

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Ehemalige Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Christian Weber

Die Bedeutung verschiedener Frizzled8-Isoformen und Wnt8B
im Wnt/ β -Catenin-Signalweg von mesodermalen Tumorzellen

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Felix Lechner

aus

München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Peter Neth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann

PD Dr. med. Christoph Walz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2013

Meinen lieben Eltern und Geschwistern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
A Zusammenfassung.....	1
B Einleitung.....	3
B.1 Wnt-Signaling – Die Signalwege und ihre funktionelle Bedeutung	3
B.2 Extrazelluläre Komponenten des Wnt-Signalings	4
B.2.1 Aktivierende Proteine: Die Familie der Wnts	4
B.2.2 Inhibierende Proteine: <i>secreted Frizzled-related proteins</i> (sFRPs), Dickkopf (Dkk) und andere.....	6
B.3 Membrangebundene Komponenten des kanonischen Wnt-Signalings	7
B.3.1 Die Gruppe der Fzd-Rezeptoren.....	7
B.3.1.1 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Fzd-Rezeptoren	7
B.3.1.2 Aufbau der Fzd8-CRD	8
B.3.2 <i>Low-density-lipoprotein-related protein</i> (LRP) 5 und 6	12
B.3.3 Atypische Rezeptoren des Wnt-Signalings: Ror2 und RYK.....	13
B.3.4 Interaktion der Rezeptorstrukturen mit intrazellulären Komponenten	14
B.4 Zytosolische Komponenten des kanonischen Wnt-Signalings.....	15
B.4.1 Dishevelled	15
B.4.2 Axin	15
B.4.3 APC	15
B.4.4 Kinasen und Phosphatasen: GSK3 β , CK1 α , PP2A und PP1	16
B.4.5 β -Catenin	16
B.4.6 Intrazelluläre Transduktion des kanonischen Wnt-Signals	17
B.5 Nukleäre Komponenten des kanonischen Wnt-Signalings	19
B.5.1 TCF/LEF	19
B.5.2 Aktivierung der Transkription durch kanonisches Wnt-Signaling	19
B.5.3 Zielgene	20
B.6 Signalübertragung über nicht-kanonische Signalwege	21
B.7 Fehlregulation des Wnt-Signalings: Degenerative Erkrankungen und Krebsentstehung.....	22
B.7.1 Wnt-Signaling in Gewebshomöostase und der Entstehung nicht-maligner Erkrankungen	22
B.7.2 Wnt-Signaling in Tumorinitiation und -progression.....	23

B.7.2.1	Fehlregulationen des kanonischen Wnt-Signalweges.....	23
B.7.2.1.1	Veränderungen extrazellulärer Komponenten.....	23
B.7.2.1.2	Veränderungen intrazellulärer Komponenten.....	23
B.7.2.2	Fehlregulationen in den nicht-kanonischen Signalwegen.....	24
B.7.2.3	Das Tumor-Stammzellmodell und therapeutische Aspekte.....	25
C	Fragestellung und Zielsetzung.....	26
D	Material und Methoden.....	27
D.1	Geräte und Materialien.....	27
D.1.1	Geräte.....	27
D.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	28
D.1.2.1	Bakterienstämme, Nährlösungen und Antibiotika.....	28
D.1.2.2	Oligonukleotide.....	29
D.1.2.3	Enzyme, Chemikalien und weitere Materialien.....	30
D.1.3	Plasmide.....	32
D.1.3.1	Plasmide zur Proteinexpression und Negativkontrollen.....	32
D.1.3.1.1	pN3.....	32
D.1.3.1.2	pN3-Fzd8.....	32
D.1.3.1.3	pEF-DEST51.....	33
D.1.3.1.4	pEF-DEST51-Wnt8B.....	33
D.1.3.2	Plasmide zur Expression von Fluoreszenzproteinen.....	34
D.1.3.2.1	pN3-eGFP.....	34
D.1.3.2.2	pDsRed-Express-C1.....	34
D.1.3.3	Plasmide zur Reportergenexpression.....	35
D.1.3.3.1	pN3-Bar-GLuc.....	35
D.2	Methoden.....	36
D.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	36
D.2.1.1	Anzucht und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	36
D.2.1.2	Transformation.....	36
D.2.1.3	Plasmidisolierung zur Analyse und Transfektion, Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	37
D.2.1.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	37
D.2.1.5	Polymerasekettenreaktion.....	38
D.2.1.6	DNA-modifizierende Reaktionen.....	39
D.2.1.7	RNA-Isolierung.....	40
D.2.1.8	cDNA-Synthese.....	41

D.2.1.9	qRT-PCR	41
D.2.2	Proteinbiochemische Methoden	44
D.2.2.1	Der Luciferase-Reportergen-Assay	44
D.2.2.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	44
D.2.2.3	Erstellung von Proteinlysaten	45
D.2.2.4	SDS-PAGE und Western-Blot	46
D.2.2.5	Proteindetektion mittels Fluoreszenz	47
D.2.3	Zellbiologische Methoden	48
D.2.3.1	Auftauen, Kultivieren und Einfrieren von hMSC, HT1080 und HEK293	48
D.2.3.2	Splitten von Zellen, Zellzahlbestimmung	48
D.2.3.3	Transiente Transfektion	49
D.2.3.4	Stabile Integration von DNA-Sequenzen in das Wirtsgenom	50
D.2.4	Bioinformatische Methoden	52
E	Ergebnisse	53
E.1	Expression und Lokalisation N-terminal verkürzter Varianten von Fzd8	53
E.1.1	Evaluierung des Transkriptionsstarts von Fzd8 unter Einsatz der RLM-RACE	53
E.1.2	Etablierung einer spezifischen Amplifikationsreaktion für die Fzd8-cDNA	53
E.1.3	Generierung von Plasmiden zur ektopischen Expression verschiedener N-terminal verkürzter Fzd8-Varianten	54
E.1.3.1	pN3-Fzd8-HA, p2in1-Fzd8, p2in1-Fzd8-HA	54
E.1.3.2	pN3-Fzd8 Δ (1-52), pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA, p2in1-Fzd8 Δ (1-52)	56
E.1.3.3	pN3-Fzd8 Δ (1-268)-HA, p2in1-Fzd8 Δ (1-268), p2in1-Fzd8 Δ (1-268)-HA	57
E.1.4	Generierung eines Expressionsplasmids für eGFP-markiertes Fzd8 Δ (1-52)	59
E.1.5	Quantifizierung der mRNA-Expression der pN3-Fzd8-Varianten	60
E.1.6	Detektion der Proteinexpression der Fzd8-Varianten	61
E.1.7	Detektion der zellulären Lokalisation von Fzd8 Δ (1-52) durch Immunfluoreszenz	62
E.2	Expression und Lokalisation von Wnt8B, einem potentiellen Liganden von Fzd8	64
E.2.1	Evaluierung der endogenen mRNA-Expression von Wnt8B in verschiedenen Zelllinien und Gewebstypen	64
E.2.2	Generierung eines Expressionsplasmids für dsRed-markiertes Wnt8B	65
E.2.3	Detektion der zellulären Lokalisation von Wnt8B durch Immunfluoreszenz	65
E.3	Aktivierung des kanonischen Signalweges durch verschiedene Wnts und deren Auswirkung auf die mRNA-Expression ausgewählter Zielgene	67
E.3.1	Auswirkungen der Stimulation mit rekombinanten Wnt1 auf den kanonischen Wnt-Signalweg in HT1080-Bar-Zellen	67

E.3.2	Auswirkungen der transienten Transfektion von pEF-DEST51-Wnt8B auf den kanonischen Signalweg in HT1080-Bar-Zellen	68
E.3.3	Auswirkungen der transienten Transfektion von pEF-DEST51-Wnt8B auf den kanonischen Signalweg in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)	69
E.3.4	Generierung von HT1080-Bar-Zellen mit stabiler Integration von pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock	69
E.3.5	Quantifizierung der Wnt8B-Expressionsleistung der HT1080-Bar-Zellpopulationen auf mRNA-Ebene nach stabiler Integration von pEF-DEST51-Wnt8B	71
E.3.6	Quantifizierung des Aktivitätszustandes des kanonischen Wnt-Signalweges der Wnt8B-exprimierenden HT1080-Bar-Klone.....	72
E.3.7	Auswirkungen der Wnt8B-Stimulation auf die mRNA-Expression ausgewählter Zielgene	73
E.3.7.1	Quantifizierung der Cyclin D1-mRNA-Expression in den HT1080-Bar-Zellklonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B	73
E.3.7.2	Qualitativer Nachweis der Cyclin-D1-PCR-Produkte	74
E.3.7.3	Quantifizierung der MMP-14-mRNA-Expression in HT1080-Bar-Zellklonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B	74
E.3.7.4	Qualitativer Nachweis des MMP-14-PCR-Produkts.....	75
E.3.7.5	Quantifizierung der Fzd8-mRNA-Expression in den HT1080-Bar-Zellklonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B	76
E.3.7.6	Qualitativer Nachweis des Fzd8-PCR-Produkts	77
E.3.8	Aktivierung des kanonischen Signalweges durch die Transkriptionsvarianten von Fzd8 in HT1080-Bar-Zellen unter stabiler Wnt8B-Expression	77
F	Diskussion.....	79
F.1	N-terminal verkürzte Varianten von Fzd8.....	79
F.1.1	Evaluierung des Transkriptionsstarts von Fzd8 unter Einsatz der RLM-RACE.....	79
F.1.2	mRNA-Expression und Lokalisation ektopisch exprimierter Verkürzungsvarianten von Fzd8	80
F.1.3	Funktionalität der Rezeptorvarianten in der Aktivierung des kanonischen Signalweges. 82	
F.2	Expression und Lokalisation von Wnt8B	82
F.2.1	Evaluierung der endogenen mRNA-Expression von Wnt8B in verschiedenen Zell- und Gewebetypen	83
F.2.2	Detektion der zellulären Lokalisation von Wnt8B durch Immunfluoreszenz.....	84
F.3	Wirkung von Wnt1 und Wnt8B auf die Aktivität des kanonischen Signalweges und die Transkription ausgewählter Zielgene	84
F.3.1	Stimulation von HT1080-Bar mit rekombinanten humanem Wnt1.....	84
F.3.2	Transiente Transfektion von Wnt8B in HT1080-Bar und hMSC-Bar	85
F.3.3	Stabile Integration der Wnt8B-cDNA in HT1080-Bar-Zellen	85

F.3.4	Wnt/ β -Catenin-Aktivität in verschiedenen HT1080-Bar-Zellklonen mit stabiler Integration von Wnt8B.....	86
F.3.5	Einfluss der ektopischen Expression von Wnt8B auf die Cyclin D1- und MMP-14-Expression.....	87
F.3.6	Die Rolle von Fzd8 als potentielles Zielgen des kanonischen Signalweges.....	89
G	Resümee und Ausblick	91
H	Literaturverzeichnis.....	93
I	Danksagung	104
J	Curriculum Vitae.....	105

Abkürzungsverzeichnis

Komponenten der Wnt-Signaltransduktionskaskade und assoziierter Signalwege

AP-1	<i>activating protein 1</i>
APC	Adenomatosis Polyposis Coli - Protein
Arm	Armadillo (β -Catenin-Homolog in <i>Drosophila</i>)
Arr	Arrow (LRP-Homolog in <i>Drosophila</i>)
β -TrCP-1	<i>β-transducin-repeat containing protein 1</i>
Bcl9/Legless	B-cell CLL/Lymphoma 9
Calc	Calcineurin
Calm	Calmodulin
CAMK	Calmodulin-Kinase
CK-1 (α oder γ)	Caseinkinase-1 (α oder γ)
CtBP	<i>C-terminal binding protein</i>
CTNNB1	β -Catenin
DAG	Diacylglycerin
Dkk	Dickkopf
Dll	Dally
Dlp	<i>Dally-like protein</i>
Dvl	Dishevelled
GEF	<i>guanine nucleotide-exchange factor</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
Gro	Groucho (TLE-Homolog in <i>Drosophila</i>)
Fzd (DFzd, hFzd, mFzd, rFzd)	Frizzled-Rezeptor (in <i>Drosophila</i> , human, murin, in der Ratte)
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
HDAC	Histondeacetylase
Int-1	<i>mouse mammary tumor virus integration site 1</i>
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
JNK	<i>c-jun NH₂-terminal kinase</i>
Krm1, Krm2	Kremen1, Kremen2
LEF	<i>lymphoid enhancer-binding protein</i>
LGR-5	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5</i>
LRP	<i>low-density-lipoprotein receptor-related protein</i>
MAPK	Map-Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMTV-1	<i>mouse mammary tumor virus 1</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>
p300/CBP	<i>p300/CREB-binding protein</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>

PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphat
PKC	Proteinkinase C
Porc	Porcupine
PP1	Protein-Phosphatase 1
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
Pygo	Pygopus
Rock	Rho-Kinase
RYK	<i>Receptor-like tyrosine kinase</i>
sFRP	<i>secreted frizzled-related protein</i>
Sgy	Soggy
Smo	Smoothened
TCF	<i>T-cell-specific transcription factor</i>
TLE	<i>transducin-like enhancer of split</i>
Wg	Wingless
WIF-1	<i>Wnt inhibitory factor 1</i>
WI	Wntless
Wnt (hWnt, XWnt)	Akronym aus "Wingless" und "Int-1" (human, in <i>Xenopus</i>)

Domänen verschiedener Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges

CRD	<i>Cysteine rich domain</i>
DEP	<i>Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain</i>
DIX	<i>Dishevelled homologous domain</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
GPI-Anker	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
HMG	<i>high mobility group</i>
PDZ	<i>postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1</i>
RGS	<i>Regulator of G-protein signaling</i>
TM	Transmembrandomäne
WRE	<i>Wnt-responsive element</i>

Wnt-Signaltransduktion und Tumorentstehung

CRC	<i>colorectal cancer</i> (Kolorektalkarzinom)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FEVR	Familiäre Exsudative Vitreoretinopathie
HCC	<i>hepatocellular cancer</i> (Hepatozelluläres Karzinom)
NSCLC	<i>Non-small-cell lung cancer</i> (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
OPPG	Osteoporose–Pseudoglioma–Syndrom

Anwendungen, Substanzen und Chemikalien in Molekular- und Zellbiologie

Ak	Antikörper
α MEM	<i>minimal essential medium alpha</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
Bla	Blasticidin
BSA	Bovines Serumalbumin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA (cDNA, dsDNA, gDNA)	Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i> , Doppelstrang-DNA, genomische DNA)
CIP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRed (auch: drFP583)	<i>destabilized red fluorescent protein</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
HA	Hämagglutinin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Kan	Kanamycin
LNA	<i>Locked nucleotide acid</i>
Neo	Neomycin
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RE	Restriktionsenzym
RNA (mRNA)	Ribonukleinsäure (<i>messenger-RNA</i>)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween-20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UPL	<i>universal probe library</i>

Weitere molekularbiologische Begriffe

BGH	<i>bovine growth hormone</i>
CMV	Zytomegalievirus
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Ori	<i>Origin of replication</i> (Replikationsursprung)
SV40	<i>Simian virus 40</i>

Pro- und eukaryote Zelltypen

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HEK293	<i>human embryonic kidney cells</i>
HT1080	Humane Fibrosarkomzellen
SAOS-2	Humane Osteosarkomzellen

Einheiten und sonstige Abkürzungen

AS	Aminosäuren
bp	<i>Base pairs</i> (Basenpaare)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
OD	<i>Optical density</i> (Optische Dichte)
RLU	<i>Relative light units</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
U	<i>Units</i>

A Zusammenfassung

Im Zuge der Forschung an Stamm- und Tumorzellen kristallisierte sich der Wnt-Signalweg in den letzten Jahren zunehmend als essentielle Komponente sowohl in der Regulierung von Stammzell- als auch von Tumorzelleigenschaften heraus. Im *Wnt-Signaling* wird hierbei zwischen β -Catenin-abhängigen, sog. kanonischen Signalübertragungsmechanismen, und β -Catenin-unabhängigen Übertragungswegen wie dem $\text{Wnt}/\text{Ca}^{2+}$ - und dem *planar cell polarity (PCP)-like*-Weg unterschieden. Aberrante Aktivierung oder Inhibition der Signalwege kann sowohl zur Fehlregulation von Stammzelleigenschaften als auch zur Entstehung, Proliferation und Migration von Tumoren führen.

Die Komponenten des *Wnt-Signaling*s umfassen hierbei 19 extrazelluläre Liganden, die sog. Wnts, zehn transmembrane Fzd-Rezeptoren, zwei Co-Rezeptoren (LRP5 und LRP6) sowie eine Vielzahl an zytoplasmatischen und intranukleären Molekülen, welche an der Signaltransduktion und der Regulation intrazellulärer Effekte partizipieren. Die molekularen Mechanismen der Signaltransduktion sind bislang nur abschnittsweise verstanden. Insbesondere die Vorgänge an der Zellmembran, also die Interaktionen zwischen Wnt, Fzd und dessen Co-Rezeptoren sind bislang sowohl auf molekularer als auch auf funktioneller Ebene erst teilweise charakterisiert worden.

In diesem Zusammenhang konnten wir in unserer Arbeitsgruppe eine erhöhte Expression des Fzd8-Rezeptors in HT1080-Fibrosarkomzellen nachweisen, welcher eine wichtige Rolle in der Proliferation und Invasivität dieser Tumorzelllinie spielt (Leitenstern et al., persönliche Mitteilung). Ferner konnte gezeigt werden, dass in Fibrosarkomzellen (HT1080), Osteosarkomzellen (SAOS-2) und humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) verschiedene Transkriptionsvarianten der Fzd8-mRNA vorliegen.

Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen verschiedener Fzd8-mRNA-Transkriptionsvarianten auf deren Expression, die Struktur des entstehenden Proteins sowie dessen Funktionalität im Wnt/β -Catenin-Signalweg in HT1080-Zellen beleuchtet werden. Ferner wurde mit Wnt8B ein potentieller Ligand des Fzd8-Rezeptors identifiziert. In diesem Zusammenhang sollte dessen Expression und Interaktion mit Fzd8 und dem kanonischen Signalweg charakterisiert werden.

Die Analyse des Fzd8-Transkriptionsstarts mittels RLM-RACE in o.g. Zelllinien zeigte ein variables Verteilungsmuster des Transkriptionsstarts, welches in einem Teil der mRNAs im Verlust des ersten Translationsstartpunktes resultierte. Demzufolge war ein weiter *downstream* lokalisierter Translationsbeginn und konsekutiv eine N-terminale Verkürzung des entstehenden Fzd8-Proteins zu erwarten. Die cDNA der verkürzten Varianten Fzd8 Δ (1-52) und Fzd8 Δ (1-268) wurde in Überexpressionsvektoren kloniert und mittels eines N-terminalen HA-Tags bzw. einer C-terminalen eGFP-Sequenz detektierbar gemacht. Es konnte mittels Immunfluoreszenz eine Translokation des C-Terminus der verkürzten Variante Fzd8 Δ (1-52) in den Bereich des Zellkerns, aber keine Integration in die Zellmembran nachgewiesen werden.

Auf der Grundlage von *in-silico*-Analysen (Voronkov, Baskin et al. 2007) und Experimenten in *Xenopus laevis* (Hsieh, Rattner et al. 1999) wurde Wnt8B als potentieller Interaktionspartner des Fzd8-Rezeptors charakterisiert. In cDNA-Proben primärer Gewebe konnte, ebenso wie in hMSC, HT1080 und SAOS-2, keine endogene Expression der mRNA von Wnt8B nachgewiesen werden.

Die cDNA von Wnt8B wurde in einen Überexpressionsvektor integriert und mit der cDNA des Fluoreszenzproteins dsRed ligiert. Mit Hilfe dieses Konstrukts konnte die präferentielle Lokalisation

von Wnt8B in der Zellmembran nachgewiesen werden, wie sie bereits für andere Wnt-Proteine beschrieben wurde (Willert, Brown et al. 2003).

Zur Analyse des Verhaltens von HT1080-Zellen unter Wnt8B-Stimulation wurden klonale Zellpopulationen mit stabiler Integration des Wnt8B-Plasmids und des Reportergens pN3-Bar-GLuc für den Wnt/ β -Catenin-Signalweg generiert.

Es konnte mit Hilfe dieses Konstrukts eine Wnt8B-abhängige Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges nachgewiesen werden. Die Analyse der Expression der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MMP-14, welche als Marker der Proliferation und der Invasivität von Zellpopulationen dienen, zeigten eine Wnt8B-konzentrationsabhängige Steigerung der mRNA-Expressionsraten.

Zur Evaluation des Effekts von Wnt8B auf die Expression der Fzd8-mRNA wurde diese ebenfalls quantifiziert. Hierbei zeigte sich unter niedrigen Konzentrationen eine Repression der mRNA-Expression, Fzd8 war in diesem Falle als negatives Wnt-Zielgen anzusehen. Hohe Konzentrationen von Wnt8B zeigten jedoch eine entgegengesetzte Wirkung mit einer Erhöhung der Fzd8-mRNA-Expression im Sinne eines positiven *feedback-loops*.

Die Transfektion der verschiedenen Varianten von Fzd8 in Wnt8B-exprimierende Zellen zeigte eine Aktivierung des β -Catenin-abhängigen Signalweges durch den Fzd8-Rezeptor. Die N-terminal verkürzten Varianten des Rezeptors, Fzd8 Δ (1-52) und Fzd8 Δ (1-268), zeigten keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Verhalten des kanonischen Signalweges. Wnt8B – wie auch Fzd8 – konnten somit als Aktivatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges charakterisiert werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von N-terminal verkürzten Varianten des Fzd8-Rezeptors keinen oder nur einen minimalen Einfluss auf das β -Catenin-abhängige *Signaling* aufweist, sondern deren Proteinprodukte vielmehr intrazellulär lokalisiert sind. Ferner konnte Wnt8B als Aktivator des β -Catenin-abhängigen Signalweges charakterisiert und Hinweise auf eine Rolle von Wnt8B als funktioneller Interaktionspartner des Fzd8-Proteins gewonnen werden.

B Einleitung

B.1 Wnt-Signaling – Die Signalwege und ihre funktionelle Bedeutung

Das Wnt-Signaling umfasst eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Proteine, deren Funktion und Abfolge in der Signaltransduktion im Laufe der letzten drei Jahrzehnte sukzessive zumindest zum Teil aufgeklärt werden konnten. Der Name Wnt leitet sich aus einer Kombination aus *int-1* und *Wingless* (Wg) ab. *Int-1* ist ein Protoonkogen der Maus, welches durch Integration des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) aktiviert wird und hierdurch an der Entstehung von Brustkrebs partizipiert (Nusse and Varmus 1982). *Wingless* stellt das Homolog zu *int-1* in *Drosophila melanogaster* dar (Cabrera, Alonso et al. 1987; Rijsewijk, Schuermann et al. 1987). Mit Hilfe funktioneller Analysen in *Drosophila*, aber auch in Vertebraten, konnte gezeigt werden, dass das Wnt-Signaling Einfluss auf diverse Regulationsprozesse in Proliferation und Differenzierung ausübt, aber auch in Entwicklungsprozessen eine tragende Rolle spielt, welche in den folgenden Kapiteln erläutert werden sollen.

Im Menschen konnten bislang 19 verschiedene Wnt-Gene sowie die entsprechenden Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Die verschiedenen Wnt-Proteine wurden an Hand funktioneller Eigenschaften in Gruppen eingeteilt. Das entscheidende Kriterium hierbei war die Fähigkeit zur Transformation muriner Brustdrüsenzellen C75MG zu Tumorzellen. Wnt-Liganden mit dieser Eigenschaft wurden zur Gruppe der transformierenden Wnts, die anderen zur Gruppe schwach oder nicht-transformierender Wnts zusammengefasst (Wong, Gavin et al. 1994). Im Zusammenhang mit der Transformationsinduktion steht auch die intrazelluläre Transduktion des Wnt-Signals über verschiedene Signalwege. Es wird hierbei die kanonische, β -Catenin-abhängige Signalübertragung von den nicht-kanonischen, β -Catenin-unabhängigen Signalwegen unterschieden. Transformierende Wnts zeigen eine Präferenz für den kanonischen Signalweg, während nicht-transformierende Wnts vorzüglich über die nicht-kanonischen Wnt-Pfade agieren. Sowohl die Auftrennung der Wnts in transformierend und nicht-transformierend als auch die Trennung von kanonischem und nicht-kanonischem Signalweg können jedoch in Folge neuer Resultate nicht mehr strikt aufrechterhalten werden. Es konnte beispielsweise sowohl eine Interaktion transformierender Wnts mit nicht-kanonischen Signalwegen (Kuhl, Sheldahl et al. 2000) und umgekehrt (Tao, Yokota et al. 2005) als auch ein *Cross-Talk* zwischen kanonischen und nicht-kanonischen Signaling gezeigt werden (Ishitani, Kishida et al. 2003). In ihrer Funktionalität wird dem kanonischen Signalweg klassischerweise die Eigenschaften der Zelltypfestlegung, Steuerung von Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsvorgängen zugeordnet. Die nicht-kanonischen Signalwege sind typischerweise für Zellausrichtung und -polarität, aber auch für intra- und extrazelluläre Restrukturierungsvorgänge verantwortlich. Im Folgenden sollen die Signalwege, insbesondere unter Betrachtung der Signaltransduktionsvorgänge an der Zellmembran, näher beleuchtet und in Bezug zur Krankheitsentstehung, vor allem von malignen Erkrankungen, gesetzt werden.

B.2 Extrazelluläre Komponenten des Wnt-Signalings

B.2.1 Aktivierende Proteine: Die Familie der Wnts

Wnt-Proteine besitzen eine Größe von ca. 350 - 400 Aminosäuren. Die 19 Wnts wurden nicht primär unter funktionellen Gesichtspunkten (vgl. B.1), sondern auf Grund ihrer Primärstruktur zu einer Gruppe zusammengefasst. Alle Proteine dieser Gruppe besitzen 22 Cystein-Reste, die über Disulfidbrücken die Faltung des Proteins determinieren (Mikels and Nusse 2006). Obwohl sie einen hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren besitzen, zeigen Wnt-Proteine einen hohen Grad an Hydrophobizität und eine ausgeprägte Assoziation zur Zellmembran sowie zur extrazellulären Matrix (Willert, Brown et al. 2003), die durch posttranslationale Modifikationsschritte erklärt werden können.

Die N-terminale Signalsequenz bewirkt eine Translation des Wnt-Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Dort unterliegen Wnt-Liganden zahlreichen posttranslationalen Modifikationen an in der Wnt-Familie konservierten Seitenresten, welche jedoch nur für einige Wnt-Proteine bislang vollständig aufgeklärt werden konnten. Eine entscheidende Rolle spielte hierbei die erstmalige Isolation eines funktionsfähigen Proteins, Wnt3a (Willert, Brown et al. 2003). Bei den posttranslationalen Modifikationsschritten lassen sich hierbei Glykosylierungsschritte und Lipidmodifikationen unterscheiden.

Studien unter Einsatz von Glykosylierungsinhibitoren sowie Mutationsexperimente unter Veränderung potentieller Glykosylierungsstellen konnten N-Glykosylierungen an multiplen Stellen des Wnt-Proteins nachweisen (Smolich, McMahon et al. 1993). Über die Auswirkungen dieser Modifikationen existieren kontroverse Erkenntnisse, einerseits konnte kein Einfluss der Glykosylierung auf Sekretion und Aktivität nachgewiesen werden (Mason, Kitajewski et al. 1992), Wnt3a und Wnt5a zeigten nach Mutation der Glykosylierungsstellen jedoch keine Sekretion mehr (Komekado, Yamamoto et al. 2007; Kurayoshi, Yamamoto et al. 2007). *In vitro* deglykosylierte Wnt5a-Proteine zeigten jedoch keine Veränderung in ihrer Aktivität, so dass die Hauptaufgabe der Glykosylierung in der Gewährleistung einer suffizienten Sekretion zu suchen ist.

Eine essentielle Rolle in der Hydrophobizität der Wnt-Proteine spielen Lipidmodifikationen. Für Maus-Wnt1, Wnt3a und Wnt5a konnte eine Palmitoylierung des ersten konservierten Cysteins nachgewiesen werden (Willert, Brown et al. 2003; Galli, Barnes et al. 2007; Kurayoshi, Yamamoto et al. 2007). Ferner konnte für Wnt3a eine Addition von Palmitoleinsäure an Ser²⁰⁹ nachgewiesen werden (Takada, Satomi et al. 2006). Proteine ohne Modifikation des ersten Cysteins zeigten keine Veränderung in der Sekretion, allerdings zeigten unpalmitoyliertes Wnt3a oder Wnt5a jedoch keine Aktivität ihrer korrespondierenden Signalwege (Komekado, Yamamoto et al. 2007; Kurayoshi, Yamamoto et al. 2007); Wnts ohne Addition der Palmitoleinsäure an Ser²⁰⁹ wurden nicht aus dem ER sezerniert (Takada, Satomi et al. 2006). Einige Experimente zeigten auch eine entscheidende Rolle des Transmembranproteins Porcupine (Porc), das zur Gruppe der O-Acyltransferasen zählt (Hofmann 2000), in der Lipidmodifikation. Ein Verlust der Porc-Funktion ging hierbei mit einer Akkumulation wenig hydrophiler Wnts im ER und ausbleibender Sekretion einher (van den Heuvel, Harryman-Samos et al. 1993; Kadowaki, Wilder et al. 1996; Galli, Barnes et al. 2007), während in Porc-überexprimierenden Zellen der Anteil lipidmodifizierter Wnt-Proteine erhöht war (Galli, Barnes et al. 2007).

Während die Glykosylierung hauptsächlich die Sekretion vermittelt, stellt die Lipidmodifikation einen wichtigen Baustein zur Funktionalität der Wnt-Proteine dar. Über den genauen Wirkmechanismus sind jedoch erst wenige Details bekannt, aktuell sind sowohl eine Veränderung der Proteinstruktur (Port and Basler 2010), eine Verankerung in der Zellmembran für länger anhaltendes, effizienteres *Signaling* (Mikels and Nusse 2006) als auch verbesserte Interaktionen mit den Rezeptorproteinen vorstellbar (Cong, Schweizer et al. 2004). Ferner scheint ein Zusammenhang zwischen den posttranslationalen Modifikationen zu bestehen, da Lipidmodifikationen Glykosylierungsschritte unterstützen, die N-Glykosylierung andererseits wiederum zur Palmitoylierung von Wnt3a essentiell ist (Tanaka, Kitagawa et al. 2002; Komekado, Yamamoto et al. 2007).

Die Entdeckung von Wntless (Wl) stellte einen Meilenstein in der Aufklärung der Sekretion von Wnt-Proteinen dar. Wl ist ein Sieben-Transmembrandomänen-Protein, das vorzugsweise im Golgi-Apparat, in Endosomen und der Zelloberfläche lokalisiert ist (Port, Kuster et al. 2008). Durch Bindung an lipidmodifizierte Wnts transportiert Wl diese vom Golgi-Apparat an die Zelloberfläche (Banziger, Soldini et al. 2006), Wl wird im Folgenden durch einen Retromer-Komplex von der Zelloberfläche endozytotisch aufgenommen und wieder in den Golgi-Apparat recycelt (Belenkaya, Wu et al. 2008). *Loss-of-function*-Mutanten von Wntless zeigen eine Akkumulation von Wnt-Proteinen im Golgi-Apparat sowie eine inhibierte Sekretion, die phänotypisch *Wnt-loss-of-function*-Mutanten entspricht (Banziger, Soldini et al. 2006).

Wnts agieren im Extrazellularraum als Morphogene (Zecca, Basler et al. 1996); wie der dazu erforderliche Aufbau eines Konzentrationsgradienten auf molekularer Ebene von statten geht, ist jedoch bislang nicht aufgeklärt. Der Nachweis einer Signaltransduktion durch Wnt über die Strecke von 20 – 30 Zelldurchmessern in *Drosophila* legt jedoch die Existenz besonderer Transportmechanismen nahe (Neumann and Cohen 1997). Studien zeigten, dass die Proteine Dally (Dll) und *Dally-like protein* (Dlp), die zur Gruppe der Glyptikane, GPI-verankerter Heparansulfat-Proteoglykane, zählen, für die Aufrechterhaltung normaler *Wnt-Level* verantwortlich sind und eine laterale Diffusion an Zelloberflächen vermitteln können (Takei, Ozawa et al. 2004; Han, Yan et al. 2005). Aber auch Transport durch Mizellenbildung (Chen, Li et al. 2004), durch Bindung an spezielle Wnt-Transporterproteine (Nusse 2008), durch Integration in Lipoproteinstrukturen (Panakova, Sprong et al. 2005) sowie ein Transport in exosomalen Vesikeln in Zusammenarbeit mit Wl (Korkut, Ataman et al. 2009) konnten nachgewiesen werden.

B.2.2 Inhibierende Proteine: *secreted Frizzled-related proteins* (sFRPs), Dickkopf (Dkk) und andere

Die inhibitorischen Peptide lassen sich in zwei Subklassen dividieren; die Mitglieder der ersten Klasse, welche die *secreted Frizzled-related peptides* (sFRPs), den *Wnt inhibitory factor 1* (WIF-1) sowie Cerberus umfasst, inhibieren direkt über extrazelluläre Bindung an Wnt, während die Partizipanden der zweiten Klasse, Mitglieder der Dickkopf (Dkk)-Familie, ihre inhibitorische Wirkung über Interaktionen mit dem Wnt-Rezeptor-Komplex ausüben.

Die Gruppe der sFRPs umfasst in Vertebraten fünf Proteine, die größtenteils in der Zellmembran und der extrazellulären Matrix lokalisiert sind (Finch, He et al. 1997). Sie besitzen eine N-terminale Region, die strukturelle Verwandtschaft zu der *cysteine rich domain* (CRD) der Fzd-Rezeptoren aufweist (vgl. B.3.1). Über die antagonisierende Funktion dieser Proteinklasse existieren teils kontroverse Resultate: Lin et al. zeigten eine inhibierende Interaktion der Wnt-Proteine mit der CRD der sFRPs (Lin, Wang et al. 1997), während Uren et al. (Uren, Reichsman et al. 2000) die inhibitorische Komponente des Proteins im C-Terminus lokalisierten. Ferner konnte für sFRP1 auch eine Interaktion mit Frizzled-Proteinen (Fzd6) unter Formierung funktionsloser Komplexe beobachtet werden (Bafico, Gazit et al. 1999). Neben der hemmenden Komponente werden den sFRPs in niedrigeren Konzentrationsbereichen auch agonistische Wirkungen zugeschrieben, wobei die exakte Wirkungsweise noch unklar ist (Uren, Reichsman et al. 2000), so dass neuere Publikationen dieser Gruppe den sFRPs vorzugsweise modulatorische statt strikt inhibierende Funktionsweisen zuweisen (Bovolenta, Esteve et al. 2008).

Der WIF-1 besitzt keine CRD, sondern entfaltet seine Wnt-bindende Wirkung durch seine WIF-Domäne, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Extrazellulärkomponente der RYK-Familie (vgl. B.3.3) besitzt. Für WIF-1 konnte eine inhibierende Wirkung sowohl auf *Xenopus* Wnt8 (XWnt8) als auch auf Wingless (Wg) nachgewiesen werden (Hsieh, Kodjabachian et al. 1999). Man geht hierbei von einer Interaktion der WIF-Domäne mit der Palmitoylkette des Wnt-Proteins aus (Liepinsh, Banyai et al. 2006).

Im Gegensatz zur erstgenannten Subklasse der inhibitorischen Proteine, welche nicht-selektiv sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Signalweg hemmen, wirken Dickkopf-Proteine selektiv auf das Wnt/ β -Catenin-vermittelnde Signalosom (vgl. B.3.4). Diese Subgruppe umfasst die Dickkopf-Proteine Dkk1, Dkk2, Dkk3, Dkk4 und Soggy (Sgy). Die Effekte dieser Proteine auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg unterscheiden sich signifikant voneinander: Dkk3 zeigt keinerlei Effekt auf den kanonischen Signalweg (Krupnik, Sharp et al. 1999), während Dkk1 und Dkk4 in Kooperation mit den Transmembranproteinen Kremen1 und Kremen2 (Krm1, Krm2) eine endozytische Internalisierung des LRP-Rezeptors und damit eine Inhibition des kanonischen Signalweges herbeiführen können (Mao, Wu et al. 2002). Hierbei spielt der N-Terminus von LRP eine entscheidende Rolle, da Mutanten ohne diesen extrazellulären Abschnitt keiner Endozytose und Degradation unterliegen (Brennan, Gonzalez-Sancho et al. 2004). Über die Funktion von Dkk2 existieren kontroverse Ergebnisse, so konnte einerseits eine Inhibition, andererseits bei ektopischer Expression aber auch eine Aktivierung des kanonischen Signalweges in *Xenopus* gezeigt werden (Wu, Glinka et al. 2000; Brott and Sokol 2002).

B.3 Membrangebundene Komponenten des kanonischen *Wnt-Signalings*

B.3.1 Die Gruppe der Fzd-Rezeptoren

B.3.1.1 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Fzd-Rezeptoren

Die Gruppe der Fzd-Rezeptoren (Fzds) wurde erstmals im Zusammenhang mit Experimenten mit *Drosophila melanogaster* erwähnt. Mutationen der codierenden Abschnitte für die Rezeptoren Dfzd1 und Dfzd2 im Genom von *Drosophila* zeigten einen Phänotyp mit gestörter, unpolarer Ausrichtung der Haare auf den Flügeln. (Vinson and Adler 1987; Chan, Karpf et al. 1992).

Die Gruppe der Fzd-Rezeptoren spielt eine essentielle Rolle in der Übertragung des Wnt-Signals, was erstmals in Experimenten mit *Drosophila* nachgewiesen wurde. In diesen Organismen konnte eine Stabilisierung des β -Catenin-Homologs Amardillo (Arm) in Folge einer Bindung von Wingless (Wg) an den *Drosophila* Fzd2 (DFzd2)-Rezeptor gezeigt werden (Bhanot, Brink et al. 1996). Weitere Versuche in Vertebraten (Yang-Snyder, Miller et al. 1996) zeigten ähnliche Ergebnisse, die Interaktion zwischen den humanen Wnt-Proteinen und Fzd-Rezeptoren ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt und integraler Bestandteil der Forschung im *Wnt-Signaling*.

Im Menschen wurden bislang zehn für Fzd-Rezeptoren codierende Genomabschnitte, die korrespondierenden mRNAs sowie die entsprechenden Proteine entdeckt und charakterisiert (Wang, Samos et al. 1997; Sagara, Toda et al. 1998; Tokuhara, Hirai et al. 1998; Kirikoshi, Sagara et al. 1999; Koike, Takagi et al. 1999; Kirikoshi, Koike et al. 2000; Saitoh, Hirai et al. 2001; Saitoh, Hirai et al. 2001). Die verschiedenen Rezeptoren lassen sich an Hand bioinformatischer Analysen vier verschiedenen phylogenetischen Subgruppen zuordnen, die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz variiert hierbei von ca. 75 % (Fzd1, Fzd2, Fzd7) bis zu rund 50 % (Fzd3, Fzd6). Die Sequenzidentität zwischen den Subgruppen liegt mit rund 20 – 40 % in vergleichsweise niedrigen Bereichen (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003).

Zur Gruppe der Fzd-Rezeptoren wird auch Smoothened (Smo), ein Rezeptor des Hedgehog-Signalweges gezählt, der mit Fzd2 jedoch eine Sequenzhomologie von nur 24 % aufweist (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003).



Abb. B.1: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Fzd-Rezeptoren (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003). Die Prozentzahl beschreibt die Aminosäurehomologie innerhalb einer Untergruppe.

Alle Fzd-Rezeptoren weisen typischerweise sieben hydrophobe Regionen mit α -helikaler Sekundärstruktur auf. Vergleichbare Strukturen sind auch in der Aminosäuresequenz G-Protein-

gekoppelter Rezeptoren (GPCR) nachweisbar und bilden dort sieben membranspannende Segmente, die den Rezeptor in der Lipiddoppelschicht verankern (Foord, Bonner et al. 2005).

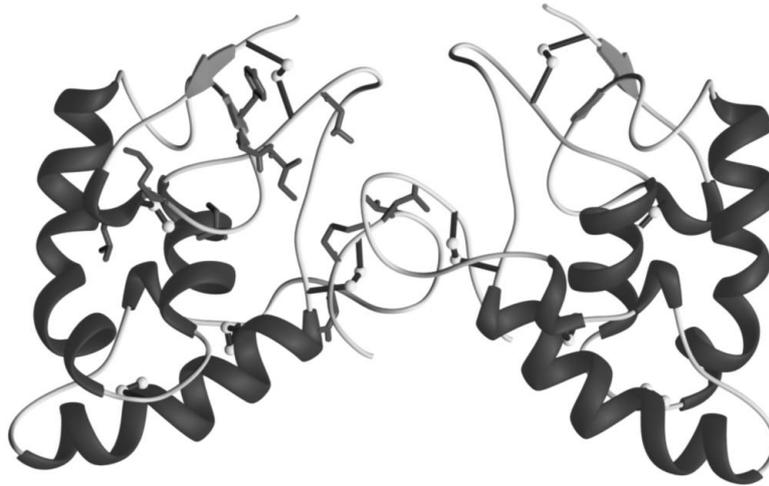
N-terminal befindet sich eine rund 30 Aminosäuren lange Signalsequenz, die im Zuge der Translation des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum abgespalten wird. Den N-Terminus des synthetisierten Proteins bildet die sog. *cysteine rich domain* (CRD), die rund 120 - 150 Aminosäuren umfasst. In dieser CRD sind zehn konservierte Cysteine lokalisiert, die untereinander Disulfidbrücken eingehen und somit die Tertiärstruktur der CRD prägen. Die CRD stellt eine essentielle Struktur zur Bindung der Wnt-Proteine dar, was in den ersten funktionellen Analysen der CRD gezeigt werden konnte (Hsieh, Rattner et al. 1999). Die Kristallstrukturen der CRD des murinen Fzd8-Rezeptors (mFzd8) sowie des *secreted Frizzled-related peptides 3* (sFRP3) wurden 2001 von Dann et al. aufgeklärt (Dann, Hsieh et al. 2001). Hierbei wurden potentielle N-terminale Glykosylierungsstellen mutiert (George, Ruoho et al. 1986), was jedoch keine Änderung der Rezeptoraffinität zum *Xenopus* Wnt8-Protein (XWnt8) zur Folge hatte (Dann, Hsieh et al. 2001). Über mögliche N-terminale Glykosylierungen der CRD existieren bislang weder strukturelle noch funktionelle Erkenntnisse, in *Drosophila* konnten im Immunoblot jedoch drei verschiedene Banden nachgewiesen werden, die verschiedene Glykosylierungsmuster repräsentieren könnten (Hsieh, Rattner et al. 1999).

B.3.1.2 Aufbau der Fzd8-CRD

Die Kristallstrukturen der mFzd8-CRD und der sequenzidentischen humanen Fzd8-CRD (hFzd8-CRD) umfassen 127 Aminosäuren. Sie bilden N-terminal eine aus zwei Domänen bestehende β -Faltblattstruktur, welche durch einen in Folge einer Disulfidbrücke entstehenden Knoten unterbrochen wird. C-terminal formieren sich in der CRD vier α -Helices unterschiedlicher Länge (vgl. Abb. B.2).

In der Gelfiltrationschromatografie zeigte sich die *cysteine rich domain* von mFzd8 in Konzentrationsbereichen von 100 μ M als Monomer vorliegend, im Kristall organisierten sich die CRDs in Dimeren mit einer potentiellen Interaktionsdomäne im C-terminalen Teil dieses Sequenzabschnitts (vgl. Abb. B.2). Da die Konzentration im Kristall mit 50 mM deutlich über dem Niveau der Gelfiltrationschromatografie liegt, kann von einer konzentrationsabhängigen Homodimerisierung der CRDs mit einer Dissoziationskonstante zwischen 100 μ M und 50 mM ausgegangen werden (Dann, Hsieh et al. 2001). Interessanterweise liegen einige der von Dann et al. identifizierten Residuen, die die Bindung von Wnt inhibieren (siehe Abb. B.2 und die roten Strukturen des linken Monomers in Abb. B.4) im Bereich der potentiellen Dimerisierungsdomänen der CRDs. Diese Überlappung von Wnt-Bindungsabschnitten und CRD-Dimerisierungsstrukturen lassen eine Di- oder Oligomerisierung der Fzd-Rezeptoren bei Wnt-Bindung erwarten, auch wenn dies bislang noch nicht bewiesen werden konnte (Hollien 2001).

Abb. B.2: mFzd8-CRD-Dimer (Hollien 2001).



Pfeile: β -Faltblattstruktur
 Spiralen: α -Helices
 Stäbe und Kugeln:
 Disulfidbrücken

Hsieh et al. sowie Dann et al. konnten weiterhin die für die Wnt-Bindung essentiellen Reste der CRD identifizieren (Hsieh, Rattner et al. 1999; Dann, Hsieh et al. 2001). Sie bedienten sich hierzu dreier verschiedener Techniken: Durch die punktuelle Insertion des Tripeptids Gly – Ser – Gly (GSG) in die Primärstruktur der CRD an insgesamt 34 unterschiedlichen Stellen und anschließender Bestimmung der Bindungseffektivität konnten 18 Insertionen identifiziert werden, die eine verminderte oder vollständig unterdrückte Bindung des XWnt8-Liganden aufwiesen; als Grund der veränderten Bindungseigenschaften können sowohl eine direkte Modifikation der Bindungsstelle als auch globale Effekte durch Änderungen in Sekundärstrukturen in Betracht gezogen werden. Ferner führten Dann et al. sowohl einen Ala-Scan, in welchem Oberflächenstrukturen *en bloc* zu Alaninen mutiert wurden, als auch einen Ho-Scan, in welchem strukturverschiedene Oberflächenregionen aus dem nicht-XWnt8-bindenden mFzd6-Protein in die mFzd8-CRD integriert wurden, durch. Beide Scans zeigten verminderte Bindung in einer Oberflächenstruktur der CRD, die sich wiederum aus drei Teilen der Primärsequenz zusammensetzte (vgl. Abb. B.2, Abb. B.3 und Abb. B.4). Die gemessenen Bindungsaffinitäten zwischen XWnt8 und der CRD des mFzd8 lagen hierbei im Bereich von 9 ± 2 nM (Hsieh, Rattner et al. 1999).

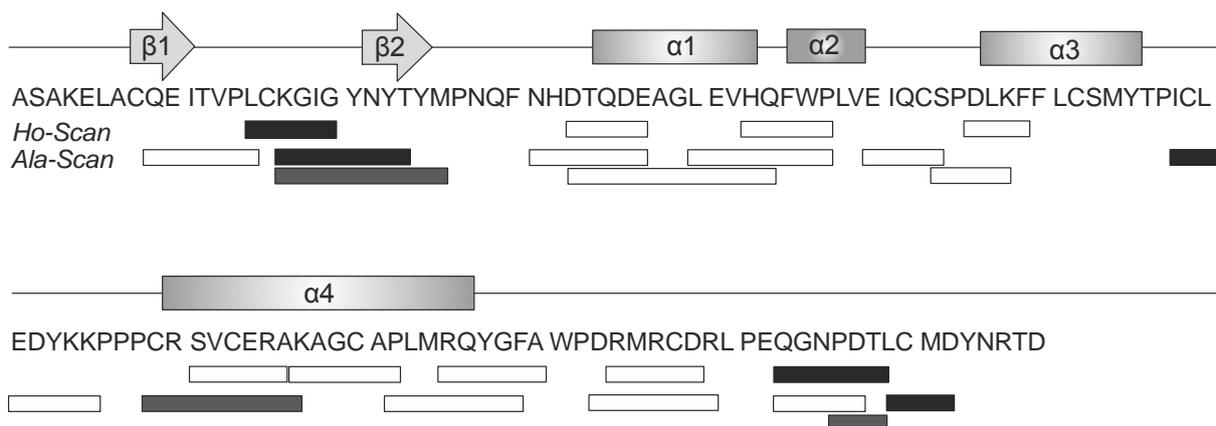


Abb. B.3: Primärsequenz der CRD von mFzd8 und Ergebnisse des Ho- und Ala-Scans (Dann, Hsieh et al. 2001). Regionen mit vollständig inhibierter Bindung sind schwarz, mit reduzierter Bindung grau und unveränderter Bindung weiß dargestellt.

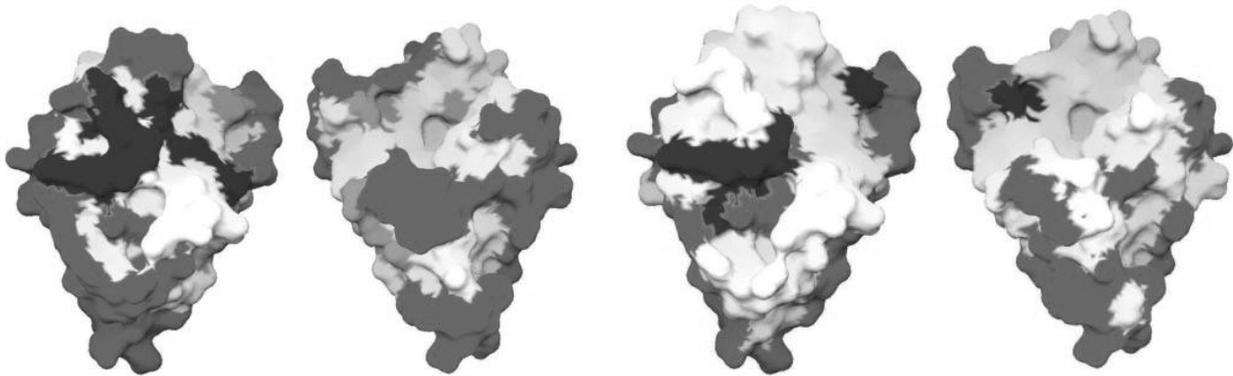


Abb. B.4: Ergebnisse des Ala-Scans (links) und des Ho-Scans (rechts) (Dann, Hsieh et al. 2001). Die Orientierung der jeweils linken Struktur entspricht der Ansicht aus Abb. B.2, die jeweils rechte Struktur entspricht der CRD nach 180°-Drehung um die vertikale Achse. Regionen mit vollständig inhibierter Bindung sind dunkelgrau, mit reduzierter Bindung hellgrau und unveränderter Bindung mittelgrau dargestellt.

