt-antagonistische Aktivität mit der von DKK1 gleichzusetzen ist und dass möglicherweise auch für DKK4 ein negativer *Feedback*-Mechanismus zum Wnt-Signalweg besteht⁷⁹. Im Nachfolgenden haben wir u.a. versucht, diesen vermuteten Mechanismus darzustellen.

1.5 WNT-SIGNALWEG UND TUMORENTWICKLUNG

Das Vogelstein-Modell

Bei der Entwicklung von Tumoren handelt es sich um einen Mehrschrittprozess, hervorgerufen durch Mutationen in Tumorsuppressor und/oder Onkogenen. Neben Mutationen treten auch epigenetische Veränderungen wie DNS-Methylierung auf, welche die Expression von Genen verändern. In den späten 80er Jahren wurde von Fearon und Vogelstein das erste Modell entwickelt, das die genetischen Veränderung, die eine gesunden Darmepithelzelle über das Stadium dysplastischer Adenome hin zum malignen Tumor durchläuft, zusammenhängend beschreibt⁸⁰. Das *Vogelstein Modell* basiert auf der Idee, dass das Auftreten einer Vielzahl aufeinanderfolgender Mutationen an bestimmten Schlüsselpositionen notwendig ist, um die Wandlung einer gesunden in eine Tumorzelle zu vollziehen. Der zentrale Kerngedanke dieses Modells ist der fortschreitende Erwerb von aktivierenden oder mit Funktionsverlust einhergehenden Mutationen. Es wird vermutet, dass das Zusammenspiel von minimal sieben verschiedenen Mutationen notwendig ist, damit es zur Entwicklung eines Tumors kommen kann⁸¹. Das Vogelstein-Modell manifestiert seit Jahren das Dogma, dass für die Entwicklung von kolorektalen Tumoren die Anhäufung verschiedener genetischer Veränderungen unumgänglich ist. Aktuelle Arbeiten zeigen jedoch immer wieder, dass die Akkumulation von Mutationen in nur einem sehr geringen Anteil der Tumoren nachgewiesen werden kann. Vielmehr müssen neue Modelle, welche die Unterschiede in der Entwicklung von Darm- und Rektumkarzinomen als auch epigenetische Veränderungen berücksichtigen, entwickelt werden⁸². Im Folgenden werden die für das Verständnis der Wnt-Signalweg-assoziierten Vorgänge während der kolorektalen Karzinogenese entscheidenden Mutationen kurz beschrieben.

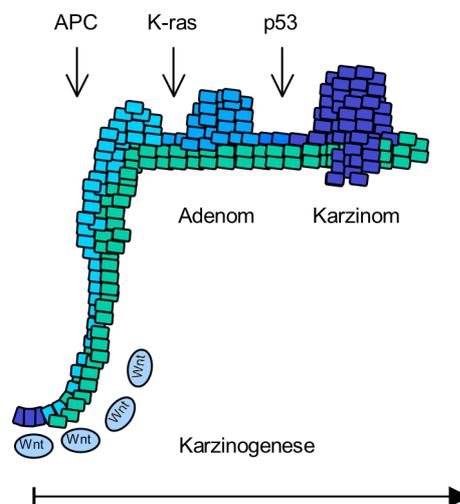


Abbildung 1.5 Modell der kolorektale Karzinogenese nach Fearon und Vogelstein.

Das Tumorsuppressor-Protein APC – Torhüter der kolorektalen Karzinogenese

In der Entwicklung sporadischer kolorektaler Tumore spielt die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens APC eine wichtige Rolle. Mutationen des APC-Gens wurden zuerst in der Keimbahn von Patienten mit FAP-Syndrom (*Familial Adenomatous Polyposis*) identifiziert. Nach Verlust des noch verbliebenen Wild-Typ-Allels entwickeln diese Patienten Hunderte kleiner Polypen, ein Anzeichen für die Tumorsuppressorfunktion von APC⁸¹. Für FAP-assoziierte Tumoren wurde drei verschiedene Subklassen beschrieben, die interessanterweise mit der Position der APC-Mutation korrelieren⁸³. Ungefähr 70-80% der sporadisch entwickelten kolorektalen Tumore weisen Mutationen des APC-Gens auf. Da diese bereits in sehr frühen Stadien der Adenom-Karzinom-Entwicklung auftreten, wird angenommen, dass APC-Mutationen eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung maligner Tumore darstellen⁸¹.

Das relativ lange APC-Gen ist auf Chromosom 5q21 lokalisiert und kodiert für ca. 8.5-kb mRNA bzw. ein 2843 Aminosäuren umfassendes 312kD großes Protein. Innerhalb des Proteins weist das strukturell sehr komplexe APC-Protein Protein-Protein-Interaktionsdomänen für β -Catenin und Axin auf^{35,36,81}. So vermitteln die drei 15 Aminosäuren-*Repeats* umfassenden *SAMP-Repeats* (Serin-Alanin-Methionin-Prolin) die Interaktion mit Axin, während eine weitere aus sieben 20-Aminosäuren-*Repeats* bestehende Region für die Bindung von β -Catenin verantwortlich ist⁸⁴.

In kolorektalen Tumoren sind stets beide Allele, sei es durch Punktmutation oder Allelverlust, betroffen. Ungefähr 60% der Karzinome weisen Punktmutationen auf. Untersuchungen sowohl an sporadischen als auch FAP-assoziierten Tumoren zeigten hinsichtlich der betroffenen Region Parallelen⁸⁵. Obwohl die auf Exon 15 zwischen Codon 1286 und 1513 lokalisierte und als *Mutation Cluster Region* (MCR) bezeichnete Region lediglich 10% der kodierenden Sequenzen enthält, ist sie von 90% der berichteten APC Mutationen betroffen. Sie liegt *upstream* der *SAMP-Region*, so dass die Einführung eines Stop-Codons in der Expression eines um die carboxyterminal gelegenen β -Catenin Bindestellen verkürzten und daher unfunktionalen APC-Proteins resultiert⁸³. Neben dieser für die Phosphorylierung von β -Catenin entscheidenden Region kommt es auch zum Verlust der für den APC-vermittelten β -Catenin Kernexport zuständigen Region (*Nuclear Export Sequence, NES*)^{46,47}. In der Summe ergibt sich die Akkumulation von Signalweg-aktivem β -Catenin im Zellkern und ein Anstieg β -Catenin vermittelter Genexpression.

β-Catenin

Mutationen von β-Catenin betreffen die für den Abbau notwendigen Phosphorylierungsstellen im Bereich der NH₂-Domain und führen zur Stabilisierung der β-Catenin-Spiegel. β-Catenin Mutationen treten nur in einem kleinen Teil (ca. 10%) der Tumoren auf und werden vor allem in Mikrosatteliten instabilen Tumoren berichtet⁸⁶. Diese Tumore weisen Störungen der DNS-Reparaturmechanismen auf⁸⁷.

Axin2 (conductin)

Neben Mutationen des β-Catenin Gens treten in Mikrosatteliten instabilen Tumoren oftmals auch Mutationen des Axin Gens auf, die in der Expression eines trunkierten, in der Art eines dominant negativen Proteins fungierenden Axins-Proteins resultieren⁸⁸.

K-ras

Mutationen in K-ras führen zu erhöhter und unkontrollierter Zellproliferation und maligner Transformation⁸².

Der Tumorsuppressor p53

Der bekannteste Tumorsuppressor p53, ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 lokalisiert und ist in mehr als 70% der kolorektalen Karzinome mutiert. Dem Protein werden wichtige regulatorische Funktionen im Bereich Zellzyklus, Transkription, Zellstress und Verarbeitung von DNS-Schäden zugeschrieben. Der vor allem in späteren Stadien auftretende Verlust des p53-Gens wird als entscheidender Schritt in vom Adenom in Richtung des malignen Tumors verstanden^{89,90}.

Epigenetische Veränderungen der Secreted Frizzled Related Proteins (SFRP)

Epigenetische Änderungen der SFRP-Expression durch Promotermethylierung treten in relativ frühen Stadien der kolorektalen Karzinogenese auf⁵⁶.

2 Material und Methoden

2.1 ZELLKULTUR

2.1.1 ZELLINIEN

Die humanen Kolonkarzinomzelllinien SW-480, DLD-1 und HT-29 als auch die humane Nierenzelllinie HEK293 wurden von ATCC (LGC-Promochem) geliefert. 293T-Rex (Clontech) wurden wie bereits beschrieben mit einem induzierbaren Expressionsplasmid für S33Y β -Catenin bzw. β -Galaktosidase stabil transfiziert⁹¹. Alle Zelllinien wurden in einer feuchtwarmen Atmosphäre von 37°C und 5% CO₂ gehalten. Um möglichen Veränderungen der Zellen durch Mutationen vorzubeugen, wurden für die Experimente keine Passagen ≥ 25 benutzt. Um sicherzustellen, dass die durch stabile Transfektion erhaltenen Zellklone nicht von Zellen, die das stabil integrierte Plasmid verloren haben unterwandert werden, wurden diese Linien stets unter Selektionsdruck gehalten. Die genauen Konditionen können Tabelle 2.1 entnommen werden.

Tabelle 2.1 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Medium	Zusätze	Selektionsmarker / Konz.	
DLD-1	DMEM	1% P/S 10% FCS gold		
SW-480	DMEM	1% P/S 10% FCS gold		
HT-29	McCoy's 5a	1% P/S 10% FCS gold		
HEK293	DMEM	1% P/S 10% FCS gold		
293T-Rex S33Y β -cat	McCoy's 5a	1% P/S 10% FCS gold	G418	100 μ g/ml
HeLa	DMEM	1% P/S 10% FCS gold		
HT-29TR	McCoy's 5a	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin	50 μ g/ml
SW-480TR	DMEM	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin	50 μ g/ml
SW-480TR β -cat	DMEM	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin G418	50 μ g/ml 500 μ g/ml
SW-480TR dnTCF	DMEM	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin Hygromycin B	50 μ g/ml 700 μ g/ml

* Tetracycline negative FCS

2.1.2 ZELLKULTURTECHNIKEN

2.1.2.1 PASSAGIERUNG UND EINSAAT DER ZELLEN

Um das Risiko von Mutationen so gering wie möglich zu halten, wurden die Zellen bei Erreichen von ca. 90% Konfluenz bzw. 3x pro Woche passagiert. Dazu wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA im Brutschrank solange inkubiert, bis sie sich leicht von der Platte ablösen ließen. Um den Verdau durch Trypsin zu stoppen, wurde FCS-haltiges Medium im Überschuss zugesetzt und die Zellen abzentrifugiert (360xg, 5min, RT). Nach Bestimmung von Zellzahl und -viabilität (Nebauerzählkammer) wurden 1,6 – 2,0 10⁶ Zellen in 10cm Zellkulturschalen eingesät. 24h vor geplanten Experimenten wurden die Zellen wie nachfolgend eingesät (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Zellkulturbedingungen für Experimente

Assay	Zellline	Zellzahl / well
Western Blot induzierbare Linien)	SW-480 TR β-cat	1,5 x 10 ⁵ 12 well
transiente Transfektion (Proteinextraktion)	DLD-1 SW-480	1,5 x 10 ⁵ 12 well
	HT-29	1,7 x 10 ⁵ 12 well
transiente Transfektion (RNA extraction)	DLD-1 SW-480 HT-29	4 x 10 ⁵ 6 well
stabile Transfektion von Plasmid DNS	SW-480 (TR) HT-29	4 x 10 ⁵ 6 well
Zellproliferation (MTT)	DLD-1 SW-480 SW-480 TR, β	5 x 10 ³ 96 well
DNS-Fragmentierung (Nicoletti)	alle Linien	1,5 x 10 ⁵ 12 well

2.1.2.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN

Die Zellen wurden wie unter 2.1.2.1 beschrieben trypsinisiert und zentrifugiert. Um die Zerstörung der Zellmembranen durch Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens zu vermeiden, wurden die Zellen in eiskaltem FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und anschließend bei -80°C eingefroren. Um die Zellen auch über längere Zeit (≥ 6 Monate) zu lagern, wurden die Zellen nach 24h bei -80°C in flüssigen Stickstoff eingelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden diese in der Hand aufgetaut und in vorgewärmtem Medium aufgenommen. Anschließend wurde zum Entfernen von DMSO zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend im entsprechenden Medium (Tabelle 2.1) aufgenommen und mit ca. 70% Konfluenz eingesät, so dass die Zellen nach zwei Tagen passagiert werden konnten. Die Zellen wurden 2x passagiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.2 WESTERN BLOT ANALYSE

Obwohl der Begriff *Western Blot* streng genommen nur den Proteintransfer auf eine Membran innerhalb eines elektrischen Felds beschreibt, wird er oft als Synonym für den gesamten Prozess der Proteinseparation mittels Gelelektrophorese, anschließendem Transfer auf eine Membran und nachfolgender Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper verwendet.

2.2.1 MATERIAL UND LÖSUNGEN

10x SDS-Elektrophorese-Puffer		
Tris-Base		30,3 g
Glycin		144,0 g
SDS		10,0 g
H ₂ O	ad	1000,0 ml

1x SDS-Elektrophorese-Puffer wird durch 1:10 Verdünnung mit H₂O hergestellt

10x TBS-T		pH 7,5
Tris-Base		30,0 g
NaCl		80,0 g
KCl		2,0 g
H ₂ O	ad	1000,0 ml

1x TBS-T: 1:10 Verdünnung mit H₂O und Zusatz von 0,1% Tween 20

4x Laemmli Puffer		
Tris-HCl		2,0 g
SDS		4,0 g
Bromphenolblau		q.s.
Glycerol	ad	50,0 ml

20% β -Mercaptoethanol wurde kurz vor der Nutzung zugesetzt

10x Transfer-Puffer		
Tris-Base		30,3 g
Glycin		144,0 g
SDS		30,0 g
H ₂ O	ad	1000,0 ml

1x Transfer-Puffer wird durch Zugabe von 1 Teil Methanol + 8 Teilen H₂O hergestellt

RIPA Lysepuffer		
Tris-HCl		50,0 mM
NaCl		150,0 mM
NP40		1,0 %
Deoxycholsäure		0,5 %
SDS		0,1 %

Block-Milch 5%		
fettfreies Magermilchpulver		5,0 g
TBS-T	ad	100,0 ml

Block-Milch 10%		
fettfreies Magermilchpulver		10,0 g
TBS-T	ad	100,0 ml

Trenngel		10%	Sammelgel		5%
30% Acrylamid-Mix (BioRad)		3,3 ml	30% Acrylamid-Mix (BioRad)		830,0 µl
1,5 M Tris-Base		25,0 ml	1,5 M Tris-HCl		630,0 µl
10% SDS-Lösung		100,0 µl	10% SDS-Lösung		50,0 µl
10% Ammonium-persulfat-Lösung		100,0 µl	10% Ammonium-persulfat-Lösung		50,0 µl
TEMED (BioRad)		4,0 µl	TEMED (BioRad)		5,0 µl
H ₂ O	ad	10,0 ml	H ₂ O	ad	5,0 ml

Tabelle 2.3 Primäre Antikörper und Konditionen

Primärer Antikörper	Konzentration	Inkubation	Isotype	Hersteller
anti-β-Catenin	1:2.500 in Milch 10 %	über Nacht bei 4°C	Maus IgG	BD Bioscience
anti-γ-Catenin	1:2.500 in Milch 10 %	über Nacht bei 4°C	Maus IgG	BD Bioscience
anti-β-Aktin	1:2.500 in Milch 10 %	über Nacht bei 4°C	Maus IgG	Sigma Aldrich
anti-flag	1:500 in Milch 10 %	1h bei Raumtemperatur	Maus IgG	Sigma Aldrich

Tabelle 2.4 Sekundäre Antikörper und Konditionen

Sekundärer Antikörper	Konzentration	Inkubation	Isotype	Hersteller
anti-Maus	1:10.000 in Milch 10 %	1h bei Raumtemperatur	Schaf IgG	Amersham

2.2.2 PROTEINBESTIMMUNG UND PROBENVORBEREITUNG

Die Zellen wurden auf Eis mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend in eiskaltem PBS mittels Zellschaber abgeschabt, herunterzentrifugiert ($2,0 \times 10^4 \times g$, 4°C , 5min) und darauf folgend in $40\mu\text{l}$ RIPA Lysepuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die festen Zellbestandteile durch Zentrifugation vom Lysat abgetrennt ($2,0 \times 10^4 \times g$, 4°C , 15min).

Um bei der Western Blot Analyse gleiche Proteinmenge auftragen zu können, wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Die Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliant Blue G-250 führt zur hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm nach 595nm . Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer mit bovines Serum Albumin (BSA) erstellten Eichgeraden bestimmt. Zur Vermeidung von Absorptionen > 1 wurden Aliquots der Proben in H_2O auf einheitliche Volumina eingestellt und entsprechend des Herstellerprotokolls mit Bradfordreagenz (BioRad) für 5min inkubiert und anschließend am Photometer (Ultrospec 3100 *pro*, Amersham Pharmacia) bei 595nm vermessen. Die Lysate wurden bei -80°C eingefroren. Vor der Elektrophorese wurde die Proteinmenge auf $10\mu\text{g}$ Protein/Probe eingestellt und mit 4x Laemmli Puffer versetzt. Durch anschließendes Aufkochen (5min, 95°C) wurden die Proteine denaturiert.

2.2.3 ELEKTROPHORESE, TANK BLOT UND IMMUNODETEKTION

Gleiche Proteinmengen wurden auf ein Gel geladen und per denaturierender SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli aufgetrennt. Durch Zugabe des stark negativ geladenen anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) verlieren die Proteine sowohl ihre sekundäre als auch tertiäre Struktur. Sie weisen nach Anlagerung von SDS eine ihrer Masse proportionale Ladung auf und können dadurch im elektrischen Feld nach ihren Massen aufgetrennt werden. Im Sammelgel erfolgte die Aufkonzentrierung der Proteine unter niedrigerer Spannung (10min, 100mV), die Trennung erfolgte bei 180V für 45min in einer Gelkammer (MiniProtean3, BioRad). Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine auf eine Polyvinyliden Fluorid Membran (PVDF) im elektrischen Feld transferiert (1h30min, 300mA, Mini TransBlotCell system, BioRad). Vor der Immunodetektion wurden durch Inkubation der Membran in 10% fettfreier Milch (*non-fat-skim milk*, BioRad) unter stetigem Schütteln (1h, RT) unspezifische Bindestellen geblockt. Nachfolgend wurden die Membranen mit den entsprechenden Antikörpern unter stetigem Schütteln inkubiert (Tabelle 2.3). Im Anschluss wurden die Membranen 3x mit TBS-T gewaschen (je 10min) und gefolgt von drei weiteren Waschschritten mit TBS-T (je 20min) mit dem sekundären Antikörper inkubiert (Tabelle 2.4). Die immunoreaktiven Banden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert. Dafür wurden die Membranen in einer 1:1 Mischung von ECL1 und ECL2 (Amersham) inkubiert (1min, RT) und anschließend ein Röntgenfilm (Amersham) belichtet und entwickelt (Curix60, Agfa).

2.3 PROLIFERATION UND ZYTOTOXIZITÄT VIA MTT

Der MTT-Assay stellt einen einfachen, preiswerten und schnell durchführbaren Test für die Bestimmung der Toxizität von Substanzen und/oder Proliferation von Zellen dar. Der Assay basiert auf der photometrischen Bestimmung der Umsetzung des gelblichen MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma) in schwerlösliches, blauviolettetes Formazansalz. Die Umsetzung erfolgt hauptsächlich an mitochondrialen Redoxsystemen. Die Aussage des MTT-Assays ist begrenzt, da sowohl die Zellzahl als auch die Stoffwechselaktivität der Zellen das Ergebnis beeinflussen. Der Assay ist nicht in der Lage Zelltod von Proliferationshemmung zu unterscheiden.

Durchführung

Die Zellen wurden in 96well Platten eingesät (Tabelle 2.2) und zum gegebenen Zeitpunkt im MTT-Assay analysiert. Dazu wurde das Medium vorsichtig entfernt und frisches, mit MTT-Reagenz (5mg/ml in PBS) versetztes Medium (1:8) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 3h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das mit MTT-Reagenz versetzte Medium entfernt und das gebildete Salz mit 100 μ l 0,04N Isopropanol-HCl (Sigma) vorsichtig aufgelöst. Die Absorption wurde mittels Mikroplattenleser bestimmt ($\lambda=495\text{nm}$, SLT Microplatereader, SLT).

2.4 BESTIMMUNG VON DNS-FRAGMENTIERUNG

2.4.1 FLUORESZENZ AKTIVIERTE ZELL SORTIERUNG (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es gleichzeitig mehrere Parameter wie Zellgröße und -granularität, aber auch die Fluoreszenz von einzelnen, suspendierten Zellen zu analysieren. Um die verschiedenen optischen Parameter durch eine komplexe Optik erfassen zu können, werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom vereinzelt und an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die Zellgröße wird durch den *Forward Angle Light Scatter* (FSC) repräsentiert, einem Parameter der nah der optischen Achse erfasst wird. Oberflächenparameter wie die Granularität beeinflussen den *Side Scatter* (SSC). Dieser Parameter wird in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl erfasst. Die Fluoreszenz der Zellen, hervorgerufen durch Eigenfluoreszenz, (interkalierende) Farbstoffe wie z.B. Propidiumiodid oder fluoreszenzgekoppelte Antikörper, wird ebenfalls im 90° Winkel bestimmt.

2.4.2 PROPIDIUMIODID FÄRBUNG (NICOLETTI)

Propidiumiodid (PI) stellt einen in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff dar. Die Anlagerung von Propidiumiodid an DNS führt zu einer Verschiebung sowohl der Exikations- als auch Emissionsspektren. PI kann daher leicht zur Quantifizierung des DNS-Gehalts einer Zelle herangezogen werden. PI kann sowohl mittels Xenon- als auch Quecksilberdampflampe oder durch Argonlaser ($\lambda=488\text{nm}$) angeregt werden. Im Gegensatz zu Membranen mit gestörter Integrität wie z.B. bei nekrotischen oder spät apoptotischen Zellen, kann die intakte Membran vitaler Zellen nicht von PI durchdrungen werden. Sie werden daher mittels eines Detergentien enthaltenen Puffers permeabilisiert. Die Zellen wurden dazu nach Nicoletti in *Hypotonic Fluorochrome Solution* (HFS)-Puffer resuspendiert⁹².

2.4.3 ANALYSE DER DNS-FRAGMENTIERUNG

Die Zellen wurden wie in Tabelle 2.2 dargestellt eingesät und das entsprechende Experiment durchgeführt. Danach wurden die Zellen auf Eis im Medium vorsichtig abgeschabt und herunter zentrifugiert (2000xg, 10 min, 4°C). Zum Waschen wurden die Zellen mit eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (2000xg, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde anschließend in frisch hergestelltem Nicoletti-Puffer aufgenommen und für maximal 24h im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Proben wurden an einem FACSCalibur (BD Bioscience) im FL2-Detektor analysiert.

FACS Puffer (pH 7.4)		
NaCl		8.12 g
KH ₂ PO ₄		0.26 g
Na ₂ HPO ₄		2.35 g
KCl		0.28 g
Na ₂ EDTA		0.36 g
LiCl		0.43 g
Na-azide		0.20 g
H ₂ O	ad	1000 ml

HFS buffer		
Natriumcitrat		0.1 g
Triton X-100		0.1 ml
PBS	ad	100 ml
Kurz vor Benutzung wurden 50 µg/ml Propidiumiodid zugesetzt		

Tabelle 2.5 FACS- und Nicoletti (HFS)-Puffer

2.4.4 NICOLETTI HINTERGRUND

Die Aktivierung von Endonukleasen während der Apoptose führt zur Fragmentierung nukleärer DNS. Daher kann die Quantifizierung von Zellen mit subdiploider (fragmentierter) DNS zur Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen herangezogen werden. Da die Methode von Nicoletti einen nicht membrangängigen DNS-interkalierenden Farbstoff nutzt und die Zerstörung der Membranintegrität ein Charakteristikum der Nekrose und späten Stadien der Apoptose darstellt, wird die Membran mittels eines hypotonen und Detergentien beinhaltenden Puffer (HFS) permeabilisiert. Ein Großteil der unbehandelten Zellen befindet sich in der G₀/G₁-Phase, und weist daher einen doppelten Chromosomensatz auf. Zellen in der G₂M-Phase mit vierfachem Chromosomensatz binden mehr PI und zeigen daher stärkere Fluoreszenz und können dadurch von Zellen der G₀/G₁-Phase unterschieden werden. In Zellen mit fragmentierter DNS und *Apoptotic Bodies* kann sich nur wenig PI einlagern. Daher zeigen diese nur eine schwache Fluoreszenz und sind dadurch von vitalen Zellen zu unterscheiden und werden über den so genannten subG₁-Peak quantifiziert⁹².

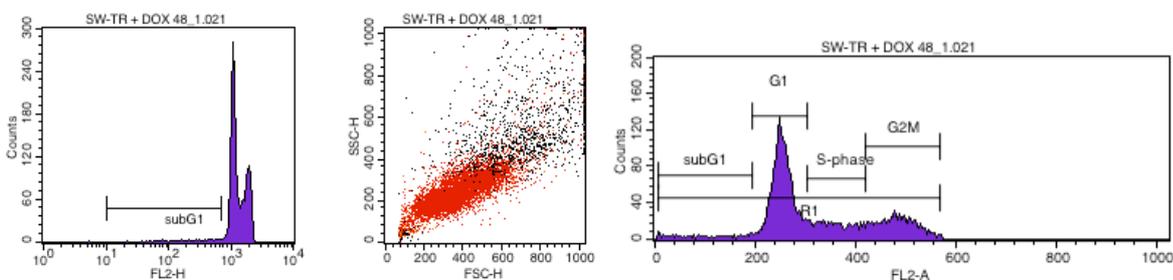


Abbildung 2.1 *Eine beispielhafte Abbildung von Zellen nach Nicoletti-Färbung.* Die linke Abbildung zeigt ein Histogramm in logarithmischer Auftragung mit zur Quantifizierung eingegrenzter sub-G₁-Fraktion. Die rechte Abbildung zeigt den dazugehörigen *Dot-Plot*. Die untere Abbildung zeigt das Histogramm in linearer Auftragung mit den jeweiligen Phasen des Zellzyklus. Das Signal rechts des G₁-Peaks weist Zellen mit fragmentierter DNS aus.

2.5 TRANSFEKTION VON *SMALL INTERFERING RNA*

2.5.1 MATERIAL UND LÖSUNGEN

Tabelle 2.6 siRNA Sequenzen

Zielgen	Name		Sequenz
β-catenin	β _{amb}	sense	AGC UGA UAU UGA UGG ACA GUU
		antisense	CUG UCC AUC AAU AUC AGC UUU
-	β _{mut}	sense	AGC UGA UAU <u>ACA</u> UGG ACA GUU
		antisense	CUG UCC AUG <u>UAU</u> AUC AGC UUU
β-catenin	β _I	sense	GCU GAA ACA UGC AGU UGU AUU
		antisense	UAC AAC UGC AUG UUU CAG CUU
β-catenin	β _{II}	sense	GAU AAA GGC UAC UGU UGG AUU
		antisense	UCC AAC AGU AGC CUU UAU CUU
β-catenin	β _{III}	sense	CCA CUA AUG UCC AGC GUU UUU
		antisense	AAA CGC UGG ACA UUA GUG GUU
β-catenin	β _{IV}	sense	ACA AGU AGC UGA UAU UGA UUU
		antisense	AUC AAU AUC AGC UAC UUG UUU
γ-catenin	γ ₁	sense	GGG CAU CAU GGA GGA GGA UUU
		antisense	AUC CUC CUC CAU GAU GCC CUU
γ-catenin	γ ₂	sense	GGU GAC CUG GAG UAC CAG AUU
		antisense	UCU GGU ACU CCA GGU CAC CUU
γ-catenin	γ ₃	sense	GGG CUU UGG UUC CUU CUC UUU
		antisense	AGA GAA GGA ACC AAA GCC CUU
γ-catenin	jup I	sense	CCA CGU AGC UGC AGG CAC AUU
		antisense	UGU GCC UGC AGC UAC GUG GUU
γ-catenin	jup II	sense	UCA AUG AGC CCU AUG GAG AUU
		antisense	UCU CCA UAG GGC UCA UUG AUU
GFP	GFP	sense	GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC
		antisense	UGC GCU CCU GGA CGU AGC CUU
β-Galakto- sidase	β-gal	sense	UUA UGC CGA UCG CGU CAC AUU
		antisense	UGU GAC GCG AUC GGC AUA AUU

Tabelle 2.6 Die Sequenzen für β_{amb} und γ₁₋₃ wurden mit Hilfe der web-basierten Ambion siRNA-Designsoftware entwickelt. Unterstrichene Basen zeigen die zum Erhalt der Kontroll-siRNA β_{mut} eingeführten Punktmutationen. Die Sequenzen wurden in BLAST auf ihre Sequenzspezifität, bzw. im Fall von β_{mut} auf das Nichtvorhandensein komplementärer Zielsequenzen überprüft. Die siRNA-Sequenzen für β_{I-IV} sowie JUP I / II werden von Dharmacon vertrieben. Die Sequenz für β-gal wurde der Literatur entnommen, wo sie als β-gal 924 publiziert wurde⁹³.

Das Phänomen des posttranskriptionellen *Gene Silencings* konnte von Forschern erstmal in Petunien beobachtet werden, als die mehrfache Integration des für violette Blüten kodierenden Gens nicht wie erwartet zur Verstärkung der Intensität, sondern nur zu fleckigen bis farblosen Blüten führte^{94,95}. Später wurde auch in *C. elegans* gezeigt, dass durch Injektion von dsRNA die Expression von Genen verringert werden konnte⁹⁶. Bei der Wiederholung in *Drosophila melanogaster* wurde festgestellt, dass die eingebrachte lange doppelsträngige RNA in kurze RNA-Stücke verdaut wurde⁹⁷. Das Einbringen von chemisch synthetisierten kurzen doppelsträngigen RNA-Strängen, der *small interfering RNA* (*siRNA*) führte ebenfalls zur verringerten Genexpression^{98,99}.