Weitere Experimente mit DFzd1 und Wg spezifizierten die Rolle der CRD für eine stabile Signalübertragung ins Zellinnere. Ein Rezeptorchimäre, in welcher die CRD gegen die Wg-bindende WIF-Sequenz ausgetauscht wurde, konnte ebenfalls eine Aktivierung des kanonischen Signalweges - wenngleich nicht in gleichwertigem Ausmaße wie der native Rezeptor - induzieren (Povelones and Nusse 2005). Auch ein Fusionskonstrukt, bei der Wg an die Stelle der CRD und somit in unmittelbare Nähe des Fzd-Rezeptors inseriert wurde, konnte eine Aktivierung des kanonischen *Signalings* erwirken (Povelones and Nusse 2005). Diese Ergebnisse akzentuieren die Funktion der CRD, ihre Liganden in räumlicher Nähe zur Zellmembran zu fixieren, um eine Signalübertragung zu ermöglichen. Dass Fzd aber nicht allein als Ligandenfänger fungiert, konnte mit Hilfe von in der Membran mittels eines GPI-Ankers fixierter CRDs gezeigt werden, die als nicht-funktioneller Rezeptor fungierten und keine Signaltransduktion ermöglichten (Cadigan, Fish et al. 1998). Diese Ergebnisse zeigten, dass auch C-terminal der CRD gelegene Strukturen des Fzd-Proteins essentielle Prozesse in der Signaltransduktion vermitteln, wie im Folgenden gezeigt werden soll.

Zwischen N- und C-Terminus des Rezeptors befinden sich, wie bereits beschrieben, sieben hydrophobe Transmembrandomänen (TM) mit typischer α -helikaler Struktur. Die zwischen diesen Domänen lokalisierten Aminosäureabschnitte bilden Schleifen, sog. *Loops*, die im Vergleich zu anderen GPCRs sehr kurz sind (Wang, Liu et al. 2006). Die *Loops* zwischen TM1 und TM2, zwischen TM3 und TM4 und zwischen TM5 und TM6 sind hierbei in das Zellinnere gerichtet und werden mit *iLoop1*, *iLoop2* und *iLoop3* bezeichnet; die anderen Abschnitte bilden in den Extrazellulärraum ausgerichtete Schleifen. Zwischen der ersten und der zweiten extrazellulären Schleife befindet sich eine Disulfidbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinen, die ein typisches Merkmal von GPCRs darstellt (Moxham and Malbon 1985). Cong et al. zeigten in Mutagenesestudien für Fzd5, dass spezifische Reste in *iLoop1* und *iLoop3* eine wichtige Rolle in der β -Catenin-Stabilisierung und somit der Aktivierung des kanonischen Signalweges spielen; *iLoop2* scheint in der Signalübertragung eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Cong, Schweizer et al. 2004; Wang, Liu et al. 2006).

Die Länge der C-terminalen Aminosäurekette variiert erheblich zwischen den verschiedenen humanen Fzd-Rezeptoren, Fzd1 weist mit 24 Aminosäuren den kürzesten, Fzd6 mit 212 Aminosäuren den längsten C-Terminus auf. Zwischen den verschiedenen Fzd-Rezeptoren besitzt dieser Abschnitt die höchste Divergenz in der Aminosäuresequenz; die N-terminal gelegenen Sequenzabschnitte des C-Terminus zeigen noch die größte Sequenzhomologie (Wang, Liu et al. 2006). Das Fehlen eines in GPCRs häufig in unmittelbarer Nähe zur siebten Transmembrandomäne vorliegenden Cystein-

Seitenrestes, der eine Palmytolierungsstelle darstellt, macht das Auftreten eines vierten intrazellulären *Loops* im Bereich des C-Terminus unwahrscheinlich (Wang, Liu et al. 2006).

Zwei Aminosäuren *downstream* des siebten Transmembranabschnitts besitzen Fzd-Rezeptoren eine typische Domäne der Aminosäurefolge Lys-Thr-X-X-X-Trp, das sog. KTXXXW-Motiv. Umbhauer et al. konnten in *Drosophila* zeigen, dass dieses Motiv eine essentielle Komponente zur Übertragung des Wnt/ β -Catenin-Signals ins Zellinnere darstellt (Umbhauer, Djiane et al. 2000). Die Sequenz interagiert zur Signalübertragung hierbei mit der PDZ-Domäne von Dishevelled, rekrutiert ebendieses an die Zellmembran und spielt auf diesen Wege eine wichtige Rolle in der Weiterleitung des Signals in das Zellinnere (Wong, Bourdelas et al. 2003; Kay and Kehoe 2004).

Das oben genannte Motiv ist in vielen Spezies hochkonserviert, lediglich DFzd3 sowie mom-5 (ein Fzd-Homolog in *C. elegans*) weisen eine Punktmutation in dem Motiv auf, welche mit einer deutlich verminderten Signaltransduktionsfähigkeit im kanonischen Signalweg einhergeht (Rocheleau, Downs et al. 1997; Thorpe, Schlesinger et al. 1997; Sato, Kojima et al. 1999).

Dass das KTXXXW-Motiv jedoch nicht allein zur Signaltransmission des kanonischen Signalweges ausreicht, zeigt sich am Beispiel des Fzd2-Rezeptors der Ratte (rFzd2), welcher zwar das KTXXXW-Motiv, jedoch keine Kapazität zur Übertragung kanonischer Wnt-Signale ins Zellinnere besitzt (Kuhl, Sheldahl et al. 2000).

Ferner besitzen einige Fzd-Rezeptoren die typische Aminosäurefolge Ser/Thr-X-Val am C-terminalen Ende des Proteins. Dieses Motiv wird ebenfalls als Interaktionsstelle mit PDZ-Domänen intrazellulärer Proteine angesehen (Kay and Kehoe 2004). Diese Aminosäuresequenz findet sich in der Gruppe der humanen Fzd-Rezeptoren in Fzd1, Fzd2, Fzd4, Fzd5, Fzd7, Fzd8 und Fzd10; Fzd3, Fzd6 und Fzd9 besitzen das S/T-X-V-Motiv hingegen nicht.

Den Fzd-Rezeptoren wird über die Rekrutierung von Dishevelled (Dvl, in *Drosophila*: Dsh) hinaus ferner eine Interaktion mit G-Proteinen zugeschrieben. Hierbei propagieren *in silico*-Analysen eine Interaktion mit den Proteinen der $G_{\alpha i/o}$ -Gruppe, $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha s}$ (Moller, Vilo et al. 2001). *In vivo*-Studien zeigten eine Sensitivität des Fzd1-vermittelten kanonischen Wnt-Signalweges auf Pertussistoxin, das selektiv die Proteine der $G_{\alpha i/o}$ -Gruppe, in diesem Falle $G_{\alpha o}$, hemmt. Wnt/ β -Catenin-Signaling konnte ferner auch durch *Knockdown* des $G_{\alpha q}$ -Proteins effektiv blockiert werden (Liu, DeCostanzo et al. 2001). *Loss-of-function*-Mutationen in Armadillo oder Dsh, Überexpression von GSK3 β und Einsatz von mutierten $G_{\alpha o}$ -Proteinen in *Drosophila* propagierten die Funktionsweise von Fzds als *guanine nucleotide-exchange factors* (GEF) und lokalisierten die G-Protein-Aktivität *upstream* von Dishevelled (Katanaev, Ponzielli et al. 2005). Die Hemmung des Fzd2-vermittelten nicht-kanonischen Signalweges konnte ebenfalls durch Pertussistoxin und durch *Knockdown*-Experimente von $G_{\alpha o}$ und $G_{\alpha t2}$ erreicht werden (Liu, Liu et al. 1999; Ahumada, Slusarski et al. 2002), was die Rekrutierung unterschiedlicher G-Proteine je nach zu aktivierendem Signalweg aufzeigt.

Die Gruppe der Fzd-Rezeptoren (und Smo) weist sowohl auf struktureller als auch auf funktioneller Ebene eine Vielzahl an Eigenschaften typischer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf, so dass sie, zusammen mit den TASTE2-Rezeptoren zu einer Subgruppe der GPCRs zusammengefasst wurden (Morris and Malbon 1999; Foord, Bonner et al. 2005).

B.3.2 *Low-density-lipoprotein-related protein (LRP) 5 und 6*

Die *low-density-lipoprotein-related proteins* 5 und 6 (LRP5 und LRP6) spielen ebenfalls eine integrale Rolle in der Signaltransduktion des Wnt-Signals in das Zellinnere. Humanes LRP5 wurde im Zuge seiner Homologie zum *low-density-lipoprotein receptor* (LDLR) entdeckt und isoliert (Dong, Lathrop et al. 1998; Hey, Twells et al. 1998; Kim, Inagaki et al. 1998); LRP6 wurde auf der Basis seiner Ähnlichkeit zu LRP5 identifiziert (Brown, Twells et al. 1998). Mutanten in *Drosophila* mit ausgeschalteter Arrow-Expression (Arr, LRP-Homolog) zeigten einen Phänotyp ähnlich einer Wg-Mutation (Wehrli, Dougan et al. 2000), auch in LRP6-defizienten Mäusen konnten ähnliche Erscheinungen gezeigt werden (Pinson, Brennan et al. 2000). In *Xenopus* konnte die Lokalisation der Wnt-Signalkomponente LRP5/6 *upstream* bisher bekannter zytoplasmatischer Proteine des kanonischen Signalweges spezifiziert werden (Tamai, Semenov et al. 2000; Wehrli, Dougan et al. 2000). Eine Beeinflussung der nicht-kanonischen Signalwege durch Arr oder LRP6 konnten sowohl in *D. melanogaster* als auch in *Xenopus* nicht nachgewiesen werden (Wehrli, Dougan et al. 2000).

Strukturell besitzen LRP5 und LRP6 eine 73-prozentige Homologie in der extrazellulären und eine 64-prozentige Übereinstimmung der intrazellulären Domäne. Auf funktioneller Basis zeigten LRP6^{-/-}-Mutanten im Mausmodell ein gravierendes Krankheitsbild mit letalen Störungen der Embryogenese (Pinson, Brennan et al. 2000), während LRP5^{-/-}-Mutanten bei normaler Embryonalentwicklung später Osteoporose (Kato, Patel et al. 2002) und metabolische Störungen (Fujino, Asaba et al. 2003; Magoori, Kang et al. 2003) entwickelten. Der nochmals verschärfte Phänotyp in LRP6^{-/-}-LRP5^{-/-}-Mäusen lässt jedoch auf eine partielle funktionelle Redundanz der beiden Rezeptoren schließen (Kelly, Pinson et al. 2004).

LRP5/6 (und Arrow) sind Typ I-Transmembranproteine mit einer singulären membranspannenden Domäne. Der extrazellulär gelegene N-Terminus umfasst hierbei den Hauptteil des Proteins. Er besteht aus drei typischen Strukturen (He, Semenov et al. 2004): Der YWTD-Propeller-Domäne, die jeweils 43 - 50 Aminosäuren umfasst und sich in sechsblättrigen propellerartigen Strukturen zusammensetzt (vgl. Abb. B.5); der *epidermal-growth-factor (EGF)-like*-Domäne und der *LDLR type A*-Domäne. Die vier YWTD-Propeller-Domänen werden hierbei von jeweils einer *EGF-like*-Domäne gefolgt; vor dem Übergang zur Transmembranregion liegen drei *LDLR type A*-Domänen, die als Lipoprotein-Bindungsstellen fungieren können und somit eine potentielle Interaktionsstelle mit den palmylierten Wnt-Proteinen (vgl. B.3.4) darstellen könnten. Aber auch die Propeller-*EGF-like*-Domänen bieten Interaktionsstellen für extrazelluläre Proteine (He, Semenov et al. 2004).

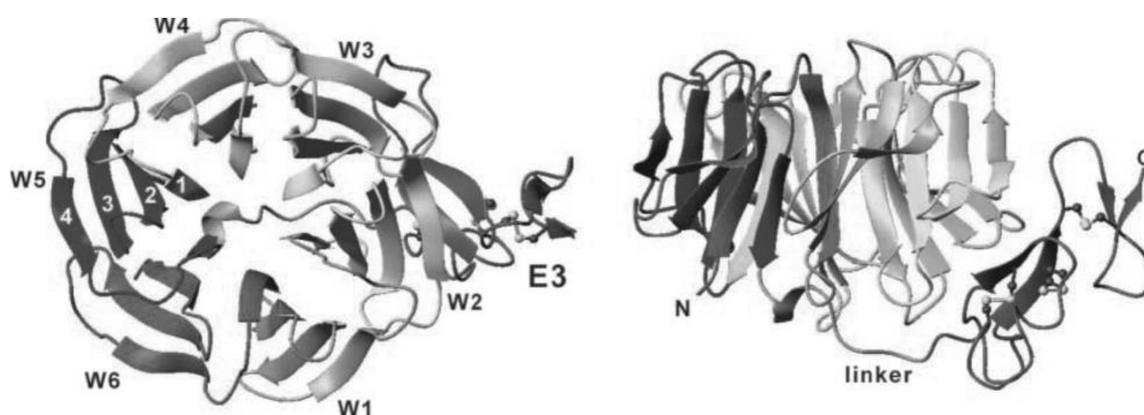


Abb. B.5: Die YWTD-Propeller-Domäne (W1 – W6) und die *EGF-like*-Domäne (E3) (He, Semenov et al. 2004).

Eine Interaktion der N-terminalen extrazellulären Domäne mit verschiedenen Wnt-Proteinen konnte bereits experimentell für Wnt1, Wnt4 (mit LRP5) (Mao, Wu et al. 2001; Kato, Patel et al. 2002) sowie für Wnt1, Wnt3a, Wnt9b und XWnt8 (mit LRP6) (Tamai, Semenov et al. 2000; Itasaki, Jones et al. 2003; Liu, Bafico et al. 2003; Bourhis, Tam et al. 2010) nachgewiesen werden; die Bindungen zeigten sich jedoch deutlich schwächer als zwischen Fzd- und Wnt-Proteinen (He, Semenov et al. 2004). Die Bindung verschiedener Wnt-Proteine am N-Terminus von LRP6 zeigte keine spezifische Fixation an eine bestimmte Stelle auf LRP6: Während Wnt3a charakteristischerweise im Bereich der dritten und vierten YWTD-Propeller-Domäne band, zeigte Wnt9b eine Präferenz für die erste und zweite Domäne (Bourhis, Tam et al. 2010). Auch für eine weitere Zahl an Wnt-Proteinen konnte unlängst die LRP6-Bindungsstellen genauer charakterisiert werden (vgl. Abb. B.6).

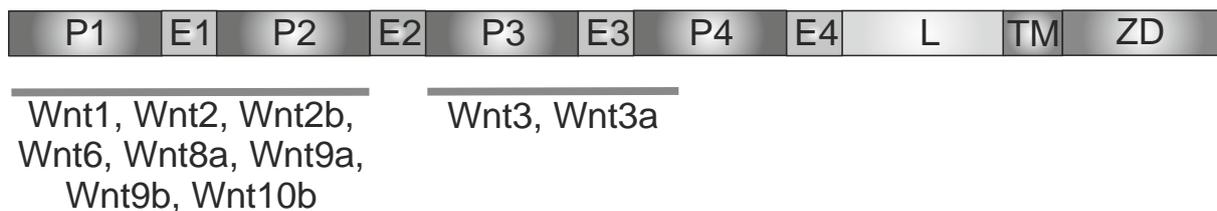


Abb. B.6: Bindungsstellen für Wnt-Proteine auf der extrazellulären Domäne von LRP6 (Bao, Zheng et al. 2012). Abkürzungen: P1 – P4, YWTD-Propeller-Domänen; E1 – E4, *EGF-like*-Domänen; L, *LDLR type A*-Domänen; TM, Transmembrandomänen; ZD, zytoplasmatische Domäne.

Die intrazelluläre Domäne der LRPs weist fünf Sequenzen der Aminosäurefolge Pro–Pro–Pro–Ser/Thr–Pro auf, diese werden als PPP(S/T)P-Motiv bezeichnet. Die OH-Gruppe des Serins oder des Threonins stellen hierbei potentielle intrazelluläre Phosphorylierungsstellen dar. Rezeptoren mit Mutationen des Serins/Threonins in den PPP(S/T)P-Motiven agieren ebenso wie LRPs ohne C-Terminus als dominant negative Rezeptoren, während der membranverankerte N-Terminus ohne Extrazellulardomäne als konstitutiv aktiver Rezeptor fungiert (He, Semenov et al. 2004).

B.3.3 Atypische Rezeptoren des Wnt-Signalings: Ror2 und RYK

Neben den Fzd- und den LRP-Rezeptoren wurden noch zwei weitere Rezeptoren aus der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, Ror2 und RYK, mit dem Wnt-Signalweg in Assoziation gebracht.

Ror2 besitzt eine Fzd-ähnliche CRD-Domäne (Xu and Nusse 1998) sowie eine intrazelluläre Kinasedomäne, die aber für die Übertragung auf intrazelluläre Signalkaskaden entbehrlich erscheint (Hikasa, Shibata et al. 2002). Ror2-defiziente Mäuse zeigten einen Phänotyp, der vergleichbar mit Wnt5a-Mutanten ist (Oishi, Takeuchi et al. 1999). Ein Zusammenhang konnte durch den Nachweis einer Wnt5a-abhängigen Aktivierung des nicht-kanonischen JNK-Signalweges über Ror2 gezeigt werden, welcher für die Steuerung der Zellpolarität in der Morphogenese in *Xenopus laevis* verantwortlich ist (Unterseher, Hefele et al. 2004). Ferner konnte durch Ror2-Überexpressionsexperimente eine inhibierende Funktion des Rezeptors auf den kanonischen Signalweg nachgewiesen werden (vgl. B.6) (Mikels and Nusse 2006).

RYK besitzt eine extrazellulär gelegene, N-terminale WIF-Domäne zur Interaktion mit Wnt-Proteinen (Patthy 2000) sowie eine intrazelluläre PDZ- sowie eine inkomplette Tyrosinkinasendomäne. In Experimenten mit humanen Zellen konnte eine Interaktion mit Wnt1 und Wnt3a mit nachfolgender Aktivierung des kanonischen Signalweges gezeigt werden. RYK bildet hierbei mit Fzd und Wnt einen trimeren Komplex und aktiviert hierdurch eine Signaltransduktion via Dishevelled (Dvl) ins Zellinnere (Lu, Yamamoto et al. 2004).

B.3.4 Interaktion der Rezeptorstrukturen mit intrazellulären Komponenten

Die Interaktion des extrazellulären Wnt-Proteins mit den Fzd-Rezeptoren und den LRP-Co-Rezeptoren in einem ternären Komplex (Tamai, Semenov et al. 2000) ist der Initiator der Transduktion des kanonischen Wnt-Signals in das Zellinnere. Die aktivierte $\beta\gamma$ -Komponente der G-Proteine kann danach Dishevelled (Dvl) an die Zellmembran rekrutieren (Egger-Adam and Katanaev 2010), welches über seine PDZ-Domäne eine Bindung mit den Fzd-Rezeptoren eingeht (Wong, Bourdelas et al. 2003), wobei dieses an der Zellmembran Fzd-vermittelt phosphoryliert und somit aktiviert wird (Umbhauer, Djiane et al. 2000). Über die DIX-Domäne kann Dvl ferner oligomerisieren und auf diese Art weitere Fzd- und LRP-Rezeptoren rekrutieren (Schwarz-Romond, Fiedler et al. 2007). Das *Clustering* von Rezeptorstrukturen über Dvl-Oligomerisierung wird von einer Axin-GSK3 β -Rekrutierung an die Zellmembran gefolgt (Cliffe, Hamada et al. 2003), bei diesem Vorgang scheinen sowohl die α -Untereinheit der G-Proteine als auch die zur Heteropolymerisierung befähigte DIX-Domänen von Dvl und Axin zu partizipieren. Sowohl GSK3 β als auch die in der Membran verankerte Caseinkinase 1 γ (CK1 γ) bewirken eine Phosphorylierung der C-terminalen PPP(S/T)P-Domänen und CK-Domänen der LRP-Co-Rezeptoren (Davidson, Wu et al. 2005; Zeng, Tamai et al. 2005). Die polyphosphorylierten intrazellulären Enden der LRPs stellen eine Andockdomäne für weitere Axin-Moleküle dar (Tamai, Zeng et al. 2004), was eine Translokation von Axin an die Zellmembran bewirkt (Mao, Wang et al. 2001). Da Axin nur in sehr geringen Mengen im Zytoplasma vorliegt, bewirkt diese Rekrutierung einen Zerfall des intrazellulären Degradationskomplexes und somit die Stabilisierung von β -Catenin (vgl. B.4.6).

Der Komplex aus Fzd-Rezeptoren, phosphorylierten LRPs, Dvl, Axin und weiteren membranannahen Komponenten den *Wnt-Signalings* wird auch als Signalosom bezeichnet (Bilic, Huang et al. 2007).

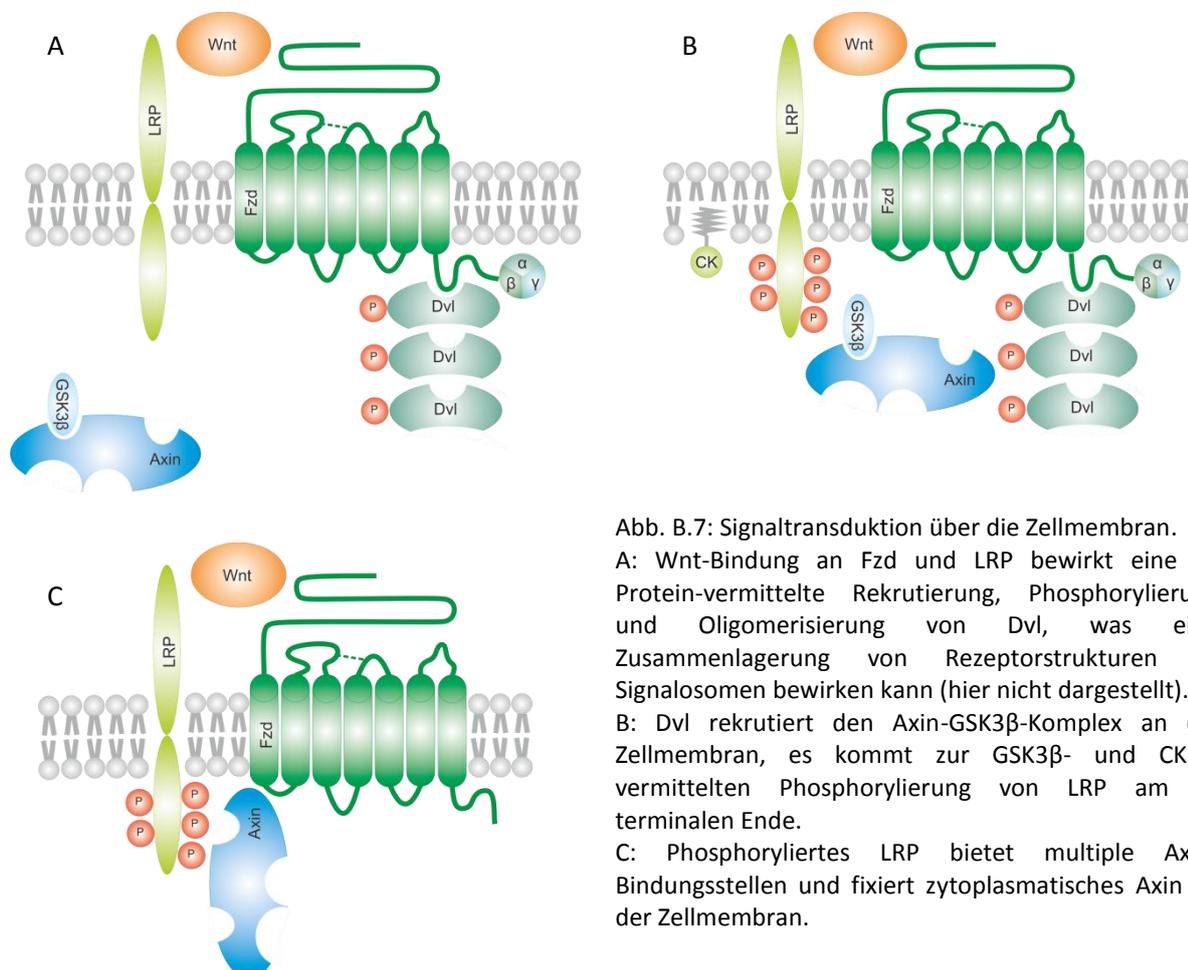


Abb. B.7: Signaltransduktion über die Zellmembran.
 A: Wnt-Bindung an Fzd und LRP bewirkt eine G-Protein-vermittelte Rekrutierung, Phosphorylierung und Oligomerisierung von Dvl, was eine Zusammenlagerung von Rezeptorstrukturen zu Signalosomen bewirken kann (hier nicht dargestellt).
 B: Dvl rekrutiert den Axin-GSK3 β -Komplex an die Zellmembran, es kommt zur GSK3 β - und CK1 γ -vermittelten Phosphorylierung von LRP am C-terminalen Ende.
 C: Phosphoryliertes LRP bietet multiple Axin-Bindungsstellen und fixiert zytoplasmatisches Axin an der Zellmembran.

B.4 Zytosolische Komponenten des kanonischen Wnt-Signalings

B.4.1 Dishevelled

Das Protein Dishevelled (Dvl in Vertebraten, Dsh in *Drosophila*) spielt, wie in B.3.4 und B.6 beschrieben, eine essentielle Rolle sowohl in der Transduktion des kanonischen als auch nicht-kanonischer Signale. In Vertebraten existieren drei Subtypen des Dvl-Proteins, Dvl1, Dvl2, und Dvl3 (Semenov and Snyder 1997), die in *Knockdown*-Experimenten zwar unterschiedliche phänotypische Erscheinungsbilder offerieren, aber auch eine partielle funktionelle Redundanz aufweisen (Gao and Chen 2010). Dvl besitzt drei charakteristische Domänen, die als Interaktionspartner mit anderen Proteinen dienen können. Der N-terminalen DIX-Domäne wird eine wichtige Funktion in der Polymerisierung der Dvl-Proteine und der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (vgl. B.3.4) zugeschrieben (Wharton 2003), die PDZ-Domäne kann u.a. mit Fzd interagieren (Wong, Bourdelas et al. 2003) und die DEP-Domäne scheint eine Assoziation mit Membranlipiden zu vermitteln (Simons, Gault et al. 2009).

Der Phosphorylierungsstatus von Dvl spielt eine wichtige Rolle in der Aktivität des Wnt-Signalings; eine Casein-Kinase 1-vermittelte Phosphorylierung zeigte eine positive regulatorische Funktion auf den Signalweg. Aber auch Interaktionen von Dvl mit anderen Kinasen wie CK2 oder PAR-1 mit Einfluss auf die Signalübertragung wurden berichtet, während über die Dephosphorylierung des Proteins bislang kaum Ergebnisse vorliegen (Gao and Chen 2010).

B.4.2 Axin

Die Gruppe der Axin-Proteine besitzt zwei Subtypen, Axin1 (862 Aminosäuren) und Axin2 (843 Aminosäuren). Axin bietet eine N-terminale RGS-Domäne, welche als Bindestelle für APC (s.u.) angesehen wird (Kimelman and Xu 2006). Darüber hinaus offeriert Axin eine hydrophobe Interaktionsstelle für GSK3 β (Dajani, Fraser et al. 2003), eine zentrale Bindungsstelle für β -Catenin sowie eine C-terminale Bindestelle für CK1 α (Kimelman and Xu 2006). Axin stellt mit seinen multiplen Interaktionsdomänen das Rückgrad des Degradationskomplexes, der deshalb auch als Axin-Komplex bezeichnet wird, dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Axin- β -Catenin-Bindungseigenschaften sowie die Axin-Halbwertszeit durch Phosphorylierungen an diesen Protein modifiziert werden können (Huang and He 2008). Dies ist nicht zuletzt deshalb interessant, da Axin im Vergleich zu den weiteren Proteinen des Degradationskomplexes die niedrigste zytoplasmatische Konzentration aufweist und somit auch eine zentrale regulatorische Komponente des kanonischen Wnt-Signalings darstellt (Lee, Salic et al. 2003).

Überexpressionsstudien von Axin in Fröschen zeigten eine Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges (Zeng, Fagotto et al. 1997); Axin spielt durch seine hemmende Wirkweise auch eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor, was in B.7 genauer beleuchtet wird.

B.4.3 APC

Das *Adenomatöse Polyposis Coli* (APC) - Gen codiert für das 2843 Aminosäuren umfassende gleichnamige Protein, das wie Axin eine Wnt-Signalweg-inhibierende Funktion innerhalb des Degradationskomplexes inne hat (Rubinfeld, Souza et al. 1993). Mutationen in APC können in der Mehrzahl kolorektaler Tumoren nachgewiesen werden (vgl. B.7). Das Protein besitzt Bindungsstellen für Axin, GSK3 β sowie β -Catenin. APC besitzt hierbei zwei räumlich getrennte Bindungsdomänen mit

unterschiedlicher Affinität für β -Catenin (15 AS und 20 AS), welche eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung und Ubiquitinierung des Zielproteins spielen, was vertiefend in B.4.6 erörtert wird (Kimelman and Xu 2006). Wie Axin verändert auch APC seine Bindungskapazität für β -Catenin mit dem Phosphorylierungsstatus (Xing, Clements et al. 2004). Interessanterweise konkurrieren Axin und APC um die identische Bindungsstelle an β -Catenin, was eine entscheidende Rolle in der Entfernung ubiquitinierten β -Catenins aus dem Degradationskomplex spielen könnte (Kimelman and Xu 2006).

B.4.4 Kinasen und Phosphatasen: GSK3 β , CK1 α , PP2A und PP1

Neben Axin und APC spielen auch Kinasen sowie Phosphatasen, die die Phosphorylierung sowohl des β -Catenins als auch der anderen Bestandteile des Degradationskomplexes kontrollieren können, in der Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges eine wichtige Rolle.

Sowohl die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) als auch die Casein-Kinase 1 α (CK1 α) wurden hierbei im Zusammenspiel mit den Komponenten den Degradationskomplexes als signalinhibierend charakterisiert. Beide Kinasen können an Axin, das Rückgrad des Abbaukomplexes, binden. GSK3 β und CK1 α verknüpfen unterschiedliche Reste des β -Catenins mit Phosphatgruppen (vgl. auch B.4.5 und B.4.6) und initiieren auf diese Weise den Abbau von β -Catenin und somit eine Inhibition der Weiterleitung des kanonischen Signals (Yost, Torres et al. 1996; Amit, Hatzubai et al. 2002; Liu, Li et al. 2002). Neben dieser Reaktion können diese Kinasen, insbesondere GSK3 β , auch Axin und APC phosphorylieren und auf diese Weise die Bindungsaffinität dieser Proteine zu β -Catenin erhöhen (Huang and He 2008). Interessanterweise erfüllt GSK3 β also sowohl eine im Zusammenspiel mit LRP-Co-Rezeptoren aktivierende als auch im Degradationskomplex inhibierende Funktion im Signalweg. Ein solches bivalentes Verhalten einer Kinase konnte bislang nur im Hedgehog-Signalweg in *Drosophila* gezeigt werden (Price 2006).

Zu den Gegenspielern der Kinasen werden die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und die Protein-Phosphatase 1 (PP1) gezählt, auch wenn deren Partizipation in der Regulation bislang unschärfer definiert ist. PP1 dephosphoryliert Axin, senkt hierbei die Affinität von Axin zu β -Catenin und trägt auf diese Weise zur Stabilisierung des β -Catenin-Levels bei (Luo, Peterson et al. 2007). PP2A bewirkt durch eine direkte Dephosphorylierung von β -Catenin eine Unterbrechung der Degradation und wirkt somit Wnt-signalunterstützend (Su, Fu et al. 2008). Für PP2A wurden jedoch auch Wnt-inhibierende Effekte nachgewiesen, welche mit den unterschiedlichen regulatorischen Untereinheiten der PP2A erklärt werden können (Chen, Yang et al. 2008).

B.4.5 β -Catenin

Zentraler Bestandteil des zyttoplasmatischen wie auch des nukleären Wnt-Signals ist das Molekül β -Catenin. β -Catenin (auch: CTNNB1, in *Drosophila*: Amardillo) ist ein 781 Aminosäuren großes Protein, welches in das Zytoplasma synthetisiert wird.

β -Catenin besitzt im Proteinzentrum die sog. *Amardillo repeats*, eine Superhelix, welche aus einer zwölfmaligen Wiederholung jeweils dreier zusammengelagerter α -Helices besteht und bereits in ihrer 3D-Struktur aufgeklärt werden konnte (Huber, Nelson et al. 1997). Die *Amardillo repeats* stellen eine Bindestelle für diverse andere Proteine wie APC, Axin oder auch die Gruppe der TCF/LEF-Proteine dar. Von zentraler Bedeutung sind hierbei zwei Lysine im Zentrum der *repeats*, welche elektrostatische Interaktionen mit den Bindeproteinen vermitteln (Graham, Weaver et al. 2000; Eklof Spink, Fridman et al. 2001). N-terminal der *Amardillo repeats* besitzt β -Catenin zwei

Ubiquitinierungsstellen (Lys¹⁹, Lys⁴⁹) sowie mindestens vier Phosphorylierungsstellen (Ser³³, Ser³⁷, Thr⁴¹, Ser⁴⁷), welche Angriffspunkte für GSK3 β und CK1 α darstellen (Yost, Torres et al. 1996; Liu, Li et al. 2002). An beiden Seiten der *Amarillo repeats* sind ferner Transaktivierungsdomänen lokalisiert, die in der intranukleären Transkriptionssteuerung durch Rekrutierung von Co-Aktivatoren partizipieren (vgl. auch B.5.2).

B.4.6 Intrazelluläre Transduktion des kanonischen Wnt-Signals

Der *Wnt-off*-Status: Phosphorylierung und Degradation von β -Catenin durch den Axinkomplex

Der Abbau von β -Catenin wird in einem Mehrstufen-Prozess, dessen Funktionsweise weitestgehend aufgeklärt wurde, vollzogen. In Abwesenheit eines stimulatorischen Wnt-Signals befindet sich Axin im Zytoplasma. Im Zellinneren bildet Axin durch Bindung an die entsprechenden Domänen einen Komplex mit GSK3 β , CK1 α und APC (Spink, Polakis et al. 2000; Liu, Li et al. 2002; Dajani, Fraser et al. 2003). Im folgenden Schritt bindet das im Zytoplasma vorliegende β -Catenin mit seinen *Amarillo repeats* 3 und 4 an die zentrale Bindungsstelle des Axin-Proteins sowie mit den *repeats* 5 bis 9 an die 15 AS-Bindungsstelle des APCs (Eklof Spink, Fridman et al. 2001; Xing, Clements et al. 2003). Durch diese Interaktion wird der N-Terminus von β -Catenin in räumliche Nähe zu oben beschriebenen Kinasen gebracht, welche zunächst eine Phosphorylierung von Ser⁴⁵ durch CK1 α , und daraufhin folgend Phosphorylierungsreaktionen von Thr⁴¹, Ser³⁷ und Ser³¹ durch GSK3 β katalysieren (Amit, Hatzubai et al. 2002; Liu, Li et al. 2002). Im Zuge dieser β -Catenin-Modifikationen kommt es auch zur CK1 α - und GSK3 β -vermittelten Phosphorylierung der 20 AS-Bindungsstelle des APC-Moleküls. Dieser Schritt bewirkt eine bis zu 140-fache Erhöhung der Bindungsaffinität zu β -Catenin und eine konsekutive Translokation des phosphorylierten β -Catenins an diese Bindungsregion (Ha, Tonzuka et al. 2004; Liu, Xing et al. 2006). Hierbei kommt es zur Lösung von β -Catenin vom Axin-Molekül, da dieses die identischen Bindestellen, allerdings niedrigaffiner, okkupiert (Xing, Clements et al. 2004). In Interaktion mit APC lagert sich an die phosphorylierten Ser³¹- und Ser³⁷-Reste β -TRCP1, ein Bestandteil des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes an und bewirkt durch Rekrutierung der E2-Ligase eine Polyubiquitinierung der Lys¹⁹- und Lys⁴⁹-Resten (Liu, Stevens et al. 2001; Wu, Xu et al. 2003). Ubiquitiniertes β -Catenin dissoziiert vom Degradationskomplex und wird nachfolgend im Proteasom abgebaut. Die Rolle des APCs in diesem letzten Schritt ist hierbei noch nicht genauer verstanden, Hypothesen gehen jedoch entweder von einer Dephosphorylierung der Bindestelle und massiver Affinitätserniedrigung oder von einer weiteren APC- β -Catenin-Bindung bis zur proteosomalen Degradation aus (Kimelman and Xu 2006) (vgl. Abb. B.7).

Der *Wnt-on*-Status: Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und intranukleäre Translokation

Unter Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges wird, wie bereits in B.3.4 beschrieben, Axin an die phosphorylierten PPP(S/T)P-Motive der LRP-Co-Rezeptoren gebunden und steht somit als Rückgrad des Degradationskomplexes nicht mehr zu Verfügung. Durch den fehlenden Abbau kommt es zur konsekutiven Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Die molekulare Mechanismus der folgenden Translokation in den Nukleus ist noch nicht abschließend geklärt, es existieren aber sowohl Anzeichen für eine direkte Interaktion mit Porenproteinen (Fagotto, Gluck et al. 1998) als auch eine Involvierung des Rac1-Systems sowie der JNK-Kinase (Wu, Tu et al. 2008).

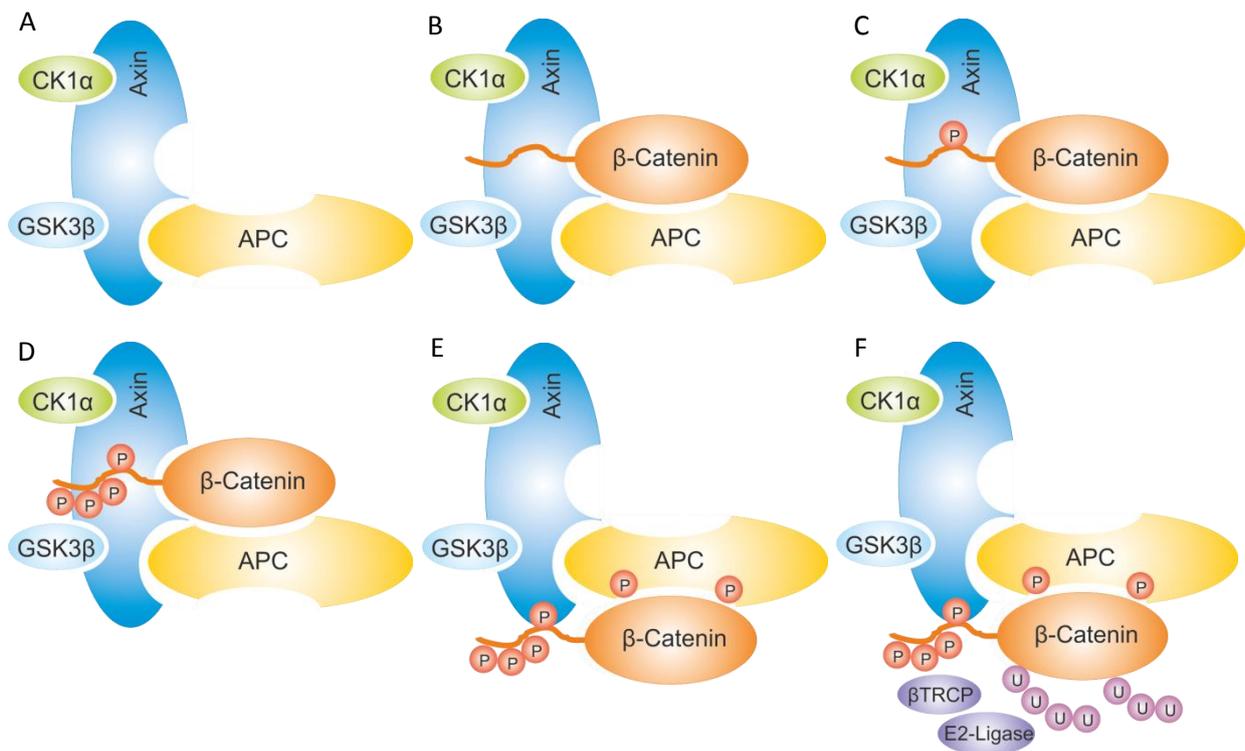


Abb. B.8: Der Wnt-off-Status: Phosphorylierung und Degradation von β -Catenin.

A: Bindung von CK1 α , GSK3 β und APC an Axin

B: Bindung von β -Catenin durch Axin und APC und Translokation des N-Terminus in die Nähe der Kinasen

C: Phosphorylierung von Ser⁴⁵ durch CK1 α

D: Phosphorylierung von Thr⁴¹, Ser³⁹ und Ser³¹ durch GSK3 β

E: Translokation von β -Catenin an die phosphorylierte 20 AS-Bindungsstelle des APCs

F: Ubiquitinierung des β -Catenins an Lys¹⁹ und Lys⁴⁹ durch β -TRCP1 und E2-Ligase

B.5 Nukleäre Komponenten des kanonischen Wnt-Signalings

B.5.1 TCF/LEF

Nukleäres β -Catenin besitzt am N- und C-Terminus zwar hochpotente Domänen zur Transkriptionsaktivierung (vgl. B.4.5), jedoch keine intrinsische DNA-Bindekapazität. Es benötigt deshalb einen Mediator zur Interaktion mit der DNA. In humanen Zellen konnten die Gruppe der *T cell factor proteins* (TCFs) sowie der *lymphoid enhancer factor* (LEF) als Interaktionspartner identifiziert werden (Van de Wetering, Castrop et al. 1996; Duval, Rolland et al. 2000; Hovanes, Li et al. 2000). Die TCFs umfassen im Menschen drei Proteine, TCF-1, TCF-2 und TCF-3. Durch ihre Vielzahl an alternativen *Splicing*-Varianten wird eine große Bandbreite von verschiedenen Isoformen generiert, die dadurch mit multiplen Bindungspartnern Komplexe ausbilden können (Arce, Yokoyama et al. 2006).

TCF/LEF-Proteine besitzen eine N-terminale, rund 40 Aminosäuren lange β -Catenin-Bindedomäne, welche durch Interaktion mit β -Catenin eine Konformationsänderung des TCF/LEF-Proteins induziert. C-terminal ist die *context-dependent regulatory domain*, welche den Interaktionspartner hauptsächlich für Repressoren darstellt (Cavallo, Cox et al. 1998), lokalisiert. Daran angeschlossen findet sich die *high mobility group (HMG) DNA binding domain*, welche an DNA-Sequenzen der Folge 5'-CCTTTGGW-3', den sog. *wnt responsive elements* (WRE) binden kann (van Beest, Dooijes et al. 2000). Zur DNA-Bindung ist jedoch die vorhergehende Interaktion mit β -Catenin essentiell, da isoliertes TCF/LEF keine Transkriptionsinitiation auslösen kann (Eastman and Grosschedl 1999). Durch nachfolgendes *bending* der DNA um bis zu 130° können Angriffsflächen für weitere regulatorische Faktoren der Transkription offeriert werden (Giese, Cox et al. 1992). Die Kernlokalisationssequenz (NLS) gewährleistet den Transport von TCF/LEF-Proteinen in den Zellkern. Über den C-Terminus und dessen *Splice*-Varianten ist bislang funktionell in den TCF/LEF-Familien noch wenig bekannt (Arce, Yokoyama et al. 2006).

Der mit dem kanonischen Wnt-Signalweg verbundene Transkriptionsapparat umfasst neben den zentralen TCF/LEF-Proteinen eine Vielzahl an Repressoren und Co-Aktivatoren zur Modulation der transkriptionellen Aktivität, auf die in diesem Kontext im folgenden Kapitel eingegangen werden soll.

B.5.2 Aktivierung der Transkription durch kanonisches Wnt-Signaling

Der *Wnt-off*-Status: Repression von TCF/LEF und der Transkription

Im *Off*-Status liegt nahezu kein β -Catenin im Zellkern vor. In diesem Zustand binden Transkriptionsrepressoren wie der *transducin-like enhancer of split* (TLE, in *Drosophila*: Groucho), *C-terminal binding protein* (CtBP) oder die Histondeacetylase (HDAC) an die entsprechende Domäne von TCF/LEF und stellen auf diesem Weg neben der fehlenden Konformationsänderung eine weitere Transkriptionshemmung dar. Sowohl TLE als auch die HDAC vermitteln eine kompakte Chromatinstruktur durch Histon-Deacetylierung (Cavallo, Cox et al. 1998; Billin, Thirlwell et al. 2000).

Der *Wnt-on*-Status: Aktivierung der Transkription durch β -Catenin, TCF/LEF und weiterer Aktivatoren

Nach Translokation des β -Catenins in den Nukleus (vgl. B.4.6) verdrängt dieses den Repressor TLE aus der TCF/LEF-Bindung (Daniels and Weis 2005). Durch die Interaktion mit β -Catenin unterliegt TCF/LEF einer Konformationsänderung, welche die Interaktion der *HMG DNA binding domain* mit den entsprechenden WRE der DNA sowie ein *bending* der DNA ermöglicht und den Proteinkomplex an die Promotorstrukturen der Zielgene heftet (Giese, Cox et al. 1992). Durch Interaktion der N- sowie

der C-terminalen Domäne mit einer Vielzahl von Co-Aktivatoren der Transkription wie Pygopus, Bcl9/Legless, p300/CBP und PAF-1 kommt es zur Histon-Acetylierung, Lockerung der Chromatinstruktur sowie zur Rekrutierung des Transkriptionsapparates (Goldman, Tran et al. 1997; Hecht, Vleminckx et al. 2000; Belenkaya, Han et al. 2002).

Die Regulation der Transkription wird durch drei grundsätzlich verschiedene Mechanismen gesteuert, hierzu zählen die Antagonisierung von TCF/LEF durch dominant-negative TCF/LEF-Isoformen, Repression der TCF/LEF-Aktivität durch regulatorische Proteine sowie kovalente Modifikationen des Transkriptionsapparates (Arce, Yokoyama et al. 2006).

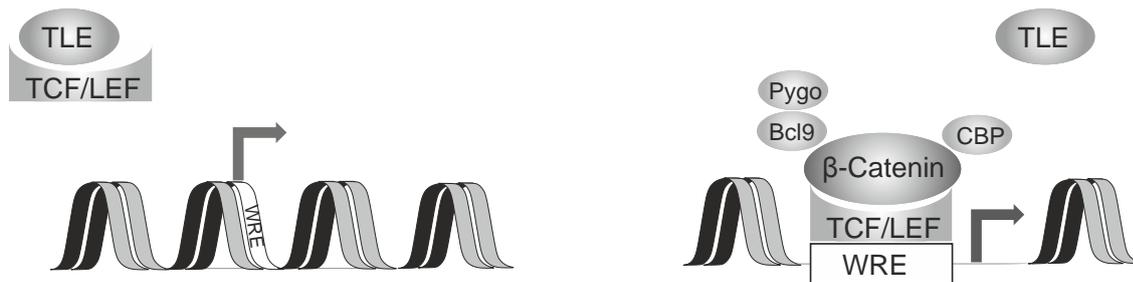


Abb. B.9: Transkriptionssteuerung durch β -Catenin.

Links: TLE inhibiert TCF/LEF und gewährleistet mit anderen Repressoren eine kompakte Chromatinstruktur.

Rechts: β -Catenin verdrängt TLE und bindet über TCF/LEF an WRE: Die Co-Aktivatoren initiieren Chromatin-Remodeling und Transkriptionsaktivierung.

Abkürzungen: TLE, *transducin-like enhancer of split*; TCF/LEF, *T cell factor protein* bzw. *lymphoid enhancer factor*; WRE, *wnt responsive elements*; Pygo, Pygopus; Bcl9, *B-cell CLL/Lymphoma 9*; CBP, *p300/CREB binding protein*.

B.5.3 Zielgene

Als Folge der β -Catenin-vermittelten Interaktion von TCF/LEF mit der DNA wird die Transkription einer Vielzahl von Genen aktiviert, die grundlegende Effekte auf die Zelle und ihr Umfeld haben. Unter den Auswirkungen der Wnt-Signalaktivierung lassen sich verschiedene Einflussebenen unterscheiden. Direkte Einflüsse durch Transkription von Zielgenen in der Zelle machen die Primärebene aus, die Sekundärebene besteht aus indirekt regulierten Zielgenen und durch Primäreffekte beeinflussten Signalwegen, während die Zielgene dieser beeinflussten Signalwege die Tertiärebene darstellen. *Wnt-Signaling* aktiviert also ein komplexes Netzwerk von zellulären Antworten (Vlad, Rohrs et al. 2008).

Zu den Primäreffekten zählen einerseits die Inhibition der Transkription vieler Komponenten des Wnt-Signalübertragungsweges wie den Fzd-Rezeptoren, LRP oder Axin (Logan and Nusse 2004), welche eine funktionelle Inhibition und damit eine negative Rückkopplung initiieren. Aber auch die Regulation proliferativer Effekte, beispielsweise über das Zellzyklusprotein Cyclin D1 (Tetsu and McCormick 1999), die Beeinflussung anderer Transkriptionen, z.B. über c-Myc (He, Sparks et al. 1998), der Einfluss auf Zelladhäsion und extrazelluläre Proteinkomponenten z.B. über Matrix-Metalloproteinasen (Brabletz, Jung et al. 1999; Neth, Ciccarella et al. 2006; Wu, Crampton et al. 2007) sowie die veränderte Expression von Hormonen und Wachstumsfaktoren (Vlad, Rohrs et al. 2008) werden zu den Primäreffekten gerechnet. All diese Effekte spielen eine essentielle Rolle in Proliferation, Migration, Gewebemöostase und in der Interaktion mit dem zellulären Umfeld. Fehlregulierungen bei diesen Prozessen können deshalb auch einen großen Einfluss auf die Tumorigenese entfalten (vgl. B.7).

Die Transkriptionsregulation der Zielgene und somit auch die Effektmuster variieren je nach Zelltyp (Vlad, Rohrs et al. 2008) und nach Zeit nach Aktivierung des Wnt-Signalweges (van de Wetering, Sancho et al. 2002), was für eine komplexe Steuerung der Transkriptionsprozesse spricht.

B.6 Signalübertragung über nicht-kanonische Signalwege

Frühe Studien zeigten unter Stimulation mit Wnt5a Effekte, die nicht durch den kanonischen Wnt-Signalweg erklärbar waren und auf die Aktivierung β -Catenin-unabhängiger Signalübertragungsmechanismen schließen ließen (Moon, Campbell et al. 1993). Als Aktivatoren dieser nicht-kanonischen Signalwege kristallisierten sich die nicht transformierenden Wnts heraus (Veeman, Axelrod et al. 2003). Die β -Catenin-unabhängige Signalübertragung lässt sich in Vertebraten in zwei differente Subgruppen unterteilen, den *planar cell polarity (PCP)-like* Signalweg sowie das Ca^{2+} -abhängige *Signaling* (vgl. Abb. B.10). Der *PCP-like*-Weg vermittelt sein Signal hierbei unter Zuhilfenahme von G-Proteinen und Dishevelled über kleine Effektormoleküle (Rho, Rac) und Kinasepfade unter anderem über die *c-jun NH₂-terminal kinase* (JNK) auf das Zytoskelett und zur Transkriptionssteuerung in den Zellkern (Boutros, Paricio et al. 1998). Die Ca^{2+} -abhängige Signalübertragung bewirkt über die Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphat (PIP_2) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie eine Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels. Dies wiederum aktiviert über weitere Signaltransduktionsprozesse, unter anderem über *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), transkriptionelle Effekte (Dejmek, Safholm et al. 2006), über die *Nemo-like kinase* (NLK) aber auch eine Inhibition des kanonischen Signalweges (Ishitani, Kishida et al. 2003) (vgl. Abb. B.10).

Die nicht-kanonischen Signalwege partizipieren in der Regulation von Gastrulationsvorgängen, der Steuerung zytoskelettaler Reorganisationsmechanismen, Zelladhäsion und -migration sowie die Polaritätseigenschaften der Zelle (Katoh 2007).

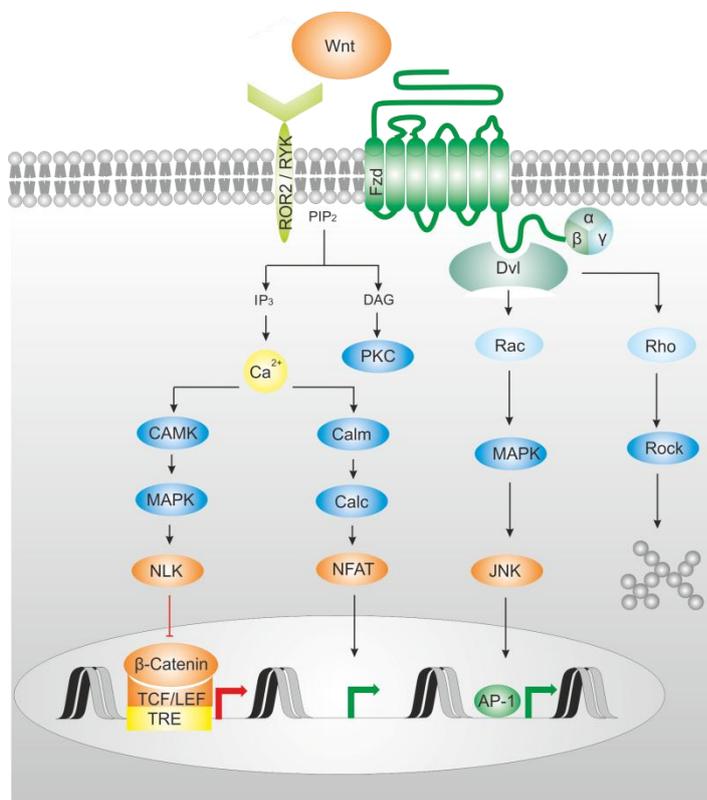


Abb. B.10: β -Catenin-unabhängige Signalwege

Links: Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktionsmechanismen bewirken eine Hemmung des kanonischen Signalwegs über NLK sowie eine Transkriptionssteuerung über NFAT.

Rechts: *PCP-like*-Signalübertragung bewirkt eine Transkriptionsregulation über JNK und AP-1 sowie zytoskelettale Reorganisation.

Abkürzungen: CAMK, Calmodulin-Kinase; Calm, Calmodulin; Calc, Calcineurin; MAPK, Map-Kinase-Pfad; Rock, Rho-Kinase; AP-1, *activating protein 1*.

B.7 Fehlregulation des *Wnt-Signalings*: Degenerative Erkrankungen und Krebsentstehung

 B.7.1 *Wnt-Signaling* in Gewebshomöostase und der Entstehung nicht-maligner Erkrankungen

In den letzten Jahren zeigten viele Studien eine wichtige Funktion des *Wnt*-Signalweges in der Regulation des Wechselspiels von Differenzierungs- und Proliferationsvorgängen auf (Chen, Yang et al. 2008). Die Eine korrekte Steuerung dieser Mechanismen spielt eine entscheidende Rolle in der Gewebshomöostase, eine Fehlregulation kann jedoch zur Entstehung schwerer Erkrankungen führen. Der *Wnt*-Signalweg spielt sowohl im physiologischen als auch im pathophysiologischen Zellverhalten eine wichtige Rolle, und Fehlregulationen in nahezu allen Ebenen der Signalübertragung konnten mit der Entstehung maligner Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, was im Folgenden, insbesondere unter der Thematik der Tumorentstehung und -progression, erörtert werden soll.

In zahlreichen Studien konnten Assoziationen zwischen vermindertem *Wnt-Signaling* und degenerativen Erkrankungen gezeigt werden, wie zum Beispiel das Auftreten der Familiären Exsudativen Vitreoretinopathie (FEVR), welche durch eine verminderte *Fzd4*-Expression gekennzeichnet ist (Robitaille, MacDonald et al. 2002), oder das Auftreten neurodegenerativer Krankheiten wie M. Alzheimer im Zusammenhang mit β -Catenin-Funktionsverlust (Caricasole, Copani et al. 2003). Weitere nicht-maligne Erkrankungen, die mit einer Funktionsänderung des *Wnt-Signalings* einhergehen, sind in Tab. B.1 gezeigt.

Molekül	Veränderung	Krankheit
β -Catenin	Reduzierte Aktivität	M. Alzheimer
	Erhöhte Aktivität	M. Dupuytren
<i>Dvl1</i>	<i>Loss of function</i>	Myokardinfarkt
<i>sFRP3</i>	Reduzierte Aktivität	Erhöhte Osteoarthritis-Inzidenz bei Frauen
<i>Fzd2</i>	Erhöhte Expression	Kardiale Hypertrophie
<i>Fzd3</i>	Polymorphe SNPs	Erhöhte Anfälligkeit für Schizophrenie
<i>GSK3β</i>	Veränderte Aktivität	Schizophrenie
<i>LRP5</i>	<i>Loss of function</i>	Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG)
	<i>Gain of function</i>	Familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR)
<i>Fzd4</i>	<i>Loss of function</i>	Erhöhte Knochenmasse
<i>TCF1/TCF4</i>	Transkriptionsvarianten	Familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR)
<i>Wnt1</i>	Erhöhte Expression	Erhöhtes Risiko für Diabetes Typ II
<i>Wnt3</i>	<i>Loss of function</i>	Schizophrenie
	(homozyg. Mutation)	Tetra-Amelie
<i>Wnt4</i>	<i>Gain of function</i>	Nierenfehlentwicklung
	(Genduplikation)	Regression des Müller-Gangs, Virilisierung, intersexueller Phänotyp
<i>Wnt10B</i>	<i>Loss of function</i>	Erniedrigte Knochenmasse, Fettsucht

 Tab. B.1: Nicht-maligne Erkrankungen mit Veränderungen im *Wnt-Signaling* (Luo, Chen et al. 2007).

B.7.2 Wnt-Signaling in Tumorinitiation und -progression

Eine pathologische Überaktivierung des Wnt-Signalweges besitzt hingegen oftmals eine Verbindung zu hyperproliferativen Erkrankungen und zu malignen Tumorerkrankungen, wie im Folgenden genauer erläutert werden soll.

B.7.2.1 Fehlregulationen des kanonischen Wnt-Signalweges

B.7.2.1.1 Veränderungen extrazellulärer Komponenten

Über die spezifische Interaktion bestimmter Wnt-Proteine mit ihren membrangebundenen Rezeptoren konnten bislang nur wenige Erkenntnisse gewonnen werden, jedoch scheint ein verändertes Wnt-Expressionsverhalten eine Rolle im Verhalten von Tumorzellen zu spielen. In Hepatitis-B-induzierten hepatozellulären Karzinomen konnte beispielsweise eine Wnt3-Überexpression mit konsekutiver, Fzd7-abhängiger Aktivierung des kanonischen Signalweges nachgewiesen werden (Kim, Lee et al. 2008).

In direktem Zusammenhang mit bestimmten Tumoren stehen auch Modifikationen der Expression der extrazellulär inhibierenden Peptide. Epigenetisches *Silencing* von sFRPs konnte in Brust- (Turashvili, Bouchal et al. 2006), Magen- (To, Chan et al. 2001), Prostata- (Zi, Guo et al. 2005) und hepatozellulären Karzinomen (Huang, Zhang et al. 2007) nachgewiesen werden, eine Wiederherstellung der Expression resultierte in einer verminderten Tumoraktivität (Bovolenta, Esteve et al. 2008). Auch das *Silencing* von Dkk1 in Kolorektaltumoren zeigte eine konsekutiv erhöhte Tumoraktivität (Hoffman, Kuhnert et al. 2004). Die ektopische Expression von Peptiden mit den N-Termini von Fzd7 oder Fzd8, die in das extrazelluläre Medium sezerniert werden, können das Wachstum von Tumoren inhibieren und auf diese Weise - zumindest partiell - die Funktion der sFRPs imitieren (DeAlmeida, Miao et al. 2007; Wei, Chua et al. 2011).

B.7.2.1.2 Veränderungen intrazellulärer Komponenten

Nahezu alle intrazellulären Komponenten des Wnt-Signalings können ebenfalls eine Rolle in der Tumorgenese und -progression spielen. Der wohl bekannteste Tumorsuppressor ist das APC-Protein. Mutationen dieses Proteins, zumeist mit Verlust der β -Catenin- oder der Axin-Bindungsstelle und konsekutiver β -Catenin-Akkumulation, werden mit der Mehrzahl aller kolorektalen Tumoren und auch der *Familiären Adenomatösen Polyposis Coli* (FAP), eine Erbkrankheit mit frühzeitiger Entstehung adenomatöser Polypen mit obligatorischer Entartung, in Verbindung gebracht (Kinzler, Nilbert et al. 1991; Clevers 2006). Aber auch andere Komponenten des Degradationskomplexes können durch Inhibierung des kanonischen Signalweges als Tumorsuppressoren wirken, was z.B. durch Mutationen von Axin in kolorektalen Tumoren, Oesophagus- und hepatozellulären Karzinomen und Medulloblastomen gezeigt werden konnte (Luo, Chen et al. 2007). N-terminale Verkürzungen sowie die Mutation der Phosphorylierungsstellen von β -Catenin mit dem Resultat einer inhibierten Degradation werden für rund 10 % aller kolorektalen Tumoren verantwortlich gemacht (Schneikert and Behrens 2007). Die intranukleären Proteine der TCF/LEF-Familie zeigen häufig Mutationen in Mikrosatelliten-instabilen Kolonkarzinomarten (Duval, Gayet et al. 1999).

All diese genetischen bzw. epigenetischen Veränderungen resultieren in einer Überaktivierung des kanonischen Signalweges und somit durch die Transkriptionsinitiation von Zielgenen wie c-Myc oder Cyclin-D1 in einem Verlust der Kontrolle bzgl. Apoptose, Proliferation und Differenzierung, welche zur Tumorentstehung und -progression beiträgt.

In Tab. B.2 sind einige Fehlregulationen des kanonischen Signalweges, die mit Tumoren in Verbindung gebracht werden konnten, aufgezeigt.

Molekül	Funktionsänderung	Krebsart
Wnts		
Wnt3	Überexpression	HCC
Wnt5a	Überexpression	Malignes Melanom, HCC, NSCLC Partizipation in chronischen Entzündungsreaktionen, z.B. Hepatitis-Infektionen
Extrazelluläre Antagonisten		
sFRP1,3	Hypermethylierung	CRC
WIF-1	<i>Silencing</i>	Prostata-Ca, Blasen-Ca, Lungen-Ca, Mamma-Ca, Gastrointestinal-Ca, Pleuramesotheliom
Dkk1	Überexpression <i>Silencing</i>	Erhöhte Zahl osteolyt. Metastasen bei Multiplem Myelom Progression von CRC
Rezeptoren		
Fzd7	Überexpression	HCC, Oesophagus-Ca
Ror2	Überexpression	Chronisch-lymphatische Leukämie
Intrazelluläre Komponenten der Signalübertragung		
APC	<i>Loss of function</i> Hypermethylierung	FAP, spontaner CRC, Ovarial-Ca, Magen-Ca, Hepatoblastome NSCLC
Axin	<i>Loss of function</i>	HCC, sporadische Medulloblastome, CRC, Oesophagus-Ca
β -Catenin	<i>Gain of function</i>	CRC, HCC, Malignes Melanom, Endometrium-Ca, Prostata-Ca
PP2A	<i>Loss of function</i>	NSCLC, CRC, Mamma-Ca
WT-1	Suppression	Wilms-Tumor
Intranukleäre Komponenten der Signalübertragung		
TCF/LEF	<i>Gain of function</i>	CRC

Tab. B.2: Maligne Tumoren mit Veränderungen im Wnt-Signaling (Luo, Chen et al. 2007).

Abkürzungen: HCC, Hepatozelluläres Karzinom; NSCLC, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom; CRC, Kolorektal-Ca.

B.7.2.2 Fehlregulationen in den nicht-kanonischen Signalwegen

Über die Funktion der nicht-kanonischen Signalkomponenten existierten lange Zeit kontroverse Ergebnisse. Nicht-kanonisches Wnt5a zeigt in Darmkrebs eine Antagonisierung des kanonischen Signalweges und somit eine potentiell anti-onkogene Funktion (Dejmek, Dejmek et al. 2005); andererseits stellt eine Wnt5a-Überexpression einen negativen prognostischen Marker, verbunden mit verstärkter Invasion und Proliferation, in beispielsweise nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer* (NSCLC)) (Huang, Liu et al. 2005) oder im Malignem Melanom (Weeraratna, Jiang et al. 2002) dar. Yuzugullu et al. konnten ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf den kanonischen Signalweg in hepatozellulären Karzinomen (HCC) nachweisen (Yuzugullu, Benhaj et al. 2009). Paradoxerweise wiesen Tumoren mit aggressiverem Wachstumsverhalten jedoch eine erhöhte Expression des nicht-kanonischen Wnt5a auf, was den vermeintlich anti-onkogenen Eigenschaften auf den ersten Blick widersprach. Diese Tumoren zeigten vermehrt Oberflächenantigene von mesenchymalen Tumorzellen, was mit dem Vorgang der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), die als Meilenstein in der Akquisition invasiver und metastatischer Eigenschaften angesehen wird (Kalluri and Weinberg 2009), erklärt werden könnte. Die Aktivität des kanonischen Signalweges zeigte sich in diesen Zelllinien im Vergleich zu weniger aggressiven HCCs inhibiert. Die Arbeitsgruppe postulierte auf der Basis ihrer Ergebnisse eine Rolle des kanonischen Signalweges in der Tumorentstehung sowie eine Partizipation der nicht-kanonischen Komponenten in

der Tumorprogression, da viele Zielgene des nicht-kanonischen *Wnt-Signalings* eine Veränderung von zytoskelettalen Bestandteilen, extrazellulärer Matrix und Zelladhäsion vermitteln (vgl. B.5.3).

B.7.2.3 Das Tumor-Stammzellmodell und therapeutische Aspekte

Ein weiteres, gerade therapeutisch interessantes Modell ist die Existenz von Krebsstammzellen, welche durch Fehlregulierung bestimmter Signalwege, u.a. dem *Wnt-Signalweg*, aus Stammzellen entstehen und das Tumorstammzellwachstum unterhalten (Taipale and Beachy 2001). Kürzlich konnte LGR-5, ein Oberflächenmarker auf Stammzellen im Gastrointestinaltrakt, identifiziert werden. LGR-5-positive Zellen sind in der Lage, gesamte Darmzotten *in vitro* zu regenerieren. Ferner konnte eine LGR-5-Expression ebenfalls auf bestimmten Kolonkarzinomzellen, welche für den Hauptanteil tumoröser Proliferation verantwortlich sind, gezeigt werden (Barker, Ridgway et al. 2009), so dass dieses Oberflächenmolekül in der Zukunft eine potentielle Angriffsstelle in der Bekämpfung von Tumorstammzellen darstellen könnte (Verkaar and Zaman 2011). Aber auch ein Eingriff in die Interaktion des β -Catenins mit den Co-Aktivatoren p300 und CBP in Tumorstammzellen könnte eine Differenzierung induzieren und damit einen Verlust an Tumorigenität auslösen (Takahashi-Yanaga and Kahn 2010).

Genauere Analysen des *Wnt-Signalweges* und seiner Komponenten spielen sicherlich eine essentielle Rolle im Verständnis der Krebsentstehung und -progression und werden in Zukunft ein interessantes Ziel für therapeutische Interventionen sein. Zum einen, um die Wirkung heutiger Chemotherapeutika, wie z.B. in der Doxorubicin-Behandlung von hepatozellulären Karzinomzellen, zu potenzieren (Wei, Chua et al. 2011) oder zum anderen, um eine spezifischere Antitumorthherapie ermöglichen zu können.

C Fragestellung und Zielsetzung

Die Signalübertragungswege des *Wnt-Signalings* stellen ein hochkomplexes Zusammenspiel verschiedener Liganden, Rezeptoren und intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden dar, welche von Zelltyp zu Zelltyp in ihrer Ausprägung stark variieren. Wir konnten in HT1080-Zellen eine erhöhte Expression des Fzd8-Rezeptors nachweisen (Leitenstern et al., persönliche Mitteilung). Dieser scheint eine wichtige Rolle in der Proliferation und der Migration der Zellen zu spielen. Die Überexpression von Fzd8 zeigte eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, Fzd8 fungiert als kanonischer Rezeptor (Leitenstern et al., persönliche Mitteilung). Die Interaktion des Rezeptors mit den extrazellulären Liganden aus der Gruppe der Wnt-Proteine ist jedoch noch weitestgehend unklar, es konnten – wie in B.3.1 erwähnt – jedoch Strukturen im Bereich der *cysteine rich domain* identifiziert werden, welche eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen. In der Bestimmung des Transkriptionsstarts von Fzd8 zeigte sich ein variables Muster des 5'-Terminus der mRNA mit teilweisem Verlust des ersten Startcodons. Eine Translation dieser verkürzten mRNA-Moleküle würde in verkürzten Transkriptionsvarianten resultieren.

In dieser Arbeit sollte der Fzd8-Rezeptor und dessen Transkriptionsvarianten Fzd8 Δ (1-52) und Fzd8 Δ (1-268) sowie deren Auswirkungen auf die β -Catenin-abhängige Signalübertragung charakterisiert werden.

Hierzu sollten insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Welche Auswirkungen zeigt das Auftreten der Fzd8-mRNA-Transkriptionsvarianten Fzd8 Δ (1-52) und Fzd8 Δ (1-268) auf die Translation des Fzd8-Proteins und dessen Struktur?
- Wie verhält sich die Expression der verkürzten Fzd8-Varianten auf mRNA- und Proteinebene?
- Welche Folgen hat das Auftreten N-terminal verkürzter Proteinvarianten auf die zelluläre Lokalisation des Rezeptors?
- Übernehmen die N-terminal verkürzten Varianten des Fzd8-Rezeptors eine Funktion in der β -Catenin-abhängigen Signaltransduktion?

Ferner sollte mit Wnt8B ein potentieller Ligand des Fzd8-Rezeptors eingehender charakterisiert werden. Hierbei wurde Wnt8B hinsichtlich folgender Eigenschaften und Funktionen analysiert:

- Welche präferentielle Lokalisation weist Wnt8B im Extrazellularraum auf?
- Welchen Einfluss besitzt die Überexpression von Wnt8B auf den kanonischen Signalweg?
- Welche Folgen zeigt die Überexpression von Wnt8B in der Transkriptionsregulation der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MMP-14?
- Zeigt die Überexpression von Wnt8B einen Einfluss auf die Expressionsrate des Fzd8-Rezeptors?
- Zeigen Wnt8B und Fzd8 bzw. dessen Transkriptionsvarianten eine Interaktion auf funktioneller Ebene in der Aktivierung des kanonischen Signalweges?

D Material und Methoden

D.1 Geräte und Materialien

D.1.1 Geräte

Autoklav 3850	Systemec GmbH, Wettenberg
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator Galaxy S	RS Biotech, Irvine, England
Eismaschine AF-10	Scotsman, Frimont, Italien
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur, Modell B1	PeqLab, Erlangen
Gel-Bilderfassungssystem Intas Gel Imager	Intas, Göttingen
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Products, USA
Image Scanner	Pharmacia, Freiburg
Kühlschrank (4 °C)	Siemens, München
Magnetrührer Ika-Combimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop IX50 mit CCD Kamera Typ 3CCD UV-Lampe U-RFL-T	Olympus, Feldkirchen-Westerham Sony, Köln
Mikroskop IX70 mit POC Chamber SensiCam QE Tempcontrol 32-2 Uniblitz® VCM-D1 Shutter	Olympus, Feldkirchen-Westerham Olympus, Feldkirchen-Westerham Pecon, Erbach PCO CCD Imaging, Kehlheim Pecon, Erbach Vincent Associates, Rochester, USA
Mikrowellenofen R-6270	Sharp, Osaka, Japan
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
Orbitalschüttler Certomat® R Infrons TR150 mit Heissluft Inkubatoröfen ITE	Braun Biotech International, Melsungen Infrons AG, Bottmingen, Schweiz Infrons AG, Bottmingen, Schweiz
LightCycler II	Roche, Mannheim
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter Typ 526 mit pH Elektrode	WTW, Weilheim
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proteintransfereinheiten: Mini Protean Electrophoresis Cell Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München BioRad, München
Sicherheitswerkbänke: BDK 7419, Modell UVF 6.18S Herasafe Typ HS12	BDK, Sonnenbühl-Genkingen Heraeus Instruments, Göttingen
Spannungsquellen: Consort E143 Mighty Slim™	PeqLab, Erlangen Hoefer, Heidelberg
Stickstofftank Locator 4	Sigma, Taufkirchen
Spectrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Tiefkühlgefrierschrank: Colora UF 85-300S (-80 °C) Liebherr Premium Frost (-20 °C)	Colora, Lorch Liebherr, Ochsenhausen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen: Analysenwaage, A 120 S	Satorius, Göttingen

Technische Waage, MA AF200	Satorius, Göttingen
Wärmeschranke:	
B30	Memmert, Schwabach
BE30	Memmert, Schwabach
Wasserbäder:	
WB-14	Memmert, Schwabach
Exatherm U3electronic	Julabo, Seelbach
Wasserdeionisierungseinheit Membrapure	MembraPURE, Bodenheim
Zentrifugen:	
Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, München
Sepatech Biofuge 15	Heraeus Sepatech, München
Eppendorf 5415 D	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Kühlzentrifuge, Eppendorf 5415 R	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

D.1.2 Chemikalien und Reagenzien

D.1.2.1 Bakterienstämme, Nährlösungen und Antibiotika

Bakterienstämme

E. coli TOP10 (Invitrogen, USA)

F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ ⁻

E. coli SURE 2 Supercompetent cells (Stratagene, USA)

endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15 Tn10 Amy Cm^R]

E. coli C2925H (NEB, USA)

ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet^S endA1 rspL136 (Str^R) dam13::Tn9 (Cam^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2

E. coli JM109 (NEB, USA)

endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)

Tab. D.1: Bakterienstämme

Nährmedien

DYT-Medium

16 g/l Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
10 g/l Bacto-Hefeextrakt
5 g/l NaCl

SOC-Medium

20 g/l Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
10 g/l Bacto-Hefeextrakt
0,5 g/l NaCl
1,2 g/l MgSO₄
0,95 g/l MgCl₂
20 g/l D(+)-Glukose

Tab. D.2: Nährmedien

Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert bzw. durch Filtration aufgereinigt. Der Zusatz von 15 g/l Bacto-Agar zum DYT-Medium vor dem Autoklavierprozess ermöglichte die Erstellung fester Nährmedien (Agarplatten).

Antibiotikallösungen

In dieser Arbeit wurden im molekularbiologischen Abschnitt die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin eingesetzt. Auf Grund der Hitzeinstabilität dieser Substanzen wurden diese erst bei Temperaturen unter 50 °C zur Nährlösung zugesetzt; die Endkonzentrationen betragen 200 µg/ml (Ampicillin) und 50 µg/ml (Kanamycin).

D.1.2.2 Oligonukleotide

Zur Anwendung in der RT-PCR

Name	Sequenz (5' → 3')	T_m	Amplikon	Sonde
UPL-hWnt8B-f-339	TGTGATGACTCCCGCAAC	61 °C	132 bp	#37
UPL-hWnt8B-r-453	CCGTGCATCCTGTCTGT	63 °C		
UPL-Fzd8-f-1504	CGGTCATCAAGCAACAGGA	62 °C	87 bp	#78
UPL-Fzd8-r-1607	TGTAGAGCACGGTGAACAGG	64 °C		
UPL-Fzd8-f-2336	CGCCACGCGTTAATTCT	59 °C	64 bp	#73
UPL-Fzd8-r-2381	ATCTCGGGTTCTGGAAACG	60 °C		
CyclinD1-f	Produkt von SearchLC zur Anwendung mit Sybr Green I			
CyclinD1-r				
MMP-14-f	Produkt von SearchLC zur Anwendung mit Sybr Green I			
MMP-14-r				

Tab. D.3: Die Primer wurden zum Einsatz in der RT-PCR konzipiert und mit Hilfe des Roche Assay Design Centers generiert (www.roche-applied-science.com). Mittels der NCBI Nucleotide Blast Search Software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden etwaige Kreuzreaktivitäten bzgl. anderer humaner mRNAs ausgeschlossen.

Universal Library Probes für die RT-PCR

Nummer	Sequenz (5' → 3')	Assoziierte Primer (siehe Tab. D.3)
#37	TGCCCTGG	UPL-hWnt8B-f-339, UPL-hWnt8B-r-453
#73	GCTGAGGA	UPL-Fzd8-f-2336, UPL-Fzd8-r-2381
#78	AGCTGGAG	UPL-Fzd8-f-1504, UPL-Fzd8-r-1607

Tab. D.4: Die o.g. Sonden wurden von der Roche, Mannheim bezogen.

Zur DNA-Amplifikation mittels PCR

Name	Sequenz (5' → 3')	T_m
GC-NheI-Wnt8B-f	GC-GCTAGC-ATGTTTCTTTCAAAGCCTTC	56 °C
GC-AgeI-Wnt8B-r*	GC-ACCGGT-AAGGGTTTTCTCCGG	57 °C
GC-ClaI-Fzd8-f	GC-ATCGAT-ATGGAGTGGGGTTACCTGTTGG	66 °C
GC-NheI-Fzd8-f-156	GC-GCTAGC-ATGCCAATCAGTTCAACCACG	65 °C
GC-NotI-ATG-HA-Fzd8-f-156	GC-GCGGCCGC-ATG-TATCCGTACGATGTACCAGACTATGCGGG ATCC-ATGCCCAATCAGTTCAACCAC	65 °C
GC-ClaI-ATG-Fzd8-f-806	GC-ATCGAT-ATG-TTCAGCCAGGACGAGCGCGCC	74 °C
GC-EcoRV-Fzd8-r	GC-GATATC-TCAGACCTGGGACAATGGCATC	66 °C
GC-BamHI-Fzd8-r*	GC-GGATCC-TCCGACCTGGGACAATGGCATC	68 °C

Tab. D.5: Die Primer wurden mit GC-Überhängen generiert, um eine höhere Bindungseffizienz für terminal angreifende Restriktionsendonukleasen zu gewährleisten. Überhängende Sequenzabschnitte sind *kursiv*, der Transkriptionsstart **fett** darstellt. Mit * markierte Primer besitzen eine Mutation zur Eliminierung des Stopp-Codons (vgl. E.1.4 und E.2.2).

Zur Insertion eines *Tags*

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>Sfi</i> I-HA- <i>Sfi</i> I-f	CGGCC-TATCCGTACGATGTACCAGACTATGCGGGATCC-GGGGCCGCCT
<i>Sfi</i> I-HA- <i>Sfi</i> I-r	CGGCCCC-GGATCCCGCATAGTCTGGTACATCGTACGGATA-GGCCGAGG
<i>Cl</i> aI-ATG-HA- <i>Cl</i> aI-f	CGAT- ATG TATCCGTACGATGTACCAGACTATGCGGGATCC-AT
<i>Cl</i> aI-HA-CAT- <i>Cl</i> aI-r	CGAT-GGATCCCGCATAGTCTGGTACATCGTACGGAT CAT -AT

Tab. D.6: Die Oligonukleotide wurden mit kompatiblen Enden (*kursiv*) versehen, um während der Ligation mit dem überhängenden Ende der jeweiligen Schnittstelle im Zielplasmid die entsprechende Basenpaarung ausbilden zu können (vgl. E.1.3.2 und E.1.3.3)

D.1.2.3 Enzyme, Chemikalien und weitere Materialien

Enzyme

Antarctic Phosphatase	NEB, USA
Calf Intestinal Phosphatase	NEB, USA
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	NEB, USA
Hot Star HiFidelity Polymerase	Qiagen, Hilden
PfuTurbo Polymerase	Stratagene, USA
Phusion Flash Polymerase	Finnzymes, Finnland
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen, USA
Restriktionsenzyme	NEB, USA
T4-Ligase	Roche, Mannheim

Kits

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
LightCycler TaqMan® Master	Roche, Mannheim
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
PeqGold Plasmid Mini Prep Kit	PeqLab, Erlangen
QiaShredder Säulen	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken

Agarose, Nusive	Biozym, Hameln
Agarose, Seakem GTG	Biozym, Hameln
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
DNA Molekulargewichtsmarker Gene ruler 1 kb	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Molekulargewichtsmarker Ultra Low Range	PeqLab, Erlangen
DNA-Auftragspuffer, 10 x	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim

Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken

Ampicillin Natrium-Salz	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	BD Bioscience, USA
Bacto Hefeextrakt	BD Bioscience, USA
Bacto Trypton	BD Bioscience, USA
D-Glukose	Sigma, Deisenhofen
Erlenmeyerkolben 100, 250 und 1000 ml	Wagner und Munz, München

Glycerin	Serva, Heidelberg
Kanamycinsulfat	Roche, Mannheim
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen, Polystyrol 10 cm Ø	Greiner, Nürtingen

Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken

αMEM mit L-Glutamin, ohne Nukleoside	PAA, Österreich
Blasticidin	PAA, Österreich
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Österreich
DMSO	Merck, Darmstadt
FCS	Sigma, Deisenhofen
G418 (Geneticin)	PAA, Österreich
Glycerin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Österreich
Zellkulturgefäße (T25, T75)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96-well)	Nunc, Wiesbaden

Chemikalien und Materialien für proteinbiochemische Techniken

Acrylamid : Bisacrylamid (37,1 : 1)-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Cellophan	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Geltrocknungsrahmen	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope	BioRad, München
SDS	Serva, Heidelberg
SeeBlue® Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tris-Cl	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Western Lightning Plus ECL	Perkin-Elmer, USA
Whatman Filterpapier Nr. 1	Whatman/Vetter, Ammerbuch
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, USA

D.1.3 Plasmide

D.1.3.1 Plasmide zur Proteinexpression und Negativkontrollen

D.1.3.1.1 pN3

pN3 stellt ein Vektorrückgrad dar und enthält bis auf das Resistenzgen keine codierenden DNA-Sequenzen. Durch Insertion des codierenden Bereichs einer cDNA für ein bestimmtes Ges in die *multiple cloning site* (MCS) wird das entsprechende Genprodukt überexprimiert.

Der pN3-Vektor enthält die Sequenz des Zytomegalie-Promotors vom *immediate early*-Typ ($P_{CMV\ IE}$), der eine hohe Expressionsleistung garantiert, sowie an dessen 3'-Ende eine *multiple cloning site* (MCS). Diese dient zur Integration von DNA-

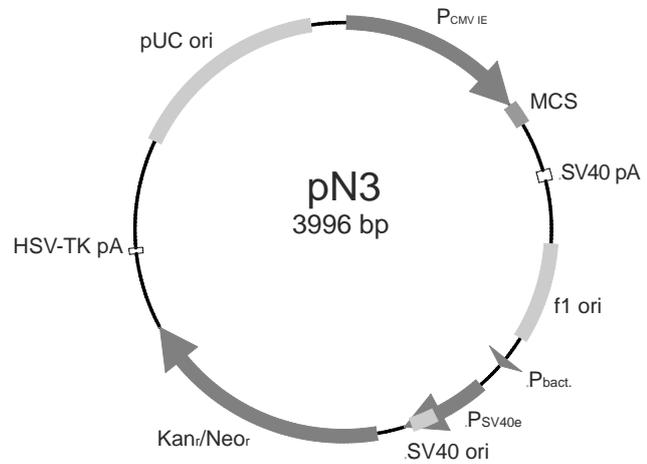


Abb. D.1: pN3

Fragmenten mittels der dort lokalisierten singulären Restriktionsenzymstimmstellen. Stromabwärts wird die MCS von einem SV40 Polyadenylierungssignal (SV40 pA) flankiert, das die korrekte mRNA-Prozessierung des Transkriptionsprodukts der inserierten codierenden DNA bewirkt. Die Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette (Kan_r/Neo_r), bestehend aus einem bakteriellen Promotor ($P_{bact.}$), dem SV40 *early promoter* (P_{SV40e}), dem Gen für die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase sowie dem Polyadenylierungssignal der Herpes-Simplex-Thymidin-Kinase (HSV-TK pA), ermöglicht eine Selektion sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten. Durch die Expression der APH kommt es in Plasmid-tragenden Zellen zur enzymvermittelten Phosphorylierung der zur Selektion eingesetzten Antibiotika der Aminoglykosid-Gruppe, wie z.B. G418 (in Eukaryoten) oder Kanamycin (in Prokaryoten). Im unmodifizierten Zustand bewirken diese Antibiotika durch Interaktion mit der 30-S-Untereinheit der Ribosomen eine Fehltranslation in der Proteinsynthese und wirken durch die gebildeten *Nonsense*-Proteine primär bakterizid. Die Phosphorylierungsreaktion bewirkt einen Funktionsverlust der Aminoglykoside und ermöglicht auf diese Weise eine korrekte Translation von mRNA in plasmidhaltigen Zellen. Ferner sind in dem pN3-Vektor ein SV40 Replikationsursprung (SV40 ori) für die Replikation in Säugetierzellen, ein Plasmid-Replikationsursprung (pUC ori) sowie ein f1-Replikationsursprung (f1 ori) für die Einzelstrang-Replikation integriert.

D.1.3.1.2 pN3-Fzd8

pN3-Fzd8 ist ein Überexpressionsvektor für Fzd8, der auf dem Grundgerüst des pN3-Vektors beruht. Die cDNA des Fzd8-Rezeptors (Fzd8) wurde hierbei mittels Ligation in die *multiple cloning site* (MCS) integriert. Die Transkription steht somit unter Kontrolle des CMV IE-Promotors ($P_{CMV\ IE}$), der eine hohe konstitutive Expression des Fzd8-Rezeptors garantiert. Der Vektor ermöglicht eine Selektion durch Kanamycin/G418 in Pro- und Eukaryoten. Alle weiteren Komponenten des Vektors und deren Eigenschaften sind im Detail in D.1.3.1.1 erläutert.

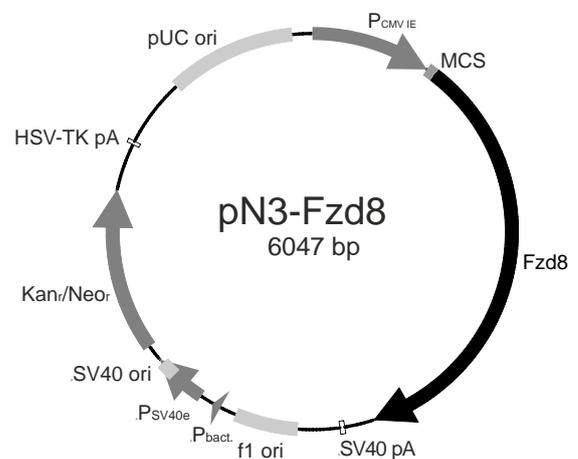


Abb. D.2: pN3-Fzd8

D.1.3.1.3 pEF-DEST51

Der Vektor pEF-DEST51 dient der Überexpression inserierter DNA-Sequenzen; ferner bietet er durch die Präsenz von zusätzlichen DNA-Sequenzen die Möglichkeit, das codierte Protein mit einem 6x His-Tag und/oder einem V5-Epitop zu versehen. In dieser Arbeit wurde eine verkürzte Version des Plasmids verwendet, das die vom Hersteller inserierten attB-Sites, die Chloramphenicol-Resistenz sowie das ccdB-Gen, das zur Gateway-Klonierung verwendet werden kann, nicht enthält.

pEF-DEST51 besitzt einen EF-1 α -Promotor ($P_{EF-1\alpha}$), der die Überexpression des inserierten cDNA-Abschnitts garantiert. Die Insertionsstelle für codierende Sequenzen befindet sich zwischen dem Promotor und den 3'-terminal liegenden, für das V5-Epitop und den 6xHis-Tag codierenden Abschnitten. Flankiert wird diese Expressions-einheit von der Polyadenylierungssequenz des bovine growth hormones (BGH pA), die eine korrekte Polyadenylierung der synthetisierten mRNA bewirkt. pEF-DEST51 besitzt zwei funktionelle Resistenzkassetten, die sowohl eine Ampicillin- als auch eine Blasticidin-Resistenz bieten. Die Blasticidin-Kassette (Bla_r) setzt sich aus dem SV40-Promotor (P_{SV40e}), dem EM7-Promotor (P_{EM7}), dem Blasticidin-Resistenzgen und dem

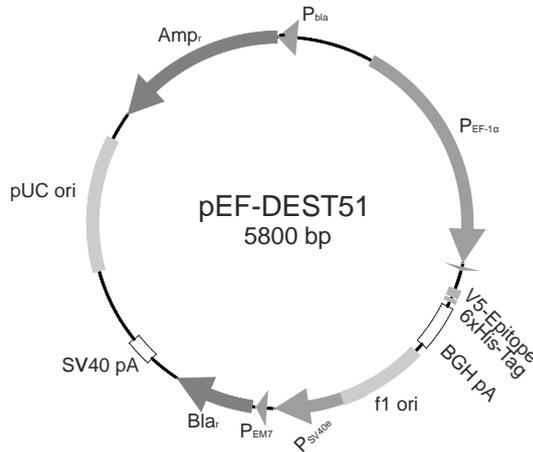


Abb. D.3: pEF-DEST51

SV40-Polyadenylierungssignal (SV40 pA) zusammen und lässt sich zur Selektion in Eukaryoten einsetzen. Dieses Resistenzgen codiert für die Blasticidin-S-Aminohydrolase, die durch einen hydrolytischen Deaminierungsschritt das Selektionsantibiotikum Blasticidin inaktiviert und somit eine uneingeschränkte Proteinsynthese in der Zelle ermöglicht. Die Ampicillin-Resistenz wird zur Selektion in *E.coli* eingesetzt; der entstehende β -Lactamring inhibiert die bakterielle D-Alanin-Transpeptidase und bewirkt eine Unterdrückung der Zellwandneusynthese. Die Expression des Resistenzgens steht unter transkriptioneller Kontrolle des bla-Promotors (P_{bla}). Ferner besitzt der Vektor die Replikationsursprünge f1 ori, pUC ori und SV40 ori.

D.1.3.1.4 pEF-DEST51-Wnt8B

Das Plasmid pEF-DEST51-Wnt8B ist ein Überexpressionsvektor für das Protein Wnt8B. Grundgerüst ist hierbei der Vektor pEF-DEST51, in welchen durch Gateway-Klonierung die cDNA von Wnt8B integriert wurde. Das Plasmid wird von BioScience imaGenes, Berlin vertrieben (Produktname: OCABo5050E0319-pEF-DEST51).

Die Wnt8B-cDNA ist hierbei am 3'-Ende des EF-1 α -Promotors ($P_{EF-1\alpha}$) integriert, welcher eine konstitutive Überexpression des Proteins garantiert. Die am 3'-Ende der Wnt8B-cDNA gelegenen Sequenzen des V5-Epitops und des 6xHis-Tags werden auf Grund eines davor inserierten Stopp-Codons nicht transkribiert. Die Blasticidin-Resistenz ermöglicht eine Selektion in Eukaryoten, die Ampicillin-Resistenz hingegen in Prokaryoten. Alle weiteren Komponenten des Vektorrückgrads sind in D.1.3.1.3 beschrieben.

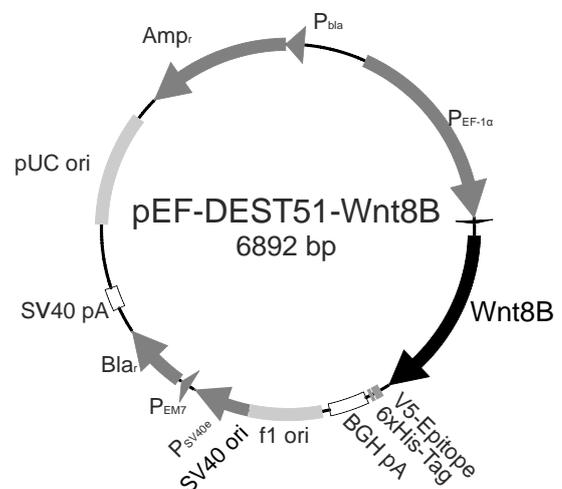


Abb. D.4: pEF-DEST51-Wnt8B

D.1.3.2 Plasmide zur Expression von Fluoreszenzproteinen

D.1.3.2.1 pN3-eGFP

Der pN3-eGFP-Vektor wird vor allem zur Expression fluoreszierender Fusionsproteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet.

Zentraler Bestandteil des pN3-eGFP-Vektors ist die codierende Sequenz für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), das eine modifizierte Variante des in der Qualle *Aequorea victoria* exprimierten Fluoreszenzproteins *green fluorescent protein* (GFP) darstellt. Im Vergleich zur ursprünglichen DNA aus *A. victoria* wurden zwei Aminosäuren ausgetauscht (F64L und S65T) (Cormack, Valdivia et al. 1996) sowie 190 stumme Basenmutationen integriert (Haas, Park et al. 1996), die eine optimale Anpassung an die humane Codonpräferenz gewährleisten. Durch diese Modifikationen ist eine optimierte Expressions- und Fluoreszenzausbeute gewährleistet. Das Ex-tinktionsmaximum liegt für eGFP bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 507 nm. Das Rückgrad des Vektors basiert auf dem Grundgerüst von pN3 (vgl. D.1.3.1.1).

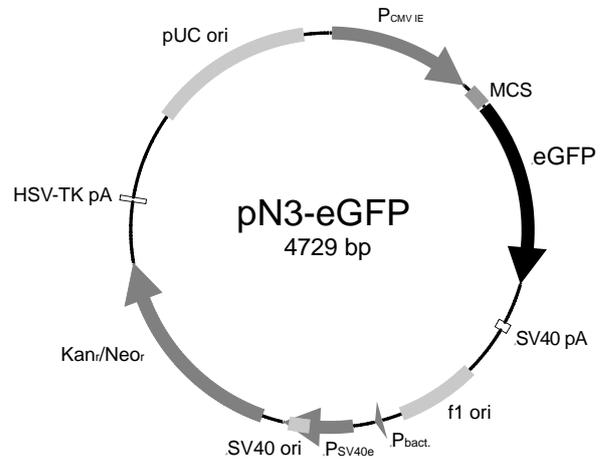


Abb. D.5: pN3-eGFP

D.1.3.2.2 pDsRed-Express-C1

pDsRed-Express-C1 ist ein von der Firma Clontech, USA entwickelter Vektor, dessen Haupteinsatzgebiet in der fluoreszenzbasierten Kontrolle der Transfektionseffizienz sowie in der Expression von fluoreszierenden Fusionsproteinen liegt.

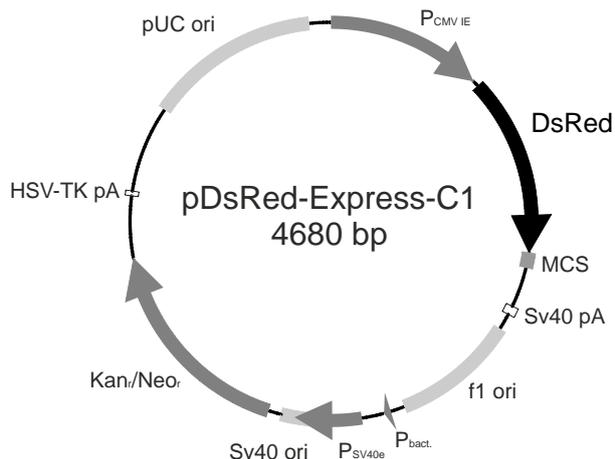


Abb. D.6: pDsRed-Express-C1

In dem Vektor pDsRed-Express-C1 ist die kodierende Sequenz des Fluoreszenzproteins DsRed integriert. DsRed stammt aus *Discothyma spp.* (Matz, Fradkov et al. 1999), die Primärstruktur wurde auf bestmögliche Expression und Funktionalität in humanen Zellen optimiert (Bevis and Glick 2002). Die Modifikation von neun Basentriplets und der damit einhergehenden Aminosäureaustausche (R2A, K5E, N6D, T21S, H41T, D41Q, V44A, C117S, T217A) sowie die Anpassung an die humane Codonpräferenz garantieren bestmögliche Expressionseigenschaften. DsRed besitzt sein Exzitationsmaximum bei 557 nm, das

Emissionsmaximum liegt bei 579 nm. Stromaufwärts der DsRed-cDNA liegt der *immediate early promoter* des humanen CM-Virus ($P_{CMV IE}$), der eine hohe Expressionsleistung des fluoreszierenden Proteins gewährleistet. Das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 (SV40 pA) am 3'-Ende garantiert eine regelgerechte Prozessierung der DsRed-mRNA. Stromabwärts des Stopp-Codons der

für DsRed kodierenden Sequenz ist eine *multiple cloning site* (MCS) integriert, die die Integration von DNA-Fragmenten zur Generierung von Fusionsproteinen ermöglicht. Zur Selektion in pro- und eukaryoten Zellen besitzt der Vektor eine Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette (Kan_r/Neo_r).

D.1.3.3 Plasmide zur Reporterexpression

D.1.3.3.1 pN3-Bar-GLuc

Das pN3-Bar-GLuc-Plasmid dient als Reporterplasmid zur Quantifizierung der nukleären β -Catenin-Aktivität in eukaryoten Zellen.

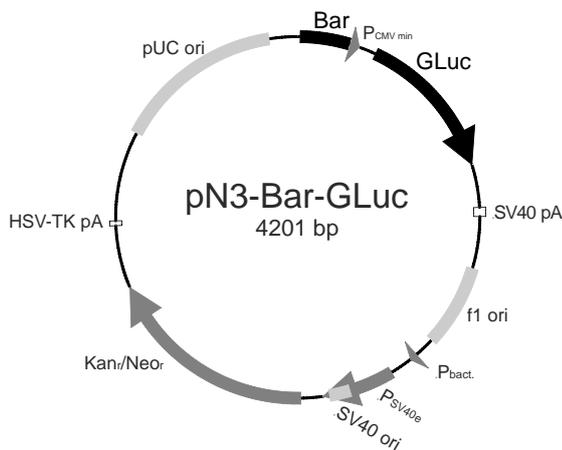


Abb. D.7: pN3-Bar-GLuc

Rückgrad des Plasmids ist der pN3-Vektor (vgl. D.1.3.1.1). Eine Promotorkombination, bestehend aus dem minimalen CMV-Promotor ($P_{CMV\ min}$) und dem β -Catenin-activated reporter (Bar), der zwölfmalig repetitiv die Sequenz der TCF/LEF-Konsensussequenz beinhaltet, liegt hierbei stromaufwärts des Gaussia-Luciferase-Gens (Biechele and Moon 2008). Bei Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges steigt die intranukleäre Konzentration von β -Catenin, das im Kern mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF funktionelle Aktivator Komplexe bildet. Dadurch wird die Expression des assoziierten Reportergens, in diesem Fall der Gaussia-Luciferase, induziert.

D.2 Methoden

D.2.1 Molekularbiologische Methoden

D.2.1.1 Anzucht und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Prinzip

Prokaryote Zellen wie *Escherichia coli* (*E.coli*) dienen in der Molekularbiologie der Vermehrung und Asservierung von rekombinanten Plasmiden. Die verwendeten *E.coli*-Stämme (vgl. Tab. D.1) zeichnen sich sowohl durch eine hohe Aufnahmekapazität für plasmidförmige DNA als auch durch hohe Proliferationsraten aus.

Durchführung

Bei 4 °C wurden diese auf DYT-Agarplatten über einen Zeitraum bis max. 6 Wochen konserviert. Die längerfristige Asservierung erfolgt durch Generierung einer Glycerinstammkultur, bestehend aus 850 µl einer DYT-Mediumkultur sowie 15 % (v/v) Glycerin (entspricht 150 µl) bei -80 °C. Ein Bakterienkulturansatz zur analytischen Plasmidpräparation umfasste 3 ml, zur präparativen Plasmidisolierung bei high-copy-Plasmiden 150 ml. Dieser wurde in autoklavierten Reagenzgläsern bzw. Erlenmeyerkolben angesetzt und bei 200 rpm bei 37 °C für 12 Stunden inkubiert. Ein im Plasmid integriertes Antibiotika-Resistenzgen ermöglichte die Selektion Plasmid-tragender *E.coli*.

D.2.1.2 Transformation

Prinzip

Unter einer Transformation versteht man die Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA in bakterielle Zellen. In der Molekularbiologie werden hierbei chemische und elektrische Verfahren angewendet; im Verlauf dieser Arbeit wurde ausschließlich die chemische Transformation durchgeführt. Bei temporärer Hitzeeinwirkung kommt es in kompetenten *E.coli* zu einer Porenbildung, wobei die zugegebene Plasmid-DNA zunächst in die Zelle aufgenommen und später repliziert wird. Das auf dem Plasmid codierte Antibiotika-Resistenzgen erlaubt die Kultivierung unter den entsprechenden Selektionsbedingungen.

Durchführung

Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden in Aliquots bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauvorgang auf Eis wurden 1 - 5 ng eines Plasmids bzw. 60 ng eines Ligationsansatzes zu den Zellen gegeben. Eine homogene Verteilung der DNA erfolgte durch eine Inkubationsphase von 30 Minuten bei 4° C. Mit Hilfe des anschließenden Hitzeschocks bei 42 °C für 30 Sekunden wurde die Aufnahme der Plasmide in das Zellinnere gewährleistet. Nach einer fünfminütigen Kühlung auf Eis wurden zu 50 µl der Zellsuspension 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium (5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM D(+)-Glukose) gegeben und das Gemisch für eine Stunde bei 37°C mit 200 rpm inkubiert, um eine Erholung und Proliferation der Bakterien zu gewährleisten. Abschließend wurden die Zellen auf DYT-Agarplatten ausplattiert; wobei das Bakterienvolumen der zu erwartenden Transformationseffizienz angepasst wurde. Das Nährmedium wurde mit dem passenden Antibiotikum versehen, um das Risiko einer Kontamination oder einer Proliferation nicht-plasmidhaltiger Bakterien zu minimieren. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C zur Expansion der Bakterienkolonien bebrütet.

D.2.1.3 Plasmidisolierung zur Analyse und Transfektion, Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Prinzip

Plasmide können mittels selektionsgesteuerter Proliferation in transformierten Prokaryoten amplifiziert werden. Zur Rückgewinnung der Plasmid-DNA werden die Zellen in alkalischem Milieu lysiert und anschließend die Plasmide mit Hilfe von DNA-bindenden Silikamembranen von anderen Zellbestandteilen gereinigt.