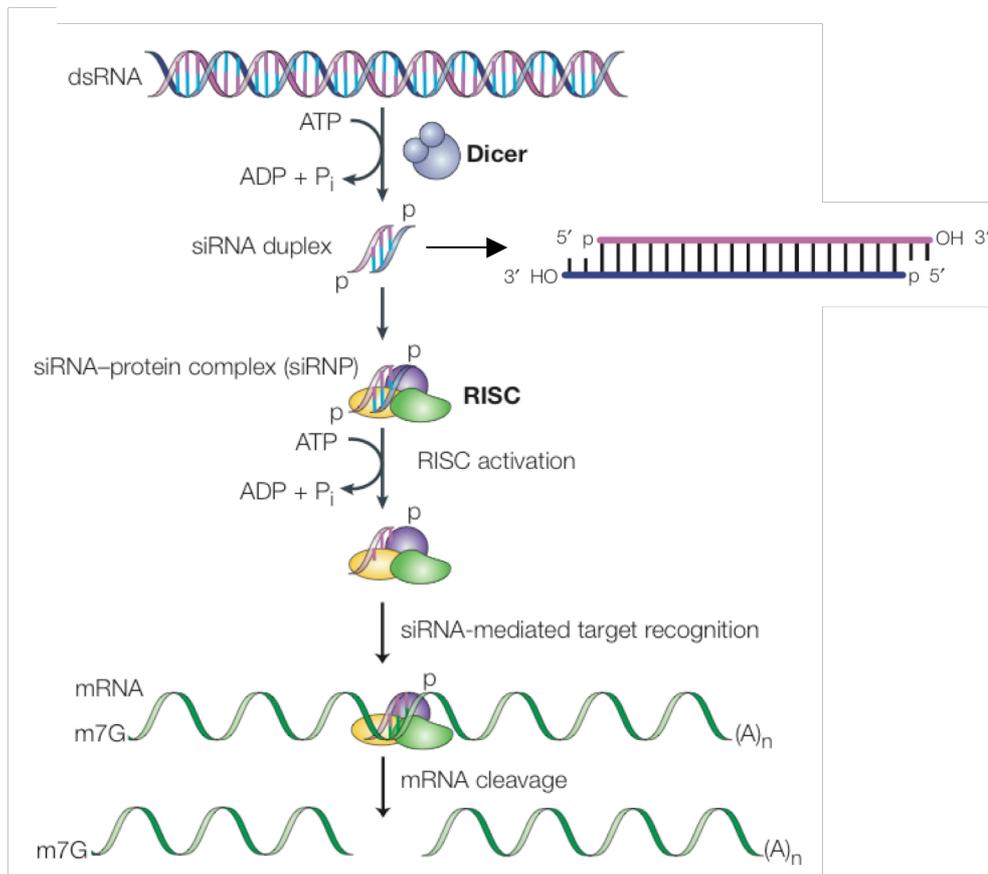


Abbildung 2.2 siRNA vermittelte Degradierung von mRNA durch RNA Interferenz (RNAi). Lange doppelsträngige (ds) RNA wird durch das Enzym DICER, einem Mitglied der RNase III Familie, in kurze 19-22 nt *short interfering* (siRNA) geschnitten und weisen an den 3' Enden jeweils 2nt umfassende Überhänge auf. Alternativ können auch chemisch synthetisierte siRNA eingebracht werden. Der *RNA-induced Silencing Complex* (RISC) unterscheidet zwischen *sense* und *antisense* Strang des siRNA Duplex. Während der *sense*-Strang abgebaut wird, ermöglicht der Einbau des *antisense*-Stranges in den RISC-Komplex die zur Degradation der mRNA führende sequenzspezifische Interaktion zwischen RISC und des zum *antisense*-Strang der siRNA komplementären mRNA-Abschnitts. Dadurch wird die mRNA 10nt vom 5' Ende des siRNA-Strangs entfernt durch den RISC-Komplex enzymatisch geschnitten. Abbildung:Dykxhoorn¹⁰⁰

2.5.1.1 TRANSFEKTION VON siRNA

Die siRNAs wurden je nach Sequenz entweder von Ambion oder Dharmacon bezogen und direkt nach Erhalt im mitgelieferten RNase-freiem Puffer aufgenommen (Tabelle 2.6). Zur Vermeidung wiederholter Einfrier- Auftauzyklen, wurden die siRNA-Stocks (20 μ M) aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die Linien SW-480 und DLD-1 wurden mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und HT-29 mit Dharmafect4 (Dharmacon) transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie durch den Hersteller protokolliert. Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion in Antibiotika freiem Medium eingesät (Tabelle 2.1, Tabelle 2.2).

Die siRNA-Aliquots wurden auf Eis aufgetaut, das entsprechende Volumen entnommen und in Optimum (Invitrogen) verdünnt. Das jeweilige Volumen an Transfektionsreagenz wurde ebenfalls in Optimum aufgenommen und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurden beide Ansätze durch mehrfaches Pipettieren vereinigt und 15 (Dharmafect) bzw. 20min (Lipofectamine 2000) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der gebildete siRNA-Transfektionsreagenz-Komplex auf mit frischem Antibiotika freiem Medium versehene Zellen gegeben, um so die finale siRNA-Konzentration von 50nM zu erhalten. Die Experimente wurden anschließend in einem Zeitfenster von 24h bis 96h nach der Transfektion durchgeführt.

2.6 TRANSFEKTION VON PLASMID DNS

Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion eingesät (Tabelle 2.1, Tabelle 2.2). DLD-1, SW-480(TR, β -cat), HT-29(TR) sowie HEK293 wurden mit Nanofectin (PAA) und HeLa mit FuGENE6 transfiziert. Die Transfektionen wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die verwendete DNS wurde bezüglich ihrer Konzentration photometerisch bestimmt (Ultrospec 3100 *pro*, Amersham Pharmacia) und per Agarose-Gelelektrophorese auf Intaktheit überprüft. Nur intakte, nicht degradierte DNS mit einer $OD_{260/280}$ -Ratio von $1,8 \pm 0,5$ wurde für die Transfektionen verwendet. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde in parallelen Experimenten ein EGFP Expressionsplasmid unter gleichen Bedingungen transfiziert.

2.6.1 REPORTERGEN ASSAY

Der Begriff *Reporter*gen beschreibt Gene deren Expressionsprodukte, d.h. Proteine, leicht quantifiziert werden können und unter Kontrolle von einem zu untersuchenden Promotor stehen. Alle von uns verwendeten und etablierten Reportersysteme basieren auf der Expression von Leuchtkäferluziferase (*Firefly Luciferase*), Luziferase katalysiert die Oxidation von Luziferin zu Oxiluziferin, bei der sowohl ATP als auch Mg^{2+} als Kofaktoren benötigt werden. Pro umgesetztes Luziferin wird ein Lichtquant frei. Die Lichtemission wurde mittels Luminometer (TD-20/20, Turner Design) quantifiziert. Sie ist proportional zu Aktivität und Menge der Luziferase und somit zur Aktivität des untersuchten Promoters unter den gegebenen Bedingungen.

Um die auch innerhalb eines Experiments auftretenden Schwankungen der Transfektionseffizienz auszugleichen zu können, wurde jeweils das Plasmid pCH110 kotransfiziert. Dieses Plasmid exprimiert β -Galaktosidase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *Simian Virus 40 Promoters* (SV40), dessen Aktivität nicht durch die Experimente beeinflusst wird. β -Galaktosidase katalysiert die hydrolytische Spaltung von Laktose zu Galaktose und Glukose. Zur Quantifizierung der Aktivität eignet sich die hydrolytische Spaltung des farblosen Edukts o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid in das gelbliche Produkt o-Nitrophenol, das photometrisch bestimmt werden kann (SLT Microplatereader, SLT, $\lambda=405nm$).

Die gemessene Luziferaseaktivität wurde jeweils auf die Aktivität der β -Galaktosidase bezogen. Um innerhalb eines Experimentes, z.B. bei Konzentrationsreihen oder Kombinationen verschiedener Expressionsplasmide die Gesamtmenge an DNS konstant zu halten, wurde, so erforderlich, der parentale Vektor pcDNA3 (Invitrogen) in entsprechender Mengen kotransfiziert.

Zur Untersuchung von β -Catenin-abhängiger Transkription verwendeten wir das pTOPflash-pFOPflash-Reportersystem, das wir von Bert Vogelstein erhielten. Der Reporter pTOPflash enthält drei optimierte TCF-Bindestellen oberhalb eines minimalen Promoters und der für *Firefly Luciferase* kodierenden Sequenz. Um die β -Catenin und / oder γ -Catenin vermittelte Beeinflussung der DKK4-Transkription untersuchen zu können, wurden durch Klonierung verschieden langer Abschnitte des DKK4-Promoters in pGL3basic diverse DKK4-Reporter-Konstrukte neu erschaffen (siehe 2.8). Unabhängig von Promoterstudien nutzen wir die Reporter-Technologie zur Etablierung stabil induzierbarer Systeme. Hierbei nutzen wir das Konstrukt pCDNA4toLUC (ein Geschenk der Arbeitsgruppen van de Wetering / Brummelkamp), das in Verbindung mit einem TET-Repressor Doxycyclin-induzierbar Luziferase exprimiert und somit zur Validierung von TET-Repressorsystemen genutzt werden kann (2.7, Abbildung 3.10).

Experimentelle Durchführung

Die Zellen wurden wie unter 2.1.2 beschrieben kultiviert und 24h vor dem Experiment eingesät (Tabelle 2.2). Bei siRNA Experimenten wurden die Zellen zuerst mit siRNA (2.5.1.1) und 24h später mit den Reporterkonstrukten transfiziert. Zur Normalisierung wurde jeweils das β -Galaktosidase-Expressionkonstrukt pCH110 kotransfiziert. Im Fall der Untersuchungen mit LiCl (Sigma) als auch mit rekombinantem DKK4 und Wnt3a Proteinen (beide R&D Systems) wurden die Zellen zuerst transfiziert und 24h später stimuliert. Zum gegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend lysiert. Dazu wurden sie in der Multiwellplatte mit Reporter-lysepuffer (Promega) versetzt, leicht geschwenkt und anschließend bei -80°C bis zur Messung eingefroren. Zur Gewinnung der Lysate wurden die Platten auf Eis aufgetaut, die Zellen mittels Zellschaber abgekratzt und bei 20.000xg und 4°C für 10min zentrifugiert. Die Luziferase Aktivität wurde entsprechend der Herstelleranweisung (*Reporter Gene Assay System*, Promega) mittels Luminometer bestimmt (20/20 Luminometer, Turner Designs). Zur Bestimmung der β -Galaktosidase wurden Aliquots der Lysate mit 2X β -Galaktosidasepuffer bis zum Erreichen von Absorptionswerten $\leq 0,5 \geq 1,0$ bei 37°C inkubiert und mittels Mikroplattenleser bei $\lambda=405\text{nm}$ vermessen (SLT Microplatereader, SLT).

2x β -gal buffer

Na_2HPO_4	120 mM
NaH_2PO_4	80 mM
MgCl_2	2 mM
β -Mercaptoethanol	100 mM
o-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside	4,4 mM

2.6.2 STABILE TRANSFEKTION

2.6.2.1 BESTIMMUNG DER SELEKTIONSBEDINGUNGEN

Bei stabilen Transfektionen nutzt man die Koexpression einer Antibiotikumsresistenz (Selektionsmarker). Um nachfolgend nur den Zellen, die das gewünschte Plasmid stabil in ihr Genom integrieren konnten das Wachstum zu ermöglichen, ist einem Vorexperiment die minimale tödliche Dosis des Selektionsantibiotikums, nachfolgend auch als Selektionsmarker bezeichnet, für parentale Zellen zu bestimmen. Zur Generierung von doppelt stabilen Zellen (SW-480TR β -cat) wurde die vorab generierte stabile Linie (SW-480TR) im Selektionsmedium für das bereits integrierte Plasmid (Tabelle 2.7) getestet.

24h nach der Einsaat in 6well Platten wurden die Zellen gewaschen und erhielten frisches Medium mit aufsteigender Konzentration zugesetztem Selektionsmarker. Als Basis diente der von Hersteller angegebene Bereich. Zur anschließenden Generierung von stabilen Klonen wurde die minimale Dosis, welche die Zellen in der für das Antibiotikum typischen Zeit zuverlässig (d.h. $\leq 80\%$) töten konnte eingesetzt.

2.6.2.2 GENERIERUNG STABIL TRANSFIZIERTER ZELLKLONE

Die Zellen wurden wie unter 2.1.2 und 2.6 beschrieben eingesät und transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen in verschiedenen Dichten (5-30% Konfluenz) in 10cm Platten gesplittet und 24 später durch Zugabe der vorher bestimmten Konzentration an Selektionsantibiotikum (2.6.2.1) in Selektion genommen. Bis zur Bildung von mit bloßem Auge gut sichtbaren Kolonien ($d \leq 1\text{mm}$) wurden die Zellen 2-3x pro Woche gewaschen und mit neuem Selektionsmedium versetzt. Die Kolonien wurden gepickt, subkultiviert und auf die Expression des eingebrachten Gens mit Hilfe transienter Reporter (2.6.1) und gegebenenfalls Western Blot (2.2) untersucht.

Tabelle 2.7 Konditionen und generierte Zelllinien

Zeline	Medium	Zusätze	Selektionsmarker / Konz.
HT-29TR	McCoy's 5a	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin 50 $\mu\text{g/ml}$
SW-480TR	DMEM	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin 50 $\mu\text{g/ml}$
SW-480TR β -cat I	DMEM	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin 50 $\mu\text{g/ml}$ G418 500 $\mu\text{g/ml}$
SW-480TR β -cat IV	DMEM	1% P/S 10% FCS*	Blasticidin 50 $\mu\text{g/ml}$ G418 500 $\mu\text{g/ml}$

* Tetracyclin negatives FCS

2.7 KOLONIERUNG DER shRNA-EXPRESSIONSPLASMIDE

RNA Interferenz kann entweder durch klassische Transfektion von kurzer doppelsträngiger RNA *small interfering RNA* (siRNA) oder durch die Expression von haarnadelartigen Oligonukleotiden, den *short hairpin RNAs* (shRNAs) hervorgerufen werden^{99,101}. In dem von uns favorisierten System wird die Expression dieser Oligonukleotide vom H1 RNA Polymerase III Promoter initiiert. Entscheidend ist, dass der verwendete Promoter in der Lage ist ein kurzes RNA-Transkript und mit eindeutig definiertem Start- und Endpunkt, d.h. ohne Polyadenosinschwanz, zu erzeugen. Die Transkription wird durch TTTTT terminiert, wobei das RNA-Transkript nach dem zweiten Uridin abgespalten wird. Das so erhaltene Transkript weist siRNA-ähnliche Enden mit UU Überhängen am 3' Ende auf. Nach der Expression des *short hairpins* in der Zelle wird die shRNA durch das Enzym DICER prozessiert und an den Multienzymkomplex RISC zum Auslösen von RNA Interferenz übergeben. Solche Expressionsvektoren können sowohl transient als auch stabil in Zellen eingebracht werden, wobei die stabile Integration mit stetiger RNAi-vermittelter Senkung des entsprechenden Proteins einhergeht. Der Nachteil dieses Ansatzes ist, dass er nicht für überlebensnotwendige Proteine (z.B. Zellzyklusregulatoren) anwendbar ist, da das zu Zelltod und / oder Artefakten führen würde. Um dieses Problem zu umgehen, wurde von van de Wetering ein stabil integrier- und induzierbares System zur Expression von shRNA entwickelt, das durch Integration einer TET-Operator Bindestelle in den H1 Promoter in Kombination mit konstitutiv aktiven TET-Repressor-Proteinen shRNA Doxycyclin-abhängig exprimiert¹⁰². Für unsere Experimente nutzen wir eine kommerziell erhältliche Weiterentwicklung des publizierten pTER Vektors. pSUPERIORneo.gfp (Oligoengine) wurde in *E. coli* DH5 α (*Subcloning Efficiency*, Invitrogen) transformiert und vervielfältigt. Zur Isolierung der Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen wurden NucleoBond-Systeme PC20 und PC500 (Macherey-Nagel) verwendet. Die im transienten System charakterisierten β -Catenin siRNA-Sequenzen wurden als Vorlage zur Entwicklung der *hairpin RNAs* verwendet. Als *Loop-Sequence* nutzen wir eine neun Basenpaar lange Sequenz, die in der Literatur charakterisiert wurde¹⁰¹. Entscheidend für die Wahl der siRNA Sequenzen waren neben ausreichender *Silencing*-Effizienz und dem Ausbleiben unspezifischer Effekte das Fehlen von zu nicht endständigen TTTTT-Motiven führenden Basenpaaren.



Abbildung 2.3 Funktionsweise induzierbarer Doxycyclin-induzierbarer TET-ON Systeme. In Abwesenheit von Doxycyclin verhindert die Bindung des TET-Repressors (TR) an den TET-Operator (TO) die Expression der Zielsequenz. Durch Doxycyclin-vermittelte Änderung der TR-Konformation und nachfolgender Dissoziation des TR vom TO wird die Zielsequenz exprimiert.

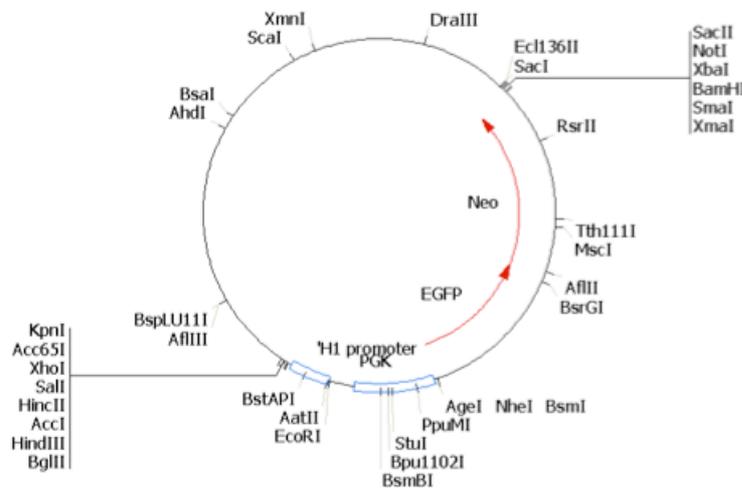
Die synthetisierten Oligonukleotide (Tabelle 2.8, Metabion) wurden in *PCR-clean water* (Invitrogen) zu 100pmol/ μ l gelöst und 100pmol pro Strang wurden in 5 μ l *Annealing* Puffer aufgenommen. Das *Annealing* wurde in einem PCR Cycler (Palm-Cycler, Corbett Research) vorgenommen. Die *annealten* Oligonukleotide wurden in pSUPERIORneo.gfp kloniert. Dafür wurden 3 μ g pSUPERIORneo.gfp mit Xho I / Bgl II (Fermentas) geschnitten und per Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (Qiagen). Qualität, Menge und Integrität der so erhaltenen linearen DNS wurden photometrisch (Ultrospec 3100 *pro*, Amersham Pharmacia) und per Gelelektrophorese bestimmt. Das Verhältnis zwischen *Insert* und *Frame* wurde auf 1:7 eingestellt und über Nacht ligiert (T4-Ligase, Fermentas). Die DNS wurde in E. Coli GT116 (Invivogen) transformiert. Die erhaltenen Klone wurden wie oben beschrieben vermehrt und die Plasmid-DNS isoliert. Bei E. coli GT116 handelt es sich um einen *sure*-Stamm, der für die Vervielfältigung von *loop*-Sequenzen geeignet ist. Da durch erfolgreiche Ligation die Bgl II Schnittstelle in pSUPERIORneo.gfp zerstört wird, konnten die gepickten Klone leicht per Verdau und nachfolgender Sequenzierung charakterisiert werden.

2.7.1.1 MATERIAL UND LÖSUNGEN

Annealing Puffer und Annealing Reaktion

Annealing Puffer		90°C	4 min
NaCl	100 mM	die Reaktion wurde um	
HEPES pH 7,4	50 mM	4°C pro Minute abgekühlt	

Vektorkarte des verwendeten RNAi Vektors pSUPERIORneo.gfp



Die Oligonukleotide wurden über XhoI / BglII in pSUPERIORneo.gfp kloniert

Zielgen	Name	tag	Sequenz	loop	Sequenz	tag
β-catenin	β I	s	GATCCCC GCTGAAACATGCAGTTGTA	TTCAAGAGA	TACAACTGCATGTTTCAGC	TTTTTA
		as	GGG CGACTTTGTACGTCAACAT	AAGTTCTCT	ATGTTGACGTACAAAGTCG	AAAAATTCGA
β-catenin	β IV	s	GATCCCC ACAAGTAGCTGATATTGAT	TTCAAGAGA	ATCAATATCAGCTACTTGT	TTTTTA
		as	GGG TGTTTCATCGACTATAACTA	AAGTTCTCT	TAGTTATAGTCGATGAACA	AAAAATTCGA
β-catenin	β IV rev	s	GATCCCC ATCAATATCAGCTACTTGT	TTCAAGAGA	ACAAGTAGCTGATATTGAT	TTTTTA
		as	GGG TAGTTATAGTCGATGAACA	AAGTTCTCT	TGTTTCATCGACTATAACTA	AAAAATTCGA
β-Galakto sidase	β gal	s	GATCCCC TTATGCCGATCGCGTCACA	TTCAAGAGA	TGTGACGCGATCGGCATAA	TTTTTA
		as	GGG AATACGGCTAGCGCAGTGT	AAGTTCTCT	ACACTGCGCTAGCCGTATT	AAAAATTCGA

Tabelle 2.8

Oligonukleotide für die Klonierungen der shRNA-Plasmide. Zur Verdeutlichung sind die *sense* (s) Oligonukleotide in 5' → 3' während die komplementären *antisense* (as) Oligonukleotide in 3' → 5'-Richtung aufgetragen sind. Zur Ligation tragen die Oligonukleotide Xho I bzw. Bgl II kompatible Enden (tag). In den 3' tag des *sense*-Strangs ist das zur Terminierung der Transkription notwendige TTTT-Motiv integriert.

2.8 KLONIERUNG DER DKK4 REPORTERGEN-KONSTRUKTE

Als Basis für die Generierung von Reporter-Gen-Konstrukten verwendeten wir pGL3basic (Promega). Die als Bakteriensuspension gelieferten *Bacterial artificial chromosomes (BAC)* Klone von humanem Dickkopf4 (RZPD) wurden auf mit Kanamycin (Sigma) zubereiteten LB-Agarplatten ausgestrichen und einzelne Kolonien gepickt und vervielfältigt. Zur Isolierung der Plasmid-DNS aus Bakterienkulturen wurden NucleoBond-Systeme PC20 und PC500 (Macherey-Nagel) verwendet. Die DNS wurde über Silica-Säulen entsprechend der Herstelleranweisung zur Aufreinigung von BAC-Klonen extrahiert (NucleoBond AX PC500, Macherey-Nagel). Qualität, Menge und Integrität der so erhaltenen DNS wurden photometrisch (Ultrospec 3100 *pro*, Amersham Pharmacia) und per Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Promoterfragmente wurden per *Polymerase Chain Reaction (PCR)* amplifiziert und in pGL3basic kloniert. Die Primer (Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10, Metabion) wurden in *PCR clean water* (Invitrogen) gelöst und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die PCR wurde mittels Pfu-Polymerase (Fermentas) entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt (Tabelle 2.11). Die erhaltenen PCR Produkte wurden per Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die DNS per *Gel Extraction Kit* (Qiagen) extrahiert, nachfolgend mit den entsprechenden Enzymen verdaut (Fermentas) und anschließend mittels *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Die DNS wurde photometrisch quantifiziert und per Agarose-Gelelektrophorese auf Intaktheit überprüft. Das parentale Reporter-Gen-Plasmid pGL3basic (Promega) wurde entsprechend geschnitten und aufgereinigt (*Gel Extraction Kit*, Qiagen).

Die Ligation per T4-Ligase erfolgte über Nacht (Fermentas). Das Vektor-Insert-Verhältnis wurde auf 1:6 - 1:9 eingestellt. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde in DH5 α (Invitrogen) transformiert und anschließend auf mit Ampicillin (Sigma) versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen. Die erhaltenen Klone wurden gepickt und wie beschrieben vervielfältigt, und die Plasmid-DNS gewonnen (NucleoBond PC20/500, Macherey-Nagel). Die Klone wurden durch Restriktionsverdau und anschließende Sequenzierung charakterisiert.

Die Nomenklatur der Primer gibt die Position relativ zum Start-ATG innerhalb der genomischen Sequenz, die Orientierung sowie den Namen des Restriktionsenzym (tag) der angehängten Erkennungssequenz (*tag-Sequenz*) an (Tabelle 2.9, Tabelle 2.10).

Tabelle 2.9 Primer zur Generierung der DKK-4 Reporter-gen-Konstrukte DKK4_I-V

Primer	tag	tag-Sequenz	Primersequenz	Konstrukt
DKK4_RV_HindIII	Hind III	gaac aagctt	gca cgt cgt ctg ttt gtc ac	DKK4_I-V
DKK4_I_FW_XhoI	Xho I	gccg ctcgag	ggg att tgt tga agc ctg tg	DKK4_I
DKK4_II_FW_XhoI	Xho I	gccg ctcgag	tga acc cct gga gga gaa g	DKK4_II
DKK4_IV_FW_XhoI	Xho I	gccg ctcgag	tga tac aga cat cct gct ctg c	DKK4_IV
DKK4_V_FW_XhoI	Xho I	gccg ctcgag	ccc tac ccc caa agg att ac	DKK4_V

Tabelle 2.10 Primer zur Generierung der DKK-4 Reporter-gen-Konstrukte DKK4_0 and DKK4_VI-VIII

Primer	tag	tag-Sequenz	Primersequenz	Konstrukt
DKK4_RV_XhoI	Xho I	ccg ctcgag	gca cgt cgt ctg ttt gtc ac	DKK4_VI-VIII
DKK4_0_FW_MluI	MluI	gccg acgcgt	ccg att tca cgc acc tta ct	DKK4_Ø
DKK4_VI_FW_MluI	Mlu I	gccg acgcgt	gac agg aaa ggg atg aag ca	DKK4_VI
DKK4_VII_FW_MluI	Mlu I	gccg acgcgt	caa gga caa ggg cca agt ag	DKK4_VII
DKK4_VIII_FW_MluI	Mlu I	gccg acgcgt	ctc cca aag tgc tgg gat ta	DKK4_VIII

Tabelle 2.11 PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95°C	5 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annaeling	64°C	30 sec	
DNS-Synthese	72°C	3-7min*	
finale Synthese	72°C	5 min	

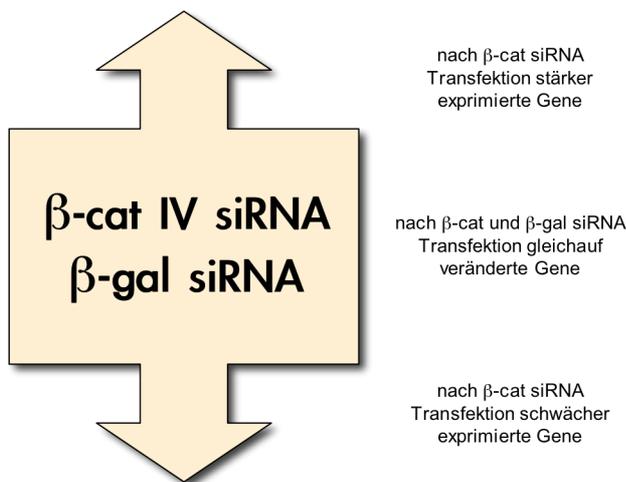
* theoretische Syntheseleistung der Pfu-Polymerase bis max. 1kb/min; Zeit wurde entsprechend angepasst

2.9 AFFYMETRIX MICROARRAY ANALYSE

Um durch umfassende Untersuchung des Transkriptoms von SW-480 Zellen nach siRNA vermittelter Senkung der β -Catenin Proteinspiegel mögliche Zielgene von β -Catenin analysieren zu können, führten wir in Kooperation mit der AG Blum, LaFuGa, Genzentrum der LMU München, *DNA Microarray* Analysen durch.

2.9.1 AUFBAU DES EXPERIMENTS

SW-480 Zellen wurden wie unter 2.1 beschrieben mit siRNA gegen β -Catenin (Sequenz β_{IV}) bzw. β -Galaktosidase (β -gal) als Kontrolle transfiziert und 72h später mRNA isoliert. Um die Beeinflussung der Analysen durch Schwankungen zu vermindern, wurden drei voneinander unabhängige biologische Replikate durch bioinformatische Analyse miteinander verglichen. Gene, die in allen biologischen Replikaten im Vergleich von β_{IV} zu β -gal siRNA transfizierten Zellen einer Expressionsänderung ≥ 2.5 unterlagen, wurden primär als durch β -Catenin regulierte Gene angenommen.



2.9.1.1 RNA-ISOLIERUNG

Das Medium wurde entfernt, die Zellen 1x auf Eis mit PBS gewaschen und anschließend in TRIzol (Invitrogen) geerntet. Dazu wurden pro 6well 1ml und pro 12well 0,5ml TRIzol eingesetzt und die Zellen durch mehrfaches Pipettieren von der Kulturschale abgelöst und in Eppendorf Gefäße überführt und falls gewünscht bis zur Isolierung der RNA bei -80°C gelagert.

Um die komplette Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu gewährleisten, wurden die Zellen 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Separierung der RNA von anderen Zellbestandteilen wurden 0,2ml Chloroform pro 1ml TRIzol hinzugegeben und durch mehrfaches Schütteln miteinander vermischt.

Die Zellen wurden nachfolgend für 3min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Beschleunigung der Phasentrennung zentrifugiert (12.000xg, 15min, 4°C). Nach erfolgreicher Phasentrennung sind eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine farblose wässrige Phase erkennbar. Die farblose wässrige Phase wurde vorsichtig abgetrennt und in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Zum Präzipitieren der RNA wurden 0,5ml 100%iges Isopropanols (Merck) zugegeben, 10min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend zentrifugiert (10.000xg, 10min, 4°C). Nach der Zentrifugation wurde das dann sichtbare RNA-Pellet vorsichtig mit 1ml eiskaltem 75%igem Ethanol (Merck) gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500xg, 5min, 4°C). Nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet für ein paar Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, um den verbliebenen Restalkohol zu entfernen. Anschließend wurde es in RNase-freiem Wasser (*Ultrapure DNase/RNase-Free distilled water*, Invitrogen) aufgenommen.

Ein Aliquot wurde mittels UV/VIS und Agarose-Gelelektrophorese quantifiziert und auf Intaktheit überprüft. Nur Proben mit $OD_{260/280}$ ratio < 1,6 wurden für weitere Arbeitsschritte verwendet. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.9.1.2 cDNA-SYNTHESE, MICROARRAY UND BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG

Die gesamte Microarray Analyse inklusive cDNA-Synthese, Hybridisierung, Auslesen des Genchips und nachfolgender bioinformatischer Auswertung wurde von Dr. med. vet. Susanne Schmidt, LaFuGa, Arbeitsgruppe Dr. Helmut Blum, durchgeführt. Als Chip kam der Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) zum Einsatz.

2.10 REAL TIME RT-PCR

Real Time RT-PCR ist die dem heutigen Stand der Technik entsprechende und zuverlässigste Methode zur Quantifizierung der Gen-Expression. Nach der Extraktion aus den zu untersuchenden Zellen wird mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt wird. Hierbei erfolgt die stetige Messung der aktuellen Menge an bereits vervielfältigter DNA.

Dazu können neben spezifischen Sonden auch unspezifische in die DNS interkalierende Fluoreszenz-Farbstoffe eingesetzt werden. Das Signal steigt dabei proportional zur innerhalb der Replikationsschritte bereits synthetisierten Menge an Amplifikat (DNS) in Echtzeit (*real time*) an.

2.10.1 MATERIAL UND LÖSUNGEN

Sequenzen der Primer für die *Real Time* RT-PCR Analyse

	Primer	Sequenz
DKK4	forward primer	AGC TCT GGT CCT GGA CCT CA
DKK4	reverse primer	CAA CCC ACG ACA TGT AGC AC
TKTL1	forward primer	ACA ACG ACC GAT TTG TCC TC
TKTL1	reverse primer	AGG TTG CCA CAA GAT TGT CC
GAPDH	forward primer	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
GAPDH	reverse primer	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

2.10.2 PROBENVORBEREITUNG

Die Zellen wurden geerntet und zur Gewinnung von mRNA wie unter 2.9.1.1 bereits beschrieben aufgearbeitet.

2.10.2.1 REVERSE TRANSKRIPTION

Vor Beginn der cDNA-Synthese wurden mögliche DNA-Kontaminationen entsprechend dem Herstellerprotokoll mittels DNaseI (Invitrogen) entfernt. Nachfolgend wurde die mRNA mittels *SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System* (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Pro Reaktion wurden 4µg isolierter RNA eingesetzt.

2.10.3 *REAL TIME RT-PCR*

Real Time RT-PCR wurde mittels Platinum Taq Polymerase (Invitrogen) durchgeführt. Zur Normalisierung der DKK4-Expressionsdaten wurde parallel die Expression von GAPDH als *Housekeeping Gene* gemessen. Alle Daten wurden auf einem Eppendorf realplex4 mit Silberblock erhoben. Nach erfolgreicher SYBR-Green PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse (60°C-95°C) durchgeführt. Die relative Quantifizierung des mRNA-Gehalts erfolgte nach Pfaffl¹⁰³.