Durchführung

Zur Plasmid-Isolierung wurden je nach Menge der zu lysierenden *E.coli* das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen) oder das HiSpeed Plasmid Midi Kit der (Qiagen, Hilden) eingesetzt, die eine Extraktion von DNA-Fragmenten bis zu 10000 bp ermöglichen. Bei beiden Kits wurden die Bakterien mittels Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt und in alkalischem Milieu lysiert, um die Desoxyribonukleinsäuren freizusetzen. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von RNase entfernt und die Zellfragmente sedimentiert. Nach Bindung der DNA an eine Silikamembran erfolgte die Abtrennung der Proteine und anderer Zellfragmente durch mehrere Waschschriffe mittels Zentrifugation, bevor die gebundene DNA in Aqua dest. eluiert wurde. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

Bestimmung der Konzentration DNA- oder RNA-haltiger Proben

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA wurde das Absorptionsverhalten der (Desoxy-)Nukleosid-Monophosphate genutzt, dessen Maximum im Mittel bei der Wellenlänge 260 nm ($A_{260\text{ nm}}$) liegt. Die Konzentration $c_{\text{Nukleinsäure}}$ korreliert hierbei direkt mit der Absorption (engl. *optical density*, kurz: OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm:

$$c_{\text{Nukleinsäure}} = \text{Absorptionskoeffizient}_{\text{Nukleinsäure}} \times A_{260\text{ nm}}$$

Der Absorptionskoeffizient ist hierbei anhängig von der Art der Nukleinsäure. Um die Proteinfreiheit der Proben nachzuweisen, wurde ferner die durch aromatische Aminosäuren proteintypische Absorption bei 280 nm ($A_{280\text{ nm}}$) bestimmt. Eine geringe $A_{280\text{ nm}}$ -Absorption zeigt hierbei eine geringe Proteinkontamination an. Bei einem Quotient $A_{260\text{ nm}} : A_{280\text{ nm}} > 1,8$ kann von einer nicht bis nur minimal verunreinigten Nukleinsäure-Probe ausgegangen werden. Die Absorptionen wurden mit Hilfe des nanodrop-Photometers (Thermo Scientific, USA) bestimmt.

D.2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Prinzip

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der längenabhängigen Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen. Die Agarose wird hierzu in TAE-Puffer kurzzeitig erhitzt und nachfolgend abgekühlt. Der Temperaturabfall und der damit verbundene Verlust an Energie bewirkt die Erstarrung der Agarose-Moleküle zu einer netzartigen Polysaccharidstruktur, die die strukturelle Basis für den Auftrennungsvorgang darstellt. Der zugegebene Agaroseanteil bestimmt hierbei entscheidend die Laufeigenschaften des Gels; die eingesetzte Menge an Agarose wird hierbei indirekt proportional zu der zu erwartenden DNA-Fragmentgröße gewählt. Die durch die Phosphatgruppen determinierte negative Ladung der DNA bewirkt nach Anlage eines elektrischen Feldes entlang des Agarosegels eine Wanderung der DNA-Fragmente innerhalb des Gels in Richtung der Anode. Die Flusseigenschaften werden hierbei wesentlich durch die Molekülgröße der Nukleinsäurekette bestimmt; kleine Moleküle legen dabei im gleichen Zeitintervall eine größere Laufstrecke zurück. An Hand des Einsatzes einer

DNA-Leiter, einem Gemisch größenbekannter Nukleinsäureketten, kann eine Abschätzung der DNA-Fragmentgröße durchgeführt werden.

Die Zugabe von DNA-interkalierendem Ethidiumbromid zum Agarosegel ermöglicht die Visualisierung der Nukleinsäurebanden. Die Fluoreszenzemission des Ethidiumbromids unter UV-Licht (302 nm) nimmt nach dem Interkalationsvorgang um den Faktor 50 bis 100 zu.

Nach Exzision separierter Gelfragmente können diese durch Zufuhr thermischer Energie gelöst und die enthaltene DNA unter Verwendung einer Silikamembran aufgereinigt werden.

Durchführung

Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 8,3) gegeben, mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und durch Temperaturerhöhung gelöst. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung wurde diese in eine Gelapparatur gegeben und nach vollständigem Erstarren mit den mit Farbmaler gefärbten Proben und einem entsprechenden DNA-Marker beladen. Die Auftrennung erfolgt bei 5-7 V/cm für 1 - 3 Stunden in TAE-Puffer. Nach Separation konnten die Fragmente unter UV-Licht visualisiert und exzidiert werden. Die Aufreinigung der DNA aus den Gelfragmenten erfolgte mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Hierbei wurde das Gelfragment zunächst in GC-Puffer resolubilisiert und anschließend mit 70% Isopropanol zu einer Endkonzentration von 14 % (v/v) Isopropanol gemischt. Nach Bindung der gelösten DNA an eine Silikamembran konnten überschüssige Bestandteile durch mehrere Waschschrirte mittels Zentrifugation entfernt und die gereinigte DNA in Aqua dest. zur Weiterverwendung eluiert werden.

D.2.1.5 Polymerasekettenreaktion

Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, kurz: PCR) beruht auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, ausgehend von einem Matrizenstrang die Synthese komplementärer DNA-Stränge in 5'→3'-Richtung unter Anwesenheit von dNTPs und einem entsprechenden Primerpaar zu katalysieren. Im Reaktionszyklus wird die DNA zur Auftrennung der Doppelstrangstruktur bei 95 °C – 99 °C denaturiert, um danach im Temperaturbereich des Schmelzwertes der Primer eine spezifische Anlagerung der Primer (*Annealing*) an die entstehenden Einzelstränge zu gewährleisten. An den angelagerten Primern wird die Synthese der korrespondierenden DNA-Stränge unter Einbau der dNTPs initiiert (Elongation). Dieser Zyklus aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation wird mehrfach wiederholt und schließlich mit einem finalen Elongationsschritt terminiert.

GC-reiche DNA-Abschnitte sind durch die erhöhte Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen deutlich schwerer zu amplifizieren, so dass diese oftmals den Einsatz modifizierter PCR-Protokolle oder spezieller Polymerasen erfordern.

Durchführung

In dieser Arbeit wurden mehrere Polymerasen verwendet, die mit entsprechenden, i. d. R. nukleotidhaltigen Puffern geliefert wurden (vgl. D.1.2.3). Die Reaktionsbedingungen variierten je nach Polymerase und wurden nach den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller eingestellt. Die *Annealing*-Temperatur wurde hierbei je nach Primerdesign und der entsprechenden resultierenden Schmelztemperatur gewählt und, um spezifischere Resultate zu erreichen, modifiziert. Auf die Amplifikation der Fzd8-cDNA, welche sich als besonders diffizil erwies, sowie den Einsatz spezieller Substanzen für die PCR GC-reicher *templates* soll genauer in E.1.2 eingegangen werden.

D.2.1.6 DNA-modifizierende Reaktionen

Restriktionsanalyse*Prinzip*

Das Prinzip der Restriktionsanalyse beruht einer der sequenzspezifischen Spaltung von DNA durch bakterielle Restriktionsenzyme (RE). Typ-II-RE können spezifisch an palindromische Sequenzen binden und diese an definierten Stellen im oder in unmittelbarer Nähe des Palindroms digestieren. Das Produkt kann nach dem Verdau überhängende Enden (*sticky ends*) oder keinen Nukleotidüberhang (*blunt ends*) aufweisen.

Entscheidend beim Einsatz der RE ist deren in Units (U) angegebene Aktivität. Ein U beschreibt hierbei die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg DNA des Phagen Lambda (λ) in einer Stunde unter optimalen Bedingungen zu verdauen. Die einzusetzende Enzymmenge (in U) hängt von der Länge der zu verdauenden DNA, der Anzahl der durchzuführenden Schnitte sowie der Anzahl der Schnitte in der λ -DNA ab:

$$U = \frac{\text{Nukleotidlänge des } \lambda\text{-Phagen}}{\text{Nukleotidlänge des Substrats}} \times \frac{\text{Zahl der Schnittstellen im Substrat}}{\text{Zahl der Schnittstellen im } \lambda\text{-Phagen}}$$

Durchführung

Die RE wurden hierbei mitsamt den optimalen, von der Firma New England Biolabs (NEB), USA zur Verfügung gestellten Puffersubstanzen eingesetzt. Die Inkubationszeit variierte je nach Enzym zwischen 15 Minuten und 12 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die entsprechende Zahl an einzusetzenden Units wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA mittels o.g. Formel ermittelt. Doppeldigestionen wurden auf ihre optimale Pufferzusammensetzung mit Hilfe der NEB Double Digest Finder Software (vgl. D.2.4) geprüft.

Ligation*Prinzip*

Die Ligation dient der Verbindung von DNA-Doppelstrang-Molekülen. Hierbei werden korrespondierende *sticky ends* oder *blunt ends* miteinander verknüpft, die Ligation von *sticky ends* ermöglicht hierbei eine gerichtete Ligation von DNA-Fragmenten. Voraussetzungen für eine gelungene Ligation stellen neben der Anwesenheit der Ligase und den benötigten Co-Faktoren die Existenz 5'-phosphorylierter Enden an den zu ligierenden DNA-Fragmenten dar, da über diese die Esterbindung zu den Desoxyribosen der korrespondierenden 3'-Enden gebildet werden.

Durchführung

In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) mit ihrer korrespondierenden, den Co-Faktor ATP beinhaltenden Pufferlösung verwendet. Die Ligationen wurden bei 16 °C über 1 bis zu 12 Stunden durchgeführt. Zur Ligation wurden die gereinigten DNA-Fragmente in einem definierten Verhältnis, i. d. R. Vektor : Insert = 1 : 3 eingesetzt; die Gesamtmasse der eingesetzten DNA betrug normalerweise 300 ng.

Dephosphorylierung*Prinzip*

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten dient der Inhibierung von Ligrationsreaktionen und wird angewendet, um die Religationswahrscheinlichkeit korrespondierender Vektorenden zu minimieren. Durchgeführt wird diese Reaktion durch Phosphatasen mit der Fähigkeit zur Abspaltung 5'-terminaler Phosphatgruppenüberhänge.

Durchführung

In dieser Arbeit wurden sowohl die *antarctic phosphatase* als auch die *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP) (beide NEB, USA) verwendet. Die CIP-Reaktion wurde in den mitgelieferten Puffern bei 37 °C für eine Stunde durchgeführt, die Dephosphorylierung mit Hilfe der *antarctic phosphatase* im assoziierten Puffer erlaubt nach der Inkubationsphase bei 37 °C über 30 Minuten eine fünfminütige Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C.

Klenow-Fill-in-Reaktion

Prinzip

Das Klenow-Fragment wird durch Proteolyse der DNA-Polymerase I aus *E.coli* generiert. Diese Untereinheit zeichnet sich neben der Polymeraseaktivität auch durch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität aus. Allerdings besitzt sie keine die 5'→3'-Exonukleaseaktivität. Hierdurch können überhängende 3'-Enden abgebaut und überhängende 5'-Enden mit dem entsprechenden komplementären Strang versehen werden. Beide Reaktionen ermöglichen die Bildung glatter Enden (*blunt ends*).

Durchführung

Die DNA wurde mit 1 µl Klenow-Fragment, dem korrespondierenden Puffer und 33 µM dNTPs versehen und bei 25 °C für 15 Minuten inkubiert. Eine Zugabe von 10 mM EDTA und eine 20-minütige Erhitzung auf 75 °C terminierten die *Fill-in*-Reaktion.

D.2.1.7 RNA-Isolierung

Prinzip

Die RNA-Isolierung gewährleistet eine selektive Extraktion von RNA-Bestandteilen aus Zelllysaten. Hierbei werden die Zellen in einem Guanidin-Isothiozyanat-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert, was die Inaktivierung vorhandener RNasen gewährleistet. Ferner wird diesem Puffer β-Mercaptoethanol zugegeben, was eine Denaturierung vorhandener Proteine mittels Reduktion bewirkt. Nach Homogenisierung mittels einer speziellen Säule wird die RNA an eine Silikagelmembran gebunden und überschüssige Bestandteile des Lysats von der Membran entfernt. Die RNA wird in RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

Durchführung

Zur RNA-Isolierung wurde in dieser Arbeit das RNeasy Mini Kit in Verbindung mit QiaShredder-Säulen (beides Qiagen, Hilden) verwendet. Das RNeasy Mini Kit erlaubt hierbei eine selektive Isolierung von RNA-Bestandteilen über 200 bp Länge. 5.8S RNAs, 5S RNAs und tRNAs werden durch ihre geringe Größe nicht mitextrahiert.

Die Zellen einer Kavität wurden in 350 µl RLT-Puffer, der das Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol im Verhältnis 1 : 100 enthielt, lysiert, suspendiert und zur Homogenisierung durch eine QiaShredder-Säule zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand wurde danach mit 350 µl 70-prozentigem Ethanol versetzt, um eine optimale Bindung der RNA an die RNeasy Mini-Säule zu gewährleisten. Die folgenden Waschschrte garantierten eine RNA-Purifikation durch Entfernung überschüssiger Bestandteile. Die gebundene RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. D.2.1.3).

D.2.1.8 cDNA-Synthese

Prinzip

Ziel der cDNA-Synthese ist es, die mRNA in die wesentlich stabilere Form der *complementary*-DNA (cDNA) zu überführen. Vorhandene genomische DNA (gDNA) wird durch einen DNase-Reaktionsschritt eliminiert. Anschließend werden die Reverse Transkriptase (RT) sowie Primer zugegeben, die an den Poly-A-Schwanz der mRNAs binden. Reverse Transkriptasen sind retroviralen Ursprungs und erlauben mittels ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität eine Transkription von mRNA in cDNA. Die eingesetzte RT besitzt weiterhin eine RNase-H- sowie eine DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität, die nach dem Transkriptionsschritt die mRNA-Matrize abbaut und durch einen komplementären cDNA-Strang ersetzt. Durch die Primerbindung an den Poly-A-Schwanz der mRNA wird gewährleistet, dass die gesamte sich in der Lösung befindende mRNA in cDNA umgeschrieben wird.

Durchführung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das QuantiTect Reverse Transkription-Set (Qiagen, Hilden) verwendet. Die vorhandene gDNA wurde zunächst mit 2 µl des gDNA-Wipeout-Puffers für 2 Minuten bei 42 °C eliminiert, wobei die Proben nach diesem Schritt sofort auf Eis gelagert

wurden. Nach Zugabe des Reaktionsmix (vgl. Tab. D.7) zur gekühlten Probe wurde die Transkription für 30 Minuten bei 42 °C durchgeführt. Abschließend wurde die RT über 3 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bei -20 °C.

Substanz	Volumen
RNA-Mix nach gDNA-Wipeout-Reaktion	14 µl
QuantiTect Reverse Transkriptase	1 µl
RT-Primer-Mix	1 µl
QuantiScript RT-Puffer (5x)	4 µl

Tab. D.7: Reaktionslösung zur cDNA-Synthese

D.2.1.9 qRT-PCR

Prinzip

Die *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) ermöglicht die spezifische Quantifizierung von DNA-Molekülen in einer Probe. Hierbei werden verschiedene Systeme eingesetzt.

a) Interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe

Diese Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren in Doppelstrang-DNA (dsDNA) und emittieren hierbei detektierbare Fluoreszenzsignale. Bei spezifischer Amplifikation der Ziel-cDNA in der RT-PCR-Reaktion steigt die Zahl der dsDNA-Moleküle, was mit einer vermehrten Farbstoff-Interkalation und einer Erhöhung des Fluoreszenzlevels einhergeht. Entscheidend ist die log-Phase der PCR-Reaktion, da in diesem Intervall das emittierte Fluoreszenzsignal direkt proportional zur dsDNA-Kopienzahl ist. Eine absolute Quantifizierung wird durch Normierung an Hand einer Verdünnungsreihe von Proben der Matrize mit bekannter Kopienzahl gewährleistet. Nachteil dieser Methode ist die unspezifische Interkalation des Farbstoffs in dsDNA; mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse am Ende der RT-PCR kann allerdings die Spezifität der PCR-Produkte geprüft und bestätigt werden.

b) Sequenzspezifischer Nachweis durch DNA-Sonden

DNA-Sonden ermöglichen eine sequenzspezifische Detektion von amplifizierter cDNA. Die Sonde besteht aus einer 8 Nukleotide umfassenden Erkennungssequenz sowie den daran gebundenen fluoreszierenden Reporter und dem Quencher, wobei letzterer die emittierte Fluoreszenz durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) absorbiert. Die Nukleotide der Sonde bestehen aus *Locked nucleotid acid* (LNA), wobei in dieser die Kohlenstoffatome des Riboseringes an C2 und C4 über eine Sauerstoffmethylengrücke verbunden sind (vgl. Abb. D.8). Die Brücke fixiert den Zuckerring in 3'-endo-Konformation und gewährleistet eine deutlich erhöhte Schmelztemperatur bei der Hybridisierung mit DNA-Molekülen.

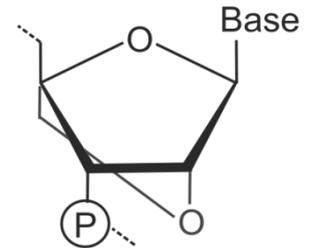


Abb. D.8: LNA

Die Sonde lagert sich während des Annealingschritts der PCR an die korrespondierenden Erkennungssequenzen der Matrize an. Durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der eingesetzten Taq-Polymerase wird die Sonde hydrolytisch abgebaut. Der Reporter verliert hierdurch seine Fixierung in unmittelbarer Nähe des Quenchers; infolgedessen wird die durch den Reporter emittierte Fluoreszenz nicht mehr länger durch den Quencher absorbiert (vgl. Abb. D.9).

Dieses Prinzip garantiert eine geringe Fehldetektionsrate, da bei entsprechendem Design durch die sequenzspezifische Bindung der DNA-Sonde die Rate an unspezifischen Amplifikationsprodukten minimiert werden kann.

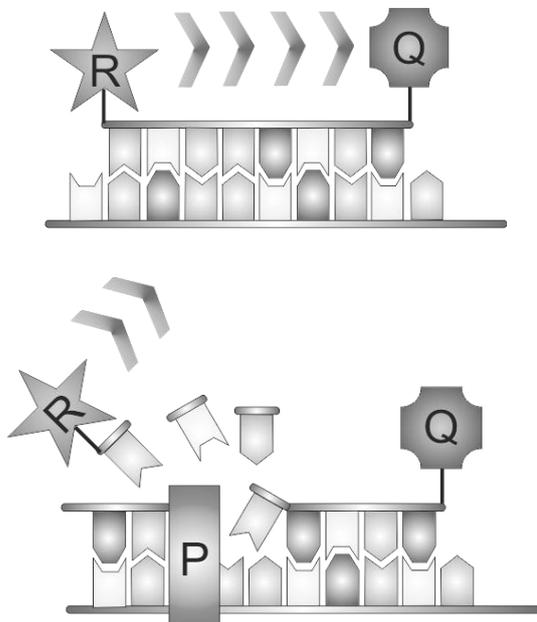


Abb. D.9: Funktionsprinzip der DNA-Sonde

oben: Im Ursprungszustand wird die durch den Reporter (R) emittierte Fluoreszenz mittels FRET durch den Quencher (Q) absorbiert.

unten: Nach Hydrolyse durch die Taq-Polymerase (P) wird die räumliche Nähe von Reporter (R) und Quencher (Q) aufgehoben, die Fluoreszenz kann detektiert werden.

Durch parallele Bestimmung der Emission in Eichproben mit bekannter Kopienzahl kann auf die absolute cDNA-Kopienzahl geschlossen werden. Eine Verdünnungsreihe einer eingesetzten Probe mit unbekannter Kopienzahl ermöglicht dementsprechend eine Angabe relativer Kopienzahlen. Durch eine agarosegelelektrophoretische Kontrolle der Ansätze auf die entsprechende Amplikonlänge kann z.B. eine unspezifische Amplifikation oder eine Primerdimerisierung ausgeschlossen werden.

Durchführung

Die qRT-PCR wurde im LightCycler II (Roche, Mannheim) durchgeführt.

- a) Bei der Quantifizierung mittels SYBR Green I wurden die von der Firma Search LC (www.search-LC.com) erstellten Primer verwendet. Der Reaktionsansatz bestand bei der RT-PCR aus 1 µl cDNA-Lösung und 4 µl Aqua dest., die in die LightCycler-Glaskapillaren (Roche, Mannheim) eingebracht wurden. Der Reaktionsansatz wurde anschließend durch Zugabe von 5 µl des zuvor erstellten PCR-Ansatzes (1 µl Primerlösung, 3 µl Aqua dest., 1 µl LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I) vervollständigt. Die PCR-Reaktion sowie die anschließende Schmelzkurvenanalyse richteten sich nach den von Search-LC empfohlenen Temperaturen und Zeiten (vgl. Tab. D.8).

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
35 Zyklen	Denaturierung	95 °C 10 s
	Annealing	68 °C 10 s
	Elongation	72 °C 16 s
Schmelzkurvenanalyse	Beginn bei 95 °C, dann schrittweise Senkung um 0,1 °C/s bis 58 °C	

Tab. D.8: Schritte der RT-PCR mit SYBR Green I

- b) Beim Nachweisverfahren durch DNA-Sonden wurde das Universal Probe Library (UPL) System (Roche, Mannheim) eingesetzt. Die designten Primer, die verwendeten Sonden und die zugehörigen Amplikons sind in D.1.2.2 aufgeführt. Der 10 µl umfassende Reaktionsansatz setzte sich wie in Tab. D.9 beschrieben zusammen. Hierbei wurde zunächst die cDNA in die LightCycler-Glaskapillaren gegeben und anschließend mit 9 µl einer Lösung aus Primern, Sonde, Aqua dest. sowie der LightCycler TaqMan Master-Lösung versetzt. Die Amplifikation wurde nach dem in Tab. D.9 aufgeführten Einzelschritten durchgeführt.

Reagenz	Volumen	Schritt	Temp.	Dauer
cDNA	1 µl	Denaturierung	95 °C	10 min
Primer 1	0,2 µl	45 Zyklen	Denaturierung	95 °C 10 s
Primer 2	0,2 µl		Annealing	68 °C 10 s
Probe	0,1 µl		Elongation	72 °C 1 s
LC-Mix	2 µl	Kühlung	40 °C	30 s
H ₂ O	6,5 µl			

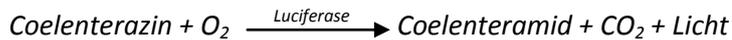
Tab. D.9: Zusammensetzung der UPL-Reaktion und Schritte der RT-PCR im UPL-System

D.2.2 Proteinbiochemische Methoden

D.2.2.1 Der Luciferase-Reportergen-Assay

Prinzip

Der Luciferase-Reportergen-Assay ermöglicht die Quantifizierung des intranukleär aktiven Anteils von β -Catenin. Die Luciferase ist ein Enzym, das die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin, das zur Proteingruppe der Luciferine gehört, katalysiert.



Bei dieser Luciferase-katalysierten Reaktion wird Licht der Wellenlänge 466 nm freigesetzt, das mit Hilfe geeigneter Detektionsmethoden in *relative light units* (RLU) quantitativ erfasst werden kann.

Nach Transfektion der Zellen mit dem pN3-Bar-GLuc-Plasmid exprimiert die Zelle je nach Aktivierungszustand des Wnt/ β -Catenin-Signalweges unterschiedliche Mengen an Luciferase (vgl. D.1.3.3.1, Abb. D.10). Zur Quantifizierung werden Aliquots des Zellüberstands zu definierten Zeitpunkten abgenommen und mit Coelenterazin im Überschuss inkubiert, so dass die Oxidationsreaktion unter Lichtfreisetzung allein von der vorhandenen Menge der Luciferase abhängig ist. Die Lichtemission ist somit direkt proportional zu Luciferase-Konzentration im Zellkulturüberstand und somit zur Aktivität des transkriptionell aktiven Anteils von β -Catenin im Nukleus.

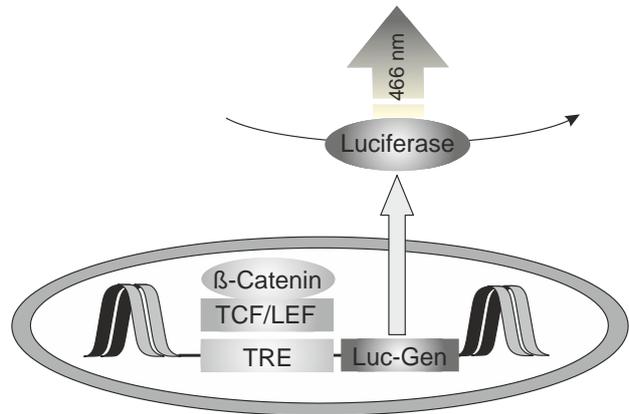


Abb. D.10: Funktionsprinzip des Luciferase-Reportergen-Assays

Durchführung

Nach Transfektion mit dem Reporterplasmid pN3-Bar-GLuc wurde das Medium gewechselt, um in allen Kavitäten posttransfektionell einen Luciferase-freien Überstand zu gewährleisten. Hierbei wurde bei HT1080-Zellen 2% -FCS-haltiges DMEM-high-glucose Medium verwendet, im Falle von hMSCs 2% -FCS-haltiges α MEM-Medium. Zu den definierten Zeitpunkten wurden 50 μ l des Zellüberstands in eine lichtundurchlässige 96-well-Platte überführt und mit 50 μ l einer Coelenterazin-Lösung (Gaussia-Juice, p-j-k, Kleinbittersdorf) inkubiert. Die Emission bei 466 nm wurde bei Raumtemperatur sofort nach Zugabe der Coelenterazin-Lösung photometrisch mit Hilfe des Spectrofluorimeter Safire 2, TECAN, Crailsheim quantifiziert.

D.2.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Prinzip

Der Bicinchoninsäure-Assay ist ein Verfahren zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Probe. Bicinchoninsäure (engl. *bicinchoninic acid*, kurz: BCA) ist eine Dicarbonsäure, die sich mit einwertigen Kupferionen zu einem violettfarbenen Komplex verbinden kann, dessen Absorption bei 562 nm mittels Photometrie bestimmt werden kann. Basis der Komplexbildung ist die Anwesenheit

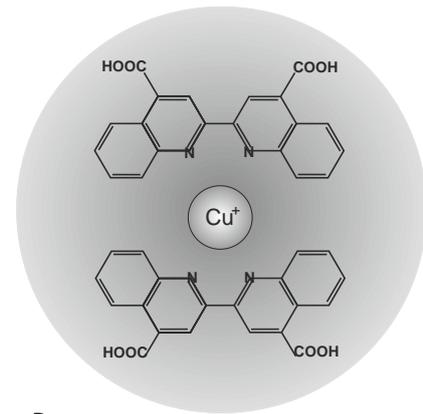
einwertiger Kupferionen. Diese entstehen in einer temperaturabhängigen Reduktionsreaktion mit den Peptidbindung der Proteine, wobei die Menge der entstehenden Cu^+ -Ionen von der Proteinkonzentration abhängig ist. Über die Cu^+ -abhängige Komplexbildung ist somit eine Quantifizierung der Proteinkonzentration möglich.



Abb. D.11: Die Reaktionsschritte des BCA-Assays

A: Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+

B: Komplexbildung mit BCA



Durchführung

50 μl der zu quantifizierenden Proben wurden zunächst mit 130 μl Lysepuffer (10 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA + 2 μM β -Mercaptoethanol + 1 ‰ (v/v) Proteinase-Inhibitor) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung auf transparente 96-wells gegeben und mit 100 μl Uptima-Lösung (Interchim, Frankreich) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte bei 562 nm wurde im ELISA-Reader bestimmt; als Standardkurve diente eine absteigende Verdünnungsreihe von BSA von 1 mg/ml bis 15,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

D.2.2.3 Erstellung von Proteinlysaten

Prinzip

Zur Proteindetektion mittels SDS-PAGE und Western Blot müssen die Zellen zunächst lysiert werden, um die Proteine aus dem Zellüberstand zu gewinnen. Hierzu werden die Zellen zunächst von Mediumbestandteilen befreit und dann mit einem Gesamtlysepuffer zur Gewinnung einer Gesamtproteinlösung bzw. mit Leeb-Lundberg-Puffer zur Gewinnung der zytoplasmatischen und membranösen Proteine versetzt. Die entstehenden Proteinlösungen werden im Folgenden mit einer reduzierenden Färbelösung gemischt und vor dem Auftragen durch Hitzeeinwirkung denaturiert.

Durchführung

Zur Proteinisolierung aus HT1080- und HEK293-Zellen wurden jeweils 10^5 Zellen in die Kavität eines 6-wells ausgesät und mit dem entsprechenden, die Proteinexpression vermittelnden Plasmid transfiziert. Am zweiten Tag nach Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen auf Eis dreimalig mit *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Das PBS wurde nachfolgend entfernt und die Zellen mit je 300 μl Lysepuffer inkubiert. Der Lysepuffer setzte sich aus 300 μl Leeb-Lundberg-Puffer (0,1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) bzw. 300 μl Gesamtlysepuffer (10 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 2 μM β -Mercaptoethanol, pH 8), jeweils versetzt mit α -Proteinaseinhibitor im Verhältnis 1 : 1000 zusammen. Die Zellen wurde im Lysepuffer abgeschabt, suspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend bei 4 °C bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Laemmli-Puffer (Tris/HCl 63 mM, Glycerin 10 %, SDS 2 %, Bromphenolblau 0,01 %), versetzt mit 10 mM Dithiothreitol (DTT), im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Die Proben konnten bei -20 °C gelagert

werden. Vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamid-Elektrophorese-Gel wurden die Proben bei 95 °C für 10 Minuten erhitzt, anschließend gevortext und abgekühlt.

D.2.2.4 SDS-PAGE und Western-Blot

Prinzip

Mittels der SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wird die Proteinfraktion zunächst nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Methode des Western-Blots ermöglicht die Übertragung der Proteinfraktion auf eine Membran und die Detektion bestimmter Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen zunächst lysiert (vgl. D.2.2.3). Die reduzierende Wirkung des zugegebenen Dithiothreitol (DTT) wird genutzt, um Disulfidbrückenbindungen zu spalten, die Sekundärstrukturen stabilisieren. Mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate, SDS*) werden die Proteine denaturiert und die Eigenladungen des Proteins maskiert, die die Laufeigenschaften in der elektrophoretischen Auftrennung verändern würden. Die Komplexbildung zwischen SDS und Proteinen folgt mit einem konstanten Massenverhältnis (1,4 g SDS pro 1 g Protein).

Die Auftrennung der Proteine wird mit Hilfe eines Polyacrylamid-Gels durchgeführt. Polyacrylamid entsteht durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid nach Zugabe des Radikaldonors Ammoniumperoxodisulfat (APS) und des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED). Dabei bildet sich eine netzartige Struktur, die nach Anlage eines elektrischen Feldes die Auftrennung der durch die SDS-Interaktion negativ geladenen, denaturierten Proteine mittels diskontinuierlicher Elektrophorese (Laemmli 1970) ermöglicht. Die Laufstrecke der Proteine ist dabei indirekt proportional zum jeweiligen Molekulargewicht.

Das Western-Blotting beinhaltet die Übertragung der aufgetrennten Proteinbestandteile auf eine Membran. Auf das Gel wird dabei die proteinundurchlässige Nitrozellulosemembran gelegt und mit Filterpapier sowie einem Schwamm überschichtet. Unter der Membran erfolgt die identische Anordnung der letztgenannten Komponenten. Senkrecht zur Membran- und Gelebene wird ein elektrisches Feld angesetzt, wodurch die Proteine aus dem Gel mittels Diffusion auf die Membran übertragen werden.

Die auf der Nitrozellulosemembran fixierten Proteine können nun spezifisch detektiert werden. Zur Visualisierung werden zwei Antikörper (Ak) verwendet. Der Primär-Antikörper, dessen F_{ab} -Ende eine spezifische Bindung mit dem zu detektierenden Protein eingeht, wird durch den HRP-markierten Sekundärantikörper (engl. *horseradish peroxidase (HRP)* = Meerrettich-Peroxidase), der an den F_c -Terminus des Primärantikörpers bindet, markiert (vgl. Abb. D.12). Bei der Oxidation des HRP-Substrats Luminol wird eine Chemolumineszenz der Wellenlänge 428 nm freigesetzt, die mittels eines Fluoreszenzfilms detektiert werden kann.

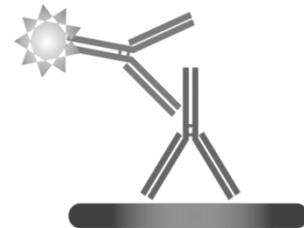


Abb. D.12: Proteindetektion mittels Chemolumineszenz

Durchführung

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im TransBlot Module (BioRad, München) bei 120 V in einem SDS-haltigen Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3). Die Elektrophoresedauer betrug 90 Minuten, wobei die zurückgelegte Laufstrecke durch die Lauffront des im Auftragspuffer enthaltenen Bromphenolblaus kontrolliert werden konnte. Vor dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 μm) für 15 Minuten in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol) inkubiert, anschließend wurden Membran, Gel, Filterpapier und Schwämme in o.g. Anordnung zusammengefügt und die Proteine

durch die angelegte Stromstärke von 70 mA über 90 Minuten auf die Membran transferiert. Nach der Übertragung der Proteinbestandteile wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mittels einer 5-prozentigen Magermilchlösung (in Aqua dest.) blockiert, um einen spezifischen Proteinnachweis zu gewährleisten. Nach Entfernung überschüssiger Magermilchlösung durch dreimaliges Waschen mit TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton X-100) wurde die Membran für eine Stunde in einer Lösung aus TBS-T und dem Primärantikörper inkubiert. Unspezifisch bindende Antikörper wurden durch einen dreifachen Waschschrift mit TBS-T für jeweils 10 Minuten von der Membranoberfläche entfernt. Im Folgeschritt wurde durch Zugabe und einstündige Inkubation des in TBS-T gelösten Sekundärantikörpers die Bindung an den F_c-Teil des Primär-Antikörpers erreicht. Die eingesetzten Antikörper mit den jeweiligen Verdünnungsstufen können Tab. D.10 entnommen werden. Im finalen Schritt wurde die in TBS-T-gewaschene und getrocknete Membran eine Minute lang in 2 ml Entwicklerreagenz (Western Lightning Plus-ECL, Perkin-Elmer, USA) getränkt. Durch Auflage des Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, USA konnten schließlich die entsprechenden Proteinbanden mittels Chemolumineszenz-Detektion erfasst werden.

Ak-Typ	Antikörper	Antigen	Konzentration
<i>Primär-Antikörper</i>	Rabbit Polyclonal to Fzd8 (GeneTex, USA)	Fzd8 N-Terminus	1 µg/ml
	Goat anti-Fzd8 (everest Biotech, USA)	Fzd8 C-Terminus	1,5 µg/ml
	Rat monoclonal Anti-HA High Affinity (Roche, Mannheim)	HA-Tag	12,5 mU/ml
<i>Sekundär-Antikörper</i>	Goat anti-rat IgG HRP (Santa Cruz, USA)	F _c -Teil Ratte	0,2 µg/ml
	Amersham ECL Anti-rabbit IgG (GE, USA)	F _c -Teil Hase	1 : 1000
	Donkey anti-goat IgG (Santa Cruz, USA)	F _c -Teil Ziege	0,04 µg/ml

Tab. D.10: Im Western-Blotting verwendete Antikörper

D.2.2.5 Proteindetektion mittels Fluoreszenz

Prinzip

Fluoreszierende Proteine wurden erstmals in Form des *green fluorescent proteins (GFP)* von der Arbeitsgruppe um Osamu Shimomura in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt und beschrieben (Shimomura, Johnson et al. 1962). Diese Proteinfamilie reagiert auf Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge mit der Emission einer differenten Wellenlänge, die detektiert werden kann. Einsatz in der Biologie findet die Gruppe der Fluoreszenzproteine vor allem in der *in-vivo*-Detektion von Proteinen. Hierbei werden sog. Fusionsproteine generiert, die aus dem zu detektierenden Protein sowie einem daran gekoppelten Fluoreszenzprotein bestehen; die hierfür generierten rekombinanten DNA-Abschnitte werden nach Integration in entsprechende Plasmide in die Zelle transfiziert (Prasher, Eckenrode et al. 1992; Chalfie, Tu et al. 1994).

In dieser Arbeit wurden sowohl das *enhanced green fluorescent protein (eGFP)*, modifiziert aus *Aequorea victoria* (Cormack, Valdivia et al. 1996; Haas, Park et al. 1996) als auch das *red fluorescent protein (drFP583, Handelsname dsRed (Matz, Fradkov et al. 1999))*, modifiziert aus *Discosoma spp.* (Bevis and Glick 2002) eingesetzt. Das eGFP emittiert auf Anregung mit der Wellenlänge 488 nm grünfarbenes Licht (507 nm); dsRed fluoresziert unter Anregung bei 557 nm rotfarbenes Licht der Wellenlänge 579 nm. Die Fluoreszenzprotein-produzierenden Zellen werden durch das Licht einer Hg-Lampe und einen zwischengeschalteten *Shutter* zur Emission angeregt. Die gezielte Erfassung der Fluoreszenz wird durch den Einsatz eines Polarisationsfilters im Strahlengang des Mikroskops ermöglicht, der nur das Licht einer bestimmten Wellenlänge passieren lässt.

Durchführung

Die Zellen wurden nach der Transfektion der Fluoreszenzprotein-Plasmide in Chamber Slides (Nunc, Langerselbold) transferiert. Die Fluoreszenz wurde dabei durch einen entsprechenden Polarisationsfilter und ein 60x/1.4 Öl-Immersions-Objektiv im Mikroskop Olympus IX70 erfasst und dokumentiert.

D.2.3 Zellbiologische Methoden

D.2.3.1 Auftauen, Kultivieren und Einfrieren von hMSC, HT1080 und HEK293

Auftauen

Die in Kryoröhrchen konservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und der Inhalt der Kryotubes wird nach Verflüssigung in 5 ml auf Raumtemperatur temperiertes Medium überführt. Eine Zentrifugation (500 g, 5 Minuten, Raumtemperatur) ermöglicht die Entfernung überschüssigen Einfriermediums. Das verbleibende Zellsediment wurde in Kulturmedium resuspendiert und anschließend in Zellkulturflaschen kultiviert.

Kultivierung

Die Kultivierung von hMSC, HT1080 und HEK293 erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit. hMSC wurden mit αMEM mit 16,5 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin versetzt; HT1080 und HEK293 wurden hingegen in DMEM mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin kultiviert, wobei das Medium alle drei Tage gewechselt wurde. Bei Konfluenzen über 90 % wurden die Zellen gesplittet oder zu Versuchen eingesetzt. Stabil transfizierte Zellen wurden unter stetem Selektionsdruck kultiviert; die dabei verwendeten Antibiotika und die entsprechenden Konzentrationen sind Tab. D.12 zu entnehmen.

Einfrieren

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst mittels Trypsinierung von der Kulturoberfläche gelöst und anschließend quantifiziert (vgl. D.2.3.2). 0,5 bis 2 x 10⁶ Zellen wurden in 1,5 ml Einfriermedium (65 % αMEM, 30 % FBS, 5 % DMSO für hMSC; 65 % DMEM, 30 % FBS, 5 % DMSO für HT1080 und HEK293) gelöst und in Kryotubes (Nunc, Wiesbaden) überführt. Nachdem die Zellen für zwei Stunden bei -20 °C gelagert worden waren, wurden sie in ein -80 °C kaltes Milieu überführt und dort nochmals für 12 Stunden gelagert, bevor die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff erfolgte.

D.2.3.2 Splitten von Zellen, Zellzahlbestimmung

Prinzip

Zur Überführung von adhärennten Zellen wie hMSC oder HT1080 in neue Kulturflaschen bzw. Kavitäten müssen diese von der Kunststoffoberfläche abgelöst werden. Die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung bewirkt hierbei die Lösung der Zellen. Dies geschieht durch die proteolytische Spaltung von Proteinen, die für die Adhäsion verantwortlich sind sowie durch die Komplexbildung von Ca²⁺-Ionen, die für die Interaktion von Cadherinen notwendig sind.

Durchführung

Überschüssige Serumbestandteile wurden durch Absaugen und Waschen mit PBS von der Kulturoberfläche entfernt. Der Abbau der für die Adhärenz verantwortlichen Oberflächenproteine wurde durch Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C erreicht. Nach 5 bis 15 Minuten wurde die Trypsin/EDTA-Reaktion durch Zugabe von den im Kulturmedium enthaltenen

Proteaseinhibitoren gestoppt. Zur Entfernung von Trypsinrückständen wurde die Zellsuspension in Zentrifugationsröhrchen für 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in neuen Zellkulturkavitäten ausgesät.

Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer eingesetzt, wobei ein Quadrat der Zählkammer ein Volumen von 0,1 µl beinhaltet. Die Zellzahl wurde unter dem Mikroskop nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen} / \mu\text{l} = \frac{\text{Zellzahl in } n \text{ Quadraten}}{n} \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

D.2.3.3 Transiente Transfektion

Prinzip

Die Methode der Transfektion ermöglicht das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryote Zellen. Hierbei werden verschiedene Techniken unterschieden. In dieser Arbeit wurde die Transfektion mittels liposomalem Gentransfer durchgeführt. Moleküle mit einem lipophilen und einem hydrophilen Anteil - sog. amphiphile Substanzen - besitzen in wässriger Umgebung die Tendenz, sich zu kugelförmigen, doppelmembranösen Strukturen, sog. Liposomen, zusammenzulagern. Durch die positiven Ladungen am hydrophilen Ende des amphiphilen Transfektionsreagenz kann durch Wechselwirkung mit der durch die Phosphatgruppen negativ geladenen DNA eine Bindung dieser im Inneren des Liposoms gewährleistet werden.

Liposomen werden von eukaryoten Zellen durch Endozytose aufgenommen, die in den Liposomen gebundene DNA wird freigesetzt und durch bisher ungeklärte Mechanismen in die Zelle transloziert (Zabner, Fasbender et al. 1995). Alternativ zur endozytotischen Aufnahme wird auch eine direkte Fusion des Liposoms mit der Zellmembran und eine konsekutive Aufnahme der DNA in das Zellinnere diskutiert (Felgner, Gadek et al. 1987).

Transfizierte zirkuläre Plasmid-DNA besitzt nur eine beschränkte Aufenthaltsdauer und damit Wirksamkeit im Zellkern, die zudem stark variieren und vom Proliferationsverhalten der Zelle abhängig sind. Eine gewünschte langfristige Wirkung bedingt somit eine stabile Integration der Plasmid-DNA in die genomische DNA, die in D.2.3.4 erläutert wird.

Durchführung

Die liposomale Transfektion wurde an in 6-well-Kavitäten ausgesäten Zellen durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Konfluenz der Zellen nicht zu ausgeprägt war, da eine zu hohe Konfluenz mit einer negativen Transfektionseffizienz assoziiert ist. Die Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) durchgeführt; die eingesetzte Menge des Lipofectamines berechnet sich wie folgt:

$$V(\text{Lipofectamine 2000}) = m(\text{DNA in } \mu\text{g}) \times 1,5$$

Lipofectamine 2000 wurde hierzu in serumfreiem DMEM-Medium gelöst und für maximal 5 Minuten inkubiert. Parallel wurde auch die zu transfizierende DNA in serumfreiem DMEM inkubiert. Die eingesetzten Volumina sind in Tab. D.11 dargestellt. Nach der Inkubationsphase wurden die Lipofectamine 2000- und DNA-Lösungen gemischt und nochmals für 20 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert, um eine bestmögliche Formation der zur Transfektion nötigen Liposomen-Komplexe zu gewährleisten. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die nach dem Medienwechsel mit normalem Zellkulturmedium behandelten Zellen gegeben. Nach einer sechsständigen Transfektionsphase bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde das Medium nochmals gewechselt, um eine Schädigung der Zellen durch das Transfektionsreagenz zu vermeiden.

Transfektionsansatz für Zellen einer 6-well Kavität			
<i>Lipofectamine 2000-haltiger Ansatz</i>		<i>DNA-haltiger Ansatz</i>	
DMEM	250 µl	DMEM	250 µl
Lipofectamine	2,88 µl	DNA	1,92 µg x c(DNA)
5-minütige Inkubationsphase			
<i>Gemischte Ansätze</i>			
	DMEM	500 µl	
	Lipofectamine	2,88 µl	
	DNA	1,92 µg	
20-minütige Inkubationsphase, dann tropfenförmige Zugabe auf die Zellen			
6-stündige Inkubationsphase			
Medienwechsel			

Tab. D.11: Ablauf der transienten Transfektion.

D.2.3.4 Stabile Integration von DNA-Sequenzen in das Wirtsgenom

Prinzip

Die transiente Transfektion eukaryoter Zellen (vgl. D.2.3.3) ermöglicht nur eine vorübergehende Translokation der transfizierten DNA in den Zellkern. Um eine Gensequenz dauerhaft im Zellkern zu fixieren, muss diese in das Genom der Zelle integriert werden, was auch als stabile Transfektion bezeichnet wird. Hierbei können Techniken zur zielgerichteten Integration von Methoden der zufallsgerichteten Insertion unterschieden werden; zweitens wurde in dieser Arbeit eingesetzt.

Der zentrale Grundgedanke der stabilen Transfektion besteht in der Generierung eines Selektionsvorteils Plasmid-tragender Zellen sowie der Elimination eukaryoter Zellen, die die transfizierte DNA nicht in ihr Genom integrieren. Erreicht werden kann dies durch eine Selektion mittels auf Eukaryoten wirkender (= eukaryotischer) Antibiotika. Das zu integrierende Plasmid codiert für ein Antibiotika-Resistenzprotein, das eine Selektion Plasmid-tragender Zellen durch Inaktivierung des Selektionsantibiotikums ermöglicht. Durch konstant aufrecht gehaltenen Selektionsdruck ab dem Zeitpunkt der Transfektion werden zunächst untransfizierte Zellen aus der Population eliminiert, im weiteren Verlauf Zellen, die das Resistenzgen-tragende Plasmid nur transient aufgenommen haben, der Restbestand überlebender Zellen besitzt eine stabile Integration der transfizierten Nukleinsäuresequenz.

Bei der zufallsgerichteten Insertion wird das Plasmid an einer unprädictierbaren Stelle geöffnet und an randomisierten Loci in die genomische DNA integriert. Bei diesem Vorgang können codierende Bereiche sowohl auf dem Plasmid als auch in der genomischen DNA geschädigt werden. Ferner kann die Zahl der Integrationsereignisse von singulären bis zum multiplen Auftreten an unterschiedlichen Genloci variieren, so dass auf Grund dieser Gegebenheiten von differierenden Expressionsleistungen der transfizierten Nukleinsäuresequenz zwischen den einzelnen stabil transfizierten Zellklonen bzw. -populationen ausgegangen werden muss. Um diese Effekte zu eliminieren, wird die Zellzahl reduziert, um eine klonale Expansion einzelner stabil transfizierter Zellen zu ermöglichen. Zellen

eines Klon weisen hierbei ein identisches Integrationsmuster der inserierten DNA auf, so dass von einer homogenen Expressionsleistung ausgegangen werden kann.

Durchführung

Die zunächst durchgeführte transiente Transfektion wurde bereits in Abschnitt D.2.3.3 beschreiben. Im Folgenden wurde das Medium der transfizierten Zellen mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versehen; in der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Blasticidin als auch G418 eingesetzt, die je nach Zelltyp variierenden Konzentrationen sind in Tab. D.12 zusammengestellt. Durch Selektion in einer nicht-transfizierten Kontrollkultur konnte der zytotoxische Effekt des Selektionsantibiotikums überprüft

werden, so dass ein Überleben nicht-plasmidhaltiger Zellen durch zu niedrig gewählte Antibiotikakonzentrationen ausgeschlossen werden konnte. Die stabil selektionierten Zellen wurden zur räumlichen Separierung in geringer Anzahl auf 10 cm-Kulturplatten ausplattiert, um ein klonales Wachstum einzelner Zellen zu ermöglichen. Diese Klone wurden dann unter Einsatz eines



Abb. D.13: selektive Trypsinierung monoklonaler Zellpopulationen unter Einsatz des Trypsinierungszylinders.

Trypsinierungszylinders selektiv gelöst (vgl. Abb. D.13) und in eine neue Kavität zur weiteren monoklonalen Expansion und Kultivierung überführt. Der antibiotische Selektionsdruck wurde bei der Kultivierung stets aufrechterhalten, um einen Verlust des Resistenzgen-tragenden Plasmids und damit des integrierten Transgens zu vermeiden.

Der Vorgang der klonalen Expansion wurde bei den humanen mesenchymalen Stammzellen nicht durchgeführt, um eine möglichst niedrige Passage der Zellen nach DNA-Integration zu gewährleisten.

Zelltyp	Transfektionsvektor	Selektionsantibiotikum	Konzentration
HT1080	pN3-Bar-GLuc	G418	200 ng/ml
HT1080	pN3-Bar-GLuc	G418	200 ng/ml
	pEF-DEST51-Wnt8B	Blasticidin	5 µg/ml
HT1080	pN3-Bar-GLuc	G418	200 ng/ml
	pEF-DEST51	Blasticidin	5 µg/ml
HT1080	pN3-Fzd8Δ(1-52)-eGFP	G418	200 ng/ml
HT1080	pDs-Red-Wnt8B	G418	200 ng/ml
HT1080	pDs-Red	G418	200 ng/ml
HEK	pN3-Fzd8Δ(1-52)-eGFP	G418	200 ng/ml
HEK	pN3-eGFP	G418	200 ng/ml
hMSC	pN3-Bar	G418	200 ng/ml

Tab. D.12: Verwendete stabil transfizierte Zellklone bzw. Zellpopulationen, deren Selektionsantibiotika und die entsprechenden Konzentrationen.

D.2.4 Bioinformatische Methoden

Internet-basierte bioinformatische Methoden

Primerdesign für die RT-PCR	Roche Universal Probelibrary Assay Design Center www.roche-applied-science.com
Genomübergreifende Validierung der Primerbindungsstellen	NCBI Nucleotide Blast Search http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Identifikation potentieller Signalsequenzen	Signal P 3.0 Server http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
Identifikation potentieller Proteaseschnittstellen	MEROPS Blast Search http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/merops/advanced
Prädiktion von Proteinmassen an Hand der korrespondierenden cDNA-Sequenz	ExpASy Compute pI/Mw-Rechner web.expasy.org/compute_pi
Zusammenstellung von Reaktionsansätzen für den Restriktionsverdau mit mehreren Enzymen	NEB Double Digest Finder Software http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp

Tab. D.13: Bioinformatische Methoden I

Verwendete Software

Image Master Labscan 3.0	Pharmacia, Freiburg
Image Quest QV 770	Intas, Göttingen
LightCycler Software 3.5	Roche, Mannheim
SECentral	SciEdSoftware, Cary, USA
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim

Tab. D.14: Bioinformatische Methoden II

E Ergebnisse

E.1 Expression und Lokalisation N-terminal verkürzter Varianten von Fzd8

E.1.1 Evaluierung des Transkriptionsstarts von Fzd8 unter Einsatz der RLM-RACE

Zur Detektion des Transkriptionsstarts der Fzd8-mRNA führten wir in unserem Labor eine *RNA-ligase mediated rapid amplification of cDNA-ends* (RLM-RACE) in verschiedenen Zellpopulationen von HT1080-Fibrosarkomzellen durch (Geißler et al., persönliche Mitteilung). Hierbei wurden je nach verwendeter Zelllinie verschiedene Transkriptionsstartpunkte detektiert, welche zum Teile eine deutliche Abweichung vom publizierten Transkriptionsstart aufwiesen. Die exakten Resultate der RLM-RACE sind in Tab. E.1 aufgeführt. Durch die Modifikation des 5'-Endes der mRNA kam es hierbei in allen Zelllinien teilweise zur Deletion des ersten Startcodons und konsekutiv zur potentiellen Verschiebung des Translationsstartpunktes nach *downstream* und demzufolge zu einem N-terminal um 52 Aminosäuren verkürzten Proteinprodukt, das im Folgenden mit Fzd8 Δ (1-52) bezeichnet wird. Die genauen Auswirkungen auf die Translation und das entstehende Proteinprodukt werden in F.1.1 diskutiert.

HT1080		hMSC		HEK293	
<i>TS</i>	<i>Häufigkeit</i>	<i>TS</i>	<i>Häufigkeit</i>	<i>TS</i>	<i>Häufigkeit</i>
- 20	2 x	+ 15	2 x	+ 13	3 x
+ 5	1 x	+ 16	3 x		
+ 6	1 x	+ 17	2 x		
+ 23	2 x				
+ 72	2 x				

Tab. E.1: Ergebnisse der RLM-RACE.

Der publizierte Transkriptionsstartpunkt entspricht hierbei Position +1, *upstream* gelegene Startpunkte besitzen ein negatives, *downstream* gelegene Startpunkte ein positives Vorzeichen.

Abkürzung: TS, Transkriptionsstart.

E.1.2 Etablierung einer spezifischen Amplifikationsreaktion für die Fzd8-cDNA

Die codierende Sequenz von Fzd8 zeichnet sich durch einen sehr hohen GC-Gehalt von 70,9 % aus. GC-reiche DNA-Sequenzen stellen auf Grund der starken Interaktion der Basen durch jeweils dreifache Wasserstoffbrückenbindungen ein besonderes Hindernis für die DNA-Amplifikation durch die *polymerase chain reaction* (PCR) dar, die den Einsatz potenter Polymerasen und eventuell modifizierter Protokolle erfordert. Die PCR von Fzd8 zeigte nur unter Verwendung der HotStar HiFidelity Polymerase (Qiagen, Hilden) spezifische Ergebnisse (vgl. Abb. E.1). Dieses Enzym wird mit einer Q-Solution für die Amplifikation GC-reicher DNA geliefert, die laut Hersteller durch die Modifikation des Schmelzverhaltens der DNA verbesserte PCR-Bedingungen schaffen soll. Ein hoher Anteil an Q-Solution resultierte jedoch in einer verminderten Genauigkeit der Amplifikationsreaktion, so dass für die Amplifikation der Fzd8-cDNA die niedrigst mögliche Konzentration an Q-Solution in der Reaktion angestrebt wurde. Tab. E.2 zeigt die optimierten Reaktionsbedingungen für die PCR der Fzd8-cDNA.

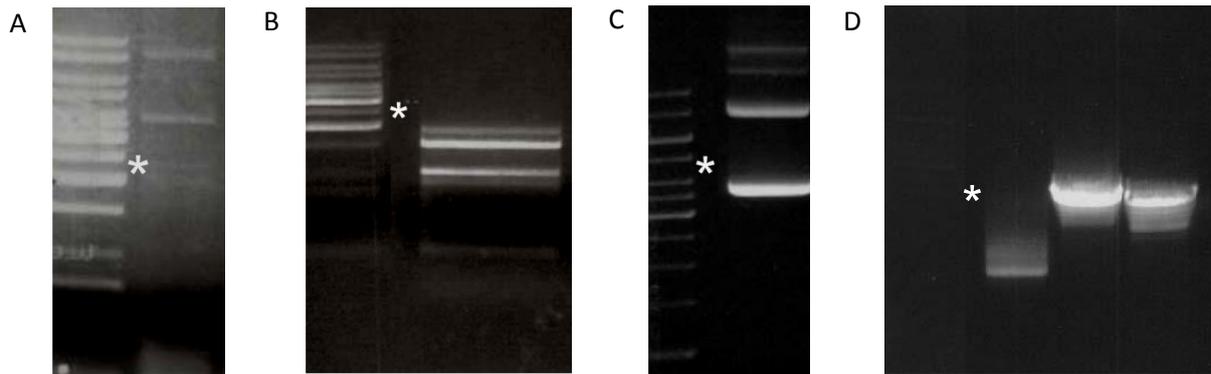


Abb. E.1: PCR von Fzd8. Der Stern markiert die zu erwartende Produktlänge (2101 bp). Links ist auf jeder Abbildung jeweils der Längenmarker, rechts das PCR-Produkt aufgetragen.

A: Platinum Taq-Polymerase, B: PfuTurbo-Polymerase, C: Phusion Flash-Polymerase

D: HotStar HiFidelity Polymerase, links: 1 x Q-Solution, Mitte: 2 x Q-Solution, rechts: 3 x Q-Solution

Lösung	Volumen	Schritt	Temp.	Dauer
Matrize	1 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	300 s
Primer	je 5 µl (1 µM)	Denaturierung	95 °C	15 s
HotStar HiFidelity Polymerase	2 µl (2,5 U/µl)	35 Zyklen <i>Annealing</i>	55 °C	60 s
5x Puffer	10 µl	Elongation	68 °C	360 s
5x Q-Solution	13 µl (= 1,3 x)	Finale Elongation	72 °C	600 s
H ₂ O	14 µl			

Tab. E.2: PCR-Ansatz zur Fzd8-Amplifikation (links) und deren Reaktionsbedingungen (rechts).

E.1.3 Generierung von Plasmiden zur ektopischen Expression verschiedener N-terminal verkürzter Fzd8-Varianten

E.1.3.1 pN3-Fzd8-HA, p2in1-Fzd8, p2in1-Fzd8-HA

Auf der Basis des pN3-Fzd8-Plasmids (vgl. D.1.3.1.2) beruhen die Konstrukte p2in1-Fzd8 und p2in1-Fzd8-HA, die jeweils eine Doxycyclin-abhängige Expression des Fzd8-Rezeptors erlauben. Zudem eröffnet das Plasmid pN3-Fzd8-HA die Möglichkeit der Detektion des ektopisch exprimierten Fzd8 auf Proteinebene über den integrierten HA-Tag.

Zur Generierung dieser Plasmide wurde zunächst die mittels PCR amplifizierte cDNA (vgl. E.1.2) von Fzd8 in das TOPO-Klonierungssystem (Invitrogen, USA) integriert. Die verwendeten Primer (vgl. D.1.2.2) inserierten hierbei N-terminal des kodierenden Abschnitts die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Clal*, C-terminal die Sequenz für *EcoRV* (vgl. Abb. E.3, Schritt A). In diesem Vektorsystem wurde im Anschluss die Sequenz des HA-Tags in das Leseraster der codierenden Sequenz von Fzd8 integriert. Essentiell war hierbei die Prämisse, die Tag-Sequenz am 3'-Ende der Signalsequenz der Fzd8-cDNA zu inserieren, um eine posttranslationale Abspaltung des HA-Tags zu verhindern. Der codierende Bereich von Fzd8 enthält in diesem Bereich eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *SfiI*. Zur Integration des HA-Tags wurde der Vektor deshalb mit *SfiI* linearisiert und mit Hilfe der *calc intestinal phosphatase* (CIP) dephosphoryliert (vgl. D.2.1.6), um die Wahrscheinlichkeit einer Religation zu minimieren. Die von Metabion, Martinsried hergestellten Oligonukleotide *SfiI*-HA-*SfiI*-f und *SfiI*-HA-*SfiI*-r (vgl. D.1.2.2) wurden zur Dimerisierung in äquimolarer

Menge auf 90 °C erhitzt, langsam abgekühlt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch eine Ligationreaktion wurde die so entstandene doppelsträngige *Tag*-Sequenz in den Vektor integriert (vgl. Abb. E.3, Schritt B). Nebenreaktionsprodukte wie Mehrfachintegrationen oder Religationen wurden durch analytische Restriktion mit *BsrGI* und *Clal* und anschließender Sequenzierung ausgeschlossen. Bei einer Religation war in der Gelelektrophorese hierbei eine Bande von 276 bp, bei Einfachintegration von 324 bp zu erwarten. Mehrfachintegrationen erhöhten die Bandenlänge jeweils um die Länge des integrierten Oligonukleotids, also 48 bp (vgl. Abb. E.2). Durch die nicht-palindromische Erkennungssequenz der *SfiI*-Schnittstelle konnte eine Integration des *Tags* in umgekehrter Leserichtung vermieden werden.

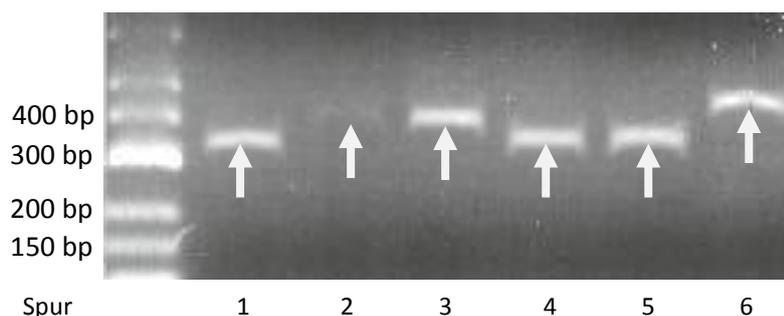
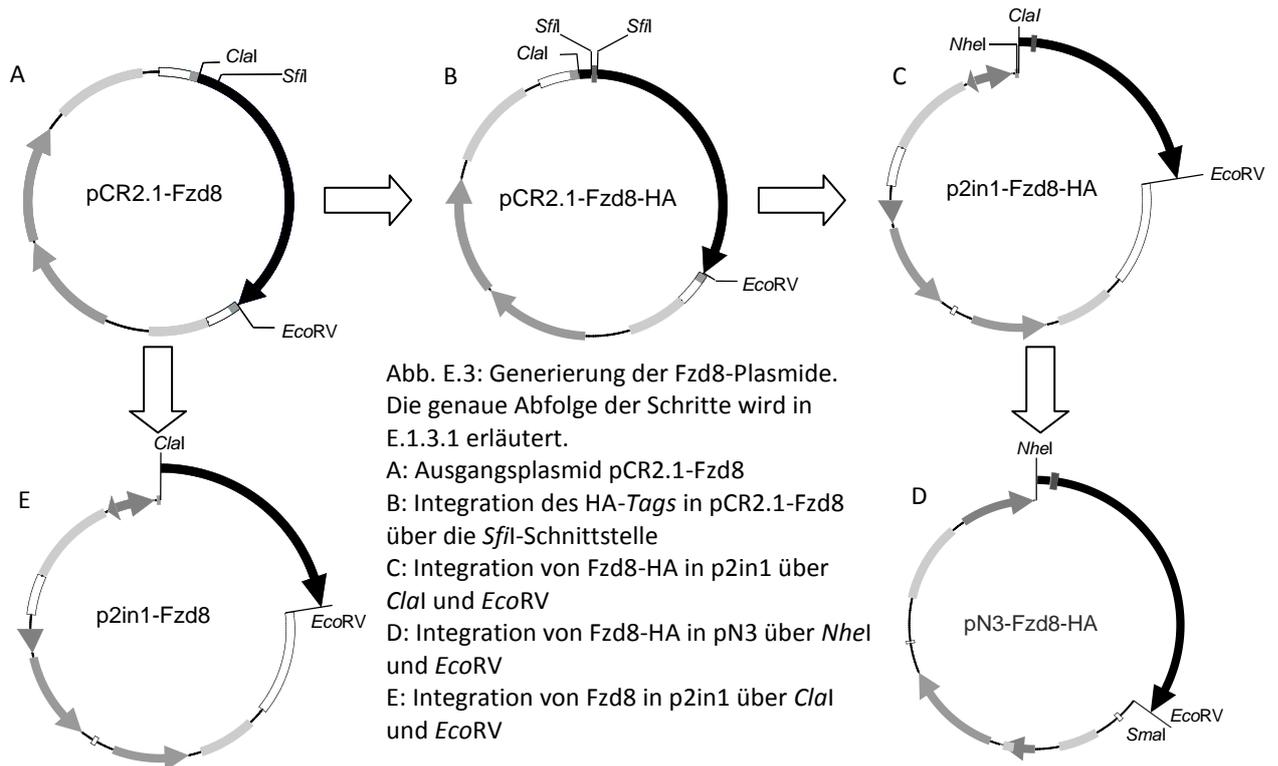


Abb. E.2: Agarosegelelektrophoretische Kontrolle des Hämagglutinin-*Tag*-Einbaus (2,5-prozentiges Agarosegel). Spur 1, 4 und 5 zeigen eine regelgerechte Einfachintegration mit einer Bande bei 324 bp. Spur 2 und 3 zeigen eine Doppelintegration mit konsekutiver Bande bei 372 bp. Spur 6 zeigt eine Dreifachintegration mit einer Bande bei 420 bp.

Die an den DNA-Enden mittels der entsprechenden Primer in das *Fzd8*-Amplifikationsprodukt integrierten Restriktionsenzymstellen für *Clal* und *EcoRV* erlaubten die Generierung von *sticky ends* (*Clal*) bzw. *blunt ends* (*EcoRV*) an den Enden der *Fzd8*-cDNA und somit die zielgerichtete Ligation in den entsprechend mit den gleichen Enzymen stromabwärts der Promotorsequenz eröffneten p2in1-Vektor (vgl. Abb. E.3, Schritt C). Aus dem p2in1-*Fzd8*-HA-Vektor konnte wiederum die Sequenz des HA-getaggten *Fzd8* mittels der Restriktionsenzyme *NheI* und *EcoRV* isoliert werden. Zur Integration dieses Fragments in das pN3-Plasmid wurde letzteres mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NheI* und *SmaI* stromabwärts des CMV IE-Promotors linearisiert. Die Produkte der *SmaI*- und *EcoRV*-Digestion generierten jeweils glatte Enden (*blunt ends*), so dass die restringierte *Fzd8*-DNA unidirektional in den pN3-Vektor zur Generierung des pN3-*Fzd8*-HA-Plasmids ligiert werden konnte (vgl. Abb. E.3, Schritt D). Auf der Basis des pCR2.1-*Fzd8*-Plasmids wurde ferner der p2in1-*Fzd8*-Vektor generiert, indem die *Fzd8*-cDNA mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Clal* und *EcoRV* aus dem pCR2.1-Vektor geschnitten wurde und in den mit den identischen Enzymen linearisierten p2in1-Vektor ligiert wurde (vgl. Abb. E.3, Schritt E).



E.1.3.2 pN3-Fzd8 Δ (1-52), pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA, p2in1-Fzd8 Δ (1-52)

Zur Expression der um 52 Aminosäuren verkürzten Variante des Fzd8-Rezeptors wurde dessen cDNA sowohl in den Überexpressionsvektor pN3 als auch in den Doxycyclin-induzierbaren p2in1-Vektor integriert. Ferner wurde die codierende Sequenz von Fzd8 im pN3-Plasmid mit einem Hämagglutinin-Tag am N-Terminus zur proteinbiochemischen Detektion versehen.

Die codierende Sequenz für den HA-Tag wurde mittels PCR in die Fzd8-cDNA integriert, indem der *forward*-Primer am 5'-Ende mit einer ATG- sowie der folgenden HA-Sequenz versehen wurde (vgl. D.1.2.2). In der anschließenden Amplifikationsreaktion wurden somit sowohl das Startcodon als auch der HA-Tag am 5'-Ende von Fzd8 integriert. Die so generierte cDNA wurde anschließend in das TOPO-System (Invitrogen, USA) zwischenkloniert (vgl. Abb. E.4, Schritt A). Die an den Enden des PCR-Produkts lokalisierten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *NotI* und *EcoRV* erlaubten nach Restriktion des pCR2.1-Fzd8 Δ (1-52)-HA-Vektors eine zielgerichtete Ligation in den mit den identischen Restriktionsendonukleasen im Bereich der *multiple cloning site* linearisierten p2in1-Vektor (vgl. Abb. E.4, Schritt B). Aus dem entstandenen p2in1-Fzd8 Δ (1-52)-HA-Plasmid konnte wiederum die cDNA des HA-getaggten Fzd8-Rezeptors mittels Restriktionsverdau mit *NheI* und *EcoRV* isoliert und über eine Ligation in den mit *NheI*- und *SmaI* verdauten pN3-Vektor stromabwärts des CMV IE-Promotors integriert werden. Sowohl *EcoRV* als auch *SmaI* generieren hierbei keinen Basenüberhang, so dass die entstehenden *blunt ends* ohne weitere Modifikationen miteinander verbunden werden konnten (vgl. Abb. E.4, Schritt C).

Aus dem pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA-Plasmid konnte der HA-Tag mittels Verdau mit *NheI* und *BamHI*, mit anschließender Klenow-Fill-in-Reaktion (vgl. D.2.1.6) zur Generierung von *blunt ends* sowie durch eine finale Religationsreaktion entfernt werden. Hierbei wurden aus dem Vektor sowohl das stromaufwärts des HA-Tags lokalisierte Startcodon als auch der größte Anteil der Hämagglutinin-Sequenz entfernt, so dass die Translation am Basenpaar 157 (nächstfolgendes Startcodon) der Fzd8-

Sequenz des Rezeptors initialisiert wurde und das nach der Translation entstehende Proteinprodukt keinen N-terminalen Hämagglutinin-Tag aufweisen sollte (vgl. Abb. E.4, Schritt D).

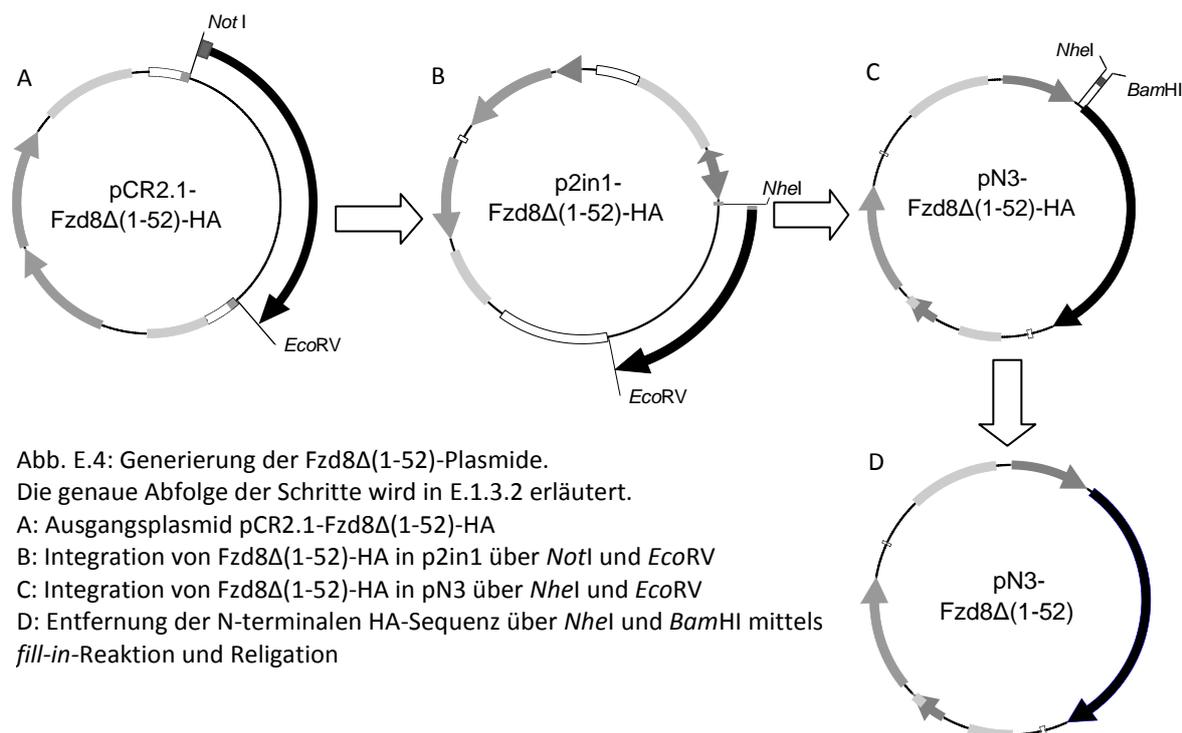


Abb. E.4: Generierung der Fzd8Δ(1-52)-Plasmide.

Die genaue Abfolge der Schritte wird in E.1.3.2 erläutert.

A: Ausgangsplasmid pCR2.1-Fzd8Δ(1-52)-HA

B: Integration von Fzd8Δ(1-52)-HA in p2in1 über NotI und EcoRV

C: Integration von Fzd8Δ(1-52)-HA in pN3 über NheI und EcoRV

D: Entfernung der N-terminalen HA-Sequenz über NheI und BamHI mittels fill-in-Reaktion und Religation

E.1.3.3 pN3-Fzd8Δ(1-268)-HA, p2in1-Fzd8Δ(1-268), p2in1-Fzd8Δ(1-268)-HA

Mit dem Ziel, die Rolle der *cysteine rich domain* (CRD) des Fzd8-Rezeptors in der Signaltransduktion zu eruieren, wurde eine N-terminal um 268 Aminosäuren verkürzte Variante generiert, die nur den codierenden Bereich von Fzd8 ab der cDNA-Position 804 beinhaltet. Dadurch entstand eine Rezeptorvariante, welche die *cysteine rich domain*, die für die Wnt-Liganden-Bindung verantwortlich sein soll, nicht umfasste. Diese Variante wurde in den p2in1-Vektor sowohl mit als auch ohne HA-Tag inseriert. Darüber hinaus wurde die HA-verknüpfte Variante auch in den pN3-Vektor integriert.

Die mittels PCR aus pN3-Fzd8 mit den Primern GC-Clal-Fzd8-f-806 und GC-EcoRV-Fzd8-r (vgl. D.1.2.2) amplifizierte cDNA der Fzd8Δ(1-268)-Variante wurde zunächst in das TOPO-System (Invitrogen, USA) integriert (vgl. Abb. E.7, Schritt A). Aus dem Vektor pCR2.1 konnte nun die codierende Sequenz über die Restriktionsenzymstellen für Clal und EcoRV isoliert und anschließend in den mit den identischen Endonukleasen verdauten pN3-Vektor 3'-terminal des Promotors zielgerichtet ligiert werden (vgl. Abb. E.7, Schritt B). Auf identische Weise wurde die Fzd8-Sequenz auch in den p2in1-Vektor integriert (vgl. Abb. E.7, Schritt C). Die Insertion der Fzd8-cDNA in diesen Vektor stellte das Ausgangsprodukt für die Verknüpfung mit dem HA-Tag dar. Hierbei wurden die Oligonukleotide Clal-ATG-HA-Clal-f und Clal-HA-CAT-Clal-r zur Dimerisierung zunächst auf 90 °C erhitzt, langsam kontinuierlich abgekühlt und gelelektrophoretisch gereinigt. In der Dimerisierungsreaktion bildeten sich auf Grund des Primerdesigns jeweils überhängende Enden, die für die Generierung der Clal-Restriktionsendonukleasenschnittstellen am 5'- und 3'-Terminus notwendig waren (vgl. Abb. E.5).

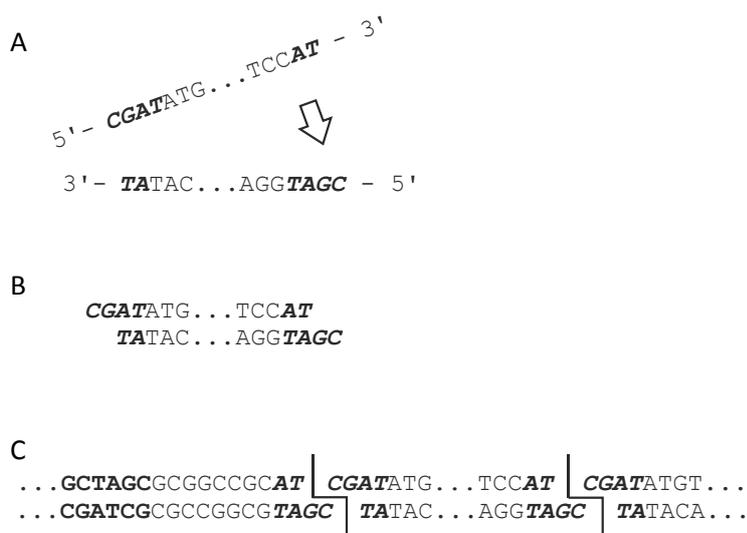


Abb. E.5: Integration des HA-Tags.

A: Dimerisierungsreaktion

B: Generierung von *Clal*-Schnittstellen an den *Tag*-Enden durch entsprechendes OligonukleotiddesignC: Integration in den mit *Clal* eröffneten p2in1-Vektor

Legende:

kursiv: überhängende Enden der *Clal*-Schnittstellefett: *NheI*-Schnittstelle zur Integration in den pN3-Vektor

Nach Linearisierung von p2in1-Fzd8Δ(1-268) mit *Clal* und anschließender Dephosphorylierung der überhängenden Enden mittels *calc intestinal phosphatase* (vgl. D.2.1.6) konnte das zuvor an den Enden phosphorylierte Dimerisierungsprodukt integriert werden. Die Sequenz des HA-Tags enthielt hierbei am 5'-Ende das ATG-Startcodon, wodurch der Translationsstart vor die Hämagglutinin-Sequenz verschoben wurde. Mehrfachintegrationen oder Religationen ohne Insertion der *Tag*-Sequenz wurden mit Hilfe eines Restriktionsverdau mit den Enzymen *BsrBI* und *PvuII* ausgeschlossen. Eine Mehrfachintegration hätte eine spezifische Bande bei 40 bp, eine Religation eine Bande von 158 bp ausgewiesen, während eine Einfachintegration der Hämagglutinin-Sequenz in der Agarosegelelektrophorese eine spezifische Bande bei 200 bp zeigte (vgl. Abb. E.6). Integrationen gegen die Leserichtung wurden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung ausgeschlossen.

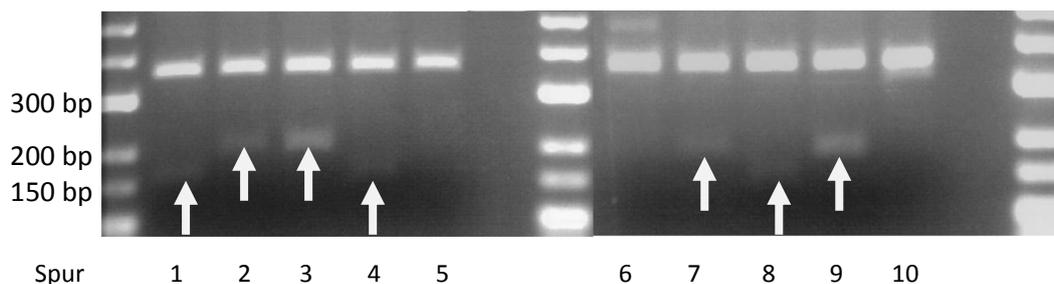


Abb. E.6: Agarosegelelektrophoretische Kontrolle des Hämagglutinin-*Tag*-Einbaus (zweiprozentiges Agarosegel). Spur 2, 3, 7 und 9 zeigen eine Bande bei 200 bp, welche eine Integration der *Tag*-Sequenz nachweist. Spur 1, 4 und 8 zeigen eine Religation des Vektors mit Bande bei 158 bp. Eine Mehrfachintegration (Bande bei 40 bp) konnte nicht nachgewiesen werden.

Aus dem HA-*Tag*-verknüpften p2in1-Fzd8Δ(1-268)-HA wurde die codierende Sequenz mit *NheI* und *EcoRV* isoliert und in den mit *NheI* und *SmaI* geschnittenen pN3-Vektor integriert, um ein Plasmid zur Überexpression des durch die HA-Sequenz markierten Rezeptorkonstrukts zu generieren (vgl. Abb. E.7, Schritt D).

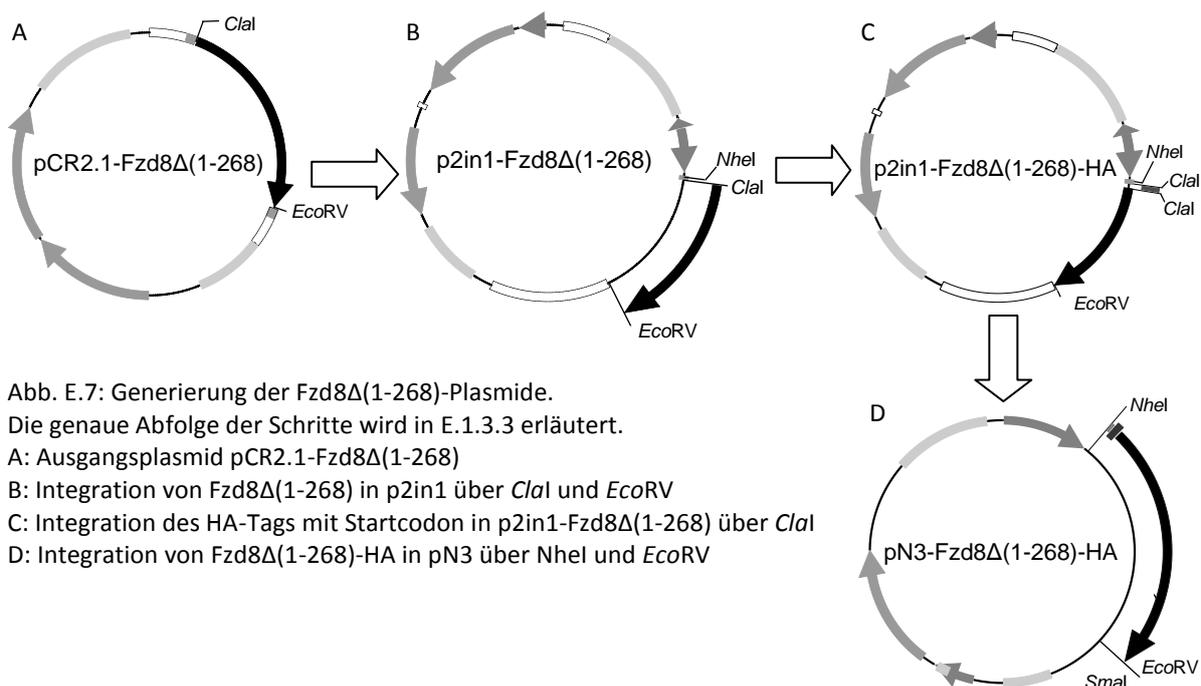


Abb. E.7: Generierung der *Fzd8Δ(1-268)*-Plasmide.

Die genaue Abfolge der Schritte wird in E.1.3.3 erläutert.

A: Ausgangsplasmid *pCR2.1-Fzd8Δ(1-268)*

B: Integration von *Fzd8Δ(1-268)* in *p2in1* über *Clal* und *EcoRV*

C: Integration des HA-Tags mit Startcodon in *p2in1-Fzd8Δ(1-268)* über *Clal*

D: Integration von *Fzd8Δ(1-268)-HA* in *pN3* über *NheI* und *EcoRV*

E.1.4 Generierung eines Expressionsplasmids für eGFP-markiertes *Fzd8Δ(1-52)*

Hauptziel dieses Vektorkonstruktes war die Expression eines Fusionsproteins aus verkürztem *Fzd8*-Rezeptor und einem am 3'-Ende fusionierten eGFP zur Prädiktion der zellulären Lokalisation der Rezeptorvariante mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

Bei der Generierung des Plasmids waren folgende vier Überlegungen von entscheidender Bedeutung:

- 1) Die ersten Basen des entstehenden Fusionsproteins determinieren dessen Lokalisation. Um diesem die identische Lokalisation wie die der nativen *Fzd8Δ(1-52)*-Variante zuzuweisen, musste die codierende Sequenz für *Fzd8Δ(1-52)* am 5'-Ende integriert werden.
- 2) Bei Integration der *Fzd8Δ(1-52)*-cDNA am 5'-Ende musste das terminale Stopp-Codon entfernt oder modifiziert werden, um einen Transkriptionsende an diesem Stopp-Codon zu verhindern und die Transkription der Fusions-mRNA bis zum Ende des eGFP-Anteils zu ermöglichen.
- 3) Die zwischen dem ersten und den zweiten Teil des Fusionsproteins lokalisierten Aminosäuren durften keine Schnittstelle für humane Proteasen enthalten, da eine post-translationale Spaltung das Resultat zweier getrennt voneinander existierender Proteine zur Folge gehabt hätte.
- 4) Bei der Fusion musste der translationale Leserahmen eingehalten werden, d.h. zwischen den DNA-Anteilen durften nur Nukleotid-Tripletts integriert werden, um die korrekte Translation des folgenden *DsRed*-mRNA-Abschnitts zu ermöglichen.

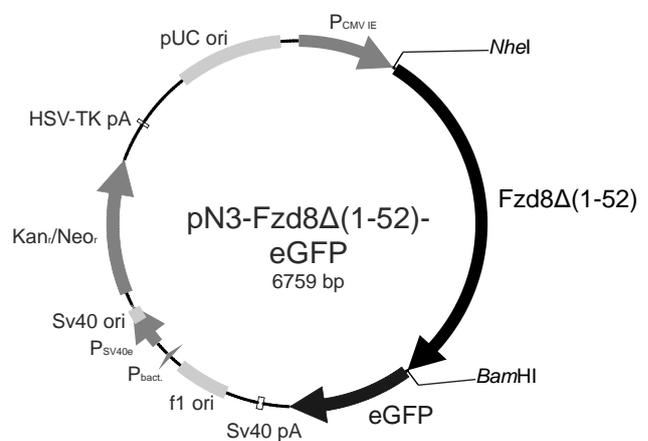


Abb. E.8: *pN3-Fzd8Δ(1-52)-eGFP*

Als Vektorskelett des entstandenen pN3-Fzd8 Δ (1-52)-eGFP-Vektors diente der bereits in D.1.3.2.1 beschriebene pN3-eGFP. Hierzu wurde die cDNA von Fzd8 Δ (1-52) zwischen den Promotor und die codierende Sequenz für eGFP integriert. Dies wurde über die singulären Restriktionsschnittstellen für *NheI* und *BamHI* erreicht.

Hierzu wurde die zu inserierende Fzd8 Δ (1-52)-cDNA zunächst mittels PCR aus pN3-Fzd8 amplifiziert. Entscheidend hierbei war die Primer-vermittelte Mutation des Stopp-Codons. Das veränderte Basentriplett codierte nach dieser Modifikation für die unpolare, ungeladene Aminosäure Glycin. PCR-Produkt wie Vektor wurden mit *NheI* und *BamHI* verdaut und nach Aufreinigung zielgerichtet ligiert. Die entstandene Bindesequenz Fzd8 Δ (1-52)–Gly–Gly–Ser–Ile–Ala–Thr–eGFP offerierte nach einer MEROPS Blast Search Software-Analyse (vgl. D.2.4) keine Erkennungssequenz für humane Proteasen, die eine posttranslationale Spaltung hätten bewirken können.

E.1.5 Quantifizierung der mRNA-Expression der pN3-Fzd8-Varianten

Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der generierten pN3-Überexpressionsplasmide für Fzd8, Fzd8 Δ (1-52) und Fzd8 Δ (1-268) wurden diese in HT1080-Bar-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden am zweiten Tag nach Transfektion lysiert, die mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die mRNA-Expression der Fzd-Rezeptorvarianten mittels qRT-PCR quantifiziert (vgl. Abb. E.9). Es zeigte sich hierbei eine Expressionssteigerung von Fzd8 im Vergleich zur Negativkontrolle pN3-Mock um den Faktor 3,9, Fzd8 Δ (1-52) wurde 3,1-fach erhöht exprimiert. Die Rezeptorvariante Fzd8 Δ (1-268) zeigte eine mittlere Steigerung der Expression um den Faktor 4,0. Die qRT-PCR wurde hierbei so entworfen, dass Primer und Sonde zwischen den Positionen 1540 und 1607, also im codierenden Bereich der cDNA binden. Hiermit wurde sowohl die endogene Fzd8-mRNA-Expression als auch die durch Transfektion ektopisch generierte Expression in der Quantifizierung erfasst. Die Fzd8-mRNA-Level der pN3-Mock-transfizierten Zellpopulation entsprachen somit der endogenen Fzd8-Expression.

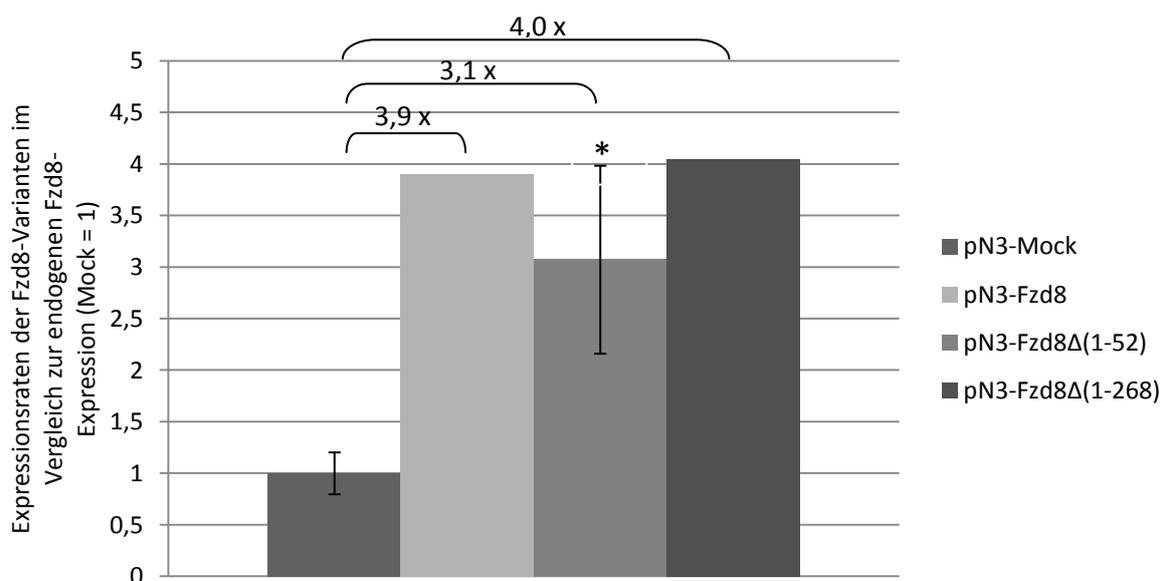


Abb. E.9: mRNA-Kopienzahl der ektopisch exprimierten Fzd8-Varianten im Vergleich zur endogenen Fzd8-mRNA-Expression (Mock = 1).

Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$ (zu pN3-Mock).

E.1.6 Detektion der Proteinexpression der Fzd8-Varianten

Die Detektion von Fzd8 mit den gegen den N-bzw. C-Terminus gerichteten anti-Fzd8-Antikörpern zeigte in untransfizierten Zelllysaten sowie in Zelllysaten nach Überexpression von Fzd8 keine spezifischen Resultate, so dass zur weiteren Proteindetektion ein Hämagglutinin-*Tag* in die entsprechenden Plasmide integriert wurde (vgl. E.1.3.1, E.1.3.2 und E.1.3.3).

Zur HA-*Tag*-vermittelten Detektion der Expression der verschiedenen Fzd8-Varianten wurden die Überexpressionsplasmide pN3-Fzd8-HA, pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA und pN3-Fzd8 Δ (1-268)-HA in HEK293-Zellen transfiziert und am Tag 2 lysiert (vgl. D.2.2.3). Die Massen der Proteine und somit die zu erwartenden Banden bei der Detektion des an die Fzd8-Varianten gebundenen HA-*Tags* wurden mit Hilfe des ExPASy Compute pI/Mw-Rechners (vgl. D.2.4) in kDa berechnet. Die errechneten Molekülmassen der verschiedenen Transkriptionsvarianten sind in Tab. E.3 dargestellt. Der HA-hierbei elf Aminosäuren mit dem Molekulargewicht von 3,6 kDa.

Name	Aminosäuren	Berechnete Molekülmasse
Fzd8-HA	694 aas	74,9 kDa
Fzd8 Δ (1-52)-HA	642 aas	69,1 kDa
Fzd8 Δ (1-268)-HA	426 aas	46,4 kDa

Tab. E.3: Molekülmassen der Fzd8-Transkriptionsvarianten.

Quelle: ExPASy Compute pI/Mw-Rechner (web.expasy.org/compute_pi)

Die Detektion des Fzd8-Proteins stellte sich auf Grund der hohen Zahl an Cysteinen und der damit verbundenen Disulfidbrückenbildung unter Normalbedingungen schwierig dar; es zeigte sich eine Proteinakkumulation im Bereich von > 250 kDa (vgl. Abb. E.10 und Abb. E.11). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Konzentration der reduzierenden Substanzen im der SDS-PAGE modifiziert, um eine bessere Auftrennung des Fzd8-Proteins zu erreichen. Der Western Blot in Abb. E.10 zeigt die Auftrennung verschiedener Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen der reduzierenden Reagenz Laemmli-DTT zur maximalen Detektion des Fzd8-Proteins zwei Tage nach Transfektion mit pN3-Fzd8-HA.

Der Versuch wurde sowohl mit Gesamtproteinlysate als auch mit Leeb-Lundberg-Puffer erstellten Lysaten durchgeführt und zeigte unter Einsatz beider Methoden analoge Ergebnisse.

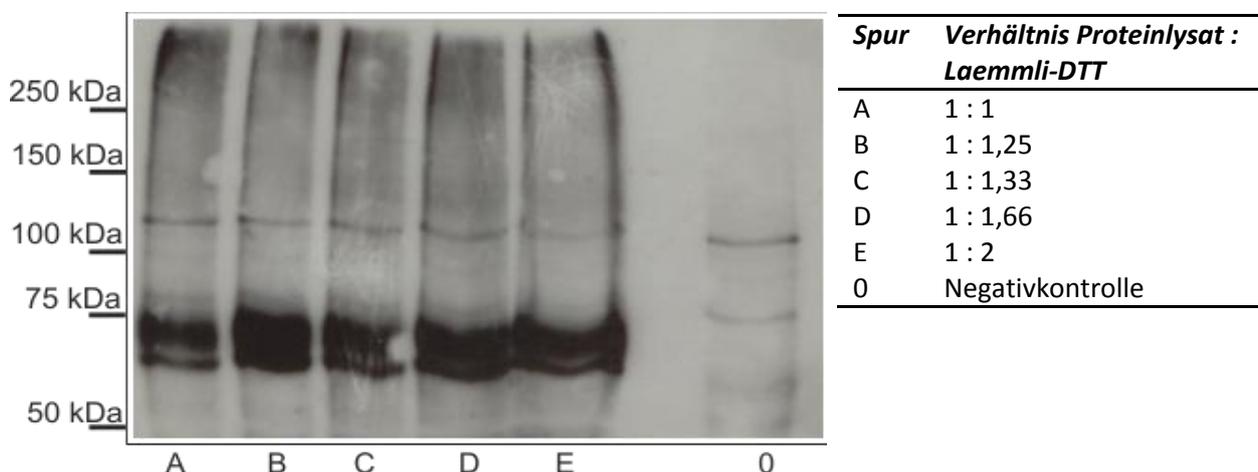


Abb. E.10: Proteinbiochemische Detektion von Fzd8 in HEK293 am zweiten Tag nach Transfektion unter Einsatz verschiedener Konzentrationen des Laemmli-DTT-Puffers (vgl. Tabelle rechts).

Es zeigt sich in Spur A und geringfügig in Spur B im Bereich > 250 kDa eine Färbung, die nicht-reduziertem Protein entspricht. In den Spuren mit höherem Laemmli-DTT-Anteil nimmt diese Proteinbande ab. Durch den HA-Tag konnten ferner zwei Banden bei rund 70 kDa und 67 kDa detektiert werden, die im Vergleich zur Negativkontrolle (untransfizierte HEK293-Lysate) als spezifisch und somit als Fzd8-Detektion gewertet werden können. Die Stärke dieser Banden nimmt trotz gleichem Einsatz von Proteinlysat von Spur A zu Spur B zu.

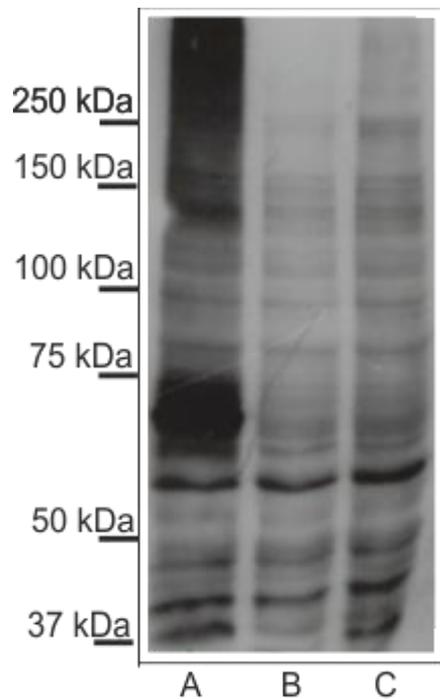


Abb. E.11: Proteinbiochemische Detektion der Fzd8-Varianten in HEK293 am zweiten Tag nach Transfektion.

Spur A: HEK293, transfiziert mit pN3-Fzd8-HA

Spur B: HEK293, transfiziert mit pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA

Spur C: HEK293, transfiziert mit pN3-Fzd8 Δ (1-268)-HA

Die Detektion der Transkriptionsvarianten wurde in HEK293-Zellen, welche mit den Überexpressionsplasmiden pN3-Fzd8-HA, pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA und pN3-Fzd8 Δ (1-268)-HA transfiziert und am zweiten Tag nach Transfektion lysiert wurden, durchgeführt. Es wurden hierbei im Vergleich zu Abb. E.10 höhere Proteinmengen eingesetzt, so dass sich im Bereich >250 kDa in den pN3-Fzd8-HA-transfizierten Zellen eine Akkumulation von unreduziertem Protein sowie im Bereich um 70 kDa die o.g. spezifische Doppelbande nachweisen ließ. Im Spur B (pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA) und Spur C (pN3-Fzd8 Δ (1-268)-HA) ließen sich keine spezifischen Banden bei 69,1 kDa bzw. 46,4 kDa detektieren.

E.1.7 Detektion der zellulären Lokalisation von Fzd8 Δ (1-52) durch Immunfluoreszenz

Die proteinbiochemische Detektion der verkürzten Fzd8 Δ (1-52)-Variante sollte nicht nur mit Hilfe des N-terminalen HA-Tags im pN3-Fzd8 Δ (1-52)-HA-Vektor, sondern ferner auch noch durch eine C-terminale Verknüpfung mit dem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) ermöglicht werden. Darüber hinaus erlaubte eGFP die Detektion der Proteinlokalisierung in der Zelle, ohne die Zelle hierzu lysieren zu müssen. Für dieses Verfahren wurde der Vektor pN3-Fzd8 Δ (1-52)-eGFP, dessen Proteinprodukt C-terminal mit der kodierenden Sequenz für eGFP verbunden wurde, eingesetzt (vgl. E.1.4). Eine Transfektion mit pN3-eGFP, welches die Expression großer Mengen von eGFP in das Zytoplasma ermöglicht, diente als Positiv-, untransfizierte Zellen als Negativkontrolle.

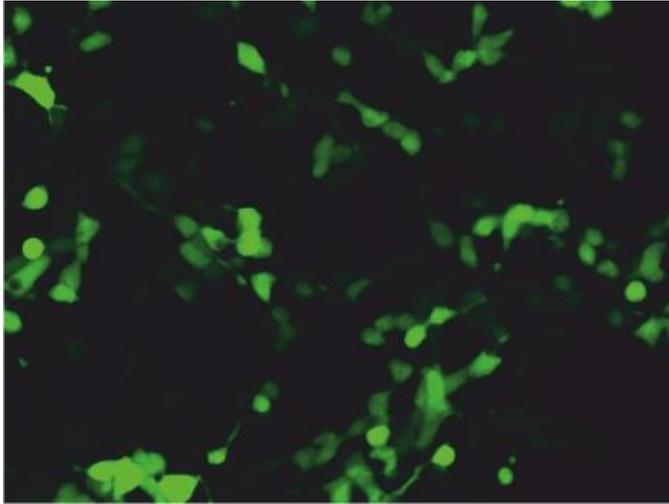


Abb. E.12: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pN3-eGFP (100 x Vergrößerung, bei 450 - 490 nm)

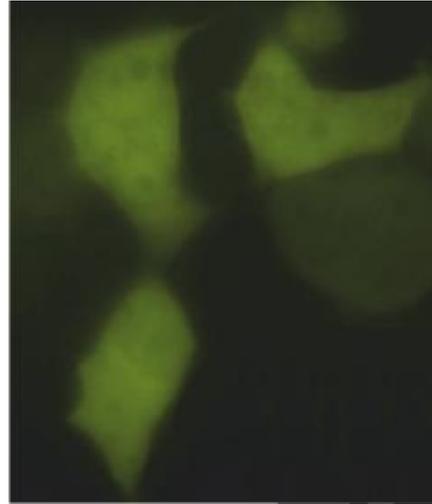


Abb. E.13: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pN3-eGFP Fluoreszenz (400 x Vergrößerung, bei 450 - 490 nm)

Abb. E.12 und Abb. E.13 zeigen das Verteilungsmuster des eGFP-Proteins, welches als Positivkontrolle diente, in der Zelle. eGFP verteilte sich hierbei auf Grund der fehlenden Signalsequenz gleichmäßig im Intrazellularraum.