Protokol für die SYBR-green real time RT-PCR Analyse

Schritt	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95°C	5 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	64°C	30 sec	
DNS-Synthese	72°C	45 sec	
finale Synthese	72°C	5 min	
Schmelzkurve	60°C - 95°C		

3 Ergebnisse

3.1 HINTERGRUND DER ARBEIT

Das Armadillo-Gen der Fruchtfliege *Drosophila* spaltet sich im Säugergenom in zwei eigenständige Gene, β - und γ -Catenin, auf. Während über Bedeutung und Funktion von γ -Catenin bisher nur wenig bekannt ist, wurden β -Catenin vermittelte Signalwege und Funktionen schon weiterführend untersucht. Beide *Armadillo-like* Proteine vermitteln über den kanonischen Wnt-Signalweg die Expression verschiedener Zielgene. Im Rahmen einer vergleichenden Analyse interessierten uns die unterschiedlichen Funktion von β - und γ -Catenin bezüglich ihrer Rollen im Wnt-Signalweg und ihrer Zielgene. Dabei standen β -Catenin Zielgene, die gleichzeitig im Wnt-Signalweg vermitteln im Fokus der Betrachtung.

Vorausgegangene Arbeiten zeigten, dass die Überexpression von β -Catenin und vor allem der stabilisierten Mutanten, S33Y und S37A β -Catenin, zu verstärkter TCF-abhängiger Transkription führt. Es wurde gezeigt, dass die Mutante S33Y β -Catenin, nicht jedoch Wildtyp β -Catenin neoplastischen Transformation von Zellen auslöst^{26,104}.

Im Fall von γ -Catenin führt weder die Überexpression vom Wildtyp noch einer bekannten Mutante zu einer mit S33Y β -Catenin vergleichbaren Verstärkung TCF-abhängigen Transkription. Dagegen führt schon die Überexpression von wild-Typ γ -Catenin zur neoplastischen Transformation humaner Epithelzellen^{20,26}.

Das Ziel der Arbeit bestand in der differentiellen Betrachtung von β - und γ -Catenin in Bezug auf Proliferation, Zelltod und Zielgen Expression. Diese Untersuchungen sollten nicht wie bisher mit Hilfe von Überexpressionsmodellen, sondern anhand zeitlich begrenzten *Knockdowns* des jeweiligen Proteins durchgeführt werden.

3.2 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON siRNA

RNA Interferenz beschreibt ein Phänomen, welches erstmalig im Pflanzenreich beobachtet werden konnte. Der Versuch durch mehrfaches Einbringen von für die Blütenfarbe kodierenden mRNA Brillanz und Stärke von Petunien-Blüten positiv zu beeinflussen schlug fehl. Anstatt der erwarteten Blütenpracht erzielten die Forscher eine damals schwer interpretierbare Verringerung der Farbintensität^{94,95}.

RNA Interferenz stellt heute eine potente Methode zur post-transkriptionellen Senkung (*Silencing*) der Proteinexpression dar. Ausgehend von der Kenntnis über die Gesamtheit des humanen Genoms, wird genspezifisches *Silencing* aktuell genutzt, um die Funktionen einzelner Gene zu charakterisieren. Die Anwendung von kurzen, ca. 19-22 nt umfassenden chemisch synthetisierten siRNA wurde mehrfach als so hochspezifische *Knockdown* Variante dargestellt, dass durch siRNA selbst das *Silencing* spezifischer krankhafter Punktmutationen möglich erscheint^{97,105}. Darüber hinaus konnte bereits im Tiermodell gezeigt werden, dass siRNAs auch Möglichkeiten zur therapeutischen Nutzung bieten¹⁰⁶.

Im folgenden wurden, basierend auf siRNA vermittelter Verringerung der Proteine β -Catenin und γ -Catein, Veränderungen der Proliferation als auch der Genexpression untersucht.

3.2.1 Etablierung von siRNA gegen β - UND γ -CATENIN

Bei der Erstellung von siRNA ist eine Vielzahl verschiedener Algorithmen zu beachten. Dabei ist generell neben der Position des Angrifforts in der mRNA, der Ausschluß von Sequenzhomologien zu anderen Genen zu berücksichtigen. Darüber hinaus spielen GC-Gehalt und Schmelzpunkt sowie die Stabilität des Duplex, der die selektive Aufnahme des *antisense*-Stranges in den RISC-Komplex vermittelt, eine Rolle. Dafür werden an bestimmten Positionen bestimmte Sequenzfolgen empfohlen, andere sollen vermieden werden^{107,108}. Um die Kriterien entsprechend ihrer Wertung möglichst vollständig und sinnvoll berücksichtigen zu können bedarf es geeigneter Software. Wir nutzten die web-basierende *siRNA design software* der Firma Ambion, Inc.

Zur Senkung der β -Catenin Proteinspiegel verwendeten wir vorerst eine einzelne siRNA Sequenzen (β_{amb}). Gegen γ -Catenin entwickelten wir drei Sequenzen, welche in jeweils unterschiedlichen Regionen der γ -Catenin mRNA angreifen (γ_{1-3}). Einhergehend mit weitreichend akzeptierten Richtlinien zur Gestaltung von siRNA basierten Experimenten wurden verschiedene Kontroll-siRNA Sequenzen getestet. Die GFP siRNA richtet sich gegen das nicht in Säugern vorkommende Protein GFP (Grün Fluoreszierendes Protein). Als weitere Kontrolle wurde eine *scrambled* siRNA verwendet.

Die *scrambled* siRNA basiert auf der funktionalen gegen β -Catenin gerichteten siRNA (β_{amb}) und wurde durch den Austausch von zwei Basen in der Mitte der Sequenz in eine unfunktionale siRNA umgewandelt (β_{mut}). Durch BLAST Sequenzvergleich konnte sichergestellt werden, dass diese Sequenz kein Homologie zu bisher bekannten Transkripten aufweist.

3.2.1.1 WESTERN BLOT ANALYSE

Um bei der Etablierung unseres transienten siRNA basierenden *Knockdown* Systems die resultierenden Veränderungen der Proteinexpression der herabregulierten Proteine analysieren zu können, wurden Western Blot Analysen mit proteinspezifischen Antikörpern durchgeführt (Abbildung 1.1). Dazu wurden zwei verschiedene humane kolorektale Karzinomzelllinien transient mit siRNA transfiziert. Sowohl in DLD-1 als auch in SW-480 Zellen konnten die Spiegel des γ -Catenin Proteins mit drei einzelnen siRNA Sequenzen (γ_{1-3}) als auch mit einem daraus hergestellten äquimolaren siRNA Pool (γ_{mix}) deutlich gesenkt werden. Dabei zeigte sich besonders in SW-480 Zellen, dass γ_3 eine besonders effiziente siRNA Sequenz darstellt. Ebenso konnten wir zeigen, dass mittels spezifischer siRNA (β_{amb}) auch β -Catenin in beiden Linien herabreguliert werden konnte, wenn auch nicht mit einer mit γ -Catenin vergleichbaren Effizienz. Die im Rahmen der Kontrollexperimente transfizierten siRNA Sequenzen GFP und β_{mut} zeigten keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine in DLD-1 Zellen. Dagegen konnte in SW-480 eine schwache Senkung der β -Catein-Spiegel nach Transfektion der β_{mut} siRNA beobachtet werden.

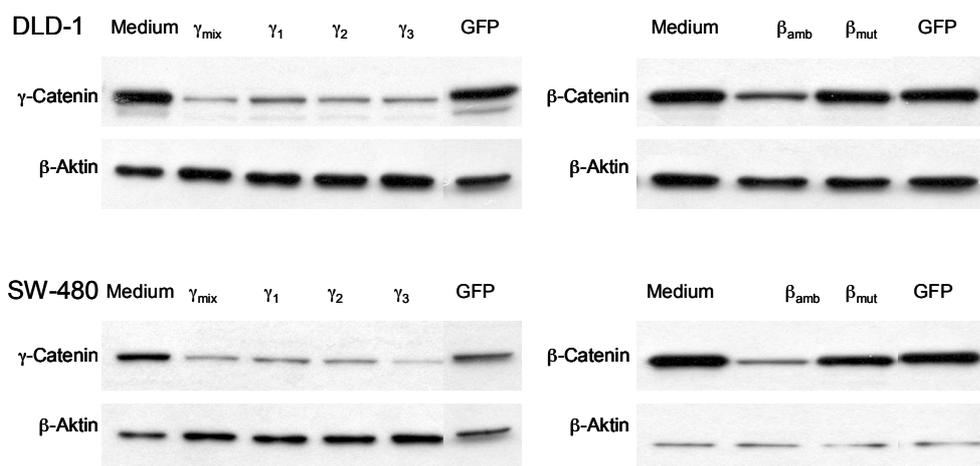


Abbildung 3.1 *β - und γ -Catenin spezifische siRNA verringert die Proteinexpression.* DLD-1 und SW-480 wurden transient mit siRNA Sequenzen gegen β - oder γ -Catenin transfiziert. Zur Herabregulation von γ -Catenin wurden drei einzelne unabhängige Sequenzen (γ_{1-3}) sowie ein darauf basierender äquimolekularer Pool eingesetzt (γ_{mix}). Gegen β -Catenin wurde eine einzelne siRNA Sequenz verwendet (β_{amb}). 72 Stunden nach der Transfektion wurden β - und γ -Catenin per Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurden einerseits nicht transfizierte Zellen (Medium) und zum anderen Zellen, die mit *scrambled* β -Catenin (β_{mut}) oder GFP siRNA transfiziert wurden, analysiert. Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet.

3.2.1.2 TOPFLASH REPORTERGENANALYSE

Wie bereits unter 3.1 erläutert, unterscheiden sich die beiden *Armadillo-like Proteins* β -Catenin und γ -Catenin (Plakoglobin) in ihrem Einfluss auf TCF-abhängige Aktivierung der Transkription. Vorangegangene Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Expression von wt- β -Catenin einen stärkeren Effekt auf TCF-abhängige Reportergen Aktivierung zeigt als wt- γ -Catenin. Darüber hinaus führt die Expression der durch Punktmutation gegen Phosphorylierung und nachfolgenden Abbau geschützten Mutante S33Y β -Catenin zu einer wesentlich stärkeren Aktivierung der TCF-abhängigen transkriptionalen Aktivität, wohingegen vergleichbare Mutanten von γ -Catenin sich vergleichsweise wenig vom Wildtyp unterscheiden²⁶. Wie schon unter (3.2.1.1) beschrieben, etablierten wir ein transientes System zur siRNA vermittelten Proteinsenkung für β - und γ -Catenin sowohl in DLD-1 als auch in SW-480 Zellen, um die daraus resultierenden Veränderungen der Transkriptionsaktivität untersuchen zu können.

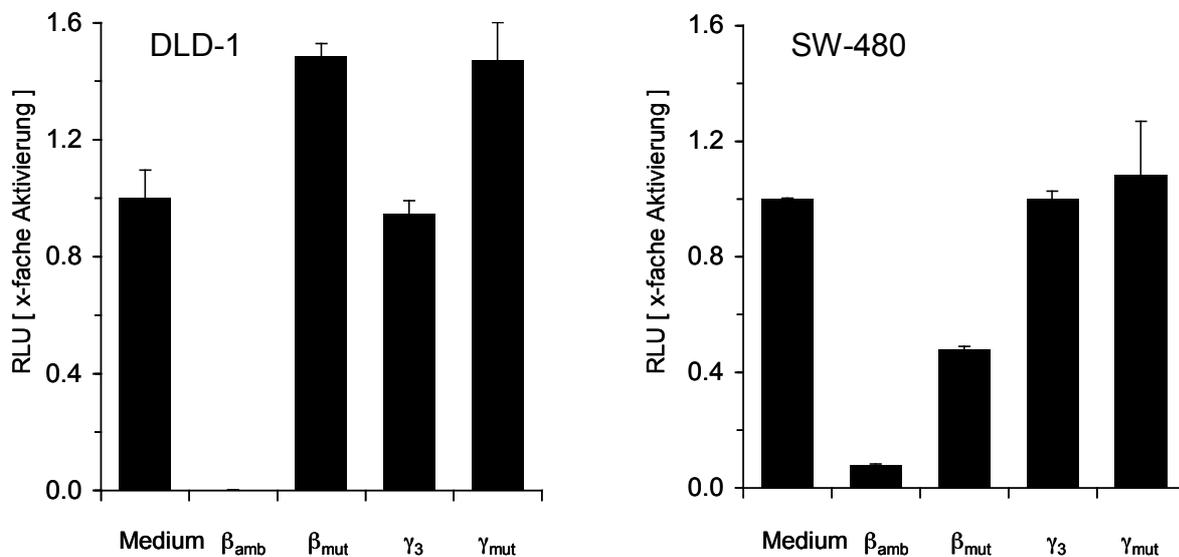


Abbildung 3.2 *RNAi* vermitteltes β -Catenin Silencing reduziert die Aktivierung des pTOPflash Reportergens. DLD-1 und SW-480 wurden transient mit siRNA gegen β -Catenin (β_{amb}) bzw. γ -Catenin (γ_3) transfiziert. 24h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit pTOPflash-Reporter-Plasmiden transfiziert und nach 48h Inkubation im Reportergen Assay analysiert. Kontrollzellen erhielten entweder Medium oder *scrambled* β -Catenin siRNA (β_{mut}). Parallel wurde im Western Blot die Verminderung von β - bzw. γ -Catenin Proteinen nachgewiesen (nicht gezeigt).

Beide Linien sowohl DLD-1 als auch SW-480 exprimieren ein trunkiertes unfunktionales APC Protein und zeigen dadurch eine stetige Aktivierung der TCF-abhängigen Transkription¹⁰⁹. Zur Analyse der TCF-abhängigen Transkription nutzen wir das weitakzeptierte pTOPflash Luziferase Reporter System. Dieses basiert auf dem pGL3Reporter System von Promega. Von Vogelstein und Kollegen wurden drei hintereinander geschaltete optimierte TCF-Bindestellen *upstream* des *Firefly-Luciferasegens* hineinkloniert, so dass dieses Reporter System sehr sensitiv auf Änderungen TCF-abhängiger Transkriptionsaktivität reagiert¹¹⁰.

Sowohl in DLD-1 als auch in SW-480 führt siRNA vermittelte Senkung der β -Catenin Proteinspiegel (β_{amb}) zu verminderter pTOPflash Reporter System Aktivität. Während in DLD-1 Zellen das Signal nach β -Catenin siRNA Transfektion nicht mehr messbar war, war es in SW-480 sehr stark abgeschwächt, aber noch messbar. RNAi-vermittelte Senkung des γ -Catenin Proteins (γ_3) zeigte in beiden Linien im Vergleich zur Kontrolle (Medium) keinen Einfluss auf die Aktivität des pTOPflash-Reporters. Vergleichbar mit den Ergebnissen auf Proteinebene (Abbildung 3.2) verursacht die Transfektion der Kontroll-siRNA (β_{mut}) keine Änderung der Reporter System Aktivität in DLD-1, führt aber dagegen in SW-480 Zellen zu einer Senkung. Schlussfolgernd führt β -Catenin *Silencing* zur verringerten Aktivität TCF-abhängiger Transkription.

3.2.1.3 PROLIFERATION UND ZELLVIABILITÄT

Wie schon unter 3.1 beschrieben, führt die Überexpression von β -Catenin als auch γ -Catenin zu erhöhter Zellproliferation²⁶. Um Veränderungen der Zellproliferation und Zellviabilität von DLD-1 und SW-480 Zellen nach RNAi-vermitteltem Protein *Knockdown* von β - bzw. γ -Catenin zu untersuchen, analysierten wir beide Zelllinien mittels MTT-Assay. Der *Read-Out* des Assays, die photometrische Bestimmung der Umsetzungen eines Farbstoffes an mitochondrialen Redoxsystemen, erlaubt es nicht Proliferationshemmung und Zelltod zu diskriminieren. Als initialer Versuch dagegen ist der MTT-Assay breit akzeptiert.

Die bereits 24h nach Einsaat der siRNA transfizierten Zellen erfolgte Messung dient der Kontrolle homogener Assaybedingungen. Wie in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4 gezeigt, führt RNAi vermitteltes *Silencing* von β - (β_{amb}) als auch γ -Catenin (γ_3) innerhalb von 6 Tagen Kultivierung unter normalen Wachstumsbedingungen zu einem im Vergleich zur Kontrolle (media) um $\geq 50\%$ verringerten Absorptionswerten im MTT Assay. Die Transfektion der Kontroll-siRNA (β_{mut}) führte in beiden Linien zu leicht verringerten Absorptionswerten im MTT-Assay. Diese Daten zeigen, dass durch Senkung der β - als auch γ -Catenin-Proteinspiegel mittels siRNA die Proliferation und/oder Viabilität von DLD-1 und SW-480 Zellen gehemmt werden kann.

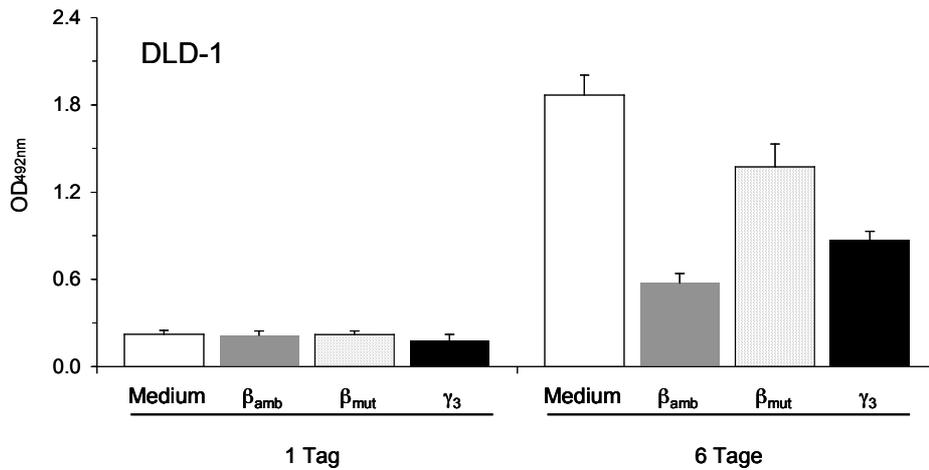


Abbildung 3.3 *RNAi* vermitteltes Silencing von β - und γ -Catenin führt zur Inhibierung von Zellproliferation und/oder Zellviabilität in DLD-1. DLD-1 Zellen wurden transient mit siRNA gegen β -Catenin (β_{amb}) oder γ -Catenin (γ_3) transfiziert und 24h später trypsiniert und mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/Loch in 96-Loch Platten eingesät. Nach 1 bzw. 6 Tagen Inkubation wurde der MTT-Assay durchgeführt und die Absorption bei $\lambda=492\text{nm}$ bestimmt. Als Kontrollexperiment wurden Zellen, die mit Medium oder *scrambled* β -Catenin (β_{mut}) siRNA behandelt wurden analysiert. Parallel wurde im Western Blot die Verminderung von β - bzw. γ -Catenin-Proteinen nachgewiesen (nicht gezeigt).

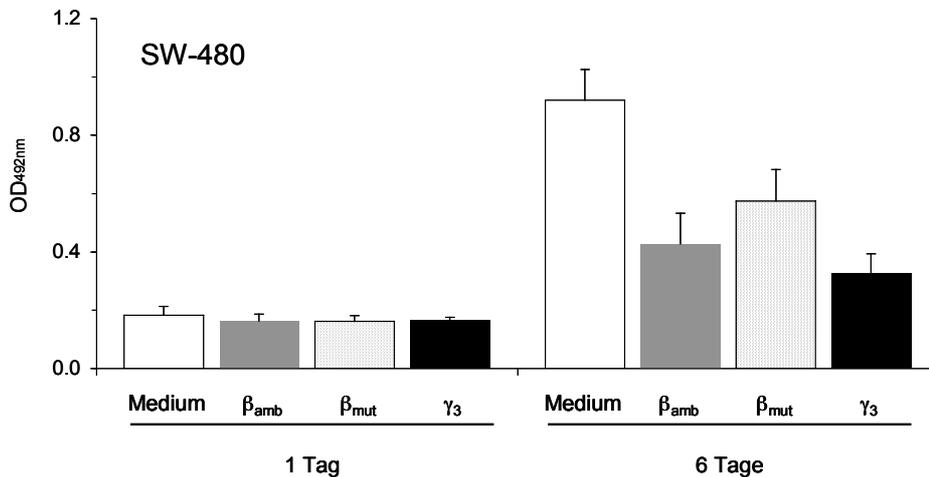


Abbildung 3.4 *RNAi* vermitteltes Silencing von β - und γ -Catenin führt zur Inhibierung von Zellproliferation und/oder Zellviabilität in SW-480. SW-480 Zellen wurden transient mit siRNA gegen β -Catenin (β_{amb}) oder γ -Catenin (γ_3) transfiziert und 24h später trypsiniert und mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/Loch in 96-Loch Platten eingesät. Nach 1 bzw. 6 Tagen Inkubation wurde der MTT-Assay durchgeführt und die Absorption bei $\lambda=492\text{nm}$ bestimmt. Als Kontrollexperiment wurden Zellen, die mit Medium oder *scrambled* β -Catenin (β_{mut}) siRNA behandelt wurden analysiert. Parallel wurde im Western Blot die Verminderung von β - bzw. γ -Catenin-Proteinen nachgewiesen (nicht gezeigt).

3.2.1.4 ANALYSE DER DNS-FRAGMENTIERUNG

Um die in von β - und/oder γ -Catenin vermittelten Einflüssen auf Proliferation und Zelltod abgrenzen zu können, analysierten wir in diesem Experiment das Auftreten vermehrter DNS Fragmentierung als Marker für einsetzenden Zelltod. Hierzu wurden die DNS-Integrität von DLD-1 und SW-480 Zellen im FACS nach erfolgter siRNA-Transfektion analysiert.

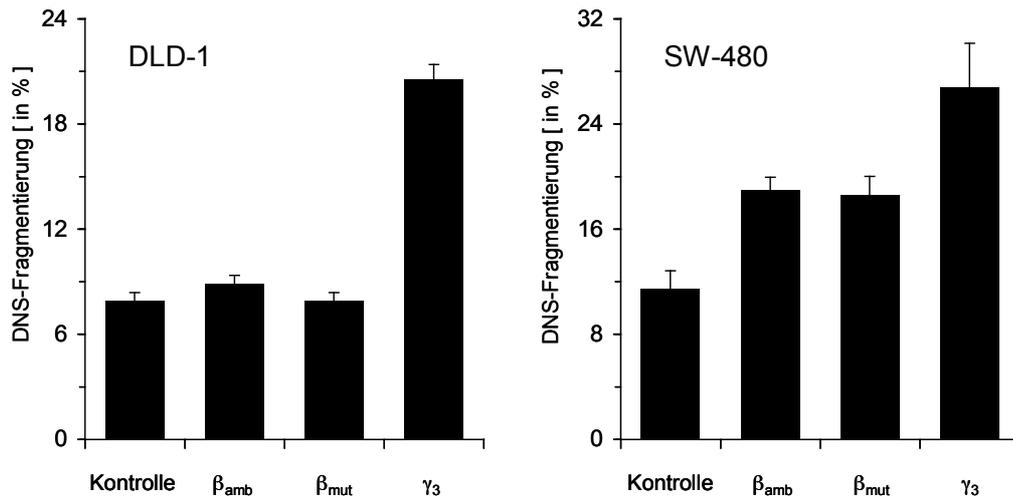


Abbildung 3.5 *RNAi* vermitteltes *Silencing* von γ -Catenin, nicht aber von β -Catenin führt zu vermehrter DNS-Fragmentierung. 72 h nach siRNA vermittelter Protein Senkung (β_{amb} , γ_3) wurde in DLD-1 und SW-480 Zellen die Integrität der DNS mittels Nicoletti-Färbung am FACS (Fluoreszenz Aktivierte Zell Sortierung) analysiert. Als Kontrollexperiment wurden Zellen, die mit Medium behandelt oder *scrambled* β -Catenin (β_{mut}) siRNA transfiziert wurden analysiert. Parallel dazu wurde im Western Blot die Verminderung der β - bzw. γ -Catenin Proteinspiegel nachgewiesen (nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 3.5 dargestellt führt RNAi vermittelte Senkung der Proteinspiegel von γ -Catenin (γ_3) im Vergleich zur Kontrolle (Medium) sowohl in DLD-1 als auch in SW-480 Zellen zu ≥ 2 -fach erhöhter DNS-Fragmentierung. In DLD-1 Zellen zeigte weder die Transfektion von β -Catenin siRNA (β_{amb}) noch die Transfektion der *scrambled* β -Catenin siRNA (β_{mut}) einen Effekt auf die Integrität der DNS im Vergleich zum Medium, wohingegen SW-480 Zellen erhöhte DNS-Fragmentierung nach RNAi vermitteltem β -Catenin Protein *Silencing* (β_{amb}) als auch nach Transfektion der *scrambled* β -Catenin siRNA (β_{mut}) zeigten. Diese Daten weisen zum einen auf einen Zusammenhang zwischen der Senkung des γ -Catenin-Proteins mittels γ -Catenin siRNA (γ_3) und DNS-Fragmentierung, zum anderen könnte die Steigerung der DNS-Fragmentierung durch Herabregulierung von β -Catenin in SW-480 auch auf unspezifischen Effekten durch die siRNA zurückgeführt werden.

3.2.2 NEUE siRNA SEQUENZEN GEGEN β -CATENIN

Da die siRNA gegen β -Catenin (β_{amb}) keine mit den Sequenzen gegen γ -Catenin (γ_{1-3}) vergleichbare Effizienz in der Senkung der Proteinspiegel zeigte und zudem in SW-480 zu verstärkter DNS-Fragmentierung führte, analysierten wir nun eine Gruppe von vier weiteren siRNA Sequenzen gegen β -Catenin ($\beta_I - \beta_{IV}$). Diese *ON-TARGET*-modifizierten Oligonukleotid-Duplexes sind so verändert, dass vorrangig der *antisense*-Strang des siRNA-Duplex in den RISC-Komplex integriert wird. Diese Modifikation führt laut Hersteller zu verbessertem Protein-*Knockdown* und verringerten *OFF-TARGET*-Effekten, durch die Einflussnahme auf andere Proteine aufgrund der Inkorporation des *sense*-Stranges in den RISC-Komplex (2.5) hervorgerufen werden können. Wie in Abbildung 3.2 - Abbildung 3.5 gezeigt, verursachen die als Kontrollsequenz verwendeten siRNAs gegen GFP sowie die *scrambled* β -Catenin (β_{mut}) siRNA unerwünschten Einfluss auf DNS-Fragmentierung, Proliferation und veränderte Aktivität des TCF-abhängigen Reporters pTOPflash.

Um auch Seitens der Kontrollen optimale Bedingungen für unsere RNAi-Experimente zu etablieren, charakterisierten wir eine neue bereits als sich neutral verhaltend beschriebene siRNA, die gegen β -Galaktosidase gerichtet ist (β -gal)⁹³.

3.2.2.1 ANALYSE DER PROTEINSPIEGEL UND DNA-FRAGMENTIERUNG

DLD-1 und SW-480 Zellen

Im Folgenden verglichen wir die Effizienz neuer (β_{I-IV}) und alter (β_{amb}) β -Catenin siRNA Sequenzen im Western Blot miteinander (Abbildung 3.6; Abbildung 3.7). Dabei erwiesen sich in beiden untersuchten Zelllinien, DLD-1 und SW-480, alle neu zu etablierenden Sequenzen (β_{I-IV}) der bereits bestehenden (β_{amb}) mehr als ebenbürtig und führten zu weitaus effizienterem Protein *Silencing*. Die transiente Transfektion der Sequenzen β_I und β_{IV} führte zur stärksten Senkung der β -Catenin Proteinspiegel. Des weiteren verglichen wir die RNAi vermittelten Effekte der drei γ -Catenin siRNA (γ_{1-3}) in den o.g. Linien.

Wie in Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7 gezeigt werden konnte, führte die Transfektion der Sequenz γ_3 zur stärksten Senkung der γ -Catenin-Proteinspiegel. Keine der zu Kontrollzwecken eingebrachten siRNA, GFP, β -galactosidase (β -gal) oder *scrambled* β -Catenin siRNA (β_{mut}), beeinflussten weder die β - noch γ -Catenin Proteinspiegel. Darüber hinaus wurde parallel der Anteil fragmentierter DNS nach siRNA Transfektion bestimmt.

In DLD-1 Zellen führte RNAi vermitteltes *Silencing* von β -Catenin mittels β_I und β_{II} siRNA zur leichten Erhöhung der DNS-Fragmentierung im Vergleich zur Kontrolle (Medium), wohingegen β_{III} , β_{IV} und β_{amb} keinen Einfluss auf die DNS-Integrität zeigten. Interessanterweise zeigte die Senkung von β -Catenin mittels der untersuchten Sequenzen (β_I - β_{IV} sowie β_{amb}) keinen Einfluss auf die DNS-Integrität in SW-480 Zellen (Abbildung 3.6; Abbildung 3.7).

Wie schon in Abbildung 3.5 gezeigt, führte γ_3 siRNA vermittelte Senkung von γ -Catenin sowohl in DLD-1 als auch in SW-480 Zellen zu einer Erhöhung der DNS-Fragmentierung um ≥ 2 (Abbildung 3.6; Abbildung 3.7). Sehr interessant ist aber, dass in DLD-1 auch die siRNA-Sequenz γ_1 zu vergleichbar starker DNS-Fragmentierung führte, während diese in SW-480 keinen Einfluss auf die DNS-Integrität ausübte. In beiden Linien wurde durch Transfektion der siRNA γ_2 die DNS-Integrität nicht verändert. Die Verstärkung der DNS-Fragmentierung scheint also im Fall von γ -Catenin nicht protein-, sondern sequenzspezifisch hervorgerufen zu werden.

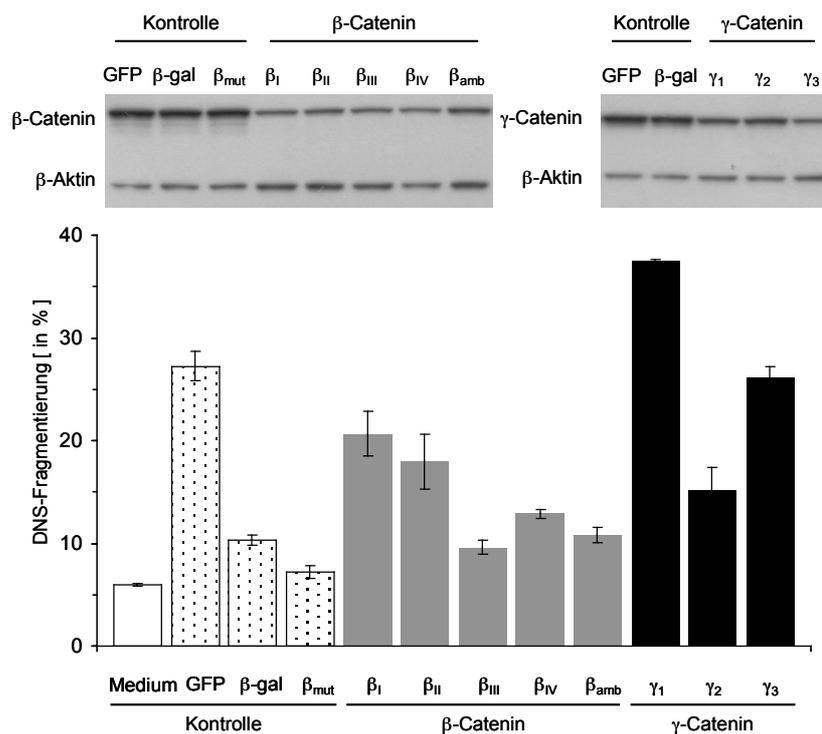


Abbildung 3.6 *Sequenzabhängigkeit der DNS-Fragmentierung und Validierung neuer siRNA-Sequenzen.* DLD-1 Zellen wurden entweder mit siRNA gegen β -Catenin (β_{I-IV}/β_{amb}) oder γ -Catenin (γ_{1-3}) transfiziert und 72h später der Anteil fragmentierter DNS am FACS mittels Nicoletti-Färbung analysiert. Parallel dazu wurden die Proteinspiegel von β - und γ -Catenin im Western Blot mittels β - bzw. γ -Catenin spezifischer Antikörper bestimmt (Ladungskontrolle: β -Aktin). Als Kontrollexperiment wurden Zellen entweder mit Medium, siRNA gegen GFP, β -Galaktosidase (β -gal) oder *scrambled* β -Catenin (β_{mut}) siRNA behandelt.