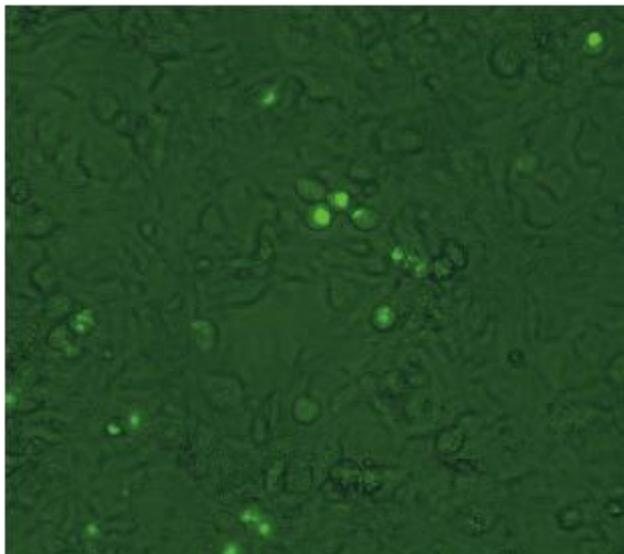


Abb. E.14: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pN3-Fzd8 Δ (1-52)-eGFP (100 x Vergrößerung, bei 450 - 490 nm mit Phasenkontrast)

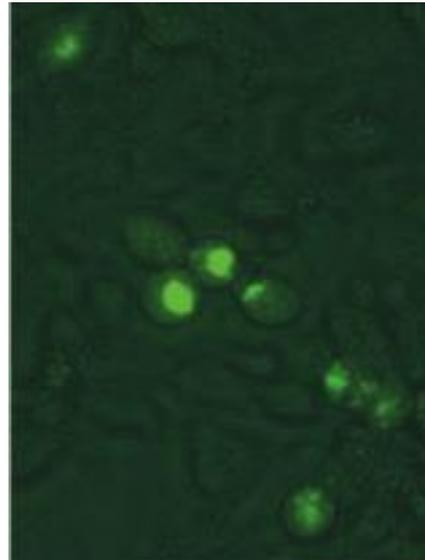


Abb. E.15: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pN3-Fzd8 Δ (1-52)-eGFP (100 x Vergrößerung, bei 450 - 490 nm mit Phasenkontrast, nochmals 2x digital vergrößert)

Die C-terminal mit eGFP markierte Fzd8 Δ (1-52)-Variante wurde nur in sehr geringem Umfang exprimiert und wies eine intrazelluläre Lokalisation mit potentieller Translokation in den Nukleus auf. Eine Insertion in die Zellmembran konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. E.14 und Abb. E.15).

Die Zellen wurden nachfolgend stabil selektiert, was in keinen Änderungen des Expressionsmusters der fluoreszierenden Proteine resultierte.

E.2 Expression und Lokalisation von Wnt8B, einem potentiellen Liganden von Fzd8

E.2.1 Evaluierung der endogenen mRNA-Expression von Wnt8B in verschiedenen Zelllinien und Gewebstypen

Dieses Experiment diente der Detektion einer eventuellen endogenen Wnt8B-Expression in verschiedenen Zelllinien und Gewebstypen. Hierzu wurden Methoden des qualitativen Nachweises über die Polymerasekettenreaktion (PCR) und der quantitativen Detektion mittels der *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) eingesetzt. Die eingesetzten Primer und die UPL-Sonde sind in D.1.2.2 aufgeführt.

Es wurden in diesem Experiment cDNA der Fibrosarkomzelllinie HT1080, der Osteosarkomzelllinie SAOS-2, humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) sowie immortalisierter *human embryonic kidney cells* (HEK293) eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des UPL-Verfahrens in der qRT-PCR (vgl. D.2.1.9). Ferner wurde eine Polymerasekettenreaktion mit den in D.1.2.2 genannten Primern und der Phusion HotStart Polymerase zum qualitativen Nachweis durchgeführt, auf ein zwei Prozentiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei endogener Expression der Wnt8B-mRNA war in den genannten Amplifikationsreaktionen eine Bande von 132 Basenpaaren (bp) zu erwarten.

Die cDNAs von humanen Speicheldrüsen-, Herz- und Skelettmuskulaturzellen (vgl. D.1.2.3) wurden mit den identischen Nachweismethoden ebenfalls auf die endogene Expression von Wnt8B-mRNA überprüft.

Als Positivkontrolle diente im qualitativen Nachweis der Einsatz des Vektors pEF-DEST51-Wnt8B als Matrize für die Amplifikationsreaktion; in die Negativkontrolle wurden sowohl bei qualitativer wie auch quantitativer PCR Aqua dest. als *template* eingesetzt.

Sowohl in den o.g. Zelllinien als auch in den Gewebe-cDNAs konnten mit der quantitativen *real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) kein Nachweis einer endogenen Wnt8B-Expression erbracht werden. Der qualitative Nachweis mittels Agarosegelelektrophorese zeigte ebenfalls keine Amplifikationsreaktion unter standardisierten PCR-Bedingungen (vgl. Abb. E.16), so dass von keiner endogenen Expression von Wnt8B-mRNA in diesen Zelllinien und Gewebetypen ausgegangen werden konnte.

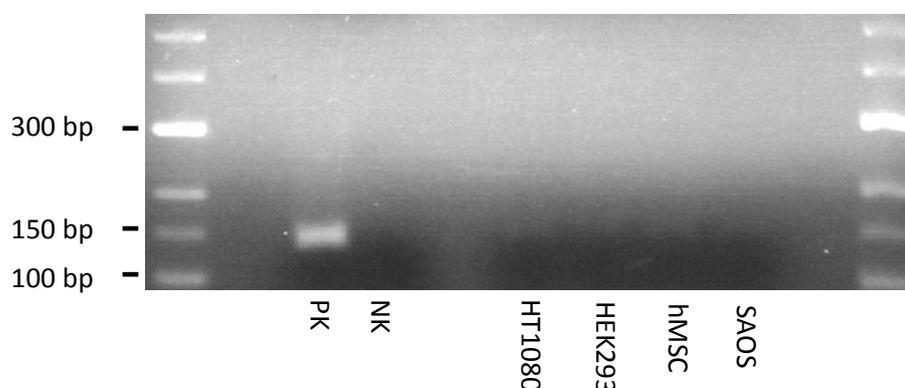


Abb. E.16: Qualitativer Nachweis von Wnt8B-cDNA in Proben verschiedener Zelllinien in der Agarosegelelektrophorese.

Der Nachweis einer Wnt8B-Expression resultiert in einem Produkt der Länge 132bp.

Die Amplifikationsreaktionen von Speicheldrüsen-, Herz- und Skelettmuskulatur-cDNA zeigte ebenfalls keine spezifischen Produkte (nicht abgebildet).

Abkürzungen: PK, Positivkontrolle; NK, Negativkontrolle (Wasser)

E.2.2 Generierung eines Expressionsplasmids für dsRed-markiertes Wnt8B

Ziel dieses Konstrukts war die Expression eines Fusionsproteins von humanen Wnt8B und DsRed, um die zelluläre Lokalisation des Wnt8B-Proteins zu eruieren. Als Vektorrückgrad diente hierbei der bereits in D.1.3.2.2 beschriebene pDsRed-Express-C1.

Die zu inserierende Wnt8B-cDNA wurde mittels PCR aus pEF-DEST51-Wnt8B amplifiziert, wobei das terminale Stopp-Codon hierbei durch eine modifizierte Primersequenz mutiert wurde. Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NheI* und *AgeI* konnte das Wnt8B-DNA-Fragment stromaufwärts der DsRed-cDNA in den mit den identischen Enzymen linearisierten Vektor integriert werden.

Bei der Modifikation des Primers wurde das Stopp-Codon durch das für die ungeladene und unpolare Aminosäure Leucin codierende Basentriplett TTA ersetzt. Die Linker-Sequenz zwischen den Komponenten des Fusionsproteins stellte sich wie folgt dar: Wnt8B–Leu–Pro–Val–Ala–Thr–DsRed.

Die Aminosäurenfolge zeigte bei der Analyse hinsichtlich potentieller Proteaseschnittstellen mit Hilfe der MEROPS Blast Search Software (vgl. D.2.4) keine typischen Erkennungssequenzen für humane Proteasen.

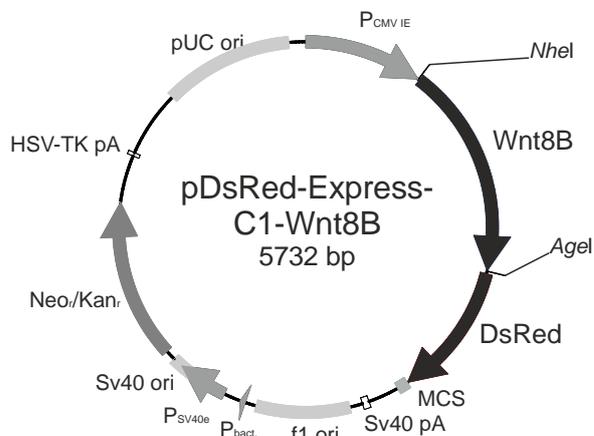


Abb. E.17: pDsRed-Express-C1-Wnt8B

E.2.3 Detektion der zellulären Lokalisation von Wnt8B durch Immunfluoreszenz

Zur Detektion der Expression des Wnt8B-Proteins wurde das Nachweisverfahren der Immunfluoreszenz gewählt. Es bietet im Gegensatz zur Proteindetektion mittels Zellyse und Western-Blot die Möglichkeit der Detektion in der vitalen Zelle.

Da, wie bereits in E.2.1 beschrieben, die analysierten Zelltypen keine endogene Expression der Wnt8B-mRNA und somit des korrespondierenden Proteins aufweisen, musste zur Detektion die codierende Sequenz für Wnt8B artifiziell in die Zellen eingebracht werden. Hierbei wurde das in E.2.2 beschriebene Plasmid pDsRed-Express-C1-Wnt8B zur Transfektion eingesetzt. Dieses bewirkt die konstitutive Überexpression eines Fusionsproteins, dessen N-terminaler Anteil aus Wnt8B, der C-terminale Anteil aus dem Fluoreszenzprotein DsRed besteht, wobei die subzelluläre Lokalisation des Proteins wird durch den N-terminalen Anteil, also durch Wnt8B determiniert wird.

Als Kontrolle diente die Transfektion von pDsRed-Express-C1 (vgl. D.1.3.2.2), welches eine konstitutive Überexpression des singulären DsRed-Proteins ermöglicht.

Die Transfektion des pDsRed-Express-C1-Plasmids in HEK293-Zellen zeigte nach zwei Tagen die Expression eines rot fluoreszierenden Proteins, welches unter Aussparung des Kerns (vgl. Abb. E.18 und Abb. E.19), nahezu gleichmäßig im Zytoplasma verteilt war. Der Extrazellularraum zeigte keine Existenz fluoreszierender Proteine.

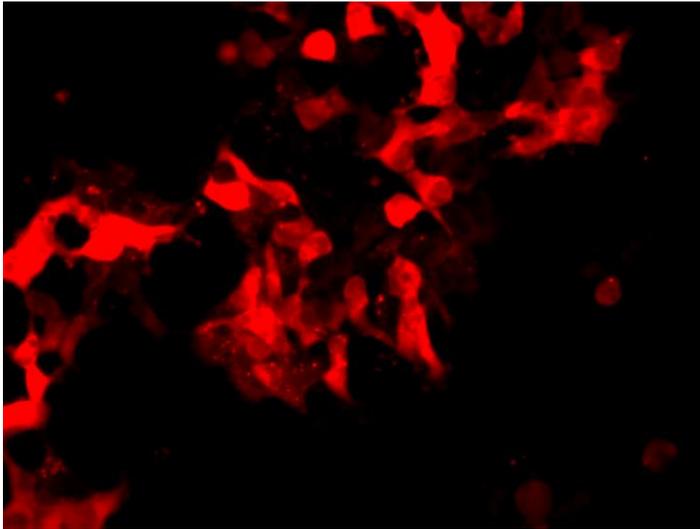


Abb. E.18: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pDsRed (100 x Vergrößerung, bei 530 - 585 nm)

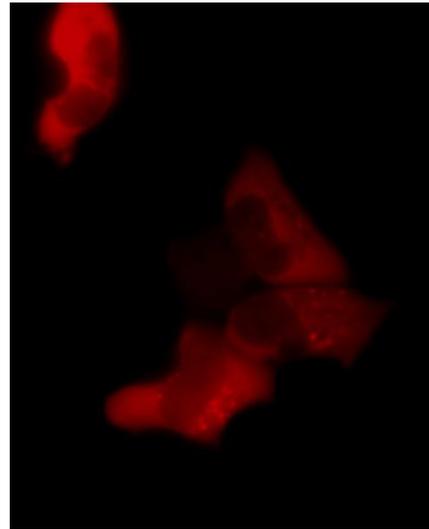


Abb. E.19: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pDsRed (400 x Vergrößerung, bei 530 - 585 nm)

Abb. E.20 und Abb. E.21 zeigen das Fluoreszenzverhalten von HEK293-Zellen nach transienter Transfektion mit pDsRed-Express-C1-Wnt8B, welches die Expression des o.g. Fusionsproteins bewirkt.

Es konnte die Expression fluoreszierenden Proteins nachgewiesen werden, welches sich jedoch nicht, wie in Abb. E.18 und Abb. E.19 gleichmäßig in den zytoplasmatischen Raum verteilt, sondern vielmehr eine Akkumulation des Proteins im Bereich der Zellmembran aufweist, was durch eine charakteristische, ringförmige Fluoreszenz an der Zellmembran repräsentiert wird. Ferner ließ sich eine intrazelluläre, aber extranukleäre Bildung von stark fluoreszierenden Proteinakkumulationen nachweisen.

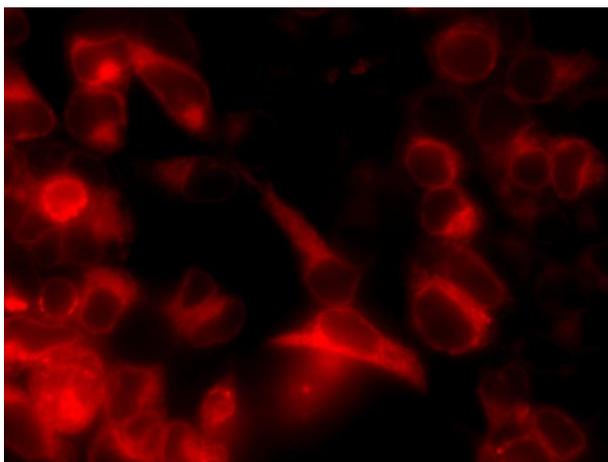


Abb. E.20: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pDsRed-Wnt8B (200 x Vergrößerung, bei 530 - 585 nm)

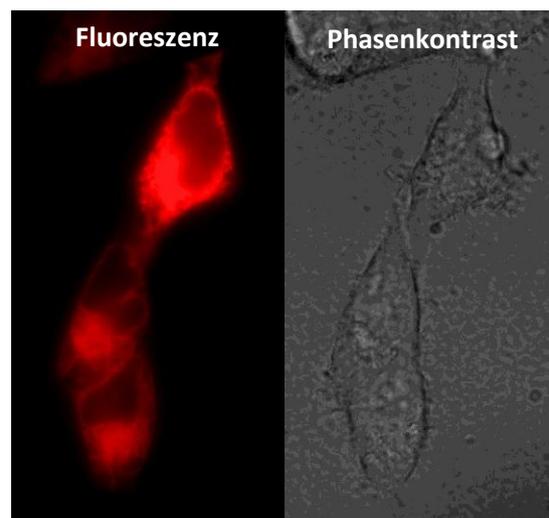


Abb. E.21: HEK293-Zellen, 48 Stunden nach der Transfektion mit pDsRed-Wnt8B (400 x Vergrößerung, bei 530 - 585 nm)

E.3 Aktivierung des kanonischen Signalweges durch verschiedene Wnts und deren Auswirkung auf die mRNA-Expression ausgewählter Zielgene

E.3.1 Auswirkungen der Stimulation mit rekombinanten Wnt1 auf den kanonischen Wnt-Signalweg in HT1080-Bar-Zellen

In dieser Versuchsreihe sollte die Auswirkung der Stimulation von HT1080-Fibrosarkomzellen mit rekombinanten Wnt1 (rWnt1) auf den β -Catenin-vermittelten Signalweg eruiert werden. Hierzu wurden HT1080-Zellen mit stabil integrierten pN3-Bar-GLuc-Plasmid eingesetzt (vgl. D.1.3.3.1), mit welchen im Luciferase-Reportergen-Assay (vgl. D.2.2.1) der Aktivierungszustand des kanonischen Signalweges quantifiziert werden kann. Diese klonale Zellpopulation, im Folgenden HT1080-Bar genannt, wurde zuvor auf die Funktionsfähigkeit des Reportersystems mit Hilfe von Lithiumchlorid (LiCl) getestet (Leitenstern et al., persönliche Mitteilung). Es wurden aufsteigende rWnt1-Konzentrationen von 50 ng/ml, 100 ng/ml und 150 ng/ml eingesetzt, um etwaige konzentrationsabhängige Effekte von Wnt1 nachweisen zu können. Die Aktivität der Gaussia-Luciferase wurde an Tag 1, 2 und 3 nach Zugabe der entsprechenden Menge des rWnt1 in das Zellmedium mit Hilfe des Luciferase-Reportergen-Assays aus dem Zellüberstand von 10^5 Zellen quantifiziert. Das Medium wurde hierbei über diesen Zeitraum nicht modifiziert oder gewechselt. Als Kontrolle dienten Zellpopulationen, welchen bei sonst identischem Prozedere kein Wnt1 appliziert wurde.

Die Ansätze zeigten einen ähnlichen Anstieg der *relative light units (RLU)* im Zeitverlauf, was das Resultat der Akkumulation von Wnt1-unabhängiger Luciferase-Expression in das Zytoplasma widerspiegelt. Dabei wiesen verschiedene Wnt1-Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikanten Unterschiede in der Luciferase-Expression auf (vgl. Abb. E.22).

Diese Resultate zeigen, dass die Wnt1-Applikation keinen Einfluss auf die Luciferase-Expression und somit auf den Aktivierungszustand des kanonischen Signalweges zeigt.

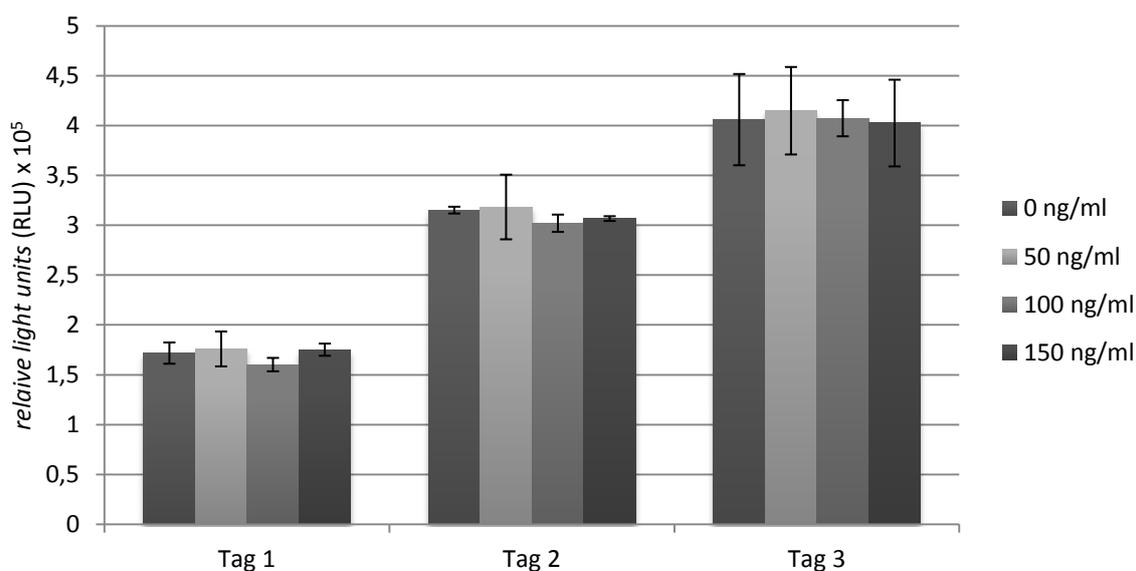


Abb. E.22: Ergebnisse des Luciferase-Reportergen-Assays nach Stimulation von HT1080-Bar mit rekombinantem Wnt1, gruppiert nach dem zeitlichen Verlauf. Die Standardabweichungen wurden aus einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe ermittelt.

E.3.2 Auswirkungen der transienten Transfektion von pEF-DEST51-Wnt8B auf den kanonischen Signalweg in HT1080-Bar-Zellen

Da das Protein Wnt8B bislang nicht in rekombinanter Form vertrieben und in Fibrosarkomzellen des HT1080-Typs nicht endogen exprimiert wird (vgl. E.2.1), stellt die Methode der transienten Transfektion von Wnt8B-tragenden Plasmiden und der konsekutiven Expression von Wnt8B eine probate Möglichkeit dar, um den Einfluss dieses Wnt-Liganden auf die Zellen zu eruieren.

Zur konstitutiven Überexpression des Wnt8B-Proteins wurde der Vektor pEF-DEST51-Wnt8B (vgl. D.1.3.1.4) transient in die HT1080-Bar-Zellen transfiziert. Die Quantifizierung der Luciferase-Expression wurde am ersten, am zweiten und am dritten Tag nach dem Transfektionsereignis durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten sowohl untransfizierte Zellen als auch Zellen, die mit dem pEF-DEST51-Mock-Plasmid transfiziert wurden (vgl. D.1.3.1.3).

HT1080-Bar-Zellen zeigten nach Transfektion des pEF-DEST51-Mock-Vektors zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Luciferase-Expression im Vergleich zur untransfizierten Zellpopulation. Die mit pEF-DEST51-Wnt8B transfizierten Zellen zeigten am ersten Tag nach der Transfektion im Vergleich zu Mock- und untransfizierten Zellen kein verändertes Luciferase-Expressionsverhalten; allerdings kam es an den Tagen zwei und drei zu einer gesteigerten Luciferase-Expression (vgl. Abb. E.23). Am dritten Tag nach Transfektion stellte sich diese Induktion sowohl im Bezug auf untransfizierte als auch auf die mit pEF-DEST51-Mock-transfizierte Zellpopulation als signifikant dar ($p = 0,022$ zu untransfiziert bzw. $p = 0,023$ zu Mock), was auf eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch die Transfektion von pEF-DEST51-Wnt8B hinweist.

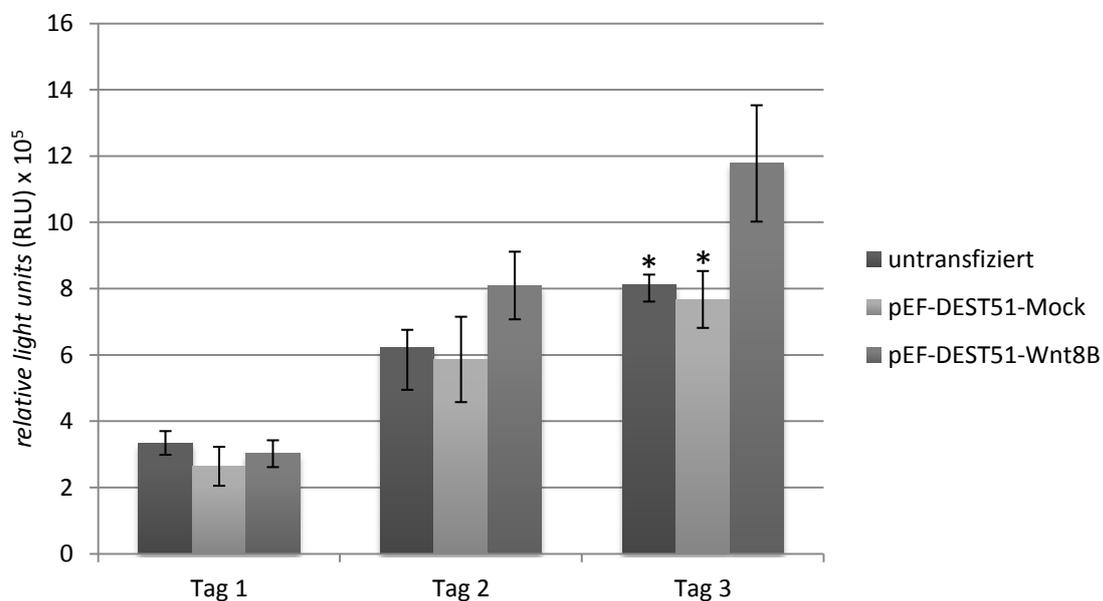


Abb. E.23: Ergebnisse des Luciferase-Reportergen-Assays nach Transfektion von HT1080-Bar mit pEF-DEST51-Mock und pEF-DEST51-Wnt8B, gruppiert nach zeitlichem Verlauf. Die Standardabweichungen und Signifikanzen basieren auf einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe. Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$ (zu pEF-DEST51-Wnt8B).

E.3.3 Auswirkungen der transienten Transfektion von pEF-DEST51-Wnt8B auf den kanonischen Signalweg in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)

Zur Quantifizierung der Aktivität des kanonischen Signalweges in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) unter der Stimulation durch Wnt8B wurde ein analoges Vorgehen wie bei den HT1080-Fibrosarkomzellen angewendet. Die Quantifizierung erfolgte mit hMSC-Bar-Zellen, die eine stabile Integration des pN3-Bar-GLuc-Plasmids aufwiesen und nach Stimulation des kanonischen Signalweges mit Lithiumchlorid mit einer erhöhten Expression der Gaussia-Luciferase reagierten. Die Quantifizierungen wurden an den Tagen 2, 5 und 7 nach Transfektion durchgeführt. Als Kontrollen dienten untransfizierte hMSC-Bar-Zellen sowie hMSC-Bar-Populationen, die mit dem pEF-DEST51-Mock-Vektor transfiziert wurden.

Im Gegensatz zu HT1080-Bar führte schon die Transfektion des Kontrollvektors pEF-DEST51 zur verstärkten Expression der Gaussia-Luciferase. Des Weiteren zeigte das Experiment eine darüberhinausgehende signifikante Expressionssteigerung des Reporterproteins nach Transfektion von pEF-DEST51-Wnt8B im Vergleich zu pEF-DEST51-Mock (vgl. Abb. E.24).

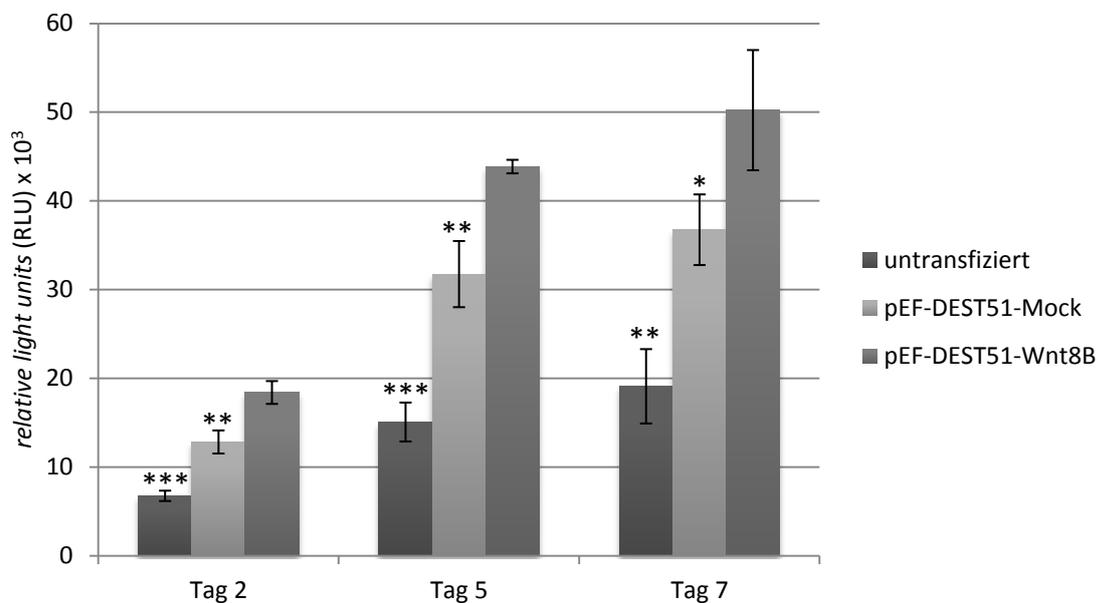


Abb. E.24: Ergebnisse des Luciferase-Reportergen-Assays nach Transfektion von hMSC-Bar mit pEF-DEST51-Mock und pEF-DEST51-Wnt8B. Die Standardabweichungen und Signifikanzen basieren auf einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe.

Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ (zu pEF-DEST51-Wnt8B).

E.3.4 Generierung von HT1080-Bar-Zellen mit stabiler Integration von pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock

Ziel der Generierung der HT1080-Bar-Zellpopulationen mit stabiler Integration der Vektoren pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock war es, ein Expressionssystem für Wnt8B, einem potentiellen Liganden des Fzd8-Rezeptors, zu schaffen, welches ein gleichbleibendes Proteinexpressionsniveau von Wnt8B garantiert. Parallel ermöglichte diese Zellpopulation die Quantifizierung des Aktivierungszustands des β -Catenin-abhängigen Signalweges durch das bereits stabil integrierte Plasmid pN3-Bar-GLuc.

Als Negativkontrolle diente eine Zelllinie mit stabil integriertem pEF-DEST51-Mock, welche unter den identischen Bedingungen kultiviert wurde und somit identische Rahmenbedingungen für folgende Versuche mit den Wnt8B-exprimierenden Zellklonen bot.

Voraussetzung für die stabile Transfektion zweier Plasmide ist die Existenz unterschiedlicher Selektionsmöglichkeiten in Form different wirkender Selektionsantibiotika in eukaryoten Zellen. Das Plasmid pN3-Bar-GLuc weist hierbei ein Resistenzgen gegen das zytotoxische G418 (Geneticin) auf (vgl. D.1.3.3.1), der pEF-DEST51-Vektor vermittelt sowohl in der Mock- als auch in der für Wnt8B codierenden Variante Resistenz gegen Blastidicin (vgl. D.1.3.1.3).

Die Integration des pEF-DEST51-Wnt8B erfolgte bei den HT1080-Bar-Zellen durch Transfektion. Zwei Tage nach Transfektion wurde die Selektion mit Blastidicin mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ begonnen. Als Kontrolle dienten hierbei Zellen, welche nicht mit einem der pEF-DEST51-Vektoren transfiziert wurden und somit keine Resistenz gegen Blastidicin aufwiesen (vgl. Abb. E.25). Der Selektionsdruck wurde so lange aufrechterhalten, bis sämtliche Zellen der Kontrollpopulation durch das Selektionsmittel eliminiert wurden. Durch kontinuierliche Selektion mit identischen Antibiotikakonzentrationen wurden im Verlauf auch solche Zellen eliminiert, welche das Plasmid nur transient aufgenommen hatten.

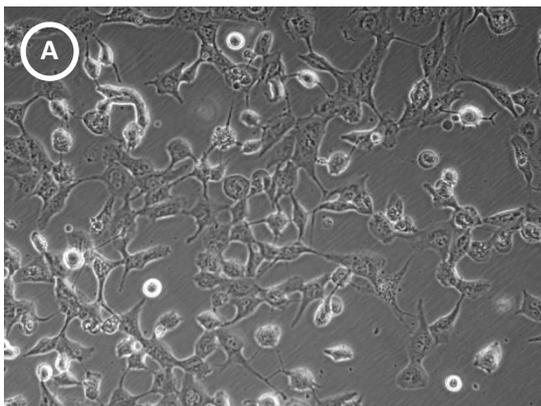
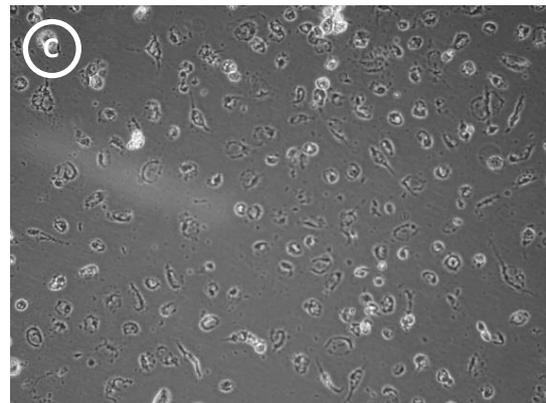
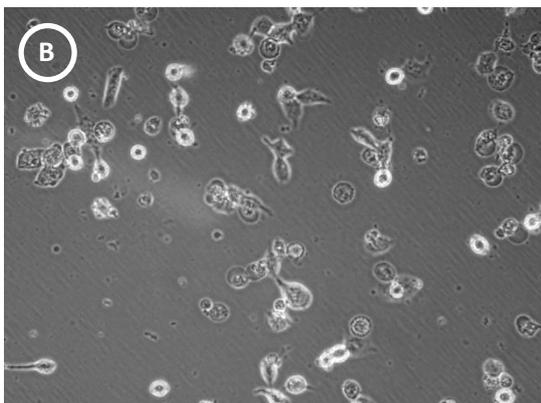


Abb. E.25: Zytotoxischer Effekt von Blastidicin auf HT1080-Bar-Zellen.

Alle Zellen wurden hierbei weiterhin mit G418 (200 ng/ml) selektioniert.

A (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zeigt eine weiterhin expandierende Zellpopulation in der Abwesenheit von Blastidicin, während der der zytotoxische Effekt des zugegebenen Blastidicins in B (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zum Untergang der Zellen führte. Zur weiteren Selektion der pEF-DEST51-transfizierten Zellen wurde mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ die niedrigstmögliche Konzentration verwendet, die in dieser Kontrollpopulation zum vollständigen Untergang der behandelten Zellen führte.



E.3.5 Quantifizierung der Wnt8B-Expressionsleistung der HT1080-Bar-Zellpopulationen auf mRNA-Ebene nach stabiler Integration von pEF-DEST51-Wnt8B

Nach der monoklonalen Expansion der stabil mit pEF-DEST51-Wnt8B transfizierten HT1080-Bar-Zellen (vgl. E.3.4) wurden aus den ersten fünf Klonen je 10^5 Zellen lysiert, mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um die Expression der Wnt8B-mRNA in jedem dieser Zellpopulationen zu untersuchen. Durch die Zufallsintegration des Plasmids in die DNA konnte hierbei nicht von einem einheitlichen Expressionsmuster zwischen den Populationen ausgegangen werden.

Die absolute Quantifizierung der mRNA-Kopienzahl wurde mit Hilfe der quantitativen *real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) durchgeführt. Als Standard diente zur Quantifizierung eine Verdünnungsreihe des pEF-DEST51-Wnt8B-Plasmids mit bekannter Kopienzahl pro Mikroliter, welche eine absolute Quantifizierung der Kopienzahl in den Proben ermöglichte. Auf einen Nachweis auf Proteinebene wurde auf Grund eventuell modifizierter Proteineigenschaften nach Einführung des zur Detektion notwendigen *Tags* verzichtet. Als Kontrolle diente eine polyklonale Population von pEF-DEST51-Mock-transfizierten HT1080-Bar-Zellen.

Die verschiedenen Zellpopulationen zeigten unterschiedliche Expressionsmuster der Wnt8B-mRNA (vgl. Abb. E.26). Zwei der Zellpopulationen (Klon 4 und Klon 5) zeigten, ebenso wie der mit dem Leervektor pEF-DEST51-Mock transfizierte Klon (Mock) keine Expression der Wnt8B-mRNA. Die höchste Expressionsleistung zeigte Klon 1 mit im Mittel $2,9 \times 10^5$ Kopien/ μl . Klon 2 wies ein Wnt8B-mRNA-Level von durchschnittlich $7,3 \times 10^4$ Kopien/ μl auf; Klon 3 zeigte eine mittlere Expression von $3,0 \times 10^4$ Kopien/ μl .

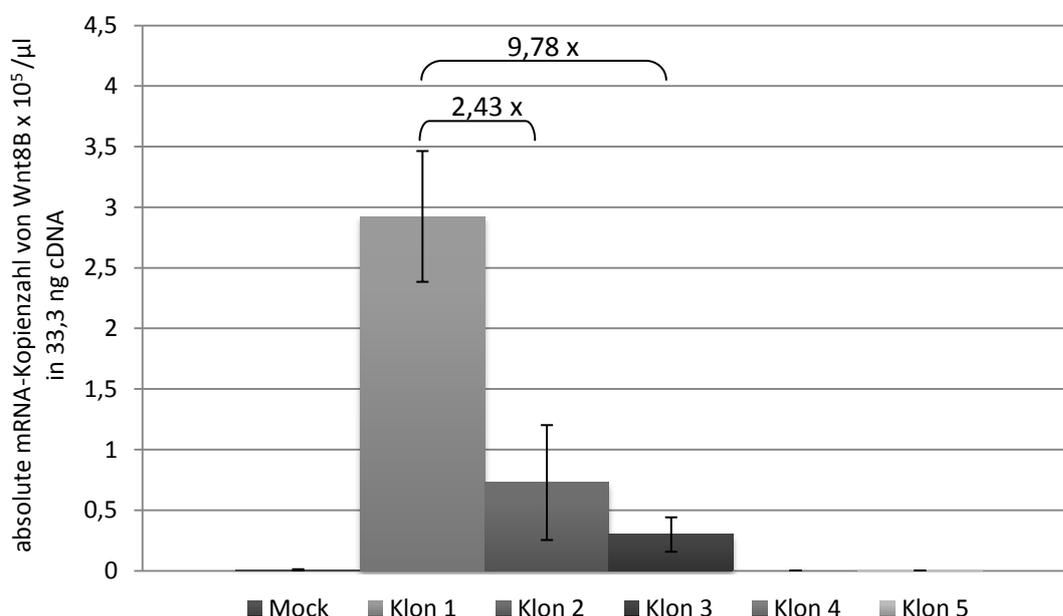


Abb. E.26: Quantitative Analyse der Wnt8B-mRNA-Expression in unterschiedlichen monoklonalen Zellpopulationen von HT1080-Bar nach stabiler Integration des pEF-DEST51-Wnt8B-Plasmids. Die Standardabweichungen wurden jeweils aus einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe ermittelt.

E.3.6 Quantifizierung des Aktivitätszustandes des kanonischen Wnt-Signalweges der Wnt8B-exprimierenden HT1080-Bar-Klone

Für diesen Versuchsansatz wurden jeweils 10^5 Zellen der Wnt8B-exprimierenden Zellklone 1, 2 und 3 in die Kavitäten eines 6-wells ausgesät. 24, 48 und 72 Stunden nach Medienwechsel wurden jeweils 25 μ l des Überstandes abgenommen und die Luciferase-Aktivität quantifiziert (vgl. D.2.2.1). Die gemessene Luciferase-Expressionsleistung wurde hierbei auf die nach 72 Stunden erhobene Zellzahl in der jeweiligen Kavität normiert, um eine zellzahlunabhängige Quantifizierung zu gewährleisten. Als Negativkontrolle diente in diesem Versuch eine Zellpopulation mit stabil integriertem pDEST51-Mock.

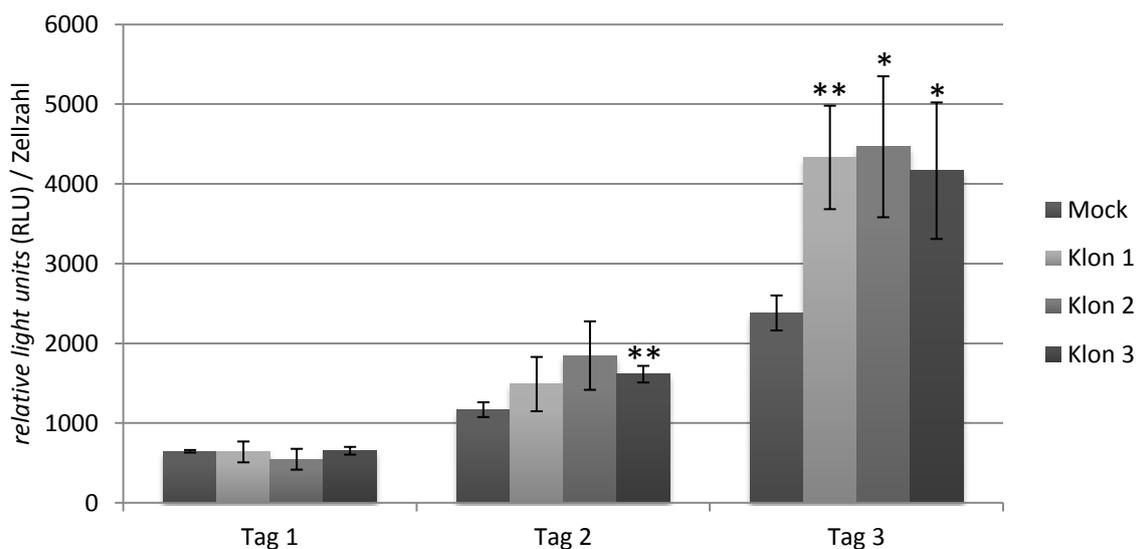


Abb. E.27: Quantifizierung der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges mittels des Luciferase-Reporter-Gen-Assays in den verschiedenen HT1080-Bar-Klonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock. Die *relative light units* (RLU) wurden hierbei auf die Zellzahl in der jeweiligen Kavität normiert. Die Standardabweichungen und Signifikanzen basieren auf einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe. Signifikanzniveaus: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (zu Mock).

In der Quantifizierung zeigte sich am ersten Tag im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikante Erhöhung der *relative light units* (RLU). Am zweiten Tag der Quantifizierung zeigte sich eine tendenzielle (Klon 1, $p = 0,19$ und Klon 2, $p = 0,06$) bzw. deutliche Erhöhung (Klon 3, $p = 0,005$) der Luciferase-Expression im Vergleich zu Mock. Dieser Effekt in den Wnt8B-exprimierenden Zellen konnte ebenfalls 72 Stunden nach Beginn der Versuchsreihe nachgewiesen werden; Klon 1 zeigte hierbei eine hochsignifikante ($p = 0,008$), Klon 2 ($p = 0,017$) und Klon 3 ($p = 0,024$) eine signifikante Steigerung der Luciferase-Expression im Vergleich zu nicht-Wnt8B-exprimierenden Zellen (vgl. Abb. E.27).

E.3.7 Auswirkungen der Wnt8B-Stimulation auf die mRNA-Expression ausgewählter Zielgene

E.3.7.1 Quantifizierung der Cyclin D1-mRNA-Expression in den HT1080-Bar-Zellklonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Cyclin D1, einem Zellzyklus-Regulatorprotein, wurden jeweils 10^5 Zellen pro Kavität lysiert und eine definierte Menge der extrahierten mRNA in cDNA umgeschrieben. Zur Quantifizierung wurde als Standard eine vom Hersteller mitgelieferte Verdünnungsreihe mit bekannter Cyclin D1-Kopienzahl herangezogen.

Die Cyclin D1-Kopienzahl in Klon 3, der Zellpopulation mit gering erhöhter Wnt8B-Expression, zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Cyclin D1-mRNA-Expression in Mock. Klon 2, der Klon mit mittlerer Wnt8B-Expression offerierte eine um den Faktor 2,3 signifikant ($p = 0,048$) erhöhte Cyclin D1-Expression, während die Cyclin D1-mRNA-Kopienzahl in Klon 1, der Population mit der höchsten Wnt8B-Synthese, eine signifikante Erhöhung ($p = 0,003$) um den Faktor 8,1 im Vergleich zu Mock zeigte (vgl. Abb. E.28).

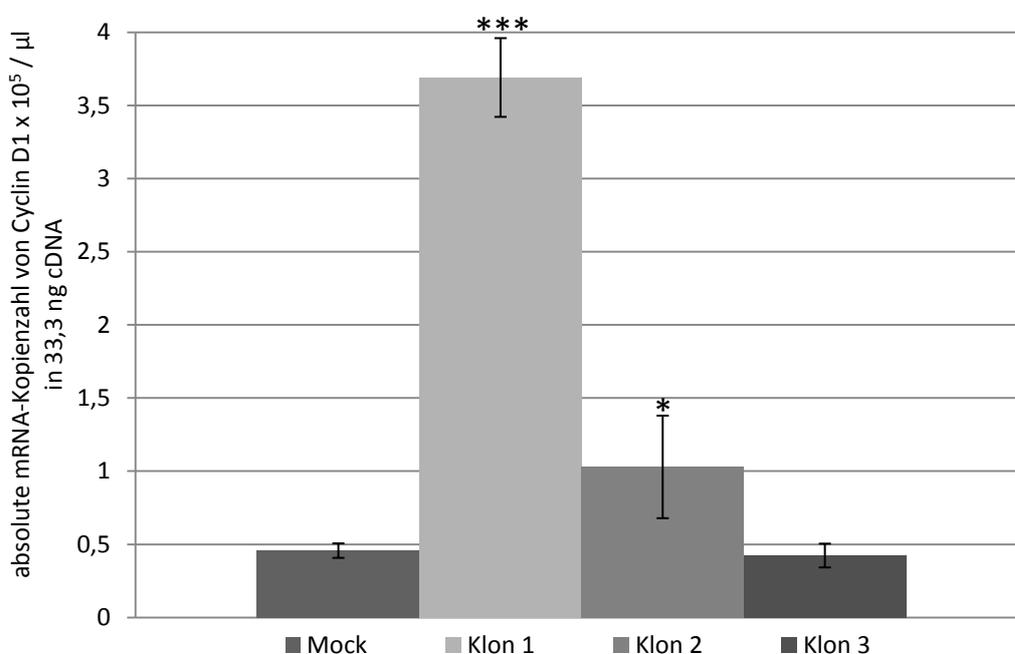


Abb. E.28: Absolute Quantifizierung der Cyclin D1-mRNA-Expression in verschiedenen HT1080-Bar-Klonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock. Die Standardabweichungen und Signifikanzen basieren auf einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe. Signifikanzniveaus: *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ (zu Mock).

E.3.7.2 Qualitativer Nachweis der Cyclin-D1-PCR-Produkte

Unter Umständen können die Ergebnisse der qRT-PCR durch unspezifische Amplifikationsreaktionen verändert werden, da in deren Produkten der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green I interkalieren kann. Um eine unspezifische Amplifikation während der qRT-PCR durch *false-priming* der Primer auszuschließen, wurde ein qualitativer Nachweis der PCR-Produkte durchgeführt. Hierbei wurden die Reaktionsprodukte der qRT-PCR auf ein Agarosegel aufgetragen und die Amplikonlänge bzw. die Spezifität überprüft. Als Negativkontrolle diente hierbei eine Probe, in welcher die Matrize durch H₂O ersetzt wurde. Eine repräsentative gelelektrophoretische Auftrennung der Cyclin D1-Amplifikationsprodukte ist in Abb. E.29 gezeigt. Das zu erwartende Amplikon beträgt laut Herstellerangaben 262 bp.

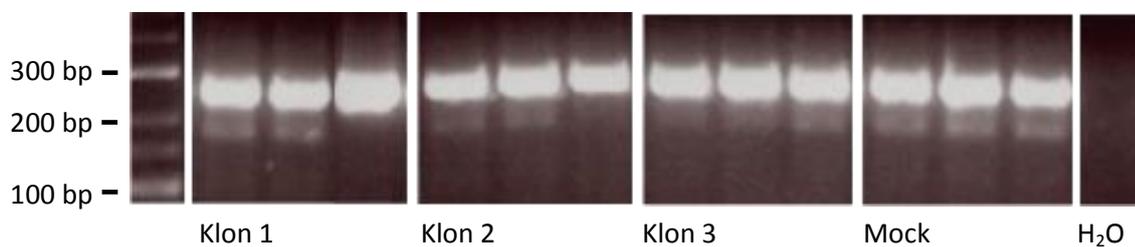


Abb. E.29: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte der qRT-PCR für Cyclin D1. Das Ergebnis zeigt ein singuläres Amplifikationsprodukt von 262 bp und keine weiteren unspezifischen Amplifikationsreaktionen. Die Negativkontrolle (H₂O) zeigt keine Bande.

E.3.7.3 Quantifizierung der MMP-14-mRNA-Expression in HT1080-Bar-Zellklonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B

Die Quantifizierung der mRNA-Expression der membrangebundenen Matrix-Metalloproteinase 14 (MMP-14), einer Schlüsselkomponente in der Zellinvasion, wurde – wie bei Cyclin D1 – mit Hilfe der quantitativen *real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) durchgeführt. Als Kontrolle diente die cDNA von HT1080-Bar-Zellen, welche mit pEF-DEST51-Mock stabil transfiziert wurden und somit keine ektopische Wnt8B-Expression aufwiesen (vgl. E.3.4). Durch eine Verdünnungsreihe mit definierten Kopienzahlen konnten in der Quantifizierung Absolutwerte für die MMP-14-mRNA-Kopienzahl ermittelt werden. In der Negativkontrolle wurde statt der jeweiligen cDNA Wasser eingesetzt.

Das Basalniveau der mRNA-Expression von MMP-14 wurde in der Mock-transfizierten Zellpopulation bestimmt. Sowohl der Wnt8B-exprimierende mit schwacher bzw. mittlerer Expressionsrate (Klon 2 und Klon 3) zeigten keine signifikante Differenz zum Basalniveau der MMP-14-mRNA. Klon 1, die Zellpopulation mit der höchsten Wnt8B-Expression, wies eine im Vergleich zur MMP-14-Basalexpression der HT1080-Bar-Zellen eine im Mittel 4,8-fach erhöhte Expression der MMP-14-mRNA auf ($p = 0,0015$).

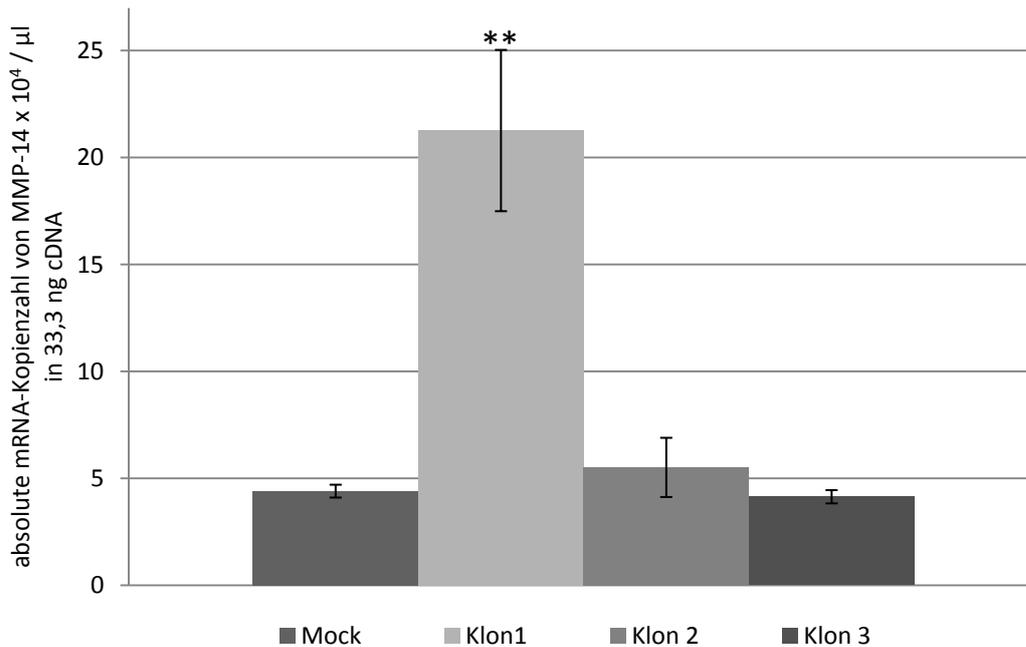


Abb. E.30: Absolute Quantifizierung der MMP-14-mRNA-Expression in verschiedenen HT1080-Bar-Klonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock. Die Standardabweichungen und Signifikanzen basieren auf einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe. Signifikanzniveaus: **: $p < 0,01$ (zu Mock).

E.3.7.4 Qualitativer Nachweis des MMP-14-PCR-Produkts

Zum Ausschluss von etwaigen unspezifischen Amplifikationsprodukten (vgl. D.2.1.9) wurden die Proben der Sybr Green I-Amplifikation gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei zeigte sich das in Abb. E.31 gezeigte Muster. Die zu erwartende Amplikonlänge betrug auf Grund des Primerdesigns 235 bp. Dieses Amplifikationsprodukt konnte in der Agarosegel-Elektrophorese singulär nachgewiesen werden, so dass eine unspezifische Amplifikation ausgeschlossen werden konnte. Als Negativkontrolle diente in dieser Auftrennung H₂O, welches anstatt der Matrize eingesetzt wurde (kein Amplifikationsprodukt) (vgl. Abb. E.31).

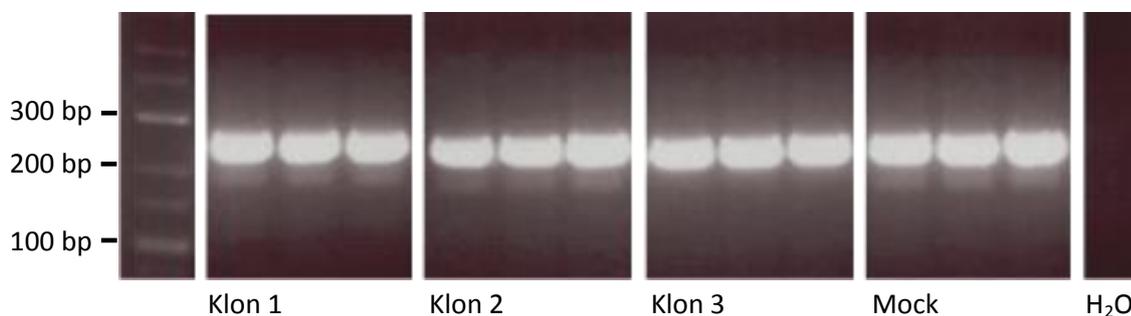


Abb. E.31: Gelelektrophoretische Auftrennung der qRT-PCR-Amplifikationsprodukte für MMP-14. Das Ergebnis zeigt ein singuläres Amplifikationsprodukt von 235 bp.

E.3.7.5 Quantifizierung der Fzd8-mRNA-Expression in den HT1080-Bar-Zellklonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B

Durch dieses Experiment sollte überprüft werden, in welchem Maße die mRNA-Expression von Fzd8 durch das Wnt8B-Expressionsniveau in HT1080-Bar-Zellen beeinflusst wird. Es wurden hierzu die in E.3.4 beschriebenen Zellklone mit stabiler Integration von pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock verwendet. Nach mRNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte die Quantifizierung von Fzd8 mittels qRT-PCR im UPL-Sondenformat (vgl. D.2.1.9). Als Negativkontrolle diente die polyklonale Zellpopulation mit stabil integriertem pEF-DEST51-Mock.

Abb. E.32 zeigt eine basale Fzd8-mRNA-Expression von durchschnittlich $8,36 \times 10^5$ Kopien/ μl . Der Zellklon mit mittlerer Wnt8B-Expressionsleistung (Klon 2) zeigte keine signifikante Änderung der Fzd8-mRNA-Kopienzahl ($p = 0,19$). Bei schwacher Wnt8B-Aktivierung (Klon 3) war eine deutlich reduzierte Fzd8-Kopienzahl (Faktor 0,46) im Vergleich zu Mock zu beobachten. Klon 1, die Zellpopulation mit starker Wnt8B-Expression, weist hingegen eine 1,77-fach erhöhte Fzd8-mRNA-Kopienzahl auf ($p = 0,017$).

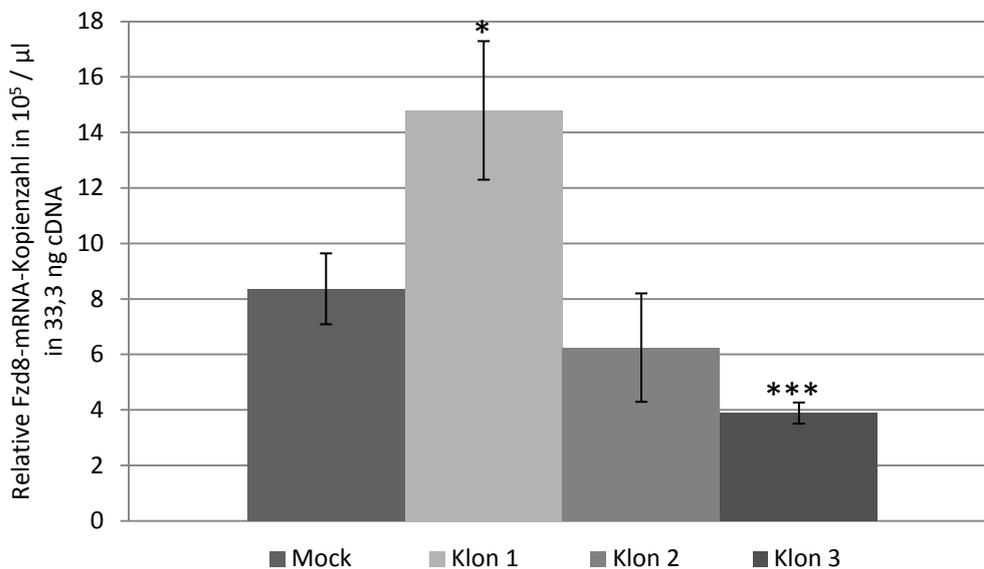


Abb. E.32: Relative Quantifizierung der Fzd8-mRNA-Expression in den verschiedenen HT1080-Bar-Klonen mit stabil integriertem pEF-DEST51-Wnt8B bzw. pEF-DEST51-Mock. Die Standardabweichungen und Signifikanzen basieren auf einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe. Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ (zu Mock).

E.3.7.6 Qualitativer Nachweis des Fzd8-PCR-Produkts

Um unspezifische Amplifikationsreaktionen auszuschließen, wurden die Proben anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf Grund des Primerdesigns war ein spezifisches Amplifikationsprodukt von 64 bp Länge zu erwarten, welches in der Agarosegel-Elektrophorese als singuläre Bande detektiert werden konnte.

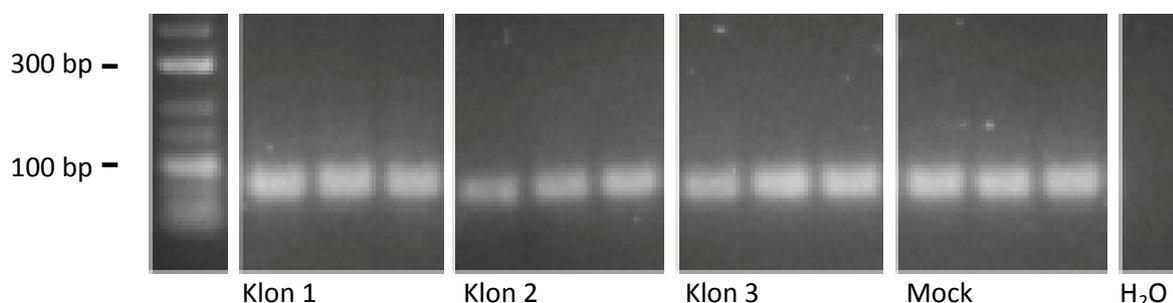


Abb. E.33: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte der qRT-PCR für Fzd8. Das zu erwartende Ergebnis zeigt ein singuläres Amplifikationsprodukt von 64 bp.

E.3.8 Aktivierung des kanonischen Signalweges durch die Transkriptionsvarianten von Fzd8 in HT1080-Bar-Zellen unter stabiler Wnt8B-Expression

Zur Analyse der N-terminalen Verkürzungsvarianten von Fzd8 (vgl. E.1.1) hinsichtlich des Wnt/ β -Catenin-Signalings wurden HT1080-Bar-Zellen eingesetzt, welche bereits eine stabile Integration des Reporterplasmids pN3-Bar-GLuc in das Genom aufwiesen. Ferner entschieden wir uns für den Einsatz des stark Wnt8B-exprimierenden Zellklons (vgl. E.3.4), da Wnt8B einen potentiellen Liganden des Fzd8-Rezeptors darstellt.

Zur Versuchsdurchführung wurden jeweils 10^5 Zellen mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden pN3-Fzd8 (vgl. D.1.3.1.2), pN3-Fzd8 Δ (1-52) (vgl. E.1.3.2) und pN3-Fzd8 Δ (1-268) (vgl. E.1.3.3) transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion von pN3-Mock. Zur Bestimmung der Reporterexpression mittels des Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion jeweils 25 μ l des Überstandes abgenommen und zur Quantifizierung eingesetzt.

In der Auswertung zeigten sich 24 Stunden nach dem Transfektionsereignis in den Fzd8-transfizierten Kavitäten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Basalniveau der Luciferase-Expression (pN3-Mock). Am zweiten Tag nach Transfektion ließ sich eine deutliche Steigerung der Luciferase-Expression in der mit pN3-Fzd8 transfizierten Zellpopulation im Vergleich zur Kontrollpopulation nachweisen ($p = 0,001$). Drei Tage nach der Transfektion zeigte sich ein vergleichbares Bild: Die Population mit transfiziertem Fzd8-Rezeptor wies sowohl gegenüber der Mock-Population als auch gegenüber den verkürzten Fzd8-Varianten eine signifikante Steigerung der Luciferase-Expression auf ($p = 0,002$ gegenüber Mock, $p = 0,002$ gegenüber Fzd8 Δ (1-52) und $p = 0,004$ gegenüber Fzd8 Δ (1-268)). Die Reporteraktivierung der Fzd8 Δ (1-52)-transfizierten Zellen zeigt an allen drei Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen. Interessanterweise war nach Transfektion von pN3-Fzd8 Δ (1-268) am Tag 2 und 3 eine gesteigerte Reporteraktivität zu beobachten.

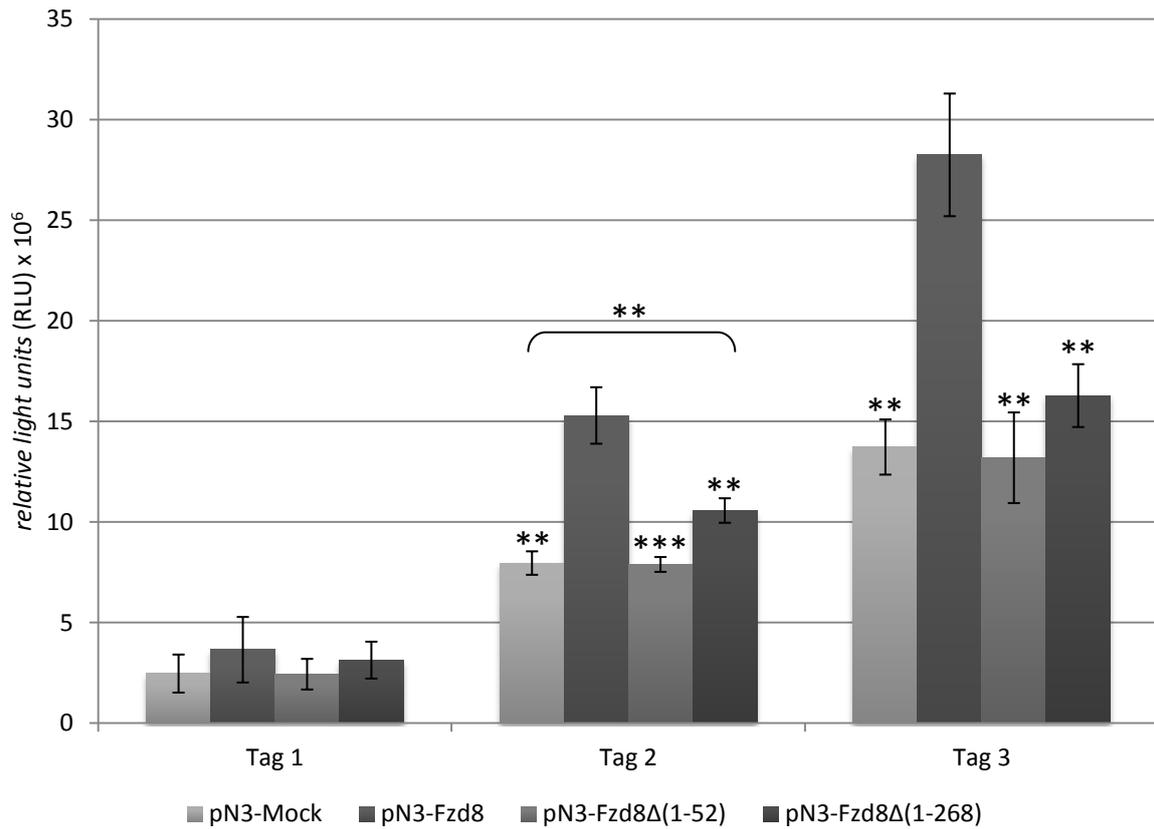


Abb. E.34: Quantifizierung der Wnt/ β -Catenin-Signalaktivität in stark Wnt8B-exprimierenden HT1080-Bar-Klonen nach Transfektion der verschiedenen Fzd8-Rezeptorvarianten pN3-Fzd8, pN3-Fzd8 Δ (1-52) und pN3-Fzd8 Δ (1-268). Die Standardabweichungen und Signifikanzen basieren auf einer im Triplet durchgeführten Versuchsreihe.

Signifikanzniveaus: **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ (zu pN3-Fzd8).

F Diskussion

F.1 N-terminal verkürzte Varianten von Fzd8

F.1.1 Evaluierung des Transkriptionsstarts von Fzd8 unter Einsatz der RLM-RACE

Zur Detektion des Transkriptionsstarts von Fzd8 führten wir in unserem Labor eine *RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA-ends* (RLM-RACE) in verschiedenen Zelltypen durch. Hierbei zeigten sich im Vergleich zur publizierten mRNA sowohl Verlängerungen als auch Verkürzungen der Fzd8-Transkripte (vgl. Tab. E.1).

Die 5'-*untranslated region* (5'-UTR) der Fzd8-mRNA (NM_031866.2) ist mit einer Länge von 5 bp sehr kurz, während die 5'-UTRs der anderen Fzd-Rezeptoren deutlich länger sind (zwischen 61 bp bei Fzd7 und 529 bp bei Fzd3). Verschiebungen des Transkriptionsstarts um mindestens 6 bp *downstream* führen demzufolge zum Verlust des ersten Startcodons (vgl. Tab. E.1 und Abb. F.1) der publizierten mRNA-Sequenz (NM_031866.2). Die folgenden potentiellen Translationsstartpunkte sind an Position 101 und an Position 156 *downstream* des publizierten Translationsstarts lokalisiert. Eine Translation beginnend an Position 101 würde in einem neun Aminosäuren (AS) langen Translationsprodukt resultieren, wobei von der Synthese eines Proteins dieser geringen Größe nicht auszugehen ist. Der folgende Translationsstart 156 Basen *downstream* liegt im Leserahmen des Fzd8-Rezeptors. Eine mit diesem Startcodon beginnende Translation hätte ein um 52 AS verkürztes Proteinprodukt zur Folge.

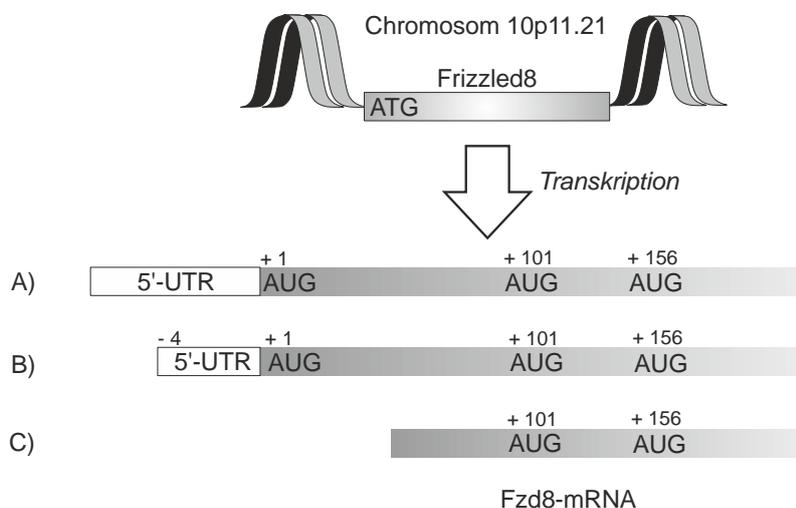


Abb. F.1: Die Entstehung verschiedener mRNA-Produkte durch Variation des Transkriptionsstarts.

A: Verlängerung der 5'-UTR durch Translokation des Transkriptionsstarts nach *upstream*.

B: Datenbank-mRNA-Sequenz (NM_031866.2).

C: Verlust des ersten Startcodons (AUG +1) durch Translokation des Transkriptionsstarts um mehr als fünf Basen *downstream*. Die nächsten potentiellen Startcodons liegen 101 bzw. 156 Basen *downstream* des publizierten Startcodons.

Im Folgenden sollen nun die potentiellen Unterschiede zwischen Fzd8 und der oben beschriebenen, um 52 AS verkürzten Variante Fzd8Δ(1-52) eruiert werden. Die ersten 27 AS bilden hierbei die Signalsequenz, welche die Integration des Fzd8-Rezeptors in die Zellmembran garantiert, aber nach der Translation ins endoplasmatische Retikulum abgespalten wird. Der Verlust der folgenden 25 AS betrifft die Struktur der *cysteine rich domain* (CRD) von Fzd8. Hierbei kommt es zum Verlust von für die XWnt8-Bindung essentieller Oberflächenregionen der CRD (Dann, Hsieh et al. 2001). Ferner ist durch das Fehlen zweier Cysteine (Cys³⁵ und Cys⁴³) und der assoziierten Disulfidbrückenbindungen von einer modifizierten Sekundärstruktur der CRD auszugehen (vgl. Abb. F.2). Ein ähnliches Phänomen konnte bereits für ein sFRP1-Netrin-Fusionsprotein gezeigt werden. Hierbei resultierte

der Verlust von Cysteinen in einem Neuarrangement der Disulfidbrückenbindungen in der CRD der sFRP1-Anteils (Chong, Uren et al. 2002).

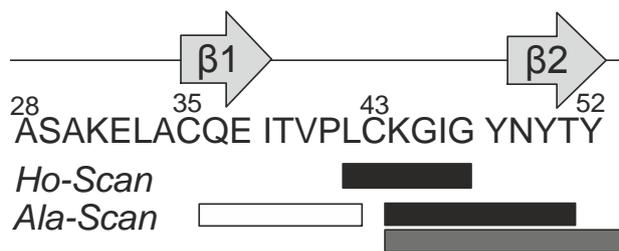


Abb. F.2: Bestandteile der CRD, die durch die N-terminale Verkürzung des Fzd8Δ(1-52)-Proteins im Vergleich zu Fzd8 fehlen (vgl. auch F.1.2 und Abb. B.3).

F.1.2 mRNA-Expression und Lokalisation ectopisch exprimierter Verkürzungsvarianten von Fzd8

Zur proteinbiochemischen Expressionsanalyse und *in-vitro* Detektion sowie für Überexpressionsstudien wurden Plasmide konstruiert, welche die cDNA sowohl des vollständigen Fzd8-Rezeptors als auch die einer verkürzten Variante, basierend auf dem nächsten, *downstream* im Leseraster liegenden Translationsstart an Position 156 (vgl. E.1.3), beinhalteten. Die Plasmide mit der integrierten cDNA von Fzd8Δ(1-268) codieren für ein Fzd8-Protein ohne N-terminale *cysteine rich domain* (CRD). Die auf dem pN3-Plasmid basierenden Vektoren dienten hierbei einer Überexpression der jeweiligen cDNAs unter der Kontrolle des CMV IE-Promotors. Da die angebotenen Antikörper keine Detektion des Fzd8-Proteins erlaubten, wurde ferner jeweils N-terminal die Sequenz des Hämagglutinin-Tags inseriert, um eine Proteindetektion mittels Western Blot zu ermöglichen.

Die Expression des Fzd8-Rezeptors mit der vollständigen Proteinsequenz konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detektiert werden (vgl. E.1.6). Es zeigte sich hierbei eine Doppelbande im Bereich des erwarteten Molekulargewichts. Die CRD des Fzd8-Rezeptors besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn²² und Asn¹²⁵), welche bei der Determinierung der Kristallstruktur mutiert wurden (Dann, Hsieh et al. 2001). Glykosylierungsmuster mit einfacher N-Glykosylierung konnten jedoch für sFRP3 (Dann, Hsieh et al. 2001) und sFRP1 (Chong, Uren et al. 2002), welche eine vergleichbare CRD besitzen, gezeigt werden. Die im Western Blot für Fzd8 detektierte Doppelbande könnte somit auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster mit entsprechender Veränderung des Molekulargewichts zurückzuführen sein.

Die verkürzten Rezeptorvarianten konnten nur auf mRNA-Ebene detektiert werden, während die Proteinprodukte mittels des HA-Tags nicht nachgewiesen werden konnten. Eine C-terminale Fusion von eGFP an Fzd8Δ(1-52) zeigte in der Immunfluoreszenz eine intrazelluläre Färbung, wobei teilweise auch eine intranukleäre Fluoreszenz nachweisbar war (vgl. E.1.7).

Der fehlende Nachweis des Fzd8Δ(1-52)-Rezeptors mittels des HA-Tags und die Detektion ebendieses Konstrukts mittels des eGFP-Labels soll im Folgenden diskutiert werden. Für den Verlust des HA-Tags sind hierbei verschiedene Erklärungsansätze denkbar.

Einerseits könnte der Verlust der am N-Terminus lokalisierten HA-Sequenz durch posttranslationale Schritte erklärt werden, auf der anderen Seite wäre auch ein verändertes Translationsverhalten in Betracht zu ziehen.

In der Literatur konnte für den *Drosophila* Fzd2-Rezeptor (DFzd2) in postsynaptischen Zellen glutaminerger Signaltransduktionskaskaden nachgewiesen werden, dass dieser nach Stimulation durch Wingless (Wg) endozytotisch in die Zelle aufgenommen wird. Des Weiteren wurde dieser in *Cleaving*-Prozessen Wg-unabhängig durch Metalloproteinasen gespalten und das C-terminale Ende mit Hilfe von Transporterproteinen in den Nukleus transloziert (Ataman, Ashley et al. 2006). Intranukleäres DFzd2 nimmt eine wichtige Rolle in der Transkriptionssteuerung während der Synapsenentwicklung ein (Mathew, Ataman et al. 2005). Ein solches Verhalten wäre auch für die verkürzte Variante des humanen Fzd8-Rezeptors denkbar; die posttranslationalen Prozessierungsvorgänge, verbunden mit einem Abbau des N-terminalen Abschnitts würden eine Erklärungsmöglichkeit für die fehlende Detektion des HA-Tags darstellen (vgl. Abb. F.3). Die posttranslationale Prozessierung von DFzd2 zeigte in der Endozytose eine Abhängigkeit von Wingless. Durch die bereits vorhandene intrazelluläre Lokalisation des Fzd8 Δ (1-52)-Rezeptors könnte der ligandenabhängige Prozess umgangen werden und Fzd8 Δ (1-52) somit Wnt-unabhängig prozessiert werden.

Ferner weist die Aminosäuresequenz von Fzd8 im Bereich zwischen der 156. und der 173. Aminosäure potentielle Proteinasenschnittstellen auf (DeAlmeida, Miao et al. 2007), welche durch die modifizierte CRD-Struktur freigelegt werden könnten und somit ebenfalls eine posttranslationale Abspaltung des HA-Tags (und der CRD) induzieren könnten.

Ein weiterer Erklärungsansatz stellt eine Änderung des Translationsverhaltens, beispielsweise durch eine *alternative translation initiation* (ATI), dar. Die ATI beschreibt eine Verschiebung des Translationsstarts vom ersten AUG-Startcodon der mRNA zur weiter *downstream* lokalisierten Startcodons. Grund hierfür sind die das Startcodon umgebenden Basen (die sog. Kozak-Sequenz), welche die Stabilität der ribosomalen Bindung regulieren; bei schwacher Bindung kann es zu Verlagerungen des Translationsstarts kommen (Kozak 1999; Touriol, Bornes et al. 2003). ATI konnte bereits für eine Vielzahl an Rezeptoren, wie beispielsweise Glukokortikoid-Rezeptoren (Duma, Jewell et al. 2006), den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR34 (Engemaier, Rompler et al. 2006) oder andere membranständige Proteine wie K⁺-Kanäle (Fernandez, Morales et al. 2003) gezeigt werden. Die Effekte auf die Zelle differieren abhängig von Rezeptor und ATI. So konnten die Proteinprodukte von potentiellen, durch ATI entstandenen Progesteronrezeptoren nicht nachgewiesen werden (Samalecos and Gellersen 2008), während der durch *Cleaving* oder ATI entstandene C-Terminus des HER-Rezeptorproteins Tumorwachstum in Brustkrebszellen induzieren kann (Anido, Scaltriti et al. 2006). Auch die Halbwertszeit von durch ATI entstandenen Rezeptorvarianten kann stark variieren, was beispielsweise für den Opioid-Rezeptor gezeigt werden konnte (Song, Choi et al. 2009). Eine Translokation des Translationsstarts könnte somit in einem Translationsbeginn *downstream* der HA-Sequenz und dem Fehlen des N-terminalen Hämagglutinin-Tags resultieren (vgl. Abb. F.4).

Dass der Verlust der Signalsequenz nicht zwangsläufig mit einer fehlenden Membran-Lokalisation einhergehen muss, konnten Studien an unterschiedlichen, durch ATI entstandenen N-terminal verkürzten Isoformen von K⁺-Kanälen zeigen (Staudacher, Baldea et al. 2011). Eine Assoziation des Fzd8 Δ (1-52)-Rezeptors mit der Zellmembran konnte jedoch mittels der Immunfluoreszenz ausgeschlossen werden (vgl. E.1.7).

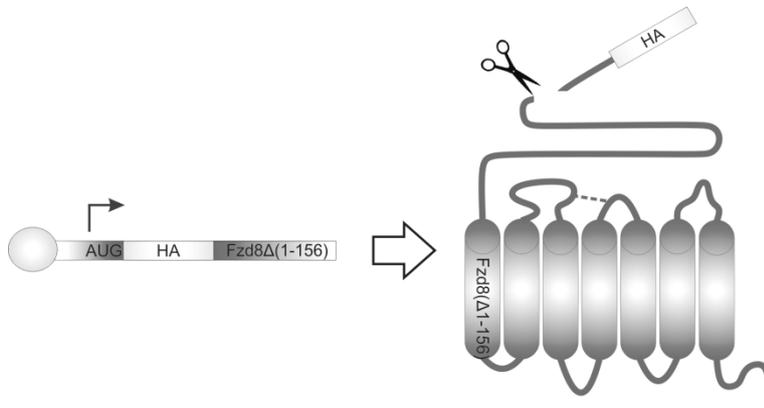


Abb. F.3: Posttranslationale C-terminale Spaltung der HA-Sequenz als mögliche Ursache der fehlenden Detektion des Fzd8Δ(1-52)-Rezeptors. Die Translation beginnt hierbei am Datenbank-Startcodon.

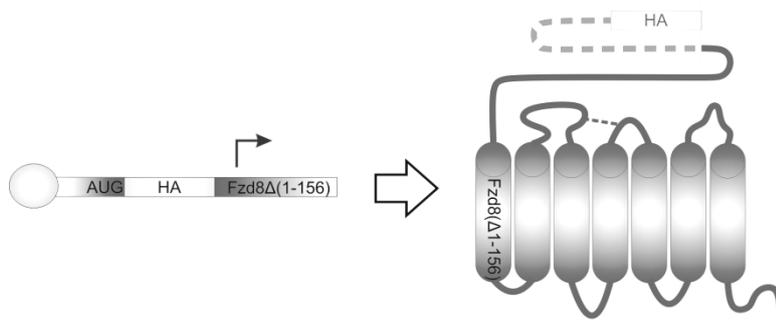


Abb. F.4: *Alternative translation initiation* (ATI) und die konsekutive fehlende Translation des N-terminal lokalisierten HA-Tags als mögliche Ursache der fehlenden Detektion des Fzd8Δ(1-52)-Rezeptors.

F.1.3 Funktionalität der Rezeptorvarianten in der Aktivierung des kanonischen Signalweges

Um die Funktionsfähigkeit der Fzd8-Varianten in der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges zu eruieren, wurden die jeweiligen Überexpressionsplasmide in HT1080-Bar-Zellen mit stabiler Integration des potentiellen Fzd8-Interaktionspartners Wnt8B transfiziert (vgl. E.3.8). Hierbei zeigte die Variante mit voller Proteinelänge die zu erwartende Aktivierung des kanonischen Signalweges. Die verkürzten Varianten des Fzd8-Rezeptors besitzen unterschiedliche Eigenschaften in der Signalübertragung. Fzd8Δ(1-52) zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Mock, was auf eine essentielle Funktion des fehlenden N-Terminus in der Aktivierung des kanonischen Signalweges hinweist. Die Transfektion von Fzd8Δ(1-268) hingegen resultierte in einer Aktivierung des β -Catenin-abhängigen Signalweges, welche jedoch deutlich geringer als nach Transfektion mit Fzd8 ausgeprägt war. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass nicht nur die CRD, sondern vielmehr auch die transmembranen Domänen eine Rolle in der Signaltransduktion spielen. Dieses Phänomen wurde bereits für Fzd5 beschrieben, wobei in diesem Fall die extrazellulär lokalisierten *Loops* zwischen den Transmembrandomänen die entscheidenden Komponenten in der Signaltransduktion darstellten (vgl. B.3.1). Interessant ist hierbei die Fähigkeit zur Aktivierung des kanonischen Signalweges trotz des Fehlens einer N-terminalen Signalsequenz des Translationsprodukts. Dies wäre sowohl durch eine Aktivierung der Rezeptorvariante durch intrazelluläres Wnt8B im Zytoplasma als auch durch die Translokation des Rezeptors in die Zellmembran trotz fehlender Signalsequenz denkbar.

F.2 Expression und Lokalisation von Wnt8B

HT1080-Fibrosarkomzellen weisen im Vergleich zu anderen Zelltypen eine erhöhte Expression des Fzd8-Rezeptors auf (Leitenstern et al., persönliche Mitteilung). Als Interaktionspartner für humanes Fzd8 wurden aus der Gruppe der extrazellulären Liganden bislang Wnt3a (DeAlmeida, Miao et al. 2007) und murines Cristin/R-Spondin (Nam, Turcotte et al. 2006) charakterisiert. Ferner konnten Arbeitsgruppen eine Interaktion von *Xenopus* Wnt8 (XWnt8) mit der CRD des murinen Fzd8-Rezeptors (mFzd8) *in vitro* nachweisen (Hsieh, Rattner et al. 1999) und die entsprechenden

Bindungsstellen *in silico* genauer prädiktieren (Voronkov, Baskin et al. 2007). Um einen entsprechenden humanen Wnt-Liganden von Fzd8 auf Basis dieser Publikationen zu identifizieren, untersuchten wir die 19 humanen Wnt-Proteine auf ihre Sequenzhomologie zum XWnt8-Protein. Es zeigten sich hierbei Übereinstimmungen zwischen 32 bis 35 %, einzig die Proteine Wnt8A und Wnt8B wiesen mit 68 bzw. 70 % eine deutlich höhere Sequenzhomologie auf. Wnt8B wird - wie auch XWnt8 - zur Gruppe der kanonischen Wnts gerechnet (Holmen, Salic et al. 2002).

F.2.1 Evaluierung der endogenen mRNA-Expression von Wnt8B in verschiedenen Zell- und Gewebetypen

In dieser Arbeit wurden Tumorzellen wie HT1080-Zellen und SAOS-2-Zellen, immortalisierte Zellen wie *human embryonic kidney cells* (HEK293) sowie primäre Zellen wie humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) auf die Expression von Wnt8B-mRNA überprüft. Ferner wurden cDNA-Bibliotheken von Speicheldrüsen-, Herz- und Skelettmuskulatur auf die Bildung von Wnt8B-mRNA evaluiert (vgl. E.2.1).

In Zelllinien mit Stammzellcharakter konnte bereits 2008 der Nachweis einer endogenen Expression von Wnt8B-mRNA in humanen embryonalen Stammzellen (H7) und in murinen pluripotenten Teratokarzinomzellen (T9) erbracht werden (Okoye, Malbon et al. 2008). In multipotenten humanen mesenchymalen Stammzellen konnte – in Übereinstimmung mit unseren Versuchsergebnissen - kein Nachweis des kanonisch wirkenden Wnt8B nachgewiesen werden. Der Verlust der Pluripotenz scheint also mit einem damit einhergehenden Verlust der Expression verschiedener Komponenten des Wnt-Signalweges, u.a. auch der Expression von Wnt8B assoziiert zu sein.

Eine ähnliche Ambivalenz zeigen auch Zelllinien der Brustdrüse. Während Zellen der *human mammary epithelial cell line* (HMEC) keine Expression der Wnt8B-mRNA aufweisen, konnte in einer Vielzahl von pathophysiologisch veränderten Brustkrebszelllinien eine Überexpression von Wnt8B und anderen Komponenten des Wnt-Signalweges nachgewiesen werden, so dass – zumindest zum Teil – von einer auto- und/oder parakrinen Aktivierung des Wnt-Signalweges und einer damit verbundenen Steigerung des Malignitätsgrades ausgegangen werden kann (Benhaj, Akcali et al. 2006).

Neben Brustkrebszelllinien wie MCF-7 zeigten auch andere Tumoren wie Pankreaskarzinomzelllinien (PSN-1, BxPC-3, MIA PaCa-2), embryonale Tumorzelllinien (NEC-8, NEC-14 und NT-2), Kolorektalkarzinomzelllinien (SW480), Magenkarzinomzelllinien (u.a. Siegelringzellkarzinom KATO-III) und schlecht-differenzierte Adenokarzinomzelllinien (MKN45) eine Überexpression von Wnt8B (Saitoh, Mine et al. 2002; Saitoh, Mine et al. 2002).

Da eine Vielzahl von Karzinomen eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte Expression von Wnt8B aufweisen, scheint diese eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Tumorigenität der Zellen zu vermitteln. Jedoch stellt die Überexpression von Wnt8B nur einen fakultativen Baustein in der Etablierung von Tumoreigenschaften dar, was die Vielzahl an nicht Wnt8B-exprimierenden Tumoren, wie auch die von uns untersuchten hochproliferativen Tumorzelllinien HT1080 und SAOS-2, belegen.

In diversen untersuchten Typen von Normalgewebe konnte die Arbeitsgruppe um Saitoh 2002 mittels der Nachweismethode des Northern-Blots keinen Nachweis von Wnt8B-mRNA erbringen, was sich auch mit den von uns untersuchten Proben physiologischen Gewebes deckt (Saitoh, Mine et al.

2002). Wnt8B scheint in der Mehrzahl von adultem Gewebe folglich keine essentielle Funktion zu besitzen und offeriert in dieser selektiven Expression möglicherweise in Zukunft einen Angriffspunkt für antitumoröse Therapien.

F.2.2 Detektion der zellulären Lokalisation von Wnt8B durch Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Lokalisation des Wnt8B-Proteins wurde dieses mit dsRed ligiert und das Fusionsprodukt mittels Immunfluoreszenz detektiert. Es zeigte sich hierbei eine Akkumulation des Wnt8B-dsRed-Proteins im Bereich der Zellmembran und partiell im Zytoplasma (vgl. E.2.3).

Die Lokalisation des Wnt8B-dsRed-Fusionsproteins wird vom N-Terminus von Wnt8B bestimmt, welcher durch seine integrierte Signalsequenz in einer extrazellulären Lokalisation des Fusionsproteins resultieren sollte. Die ebenfalls nachweisbare Lokalisation im Zellinneren stellt das Korrelat der Proteinsekretion über das Endplasmatische Retikulum und dem Golgi-Apparat dar. Die Detektion von Wnt-Proteinen im Bereich der Zellmembran konnte, wenn auch bislang nicht für Wnt8B im Speziellen, bereits für *Drosophila* Wingless und murines Wnt3a nachgewiesen werden (Reichsman, Smith et al. 1996; Willert, Brown et al. 2003). Reichsman et al. konnten zeigen, dass 83 % des sezernierten Wg-Proteins in *Drosophila* durch nichtkovalente Interaktionen an die Glykosaminoglykane (GAG) der Zellmembran und der Extrazellulärmatrix gebunden werden (Reichsman, Smith et al. 1996). Nach Zugabe von GAG-Lyase oder Chlorat wurde diese Bindung durch das verminderte Angebot von GAGs stark reduziert, konnte aber durch die Zugabe von Heparin wiederhergestellt werden. Eine entscheidende Rolle in dieser Bindung spielte die posttranslationale Modifikation des Wnt-Proteins, welche bereits in B.2.1 detailliert beschrieben wurde.

Diese posttranslationalen Modifikationen, verbunden mit der Hydrophobizität (Willert, Brown et al. 2003) und der Interaktion mit GAG an den Oberflächen humaner Zellen, stellen auch für Wnt8B den Erklärungsansatz für die membranständige Lokalisation dar. Eine höhere Affinität zur Zellmembran durch einen potentiellen Einfluss des C-terminalen dsRed-Proteins scheint unwahrscheinlich, da dieses in singulärer Form zytoplasmatisch lokalisiert ist (vgl. E.2.3).

F.3 Wirkung von Wnt1 und Wnt8B auf die Aktivität des kanonischen Signalweges und die Transkription ausgewählter Zielgene

F.3.1 Stimulation von HT1080-Bar mit rekombinanten humanem Wnt1

Um das Verhalten der HT1080-Zellen unter Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges zu untersuchen, wurden HT1080-Bar-Zellen mit rekombinanten humanen Wnt1 (rhWnt1) versetzt und mit Hilfe des Reporterproteins quantifiziert. Wnt1 wurde bereits früh als „kanonisches Wnt“ und somit als Aktivator des β -Catenin-abhängigen Signalweges charakterisiert (Korinek, Barker et al. 1998) und spielt in der Tumorigenese z.B. von Mamma-Karzinomen und der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine entscheidende Rolle (Li, Welm et al. 2003; Simon, Grandage et al. 2005). Rekombinantes murines Wnt1 (rmWnt1) konnte erstmals 2005 in *E. coli* synthetisiert und auf seine Fähigkeit zur Aktivierung des kanonischen Signalweges getestet werden (Fahnert, Veijola et al. 2004). RhWnt1 unterscheidet sich zu seinem murinen Pendant in einer Aminosäure (V50I).

In unseren Versuchen in HT1080-Bar-Zellen zeigte sich über den Zeitverlauf nicht die erwartete Aktivierung des kanonischen Signalweges. Die Ursachen der fehlenden Aktivierung könnten einerseits auf Seiten des Proteins, oder andererseits auf Seiten der Zelllinie festgemacht werden.

Eine basale hohe Wnt1-Expression in HT1080-Zellen könnte den fehlenden, nochmals stimulierenden Effekt auf die Zellen erklären; ebenso wie ein Mangel eines entsprechenden, korrespondierenden Fzd-Rezeptors. Da Fzd-Rezeptoren jedoch eine gewisse funktionelle Redundanz aufweisen (Holmen, Salic et al. 2002; Kikuchi, Yamamoto et al. 2007), erscheint die zweite Variante unwahrscheinlich. RhWnt1 zeigte jedoch auch in hMSC keine Aktivierung des kanonischen Signalweges (Peröbner et al., persönliche Mitteilung), so dass eine zellspezifische Wirkung ebenso ausgeschlossen werden konnte. Zudem zeigen hMSCs keine endogene Expression von Wnt1 (Okoye, Malbon et al. 2008), so dass eine bereits präexistente starke Wnt1-Stimulation als Ursache der fehlenden zusätzlichen Aktivierung ebenfalls ausgeschlossen werden konnte.

Wnt-Proteine unterliegen einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationsschritten (vgl. B.2.1). Fehlen diese, resultiert dies ebenfalls in einem Funktionsverlust (Komekado, Yamamoto et al. 2007; Kurayoshi, Yamamoto et al. 2007), so dass die fehlende Funktionalität auch durch einen insuffizienten Prozessierungsvorgang entstehen kann. Wir entschieden uns deshalb für die Aktivierung des kanonischen Signalweges über die stabile Transfektion von Wnt8B.

F.3.2 Transiente Transfektion von Wnt8B in HT1080-Bar und hMSC-Bar

Sowohl hMSCs als auch HT1080-Zellen, jeweils mit stabiler Integration des pN3-Bar-GLuc-Reporterplasmids, zeigten eine Steigerung der Aktivität des kanonischen Signalweges nach transienter Transfektion der Wnt8B-cDNA (vgl. E.3.2 und E.3.3), was mit dessen Funktionsweise als kanonisch wirkendes Wnt übereinstimmt (Holmen, Salic et al. 2002). Die Verstärkung des Unterschiedes zwischen Mock- und Wnt8B-transfizierten Zellpopulationen über die Messtage lässt sich durch das nötige Zeitintervall zur Expression des Wnt8B-Proteins, welches in Eukaryoten in der Regel 12 - 72 Stunden dauert (Colosimo, Goncz et al. 2000), erklären, da erst nach Proteinexpression die konsekutive Aktivierung des Signalweges erfolgen kann.

Unsere Ergebnisse unterstreichen somit die Einordnung von humanem Wnt8B als kanonisches Wnt-Protein.

F.3.3 Stabile Integration der Wnt8B-cDNA in HT1080-Bar-Zellen

Um konstitutiv Wnt8B-exprimierende Zellen zu generieren, wurde nach o.g. Nachweis der Aktivierung des kanonischen Signalweges durch Wnt8B das pEF-DEST51-Wnt8B-Plasmid stabil in HT1080-Bar-Zellen integriert. Hierbei wurde die Methode der zufallsgerichteten Integration gewählt. Die Zellen wurden hierbei zunächst transient mit dem Plasmid transfiziert und anschließend einem eukaryoziden Selektionsdruck durch Blasticidin ausgesetzt. pEF-DEST51 vermittelt über die Bla_r-Kassette eine Resistenz gegen Blasticidin. Durch den aufrechterhaltenen Selektionsdruck wurden zunächst untransfizierte, dann transient transfizierte Zellen selektioniert. Die weiterführende Selektion gewährleistete die Integration des Plasmids, so dass keine weitere Transfektionskontrolle wie eGFP eingeführt werden musste (Hoelters 2009).

Bei der stabilen Integration wird der Expressionsvektor an einer zufälligen Stelle geöffnet. Hierbei können sowohl Abschnitte, die für die Funktionsfähigkeit in Pro- als auch in Eukaryoten essentiell sind, betroffen sein (vgl. Abb. F.5). Eine Spaltung der Expressionskassette für Wnt8B resultiert in einer Blasticidin-Resistenz ohne Wnt8B-Sekretion, eine Spaltung der Resistenzkassette im Verlust der Blasticidin-Resistenz mit nachfolgendem Zelluntergang. Die Wahrscheinlichkeit einer Integration mit

konsekutiver Wnt8B-Expression, also einer Öffnung des Plasmids außerhalb der Wnt8B-Expressionskassette, ließ sich für dieses Plasmid wie folgt berechnen:

$$\text{Wahrscheinlichkeit} = \frac{(\text{Vektor} - \text{Bla-Resistenzkassette}) - \text{Wnt8B-Expressionskassette}}{\text{Vektor} - \text{Bla-Resistenzkassette}} = \frac{(6892 \text{ bp} - 1139 \text{ bp}) - 2729 \text{ bp}}{6892 \text{ bp} - 1139 \text{ bp}} = 53 \%$$

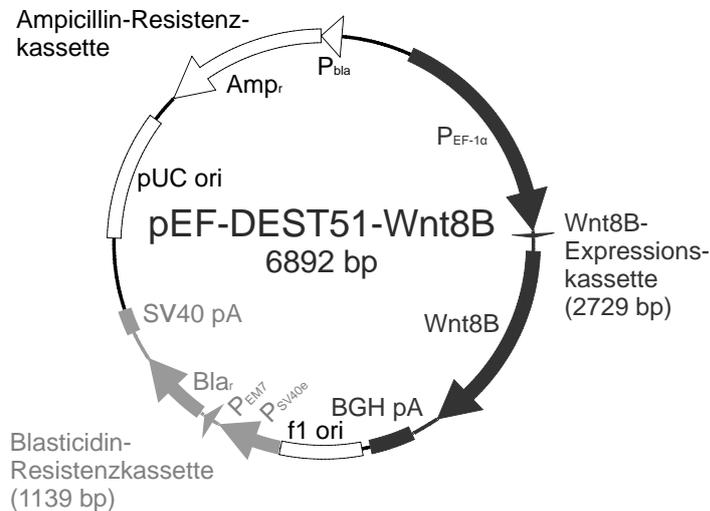


Abb. F.5: Öffnung des pEF-DEST51-Wnt8B-Vektors zur stabilen Integration.

Hellgrau: Blasticidin-Resistenzkassette (1139bp). Eine Eröffnung in diesem Bereich führt zum Verlust der Bla-Resistenz und zum Zelluntergang.

Dunkelgrau: Wnt8B-Expressionskassette (2729 bp). Eine Öffnung führt zum Verlust der Wnt8B-Expression bei bestehender Antibiotika-Resistenz.

Weiß: Bereiche (3024 bp), in denen eine Öffnung zu keiner Beeinflussung der Funktionsfähigkeit des Vektors führt.

Die Wahrscheinlichkeit einer gelungenen Integration mit konsekutiver Expression des Wnt8B-Proteins beträgt demnach rund 53 %.

Sowohl die Integrationsstelle als auch die Anzahl der Integrationen sind bei einer zufallsgerichteten stabilen Integration in die genomische DNA nicht prädiktierbar, so dass selektionierte Zellen innerhalb einer Zellpopulation unterschiedliche Expressionsmuster des Wnt8B-Proteins aufwiesen. Mit Hilfe einer monoklonalen Selektion konnten Zellstämme gewonnen werden, welche über unterschiedliche, aber in sich einheitliche Expressionsmuster verfügten. Diese wurden für die weitere Funktionsanalyse eingesetzt (vgl. E.3.5).

F.3.4 Wnt/ β -Catenin-Aktivität in verschiedenen HT1080-Bar-Zellklonen mit stabiler Integration von Wnt8B

Neben der transienten Transfektion wurde in HT1080-Bar-Fibrosarkomzellen auch nach stabiler Integration der Wnt8B-cDNA deren Aktivierung des kanonischen Signalweges quantifiziert. Es zeigte sich hierbei am dritten Tag eine signifikant erhöhte Reportergergenaktivität, die sich unter den Klonen aber nicht nachhaltig unterschied (vgl. E.3.6).

Wnt8B wurde bislang als kanonisches Wnt, also als Aktivator des β -Catenin-abhängigen Signalweges charakterisiert (Holmen, Salic et al. 2002). Dieses Verhalten konnte auch in unseren Versuchen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich entgegen unseren Erwartungen keine konzentrationsabhängige Korrelation der Wnt8B-Expression zur Gaussia-Luciferase-Aktivität und damit zum Aktivierungszustand des Signalweges, was im Folgenden diskutiert werden soll.

Ein häufig zu beobachtendes Phänomen in der ektopischen Überexpression von Wnt-Proteinen ist die Retention von Wnt-Proteinen in der Zelle und die Sekretion insuffizient funktionierender Wnt-Proteine (Willert, Brown et al. 2003). Da zur Wnt-Synthese und den posttranslationalen Modifikationschritten weitere Hilfsproteine wie Wntless (Wls, vgl. B.2.1) nötig sind (Banziger, Soldini et al. 2006), muss bei Auslastung des Syntheseapparats eine weitere Erhöhung der mRNA-Kopienzahl

in der Zelle nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Proteinsynthese einhergehen. Der Aktivierungsgrad des kanonischen Wnt-Signalweges würde somit durch die maximale Synthese- bzw. Prozessierungskapazität der Zellen für funktionsfähiges Wnt8B determiniert.

Auf Grund einer Sättigung der entsprechenden Interaktionspartner mit Wnt-Liganden, den Fzd-Rezeptoren und LRP5/6, könnte eine weitere Konzentrationssteigerung des extrazellulären Wnt8B-Proteins keine weitere Aktivierung des kanonischen Signalweges induzieren. Für diesen Erklärungsansatz würde das Verhalten der stark Wnt8B-exprimierenden HT1080-Zellen nach Transfektion des entsprechenden Rezeptors (Fzd8) sprechen: Die konsekutive Überexpression des potentiellen Wnt8B-Rezeptors Fzd8 schaffte weitere Interaktionsstellen für Wnt8B, die folgende vermehrte Signalübertragung in das Zellinnere resultierte in einer verstärkten Aktivierung des kanonischen Signalweges (vgl. E.3.8).

Neben einem Mangel an zur Signaltransduktion nötigen Proteinen sollte jedoch auch die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, die eine antagonistische Wirkung auf den kanonischen Signalweg ausüben, in Betracht gezogen werden. Die Aktivierung der *Nemo-like kinase* (NLK) über die Wnt/Ca²⁺-Signaltransduktionskaskade resultiert beispielsweise in der Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalweges (Ishitani, Kishida et al. 2003). Nicht-kanonische Signalwege werden ebenfalls durch Wnt-Proteine aktiviert, wobei spezielle Wnt-Liganden, wie für Wnt5a gezeigt, sowohl den kanonischen als auch β-Catenin-unabhängige Signalwege aktivieren können (Mikels and Nusse 2006). Die selektive Aktivierung β-Catenin-unabhängiger Signalwege nur unter hohen Wnt-Konzentrationen würde somit in einer konsekutiven Repression des kanonischen Signalweges resultieren und somit die Expression der Gaussia-Luciferase hemmen. Eine Aktivierung des kanonischen Signalweges unter hohen Wnt8B-Konzentrationen würde somit ähnliche Effekte auf die Luciferase-Expression zeigen wie die Aktivierung mit hohen Wnt8B-Konzentrationen und der damit verbundenen Repression durch nicht-kanonische Signalwege, wie wir in E.3.6 zeigen konnten.

F.3.5 Einfluss der ektopischen Expression von Wnt8B auf die Cyclin D1- und MMP-14-Expression

Um den Einfluss von Wnt8B auf das Verhalten der HT1080-Bar-Zellen weiter zu eruieren, wurde die Expression verschiedener potentieller Wnt-Zielgene unter Einsatz der qRT-PCR quantifiziert (vgl. E.3.7.1 und E.3.7.3). Als Zielgene dienten hierbei das Zellzyklusregulatorprotein Cyclin D1 und die membrangebundene Matrixmetalloproteinase MMP-14.

Cyclin D1 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation zellulären Proliferationsverhaltens. Seine Expression ist essentiell für den Übertritt aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Baldin, Lukas et al. 1993). Entsprechend dieser kritischen Position in der Proliferationssteuerung resultieren Dysregulationen der Cyclin D1-Expression in Abweichungen im Zellwachstums- und Proliferationsverhalten (Massague 2004). Viele Tumoren, wie z.B. verschiedene Kolorektalkarzinome (Arber, Doki et al. 1997), Mammakarzinome (Velasco-Velazquez, Li et al. 2011) und viele weitere Karzinomarten (Sherr 1996) weisen eine aberrante Überexpression des Cyclin D1-Proteins auf. Auch bereits in benignen Adenomen von Patienten mit *Familiärer Adenomatöser Polyposis Coli* (FAP) konnten erhöhte Cyclin D1-Expressionsniveaus detektiert werden, was für eine Dysregulation der Cyclin D1-Synthese bereits in frühen Stadien der Tumorigenese spricht (Tetsu and McCormick 1999; D'Orazio, Muller et al. 2002). Im Promotor von Cyclin D1 konnte eine Bindestelle für LEF1 identifiziert und Cyclin D1 auf diese Weise als Zielgen des kanonischen Signalweges charakterisiert werden (Shtutman, Zhurinsky et al. 1999). Zum Eintritt in die S-Phase ist neben der Stimulierung durch Wnt-

Liganden jedoch auch die Expression weiterer Regulatorproteine essentiell (Rimerman, Gellert-Randleman et al. 2000). Neuere Publikationen klassifizieren die Dysregulation von Cyclin D1 jedoch als sekundäres Ereignis, da in Dünndarmgewebe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* alleinige β -Catenin-Erhöhungen, in diesem Falle durch APC-Knockdown induziert, erst in einer verspäteten Cyclin D1-Überexpression resultierten (Sansom, Reed et al. 2005).

Metalloproteinasen stellen durch ihre Fähigkeit zur Degradation extrazellulärer Matrixbestandteile eine wichtige Komponente in der Vermittlung von zellulären Migrations- und Invasionseigenschaften dar. Die Expressionsregulation einiger Metalloproteinasen konnte mit der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in Verbindung gebracht werden, wie z.B. bei MMP-7 (Brabletz, Jung et al. 1999), MMP-26 (Marchenko, Marchenko et al. 2002) oder der membranständigen MMP-14 (Takahashi, Tsunoda et al. 2002).

MMP-14 spielt eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Migrationseigenschaften, da sie sich durch ihre Fähigkeit zur Degradation von Typ-I-Kollagen (Itoh and Seiki 2006; Sodek, Ringuette et al. 2007), ihre aktivierende Wirkung auf andere MMPs (Knauper, Will et al. 1996; Itoh, Takamura et al. 2001) und die Regulation der Aktivität anderer Oberflächenproteine auszeichnet (Tam, Morrison et al. 2004). In Kolorektalzellen zeigte die MMP-14-Expression eine Abhängigkeit vom β -Catenin-Level (Takahashi, Tsunoda et al. 2002). Auch humane mesenchymale Stammzellen zeigten eine Wnt/ β -Catenin-abhängige MMP-14-Expression (Neth, Ciccarella et al. 2006).

In unseren Experimenten zeigte sich nach der Aktivierung des kanonischen Signalweges durch ektopische Expression von Wnt8B eine Steigerung sowohl der Cyclin D1- als auch der MMP-14-Expression. Die Expressionsraten beider Zielgene korrelierten dabei mit dem Expressionsniveau von Wnt8B. Diese Beobachtungen unterstreichen die Klassifizierungen von Cyclin D1 und MMP-14 als direkte Zielgene, welche durch den kanonischen Wnt8B-Liganden reguliert werden können (Baldin, Lukas et al. 1993).

Allerdings scheint die Zielgenexpression nicht zwingend proportional mit dem Aktivierungszustand des kanonischen Signalweges zu korrelieren. Dies zeigte sich sowohl bei Cyclin D1 als auch bei MMP-14. Trotz identischem Aktivierungsniveau des kanonischen Signalweges war eine Wnt8B-abhängige mRNA-Expression von Cyclin-D1 und MMP-14 zu beobachten. Dieser Effekt wäre erklärbar über eine teilweise β -Catenin-unabhängige Transkriptionssteuerung der Zielgenexpression. Demzufolge würde Wnt8B nicht nur ausschließlich auf kanonische Signalwegsstrukturen wirken. Andererseits könnten auch hemmende Effekte auf die Zielgenexpression unter niedrigen Wnt8B-Konzentrationen, wie z.B. über β -Catenin-unabhängige Signalwege (vgl. B.6), die Ursache für die unterschiedlichen Expressionsniveaus darstellen. Diese Erklärungsansätze würden die Möglichkeit der Aktivierung sowohl kanonischer als auch nicht-kanonischer Signalwege durch ein singuläres Wnt-Protein, wie beispielsweise schon für Wnt5a gezeigt werden konnte (Mikels and Nusse 2006), sowie eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Aktivierung durch Wnt8B implizieren.

Wie bereits erwähnt, spielt Cyclin D1 eine essentielle Rolle im Proliferationsverhalten von Tumorzellen. Aber auch in primären Zellen wie z.B. hMSC konnte eine direkte Korrelation der Cyclin D1-Expression mit der Proliferationsfähigkeit der Zellen gezeigt werden (Neth, Ciccarella et al. 2006). Nichtsdestotrotz spielt eine Vielzahl von Einflussfaktoren wie weiteren Zellzyklusregulatorproteinen und anderen Molekülen eine Rolle in der Proliferationsregulation (Satyanarayana and Kaldis 2009), so dass erhöhte Cyclin D1-Level nicht zwangsläufig in jedem Zelltyp in einer augmentierten Zellproliferationsrate resultieren müssen. Dennoch zeigen unsere Resultate, dass eine Aktivierung

des kanonischen Signalweges über Wnt8B mit einer gesteigerten Proliferationsrate in HT1080-Zellen einhergeht (Leitenstern et al., persönliche Mitteilung).

Das veränderte Expressionsverhalten von MMP-14 kann einen Hinweis auf eine gesteigerte Invasivität und Metastasierungsfähigkeit von HT1080-Fibrosarkomzellen unter Wnt8B-Stimulation geben. Ein ähnliches Verhalten konnte bereits in hMSCs (Neth, Ciccarella et al. 2006) und auch in malignen Zellen wie z.B. bei Ovarialkarzinomen (Sodek, Ringuette et al. 2007; Adley, Gleason et al. 2009) oder dem Pleuromesotheliom (Doi, Maniwa et al. 2011) nachgewiesen werden. Ferner zeigten Prostatakarzinomzellen unter ektopischer MMP-14-Expression Zeichen einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und damit verbunden eine erhöhte Metastasierungsrate (Cao, Chiarelli et al. 2008). Jedoch scheint nicht nur die reine Expressionssteigerung von MMP-14 über den kanonischen Signalweg Einfluss auf die Invasivität zu besitzen, vielmehr beeinflusst auch die zytoplasmatische Lokalisation von β -Catenin die MMP-14-Aktivität. Zytoplasmatisches β -Catenin zeigte in nichtmalignen Zellen die Fähigkeit zur MMP-14-Inhibition durch direkte Interaktion mit der Metalloproteinase, während in HT1080-Zellen diese inhibitorische Komponente durch die nukleäre Lokalisation vom β -Catenin nicht nachweisbar war (Liu, Yang et al. 2010).

In der Steuerung von Invasivität und Metastasierung spielen neben MMP-14 jedoch noch eine Vielzahl weiterer Proteine wie z.B. die TIMPs eine entscheidende Rolle (Neth, Ries et al. 2007; Strongin 2010), so dass auf der Basis der mRNA-Expressionssteigerung keine definitive Aussage über eine gesteigerte Invasivität Wnt8B-stimulierter Fibrosarkomzellen getroffen werden kann. Die Applikation von *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE), die eine Expressionsinhibition der MMP-14, der MMP-2 und der MMP-9 bewirkt, resultierte jedoch in einem verringerten Invasions-, Motilitäts- und Migrationsverhalten von HT1080-Fibrosarkomzellen *in vitro* (Hwang, Park et al. 2006).

Zusammengefasst lässt das geänderte Zielgenexpressionsverhalten von Cyclin D1 und MMP-14 in HT1080 unter kontinuierlicher Wnt8B-Stimulation auf eine gesteigerte Fähigkeit der Zellen zur Proliferation und Invasion in Abhängigkeit von der Wnt8B-Konzentration schließen. Für maligne Zellpopulationen stellen diese Zielgene – und insbesondere die Faktoren, die deren Transkriptionssteigerung bewirken – interessante Angriffspunkte in der zukünftigen antitumorösen Therapie dar, wie z.B. für die Expression von MMP-14 gezeigt werden konnte (Zhang and Brodt 2003).

F.3.6 Die Rolle von Fzd8 als potentiell Zielgen des kanonischen Signalweges

Neben einer Vielzahl weiterer Proteine werden auch Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges selbst β -Catenin-abhängig reguliert, darunter auch Mitglieder der Gruppe der Fzd-Rezeptoren. Um die Wirkung von Wnt8B auf den kanonischen Signalweg, und hierbei insbesondere auf seinen potentiellen Rezeptor Fzd8 zu eruieren, wurde dessen Expression in HT1080-Zellen mit verschiedenen Wnt8B-Expressionsniveaus mittels qRT-PCR quantifiziert. Unter niedrigen Konzentrationen zeigte sich hierbei eine Repression der Fzd8-mRNA. Das Verhalten von Fzd-Rezeptoren als negatives Wnt-Zielgen wurde bereits in *Drosophila* für den DFzd2-Rezeptor beschrieben (Cadigan, Fish et al. 1998). Beobachtungen in unserem Labor zeigten in hMSC ebenfalls eine negative Regulation der Fzd8-Expression unter Aktivierung des kanonischen Signalweges, in diesem Fall durch murines Wnt3a (mWnt3a) (Karow 2008; Kolben 2010). Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg induziert somit einen negativen *feedback-loop*, wodurch eine überschießende Aktivierung verhindert wird.

Bislang wurde innerhalb der Fzd-Familie nur Fzd7 als positives Wnt-Zielgen beschrieben, wobei dieses Wnt-abhängige Expressionsverhalten in embryonalen Karzinomzellen gezeigt wurde (Willert, Epping et al. 2002). Ein ambivalentes Verhalten, wie dies unter verschiedenen Wnt8B-Expressionsniveaus in HT1080-Zellen zu beobachten war, wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben.

Die Repression von Fzd8 unter niedrigen Wnt8B-Konzentrationen steht hierbei im Einklang mit den bereits genannten Beobachtungen in hMSC. Die Aktivierung der Transkription unter Stimulation mit hohen Wnt8B-Konzentrationen, also die Funktion als positives Wnt-Zielgen, lässt sich nicht durch die Aktivierung des kanonischen Signalweges erklären. Vielmehr propagiert dieses Verhalten eine Aktivierung einer alternativen, β -Catenin-unabhängigen Signaltransduktion, welche eine, die kanonische Repression überwindende Aktivierung der Transkription induzieren würde.

Da Fzd8 funktionell als Rezeptor des kanonischen Signalweges agiert (vgl. F.1.3), würde dessen vermehrte Expression einen positiven *feedback-loop* induzieren, was über die gesteigerte Expression der Zielgene in einer vermehrten Proliferation und Migration der Zelle resultieren würde.

G Resümee und Ausblick

Das Wnt-Signaling spielt in der Aufrechterhaltung und Regulation bestimmter Zelleigenschaften wie Proliferation, Migration und Invasivität eine entscheidende Rolle. Diese Eigenschaften determinieren nicht nur die Funktion von Stammzellen, sondern partizipieren auch in der Tumorigenese, im Tumorwachstum und der -metastasierung. Dementsprechend stellt das komplexe System des Wnt-Signalings inklusive seiner großen Zahl an Molekülen, Signaltransduktionskaskaden und Zielgenen einen interessanten Ansatzpunkt potentieller antitumoröser Therapien dar.

Eine spezifische Therapie erfordert jedoch fundierte Kenntnisse über Expression, Signaltransduktion und Effekte der Komponenten des Signalings. Die Gewinnung ebendieser stellt jedoch in der Interaktion von 19 Wnt-Molekülen, mindestens 14 Rezeptorproteinen und einer Vielzahl intrazellulärer Signaltransmitter eine komplexe Aufgabe dar.

Die Funktion einer der Liganden, Wnt8B, wurde in dieser Arbeit näher evaluiert. Wnt8B ist ein Protein mit starker Assoziation zur Zellmembran, was bereits auch für andere Wnt-Proteine gezeigt werden konnte. Dieses Verhalten ist wohl auch der Grund deren morphogenen Charakters (Zecca, Basler et al. 1996). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass humanes Wnt8B als Aktivator des β -Catenin-abhängigen Signalweges fungiert. Wnt8B besitzt ein hochspezifisches Expressionsmuster in verschiedenen Zellentitäten, welches es als Ziel antitumoröser Therapien interessant erscheinen lässt (vgl. F.2.1). Wir konnten in hMSC und in cDNA-Proben verschiedener primärer Zellengewebe keine Expression endogener Wnt8B-mRNA nachweisen, wie auch für diverse andere primäre Zellen gezeigt werden konnte (Saitoh, Mine et al. 2002). Die Expression von Wnt8B scheint somit keine essentielle Funktion in diesen Gewebstypen zu spielen. Vielmehr zeigen embryonale Gewebe - wie auch einige Tumorentitäten - eine erhöhte Wnt8B-Expression (Okoye, Malbon et al. 2008). Eine selektive Expression von Wnt8B nur durch Tumorzellen offeriert somit einen Angriffspunkt spezifischer, gegen Wnt8B gerichteter antitumoröser Therapien. So konnte beispielsweise in Mammakarzinomzellen gezeigt werden, dass die in diesem Zelltyp vorherrschende Wnt8B-Überexpression durch das Hormon β -Estradiol reguliert wird (Saitoh, Mine et al. 2002). In NT2-Zellen zeigte die Applikation von Retinsäure eine Inhibition der Wnt8B-Expression (Saitoh, Mine et al. 2002). Ob solche potentiellen Angriffspunkte auch für eine antitumoröse Therapie am Menschen geeignet sind, muss jedoch erst noch eruiert werden, da die Modifikation der Expression von Wnt-Proteinen durch deren verzweigte Signaltransduktion eine hohe Zahl an ungewünschten Effekten erwarten lässt.

Eine Interaktion von Wnt8B mit einem spezifischen Fzd-Rezeptor an der Zelloberfläche wurde für humane Proteine auf molekularer Ebene bislang noch nicht nachgewiesen, jedoch weisen *in-silico*-Analysen wie auch die Experimente mit *Xenopus* Wnt8 auf Fzd8 als potentiellen Wnt-Liganden hin (Hsieh, Rattner et al. 1999; Voronkov, Baskin et al. 2007). Wir konnten zeigen, dass die Überexpression von Fzd8 in Wnt8B-exprimierenden HT1080-Fibrosarkomzellen eine aktivierende Funktion auf den kanonischen Wnt-Signalweg ausübt, was auf eine funktionelle Interaktion dieser Signalkomponenten hinweist. Die Inhibition dieses Rezeptors in der Signaltransduktion stellt somit auch einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt dar. Ähnliche Resultate zeigten auch die kürzlich publizierten Ergebnisse in Bronchialkarzinomzellen, die eine reduzierte Metastasierungsrate nach Fzd8-Knockdown zeigen konnten (Wang, Xu et al. 2011). Mit dem *insulin-like growth factor binding protein 4* (IGFBP-4) wurde bereits eine körpereigene Substanz identifiziert, die über die

Inhibition von Fzd8 potentiell antitumorös wirksam sein könnte (Zhu, Shiojima et al. 2008). Nicht zuletzt scheint das *Wnt-Signaling* auch einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu vermitteln, so konnten o.g. Lungenkarzinomzellen nach *Knockdown* von Fzd8 für die Therapie mit dem Mitosehemmstoff Docetaxel (Taxotere®) sensibilisiert werden (Wang, Xu et al. 2011).

Die Arbeit wirft jedoch eine Reihe von Fragestellungen auf, die Inhalt zukünftiger Projekte sein könnten. Hierzu gehören sicherlich der Nachweis der Interaktion von Wnt8B und Fzd8 nicht nur auch funktioneller, sondern auch auf molekularer Ebene, beispielsweise unter Einsatz der Co-Immunopräzipitation. Aber auch die Rolle des verkürzten Fzd8-Rezeptors Fzd8 Δ (1-52), welcher nicht im kanonischen *Wnt-Signaling* zu partizipieren scheint, und der Nachweis des C-terminalen Fragments im Bereich des Zellkerns, stellt eine interessante Fragestellung dar, welche in Zukunft näher beleuchtet werden könnte. Eine Analyse mittels Western Blot würde es ermöglichen, die Fragmentgröße des eGFP-markierten Proteins zu eruieren, um Hinweise auf mögliche, das Protein weiter verkürzende Prozesse zu erhalten. Ferner wäre eine Integration des HA-Tags an unterschiedlichen Stellen innerhalb der verkürzten Rezeptoren erstrebenswert, um potentielle weitere Verkürzungsvorgänge nachweisen zu können. Nicht zuletzt könnte auch die Rolle von Fzd8 als Wnt8B-reguliertes Zielgen und dessen ambivalentes Verhalten unter verschiedenen Wnt8B-Konzentrationen näher evaluiert werden.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird die zukünftige Behandlung von Krebserkrankungen durch hochspezifische Wirkstoffe – welche auch im *Wnt-Signaling* Angriffspunkte finden könnten – höhere Erfolgsraten bei niedrigeren Nebenwirkungen ermöglichen. Um jedoch eine entsprechende Therapie zu gewährleisten, ist es von essentieller Wichtigkeit, die genauen Funktionen und Interaktionen zu kennen, um die therapeutischen Mechanismen – und auch die der Nebenwirkungen – erklären. Vor diesem Hintergrund erfordert die Zukunft der Krebstherapie ein grundlegendes und fundiertes Verständnis molekularer Mechanismen in der Zelle – nicht zuletzt auch im Bereich des *Wnt-Signalings*.

H Literaturverzeichnis

- Adley, B. P., K. J. Gleason, et al. (2009). "Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) in epithelial ovarian cancer: high level expression in clear cell carcinoma." *Gynecol Oncol* **112**(2): 319-324.
- Ahumada, A., D. C. Slusarski, et al. (2002). "Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP." *Science* **298**(5600): 2006-2010.
- Amit, S., A. Hatzubai, et al. (2002). "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." *Genes Dev* **16**(9): 1066-1076.
- Anido, J., M. Scaltriti, et al. (2006). "Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation." *EMBO J* **25**(13): 3234-3244.
- Arber, N., Y. Doki, et al. (1997). "Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells." *Cancer Res* **57**(8): 1569-1574.
- Arce, L., N. N. Yokoyama, et al. (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." *Oncogene* **25**(57): 7492-7504.
- Ataman, B., J. Ashley, et al. (2006). "Nuclear trafficking of Drosophila Frizzled-2 during synapse development requires the PDZ protein dGRIP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(20): 7841-7846.
- Bafico, A., A. Gazit, et al. (1999). "Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling." *J Biol Chem* **274**(23): 16180-16187.
- Baldin, V., J. Lukas, et al. (1993). "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1." *Genes Dev* **7**(5): 812-821.
- Banziger, C., D. Soldini, et al. (2006). "Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells." *Cell* **125**(3): 509-522.
- Bao, J., J. J. Zheng, et al. (2012). "The Structural Basis of DKK-Mediated Inhibition of Wnt/LRP Signaling." *Sci Signal* **5**(224): pe22.
- Barker, N., R. A. Ridgway, et al. (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." *Nature* **457**(7229): 608-611.
- Belenkaya, T. Y., C. Han, et al. (2002). "pygopus Encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling." *Development* **129**(17): 4089-4101.
- Belenkaya, T. Y., Y. Wu, et al. (2008). "The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network." *Dev Cell* **14**(1): 120-131.
- Benhaj, K., K. C. Akcali, et al. (2006). "Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines." *Oncol Rep* **15**(3): 701-707.
- Bevis, B. J. and B. S. Glick (2002). "Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)." *Nat Biotechnol* **20**(1): 83-87.
- Bhanot, P., M. Brink, et al. (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." *Nature* **382**(6588): 225-230.
- Biechele, T. L. and R. T. Moon (2008). "Assaying beta-catenin/TCF transcription with beta-catenin/TCF transcription-based reporter constructs." *Methods Mol Biol* **468**: 99-110.
- Bilic, J., Y. L. Huang, et al. (2007). "Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation." *Science* **316**(5831): 1619-1622.
- Billin, A. N., H. Thirlwell, et al. (2000). "Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6882-6890.
- Bourhis, E., C. Tam, et al. (2010). "Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6." *J Biol Chem* **285**(12): 9172-9179.
- Boutros, M., N. Paricio, et al. (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell* **94**(1): 109-118.
- Bovolenta, P., P. Esteve, et al. (2008). "Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease." *J Cell Sci* **121**(Pt 6): 737-746.

- Brabletz, T., A. Jung, et al. (1999). "beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer." *Am J Pathol* **155**(4): 1033-1038.
- Brennan, K., J. M. Gonzalez-Sancho, et al. (2004). "Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins." *Oncogene* **23**(28): 4873-4884.
- Brott, B. K. and S. Y. Sokol (2002). "Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins." *Mol Cell Biol* **22**(17): 6100-6110.
- Brown, S. D., R. C. Twells, et al. (1998). "Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3): 879-888.
- Cabrera, C. V., M. C. Alonso, et al. (1987). "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene." *Cell* **50**(4): 659-663.
- Cadigan, K. M., M. P. Fish, et al. (1998). "Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing." *Cell* **93**(5): 767-777.
- Cao, J., C. Chiarelli, et al. (2008). "Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer." *J Biol Chem* **283**(10): 6232-6240.
- Caricasole, A., A. Copani, et al. (2003). "The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease?" *Trends Pharmacol Sci* **24**(5): 233-238.
- Cavallo, R. A., R. T. Cox, et al. (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." *Nature* **395**(6702): 604-608.
- Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* **263**(5148): 802-805.
- Chan, S. D., D. B. Karpf, et al. (1992). "Two homologs of the Drosophila polarity gene frizzled (fz) are widely expressed in mammalian tissues." *J Biol Chem* **267**(35): 25202-25207.
- Chen, M. H., Y. J. Li, et al. (2004). "Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates." *Genes Dev* **18**(6): 641-659.
- Chen, X., J. Yang, et al. (2008). "Wnt signaling: the good and the bad." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**(7): 577-594.
- Chong, J. M., A. Uren, et al. (2002). "Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules." *J Biol Chem* **277**(7): 5134-5144.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* **127**(3): 469-480.
- Cliffe, A., F. Hamada, et al. (2003). "A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling." *Curr Biol* **13**(11): 960-966.
- Colosimo, A., K. K. Goncz, et al. (2000). *Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells.*
- Cong, F., L. Schweizer, et al. (2004). "Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP." *Development* **131**(20): 5103-5115.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* **173**(1 Spec No): 33-38.
- D'Orazio, D., P. Y. Muller, et al. (2002). "Overexpression of Wnt target genes in adenomas of familial adenomatous polyposis patients." *Anticancer Res* **22**(6A): 3409-3414.
- Dajani, R., E. Fraser, et al. (2003). "Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex." *EMBO J* **22**(3): 494-501.
- Daniels, D. L. and W. I. Weis (2005). "Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation." *Nat Struct Mol Biol* **12**(4): 364-371.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, et al. (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." *Nature* **412**(6842): 86-90.
- Davidson, G., W. Wu, et al. (2005). "Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction." *Nature* **438**(7069): 867-872.
- DeAlmeida, V. I., L. Miao, et al. (2007). "The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo." *Cancer Res* **67**(11): 5371-5379.

- Dejmek, J., A. Dejmek, et al. (2005). "Wnt-5a protein expression in primary duodenal colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis." *Cancer Res* **65**(20): 9142-9146.
- Dejmek, J., A. Safholm, et al. (2006). "Wnt-5a/Ca²⁺-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells." *Mol Cell Biol* **26**(16): 6024-6036.
- Doi, T., Y. Maniwa, et al. (2011). "MT1-MMP plays an important role in an invasive activity of malignant pleural mesothelioma cell." *Exp Mol Pathol* **90**(1): 91-96.
- Dong, Y., W. Lathrop, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of LR3, a novel LDL receptor family protein with mitogenic activity." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3): 784-790.
- Duma, D., C. M. Jewell, et al. (2006). "Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification." *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**(1-5): 11-21.
- Duval, A., J. Gayet, et al. (1999). "Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability." *Cancer Res* **59**(17): 4213-4215.
- Duval, A., S. Rolland, et al. (2000). "The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines." *Cancer Res* **60**(14): 3872-3879.
- Eastman, Q. and R. Grosschedl (1999). "Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals." *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 233-240.
- Egger-Adam, D. and V. L. Katanaev (2010). "The trimeric G protein Go inflicts a double impact on axin in the Wnt/frizzled signaling pathway." *Dev Dyn* **239**(1): 168-183.
- Eklof Spink, K., S. G. Fridman, et al. (2001). "Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex." *EMBO J* **20**(22): 6203-6212.
- Engemaier, E., H. Rompler, et al. (2006). "Genomic and supragenomic structure of the nucleotide-like G-protein-coupled receptor GPR34." *Genomics* **87**(2): 254-264.
- Fagotto, F., U. Gluck, et al. (1998). "Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin." *Curr Biol* **8**(4): 181-190.
- Fahnert, B., J. Veijola, et al. (2004). "Murine Wnt-1 with an internal c-myc tag recombinantly produced in Escherichia coli can induce intracellular signaling of the canonical Wnt pathway in eukaryotic cells." *J Biol Chem* **279**(46): 47520-47527.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7413-7417.
- Fernandez, F. R., E. Morales, et al. (2003). "Inactivation of Kv3.3 potassium channels in heterologous expression systems." *J Biol Chem* **278**(42): 40890-40898.
- Finch, P. W., X. He, et al. (1997). "Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6770-6775.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* **57**(2): 279-288.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-1272.
- Fujino, T., H. Asaba, et al. (2003). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 229-234.
- Galli, L. M., T. L. Barnes, et al. (2007). "Porcupine-mediated lipid-modification regulates the activity and distribution of Wnt proteins in the chick neural tube." *Development* **134**(18): 3339-3348.
- Gao, C. and Y. G. Chen (2010). "Dishevelled: The hub of Wnt signaling." *Cell Signal* **22**(5): 717-727.
- George, S. T., A. E. Ruoho, et al. (1986). "N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors." *J Biol Chem* **261**(35): 16559-16564.
- Giese, K., J. Cox, et al. (1992). "The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures." *Cell* **69**(1): 185-195.

- Goldman, P. S., V. K. Tran, et al. (1997). "The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation." *Recent Prog Horm Res* **52**: 103-119; discussion 119-120.
- Graham, T. A., C. Weaver, et al. (2000). "Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex." *Cell* **103**(6): 885-896.
- Ha, N. C., T. Tonzuka, et al. (2004). "Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation." *Mol Cell* **15**(4): 511-521.
- Haas, J., E. C. Park, et al. (1996). "Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein." *Curr Biol* **6**(3): 315-324.
- Han, C., D. Yan, et al. (2005). "Drosophila glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc." *Development* **132**(4): 667-679.
- He, T. C., A. B. Sparks, et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* **281**(5382): 1509-1512.
- He, X., M. Semenov, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." *Development* **131**(8): 1663-1677.
- Hecht, A., K. Vleminckx, et al. (2000). "The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates." *EMBO J* **19**(8): 1839-1850.
- Hey, P. J., R. C. Twells, et al. (1998). "Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family." *Gene* **216**(1): 103-111.
- Hikasa, H., M. Shibata, et al. (2002). "The Xenopus receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling." *Development* **129**(22): 5227-5239.
- Hoelters, J. (2009). "Zielgerichtete genetische Modifikation humaner mesenchymaler Stammzellen mittels liposomaler Transfektion nicht-viraler Vektoren." *Dissertationsschrift an der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.*
- Hoffman, J., F. Kuhnert, et al. (2004). "Wnts as essential growth factors for the adult small intestine and colon." *Cell Cycle* **3**(5): 554-557.
- Hofmann, K. (2000). "A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling." *Trends Biochem Sci* **25**(3): 111-112.
- Hollien, J. (2001). "Picture story. Frizzled proteins pair up." *Nat Struct Biol* **8**(8): 661.
- Holmen, S. L., A. Salic, et al. (2002). "A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate beta-catenin-dependent signaling." *J Biol Chem* **277**(38): 34727-34735.
- Hovanes, K., T. W. Li, et al. (2000). "The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing." *Nucleic Acids Res* **28**(9): 1994-2003.
- Hsieh, J. C., L. Kodjabachian, et al. (1999). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." *Nature* **398**(6726): 431-436.
- Hsieh, J. C., A. Rattner, et al. (1999). "Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3546-3551.
- Huang, C. L., D. Liu, et al. (2005). "Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **23**(34): 8765-8773.
- Huang, H. and X. He (2008). "Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights." *Curr Opin Cell Biol* **20**(2): 119-125.
- Huang, J., Y. L. Zhang, et al. (2007). "Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma." *BMC Cancer* **7**: 126.
- Huber, A. H., W. J. Nelson, et al. (1997). "Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin." *Cell* **90**(5): 871-882.
- Hwang, H. J., H. J. Park, et al. (2006). "Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells." *J Nutr Biochem* **17**(5): 356-362.

- Ishitani, T., S. Kishida, et al. (2003). "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**(1): 131-139.
- Itasaki, N., C. M. Jones, et al. (2003). "Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling." Development **130**(18): 4295-4305.
- Itoh, Y. and M. Seiki (2006). "MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment." J Cell Physiol **206**(1): 1-8.
- Itoh, Y., A. Takamura, et al. (2001). "Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion." EMBO J **20**(17): 4782-4793.
- Kadowaki, T., E. Wilder, et al. (1996). "The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing." Genes Dev **10**(24): 3116-3128.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.
- Karow, M. (2008). "Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Analyse einzelner Signalkomponenten und derer funktionellen Bedeutung bei Proliferation und Invasion." Dissertationsschrift an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Katanaev, V. L., R. Ponzelli, et al. (2005). "Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila." Cell **120**(1): 111-122.
- Kato, M., M. S. Patel, et al. (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." J Cell Biol **157**(2): 303-314.
- Katoh, M. (2007). "WNT signaling pathway and stem cell signaling network." Clin Cancer Res **13**(14): 4042-4045.
- Kay, B. K. and J. W. Kehoe (2004). "PDZ domains and their ligands." Chem Biol **11**(4): 423-425.
- Kelly, O. G., K. I. Pinson, et al. (2004). "The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice." Development **131**(12): 2803-2815.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto, et al. (2007). "Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors." Cell Signal **19**(4): 659-671.
- Kim, D. H., Y. Inagaki, et al. (1998). "A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E." J Biochem **124**(6): 1072-1076.
- Kim, M., H. C. Lee, et al. (2008). "Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells." J Hepatol **48**(5): 780-791.
- Kimelman, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." Oncogene **25**(57): 7482-7491.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, et al. (1991). "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21." Science **253**(5020): 661-665.
- Kirikoshi, H., J. Koike, et al. (2000). "Molecular cloning and genomic structure of human frizzled-3 at chromosome 8p21." Biochem Biophys Res Commun **271**(1): 8-14.
- Kirikoshi, H., N. Sagara, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of human Frizzled-4 on chromosome 11q14-q21." Biochem Biophys Res Commun **264**(3): 955-961.
- Knauper, V., H. Will, et al. (1996). "Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme." J Biol Chem **271**(29): 17124-17131.
- Koike, J., A. Takagi, et al. (1999). "Molecular cloning of Frizzled-10, a novel member of the Frizzled gene family." Biochem Biophys Res Commun **262**(1): 39-43.
- Kolben, T. (2010). "Wnt/ β -Catenin-Signalling an der Oberfläche von humanen mesenchymalen Stammzellen: Expression und Regulation der Frizzled-Rezeptoren." Dissertationsschrift an der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Komekado, H., H. Yamamoto, et al. (2007). "Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a." *Genes Cells* **12**(4): 521-534.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1998). "Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1248-1256.
- Korkut, C., B. Ataman, et al. (2009). "Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless." *Cell* **139**(2): 393-404.
- Kozak, M. (1999). "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* **234**(2): 187-208.
- Krupnik, V. E., J. D. Sharp, et al. (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." *Gene* **238**(2): 301-313.
- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, et al. (2000). "The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." *Trends Genet* **16**(7): 279-283.
- Kurayoshi, M., H. Yamamoto, et al. (2007). "Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling." *Biochem J* **402**(3): 515-523.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lee, E., A. Salic, et al. (2003). "The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway." *PLoS Biol* **1**(1): E10.
- Li, Y., B. Welm, et al. (2003). "Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15853-15858.
- Liepinsh, E., L. Banyai, et al. (2006). "NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1." *J Mol Biol* **357**(3): 942-950.
- Lin, K., S. Wang, et al. (1997). "The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11196-11200.
- Liu, C., Y. Li, et al. (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." *Cell* **108**(6): 837-847.
- Liu, G., A. Bafico, et al. (2003). "A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5825-5835.
- Liu, J., J. Stevens, et al. (2001). "Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein." *Mol Cell* **7**(5): 927-936.
- Liu, J., Y. Xing, et al. (2006). "The third 20 amino acid repeat is the tightest binding site of APC for beta-catenin." *J Mol Biol* **360**(1): 133-144.
- Liu, P., J. Yang, et al. (2010). "Regulation of MT1-MMP activity by beta-catenin in MDCK non-cancer and HT1080 cancer cells." *J Cell Physiol* **225**(3): 810-821.
- Liu, T., A. J. DeCostanzo, et al. (2001). "G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway." *Science* **292**(5522): 1718-1722.
- Liu, X., T. Liu, et al. (1999). "Activation of a frizzled-2/beta-adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via Galphao and Galphat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14383-14388.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.
- Lu, W., V. Yamamoto, et al. (2004). "Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth." *Cell* **119**(1): 97-108.
- Luo, J., J. Chen, et al. (2007). "Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?" *Lab Invest* **87**(2): 97-103.
- Luo, W., A. Peterson, et al. (2007). "Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex." *EMBO J* **26**(6): 1511-1521.
- Magoori, K., M. J. Kang, et al. (2003). "Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E." *J Biol Chem* **278**(13): 11331-11336.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." *Nature* **417**(6889): 664-667.

- Mao, B., W. Wu, et al. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." *Nature* **411**(6835): 321-325.
- Mao, J., J. Wang, et al. (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." *Mol Cell* **7**(4): 801-809.
- Marchenko, G. N., N. D. Marchenko, et al. (2002). "Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin." *Biochem J* **363**(Pt 2): 253-262.
- Mason, J. O., J. Kitajewski, et al. (1992). "Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line." *Mol Biol Cell* **3**(5): 521-533.
- Massague, J. (2004). "G1 cell-cycle control and cancer." *Nature* **432**(7015): 298-306.
- Mathew, D., B. Ataman, et al. (2005). "Wingless signaling at synapses is through cleavage and nuclear import of receptor DFrizzled2." *Science* **310**(5752): 1344-1347.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, et al. (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species." *Nat Biotechnol* **17**(10): 969-973.
- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context." *PLoS Biol* **4**(4): e115.
- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." *Oncogene* **25**(57): 7461-7468.
- Moller, S., J. Vilo, et al. (2001). "Prediction of the coupling specificity of G protein coupled receptors to their G proteins." *Bioinformatics* **17 Suppl 1**: S174-181.
- Moon, R. T., R. M. Campbell, et al. (1993). "Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*." *Development* **119**(1): 97-111.
- Morris, A. J. and C. C. Malbon (1999). "Physiological regulation of G protein-linked signaling." *Physiol Rev* **79**(4): 1373-1430.
- Moxham, C. P. and C. C. Malbon (1985). "Fat cell beta 1-adrenergic receptor: structural evidence for existence of disulfide bridges essential for ligand binding." *Biochemistry* **24**(22): 6072-6077.
- Nam, J. S., T. J. Turcotte, et al. (2006). "Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression." *J Biol Chem* **281**(19): 13247-13257.
- Neth, P., M. Ciccarella, et al. (2006). "Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **24**(8): 1892-1903.
- Neth, P., C. Ries, et al. (2007). "The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion." *Stem Cell Rev* **3**(1): 18-29.
- Neumann, C. J. and S. M. Cohen (1997). "Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing." *Development* **124**(4): 871-880.
- Nusse, R. (2008). "Wnt signaling and stem cell control." *Cell Res* **18**(5): 523-527.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." *Cell* **31**(1): 99-109.
- Oishi, I., S. Takeuchi, et al. (1999). "Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system." *Genes Cells* **4**(1): 41-56.
- Okoye, U. C., C. C. Malbon, et al. (2008). "Wnt and Frizzled RNA expression in human mesenchymal and embryonic (H7) stem cells." *J Mol Signal* **3**: 16.
- Panakova, D., H. Sprong, et al. (2005). "Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling." *Nature* **435**(7038): 58-65.
- Patthy, L. (2000). "The WIF module." *Trends Biochem Sci* **25**(1): 12-13.
- Pinson, K. I., J. Brennan, et al. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." *Nature* **407**(6803): 535-538.
- Port, F. and K. Basler (2010). "Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading." *Traffic* **11**(10): 1265-1271.

- Port, F., M. Kuster, et al. (2008). "Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless." *Nat Cell Biol* **10**(2): 178-185.
- Povelones, M. and R. Nusse (2005). "The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling." *EMBO J* **24**(19): 3493-3503.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, et al. (1992). "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein." *Gene* **111**(2): 229-233.
- Price, M. A. (2006). "CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling." *Genes Dev* **20**(4): 399-410.
- Reichsman, F., L. Smith, et al. (1996). "Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction." *J Cell Biol* **135**(3): 819-827.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* **50**(4): 649-657.
- Rimerman, R. A., A. Gellert-Randleman, et al. (2000). "Wnt1 and MEK1 cooperate to promote cyclin D1 accumulation and cellular transformation." *J Biol Chem* **275**(19): 14736-14742.
- Robitaille, J., M. L. MacDonald, et al. (2002). "Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy." *Nat Genet* **32**(2): 326-330.
- Rocheleau, C. E., W. D. Downs, et al. (1997). "Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos." *Cell* **90**(4): 707-716.
- Rubinfeld, B., B. Souza, et al. (1993). "Association of the APC gene product with beta-catenin." *Science* **262**(5140): 1731-1734.
- Sagara, N., G. Toda, et al. (1998). "Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7." *Biochem Biophys Res Commun* **252**(1): 117-122.
- Saitoh, T., M. Hirai, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of human Frizzled-5 gene on chromosome 2q33.3-q34 region." *Int J Oncol* **19**(1): 105-110.
- Saitoh, T., M. Hirai, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of human Frizzled-8 gene on chromosome 10p11.2." *Int J Oncol* **18**(5): 991-996.
- Saitoh, T., T. Mine, et al. (2002). "Expression and regulation of WNT8A and WNT8B mRNAs in human tumor cell lines: up-regulation of WNT8B mRNA by beta-estradiol in MCF-7 cells, and down-regulation of WNT8A and WNT8B mRNAs by retinoic acid in NT2 cells." *Int J Oncol* **20**(5): 999-1003.
- Saitoh, T., T. Mine, et al. (2002). "Up-regulation of WNT8B mRNA in human gastric cancer." *Int J Oncol* **20**(2): 343-348.
- Samalecos, A. and B. Gellersen (2008). "Systematic expression analysis and antibody screening do not support the existence of naturally occurring progesterone receptor (PR)-C, PR-M, or other truncated PR isoforms." *Endocrinology* **149**(11): 5872-5887.
- Sansom, O. J., K. R. Reed, et al. (2005). "Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine." *J Biol Chem* **280**(31): 28463-28467.
- Sato, A., T. Kojima, et al. (1999). "Dfrizzled-3, a new *Drosophila* Wnt receptor, acting as an attenuator of Wingless signaling in wingless hypomorphic mutants." *Development* **126**(20): 4421-4430.
- Satyanarayana, A. and P. Kaldis (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." *Oncogene* **28**(33): 2925-2939.
- Schneikert, J. and J. Behrens (2007). "The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development." *Gut* **56**(3): 417-425.
- Schwarz-Romond, T., M. Fiedler, et al. (2007). "The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization." *Nat Struct Mol Biol* **14**(6): 484-492.
- Semenov, M. V. and M. Snyder (1997). "Human dishevelled genes constitute a DHR-containing multigene family." *Genomics* **42**(2): 302-310.
- Sherr, C. J. (1996). "Cancer cell cycles." *Science* **274**(5293): 1672-1677.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*." *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.

- Shtutman, M., J. Zhurinsky, et al. (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5522-5527.
- Simon, M., V. L. Grandage, et al. (2005). "Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia." *Oncogene* **24**(14): 2410-2420.
- Simons, M., W. J. Gault, et al. (2009). "Electrochemical cues regulate assembly of the Frizzled/Dishevelled complex at the plasma membrane during planar epithelial polarization." *Nat Cell Biol* **11**(3): 286-294.
- Smolich, B. D., J. A. McMahon, et al. (1993). "Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface." *Mol Biol Cell* **4**(12): 1267-1275.
- Sodek, K. L., M. J. Ringuette, et al. (2007). "MT1-MMP is the critical determinant of matrix degradation and invasion by ovarian cancer cells." *Br J Cancer* **97**(3): 358-367.
- Song, K. Y., H. S. Choi, et al. (2009). "Differential use of an in-frame translation initiation codon regulates human mu opioid receptor (OPRM1)." *Cell Mol Life Sci* **66**(17): 2933-2942.
- Spink, K. E., P. Polakis, et al. (2000). "Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction." *EMBO J* **19**(10): 2270-2279.
- Staudacher, K., I. Baldea, et al. (2011). "Alternative splicing determines mRNA translation initiation and function of human K(2P)10.1 K⁺ channels." *J Physiol* **589**(Pt 15): 3709-3720.
- Strongin, A. Y. (2010). "Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy." *Biochim Biophys Acta* **1803**(1): 133-141.
- Su, Y., C. Fu, et al. (2008). "APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase." *Mol Cell* **32**(5): 652-661.
- Taipale, J. and P. A. Beachy (2001). "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer." *Nature* **411**(6835): 349-354.
- Takada, R., Y. Satomi, et al. (2006). "Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion." *Dev Cell* **11**(6): 791-801.
- Takahashi-Yanaga, F. and M. Kahn (2010). "Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells?" *Clin Cancer Res* **16**(12): 3153-3162.
- Takahashi, M., T. Tsunoda, et al. (2002). "Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers." *Oncogene* **21**(38): 5861-5867.
- Takei, Y., Y. Ozawa, et al. (2004). "Three Drosophila EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans." *Development* **131**(1): 73-82.
- Tam, E. M., C. J. Morrison, et al. (2004). "Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(18): 6917-6922.
- Tamai, K., M. Semenov, et al. (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." *Nature* **407**(6803): 530-535.
- Tamai, K., X. Zeng, et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." *Mol Cell* **13**(1): 149-156.
- Tanaka, K., Y. Kitagawa, et al. (2002). "Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **277**(15): 12816-12823.
- Tao, Q., C. Yokota, et al. (2005). "Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos." *Cell* **120**(6): 857-871.
- Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." *Nature* **398**(6726): 422-426.
- Thorpe, C. J., A. Schlesinger, et al. (1997). "Wnt signaling polarizes an early C. elegans blastomere to distinguish endoderm from mesoderm." *Cell* **90**(4): 695-705.
- To, K. F., M. W. Chan, et al. (2001). "Alterations of frizzled (FzE3) and secreted frizzled related protein (hsFRP) expression in gastric cancer." *Life Sci* **70**(4): 483-489.
- Tokuhara, M., M. Hirai, et al. (1998). "Molecular cloning of human Frizzled-6." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(2): 622-627.

- Touriol, C., S. Bornes, et al. (2003). "Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons." *Biol Cell* **95**(3-4): 169-178.
- Turashvili, G., J. Bouchal, et al. (2006). "Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis." *Pathobiology* **73**(5): 213-223.
- Umbhauer, M., A. Djiane, et al. (2000). "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling." *EMBO J* **19**(18): 4944-4954.
- Unterseher, F., J. A. Hefele, et al. (2004). "Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK." *EMBO J* **23**(16): 3259-3269.
- Uren, A., F. Reichsman, et al. (2000). "Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling." *J Biol Chem* **275**(6): 4374-4382.
- van Beest, M., D. Dooijes, et al. (2000). "Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs." *J Biol Chem* **275**(35): 27266-27273.
- Van de Wetering, M., J. Castrop, et al. (1996). "Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties." *Mol Cell Biol* **16**(3): 745-752.
- van de Wetering, M., E. Sancho, et al. (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." *Cell* **111**(2): 241-250.
- van den Heuvel, M., C. Harryman-Samos, et al. (1993). "Mutations in the segment polarity genes wingless and porcupine impair secretion of the wingless protein." *EMBO J* **12**(13): 5293-5302.
- Veeman, M. T., J. D. Axelrod, et al. (2003). "A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling." *Dev Cell* **5**(3): 367-377.
- Velasco-Velazquez, M. A., Z. Li, et al. (2011). "Examining the role of cyclin D1 in breast cancer." *Future Oncol* **7**(6): 753-765.
- Verkaar, F. and G. J. Zaman (2011). "New avenues to target Wnt/beta-catenin signaling." *Drug Discov Today* **16**(1-2): 35-41.
- Vinson, C. R. and P. N. Adler (1987). "Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of Drosophila." *Nature* **329**(6139): 549-551.
- Vlad, A., S. Rohrs, et al. (2008). "The first five years of the Wnt targetome." *Cell Signal* **20**(5): 795-802.
- Voronkov, A. E., Baskin, II, et al. (2007). "Molecular modeling of the complex between the xWNT8 protein and the CRD domain of the mFZD8 receptor." *Dokl Biochem Biophys* **412**: 8-11.
- Wang, H. Q., M. L. Xu, et al. (2011). "Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer." *Biochem Biophys Res Commun*.
- Wang, H. Y., T. Liu, et al. (2006). "Structure-function analysis of Frizzleds." *Cell Signal* **18**(7): 934-941.
- Wang, Y. K., C. H. Samos, et al. (1997). "A novel human homologue of the Drosophila frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23." *Hum Mol Genet* **6**(3): 465-472.
- Weeraratna, A. T., Y. Jiang, et al. (2002). "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma." *Cancer Cell* **1**(3): 279-288.
- Wehrli, M., S. T. Dougan, et al. (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." *Nature* **407**(6803): 527-530.
- Wei, W., M. S. Chua, et al. (2011). "Soluble Frizzled-7 receptor inhibits Wnt signaling and sensitizes hepatocellular carcinoma cells towards doxorubicin." *Mol Cancer* **10**: 16.
- Wharton, K. A., Jr. (2003). "Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction." *Dev Biol* **253**(1): 1-17.
- Willert, J., M. Epping, et al. (2002). "A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells." *BMC Dev Biol* **2**: 8.
- Willert, K., J. D. Brown, et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." *Nature* **423**(6938): 448-452.
- Wong, G. T., B. J. Gavin, et al. (1994). "Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes." *Mol Cell Biol* **14**(9): 6278-6286.
- Wong, H. C., A. Bourdelas, et al. (2003). "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled." *Mol Cell* **12**(5): 1251-1260.

- Wu, B., S. P. Crampton, et al. (2007). "Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration." *Immunity* **26**(2): 227-239.
- Wu, G., G. Xu, et al. (2003). "Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase." *Mol Cell* **11**(6): 1445-1456.
- Wu, W., A. Glinka, et al. (2000). "Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling." *Curr Biol* **10**(24): 1611-1614.
- Wu, X., X. Tu, et al. (2008). "Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling." *Cell* **133**(2): 340-353.
- Xing, Y., W. K. Clements, et al. (2003). "Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex." *Genes Dev* **17**(22): 2753-2764.
- Xing, Y., W. K. Clements, et al. (2004). "Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function." *Mol Cell* **15**(4): 523-533.
- Xu, Y. K. and R. Nusse (1998). "The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases." *Curr Biol* **8**(12): R405-406.
- Yang-Snyder, J., J. R. Miller, et al. (1996). "A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway." *Curr Biol* **6**(10): 1302-1306.
- Yost, C., M. Torres, et al. (1996). "The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3." *Genes Dev* **10**(12): 1443-1454.
- Yuzugullu, H., K. Benhaj, et al. (2009). "Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells." *Mol Cancer* **8**: 90.
- Zabner, J., A. J. Fasbender, et al. (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." *J Biol Chem* **270**(32): 18997-19007.
- Zecca, M., K. Basler, et al. (1996). "Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient." *Cell* **87**(5): 833-844.
- Zeng, L., F. Fagotto, et al. (1997). "The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation." *Cell* **90**(1): 181-192.
- Zeng, X., K. Tamai, et al. (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." *Nature* **438**(7069): 873-877.
- Zhang, D. and P. Brodt (2003). "Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling." *Oncogene* **22**(7): 974-982.
- Zhu, W., I. Shiojima, et al. (2008). "IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis." *Nature* **454**(7202): 345-349.
- Zi, X., Y. Guo, et al. (2005). "Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness." *Cancer Res* **65**(21): 9762-9770.

I Danksagung

Ich möchte mich bei Fr. Prof. Dr. Jochum bedanken, welche mir die Möglichkeit gab, in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie promovieren zu dürfen. In diversen Seminaren, der Winter School und anderen Besprechungen lieferte sie wertvolle Anregungen für diese Arbeit.

Einen besonderen Dank möchte ich Hr. PD Dr. Peter Neth aussprechen. Eine bessere Betreuung einer Doktorarbeit ist nur schwer vorstellbar. Er war bei Fragen und Ideen immer sofort zur Stelle und ermöglicht es seinen Doktoranden, einen umfassenden Einblick in die Forschung zu gewinnen und stand auch eigenen Ideen immer offen gegenüber. Seine Begeisterung an der Forschung und die Gabe, Doktoranden zu motivieren und Wissen zu vermitteln, erleichterten die Arbeit oftmals ungemein.

Ich danke meinen Mitdoktoranden Iris Peröbner, Simon Capovilla, Ulli Leitenstern und Raphael Metzler, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen und das Arbeiten im Labor sehr schön und angenehm machten.

Insbesondere danke ich meinem MolMed-Kollegen Wenzel Schicho für eine wirklich tolle Zusammenarbeit und viele lustige Stunden im Labor.

Claudia Geißler und Lourdes Ruiz-Heinrich möchte ich für die kompetente Einarbeitung und Unterstützung sowohl in der Zell- als auch der Molekularbiologie danken.

Dr. Virginia Egea Alonso, Dr. Tanja Popp, Christian Mahl und Thomas Pitsch danke ich für die bereitwillige Hilfe bei fachlichen Fragen, die lustige „Labornachbarschaft“ die immer vorherrschende gute Laune.

Auch allen anderen Mitgliedern der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie möchte ich für wichtige Ratschläge und Unterstützungen bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Heinz und Christina und Geschwistern Axel, Veronika und Johanna, die mich während des gesamten Studiums immer unterstützten und mich ermunterten, wenn es in der Doktorarbeit „nicht so recht weiterging“. Ohne sie wären sowohl das Medizinstudium als auch diese Arbeit unmöglich gewesen.