Als Kontrolle wurden die Zellen mit siRNA mit GFP, β -Galaktosidase (β -gal) oder *scrambled* β -Catenin siRNA transfiziert. Die Transfektion von GFP siRNA führte zu erhöhter DNS-Fragmentierung in DLD-1, zeigte diesen Effekt in SW-480 aber nicht. Keine der weiteren Kontroll-siRNA (β_{mut} , β -gal) führten zur Veränderungen der DNS-Integrität im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium).

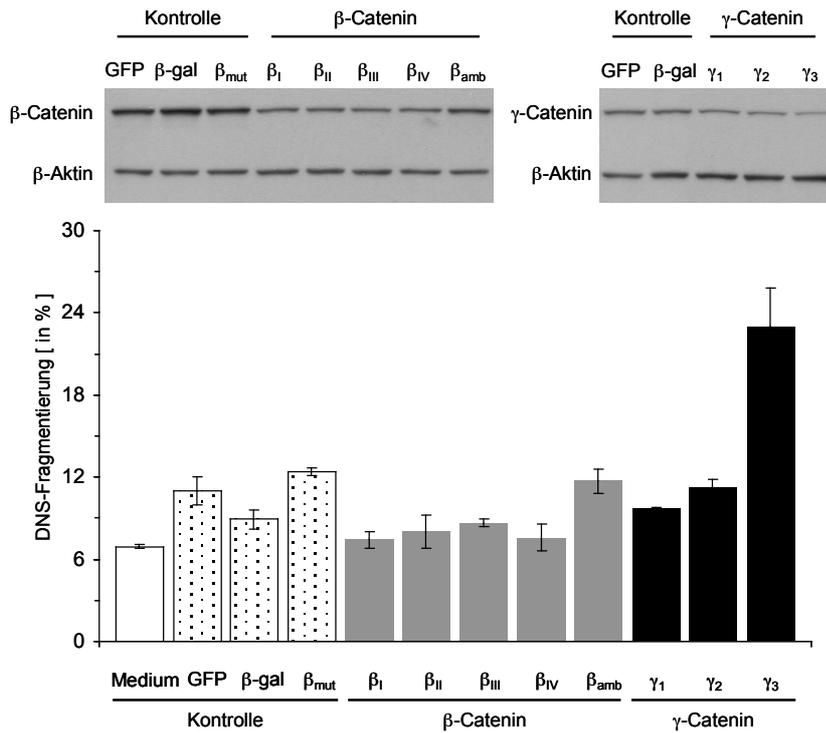


Abbildung 3.7 Sequenzabhängigkeit der DNS Fragmentierung und Validierung neuer siRNA-Sequenzen. SW-480 Zellen wurden entweder mit siRNA gegen β -Catenin (β_{I-IV}/β_{amb}) oder γ -Catenin (γ_{1-3}) transfiziert und 72h später der Anteil fragmentierter DNS am FACS mittels Nicoletti-Färbung analysiert. Parallel dazu wurde die Proteinspiegel von β - und γ -Catenin im Western Blot mittels β - bzw. γ -Catenin spezifischer Antikörper bestimmt (Ladungskontrolle β -Aktin). Als Kontrolle wurden Zellen entweder mit Medium, siRNA gegen GFP, β -Galaktosidase (β -gal) oder *scrambled* β -Catenin (β_{mut}) siRNA behandelt.

HT-29 Zellen

In weiteren Experimenten untersuchten wir die Effekte von RNAi-vermitteltem β - und γ -Catenin Protein *Silencing* in HT-29 Zellen, einer Kolorektalen Karzinomzelllinie mit trunkiertem APC protein¹⁰⁹. Wie in (Abbildung 3.8) dargestellt konnten der Proteinspiegel von β -Catenin mittels siRNA (β_{IV}) effizient gesenkt werden, beeinflusste aber im Vergleich zur Kontrolle (media) den Anteil fragmentierter DNS nicht. Hingegen führte die Transfektion von γ -Catenin siRNA (γ_3) nur zu wenig effizienter Senkung der γ -Catenin-Proteinspiegel, verursachte aber dafür, wie auch schon in DLD-1 und SW-480 (Abbildung 3.6; Abbildung 3.7), eine Erhöhung der DNS-Fragmentierung um den Faktor ≥ 2 (Abbildung 3.8). Diese Daten bestätigen somit in einer dritten, unabhängigen Zelllinie, dass die RNAi-vermittelte Senkung des γ -Catenin-Proteins mittels γ_3 -siRNA zu erhöhter DNS-Fragmentierung führt.

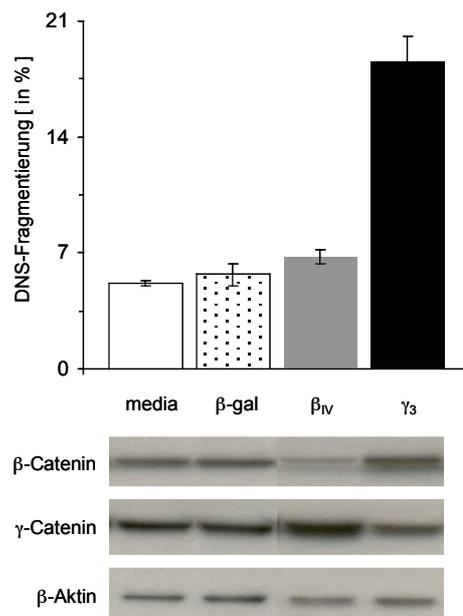


Abbildung 3.8 *Analyse der Proteinspiegel und DNS Fragmentierung in HT-29 Zellen.* HT-29 Zellen wurden entweder mit siRNA gegen β -Catenin (β_{I-IV}) oder γ -Catenin (γ_3) transfiziert und 72h später der Anteil fragmentierter DNS am FACS mittels Nicoletti-Färbung analysiert. Parallel dazu wurde die Proteinspiegel von β - und γ -Catenin im Western Blot mittels proteinspezifischer Antikörper bestimmt (Ladungskontrolle β -Aktin). Als Kontrollexperiment wurden Zellen entweder mit Medium behandelt, oder Galaktosidase (β -gal) siRNA transfiziert.

3.2.3 NEUE siRNA SEQUENZEN GEGEN γ -CATENIN

Aufbauend auf den in Abbildung 3.6 / Abbildung 3.7 dargestellten Ergebnissen waren weitere Untersuchungen notwendig, um feststellen zu können, ob entweder siRNA-Sequenz- oder Proteinvermittelte Effekte Einfluss auf die DNS-Fragmentation in γ -Catenin herabregulierten Zellen nehmen. Dafür evaluierten wir nachfolgend zwei neue eigenständige *ON-TARGET* siRNA Sequenzen gegen γ -Catenin (jup I / jup II). Wie unter 3.2.2 erläutert, führt diese Modifikation zum selektiven Einbau des *antisense*-Stranges in den RISC-Komplex und folglich zu reduzierter Beeinflussung anderer Proteine aufgrund erhöhter mRNA-Spezifität.

3.2.3.1 ANALYSE DER PROTEINSPIEGEL UND DER DNS-FRAGMENTIERUNG

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden in HT-29 Zellen durchgeführt. Dabei zeigten sich die neuen γ -Catenin siRNA Sequenzen (jup I and jup II) Bezug nehmend auf die Senkung der γ -Catenin Proteinspiegel im Vergleich zur Sequenz γ_3 als deutlich potenter. Parallel zum Western Blot wurde der Anteil fragmentierter DNS im Durchflusszytometer bestimmt.

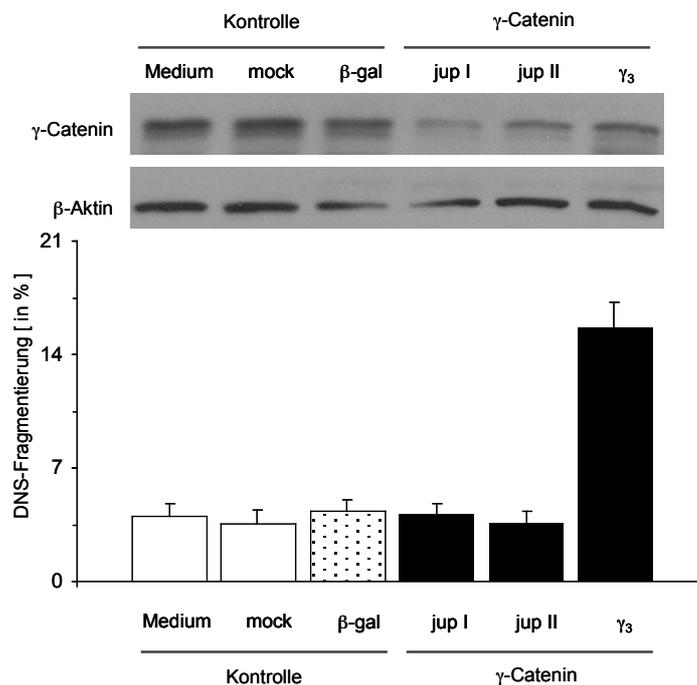


Abbildung 3.9 Sequenzabhängige DNS-Fragmentierung und Validierung neuer siRNA gegen γ -Catenin. HT-29 Zellen wurden mit siRNA gegen γ -Catenin (γ_3 , jup I, II) transfiziert und 72h später wurde der Anteil fragmentierter DNS am FACS mittels Nicoletti-Färbung analysiert. Parallel dazu wurde die Proteinexpression von γ -Catenin im Western Blot mittels proteinspezifischer Antikörper analysiert (Ladungskontrolle β -Aktin). Als Kontrollexperiment wurden Zellen entweder mit Medium behandelt, oder mit Galaktosidase (β -gal) siRNA transfiziert.

Wie in Abbildung 3.6 - Abbildung 3.8 gezeigt, führt die Transfektion von γ_3 siRNA zur Fragmentierung der DNS, wohingegen die neuen siRNA Sequenzen (jup I, jup II) keinen Einfluss auf die DNS-Integrität ausübten. Im Kontrollexperiment zeigte β -Galaktosidase siRNA (β -gal) keinen Einfluss auf DNS-Fragmentierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium).

Zusammenfassend führen alle analysierten γ -Catenin siRNAs zur Senkung des Proteins, jedoch erhöht nur die Sequenz γ_3 den Anteil fragmentierter DNS in allen untersuchten Zellen. Basierend auf diesen Erkenntnissen, scheint es wahrscheinlich, dass nicht die Senkung von γ -Catenin, sondern sequenzspezifische unerwünschte Wirkungen mit vermehrter DNS-Fragmentierung durch γ_3 -siRNA in Verbindung zu bringen sind.

3.3 STABIL INTEGRIERTE UND INDUZIERBARE shRNA

In vielen Organismen konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von dsRNA zur verringerten Genexpression führt. Dieser als RNAi bezeichnete Prozess konnte sich in der Wissenschaft als nützliches Instrument etablieren. In Säugerzellen verursacht die Verwendung längerer dsRNA Stress und wirkt in einigen Fällen auch toxisch. Dieser unspezifische Effekt kann durch die Verwendung kurzer 19-23 nt RNAs umgangen werden. Durch Einsatz synthetischer *short interfering* (siRNA) kann die Expression von Genen effizient und zielgerichtet unterdrückt werden (*Silencing*)⁹⁸.

Dieser Zustand ist transient, d.h. zeitlich begrenzt, und somit nicht für alle Anwendungen geeignet. Um die Anwendung von RNAi auch z.B. in schwer transfizierbaren Zellen oder über einen längeren Zeitraum nutzen zu können, entwickelten Brummelkamp und Kollegen ein Vektor-basiertes System für Säugerzellen, das endogen *short hairpin* RNA (shRNA) in den Zellen exprimiert¹⁰¹. Diese haarnadelartigen RNA-Stränge werden durch das Enzym DICER in siRNA prozessiert und an den RISC-Komplex übergeben. Diese shRNA-Expressionsvektoren können stabil, d.h. dauerhaft, entweder durch Selektionsmarker oder Retroviren in das Genom von Säugerzellen integriert werden.

Dadurch, dass Start- und Endpunkt basengenau definiert werden müssen, bestehen spezielle Anforderungen an die Promoterregion. Der DNS-abhängige RNA-Promoter H1 bietet den definierten Startpunkt und die Polymerase Pol III wird durch Poly-TTTT nach dem zweiten T gestoppt. Wie auch bei konventionellen *Knockout* Strategien kann dieses System nicht gegen überlebenswichtige Gene eingesetzt werden. Um auch diese Gene mittels dauerhaft integrierter shRNA-Konstrukte erreichen zu können, entwickelte die Arbeitsgruppe um van de Wetering ein Doxycyclin-induzierbares System für die Expression von shRNA¹⁰². Um Langzeitstudien über den Einfluss von RNAi vermitteltem *Silencing* von β -Catenin durchführen zu können, etablierten wir in SW-480 Zellen ein entsprechendes stabil integriertes Doxycyclin-induzierbares System.

3.3.1 ETABLIERUNG DER LINIEN HT-29TR UND SW-480TR

Um die gängigen induzierbaren Expressionssysteme auch induzierbar nutzen zu können, ist vorab die Integration eines konstitutiv aktiven TET-Repressors (TR) erforderlich, einer Art universellen Schalters. Dazu wurden Einzelzellklone von mit pCDNA6TR transfizierten HT-29 und SW-480 Zellen generiert. Dieses Plasmid kodiert für den konstitutiv aktiven TET-Repressor (TR). Die so neu generierten Linien werden nachfolgend als HT-29TR sowie SW-480TR geführt.

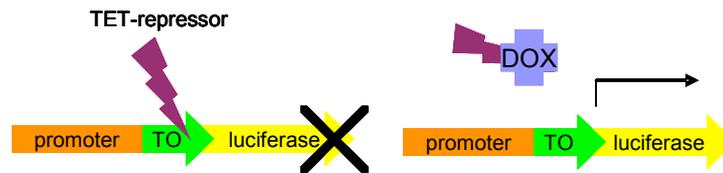


Abbildung 3.10 Das verwendete TET-ON-System anhand des Luciferase Reporters *pCDNA6TO_Luc*. In Abwesenheit von Doxycyclin bindet der konstitutiv exprimierte TET-Repressor (TR) an den im Promoter lokalisierten TET-Operator (TO) und verhindert dadurch die Expression des Zielgens. In Anwesenheit von Doxycyclin kommt es durch Konformationsänderung des TR zur Störung der TO-TR Interaktion. Durch nachfolgende Dissoziation des TR vom TO kann die Expression des Zielgens, hier Luciferase, initiiert werden.

3.3.1.1 AUSWERTUNG DER TET-REPRESSOR EXPRESSION

Um die erfolgreiche Integration des TET-Repressors in die Zellen zu analysieren, wurden Einzelzellklone der Linien HT-29TR und SW-480TR transient mit *pCDNA6TO_Luc* transfiziert (Abbildung 3.10). Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, konnte in HT-29TR Zellklonen (2-17, 2-12, 2-19) durch Stimulation mit Doxycyclin die Expression von Luciferase auf maximal das 6-fache der unstimulierten Kontrolle angeregt werden. In der Linie SW-480TR (Klon 16A, 18B, 13) konnte eine Steigerung auf ≥ 80 -fach induziert (clone 18B) werden. Zusammenfassend konnte in beiden Linien der TET-Repressor erfolgreich integriert werden. Aufgrund seiner sehr guten Induzierbarkeit, die auf eine hohe Aktivität des TR schließen läßt, wurde für die Generierung der shRNA Linien der Klon SW-480TR 18B ausgewählt (im Weiteren dieser Arbeit als Linie SW-480TR geführt).

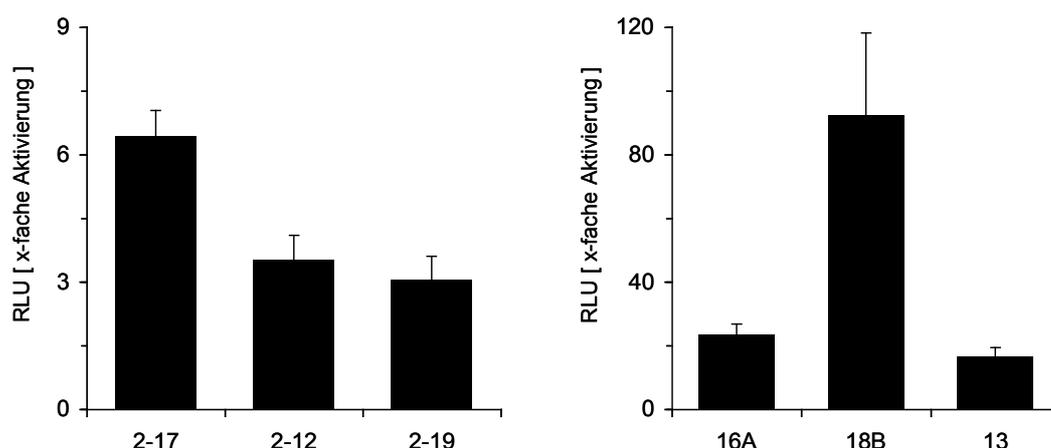


Abbildung 3.11 Bestimmung der TET-Repressor Aktivität. HT-29TR (links) und SW-480TR Zellklone (rechts) wurden transient mit *pCDNA6TO_Luc* transfiziert (Abbildung 3.10) und dabei mit $2\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin stimuliert. Nach 48h Inkubation wurde die Luciferase Aktivität bestimmt und gegen β -Galaktosidase normalisiert. Die Ratio der stimulierten gegen unstimulierte Zellen wurde im Graphen aufgetragen.

3.3.2 GENERIERUNG DES shRNA EXPRESSIONSVEKTORS

Wie unter 3.3 beschrieben, wurde vektorbasierende RNAi durch Brummelkamp und Kollegen eingeführt¹⁰¹. Kurze Zeit später wurde von van de Wetering in den verwendeten H1-Promoter eine Bindestelle für den TET-Repressor (TR) integriert um somit ein induzierbares System für shRNA zu erhalten¹⁰².

3.3.2.1 EINFLUSS DER shRNA ORIENTIERUNG AUF DIE *SILENCING* EFFIZIENZ

Die vorausgegangene Etablierung transient transfizierter β -Catenin siRNA (3.2) kann als Vorarbeit für die Entwicklung entsprechender shRNA gegen β -Catenin verstanden werden. Die RNA polymerase III wird durch TTTT-Motive nach dem zweiten T terminiert. Dementsprechend sind Sequenzen, die diese Basenfolge innerhalb des *hairpins* ergeben nicht nutzbar. Als Basis zur Erstellung des *hairpins* wählten wir die siRNA Sequenzen β_I and β_{IV} .

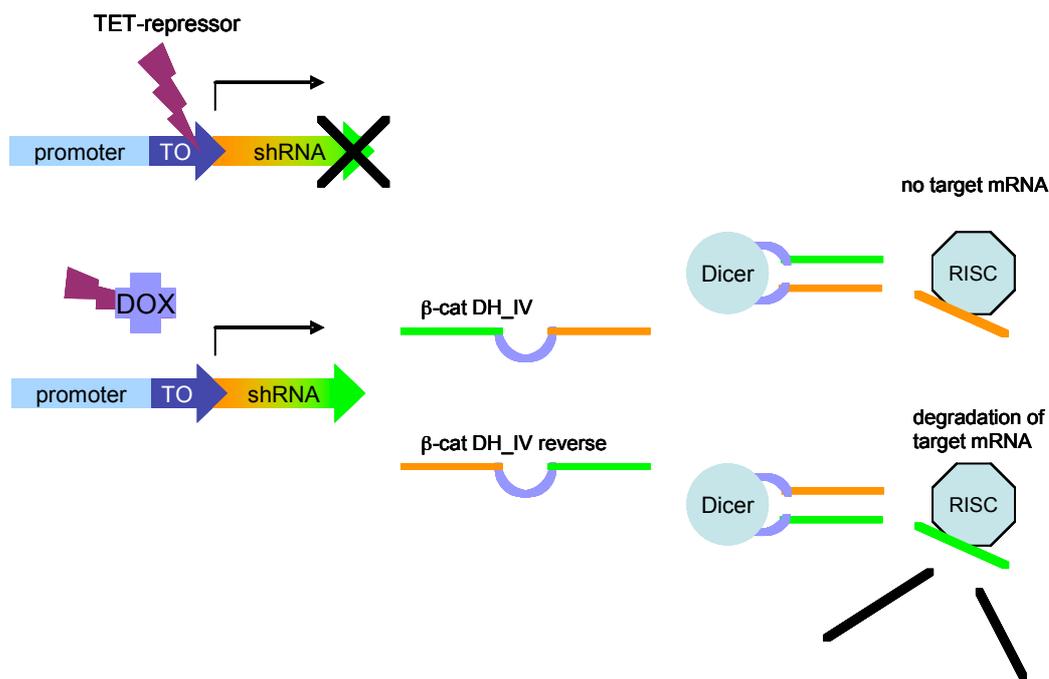


Abbildung 3.12 Funktionsweise Doxycyclin induzierbarer shRNA Expression und Einfluss der Orientierung des siRNA sense- und antisense-Strangs innerhalb des *hairpins*. In Abwesenheit von Doxycyclin verhindert die Bindung des TET-Repressors (TR) an den TET-Operator (TO) die Expression der Zielsequenz. Durch Doxycyclin-vermittelte Änderung der TR-Konformation und nachfolgender Dissoziation des TR vom TO kann die Zielsequenz exprimiert werden. Die Orientierung von *sense* und *antisense* Strang der für den *hairpin* zugrundeliegenden siRNA kann die Inkorporation des jeweiligen Einzelstrangs in den RISC-Komplex beeinflussen¹¹¹. Nur die Inkorporation des zur mRNA komplementären *antisense*-Strangs führt zum Abbau der gewünschten mRNA durch den RISC-Komplex, dem *Silencing* des Proteins.

Beide siRNA Sequenzen wurden als Vorlage für die Klonierung der auf pSUPERIORneo.gfp basierenden shRNA Expressionskonstrukte genutzt. Um die Funktionsfähigkeit der erhaltenen Konstrukte transient überprüfen zu können, nutzen wir die hohe Sensitivität des pTOPflash Reporters bezüglich der Präsenz von β -Catenin aus. In SW-480TR Zellen, welche mit pTOPflash und den entwickelten shRNA Expressionskonstrukten (β _I, β _IV) kotransfiziert und mit Doxycyclin stimuliert wurden, konnte im Gegensatz zu β _I das Konstrukt β _IV nicht die Aktivität des Reporters senken (Abbildung 3.13 links). Wie in Abbildung 3.12 erläutert, führte die Änderung der Orientierung des *sense* und *antisense* Strangs innerhalb des *hairpins* zur gewünschten Funktionalität.

Verglichen mit β _I zeigte das so gewonnene Konstrukt β _IV_rev sogar eine stärkere Senkung der pTOPflash Aktivität auf ca. 30% der unstimulierten Zellen (Abbildung 3.13 rechts). Letztlich wurden beide Konstrukte (β _I und β _IV_rev) stabil in SW-480 TR integriert.

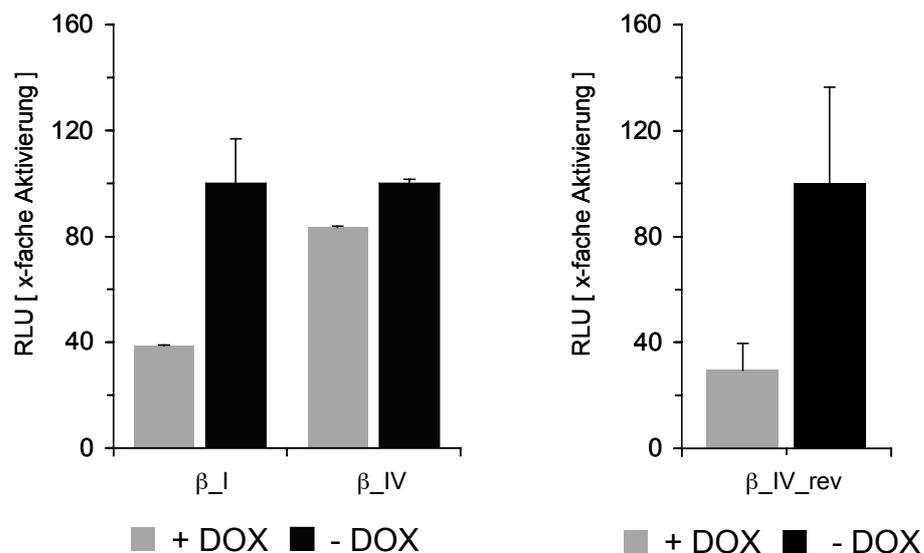


Abbildung 3.13 Expression von shRNA gegen β -Catenin führt zu verminderter pTOPflash Reporter gen Aktivität. SW-480TR Zellen wurden transient mit einem shRNA Konstrukt (β _I, β _IV oder β _IV_rev) und pTOPflash kotransfiziert. Gleichzeitig erfolgte die Stimulation mit 2 μ g/ml Doxycyclin. Nach 48h Inkubation wurde die Luziferase Aktivität bestimmt und gegen β -Galaktosidase normalisiert. Die Ratio der stimulierten vs. unstimulierten Zellen wurde im Graphen aufgetragen. Die Aktivität der unstimulierten Zellen wurde auf 100% gesetzt.

3.3.2.2 ETABLIERUNG DER LINIEN SW-480 TR β _I UND β _IVREV

Analyse der β -Catenin Proteinspiegel und pTOPflash-Reporter Aktivität

Die unter 3.3.2.1 charakterisierten shRNA-Konstrukte (β _I und β _IV_rev) wurden stabil in SW-480TR Zellen integriert. Dabei konnten vorerst nur für β _I shRNA Einzelzellklone generiert werden. Zuerst wurde die *Silencing* Effizienz der Einzelzellklone (β _I_A, β _I_13, β _I_10) sowie der polyklonalen Linien (β _I_poly sowie β _IV_rev β _IV_rev_poly) im Western Blot überprüft.

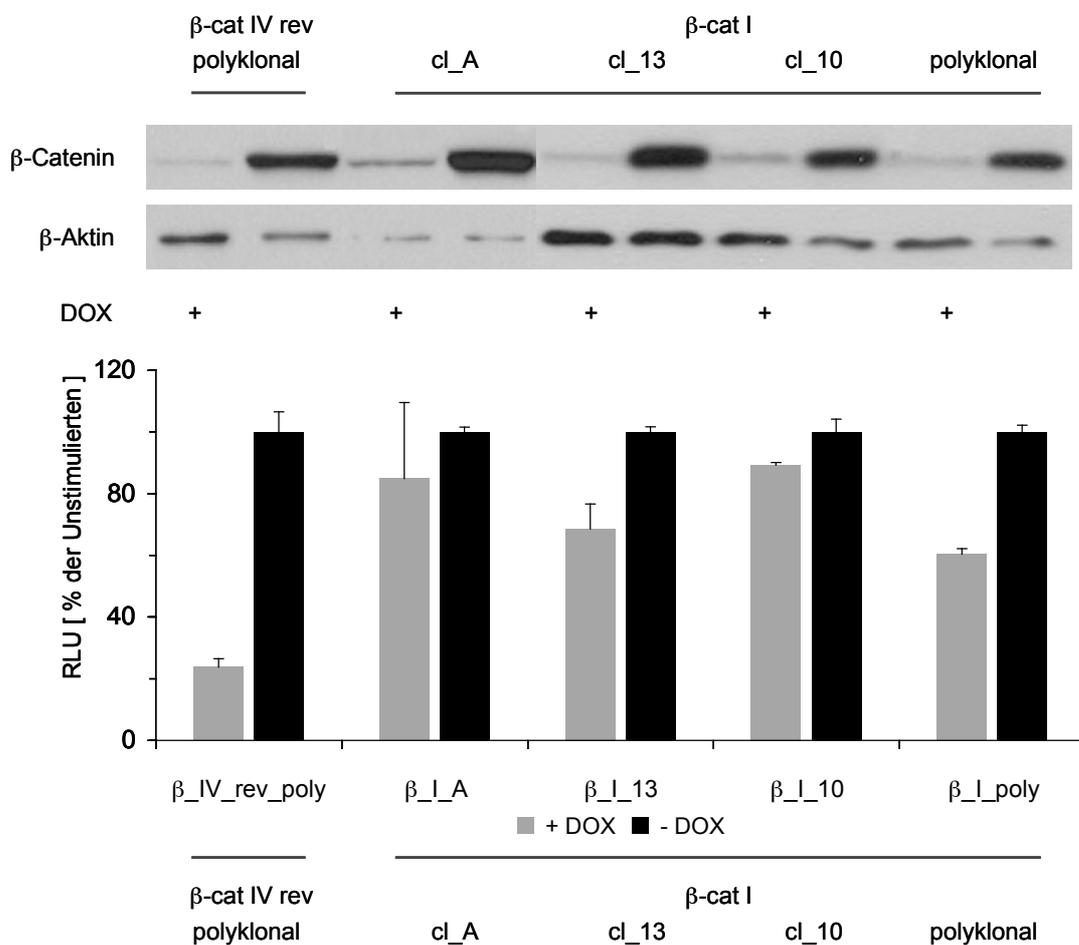


Abbildung 3.14 RNAi vermittelte Senkung des β -Catenin Proteins resultiert nicht unbedingt auch in verringerter pTOPflash Reporter gen Aktivität. Eine polyklonale, β _IV_rev shRNA exprimierende Zelllinie (β _IV_rev_poly), vier individuelle Einzelzellklone für β _I shRNA (β _I_A, β _I_13, β _I_10) sowie eine entsprechende polyklonale Linie (β _I_poly) wurden transient mit pTOPflash transfiziert und dabei mit 2 μ g/ml Doxycyclin stimuliert. Nach 48h Inkubationszeit wurde die Luziferase Aktivität bestimmt und gegen β -Galaktosidase normalisiert. Die Aktivität der unstimulierten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Parallel wurden im Western Blot β -Catenin Proteinspiegel untersucht. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

Die Doxycyclin abhängige Expression sowohl von β_I als auch von β_{IV_rev} shRNA führte zur ebenbürtigen Senkung des Proteins (Abbildung 3.14). Nachfolgend wurde die Aktivität des pTOPflash-Reporters als Marker für β -Catenin-TCF-abhängige Transkription untersucht (Abbildung 3.14). Dabei stellten wir fest, dass die Induktion von β_I shRNA in den Einzelzellklonen (cl_A, cl_13, cl_10, β_I _poly) die pTOPflash-Aktivität nur marginal senken konnte, während dagegen durch Stimulation der polyklonalen Linie (β_I _poly) eine Senkung um ca. 50% erreicht wurde. Interessanterweise führte die Expression von β_{IV_rev} shRNA (β_{IV_rev} _poly) wie auch zuvor im transienten Assay (Abbildung 3.13) zu einer nahezu 70%igen Senkung der pTOPflash Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse generierten wir auch für die Sequenz β_{IV_rev} Einzelzellklone.

Analyse der β_{IV_rev} shRNA Einzelzellklone

Die β -Catenin abhängige Transkription der SW-480TR_ β_{IV_rev} Klone wurde mittels pTOPflash Reporter bestimmt. Exemplarisch für die generierten Klone wurde durch Stimulation mit Doxycyclin die Aktivität des pTOPflash-Reporters in X.P und K.L auf bis zu < 70% gesenkt (Abbildung 3.15). Nachfolgend überprüften wir am FACS die Viabilität beider Klone und konnten zeigen, dass die Senkung der β -Catenin Proteinspiegel weder in Klon K.L noch in X.P Einfluss auf die Zellviabilität ausübte. Wir bestätigten damit die bereits im transienten System (Abbildung 3.7) gezeigt Daten, dass RNAi vermittelte Senkung von β -Catenin den Anteil fragmentierter DNS nicht beeinflusst.

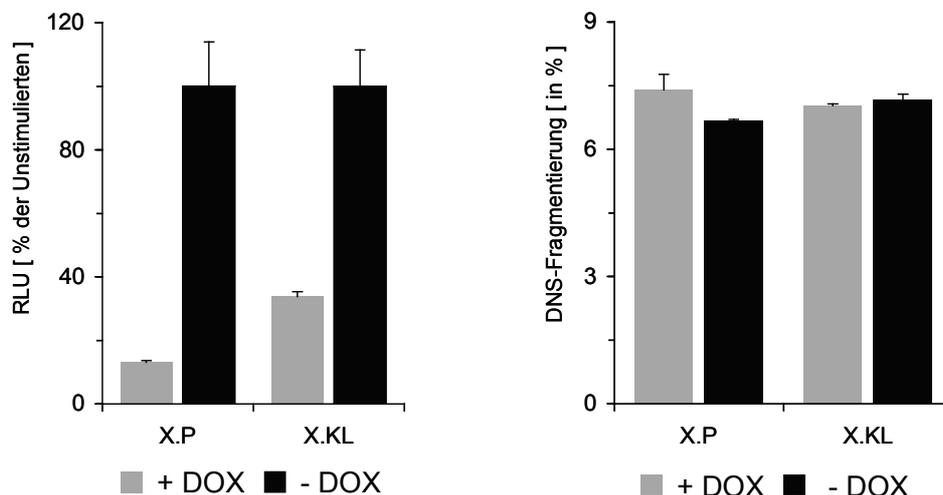


Abbildung 3.15 Die Expression von β_{IV_rev} shRNA senkt die Aktivität des pTOPflash Reporters, übt aber keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen aus. Linke Abbildung: Einzelzellklone X.P und K.L wurden transient mit pTOPflash transfiziert und mit $2\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin stimuliert. Nach 48h wurde die Aktivität des pTOPflash Luziferase Reporters bestimmt und gegen β -Galaktosidase normalisiert. Die Aktivität der unstimulierten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Rechte Abbildung: Der Anteil fragmentierter DNS wurde 48h nach Stimulation mit $2\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin Mittels Nicoletti-Färbung am FACS bestimmt.

Kinetik der shRNA vermittelten Senkung der β -Catenin Proteinspiegel

Die im Folgenden untersuchte zeitabhängige Senkung der β -Catenin Proteinspiegel nach einmaliger Stimulation mit Doxycyclin wurde mit dem β _IV_rev Klon K.L durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bereits 24 h nach Induktion der shRNA-Expression die β -Catenin-Spiegel im Vergleich zum unstimulierten Klon gesenkt wurden. 60h nach Doxycyclin-Gabe erreichten die β -Catenin Proteinspiegel ihr Minimum und blieben bis mindestens 72h nach einmaliger Gabe gesenkt. Die Stimulation der TET-Repressor Zellen SW-480 TR (Kontrolle) führte zu keiner Änderung der Proteinspiegel (Abbildung 3.16).

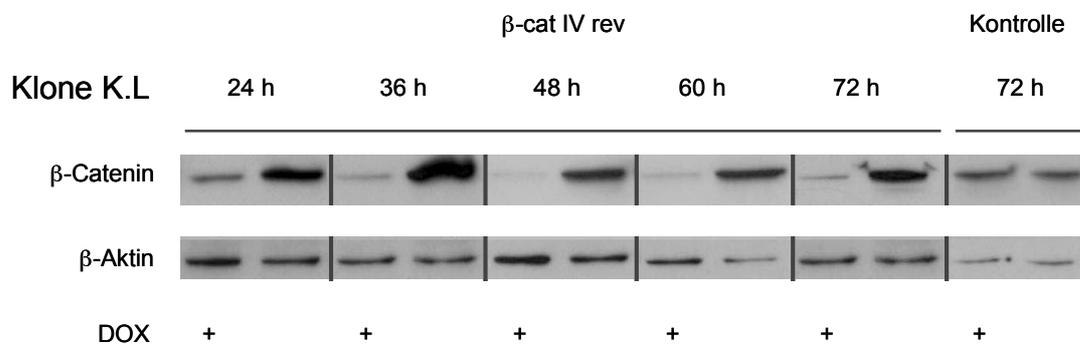


Abbildung 3.16 Kinetik der shRNA vermittelten Senkung der β -Catenin Proteinspiegel in induzierbaren Zellen.

Der SW-480TR_ β _IV_rev Klon K.L wurde mit 2 μ g/ml Doxycyclin stimuliert. Die β -Catenin Proteinspiegel wurden mittels Western Blot und β -Catenin spezifischem Antikörper zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Als Kontrolle wurden SW-480TR Zellen gleichermaßen behandelt. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

Analyse der Zellproliferation

Nachdem wir in Abbildung 3.15 durch β_{IV_rev} shRNA Expression keinen Einfluss auf die Zellviabilität feststellen konnten, überprüften wir im Folgenden die Veränderung der Zellproliferation durch β_{IV_rev} shRNA anhand des Klonen X.P. Dieser wurde nach Doxycyclin Stimulation und 6 Tagen Wachstum im MTT-Assay analysiert (Abbildung 3.17). RNAi vermitteltes *Silencing* von β -Catenin resultierte in um $\geq 40\%$ verringerten Absorptionswerten im MTT-Assay im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Werte der TET-Repressor Zellen SW-480TR (Kontrolle) wurden nicht verändert. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Abbildung 3.15, die zeigten, dass β -Catenin *Silencing* keinen Einfluß auf die Integrität der DNS nimmt, zeigte dieses Experiment eine deutliche Proliferationshemmung durch β -Catenin *Silencing*.

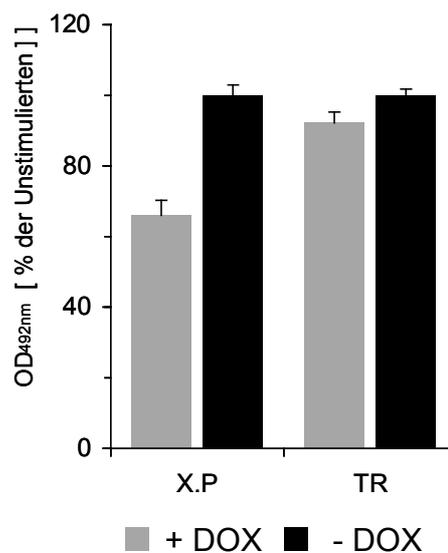


Abbildung 3.17 *Expression von shRNA gegen β -Catenin verringert die Zellproliferation.* Der β_{IV_rev} shRNA Klon X.P wurde mit $2\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin stimuliert. Nach 6 Tagen Proliferation wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die Absorption bei $\lambda=492\text{nm}$ bestimmt. Als Kontrolle wurden SW-480TR Zellen gleichfalls stimuliert. Die Absorption der unstimulierten Zellen wurde auf 100% gesetzt.

3.4 ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS VON β -CATENIN HERABREGULIERTEN ZELLEN

Der Begriff Transkriptom beschreibt die Gesamtheit aller *messengerRNA* (mRNA) Moleküle, den Transkripten, die von einer Zelle bzw. einer Zellpopulation produziert wird. Im Gegensatz zum Genom, welches in der jeweiligen Zelle statisch, d.h. fixiert ist, variiert das Transkriptom in Abhängigkeit verschiedener äußerer und innerer Bedingungen. Das Transkriptom reflektiert die Gene, die zu einer bestimmte Zeit aktiv exprimiert werden und kann daher auch als Spiegel der Zelle verstanden werden. RNA Interferenz wurde bereits als effektives Werkzeug zur Findung von Zielgenen beschrieben. Unser Ziel war es, Komponenten des Wnt-Signalwegs als mögliche Zielgene von β -Catenin zu untersuchen. Infolgedessen analysierten wir das Transkriptom von mit siRNA gegen β -Catenin behandelten SW-480 Zellen.

In Zusammenarbeit mit dem Laboratorium für funktionelle Genomanalyse (LaFuGa), Leiter Dr. Helmut Blum, Genzentrum der LMU München, wurde das Transkriptom mittels Affymetrix *Microarray* Technologie analysiert und nachfolgend einer bioinformatisch statistischen Auswertung unterzogen. SW-480 Zellen wurden mit siRNA gegen β -Catenin (β_{IV}) oder der Kontrollsequenz β -Galaktosidase (β_{gal}) transfiziert und nach 72h für die Extraktion von mRNA geerntet. Sämtliche Prozesse der Affymetrix Analyse inklusive cDNA-Synthese sowie der nachfolgenden statistischen Auswertung wurden komplett von bzw. unter der Leitung von Susanne Schmidt, LaFuGa durchgeführt. Die Tabelle enthält einen Auszug von durch β -Catenin regulierten Genen. Die Auswahl in der Tabelle beschränkt sich dabei auf Gene, die in Verbindung mit dem kanonischen Wnt-Signalweg stehen und in ihrer Expression mindestens um den Faktor 2 gesenkt wurden.

Gen Symbol	Gen Name	x-fache Änderung	Funktion im Wnt-Signalweg
DKK1	Dickkopf Homolog 1	4.5	Wnt-Antagonist, induziert Endozytose des LRP Rezeptors
DKK4	Dickkopf Homolog 4	27.9	Wnt-Antagonist, induziert Endozytose des LRP Rezeptors
WNT6	Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 6	5.7	aktiviert den kanonischen Wnt-Signalweg
KREMEN2	Kringle Containing Transmembrane Protein 2	2.0	antagonisiert Wnt-Signaling; Dickkopf-Rezeptor, wichtig für die Funktion von DKK Proteinen
NLK	Nemo-Like Kinase	2.5	antagonisiert Wnt-Signaling; verringert DNS-Bindungsaktivität von TCF/LEF-Proteinen durch deren Phosphorylierung
DACT1	Dapper Antagonist of β -Catenin, homolog 1	3.1	antagonisiert Wnt-Signaling; unterstützt den Abbau von <i>Dishevelled</i>

Tabelle 3.1 Die Senkung von β -Catenin durch siRNA beeinflusst die Expression von Mitgliedern des Wnt-Signalwegs. SW-480 Zellen wurden mit siRNA gegen β -Catenin (β_{IV}) transfiziert. Nach 72h wurde RNA extrahiert und die gewonnene mRNA durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA Bank wurde mittels *Microarray* Technologie analysiert und anschließend bioinformatisch ausgewertet.

3.5 UNTERSUCHUNG VON DICKKOPF-4 (DKK4)

Die Analyse der *Microarray* Daten brachte DKK4 als potentiell Zielgen von β -Catenin hervor. Wie schon in der Einleitung erläutert, konnte die Familie der Dickkopf-Proteine bereits als vielseitige Modulatoren des Wnt-Signalwegs charakterisiert werden. Zudem konnte am Beispiel von DKK1 die Kremenrezeptor vermittelte Antagonisierung des LRP-Rezeptors gezeigt werden^{65,112}. Da über DKK4 vermittelte Modulationen des Wnt-Signalwegs bisher nur wenig bekannt ist, untersuchten wir die gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen DKK4 und diesem Signalweg.

3.5.1 BESTÄTIGUNG DER MICROARRAY DATEN

In einem Vorexperiment wurde überprüft, ob in den analysierten Proben die Spiegel von β -Catenin gesenkt waren. Dieses Experiment dient gleichzeitig der Überprüfung, ob siRNA vermittelte RNAi vorliegt. Sowohl auf Protein als auch auf mRNA Ebene zeigten alle verwendeten β -Catenin siRNA Sequenzen vergleichbar gute *Silencing* Eigenschaften und löschten β -Catenin auf mRNA und Proteinebene beinahe aus (Abbildung 3.18).

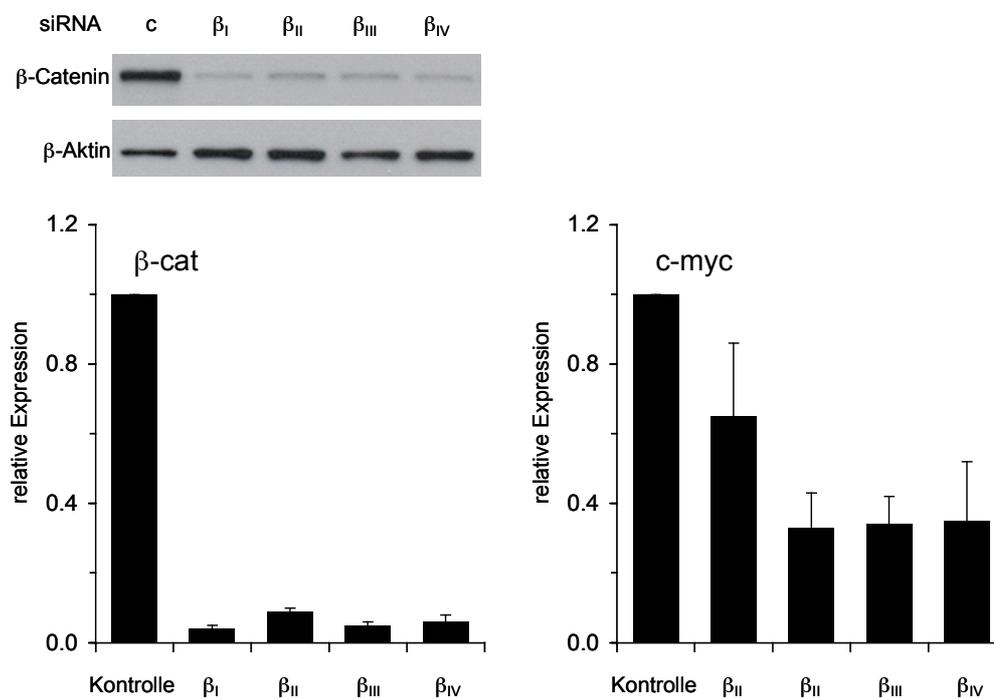


Abbildung 3.18 *Silencing von β -Catenin führt zu verminderten β -Catenin und c-myc mRNA Spiegeln.* SW-480 Zellen wurden mit β -Catenin siRNAs (β_{I-IV}) transient transfiziert. Nach 72h Inkubation wurde mRNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit β -Galaktosidase siRNA behandelt. Zur Analyse vermindelter β -Catenin Proteinspiegel wurden Western Blots mit β -Catenin spezifischen Antikörpern durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

Die Senkung der mRNA Spiegel zeigt, dass die Verringerung der β -Catenin Proteinspiegel spezifisch durch β -Catenin siRNA und nicht durch unspezifische Effekte oder nicht siRNA vermittelte RNAi hervorgerufen wurde. Als *Proof of Principle* Experiment wurden nachfolgend die mRNA Spiegel des bereits charakterisierten β -Catenin Zielgenes c-myc analysiert. Im Vergleich zur β -Galaktosidase siRNA (Kontrolle), konnten $\beta_{II} - \beta_{IV}$ siRNAs die c-myc mRNA Spiegel um bis zu 70% absenken, wohingegen durch Transfektion von β_I siRNA die analysierte c-myc mRNA nur um ca. 40% gesenkt wurde (Abbildung 3.18).

Allen weiteren Untersuchungen vorausgehend wurden die im Rahmen der *Microarray* Analyse für die Familie der DKK Proteine erhobenen Daten mit Hilfe quantitativer *real-time* RT-PCR im verwendeten Zellsystem (SW-480) validiert. Diese Methode ermöglicht es anhand der mRNA Spiegel eine quantitative Aussage zur veränderten Genexpression zu treffen. Dazu wurde die mRNA Expression humaner Dickkopf Gene (DKK1-DKK4) in SW-480 Zellen nach erfolgreicher siRNA Transfektion gegen β -Catenin (β_{I-IV}) ermittelt.

Sowohl DKK2 als auch DKK4 mRNA Spiegel wurden im Vergleich zur Kontrolle (β -gal siRNA) durch *Silencing* von β -Catenin (β_{I-IV} siRNA) bis an die untere Nachweisgrenze des Systems gesenkt. Eine effiziente Senkung der DKK1 mRNA-Spiegel um ca. 75% konnte durch die Transfektion von β_{II-IV} siRNA erreicht werden, wohingegen die Verwendung der Sequenz β_I keinen Einfluss auf die DKK1 mRNA Spiegel zeigte. In Bezug auf die DKK3 Expression zeigte RNAi vermittelter β -Catenin *Knockdown* im Falle der β_I siRNA eine Senkung der mRNA Spiegel auf ca. 25%, wohingegen die Sequenzen β_{II-IV} die mRNA Spiegel im Vergleich zur Kontrolle um weniger als 50% senken konnten (Abbildung 3.19).

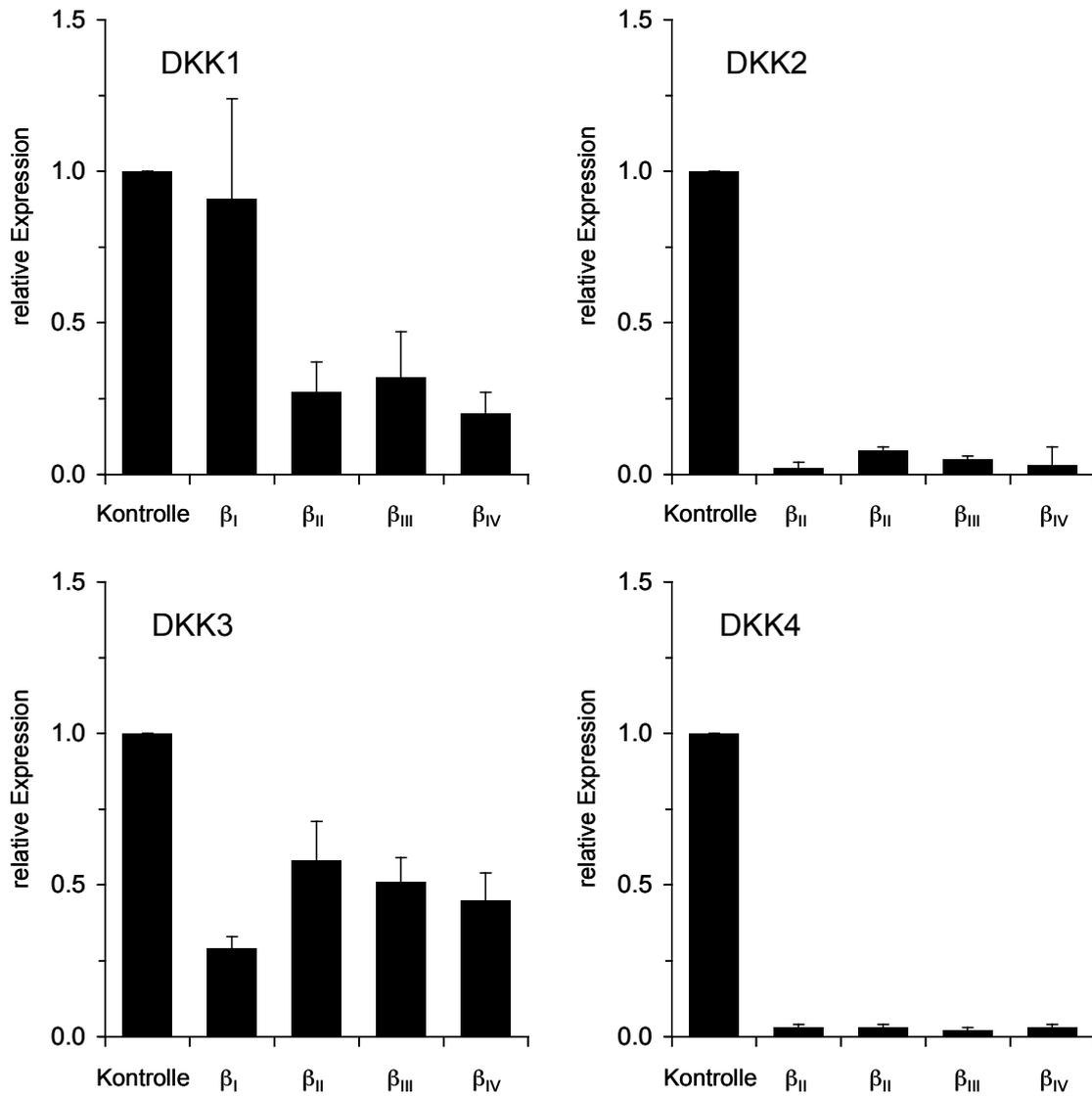


Abbildung 3.19 *RNAi* vermitteltes Silencing von β -Catenin fñhrt zu verringerten DKK1-4 mRNA Spiegeln. SW-480 Zellen wurden transient mit β -Catenin siRNA transfiziert (β_{I-IV}). Als Kontrolle wurde β -Galaktosidase siRNA eingesetzt. 72h nach der Transfektion wurden mittels quantitativer RT-PCR DKK1-4 mRNA-Spiegel untersucht. Um β -Catenin Silencing sicherstellen zu können, wurden in parallelen Experimenten β -Catenin mRNA- und Proteinspiegel ermittelt (Abbildung 3.18).

3.5.1.1 S33Y β -CATENIN ABHÄNGIGE EXPRESSION VON DKK4

Zur weiteren Untermauerung der *Microarray* Daten verwendeten wir nachfolgend ein klassisches Überexpressionsmodell für β -Catenin. Für diese Experimente wurden stabil transfizierte 293T-Rex Zellen verwendet, welche nach Stimulation mit Doxycyclin eine durch Mutation einer Phosphorylierungsstelle vor Abbau geschützte Mutante, S33Y β -Catenin, exprimieren. Wie aus Abbildung 3.20 ersichtlich wird korrelieren erhöhte S33Y β -Catenin Proteinspiegel mit erhöhten DKK4 mRNA Spiegel, welche im Vergleich zur Kontrolle bis zum Faktor 4 gesteigert werden (72 h). Die Stimulation parentaler 293T-Rex zeigte keinen Einfluss auf DKK4 mRNA Spiegel. Bezug nehmend zur Abbildung 3.19 konnte somit in einem zweiten Model gezeigt werden, dass die Expression von β -Catenin mit der von DKK4 gekoppelt ist.

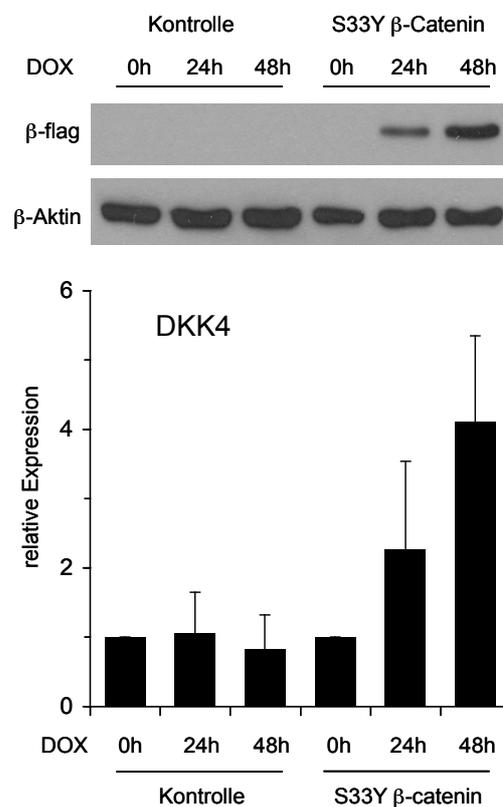
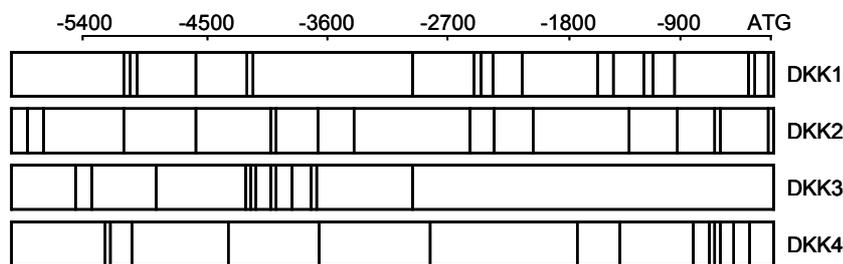


Abbildung 3.20 Die Überexpression von S33Y β -Catenin führt zu erhöhten DKK4 mRNA-Spiegeln. Zellen der induzierbaren Linie 293T-Rex S33Y β -Catenin wurden mit $2\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin stimuliert. Die DKK4 mRNA Expression wurde an den gegebenen Zeitpunkten mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. In parallelen Experimenten konnte die Expression des zur spezifischen Immuno-Detektion mit einem Flag-Epitop versehenen Proteins S33Y β -Catenin mittels Western Blot unter Verwendung eines gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörpers gesichert werden. Als Kontrollexperiment wurden parentale 293T-REX gleichermaßen analysiert.

3.5.2 PROMOTERANALYSEN DER HUMANEN DICKKOPF GENE

Die Promotoren der humanen Dickkopf-Gene (DKK1-DKK4) wurden auf die Präsenz von TCF-Bindedomänen hin untersucht. Mittels dafür durch Dr. Andreas Herbst, LMU, MedII, AK Kolligs geschaffener Software konnten Position und genaue Sequenz der einzelnen Seiten bestimmt werden. Die Analyse zeigte, dass die TCF-Seiten innerhalb der Promoterregionen von DKK1, 2 und 4 eine miteinander vergleichbare Verteilung aufweisen, wohingegen im Fall von DKK3 die TCF-Seiten im hinteren Bereich des Promoters lokalisiert sind. Die so gewonnenen Informationen über DKK4 konnten als Basis für nachfolgende Charakterisierung des Promoters genutzt werden.



DKK1 (NM_012242)		DKK2 (NM_014421)		DKK3 (NM_015881)		DKK4 (NM_014420)	
Position	Sequenz	Position	Sequenz	Position	Sequenz	Position	Sequenz
-52	TGCAAAG	-57	CTTTGCA	-2752	CTTTGCT	-181	CTTTGCT
-230	CTTTGTT	-485	TGCAAAG	-3441	TTTTGTT	-308	TTTTGAA
-249	CTTTGAA	-508	CTTTGAA	-3451	TTTTGTT	-395	CTTTGAT
-774	CTTTGCA	-743	AGCAAAG	-3664	TTTTGTA	-406	CTTTGAA
-945	TTCAAAG	-1108	AAGAAAG	-3744	CTTTGTT	-438	CTTTGAT
-1000	CTTTGAT	-1842	CTTTGCT	-3753	TTTTGTT	-603	TTTTGTA
-1211	TAGAAAG	-2296	AAGAAAG	-3883	TTCAAAG	-1158	TTTTGAT
-1372	TTTTGTT	-2477	CTTTGAT	-3967	TTTTGAA	-1485	ATCAAAG
-1927	CTTTGAA	-3162	AAGAAAG	-3988	TTTTGTT	-2579	TAGAAAG
-2101	TTCAAAG	-3404	TTTTGTT	-4617	AGCAAAG	3137	TTTTGTA
-2354	TTTTGTT	-3424	TTTTGAT	-5179	TTCAAAG	-4106	CTTTGCT
-2376	CTTTGTT	-3757	TTTTGTA	-5265	TTCAAAG	-4801	TTTTGTA
-2780	AACAAAG	-3842	AGCAAAG			-4967	TTTTGTT
-3950	TTTTGAT	-4975	TTTTGTA			-5094	CTTTGAT
-3985	AGCAAAG	-5492	TTTTGTT				
-4313	TAGAAAG						
-4853	TTTTGTA						
-4866	AAGAAAG						
-4882	AAGAAAG						

Tabelle 3.2 *In silico* Analyse der TCF-Bindestellen der humanen Dickkopf-Promotoren. Die Illustration zeigt einen zusammenfassenden Überblick der TCF-Bindestellen humaner Dickkopf Promotoren. Jede Line repräsentiert jeweils eine TCF-Seite. Präzise Positionen sowie korrespondierende Sequenzen können der Tabelle entnommen werden. Positionsangaben beziehen sich auf das jeweilige Start ATG.

3.5.2.1 ETABLIERUNG VON DKK4 REPORTERGEN-KONSTRUKTEN

Im Gegensatz zu kolorektalen Karzinomzelllinien weisen HEK293 keine Deregulierung des Wnt-Signalwegs auf. Deshalb benutzten wir diese Linie um nachfolgend die β -Catenin-abhängige Aktivität des DKK4 Promoters zu untersuchen. Hierzu wurden aufsteigend große Fragmente des DKK4-Promoters in den Luziferase-Reportervektor pGL3basic (Promega) kloniert. In Abhängigkeit von der Aktivität des untersuchten Promoters exprimiert dieser Vektor Glühwürmchen-Luziferase. Die so erhaltenen Reporter-gen-Konstrukte wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch S33Y β -Catenin und FL-TCF4 untersucht. Abgesehen von den Konstrukten DKK4_I und DKK4_II, die nur die erste bzw. die ersten zwei TCF-Seiten enthalten, konnten alle DKK4-Reporter-gen-Konstrukte durch gemeinsame Überexpression von S33Y β -Catein und FL-TCF4 aktiviert werden. Im Vergleich untereinander weist die Aktivierbarkeit der untersuchten Konstrukte vier Stufen auf.

Im DKK4-Promoter scheinen die TCF-Seiten 4 bis 7 starken Einfluss auf die Aktivität des DKK4-Promoters auszuüben (Abbildung 3.21). Nachfolgend wurde die Aktivierbarkeit dieser Konstrukte genauer untersucht.

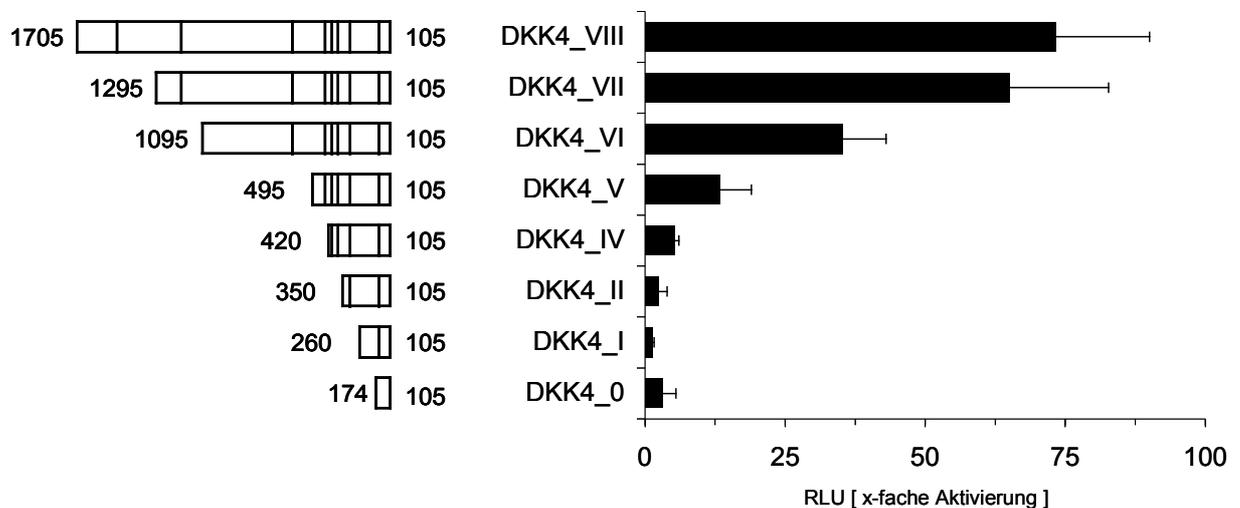


Abbildung 3.21 *DKK4 Reporter-gen-Konstrukte werden durch FL-TCF4 und S33Y β -Catenin aktiviert.* Rechte Abbildung: HEK293 Zellen wurden transient mit jeweils einem der o.g. DKK4 Reporter-gen-Konstrukte transfiziert. Zur Aktivierung β -Catenin abhängiger Genexpression wurden S33Y β -Catenin und FL-TCF4 kotransfiziert (aktiviert). Durch die Kotransfektion von pcDNA3 wurde die jeweilige Vergleichsgruppe geschaffen (nicht aktiviert). 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Aktivität der Glühwürmchen-Luziferase bestimmt und auf β -Galaktosidase normalisiert. Die normalisierte Ratio aktivierter *versus* nicht-aktivierter Zellen wurde im Graphen aufgetragen. Die linke Abbildung skizziert den jeweilig untersuchten Abschnitt des DKK4 Promoters. Linien repräsentieren TCF-Seiten, Zahlen die Position der zum Klonieren verwendeten Primer in Bezug auf das Start-ATG.

Um den in Abbildung 3.21 gezeigten Einfluss von TCF4 und S33Y β -Catenin auf die Aktivität des DKK4 Promoters näher zu charakterisieren wurde nachfolgend die Aktivierbarkeit der Konstrukte durch die Expression der jeweils einzelnen Proteine mit der gemeinsamen Expression beider Proteine verglichen. Während die Expression von TCF4 keinen Einfluss auf die Aktivität der untersuchten Konstrukte zeigte, wurden diese durch S33Y β -Catenin aktiviert. Die Koexpression beider Proteine führte zur stärksten Aktivierung. Die Positivkontrolle, VP16TCF, das die DNS-Bindestelle von TCF4 mit einer starken, synthetischen Transaktivierungsdomäne vereint, exprimiert, führte zur stärksten Aktivierung der DKK4-Reportergeren Konstrukte (Abbildung 3.22).

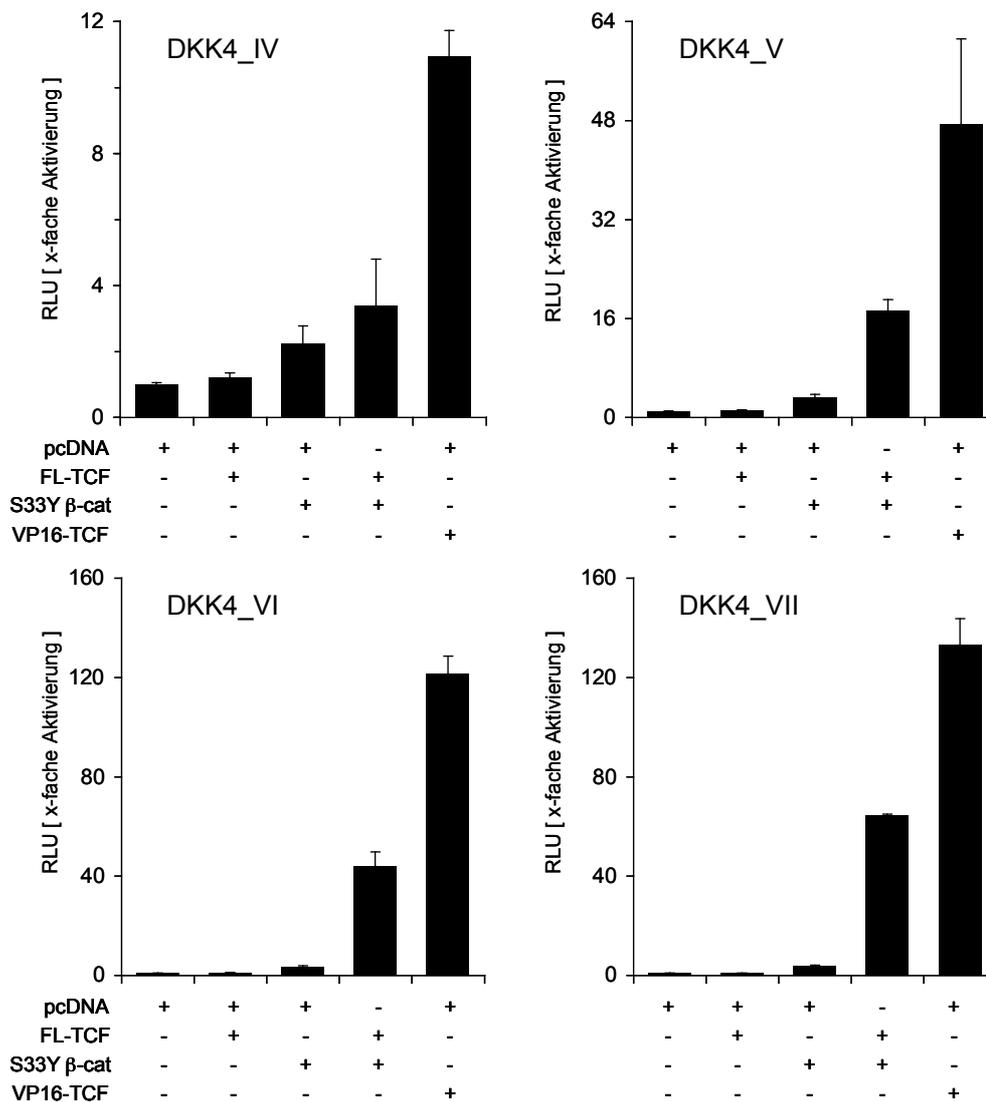


Abbildung 3.22 *Untersuchung der Aktivierung der DKK4 Reporter durch TCF4 und S33Y β -Catenin.* HEK293 Zellen wurden mit den angegebenen DKK4 Reportergeren Konstrukten transfiziert (DKK4_IV-VII). Die Zellen wurden entweder mit einem Expressionskonstrukt für TCF4 bzw. β -Catenin allein oder beiden kotransfiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen entweder mit pcDNA3 (nicht aktiviert) bzw. einem für VP16-TCF kodierenden Plasmid (Positivkontrolle) kotransfiziert. 48h nach der Transfektion wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und mit β -Galaktosidase normalisiert. Die Ratio aktivierter *versus* nicht-aktivierter Zellen wurde im Graphen aufgetragen.

Einfluss von wt- β -Catenin, wt- γ -Catenin und verschiedener Mutanten auf die Aktivierung von DKK4

Vorangegangene Analysen zeigten, dass die Koexpression von TCF4 und S33Y β -Catenin zu starker Aktivierung der DKK4-Reporter führt (Abbildung 3.22). Im nachfolgenden Assay klärten wir anhand des Dickkopfreporters DKK4_VI das Zusammenspiel von TCF4 mit weiteren β -Catenin als auch γ -Catenin Modifikationen auf. Die alleinige Expression von wildtyp (wt) β -Catenin sowie der Mutante Δ n47 β -Catenin führte zu einer Erhöhung der DKK-Reporteraktivität ≥ 2 , welche durch Koexpression von TCF4 auf ≥ 7 gesteigert wurde. Die stärkste Aktivierung wurde durch die Expression von S33Y β -Catenin erreicht; ≥ 6 ohne TCF bzw. ≥ 40 unter TCF4-Koexpression. In Bezug auf γ -Catenin stellte sich Folgendes dar: Die Expression von wt- γ -Catenin führte sowohl mit als auch ohne TCF4-Koexpression nur zu einer geringen Aktivierung um den Faktor 2, während die Transkriptionsaktivität der Mutante Δ n38 γ -Catenin durch die Anwesenheit von TCF4 auf \geq Faktor 9 gesteigert werden konnte (Abbildung 3.22). Diese Daten zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen β - und γ -Catenin sowie der entsprechenden Mutanten in Bezug auf die Aktivierung des DKK4-Reportergens.

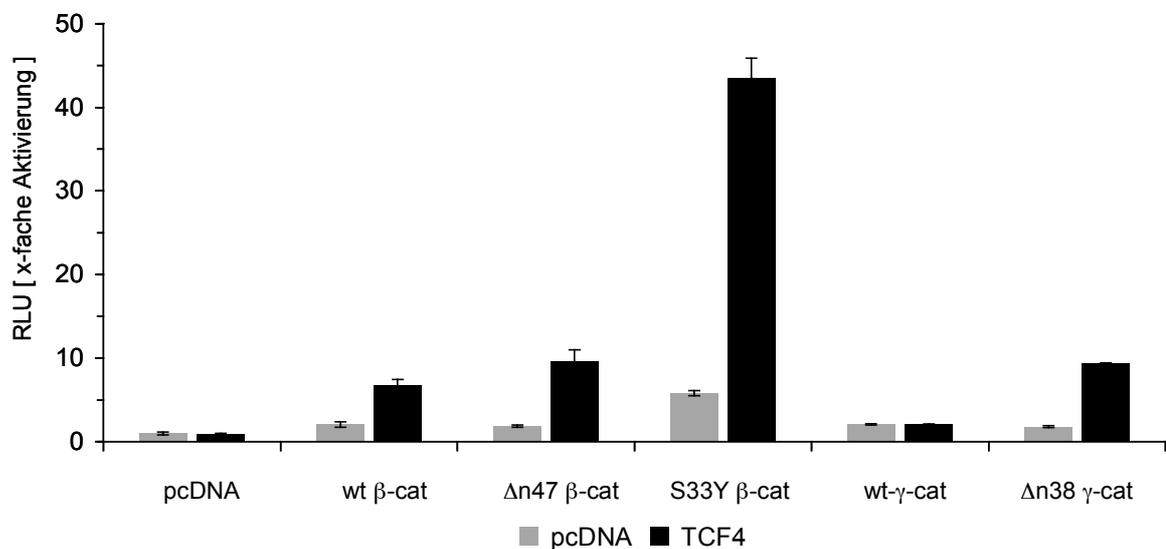


Abbildung 3.23 Die Expression von β -Catenin oder γ -Catenin sowie der entsprechenden Mutanten führt zu stark unterschiedlicher Aktivierung des DKK4 Reportergens. Die oben aufgeführten Expressionkonstrukte wurden entweder mit pcDNA oder einem TCF4 Expressionskonstrukt in HEK293 Zellen transfiziert. Als DKK4 Reporter wurde das Konstrukt DKK4_VI (Abbildung 3.21) verwendet. 48h nach der Transfektion wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und gegen β -Galaktosidase normalisiert. Die normalisierte Aktivität von nur mit pcDNA transfizierten Zellen dient als Bezugspunkt für die im Graphen aufgetragene Ratio.

Relevanz des Kofaktors TCF4

Die Aktivierung von β -Catenin vermitteltem *Signaling* durch Koexpression der Proteine β -Catenin und TCF4 führt in HEK293 Zellen zur Verstärkung der DKK4-Reporterexpression (Abbildung 3.21 - Abbildung 3.23). Im Folgenden werden wir aufklären, ob TCF4 auch in der kolorektalen Karzinomzelllinie SW-480 die Expression des DKK4-Reportergens beeinflussen kann. SW-480 Zellen weisen aufgrund einer Mutation des APC-Gens eine stetige Aktivierung des Wnt-Signalwegs auf¹⁰⁹.

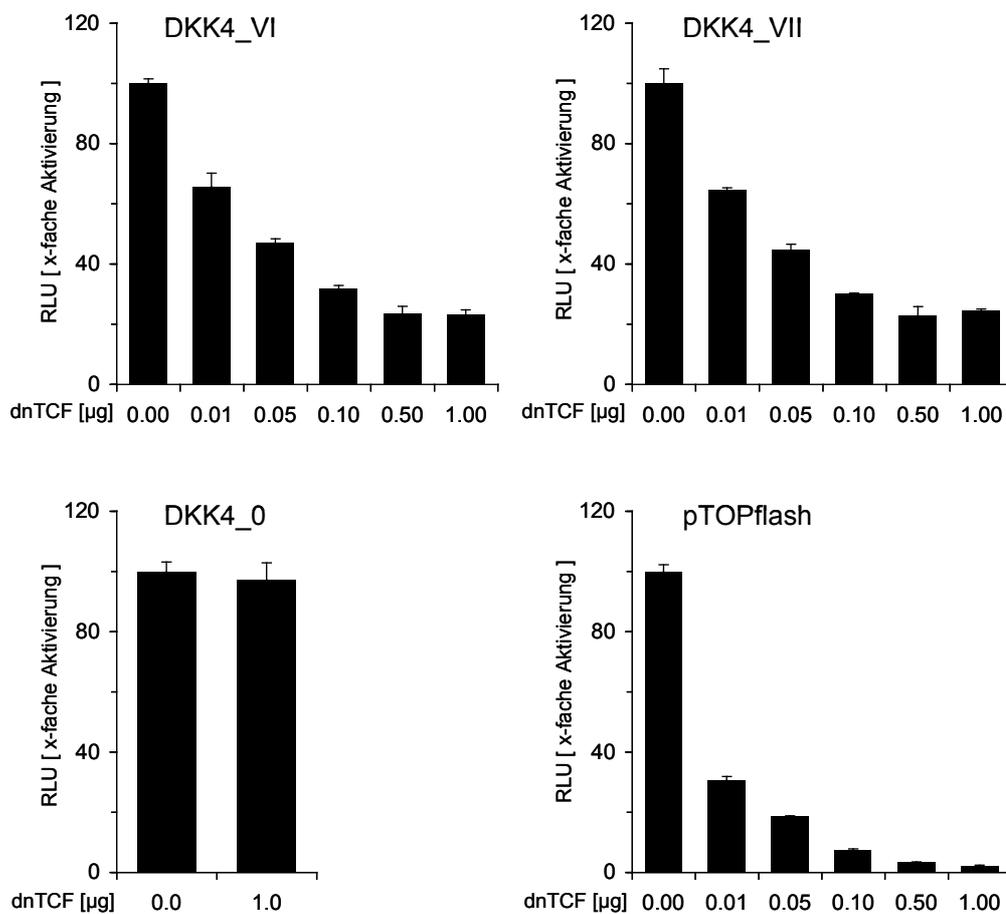


Abbildung 3.24 Die Aktivierung von DKK4 Reportergenen wird durch die Expression von dominant-negativem TCF4 konzentrationsabhängig gesenkt. SW-480 Zellen wurden mit steigenden DNS-Mengen eines für dnTCF4 kodierenden Plasmids transfiziert. Die Gesamt-DNS-Menge wurde mit pcDNA konstant gehalten. Des Weiteren wurden die Zellen mit den angegebenen Reportergen-Konstrukten transfiziert. 48h nach der Transfektion wurde die Luziferaseaktivität bestimmt und gegen β -Galaktosidase abgeglichen. Als Bezugspunkt (100%) diente die Luziferaseaktivität der SW-480 Zellen, die nur mit pcDNA transfiziert wurden.

Um als Transkriptionsfaktor fungieren zu können benötigt β -Catenin Proteine der TCF-LEF-Familie, welche die DNS-Bindedomäne bereitstellen. Obwohl dominant-negatives TCF4 (dn-TCF4) weiterhin an die DNS bindet, stellt es, da es für β -Catenin keine Interaktionsmöglichkeit bietet, keinen potentiellen Kofaktor für die Aktivierung der Transkription dar. Die Expression von dominant-negativem TCF4 senkte in SW-480 konzentrationsabhängig gleichermaßen die Aktivierung der DKK4-Reportergergenkonstrukte mit sechs bzw. sieben TCF-Seiten (DKK4_VI / VII) (Abbildung 3.24). Als *Proof-of-Principle* Experiment wurde die Veränderung des pTOPflash Reporters untersucht. Auch hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Senkung der Reporteraktivität. Um mögliche Artefakte auszuschließen wurde das Konstrukt DKK4_0, d.h. ohne TCF-Seiten untersucht. Dieses nicht aktivierbare Konstrukt (Abbildung 3.21) ist nicht durch die Expression von dominant-negativem TCF4 beeinflussbar (Abbildung 3.24). Schlussfolgernd konnten wir zeigen, dass selbst in Zellen mit dereguliertem Wnt-Signalweg funktionales TCF4 für die Aktivierung des DKK Promoters notwendig ist und belegen damit den Zusammenhang zwischen TCF4-Expression und DKK4 Reportergergen Aktivierung in einem zweiten Assay System.

DKK4 Reportergergen-Aktivierung durch Inhibierung von GSK3 β

Wie in der Einleitung beschrieben (1.3.3.1), übernimmt die Phosphokinase GSK3 β eine zentrale Rollen beim Abbau von β -Catenin. Hier untersuchen wir den Einfluss der Hemmung von GSK3 β mittels des GSK3 β Inhibitors LiCl in Hela Zellen. Hela Zellen weisen ähnlich wie HEK293 keinen deregulierten Wnt-Signalweg auf.

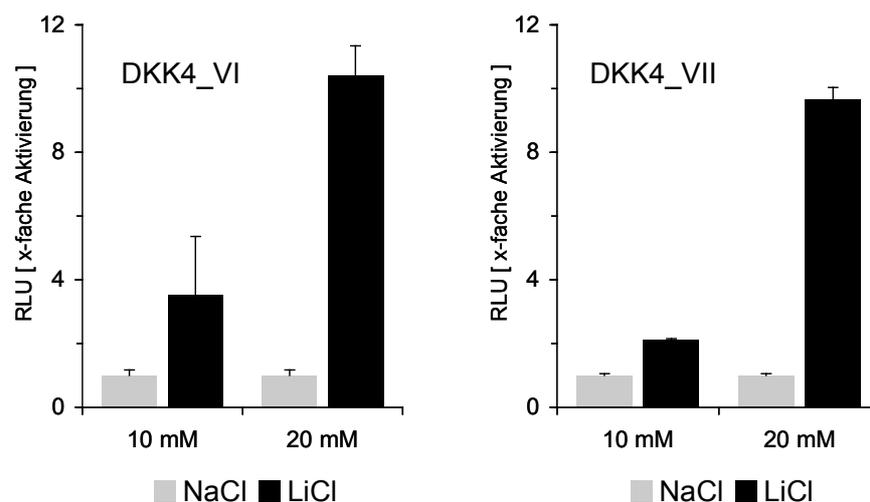


Abbildung 3.25 *Der GSK3 β -Inhibitor LiCl aktiviert DKK4 Reportergergen-Konstrukte.* Hela Zellen wurden entweder mit dem DKK4 Reporter DKK4_VI oder VII transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit der angegebenen Menge NaCl (Kontrolle) bzw. LiCl (Verum) stimuliert und nach weiteren 24h im Reporterassay analysiert. Die Luziferaseaktivität wurde bestimmt und gegen β -Galaktosidase normalisiert. Als Bezugspunkt dient die Aktivität der 10mM NaCl-Kontrollen. Die Ratio der Aktivitäten wurde im Graphen aufgetragen.

3.5.2.2 UNTERSUCHUNGEN MIT REKOMBINANTEM DKK4 UND WNT3a PROTEIN

Einfluss von rekombinatem DKK4 Protein auf die Aktivität des pTOPflash Reporters

In vorausgegangenen Experimenten (Abbildung 3.19 -

Abbildung 3.25) untersuchten wir mit Hilfe von DKK4-Reporter-Gen-Konstrukten den Einfluss der Expression von TCF4 und β -Catenin auf die Aktivierung des DKK4 Promoters. Nun folgend klären wir den Einfluss von DKK4 Protein auf die Aktivierung des β -Catenin-TCF-abhängigen Reporters pTOPflash. DKK1 wurde bereits als potenter Inhibitor des Wnt-Signalwegs beschrieben und war selbst in DLD-1 Zellen, die durch APC-Mutation dereguliertes Wnt-Signaling aufweisen in der Lage die Transkription β -Catenin-abhängiger Zielgenen zu unterdrücken^{65,113}. In SW-480 Zellen konnte rekombinantes DKK4 die Aktivität des pTOPflash Reporters dagegen nicht verringern. Die zur Kontrolle möglicher Hintergrundaktivität analysierte unfunktionale Mutante des Reporters (pFOPflash) zeigte keine Aktivierung (Abbildung 3.26).

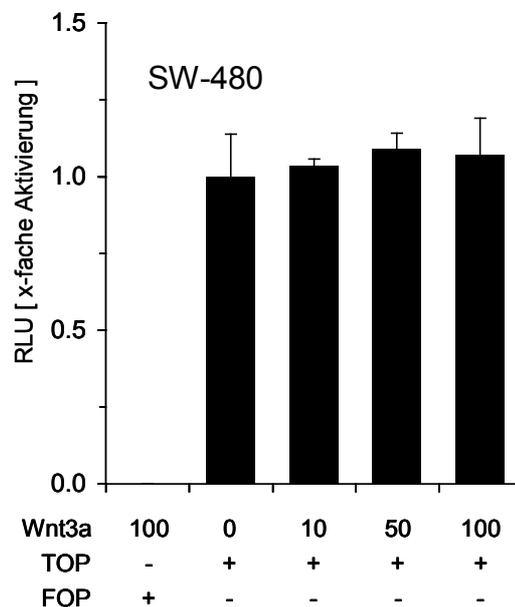


Abbildung 3.26 *Rekombinantes DKK4 zeigt keinen Einfluss auf die pTOPflash Reporter-Gen-Aktivität. SW-480 Zellen wurden transient mit pTOPflash transfiziert und 24h später mit der angegebenen Menge rekombinanten DKK4 Proteins für weitere 24h stimuliert. Die Luciferase-Aktivität des Reporters wurde gemessen und gegen β -Galaktosidase abgeglichen. Als Negativkontrolle wurde pFOPflash transfiziert. Die gegen β -Galaktosidase abgeglichenen Ratio (1=unstimuliert) wurde im Graphen aufgetragen.*

Einfluss von rekombinantem Wnt3a Protein auf die Aktivität des pTOPflash Reporters

Rekombinantes DKK4 zeigte in SW-480 Zellen keinen Einfluss auf die Aktivität des pTOPflash Reportergen Konstrukts. Daher wurden weiterführende Untersuchungen in einer Zelllinie ohne Mutation im Wnt-Signalweg vorgenommen. Wnt3a ist ein starker Induktor des Wnt-Signalwegs. Unser Ziel war es zu untersuchen, ob Wnt3a vermittelte Aktivierung des pTOPflash Reporters durch DKK4 inhibiert werden kann. Dazu stimulierten wir in einem Vorexperiment zur Dosisfindung HeLa Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen rekombinanten Wnt3a-Proteins und konnten zeigen, dass die Aktivität des pTOPflash Reporters entsprechend zunahm (Abbildung 3.27).

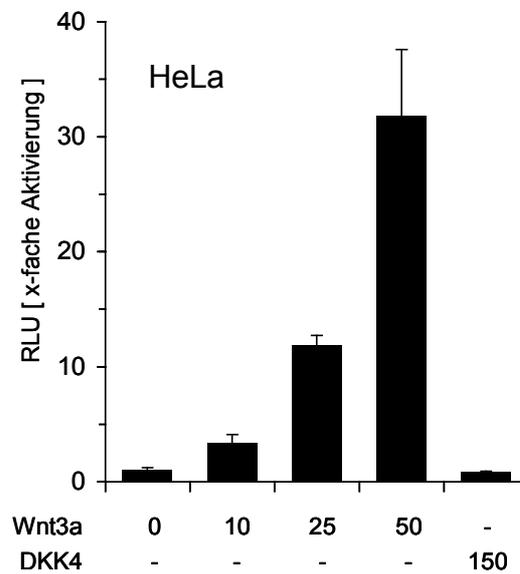


Abbildung 3.27 *Wnt3a aktiviert den pTOPflash Reporter in HeLa Zellen.* HeLa Zellen wurden 24h nach transienter Transfektion mit dem Wnt- β -Catenin abhängigen Reporter pTOPflash für weitere 24h mit aufsteigender Menge rekombinanten Wnt3a-Proteins stimuliert. Als Negativkontrolle wurde mit rekombinantem DKK4-Protein stimuliert. Die gegen β -Galaktosidase normalisierten Reportergen Aktivitäten wurden als RATIO (unstimuliert = 1) aufgetragen.

Einfluss von rekombinatem Wnt3a und DKK4 Protein auf die Aktivität des pTOPflash Reporters

Nachfolgend untersuchten wir unter Verwendung des pTOPflash Reporters die konzentrations- und zeitabhängige Effekte rekombinanten DKK4 Proteins auf die Wnt3a-vermittelte Aktivierung des pTOPflash Reporters. Zur DKK-vermittelten Internalisierung des Wnt-Korezeptors LRP wurden Hela mit DKK4 vorinkubiert und nachfolgend mit Wnt3a stimuliert. Durch Vorinkubation mit rekombinatem DKK4 Protein konnte die pTOPflash-Aktivität nach Wnt3a-Stimulation auf bis zu 70% gesenkt werden (Abbildung 3.28; links). Die Internalisierung von membranständigen Rezeptoren unterliegt bestimmten Kinetiken. Deshalb wurde im Anschluss die zeitabhängige Effizienz der DKK4-Präinkubation untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit steigender Vorinkubationszeit die Aktivität des pTOPflash Reporters zeitabhängig gesenkt werden konnte. Schlussfolgernd ist DKK4 in der Lage Wnt- β -Catenin-abhängige Transkription zu vermindern.

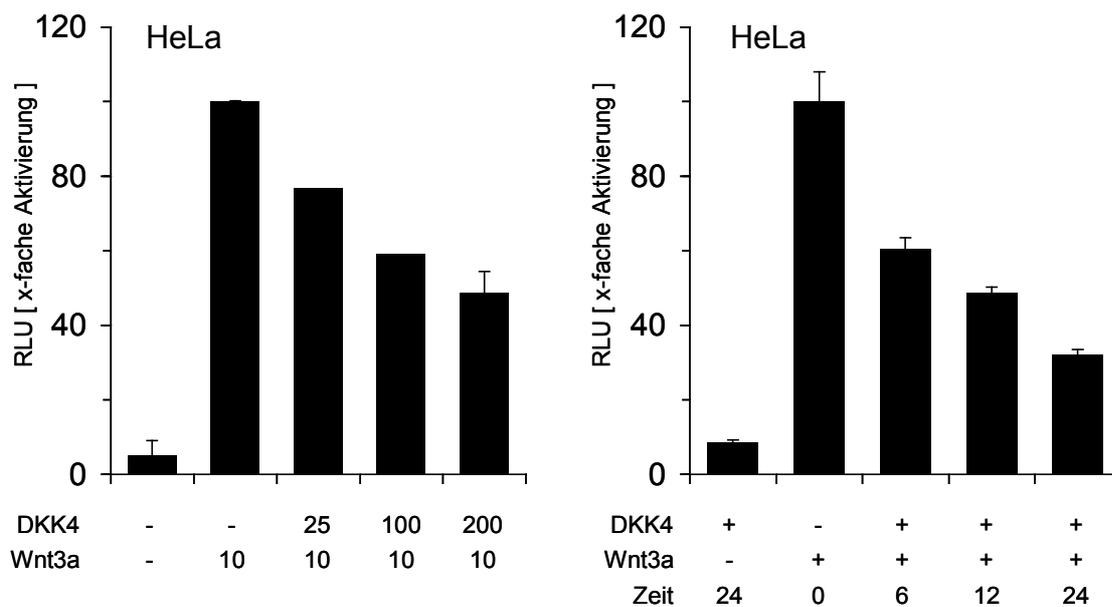


Abbildung 3.28 *DKK4 vermindert Wnt3a vermittelte pTOPflash Reporter-Aktivierung.* Hela Zellen wurden transient mit dem pTOPflash Reporter Konstrukt transfiziert und 24h später mit rekombinatem DKK4 Protein vorinkubiert. Abbildung 3.28 links: Vorinkubation für jeweils 6h (0-200 μ g/ml). Danach Gabe von Wnt3a (10 μ g/ml) für 24h. Abbildung 3.28 rechts: Vorinkubation mit jeweils 100 μ g/ml für 6-24h. Danach Gabe von Wnt3a (10 μ g/ml) für 24h. Die Luziferase Reporter gen Aktivität wurde bestimmt und gegen β -Galaktosidase abgeglichen. Die Aktivität der nur mit Wnt3a stimulierten Zellen, wurde jeweils auf 100% gesetzt.

4 Diskussion

4.1 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON siRNA

Zu Beginn der 90er Jahre stellten Fearon und Vogelstein das erste Tumormodell für die Entwicklung kolorektaler Tumore auf, das von einem kontinuierlich ablaufenden Mehrschrittprozess ausging⁸⁰. Sie formulierten das gemeinsame Auftreten bestimmter Mutationen als Voraussetzung für die Entstehung eines Adenoms und dessen Entwicklung zum Tumor. Zu dieser Zeit wurde das Gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) in Patienten mit erblich bedingtem Darmkrebs (*Familial Adenomatous Polyposis*) beschrieben^{35,36}. Mitte der 90er konnte von Kinzler und Vogelstein die Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und der Entstehung kolorektaler Tumore gezogen werden⁸¹. Seitdem ist das auch als Transkriptionsfaktor fungierende Protein β -Catenin aufgrund seiner zentralen Stellung im Wnt-Signalweg Mittelpunkt intensiver Forschung.

In Wirbeltieren spaltet sich das *Armadillo*-Gen in zwei miteinander verwandte Homologe, β -Catenin und γ -Catenin, auf. In vorangegangenen Arbeiten untersuchte unsere Gruppe die Funktion von β -Catenin und γ -Catenin anhand von Überexpressionmodellen und stabilisierten Mutanten beider Proteine. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *Armadillo-like Proteins* β - und γ -Catenin distinkte Funktionen aufweisen^{26,91}. Für β -Catenin, und vor allem seine durch Mutation der Phosphorylierungsstellen stabilisierten Mutanten, werden übereinstimmend onkogene Funktionen berichtet^{20,91}.

Der Einfluss von γ -Catenin konnte bisher nicht geklärt werden. So werden für γ -Catenin sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften diskutiert. Kolligs und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression von γ -Catenin zu neoplastischen Transformation und Matrix-unabhängigem Wachstum von Zellen der epithelialen Linie RK3E führt²⁶. Dagegen zeigten *in vivo* Untersuchungen von primären und bereits metastasierten kolorektalen Tumoren keine Erhöhung der nukleären γ -Cateninspiegel¹¹⁴. In einer prognostischen Studie konnte kein Zusammenhang zwischen γ -Catenin und verschlechterter Prognose hergestellt werden¹¹⁵.

Aktuell konnte sich die Verwendung von siRNA zur posttranskriptionellen Senkung der Proteinexpression weitgehend zur Untersuchung von Genfunktionen durchsetzen. Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von RNA Interferenz-basierten *Knockdown* Systemen sowohl für β - als auch für γ -Catenin. Wir konnten sowohl für β -Catenin als auch γ -Catenin siRNA-Sequenzen etablieren und darauf aufbauend erste funktionelle Untersuchungen im Hinblick auf die noch ausstehende Untersuchung der distinkten Funktionen beider Proteine vornehmen.

4.1.1 ETABLIERUNG VON β - UND γ -CATENIN siRNA

Im transienten System konnten wir mittels siRNA in drei verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien, DLD-1, SW-480 und HT-29, die Proteinspiegel von β -Catenin senken. Dazu wurden fünf voneinander unabhängige siRNA-Sequenzen verwendet (β_{amb} und β_{I-IV}). Dabei stellten wir fest, dass sich die Effizienzen der verwendeten siRNA bei der Senkung der Proteinspiegel deutlich voneinander unterscheiden. Die mit Hilfe von spezieller Software selbst abgeleitete Sequenz (β_{amb}) war den kommerziellen Sequenzen (β_{I-IV}) bei der Senkung der Proteinspiegel deutlich unterlegen. Bei den kommerziellen Sequenzen handelt es sich um *ON-TARGET* modifizierte siRNA. Diese chemische Modifikation führt im Vergleich zum 3' Ende zu verringerter thermodynamischer Stabilität der siRNA am 5' Ende des *antisense* Stranges und damit zur selektiven Inkorporation des zur mRNA komplementären *antisense* Stranges in den RISC-Komplex^{108,116}. Damit gehen sowohl erhöhte Selektivität und Effizienz als auch Senkung der Nebenwirkungen durch siRNA-Transfektion einher¹¹⁷. Alle vier kommerziellen Sequenzen (β_{I-IV}) zeigten deutlich höhere Effizienzen bei der Senkung der β -Catenin Proteinspiegel im Western Blot.

Untersuchung von Zelltod, Zellproliferation und transkriptioneller Aktivität nach Senkung der β -Catenin Proteinspiegel durch siRNA

Die durch Reexpression von APC vermittelte Senkung von β -Catenin in APC-defizienten Tumorzellen wurde mehrfach mit der Induktion von Apoptose in Zusammenhang gebracht^{118,119}. Untersuchungen der DNS-Fragmentierung mittels PI-Färbung am FACS nach siRNA-vermittelter Senkung von β -Catenin zeigten bei keiner der verwendeten siRNA-Sequenzen (β_{amb} und β_{I-IV}) eine Erhöhung der DNS-Fragmentierung durch Senkung der β -Cateninspiegel. Konsens finden unsere Daten mit Wetering und Kollegen, die zeigten, dass durch die Expression von dnTCF4 vermittelte Hemmung β -Catenin-abhängiger Transkription keine Apoptose in Ls147T und DLD-1 ausgelöst wird¹²⁰.

Es ist bekannt, dass die Überexpression von β -Catenin zu vermehrter Proliferation und Tumorentwicklung führt¹²¹⁻¹²³. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass die zu verminderter Transkription β -Catenin-abhängiger Zielgene führende Expression von dnTCF4 in der Lage ist, die Proliferation von Ls147T und DLD-1 zu hemmen¹²⁰. Im MTT-Assay konnten wir zeigen, dass die Senkung der β -Catenin Proteinspiegel durch siRNA (β_{amb}) zu deutlich verminderter Proliferation der kolorektalen Karzinomzellen DLD-1 als auch SW-480 führte. Die Interpretation der verringerten Absorption im MTT-Assay als Verringerung der Proliferation ergibt sich dabei aus der Kombination mit zuvor erwähnten FACS-Daten, die keine Verringerung der Zellviabilität nach β -Catenin siRNA Transfektion zeigten. Verma und Kollegen konnten für SW-480 und HCT-116 eine geringe Senkung der Proliferation *in vitro* zeigen¹⁰⁶.

Erste funktionelle Untersuchungen im Hinblick auf die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin konnten die bereits in Überexpressionssystemen gesammelten Daten bestätigen. So wurde in der Literatur gezeigt, dass durch Überexpression von β -Catenin und insbesondere der stabilisierten Mutante S33Y β -Catenin die Aktivität des TOPflash-Reporters deutlich gesteigert wird²⁶. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass durch Senkung der β -Catenin Proteinspiegel die Aktivität dieses Reporters gesenkt werden kann.

Bestätigung siRNA vermittelter RNA Interferenz für β -Catenin

Für Blasenkarzinome konnte gezeigt werden, dass der Verlust von γ -Catenin in späten Stadien der Karzinogenese einen entscheidenden Schritt für das Fortschreiten der Erkrankung darstellt und mit verschlechterter Prognose einhergeht^{124,125}. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass die siRNA vermittelte Senkung der γ -Cateninspiegel mit erhöhter Migration und Invasivität der Tumoren einhergeht¹²⁴. Auch konnte gezeigt werden, dass durch Reexpression von γ -Catenin in Nierenzelltumoren deren Aggressivität gesenkt wird²⁹. Dagegen konnten durch Kolligs und Kollegen in RK3E (*Rat Kidney Endothelial Cells*) für γ -Catenin onkogenen Eigenschaften beschrieben werden²⁶. Sie zeigten, dass die Expression von γ -Catenin zu neoplastischer Transformation und Matrix-unabhängigem Wachstum dieser Zellen führte²⁶.

Sequenzspezifische Auslösung von Zelltod nach Senkung der γ -Catenin Proteinspiegel durch siRNA

Um den Einfluss gesenkter γ -Cateninspiegel auf kolorektale Tumorzellen untersuchen zu können etablierten wir fünf voneinander unabhängige siRNA-Sequenzen, die allerdings ein deutlich inhomogeneres Bild als die β -Catenin siRNA erzeugten. Drei der verwendeten Sequenzen (γ_{1-3}) sind in Analogie zur Sequenz β_{amb} mit Hilfe spezieller Software selbst abgeleitet worden und führten zu untereinander vergleichbarer Senkung des γ -Catenin Proteins, wobei die Sequenz γ_3 zur stärksten Verminderung der Proteinspiegel führte.

In der Literatur wurde gezeigt, dass die Expression von γ -Catenin in der γ -Catenin defizienten Linie SCC9 in Klonen mit hoher Expressionrate zu erhöhter Proliferation führt, während Klone mit nur geringer Expressionsrate verringertes Wachstum aufwiesen¹²⁶. Des Weiteren stellten die Autoren in Klonen mit hoher γ -Cateninexpression erhöhte Spiegel des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 und verminderte Apoptose fest¹²⁶. Wir untersuchten den Einfluss der Senkung von γ -Catenin durch siRNA auf die Viabilität der Zellen. Die Transfektion von γ_3 löste in den untersuchten Linien DLD-1, SW-480 und HT-29 DNS-Fragmentierung aus. In DLD-1 wurde durch Transfektion der Sequenz γ_1 ebenfalls in hohem Maße DNS-Fragmentierung ausgelöst, während durch γ_1 die Integrität der DNS von SW-480 nicht beeinflusst wurde. Dagegen löste bei deutlich effizienterer Senkung des γ -Catenin Proteins keine der kommerziell entwickelten und *ON-TARGET*-modifizierten siRNAs (jup I/II), DNS-

Fragmentierung aus. Der vermehrt auftretende Zelltod nach Transfektion der Sequenzen γ_1 und γ_3 ist daher auf unspezifische Effekte durch Stabilitätsprobleme innerhalb des siRNA-Duplex oder die Aktivierung des Immunsystems durch bestimmte Basenfolgen zurückzuführen. Unsere Daten zeigen keinen Zusammenhang zwischen der Senkung der γ -Catenin Proteinspiegel und dem Auslösen von Zelltod.

Hier verdeutlicht sich ein Problem der Nutzung von siRNA. Der von der Proteinsenkung abgekoppelte Einfluss von siRNA auf die Vitalität von Zellen wird sequenzspezifischen Interaktionen, auch kurzer Oligonukleotide, mit *Toll-like* (TLR) Rezeptoren zugeschrieben. Die unspezifische Interaktion zwischen TLR und langer doppelsträngiger (ds) RNA war bekannt, während man davon ausging, dass siRNA nicht von TLR erkannt werden¹²⁷. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Basenfolgen (*pattern*) in siRNA-Sequenzen von TLR erkannt werden und somit die Transfektion als auch die *in vivo* Applikation dieser Sequenzen zur Ausschüttung von Interleukinen führt^{93,128-131}. Auch die Inkorporation des *sense* anstatt des *antisense* Stranges in den RISC-Komplex kann zu toxischen Effekten führen¹¹⁷. Es kann vermutet werden, dass der durch die Sequenz γ_3 hervorgerufene Zelltod in DLD-1, SW-480 und HT-29 auf eine dieser Interaktionen zurückgeführt werden kann.

Im MTT-Assay untersuchten wir näherungsweise die Zellzahl von SW-480 und DLD-1 nach Transfektion mit γ_3 -siRNA. Die dabei gemessenen verringerten Absorptionswerte können vor allem im Hinblick auf die FACS-Daten im Zusammenhang mit der Sequenz γ_3 nur als Anzeichen von Zelltod interpretiert werden. Berücksichtigt man die Problematik, dass die Fragmentierung spezifisch durch die siRNA Sequenz γ_3 ausgelöst wird, kann aus diese Daten bezüglich der Funktion des γ -Catenin Proteins im Hinblick auf Zellwachstum keine Aussage getroffen werden.

Untersuchung der pTOPflash Aktivität nach Senkung der γ -Catenin Proteinspiegel durch siRNA

Wir konnten zeigen, dass die Aktivierung des TCF-abhängigen Reporters pTOPflash durch die Senkung der γ -Cateninspiegel mittels siRNA (γ_3) in DLD-1 und SW-480 nicht beeinflusst wird. Diese Daten können als konform mit bereits in Überexpressionssystemen erhobenen Daten angesehen werden. So zeigten sowohl Caca als auch Williams in HEK293 Zellen, dass die Überexpression von γ -Catenin nur zu mäßiger Erhöhung der TOPflash-Aktivität führte^{20,27}. Im Gegensatz zu HEK293 weisen die von uns verwendeten kolorektalen Karzinomzellen DLD-1 und SW-480 aufgrund von APC Mutationen stetig erhöhte β -Catenin Proteinspiegel auf. Maeda und Kollegen konnten in der β -Catenin defizienten Linie NCI-H28 durch siRNA vermitteltes *Silencing* von γ -Catenin die Aktivität des sTCF-Reporters pGL3-OT minimal senken³³. Da diese Daten mit einem weiteren TCF-abhängigen Reportersystem und einer anderen siRNA-Sequenz erhoben wurden, kann davon ausgegangen werden, dass TCF-abhängige Transkription durch die Senkung von γ -Catenin nicht beeinflusst wird.

Etablierung der Kontroll siRNA-Sequenz

Die *scrambled* siRNA β_{mut} zeigte sowohl leichte Senkungen der β -Catenin Proteinspiegel als auch der Aktivität des pTOPflash Reporters. Des Weiteren führte die Transfektion dieser Sequenz zur Senkung der Gesamt-mRNA Spiegel (nicht gezeigt) und stellte somit im Hinblick auf die Analyse des Transkriptoms nach Senkung der β -Cateninspiegel keine geeignete Kontrolle dar. Die siRNA gegen GFP führte zur verstärkten Fragmentierung der DNS und vermindertem Zellwachstum (nicht gezeigt). Als geeignete Kontroll-Sequenz konnten wir eine siRNA Sequenz gegen β -Galaktosidase (β -gal) etablieren, die zum einen keinen Einfluss auf die untersuchten Proteine nahm und zum anderen die Vitalität der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht beeinflusste. Auch wurden weder die Gesamt mRNA-Spiegel (Daten nicht gezeigt) noch die mRNA-Spiegel von β - und γ -Catenin beeinflusst. Aus der Literatur, dort als β -gal 924 publiziert, ist bekannt, dass diese Sequenz selbst in hohen Dosen weder *in vitro* noch *in vivo* zu erhöhter Ausschüttung von Interleukinen führt⁹³. Sie stellt somit eine ideale Kontroll-siRNA für weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen dar.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit siRNA Sequenzen sowohl gegen β -Catenin als auch γ -Catenin etabliert werden, die hohe Effizienz, geringe Toxizität und hohe Spezifität miteinander vereinen und somit eine gute Plattform für die Untersuchung β - und γ -Catenin vermittelter Effekte in transienten Systemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* darstellen. Weiterführende Untersuchungen des Einflusses der Senkung der γ -Catenin (*Junction Plakoglobin*) Proteinspiegel sollen in nachfolgenden Untersuchungen mit den nach dem heutigen Wissensstand optimierten siRNA Sequenzen *jup I* und *jup II* durchgeführt werden.

4.2 STABIL INDUZIERBARE shRNA IN SW-480

Die Verwendung transienter siRNA Systeme ist durch den enzymatischen Abbau der siRNA auf die für ca. 1 Woche anhaltende Senkung der Proteinspiegel und durch die technisch schwierige Ausführung einiger Assays limitiert. Zudem liegen shRNA als Substrate des Enzyms DICER in natürlicher durch DICER prozessierter Form vor und sollen daher höhere Effizienzen aufweisen^{132,133}. Neben den hohen Kosten, insbesondere bei Ansätzen, die hohe Zellzahlen erfordern, unterliegt die Senkung der Proteinspiegel in transienten Systemen durch nicht konstante Transfektionseffizienzen auch erheblichen Schwankungen. Die Entwicklung induzierbarer shRNA Expressionssysteme vereint die Vorteile stabiler Klone, das heißt die dauerhafte Verfügbarkeit der Information in der Zelle, ohne dabei durch die stetige Senkung, insbesondere lebensnotwendiger Proteine, Selektionsnachteile oder Artefaktbildung zu vermitteln¹⁰². Die stabile Integration induzierbarer shRNA gegen β -Catenin stellt somit eine interessante Plattform für weiterführende Untersuchungen β -Catenin-vermittelter Funktionen als auch der Validierung von Zielgenen dar.

Den ersten Schritt bei der Etablierung des von uns verwendeten Systems stellt die stabile Integration eines konstitutiv aktiven TET-Repressor Plasmids (TR) dar. Die Expression des TET-Repressor Proteins (TR) untersuchten wir mit Hilfe eines Reportergen Konstrukts, das in Verbindung mit TET-Repressor Proteinen Luziferase Doxycyclin-abhängig exprimiert. Dabei stellten wir fest, dass in den aus HT-29 generierten Klonen HT-29TR die Expression des Reportergen lediglich um das maximal 6-fache gesteigert werden konnte, während in SW-480TR der Reporter um ca. Faktor 100 induzierbar exprimiert wurde. Im Hinblick auf mögliche Hintergrundaktivität der HT-29TR Zellen entschlossen wir uns in SW-480TR das induzierbare β -Catenin shRNA Konstrukt stabil zu integrieren.

Die für die Transkription verantwortliche DNA-abhängige RNase Polymerase III wird durch Poly-T-Sequenzen terminiert. Dementsprechend stellt das Fehlen von Basenfolgen, die zu TTTTT-Sequenzen führen ein entscheidendes Auswahlkriterium dar. Die ausgewählten Sequenzen β_I und β_{IV} wurden in pSUPERIOR.neo.gfp kloniert und im transienten System mittels des TCF- β -Catenin abhängigen Luziferase Reporters pTOPflash getestet. In vorangegangenen siRNA Experimenten konnten wir bereits zeigen, dass dieser Reporter sehr sensitiv auf die Senkung der β -Cateninspiegel reagiert. Das shRNA-Konstrukt β_I nicht aber β_{IV} konnte im transienten System die Expression des Luziferase Reportergen hemmen. Aus der Literatur ist bekannt, dass neben der *Loop* Sequenz auch die Orientierung der siRNA innerhalb der *hairpins* Einfluss auf die Effektivität nimmt (Abbildung 3.12)^{101,111}. Diese Beobachtung konnten wir bestätigen. So war das Konstrukt β_{IV_rev} in der Lage, die Aktivität des pTOPflash Reportes zu senken. Mit Hilfe der funktionalen Konstrukte β_I und β_{IV_rev} wurden Einzelzellklone etabliert.

Nachfolgend wurden die Klone mittels Western Blot analysiert. Sowohl durch Stimulierung der β_I als auch β_{IV_rev} Klone mit Doxycyclin konnte die Expression von β -Catenin nahezu komplett aufgehoben werden und übertraf damit deutlich bereits publizierte Systeme¹⁰². Interessanterweise zeigte trotz der Abwesenheit von β -Catenin nach Doxycyclinstimulation kein β_I Klon verringerte pTOPflash Aktivität. Das ist um so erstaunlicher, als dass Wetering und Kollegen bei geringerer bis fast nicht wahrnehmbarer Senkung der β -Catenin Proteinspiegel die Aktivität des pTOPflash Reporters senken konnten¹⁰². Verwunderlicherweise senkte das Konstrukt β_I sowohl im transienten System als auch in der stabil integrierten Form in einer polyklonalen Linie die pTOPflash Aktivität jeweils um ca. 50%. Eine sinnvolle Erklärung für diese Beobachtung kann nicht gegeben werden.

Untersuchungen an β_{IV_rev} Klonen zeigten, dass nach Stimulation mit Doxycyclin die β -Catenin Proteinspiegel schon nach 24h deutlich gesenkt werden konnten, nach 36h die maximale Senkung erreicht wurde, und dass die Senkung nach einmaliger Stimulation für mindestens 72h unverändert anhält. Des Weiteren konnten wir im MTT-Assay zeigen, dass auch im stabil induzierbaren System die Senkung der β -Catenin Spiegel zu der im transienten System bereits diskutierten und im Ausmaß vergleichbaren Senkung der Proliferation führte. Wie auch schon im transienten System beobachtet, wurde die Vitalität der Zellen durch die Senkung von β -Catenin nicht beeinflusst. So kam es weder im transienten System durch die Transfektion von siRNA noch durch Expression der korrespondierenden shRNA im stabil induzierbaren System zu verstärkter DNS-Fragmentierung, die wir mittels FACS bestimmen konnten. Schlussfolgernd führt die Senkung der β -Catenin Spiegel wie bereits diskutiert nicht zum Auslösen von Zelltod.

Mit der Etablierung des in SW-480 Zellen stabil integrierten und induzierbaren shRNA Expressionssystem gegen β -Catenin, konnte eine Voraussetzung für die Untersuchung lang anhaltender Effekte der β -Catenin Senkung geschaffen werden. So ist es anhand dieser Zellen *in vitro* möglich, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse seitens der Proteinsenkung besser abzusichern und langwierige Experimente, wie z.B. die Untersuchungen der Koloniebildung oder Matrix-unabhängigen Wachstums von einmaligen Effekten, d.h. einer transienten Proteinsenkung, abzukoppeln, um dauerhafte β -Catenin vermittelte Effekte zu analysieren. Auch ist dieses System in der Lage *in vivo* angewandt zu werden. Dabei sprechen sowohl ethische Gesichtspunkte als auch der Aspekt der Kostenersparnis für die Anwendung stabil induzierbarer Systeme. Anders als bei der Anwendung von siRNA, die mehrmals wöchentlich mittels hydrodynamischer Injektion, d.h. in nahezu unphysiologischen Volumina, appliziert werden, wird die Expression der shRNA durch Zugabe von Doxycyclin in das Trinkwasser induziert^{106,108,134}. Des Weiteren kann die Migration der applizierten Tumorzellen sehr einfach mit Hilfe des in den Zellen konstitutiv exprimierten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) verfolgt werden.

4.3 POTENTIELLE β -CATENIN ZIELGENE

Hinsichtlich der Untersuchung von autoregulatorischen Elementen des Wnt-Signalwegs interessierten wir uns für durch β -Catenin regulierte Zielgene, die gleichzeitig Mitglieder des Wnt-Signalwegs darstellen. Durch siRNA vermittelte Senkung der β -Catenin Proteinspiegel in SW-480 Zellen und nachfolgende Analyse des Transkriptom konnten wir für sechs prominente Mitglieder des Wnt-Signalwegs zeigen, dass diese als mögliche Zielgene von β -Catenin in Frage kommen. Neben den als Wnt-Antagonisten fungierenden Mitgliedern der DKK-Familie DKK1 und DKK4 konnte auch Kremen2, das neben den LRP-Rezeptoren den Interaktionspartner für die DKK-Proteine darstellt, identifiziert werden. Die transmembranären Kremen Proteine stellen hochaffine DKK-Rezeptoren dar, welche die Bindung der DKK-Proteine an LRP und die nachfolgende Endozytose der LRP-Rezeptoren vermitteln^{15,61,65}. Die Regulierung der Kremen2 Expression durch β -Catenin ist bislang noch nicht beschrieben worden¹³⁵.

Im Rahmen einer Microarray Analyse konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von S33Y β -Catenin in HEK293 Zellen zu erhöhten DKK1 mRNA- und Proteinspiegeln führt¹¹². Auch konnte anhand von DKK1 Reporter-gen Konstrukten dargestellt werden, dass die Transkription von DKK1 neben der Expression von β -Catenin auch von der durch LiCl vermittelten GSK3 β Inhibierung, die zur Hemmung des Abbaus von β -Catenin führt, aktiviert werden kann⁶⁸.

Für das zytosolische Protein Dapper (DACT1) wurde bisweilen keine Autoregulation im Rahmen des Wnt-Signalwegs berichtet. Dapper (DACT1) stellt das humane Homolog zu *Xenopus* Dapper und Frodo dar¹³⁶. Dapper inhibiert den Wnt-Signalweg, indem es den Abbau von Dishevelled fördert¹³⁷. Dishevelled rekrutiert Wnt-vermittelt Axin an die Zellmembran und fördert dadurch sowohl den Abbau von Axin als auch die zum Zusammenbruchs des *Deconstruction Complex* führende Rekrutierung der an diesem Komplex beteiligten Proteine an die Membran (1.3.3.2)^{40,42}.

Mangels eigenständiger DNS-Bindedomäne ist β -Catenin auf das HMG-Box-Protein TCF4 angewiesen, um an die DNS binden und die Transkription seiner Zielgene aktivieren zu können. Die Phosphokinase Nemo/NLK (*Nemo Like Kinase*) wird über nicht-kanonische Wnt-Signalwege aktiviert und beeinflusst die DNS-Bindefähigkeit von TCF4¹⁷. Nemo verbindet den kanonischen Wnt-Signalweg mit einer Vielzahl weiterer Signalwege und konnte in *Drosophila* bereits als durch Wnt autoreguliertes Gen beschrieben werden^{17,138,139}. Die Aktivierung von Nemo führt zur Phosphorylierung von TCF4, die in der Senkung der DNS-Bindeaktivität resultiert und in der Folge mit verringerter β -Catenin-vermittelter Transkription einhergeht¹⁴⁰.

Im Sinne eines positiven *Feedback Mechanismus* konnte einzig Wnt6 identifiziert werden. Wnt6 gehört zur Subfamilie der Wnt-Proteine, die nicht in dem von uns untersuchten kanonischen Wnt-Signalweg vermitteln¹⁰⁴. Es ist bekannt, dass auch nicht-kanonische Wnt-Signalwege an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind bzw. in Tumoren überexprimiert werden¹⁴¹.

4.3.1 DICKKOPF4 ALS NEUES β -CATENIN ZIELGEN

Bestätigung der Microarray Daten

Um bei der Evaluierung von DKK4 als neues β -Catenin Zielgen siRNA-Sequenz abhängige Effekte ausschließen zu können, wurde die DKK4 mRNA Expression mittels RT-PCR nach Senkung der β -Catenin Proteinspiegel durch vier unabhängige siRNA (β_{I-IV}) in SW-480 bestimmt. Dabei konnten wir zeigen, dass die Senkung der β -Catenin Proteinspiegel unabhängig der verwendeten siRNA Sequenz zu einheitlicher Senkung der DKK4 mRNA Spiegel führte. Durch Überexpression von S33Y β -Catenin in HEK293 war es möglich, die Korrelation von β -Catenin und DKK4 Expression auch im umgekehrten Fall darzustellen. So stiegen S33Y β -Catenin Protein- und DKK4 mRNA-Spiegel parallel zueinander an. In Bezug auf DKK1 konnten vergleichbare Parallelen zwischen DKK1 und S33Y β -Catenin mittels Western Blot Analyse beider Proteine bereits gezogen werden⁶⁸.

Analyse des DKK4-Promoters

Untersuchungen des DKK1-Promoters mittels Reportergen Konstrukten in HEK293 Zellen zeigten, dass mit zunehmender Länge der untersuchten Promoter-Fragmente die Aktivierbarkeit des Reporters durch VP-16-TCF zunahm⁶⁸. VP-16-TCF4 vereint die starke synthetische Transaktivierungsdomäne VP-16 mit der DNS-Bindedomäne von TCF4 und führt zu fulminanter Aktivierung β -Catenin-abhängiger Promotoren¹⁴².

Wir untersuchten die Aktivierung des humanen DKK4-Promoters ebenfalls vorerst in HEK293. Basierend auf der *in silico* Analyse der im DKK4-Promoter enthaltenen TCF-Bindestellen wurden Promoterfragmente mit aufsteigender Länge für die Etablierung verschiedener DKK4-Reportergen Konstrukte in das Luziferase Reportergen Konstrukt pGL3basic kloniert. Anhand dieser Konstrukte konnten wir zeigen, dass in Analogie zu für DKK1 bereits gezeigten Daten sich die Aktivierbarkeit der Konstrukte mit steigender Länge der zugrunde liegenden Promoterfragmente erhöhte⁶⁸. Im Gegensatz zu González-Sancho und Kollegen nutzten wir zur Aktivierung der β -Catenin abhängigen Transkription nicht das Fusionsprotein VP-16-TCF4, sondern blieben durch die Koexpression von S33Y β -Catenin und TCF4 näher am physiologischen Modell.

Wir konnten zeigen, dass ein DKK4 Reporterkonstrukt ohne TCF-Bindestelle gar nicht aktiviert werden konnte und dass, in Analogie zu den für DKK1 bereits gezeigten Daten, ab einer gewissen Länge, im Fall von DKK4 ab der siebenten TCF-Seite, des untersuchten Promoterfragments ein Plateau bei der Aktivierbarkeit erreicht wurde⁶⁸. Beim Vergleich der Aktivierbarkeit der DKK4 Reportergeren Konstrukte mit acht bzw. sieben TCF-Bindestellen fiel auf, dass durch Verkürzung des untersuchten Promoterfragments mit acht TCF-Bindestellen die Aktivierbarkeit erst ab dem Auslassen der siebten TCF-Bindestelle sprunghaft abnahm. DKK4 Reportergeren Konstrukte, die weniger als vier TCF-Bindestellen umfassten, konnten durch Koexpression S33Y β -Catenin und TCF4 quasi nicht mehr aktiviert werden. Der siebenten TCF-Seite oberhalb des Start ATG innerhalb des DKK4 Promoters kann demnach eine große Bedeutung bei der β -Catenin vermittelten Aktivierung der DKK4 Transkription zugeschrieben werden. Zusammenfassend konnten wir darstellen, dass die β -Catenin/TCF4 vermittelte Aktivierung des DKK4 Promoters von der Präsenz der TCF-Bindestellen vier bis sieben abhängig ist.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte mittels Microarray Analyse primärer muriner Haarfollikelzellen die Wnt-abhängige Expression von DKK4 gezeigt werden¹⁴³. Des Weiteren untersuchten die Autoren den murinen DKK4-Promoter mittels DKK4 Reportergeren Konstrukten, welche auf Promoterfragmenten bis 2.5 kb oberhalb des Translationsstartpunkts basierten und stellten ebenfalls fest, dass die Aktivität der Reporterkonstrukte mit absteigender Länge der zugrundeliegenden Promoterfragmente stetig fällt¹⁴³. Sie schlussfolgerten, dass die Präsenz bestimmter TCF/LEF-Bindestellen eine essentielle Voraussetzung für die Aktivierbarkeit des Promoters durch den kanonischen Wnt-Signalweg darstellt¹⁴³.

Der Einfluss von β -Catenin, γ -Catenin und TCF4 auf die Aktivierung des DKK4-Promoters

In Abwesenheit von β -Catenin agiert das HMG-Box Protein TCF4 als Repressor β -Catenin abhängiger Transkription⁵². β -Catenin hingegen benötigt TCF4, um an die DNS binden zu können. Wir konnten in HEK293 Zellen zeigen, dass die Überexpression von TCF4 keinen Einfluss auf die Aktivierung der untersuchten DKK4-Reportergeren Konstrukte zeigte, während die Überexpression von S33Y β -Catenin zu erhöhter Expression des Reportergerens führte. Die Aktivierung der Reporter durch Überexpression von S33Y β -Catenin ist dabei auf die „Nutzung“ der physiologisch in HEK293 vorliegenden Menge an TCF4 zurückzuführen. Durch Koexpression von S33Y β -Catenin und TCF4 konnten die Reporterkonstrukte deutlich überadditiv aktiviert werden. Die stärkste Aktivierung der DKK4 Reportergeren wurde durch die Expression des Fusionsproteins VP-16-TCF4 erreicht. Bisher liegen zu keinem DKK-Promoter vergleichbare Daten vor. So wurde zur Aktivierung TCF-abhängiger Transkription in HEK293 in den vorliegenden Studien entweder S33Y β -Catenin oder das Fusionsprotein VP-16-TCF4 exprimiert^{68,112}. Der Bedeutung von TCF4 wurde in diesem Kontext bisweilen keine Aufmerksamkeit zu Teil.

Vergleichbar mit den auf Basis des pTOPflash Reporters bereits erhobenen Daten zeigten wir anhand eines DKK4 Reporter-gen Konstrukt in HEK293 Zellen, dass die Expression von S33Y β -Catenin in Analogie zu pTOPflash zur stärksten Aktivierung des DKK4 Promoters, gefolgt von Δ n47 β -Catenin und wild-Typ β -Catenin, führte⁹¹. Wie bereits anhand von S33Y β -Catenin gezeigt, konnte durch Koexpression von TCF4 die Aktivierung des DKK4 Reporters überadditiv gesteigert werden.

Kolligs und Kollegen konnten zeigen, dass der vollsynthetische pTOPflash Reporter sowohl durch die Expression von wild-Typ γ -Catenin als auch der Mutante Δ n38 γ -Catenin in HEK293 Zellen aktiviert werden kann²⁶. Anders als im Fall von β -Catenin konnte für γ -Catenin keine Übereinstimmung zwischen den mit pTOPflash und den mit DKK4 Reportern erhobenen Daten festgestellt werden. So wurde der DKK4 Reporter weder durch die Expression von wild-Typ γ -Catenin, noch durch die Koexpression von mit TCF4 in HEK293 aktiviert. Auch die Expression der γ -Catenin Mutante Δ n38 γ -Catenin führte ebenfalls nicht zur Aktivierung des DKK4 Reporters. Lediglich die Koexpression von Δ n38 γ -Catenin mit TCF4 war in der Lage, den DKK4 Reporter zu aktivieren.

Schlussfolgernd zeigt der Vergleich beider Catenine, dass die transkriptionelle Aktivität des DKK4 Promoters durch die Expression von β -Catenin und insbesondere der Mutante S33Y β -Catenin am stärksten aktiviert werden konnte. Wir zeigten außerdem, dass die Koexpression von TCF4 die Aktivierung überadditiv steigert und schlussfolgern, dass die Transkription von DKK4 durch einen aus β -Catenin und TCF4 bestehenden Komplex aktiviert wird.

Aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse untersuchten wir nachfolgend die Relevanz von TCF4 im Kontext deregulierten Wnt-*Signalings*. Dominant negatives (dn) TCF ist in der Lage an die DNS zu binden, bietet aber keine Interaktionsmöglichkeit für β -Catenin und kann somit als kompetitiver Inhibitor TCF-vermittelter Transkription betrachtet werden¹²⁰. Die kolorektale Karzinomzelllinie SW-480 weist aufgrund einer APC Mutation stetig erhöhte β -Catenin Proteinspiegel auf¹⁰⁹. Wir konnten in dieser Linie anhand von DKK4-Reporter-genen mit 6 bzw. 7 TCF4-Bindestellen darstellen, dass die Expression von dnTCF4 zur dosisabhängigen Senkung der transkriptionellen Aktivität der untersuchten DKK4 Reporter-gene führte. Wir zeigten somit auch in einem Wnt-deregulierten System die Relevanz von TCF4 für die Aktivierung des DKK4 Promoters.

Die Kinase GSK3 β vermittelt die Phosphorylierung von β -Catenin und nimmt dadurch im Wnt-Signalweg eine zentrale Rolle ein. (1.3.3.1). Gonzáles-Sancho und Kollegen zeigten mittels Western Blot in HeLa Zellen, dass die zur Inhibition von GSK3 β führende Gabe von LiCl die Expression von DKK1 Protein induziert⁶⁸. Wir untersuchten in HeLa Zellen anhand von DKK4 Reporter-gen Konstrukt mit 6 bzw. 7 TCF4-Bindestellen den Einfluss LiCl-vermittelter GSK3 β Inhibierung auf die Aktivität des DKK4 Promoters.

Es konnte für beide Konstrukte gleichermaßen gezeigt werden, dass die Gabe von LiCl zur konzentrationsabhängigen Aktivierung des DKK4 Promoters führt.

Zusammenfassend konnten die durch *Microarray* Analyse erhobene Daten bezüglich der Regulation von DKK4 durch β -Catenin mittels RT-PCR bestätigt werden. Wir zeigten außerdem, dass die Transkription von DKK4 durch das Zusammenspiel von β -Catenin und TCF4 aktiviert wird und DKK4 somit ein Zielgen von β -Catenin darstellt.

Beeinflussung Wnt3a vermittelter Aktivierung des pTOPflash Reporters durch rekombinantes DKK4

Der Einfluss von DKK Proteinen auf die Aktivität des pTOPflash Reporters wurde bisher nur in Zellen mit nicht dereguliertem Wnt-Signalweg untersucht. Sowohl in 293 als auch in HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass die endogene Expression von DKK1 die Aktivität des pTOPflash Reporters nicht verändert^{63,68}. Wir untersuchten erstmals in Zellen mit konstitutiv aktivem *Wnt-Signaling* den Einfluss von rekombinantem DKK4 Protein auf die Aktivität des pTOPflash Reporters. Dabei stellten wir fest, dass die Stimulation der kolorektalen Karzinomzelllinie SW-480 mit rekombinantem DKK4 Protein ebenfalls zu keiner Änderung der pTOPflash Aktivität führte.

González und Kollegen zeigten in 293 Zellen, dass die durch endogene Expression von Wnt1 vermittelte Aktivierung des pTOPflash Reporters durch Koexpression von DKK1 wieder aufgehoben werden kann⁶⁸. Die Expression von DKK1 in HeLa Zellen zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität des pTOPflash Reporters⁶³. Diese Daten konnten wir für DKK4 anhand rekombinanten Proteins bestätigen. DKK Proteine induzieren über Kremen vermittelte Endozytose die Verringerung der LRP-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche^{61,65}. Zur Kinetik der DKK vermittelten Endozytose liegen bisher keine Daten vor. Wir konnten zeigen, dass durch Vorinkubation von HeLa Zellen mit rekombinantem DKK4 Protein die durch nachfolgende Gabe rekombinanten Wnt3a Proteins hervorgerufene Aktivierung des pTOPflash Reporters zeit- und dosisabhängig deutlich reduziert werden konnte. Dabei führte die Verlängerung der Vorinkubationszeit mit DKK4 zu deutlich stärkerem Rückgang der pTOPflash Aktivität als der Einsatz höherer Proteinkonzentrationen.

Zusammengefasst kann durch den Einsatz rekombinanten DKK4 Proteins die Aktivierung von Wnt3a abhängigen Promotoren konzentrations- und vor allem zeitabhängig gesenkt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die Etablierung RNA Interferenz basierender Systeme zur Senkung der Proteinspiegel von β - und γ -Catenin und die darauf aufbauende Evaluierung potentieller β -Catenin Zielgene mittels Microarray Technologie. Der Schwerpunkt sollte dabei auf die Untersuchung von im Wnt-Signalweg beteiligten Genen gelegt werden.

Wir konnten in den kolorektalen Karzinomzelllinien SW-480, DLD-1 und HT-29 mehrere voneinander unabhängige siRNA sowohl gegen β - als auch γ -Catenin etablieren. Dabei stand neben ausreichender Senkung der Protein- und mRNA-Spiegel auch die Vermeidung unerwünschter Effekte auf die Zellen im Mittelpunkt dieser Etablierungsarbeit.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten vier neue funktionale Zelllinien etabliert werden. Sowohl in HT-29 als auch in SW-480 konnte ein universell einsetzbarer TET-Repressor stabil integriert werden. Die Linien HT-29TR und SW-480TR können als Basis für induzierbare Expressionssysteme verwendet werden. Auf Grundlage der Linie SW-480TR konnten Zelllinien etabliert werden, die durch Doxycyclin vermittelte Induktion shRNA gegen β -Catenin exprimieren. Mittels dieser Linien können Effekte, die durch die Senkung der β -Catenin Proteinspiegel hervorgerufen werden, einfach, schnell und zuverlässig in einem breiten Spektrum an *in vitro* und *in vivo* Assays untersucht werden.

Im Rahmen einer *Microarray* Analyse des Transkriptoms von SW-480 Zellen nach RNA Interferenz basierter Senkung der β -Catenin Proteinspiegel wurde DKK4 als sehr stark reguliertes Gen auffällig. Mittels RT-PCR konnten wir bestätigen, dass die Expression von DKK4 direkt von den vorliegenden β -Catenin Proteinspiegeln abhängig ist. Basierend auf einer *in silico* Analyse des DKK4 Promoters wurden mit Hilfe von Reporter gen Konstrukten der für die Aktivierbarkeit durch β -Catenin verantwortliche Abschnitt des DKK4 Promoters bestimmt.

Wir konnten darstellen, dass die Aktivierung des DKK4 Promoters sowohl von der Präsenz von β -Catenin als auch von TCF4 abhängt. Die Expression von DKK4 bedingt die Gegenwart des aus TCF4 und β -Catenin bestehenden Transaktivierungskomplexes, der für die Aktivierung Wnt-abhängiger Transkription verantwortlich zeichnet. Gleichzeitig stellt der DKK4 Promoter durch die Präsenz von TCF-Bindestellen eine Zielstruktur für diesen Transaktivierungskomplex dar.

Unsere Daten belegen, dass DKK4 ein β -Catenin Zielgen darstellt. Wir konnten außerdem zeigen, dass die Aktivierung Wnt-abhängiger Transkription durch Gabe von rekombinantem DKK4 gehemmt werden kann. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit dargestellt werden, dass die Expression des Wnt-Antagonisten DKK4 in einen negativen *Feedback* Mechanismus, der durch β -Catenin autoreguliert wird, eingebunden ist.

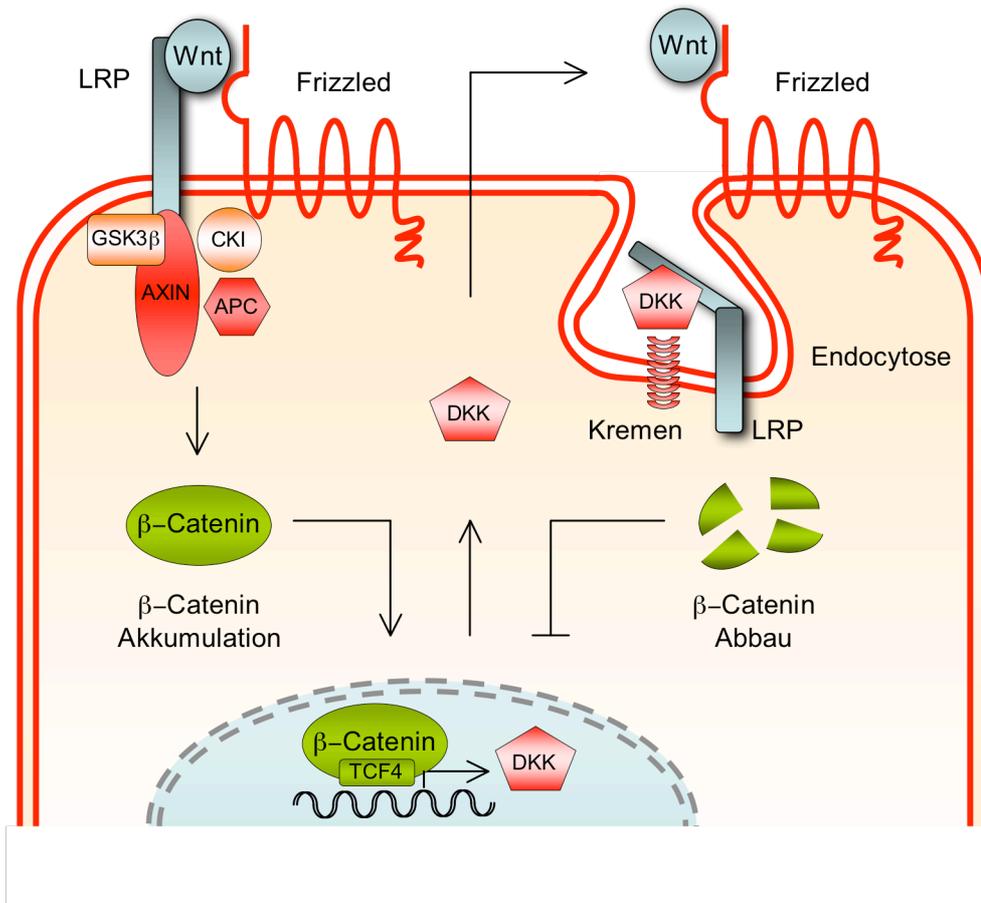


Abbildung 4.1 *DKK4 wird im Rahmen eines negativen Rückkopplungsmechanismus durch β -Catenin reguliert.*

Der vermutete *Feedback* Mechanismus stellt sich wie folgt dar. Wnt-Faktoren aktivieren die Transkription β -Catenin abhängiger Zielgene, darunter auch DKK4. DKK4 initiiert durch Bindung an LRP und Kremen den Abbau von β -Catenin und verhindert somit die weiterführende Transkription von Wnt- β -Catenin Zielgenen. DKK4 übernimmt als autokriner Inhibitor des Wnt-Signalwegs feinregulatorische Aufgaben, um bei möglicher Bedarfsdeckung β -Catenin abhängiger Gentranskription die weitere Aktivierung durch Wnt-Faktoren zu verhindern.

Für den Fall, dass DKK4 als parakriner Inhibitor agiert, wäre es denkbar, dass DKK4 von Zellen im unteren Teil der Krypte, die in hohem Maße durch Wnt-Faktoren aktiviert, werden sezerniert wird, um die darüber liegenden Zellen durch Abschirmung von weiteren Wnt-Signalen vor überschießender Expression Wnt- β -Catenin abhängiger Gene und Proliferation zu schützen und die Differenzierung dieser Zellen einzuleiten.

Die unkontrollierte Expression von Wnt- β -Catenin Zielgenen nimmt bei der Entstehung kolorektaler Karzinome eine entscheidende Schlüsselposition ein. Zur Etablierung neuer Diagnostik- und Therapieoptionen bedarf es daher auch der stetigen Erweiterung des Verständnisses des Wnt-Signalwegs. Diese Arbeit fügt ein weiteres Rädchen in die komplexe Mechanik dieses Signalwegs ein.

5 Anhang

5.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALP	Armadillo-like Protein
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AXN	Axin
BSA	Bovine Serum Albumin
BCL	B-Cell Lymphoma
cDNA	complementary DNA
Cer	Cerberus
CKI	Casein Kinase I
CRD	Cysteine Rich Ligand Sequestering Domain
DACT	Dapper Antagonist of β -Catenin, Homolog 1
DKK	Dickkopf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSH	Disheveled
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnTCF	dominant negatives TCF
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOX	Doxycyclin
dsRNA	doppelsträngige RNA
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FL-TCF4	Full length TCF4
FZ	Frizzled
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSK3 β	Glycogen Synthetase Kinase 3 β
HBSS	Hanks's Buffered Saline
HFS	Hypotonic Fluorochrome Solution
HMG	High Mobility Group
HSPG	Heparan Sulfated Forms of Proteoglycans
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LGS	Legless
LRP	Lipoprotein Related Receptor
mRNA	messenger RNA
NES	Nuclear Export Sequence
NLK	Nemo-Like Kinase
NLS	Nuclear Localization Sequence
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCP	Planar Cell Polarity (Pathway)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PYGO	Pygopus
RLU	Relative Luciferase Unit
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid
RNAi	RNA Interferenz
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFRP	Secreted Frizzled-Related Proteins
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween-20
TCF	T-Cell Factor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Receptor
β -Ttcp	β -Transducin-Repeat-Containing Protein?
Wg	Wingless
WIF	Wnt-Inhibitory Factor
Wls/Evi	Wntless/Evenness Interrupted
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family, member

5.2 FIRMENVERZEICHNIS

Agfa-Gevaert AG	München	Deutschland
Amersham Pharmacia Bioscience	Freiburg	Deutschland
Asics	Neuss	Deutschland
ATCC	Manassas	USA
BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
BD Labware	Heidelberg	Deutschland
Beckmann Instruments	München	Deutschland
BioRad Laboratories	München	Deutschland
Cell Signaling	Frankfurt/Main	Deutschland
Clontech	Heidelberg	Deutschland
Dharmacon	Lafayette	USA
Eppendorff	Hamburg	Deutschland
RZPD	Berlin	Deutschland
Gibco Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Invivogen	Toulouse	Frankreich
Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Millipore	Bedford	USA
PAA	Paschen	Österreich
Promega	Mannheim	Deutschland
Sigma-Aldrich	Taufkirchen	Deutschland
Metabion	Martinsried	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
Oligoengine	Seattle	USA
Qiagen	Hilden	Deutschland
Roche Roche Applied Science	Mannheim	Deutschland
Macherey-Nagel	Düren	Deutschland
Fermentas	St. Leon Roth	Deutschland
Corbett-Research	Sydney	Australia
Turner Designs	Sunnyvale	USA
SLT, jetzt Tecan	Grödig	Österreich

6 Referenzen

1. Boyle, P. & Langman, J.S. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *Bmj* **321**, 805-8 (2000).
2. Larsson, S.C., Bergkvist, L. & Wolk, A. Magnesium intake in relation to risk of colorectal cancer in women. *Jama* **293**, 86-9 (2005).
3. Miller, E.A. et al. Calcium, dietary, and lifestyle factors in the prevention of colorectal adenomas. *Cancer* **109**, 510-7 (2007).
4. Pufulete, M. et al. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology* **124**, 1240-8 (2003).
5. Haydon, A.M., Macinnis, R.J., English, D.R. & Giles, G.G. Effect of physical activity and body size on survival after diagnosis with colorectal cancer. *Gut* **55**, 62-7 (2006).
6. Slattery, M.L. et al. Physical activity and colorectal cancer. *Am J Epidemiol* **158**, 214-24 (2003).
7. Ahmed, R.L., Schmitz, K.H., Anderson, K.E., Rosamond, W.D. & Folsom, A.R. The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer* **107**, 28-36 (2006).
8. Willert, K. et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448-52 (2003).
9. Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C. & Eaton, S. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* **435**, 58-65 (2005).
10. Kadowaki, T., Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K. & Perrimon, N. The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev* **10**, 3116-28 (1996).
11. Bhanot, P. et al. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-30 (1996).
12. Boutros, M., Mihaly, J., Bouwmeester, T. & Mlodzik, M. Signaling specificity by Frizzled receptors in Drosophila. *Science* **288**, 1825-8 (2000).
13. Tamai, K. et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-5 (2000).
14. Hsieh, J.C. et al. Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell* **112**, 355-67 (2003).
15. Mao, B. et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-5 (2001).
16. Logan, C.Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810 (2004).
17. Ishitani, T. et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 131-9 (2003).
18. He, X. et al. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652-4 (1997).
19. Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Munemitsu, S. & Polakis, P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* **270**, 5549-55 (1995).
20. Williams, B.O., Barish, G.D., Klymkowsky, M.W. & Varmus, H.E. A comparative evaluation of beta-catenin and plakoglobin signaling activity. *Oncogene* **19**, 5720-8 (2000).
21. Barker, N. & Clevers, H. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays* **22**, 961-5 (2000).
22. Butz, S., Stappert, J., Weissig, H. & Kemler, R. Plakoglobin and beta-catenin: distinct but closely related. *Science* **257**, 1142-4 (1992).
23. Polakis, P.w. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 15-21 (1999).
24. Kodama, S., Ikeda, S., Asahara, T., Kishida, M. & Kikuchi, A. Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. *J Biol Chem* **274**, 27682-8 (1999).
25. Sadot, E. et al. Differential interaction of plakoglobin and beta-catenin with the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene* **19**, 1992-2001 (2000).
26. Kolligs, F.T. et al. gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev* **14**, 1319-31 (2000).
27. Caca, K. et al. Beta- and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer. *Cell Growth Differ* **10**, 369-76 (1999).
28. Aberle, H. et al. The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozygosity in breast and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6384-8 (1995).

29. Simcha, I., Geiger, B., Yehuda-Levenberg, S., Salomon, D. & Ben-Ze'ev, A. Suppression of tumorigenicity by plakoglobin: an augmenting effect of N-cadherin. *J Cell Biol* **133**, 199-209 (1996).
30. Zhurinsky, J., Shtutman, M. & Ben-Ze'ev, A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci* **113 (Pt 18)**, 3127-39 (2000).
31. Zhurinsky, J., Shtutman, M. & Ben-Ze'ev, A. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol* **20**, 4238-52 (2000).
32. Miravet, S. et al. The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *J Biol Chem* **277**, 1884-91 (2002).
33. Maeda, O. et al. Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene* **23**, 964-72 (2004).
34. Solanas, G. et al. beta-Catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. *J Biol Chem* **279**, 49849-56 (2004).
35. Kinzler, K.W. et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**, 661-5 (1991).
36. Kinzler, K.W. et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* **251**, 1366-70 (1991).
37. Rubinfeld, B. et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* **262**, 1731-4 (1993).
38. Staal, F.J. & Clevers, H.C. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* **5**, 21-30 (2005).
39. Krieghoff, E., Behrens, J. & Mayr, B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* **119**, 1453-63 (2006).
40. Tolwinski, N.S. & Wieschaus, E. Rethinking WNT signaling. *Trends Genet* **20**, 177-81 (2004).
41. Zeng, X. et al. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**, 873-7 (2005).
42. Itoh, K., Antipova, A., Ratcliffe, M.J. & Sokol, S. Interaction of dishevelled and Xenopus axin-related protein is required for wnt signal transduction. *Mol Cell Biol* **20**, 2228-38 (2000).
43. Lee, E., Salic, A., Kruger, R., Heinrich, R. & Kirschner, M.W. The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol* **1**, E10 (2003).
44. Davidson, G. et al. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**, 867-72 (2005).
45. Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R. & White, R.L. APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep* **1**, 519-23 (2000).
46. Rosin-Arbesfeld, R., Cliffe, A., Brabletz, T. & Bienz, M. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *Embo J* **22**, 1101-13 (2003).
47. Tolwinski, N.S. & Wieschaus, E. A nuclear escort for beta-catenin. *Nat Cell Biol* **6**, 579-80 (2004).
48. Henderson, B.R. & Fagotto, F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* **3**, 834-9 (2002).
49. Townsley, F.M., Cliffe, A. & Bienz, M. Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol* **6**, 626-33 (2004).
50. Cong, F. & Varmus, H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2882-7 (2004).
51. Salahshor, S. & Woodgett, J.R. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol* **58**, 225-36 (2005).
52. Cavallo, R.A. et al. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**, 604-8 (1998).
53. Thompson, B., Townsley, F., Rosin-Arbesfeld, R., Musisi, H. & Bienz, M. A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat Cell Biol* **4**, 367-73 (2002).
54. Kawano, Y. & Kypta, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-34 (2003).
55. Caldwell, G.M. et al. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **64**, 883-8 (2004).
56. Suzuki, H. et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* **36**, 417-22 (2004).
57. Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Diebold, J. & Hermeking, H. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* **65**, 4218-27 (2005).

58. Taniguchi, H. et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* **24**, 7946-52 (2005).
59. Krupnik, V.E. et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* **238**, 301-13 (1999).
60. Zorn, A.M. Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol* **11**, R592-5 (2001).
61. Mao, B. & Niehrs, C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* **302**, 179-83 (2003).
62. Ali, I. et al. Dickkopf homologs in squamous mucosa of esophagitis patients are overexpressed compared with Barrett's patients and healthy controls. *Am J Gastroenterol* **101**, 1437-48 (2006).
63. Mikheev, A.M., Mikheeva, S.A., Liu, B., Cohen, P. & Zarbl, H. A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis* **25**, 47-59 (2004).
64. Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A. & Aaronson, S.A. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* **3**, 683-6 (2001).
65. Mao, B. et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**, 664-7 (2002).
66. Semenov, M.V. et al. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* **11**, 951-61 (2001).
67. Wirths, O. et al. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* **83**, 429-34 (2003).
68. Gonzalez-Sancho, J.M. et al. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **24**, 1098-103 (2005).
69. Wang, J., Shou, J. & Chen, X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* **19**, 1843-8 (2000).
70. Li, L., Mao, J., Sun, L., Liu, W. & Wu, D. Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem* **277**, 5977-81 (2002).
71. Wu, W., Glinka, A., Delius, H. & Niehrs, C. Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr Biol* **10**, 1611-4 (2000).
72. Abarzua, F. et al. Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res* **65**, 9617-22 (2005).
73. Hoang, B.H. et al. Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res* **64**, 2734-9 (2004).
74. Hsieh, S.Y., Hsieh, P.S., Chiu, C.T. & Chen, W.Y. Dickkopf-3/REIC functions as a suppressor gene of tumor growth. *Oncogene* **23**, 9183-9 (2004).
75. Kawano, Y. et al. Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* **25**, 6528-37 (2006).
76. Tsuji, T., Miyazaki, M., Sakaguchi, M., Inoue, Y. & Namba, M. A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 20-4 (2000).
77. Urakami, S. et al. Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin Cancer Res* **12**, 6989-97 (2006).
78. Glinka, A. et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-62 (1998).
79. Katoh, Y. & Katoh, M. Comparative genomics on DKK2 and DKK4 orthologs. *Int J Mol Med* **16**, 477-81 (2005).
80. Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67 (1990).
81. Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-70 (1996).
82. Smith, G. et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9433-8 (2002).
83. Fearhead, N.S., Britton, M.P. & Bodmer, W.F. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* **10**, 721-33 (2001).
84. Behrens, J. et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-9 (1998).
85. Nakamura, Y. The role of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in human cancers. *Adv Cancer Res* **62**, 65-87 (1993).

86. Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**, 1837-51 (2000).
87. Kitaeva, M.N. et al. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* **57**, 4478-81 (1997).
88. Liu, W. et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* **26**, 146-7 (2000).
89. Baker, S.J. et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **50**, 7717-22 (1990).
90. May, P. & May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-36 (1999).
91. Kolligs, F.T., Hu, G., Dang, C.V. & Fearon, E.R. Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol* **19**, 5696-706 (1999).
92. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**, 271-9 (1991).
93. Judge, A.D. et al. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* **23**, 457-62 (2005).
94. van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N. & Stuitje, A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-9 (1990).
95. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289 (1990).
96. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11 (1998).
97. Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. & Sharp, P.A. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* **13**, 3191-7 (1999).
98. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
99. Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001).
100. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 457-67 (2003).
101. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3 (2002).
102. van de Wetering, M. et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* **4**, 609-15 (2003).
103. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).
104. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-80 (2006).
105. Dorsett, Y. & Tuschl, T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 318-29 (2004).
106. Verma, U.N., Surabhi, R.M., Schmaltieg, A., Becerra, C. & Gaynor, R.B. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**, 1291-300 (2003).
107. Reynolds, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-30 (2004).
108. Sandy, P., Ventura, A. & Jacks, T. Mammalian RNAi: a practical guide. *Biotechniques* **39**, 215-24 (2005).
109. Gayet, J. et al. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* **20**, 5025-32 (2001).
110. Korinek, V. et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **275**, 1784-7 (1997).
111. Yu, J.Y., Taylor, J., DeRuiter, S.L., Vojtek, A.B. & Turner, D.L. Simultaneous inhibition of GSK3alpha and GSK3beta using hairpin siRNA expression vectors. *Mol Ther* **7**, 228-36 (2003).
112. Chamorro, M.N. et al. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *Embo J* **24**, 73-84 (2005).

113. Aguilera, O. et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* **25**, 4116-21 (2006).
114. Lifshitz-Mercer, B. et al. Nuclear localization of beta-catenin and plakoglobin in primary and metastatic human colonic carcinomas, colonic adenomas, and normal colon. *Int J Surg Pathol* **9**, 273-9 (2001).
115. Bondi, J., Bukholm, G., Nesland, J.M. & Bukholm, I.R. Expression of non-membranous beta-catenin and gamma-catenin, c-Myc and cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas. *Apmis* **112**, 49-56 (2004).
116. Schwarz, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208 (2003).
117. Fedorov, Y. et al. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *Rna* **12**, 1188-96 (2006).
118. Morin, P.J., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7950-4 (1996).
119. Qian, J., Steigerwald, K., Combs, K.A., Barton, M.C. & Groden, J. Caspase cleavage of the APC tumor suppressor and release of an amino-terminal domain is required for the transcription-independent function of APC in apoptosis. *Oncogene* (2007).
120. van de Wetering, M. et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**, 241-50 (2002).
121. Kim, T.H., Xiong, H., Zhang, Z. & Ren, B. beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene* **24**, 597-604 (2005).
122. Sancho, E., Batlle, E. & Clevers, H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 695-723 (2004).
123. Sellin, J.H., Umar, S., Xiao, J. & Morris, A.P. Increased beta-catenin expression and nuclear translocation accompany cellular hyperproliferation in vivo. *Cancer Res* **61**, 2899-906 (2001).
124. Rieger-Christ, K.M. et al. Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential. *Br J Cancer* **92**, 2153-9 (2005).
125. Syrigos, K.N., Harrington, K., Waxman, J., Krausz, T. & Pignatelli, M. Altered gamma-catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *J Urol* **160**, 1889-93 (1998).
126. Hakimelahi, S. et al. Plakoglobin regulates the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2. *J Biol Chem* **275**, 10905-11 (2000).
127. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8 (2001).
128. Agrawal, S. & Kandimalla, E.R. Role of Toll-like receptors in antisense and siRNA [corrected]. *Nat Biotechnol* **22**, 1533-7 (2004).
129. Moss, E.G. & Taylor, J.M. Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nat Cell Biol* **5**, 771-2 (2003).
130. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. & Williams, B.R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**, 834-9 (2003).
131. Sledz, C.A. & Williams, B.R. RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans* **32**, 952-6 (2004).
132. Eckstein, F. Small non-coding RNAs as magic bullets. *Trends Biochem Sci* **30**, 445-52 (2005).
133. Kim, D.H. et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* **23**, 222-6 (2005).
134. Czauderna, F. et al. Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res* **31**, e127 (2003).
135. Nusse, R. Wnt-target genes. <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html> (2006).
136. Katoh, M. & Katoh, M. Identification and characterization of human DAPPER1 and DAPPER2 genes in silico. *Int J Oncol* **22**, 907-13 (2003).
137. Zhang, L., Gao, X., Wen, J., Ning, Y. & Chen, Y.-G. Dapper 1 Antagonizes Wnt Signaling by Promoting Dishevelled Degradation. *J Biol Chem* **281**, 8607-8612 (2006).
138. Behrens, J. Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: a role of MAP kinases. *J Cell Sci* **113** (Pt 6), 911-9 (2000).
139. Zeng, Y.A. & Verheyen, E.M. Nemo is an inducible antagonist of Wingless signaling during Drosophila wing development. *Development* **131**, 2911-20 (2004).

140. Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J. & Matsumoto, K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 1379-89 (2003).
141. Kirikoshi, H., Sekihara, H. & Katoh, M. WNT10A and WNT6, Clustered in Human Chromosome 2q35 Region with Head-to-Tail Manner, Are Strongly Coexpressed in SW480 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**, 798 (2001).
142. Tan, C. et al. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC^{-/-} human colon carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 133-40 (2001).
143. Bazzi, H., Fantauzzo, K.A., Richardson, G.D., Jahoda, C.A. & Christiano, A.M. The Wnt inhibitor, Dickkopf 4, is induced by canonical Wnt signaling during ectodermal appendage morphogenesis. *Dev Biol* **305**, 498-507 (2007).

6.1 PUBLIKATIONEN

6.1.1 ORIGINALARBEITEN

SOCS1 silencing enhances antitumor activity of type I IFNs by regulating apoptosis in neuroendocrine tumor cells.

Zitzmann K, Brand S, De Toni EN, Baehs S, Goke B, Meinecke J, Spottl G, Meyer HH, Auernhammer CJ.

Cancer Res. 2007 May 15;67(10):5025-32.

Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells.

Zitzmann K, Brand S, Baehs S, Goke B, Meinecke J, Spottl G, Meyer H, Auernhammer CJ.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jun 16;344(4):1334-41. Epub 2006 Apr 24.

DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells.

Bommer GT, Jager C, Durr EM, Baehs S, Eichhorst ST, Brabletz T, Hu G, Frohlich T, Arnold G, Kress DC, Goke B, Fearon ER, Kolligs FT.

J Biol Chem. 2005 Mar 4;280(9):7962-75. Epub 2004 Nov 24.

6.1.2 ABSTRACTS

Untersuchung der differentiellen Bedeutung der beiden APC-regulierten Proteine β -Catenin und γ -Catenin für die kolorektale Karzinogenese

S Baehs¹, C Jäger¹, G Bommer¹, B Göke¹, FT Kolligs¹

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten

7 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei PD Frank Kolligs für die große Unterstützung und gute Betreuung sowie das entgegengebrachte Vertrauen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bedanken, die es mir ermöglichte, in hohem Maße selbständig zu arbeiten und mich auszuprobieren. In zahlreichen Gesprächen und Diskussionen war es wiederum sein *Dickkopf*, der den Fortgang der Arbeit entscheidend und in die richtigen Bahnen lenkte.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Angelika Vollmar, die diese Arbeit als externe Betreuerin vor der pharmazeutischen Fakultät vertrat. Ich möchte mich für die hervorragende Betreuung und die Anregungen bedanken, die ich weit über den Rahmen von *Journal Club* und *Progress Report* in ihrem Arbeitskreis erfahren durfte. Durch die offene und herzliche Art des miteinander Arbeitens konnte ich in ihrem Arbeitskreis ein zweite wissenschaftliche Heimat finden, welche über die reine Mitnutzung der Geräte hinausging.

Besonderer Dank geht an PD Stefan Zahler für die stetige Bereitschaft, durch sein Wissen und seine fachliche Unterstützung die Realisierung vieler Experimente am FACS zu ermöglichen.

Für die erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Helmut Blum und Dr. Susanne Schmidt bedanken, die gemeinsam durch ihr Wissen, ihr Engagement und ihre kritische Bewertung entscheidend zum Gelingen dieses in die Forschergruppe 128 eingebundenen Projektes beigetragen haben.

Ein besonderer großer Dank gilt Claudia Jäger, die mir durch ihre Erfahrung und Hilfestellung den Einstieg in die Zellkultur erleichterte. Danke an Dr. Andreas Herbst für den Erfahrungsaustausch und die Unterstützung bei der Promoteranalyse. Ein besonders herzlicher Dank gilt Andrea, Timo und Dr. Michael Willhauck (*Tissue Culture Boys*) für die entstandene Freundschaft sowie die unzähligen gemeinsamen Stunden in der Zellkultur. Ich möchte mich ganz herzlich bei Antje für die vielen lustigen, aber auch ernsten Gespräche und ihr stets offenes Ohr bedanken. Für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit und die gemeinsamen Teepausen möchte ich mich sehr herzlich bei der *netten Kathrin* bedanken. Danke auch an PD Claus Schäfer für das entgegengebrachte Verständnis bezüglich der musikalischen Untermalung in der Zellkultur und die vielen daraus entstandenen Gespräche. Ich möchte mich darüber hinaus bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe sowie denen der benachbarten Arbeitsgruppen bedanken, die hier aus Platzmangel nicht erwähnt sind. Ich danke allen Mitgliedern der AG Vollmar, insbesondere Dr. Anita Rudy, Anja, Drs. Thomas Räthel & Roos und Hanna, für die freundliche Aufnahme, fruchtbare Zusammenarbeit und gute Freundschaft. Großes Dankeschön auch an die *Marburg Connection* für den breit gefächerten und regen Austausch.

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir bei der parallelen Realisierung meines *großen Projekts* unterstützend zur Seite standen und stehen.

8 Lebenslauf

Sebastian Baehs, deutsch,
geboren am 16.11.1978 in Weimar, Thüringen,
verheiratet, keine Kinder

Promotion

Feb. '04 - Mai '07 Klinikum Großhadern der LMU München, Medizinische Klinik II,
Gastrointestinale Tumorforschung PD Dr. F. T. Kolligs

Studium

Okt. '02 - Sep. '02 Pharmaziestudium, Philipps-Universität Marburg
Sep. '00 Abschluss des Grundstudiums
1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Okt. '02 Abschluss des Hauptstudiums
2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Nov. '02 - Okt. '03 Praktisches Jahr in der Central-Apotheke Karlsfeld

Nov. '03 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Jan. '04 Erlangung der Approbation als Apotheker

Schulbildung

Sept. '91 - Juli '97 Abitur am Geschwister-Scholl-Gymnasium Magdeburg
Juli '97 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

Sept. '97 - Juli '98 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr