

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE  
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg in  
humanen mesenchymalen Stammzellen:  
Identifizierung und Charakterisierung  
beteiligter Fzd-Rezeptoren und Wnt-Liganden**

Simon Johannes Capovilla (geb. Geimer)

aus  
Ludwigshafen am Rhein

2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn **PD Dr. Peter Neth** von der Medizinischen Fakultät betreut und wird von Frau **Prof. Dr. Angelika Vollmar** von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 15.07.2013

.....  
(Unterschrift des Autors / der Autorin)

Dissertation eingereicht am: 16.07.2013

1. Gutachterin: Prof. Dr. Angelika Vollmar

2. Gutachterin: PD Dr. Peter Neth

Mündliche Prüfung am: 24.10.2013

*„Ihrer wahren Wesensbestimmung nach ist die Wissenschaft  
das Studium der Schönheit der Welt.“*

*Simone Weil*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>V</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Stammzellen</b>	<b>3</b>
1.1.1 Embryonale Stammzellen	3
1.1.2 Adulte Stammzellen	4
1.1.3 Humane mesenchymale Stammzellen und die Stammzellnische	5
1.1.4 Stammzelltherapien	7
<b>1.2 Die Wnt-Signalwege</b>	<b>8</b>
1.2.1 Liganden der Wnt-Signalwege	9
1.2.2 Sekretierte Inhibitoren der Wnt-Signalwege	11
1.2.3 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege	12
1.2.4 Der Wnt/β-Catenin-Signalweg	12
1.2.5 Rezeption eines Wnt-Signals	13
1.2.5.1 Die Frizzled-Rezeptoren	13
1.2.5.2 Die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6	15
1.2.6 Signalweiterleitung im Cytosol und Nukleus	16
1.2.7 Zielgene des Wnt/β-Catenin-Signalweges	18
1.2.8 Die Rolle des Wnt/β-Catenin-Signalweges in hMSC	18
<b>2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>21</b>
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	22
3.1.2.1 Chemikalien und Materialien für mikrobiologische Techniken	22

3.1.2.2	Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken	23
3.1.2.3	Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken	34
3.1.2.4	Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken	36
3.1.3	Bioinformatische Hilfsmittel	37
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>37</b>
3.2.1	Mikrobiologische Methoden	37
3.2.1.1	Anzucht und Selektion von <i>E. coli</i> Stämmen	37
3.2.1.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
3.2.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	39
3.2.2.1	Plasmidisolierung und Aufreinigung aus <i>E. coli</i>	39
3.2.2.2	Isopropanolfällung von Nukleinsäuren	39
3.2.2.3	Restriktion von DNA-Fragmenten	39
3.2.2.4	Hybridisierung von Oligonukleotiden	40
3.2.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.2.2.6	TOPO-TA-Klonierung	40
3.2.2.7	Klenow-Enzym-vermittelte Auffüllreaktion	41
3.2.2.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	41
3.2.2.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	42
3.2.2.10	Auftrennung von DNA mittels Agarosegelektrophorese	43
3.2.2.11	Extraktion von DNA aus dem Agarosegel	43
3.2.2.12	DNA-Sequenzierung	43
3.2.2.13	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen	44
3.2.2.14	Photometrische Quantifizierung der DNA und RNA	44
3.2.2.15	cDNA-Synthese	44
3.2.2.16	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	45
3.2.3	Zellbiologische Methoden	48
3.2.3.1	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	48
3.2.3.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen	48
3.2.3.3	Splitten konfluenter Zellen	49
3.2.3.4	Bestimmung der Zellzahl	49
3.2.3.5	Transfektion von Plasmiden und siRNA	49
3.2.3.6	Proliferationsassay	50

3.2.3.7 Apoptose-Assay	50
3.2.4 Proteinbiochemische Methoden	51
3.2.4.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen	51
3.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	52
3.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.2.4.4 Western Blot-Transfer der Proteine	52
3.2.4.5 Immunodetektion von Proteinen	53
3.2.4.6 Messung der Gaussia-Luciferase-Aktivität in Zellkulturüberständen	54
3.2.5 Datenanalyse	54
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Evaluierung von Wnt-Signalwegkomponenten in hMSC, HT1080 und HEK293</b>	<b>55</b>
4.1.1 Wnt-Expression in hMSC	55
4.1.2 Wnt-Expression in HT1080	56
4.1.3 Wnt-Expression in HEK293	56
4.1.4 Expressionsanalyse der Wnt-Inhibitoren sFRP1 und WIF1	57
4.1.5 Expressionsprofil der Fzd-Rezeptoren in hMSC	57
<b>4.2 Das TCF/LEF-Reporter-Vektor-System</b>	<b>58</b>
4.2.1 Stabile Transfektion des TCF/LEF-Reporter-Vektor-Systems	58
4.2.2 Evaluierung der TCF/LEF-Reporter-hMSC	59
4.2.2.1 Stimulation mit LiCl	59
4.2.2.2 siRNA-induzierter Knockdown von APC sowie $\beta$ -Catenin	60
4.2.2.3 Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die TCF/LEF-Reporter-hMSC	61
<b>4.3 SiRNA-vermittelter Knockdown von Fzd-Rezeptoren</b>	<b>64</b>
<b>4.4 Ektopische Expression kanonischer Fzds und Wnts</b>	<b>65</b>
4.4.1 Klonierung von Fzd1 und Fzd5 in den Überexpressions-vektor pN3	65
4.4.2 Klonierung von Fzd5 in den Überexpressionsvektor pN3-attB	68
4.4.3 Entwicklung des modularen Klonierungssystems pN3-SoiToiGoi	70
4.4.4 Klonierung von Fzd1, 3, 5, 6 und 7 in den pN3-SoiToiGoi-Vektor	71
4.4.5 Klonierung von Wnt3 und Wnt3a in den pN3-SoiToiGoi-Vektor	76
4.4.6 Nachweis der Überexpression von Fzds sowie Wnts auf mRNA- und Protein-Ebene	79
4.4.7 Ektopische Expression von Fzds in TCF/LEF-Reporter-hMSC	83
4.4.8 Ektopische Expression von Wnts in TCF/LEF-Reporter-hMSC	84

<b>4.5 Knockdown von Fzd5: Einfluss auf Proliferation und Apoptose</b>	<b>85</b>
4.5.1 Wnt-Zielgen Cyclin D1	85
4.5.2 Proliferation	86
4.5.3 Apoptose und Nekrose	87
<b>4.6 Transiente und stabile Überexpression von Fzd5</b>	<b>88</b>
4.6.1 Transiente Überexpression von Fzd5: Effekt auf Cyclin D1-Expression und Proliferation	88
4.6.2 Stabile Überexpression von Fzd5: Effekt auf Cyclin D1-Expression	89
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>91</b>
5.1 Das Wnt-Expressionsprofil in hMSC, HT1080 und HEK293	92
5.2 Die Expression der Inhibitoren sFRP1 und WIF1 in hMSC, HT1080 und HEK293	94
5.3 Das Fzd-Expressionsprofil in hMSC	95
5.4 Evaluierung des TCF/LEF-Reporter-Vektor-Systems in hMSC	96
5.4.1 Stimulation der Wnt/β-Catenin-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-hMSC	97
5.4.2 Inhibition der Wnt/β-Catenin-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-hMSC	98
5.4.3 Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die Reporterprotein-Aktivität	98
5.5 Einfluss der Fzd-Expression auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg	100
5.5.1 Auswirkung des Knockdown von Frizzled-Rezeptoren auf die Wnt/β-Catenin-Aktivität	100
5.6 Ektopische Expression kanonischer Fzds und Wnts	101
5.6.1 Das modulare Klonierungssystem pN3-Soi-Toi-Goi	102
5.6.2 Nachweis der Überexpression auf mRNA- und Protein-Ebene	103
5.6.3 Ektopische Expression der Fzds in TCF/LEF-Reporter-hMSC	104
5.6.4 Ektopische Expression von Wnt3 und Wnt3a in TCF/LEF-Reporter-hMSC	105
5.7 Knockdown von Fzd5: Einfluss auf Proliferation und Wnt-Zielgene	106
5.8 Überexpression von Fzd5: Effekt auf Proliferation und Wnt-Zielgene	108
<b>6 RESÜMEE UND AUSBLICK</b>	<b>109</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>125</b>

# ABKÜRZUNGEN

## Bezeichnungen und Komponenten des Wnt-Signalweges

---

APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BCL9	B-Zelllymphom 9
$\beta$ -TrCP	$\beta$ -transducin repeat-containing protein
CK	casein kinase
CRD	cysteine rich domain
CtBP	C-terminal binding protein
Dkk	dickkopf
Dvl	dishevelled
Fzd	frizzled
GSK-3 $\beta$	glycogen synthase kinase-3 $\beta$
Int-1	mouse mammary tumor virus integration site
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
Lgs	legless
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
PCP	planar cell polarity
PDZ	postsynaptic density-95/ disc-large/ zonula occludens-1
Pygo	Pygopus
Ror	orphan tyrosine kinase
sFRP	secreted frizzled-related protein
TCF	T-cell factor
Wg	wingless
WIF-1	wnt-inhibitory factor-1
Wnt	wingless-type MMTV integration site family member

## Chemikalien und Proteine

---

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
Brg1	brahma-related gene 1
CamK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
CBP	CREB binding protein
cDNA	complementary DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CIP	calf intestinal phosphatase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein

FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>
HA	Hämaggglutinin
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Kan	Kanamycin
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nc-siRNA	<i>negativ control-siRNA</i>
Neo	Neomycin
NP-40	Nonidet P-40
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
RNase	Ribonuklease
SSEA	<i>stage-specific embryonic antigen</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline</i> mit Tween-20
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

#### Weitere verwendete Abkürzungen

---

<i>attB</i>	<i>attachment site in the bacterium</i>
<i>attP</i>	<i>attachment site in the phage</i>
CMV	Cytomegalievirus
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
<i>for</i>	<i>forward</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
HMG	<i>high mobility group</i>
ICM	Innere Zellmasse eines Embryos
IVF	<i>In-vitro-Fertilisation</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PID	Präimplantationsdiagnostik
Poly-A	Poly-Adenylierungssignal
qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
SCNT	<i>somatic cell nuclear transfer</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	<i>signal sequence</i>
αMEM	<i>minimal essential medium alpha</i>
7TMR	<i>7 transmembrane receptor</i>

**Zellen**

---

ASC	<i>adult stem cells</i>
CFU-F	<i>colony-forming unit fibroblasts</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EpiSC	<i>epiblast stem cells</i>
ESC	<i>embryonic stem cells</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney cells</i> 293
HSC	<i>hematopoietic stem cells</i>
MAPC	<i>multipotent adult progenitor cells</i>
MIAMIC	<i>marrow-isolated adult multilineage inducible cells</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i>
PGC	<i>progenitor cells</i>
VSEL	<i>very small embryonic-like cells</i>

**Einheiten**

---

AS	Aminosäuren
bp	Basenpaar
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MW	Mittelwert
nt	Nukleotide
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
RLU	<i>relative light unit</i>
SD	<i>standard deviation</i>
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

# ZUSAMMENFASSUNG

Mit der intensiven Erforschung von Stammzellen soll zukünftig die Möglichkeit eröffnet werden durch Manipulation von Stammzellpopulationen das regenerative Potential des Organismus zu verstehen und zu nutzen. Darüber hinaus soll mittels genetisch modifizierter Stammzellpopulationen die Grundlagen dafür geschaffen werden schwere Gen- und Immundefekte zu therapieren. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) versprechen hierbei großes Potential, da sie bereits für systemische Therapieansätze eingesetzt werden.

Allerdings sind die theoretischen Grundlagen der Stammzelleigenschaften der hMSC wie Proliferation, Invasion bzw. Migration und die Differenzierungskapazität nur rudimentär verstanden.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Dr. Marisa Karow und Dr. Thomas Kolben, die eine Beteiligung des Wnt/β-Catenin-Signalweges an der Steuerung dieser Stammzelleigenschaften in ihren Arbeiten nachweisen konnten (Karow 2008; Kolben et al. 2012), sollten in der vorliegenden Arbeit die Rezeption des spezifischen Wnt-Signals und die dabei beteiligten *Frizzled* (Fzd)-Rezeptoren näher untersucht werden.

Da aus den vorigen Arbeiten schon hervorging, dass alle 10 Fzd-Rezeptoren in den hMSC exprimiert werden, sollte über eine qualitative PCR die Expression potentieller Wnt-Liganden sowie der beiden Inhibitoren des Wnt-Weges sFRP1 und WIF1 geprüft werden. Dabei zeigte sich, dass 8 der 19 Wnts sowie der Inhibitor sFRP1 exprimiert werden. Das Wnt-Expressionsmuster der Krebszelllinie HT1080 unterschied sich dagegen nur in der Expression zweier Wnts, was wahrscheinlich auf den mesodermalen Ursprung dieser Krebszelllinie zurückzuführen ist. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine umfangreichere Wnt-Expression in der immortalisierten Zelllinie HEK293, in der 13 der 19 Wnts sowie auch die beiden Inhibitoren sFRP1 und WIF1 nachgewiesen wurden.

Für eine detailliertere Aufschlüsselung der Beteiligung einzelner Fzds an der Rezeption eines Wnt-Signals sowie an der basalen Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges in hMSC wurde ein TCF/LEF-Reporter-Vektorsystem in die hMSC eingebracht. Als Reportergen kam die sekretierte Form einer Luciferase aus dem Tiefsee-Cephalopoden *Gaussia princeps* zum Einsatz. Vorteil dieser Luciferase ist, dass die Sekretion in den Überstand eine Evaluierung der Wnt/β-Catenin-Aktivität über die Zeit hinweg erlaubt, ohne die Zellen zerstören zu müssen. Hierbei wurden transient und stabil-transfizierte TCF/LEF-(*T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*)-Reporter-hMSC generiert und die Zellkulturbedingungen für nachfolgende Experimente optimiert. Die Evaluierung unterschiedlicher Aktivatoren des Wnt/β-Catenin-Signalweges ergab die stärkste Aktivierung nach Knockdown des Tumorsuppressorgens

APC, während ein Knockdown des  $\beta$ -Catenins, dem zentralen Mediator des Wnt-Weges, zu einer signifikanten Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität führte.

Bei Knockdown-Studien mit den verschiedenen Fzds mittels RNA-Interferenz (RNAi) in den TCF/LEF-Reporter-hMSC zeigte sich, dass Fzd5 und Fzd7 an der Weiterleitung eines Wnt-Signals sowohl unter unstimulierten Bedingungen als auch nach Applikation von Wnt3a beteiligt sind. Weiter zeigte nur noch der Knockdown von Fzd1, dass dieser Rezeptor an der Weiterleitung eines Wnt3a-Signals partizipiert.

Um diese Ergebnisse über einen reversen Ansatz in Form einer Überexpression der Fzds zu untersuchen, wurde ein flexibles Klonierungssystem entwickelt, das einen einfachen Austausch von Protein-tags ermöglichen sollte. Nach Bestätigung der Überexpression der Fzds auf mRNA-Ebene und Proteinebene wurde die Wirkung der Überexpression in den TCF/LEF-Reporter-hMSC ohne und mit Wnt3a-Applikation untersucht. Hier zeigte sich, dass neben der Überexpression von Fzd5 auch Fzd3 und Fzd6 eine Erhöhung der Gaussia-Luciferase-Aktivität und damit eine gesteigerte Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges sowohl unter unstimulierten als auch unter stimulierten Bedingungen nach sich zogen.

Bei vergleichender Überexpression von Wnt3 oder Wnt3a konnte gezeigt werden, dass Wnt3 – welches hMSC auch endogen exprimieren – sehr viel stärker den Wnt-Weg aktivieren kann als Wnt3a.

Um die Auswirkung des kanonischen Wnt-Rezeptors Fzd5 auf die Stammzelleigenschaften der hMSC zu prüfen, wurde die Expression des Wnt-Zielgens Cyclin D1 und die Proliferation nach Knockdown sowie transiente Überexpression von Fzd5 quantitativ erfasst. Hierbei zeigte sich nach Knockdown von Fzd5 eine signifikante Abnahme der Proliferation, die auch auf Ebene der Wnt-Zielgene mit einer Abnahme der Cyclin D1-Expression einherging. Umgekehrt konnten stabil Fzd5-transfizierte hMSC-Populationen generiert werden, die eine signifikante Steigerung der Cyclin D1-Expression aufwiesen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die verschiedenen Fzds in unterschiedlichem Maße an der Weiterleitung eines Wnt-Signals beteiligt sind. Besonders scheinen hier Fzd5 und Fzd7 eine wichtige Rolle in hMSC zu spielen, da sie auch an der Vermittlung eines endogenen Wnt-Signals innerhalb der Stammzellpopulation beteiligt sind. Weiter wurde im Fall von Fzd5 auch die maßgebliche Beteiligung dieses Rezeptors am Erhalt der Proliferationskapazität der hMSC-Population nachgewiesen.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Stammzellen

Nach ihrer Herkunft lassen sich embryonale, germinale und somatische (fötale oder adulte) Stammzellen definieren. Gemäß ihrem Vermögen in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, unterscheidet man hierbei zwischen Toti-, Pluri- und Multipotenz (Choumerianou et al. 2008). Totipotenz bezeichnet die Fähigkeit sich in alle Zelltypen eines Organismus zu differenzieren und wird bis dato nur Zellen aus frühen Embryonen, längstens bis zum 8-Zell-Stadium, zugesprochen. Somatische Stammzellen dagegen gelten als multipotent, was ein Differenzierungsvermögen innerhalb des Keimblattes, dem sie entstammen, implementiert (De Miguel et al. 2010).

Eine weitere elementare Stammzelleigenschaft ist die Selbsterneuerung, die über symmetrische Zellteilung auch zur Vergrößerung der Stammzellpopulation führen kann. Bei der asymmetrischen Zellteilung verbleibt eine Tochterzelle als Stammzelle, während die zweite den Differenzierungsweg einschlägt (Morrison und Kimble 2006). Selbsterneuerung und Differenzierung stellen somit die Grundeigenschaften aller Stammzellen dar und werden unter dem Begriff *stemness* zusammengefasst (Snippert und Clevers 2011).

Welche Faktoren *stemness* bestimmen, ist Gegenstand intensiver Forschung. Suchten frühere Studien vor allem nach gemeinsamen intrinsischen Faktoren, wie einem stammzellspezifischen Transkriptom oder Epigenom, scheinen bei neueren Studien die Plastizität von Stammzellen sowie die spezifische Stammzellnische als extrinsischer Faktor maßgeblich mitbestimmend für die *stemness* einer Stammzellpopulation zu sein (Mikkers und Frisen 2005).

### 1.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESC) können nur während dem engen Zeitfenster der Präimplantationsphase aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden. Erstmals gelang es 1981 murine ESC (mESC) zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren (Martin 1981; Evans und Kaufman 1981). Aufgrund der Unterschiede zwischen mESC und humanen ESC (hESC), die grundlegende Veränderungen in den Parametern der Kulturbedingungen notwendig machten, konnten erst 17 Jahre später die ersten hES-Zelllinien generiert werden (Thomson et al. 1998).

Trotz des kurzen Zeitfensters, in dem ESC *in vivo* ihre Funktionen in der Blastozyste erfüllen, ist eine Langzeitkultivierung *in vitro* ohne Verlust ihrer Stammzelleigenschaften möglich (Alvarez et al. 2012). Im Vergleich zu totipotenten Zellen der Morula können pluripotente ESC nicht in Zelltypen der Trophoblastenlinie differenzieren. Im Unterschied zu den multipotenten somatischen Stammzellen sind sie aber in der Lage, alle mehr als 200 Zelltypen der drei Keimblätter zu bilden (Beddington und Robertson 1989). Eine Besonderheit der ESC gegenüber somatischen Stammzellen ist die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog, die der Pluripotenz zugrunde liegen (Loh et al. 2006). Dies gilt auch über Speziesgrenzen hinweg sowie bei unterschiedlichen Isolationsprotokollen und Kulturbedingungen (Mikkelsen und Frisen 2005).

Die Nutzung von humanen ESC ist jedoch mit starken ethischen Bedenken behaftet. Schon die Gewinnung der ESC ist mit der Zerstörung der Blastozyste und damit eines potentiell lebensfähigen Embryos verbunden. Dies kann zumindest partiell umgangen werden indem – statt überzählige Embryonen aus der *In-vitro*-Fertilisation (IVF) – vermehrt nicht lebensfähige Embryonen aus der Präimplantationsdiagnostik (PID) eingesetzt werden (Cornwell 2006). Einer Forschergruppe gelang es 2008, ESC bei Erhalt der Blastomere zu isolieren, so dass auf die Zerstörung des Embryos verzichtet werden kann (Chung et al. 2008).

Eine weitere theoretische Alternative zur Generierung von hESC ist die Verwendung des *somatic cell nuclear transfer* (SCNT). Hierbei wird der Kern einer beliebigen somatischen Zelle in eine Eizelle eingebracht, deren Vorkern entfernt wurde. Sofern die Eizelle zur Implantation gelangt, kann sie zu einem vollständigen Klon des somatischen Zellspenders heranwachsen (Wilmut et al. 1997). Abgesehen von der ethischen Bürde, die aus dem potentiellen Klonen von Menschen erwächst, ist die rechtliche Grundlage von ES-Zelllinien noch unklar. So hat der europäische Gerichtshof eine Patentierung der Methode zur Generierung von hESC nach Thomson et al. (1998) abgelehnt und damit auch die Patentierung einzelner hES-Zelllinien untersagt (Baeyens und Goffin 2012). Nicht zuletzt ist die Generierung der hESC mit einem hohen Ressourcenverbrauch verbunden, wodurch der Nutzen hinterfragt werden muss (Hipp und Atala 2008).

### 1.1.2 Adulte Stammzellen

Mit der Implantation der Blastozyste kommt es zu weitreichenden strukturellen Umbauprozessen. Dabei bildet sich mit dem Epiblasten das primitive Ektoderm, welches die drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm hervorbringt. Diese Prozesse gehen mit Einbußen an Pluripotenz der Epiblasten einher, wie *in-vitro*-Kulturen muriner Epiblasten (EpiSC) zeigten (De Miguel et al. 2010).

Bei der weiteren Entwicklung des Embryos entstehen zahlreiche gewebe- und organspezifische Stammzellpopulationen, die im postnatalen Organismus Stammzellnischen bilden. Diese Stammzellnischen sind essentiell für spezifische Regenerationsprozesse und konnten in fast allen Organen und Geweben nachgewiesen werden. Dabei ist die Zahl der Stammzellen mit etwa 1:10.000 innerhalb des entsprechenden Organs oder Gewebes relativ gering (Health 2004).

Die in den Nischen residierenden adulten Stammzellen (ASC) exprimieren in Übereinstimmung mit ESC, jedoch im Unterschied zu differenzierten Zellen, die Intermediärfilamente E-Cadherin, Vimentin und  $\beta$ -Catenin (Alvarez et al. 2012). Ein spezifisches Transkriptionsmuster teilen die unterschiedlichen ASC-Populationen aus den Stammzellnischen nicht miteinander (Ivanova et al. 2002; Ramalho-Santos et al. 2002). So konnten jedoch aus unterschiedlichen Stammzellnischen Subpopulationen identifiziert werden, welche Pluripotenzmarker wie Oct4, Nanog und SSEA-3/4 exprimierten, wie in der fötalen Retina (Koso et al. 2006) der Leber (Xiong et al. 2008) aber auch im adulten Knochenmark (Jiang et al. 2002), der Zahnpulpa (Kerkis et al. 2006) und in Haarfollikeln (Yu et al. 2006). Die Expression dieser Marker und die pluripotenten Eigenschaften dieser Subpopulationen legen die Vermutung nahe, dass es sich dabei um Epiblasten handelt, die in den adulten Stammzellnischen überdauern (De Miguel et al. 2009).

Da Stammzellnischen während dem Altern persistieren, muss ihre Aktivität streng reguliert werden. Dabei scheinen die Stammzellen in den meisten Nischen durch minimale Proliferationsraten in einem Ruhezustand (*quiescence*) gehalten zu werden (Cheng et al. 2000). Der Ruhezustand kann entweder durch interne oder externe Reize unterbrochen bzw. wieder hergestellt werden (Hsu et al. 2011; Wilson et al. 2008). Dabei spielen Signaltransduktionsprozesse, vermittelt vor allem von Wnt, BMP, Notch sowie Hedgehog, eine wichtige Rolle (Greenow und Clarke 2012). Als zentrale Stammzelleigenschaft von ASC erschwert die *quiescence* die Generierung von *in vitro* Kulturen, was eine Charakterisierung unterschiedlicher ASC-Populationen erschwert.

### 1.1.3 Humane mesenchymale Stammzellen und die Stammzellnische

Friedenstein und dessen Mitarbeiter gelang es 1970 zum ersten Mal humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) aus dem Knochenmark zu isolieren. Hierbei wurden hMSC als eine kleine Subpopulation identifiziert, die im Gegensatz zu den ebenfalls im Knochenmark residierenden hämatopoetischen Stammzellen (HSC) an Plastik adhäriren. Morphologisch lassen die spindelförmigen Zellen eine nahe Verwandtschaft zu Fibroblasten vermuten. Aufgrund dieser Eigenschaften und der Fähigkeit zu klonalem Wachstum wurden diese Zellen als *colony-forming unit fibroblasts* (CFU-F) bezeichnet (Friedenstein et al. 1970). Mit dem Nachweis, dass CFU-F *in vivo* als multipotente

Stammzellen in alle mesodermalen Binde- und Stützgewebstypen (Osteoblasten, Chondrozyten, Tendozyten und Adipozyten) differenzieren können, setzte sich die Bezeichnung mesenchymale Stammzellen durch (Caplan 1991; Pittenger et al. 1999). Standardisierte Verfahren zur Identifizierung von hMSC sind schwierig zu etablieren, da bislang noch kein singulärer spezifischer Marker gefunden wurde. Dies hat auch zur Folge, dass eine genaue Definition der *in vivo* Stammzellpopulation von hMSC auch heute noch ausbleibt. Daher empfiehlt die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) hMSC über das in Tab. 1 aufgeführte Expressionsmuster zu identifizieren.

	Positiv für mehr als 95 % der Population	Negativ für mehr als 2 % der Population
Oberflächenmarker	CD73, CD90 und CD105	CD11b oder CD14, CD19 oder CD79a, CD34, CD45 und HLA-DR

Tab. 1: Expressionsprofil der Oberflächenmarker in hMSC nach Dominici et al. (2006).

Neben diesen Oberflächenmarkern, der Plastik-Adhärenz und der Multipotenz werden hMSC durch die Fähigkeit zur Koloniebildung charakterisiert, die bis heute über den CFU-F-Assay nachgewiesen wird (Dominici et al. 2006).

Trotz dieser Versuche der Standardisierung und Charakterisierung ist *in vitro* eine starke Heterogenität innerhalb von hMSC-Populationen zu beobachten. Dies betrifft vor allem das Differenzierungspotential. So zeigte sich bei einer klonalen MSC-Population, dass nur noch 30 % der Zellen *in vivo* multipotente Charakter aufwiesen (Kuznetsov et al. 1997). Diese Unterschiede zeigen sich auch morphologisch in der Unterscheidung spindelförmiger von großen kuboidalen sowie von sehr kleinen *rapidly self-renewing* (RS)-Zellen (Colter et al. 2001). Andere Arbeitsgruppen berichten über ähnliche Subpopulationen. Eine davon sind die *very small embryonic-like* (VSEL) Stammzellen, in denen eine Expression von SSEA-1, Oct-4 und Nanog nachgewiesen werden konnte (Kucia et al. 2006). Jiang et al. beschrieb 2002 die sogenannten *multipotent adult progenitor cells* (MAPC), die bei geeigneten Differenzierungsbedingungen Charakteristika von viszeralem Mesoderm, Neuroektoderm und Endoderm aufwiesen. Wurden MAPC in frühe murine Blastozyten injiziert, gelang es sogar pluripotente Eigenschaften nachzuweisen. Andere Subpopulationen von hMSC wurden durch Änderung der Kulturbedingungen selektiert. Darunter die *mesenchymal stromal cells*, die neben der Expression von embryonalen Stammzellmarkern bei *in vitro* Ansätzen eine Transdifferenzierung zeigten (Battula et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den sogenannten *marrow-isolated adult multilineage inducible* (MIAMI) Stammzellen beobachtet, welche unter hypoxischen Bedingungen generiert worden waren (D'Ippolito et al. 2004).

Diese Heterogenität der hMSC-Population spiegelt sich auch *in vivo* im komplexen Aufbau der Stammzellnische im Knochenmark wieder. Hierbei bilden MSC die Infra-

struktur der HSC-Nische und bestimmen maßgeblich deren hämatopoetische Aktivität (Zhang et al. 2003; Sacchetti et al. 2007). Dabei nehmen hMSC eine Schlüsselrolle ein, indem sie sowohl die Vaskularisierung der Nische als auch eine Innervierung durch das periphere Nervensystem vermitteln (Katayama et al. 2006; Mendez-Ferrer et al. 2010).

Neben der Stammzellnische im Knochenmark konnten mittels der CFU-F-Assay-Technologie fast aus allen Geweben des Körpers MSC gewonnen werden (Abdallah und Kassem 2008). Vieles spricht dafür, dass die MSC den Aufbau der Nische übernehmen und – wie in Abb. 1 für das Knochenmark dargestellt – die organ- und gewebspezifischen ASC kontrollieren. Dabei scheint die Regulation der ASC unter anderem maßgeblich durch die Komponenten des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweges der hMSC gesteuert zu werden. Zentrale Funktion übernimmt hierbei das β-Catenin, welches zum einen als Adhäsionsmolekül strukturell und zum anderen als Transkriptionsfaktor regulatorisch bei der Steuerung der Stammzellnische beteiligt ist (Alvarez et al. 2012).

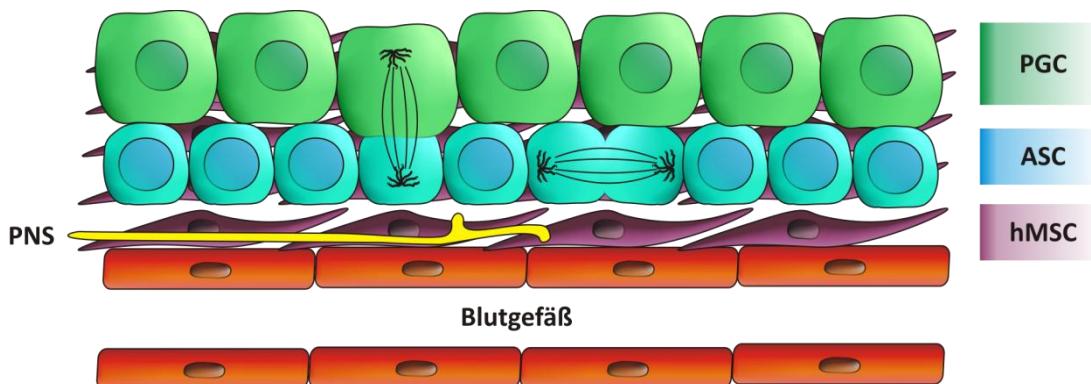


Abb. 1: Die Stammzellnische im Knochenmark (modifiziert nach Alvarez et al. 2012).

MSC steuern die symmetrische und asymmetrische Teilung der ASC und damit die Bildung von Progenitorzellen, welche die Nische verlassen. Dabei wird die Aktivität der MSC durch das endotheliale Kompartiment und durch die sympathische Innervierung gesteuert. ASC = adulte Stammzellen, hMSC = humane mesenchymale Stammzellen, PGC = Progenitorzellen, PNS = peripheres Nervensystem.

### 1.1.4 Stammzelltherapien

Die erste Stammzelltransplantation erfolgte 1956 in Form von Knochenmark im Tiermodell (Thomas et al. 1957). Ab 1970 wurden Knochenmarkstransplantationen bei Patienten mit schweren Immundefekten etabliert (Bortin 1970). Außerdem wird sie heute bei vielen Krebstherapien wie z.B. bei Leukämien eingesetzt, welche eine Depletion des Knochenmarks durch Bestrahlung oder Chemotherapie notwendig machen. Als Transplantate werden hierbei HSC-Populationen meist allogener Herkunft eingesetzt. Aber auch autologe Transplantationen werden durchgeführt, wie im Fall des schweren Immundefektes *Lupus erythematoses* (Traynor et al. 2000).

Die beiden Stammzellpopulationen aus dem Knochenmark, HSC und MSC, scheinen neben der hämatopoetischen Stammzelllinie auch an der Bildung aller anderen gewebe- und organspezifischen Stammzelllinien beteiligt zu sein (Alvarez et al. 2012). Daher ist die unterstützende Wirkung von HSC und MSC bei regenerativen Prozessen Gegenstand intensiver Forschung. In unterschiedlichen Studien konnten bei ischämischen Erkrankungen wie dem Herzinfarkt aber auch bei chronischen Wunden nach systemischer Stammzelltherapie von hMSC positive Effekte erzielt werden (Health 2006). In manchen dieser Studien wurden auch erfolgreich genetisch modifizierte oder mittels Cytokinen vorbehandelte Stammzellpopulationen eingesetzt (Gurudutta et al. 2012). So verbesserten bei schweren Knochendefekten osteogen aktivierte MSC-Transplantate die Heilung signifikant (Quarto et al. 2001; Arinze et al. 2003).

Die Plastizität von Stammzellen sowie deren Fähigkeit ganze Stammzelllinien wieder aufzubauen weckt das Interesse, *ex vivo* Gewebetransplantate zu generieren (Snippert und Clevers 2011). Dabei stellt sich die Frage, welche der bekannten Stammzellpopulationen sich dafür am besten eignet. Ein großer Vorteil von MSC gegenüber HSC ist hierbei, dass sie *ex vivo* eine sehr viel höhere Expansionskapazität aufweisen. Nachteil beider Stammzellpopulationen ist jedoch ihre starke Heterogenität und das daraus resultierende eingeschränkte Differenzierungspotential. Demgegenüber lassen sich ESC als relativ homogene Langzeitkultur halten und besitzen eine uneingeschränkte Differenzierungskapazität. Doch neigen die von hESC-Zelllinien abgeleiteten Transplantate zur Bildung von Teratomen, wodurch deren klinischer Einsatz neben den ethischen Bedenken erheblich erschwert wird (Goldring et al. 2011). So sind hMSC heute schon zentraler zellulärer Bestandteil in vielen klinischen Anwendungen (Abdallah und Kassem 2008), weshalb das Verständnis der grundlegenden Signaltransduktionsprozesse in hMSC unerlässlich ist. Gerade eine zielgerichtete Manipulation des Wnt/β-Catenin-Signalweges könnte neben der Verbesserung bestehender Therapien, die klinischen Anwendungsgebiete der hMSC nochmals erheblich erweitern.

## 1.2 Die Wnt-Signalwege

Die Komponenten der Wnt-Signalwege sind evolutionsbiologisch sehr alt und entstanden wahrscheinlich mit der Entwicklung der Körpersymmetrie und den ersten Nesseltieren vor etwa 550 bis 610 Millionen Jahren (Chen et al. 2000). Das Konzept der Körperachse in Form der Radiär- oder Bilateralsymmetrie war grundlegend für die Entwicklung der Eumetazoa und damit für die kambrische Explosion, bei der sich – innerhalb weniger Millionen Jahre – die Vertreter fast aller heutigen Tierstämme entwickelten (Chen et al. 2000). So spielen die Komponenten der Wnt-Signalwege eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung aller höheren Tiere und sind maßgeblich an der

Steuerung von Stammzelleigenschaften und dem Differenzierungspotential beteiligt (Nusse et al. 2008). Während bei degenerativen Krankheiten häufig eine verminderte Aktivierung der Wnt-Signalwege zu beobachten ist, kann die aberrante Aktivierung des Signalweges hingegen Tumorerkrankungen auslösen (Luo et al. 2007; Polakis 2012).

Die Wnt-Signalwegkomponenten lassen sich 3 Wnt-Signalwegen zuordnen. Neben dem kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg sind dies die beiden nicht kanonischen Wnt-Wege, nämlich der Wnt/PCP (*planar cell polarity*)- und der Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg. Charakteristisch für diese Wnt-Signalwege ist, dass am Anfang der Signaltransduktion die Bindung eines Wnt-Liganden an einen Fzd-Rezeptor steht (Schulte 2010).

### 1.2.1 Liganden der Wnt-Signalwege

Die erste in der Literatur beschriebene Komponente des Wnt-Signalweges war ein Wnt-Ligand. Unter dem Namen Int1 wurde ein Protoonkogen identifiziert, dessen transkriptionelle Aktivierung als Folge der genomischen Integration des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) zu erhöhtem Brustkrebsrisiko in Mäusen führte (Nusse und Varmus 1982). Zuvor wurde das Int1-Ortholog schon in *Drosophila* beschrieben; so führte eine *Loss-of-function*-Mutation zu einer fehlerhaften Flügelanlage und zu einer gestörten Segmentpolarität, weshalb der Namen *wingless* (Wg) vergeben wurde (Sharma und Chopra 1976). Jedoch erst 1987 wurde bei einem Screening von Entwicklungsmutanten Wg als Ortholog zu Int1 erkannt (Rijsewijk et al. 1987). Mit der Bezeichnung Wnt wurde dann eine Amalgamierung der beiden Ortholog-Namen Wg und Int zu Wnt vorgenommen (Nusse et al. 1991).

Heute sind in Vertebraten 19 Mitglieder der Wnt-Familie beschrieben und ihre Sequenz ist innerhalb des Tierstamms hochkonserviert. Dabei lassen sich viele der Wnts paarig in Unterfamilien einteilen, die sich durch eine sehr hohe Sequenzidentität auszeichnen. Das spiegelt sich auch in der Nomenklatur durch die Additive „a“ oder „b“ an den Namen des jeweiligen Wnts wider. Interessant hierbei ist, dass schon auf der niedrigsten Stufe der Eumetazoa, z.B. bei Hydra und der Seeanemone die gleiche Anzahl an Wnt-Unterfamilien vertreten ist wie in den Vertebraten (Kusserow et al. 2005). Dies lässt vermuten, dass die Diversifikation der Wnt-Familie und deren Aufspaltung in Untergruppen schon sehr früh in der Evolution mit der Entwicklung der Eumetazoa zusammenfällt (Petersen und Reddien 2009).

Die Mitglieder der Wnt-Familie zeigen konservierte Gemeinsamkeiten im strukturellen Aufbau. Die durchschnittliche Länge der Wnt-Liganden liegt zwischen 350 und 400 Aminosäuren (AS). Der N-Terminus besteht aus einer für den sekretorischen Weg kodierenden Signalsequenz. Daran schließt sich ein hoch konserviertes Muster von 22-24 Cysteinen an, das unerlässlich für die Funktionalität und die Spezifität des Wnt-Liganden ist (Du et al. 1995; Hoppler et al. 1996). Der Sekretionsprozess gestaltet sich

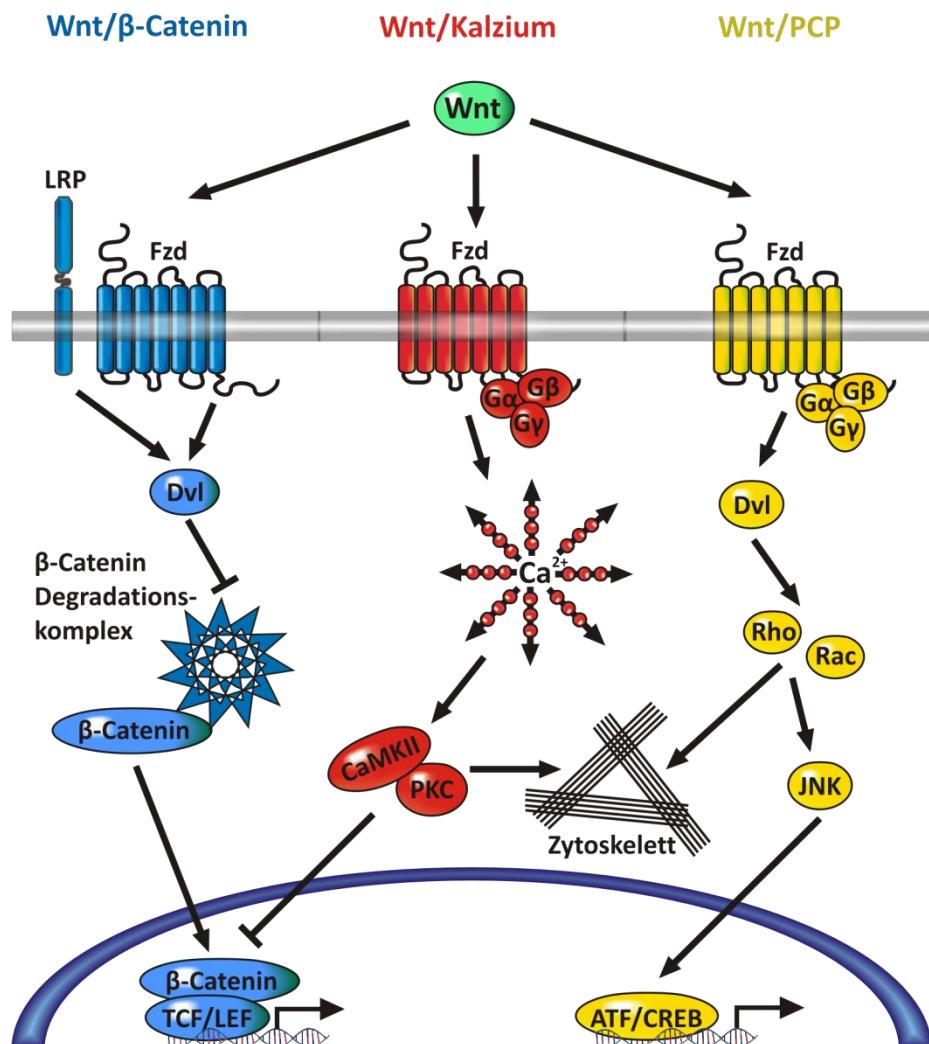
durch Wnt-spezifische Komponenten wie z.B. Porcupine und Wntless/Evi komplex und führt zu weitreichenden posttranslationalen Modifikationen. Charakteristisch ist eine kovalente Bindung an Lipide und damit einhergehend eine Erhöhung der Hydrophobizität der Wnts. Daneben sind auch N-Glykosylierungen bekannt, die zusammen mit der Lipid-Modifikation essentiell für die Sekretion und Funktionalität der Wnts sind (Willert et al. 2003). So zeigen neuere Untersuchungen an kristallisierten Wnt/Fzd-Komplexen, dass die Bindung des Wnt-Liganden an den Rezeptor maßgeblich über den Lipidrest vermittelt wird (Janda et al. 2012).

Neben der Einteilung der Wnts nach phylogenetischen Kriterien wurde schon früh eine funktionale Klassifizierung der Wnt-Liganden vorgenommen. Wnts, die nach ektopischer Expression in Froschembryonen eine Duplikation der Körperachse (McMahon und Moon 1989) sowie eine Transformation der murinen Brustdrüsenepithezellinie C57MG induzieren konnten (Wong et al. 1994), wurden als kanonisch bezeichnet. Dieser Gruppe mit Wnt1, Wnt3/3a und Wnt8a/b werden den nicht-kanonischen Wnts mit Wnt4, Wnt5a/b und Wnt11 gegenübergestellt. Diese starre Einteilung der Wnts zeigt sich heute als wenig praktikabel, da in Abhängigkeit des Zellsystems und der vorhandenen Komponenten des Wnt-Signalweges, die verschiedenen Wnts sowohl kanonische als auch nicht kanonische Wirkungen vermitteln können (Chien et al. 2009; Uysal-Oganer und Kypta 2012). Dabei scheint die jeweilige Kombination aus Fzd und Wnt eine wichtige Rolle zu spielen, welcher der Wnt-Signalwege aktiviert wird (Mikels und Nusse 2006a).

Im Gegensatz zu den nicht-kanonischen ist die Wirkung des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweges vor allem auf die Stabilisierung des β-Catenins und auf dessen nachfolgender transkriptioneller Aktivität zurückzuführen (Abb. 2). Die Unterscheidung der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege ist aufgrund einer größeren Übereinstimmung an Signalkomponenten weniger scharf und spiegelt möglicherweise die Tatsache wider, dass sie Teil eines größeren Wnt-Signalnetzwerks repräsentieren (Kestler und Kuhl 2008).

Bei der Entscheidung, welcher der Wege eingeschlagen wird, scheint die Kombination aus Wnt-Ligand und Rezeptoren von besonderer Bedeutung zu sein. So zeigte sich, dass in Abhängigkeit des Liganden unterschiedliche Wnt-Korezeptoren rekrutiert werden. Dabei bildete Wnt3a einen ternären Komplex mit Fzd und dem Korezeptor LRP6 (*low density lipoprotein receptor-related protein 6*), während Wnt5a neben Fzd die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Ror2 als Korezeptor rekrutierte (Mikels und Nusse 2006a). Die erstgenannte Kombination führte zu einem kanonischen Signal, letztere zu einem nicht-kanonischen. Bei der Rezeptorkombination aus Fzd und LRP5/6 ist mit dem Protein Norrin auch ein kanonischer Ligand bekannt, der nicht zur Wnt-Familie gehört (Xu et al. 2004). Weiter existieren mit der Familie der R-Spondine Liganden des Wnt-

Weges, die in Anwesenheit von Wnt-Liganden synergistisch wirken und ein nachfolgendes Wnt-Signal verstärken können (Kim et al. 2008).



**Abb. 2: Die verschiedenen Wnt-Signalwege:** Dargestellt sind die zentralen Komponenten der Rezeption und intrazellulären Signaltransduktion des Wnt/β-Catenin-, Wnt/Kalzium- und Wnt/PCP-Signalweges. Nähere Ausführungen sind dem Text zu entnehmen. PCP = *planar cell polarity*, G $\alpha$ βγ = heterotrimeres G-Protein, Dvl = *Dishevelled*, TCF/LEF = *T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*, CaMKII =  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II, PKC = Proteinkinase C, Rho = *Ras homologue GTPase*, Rac = *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*, JNK = *c-Jun N-terminal Kinase*, ATF/CREB = *cAMP-dependent transcription factor/cAMP response element-binding protein* (modifiziert nach Cohen et al. 2008).

## 1.2.2 Sekretierte Inhibitoren der Wnt-Signalwege

Die sekretierten Wnt-Inhibitoren lassen sich bezüglich ihrer Bindungspartner in die *secreted Fzd-related protein* (sFRP)- und *Dickkopf* (Dkk)-Klasse einteilen (Kawano und Kypta 2003). Die erstgenannte Klasse zu der die sFRP-Familie, WIF1 und Cerberus zählen, zeichnet sich durch die Bindung und Sequestrierung von Wnt-Liganden aus (Bovolenta et al. 2008). Dagegen binden die Mitglieder der Dkk-Familie an die Wnt-Korezeptoren LRP5 und 6 und verhindern so die Ausbildung des ternären Komplexes

aus Wnt/Fzd/LRP und damit die Weiterleitung eines kanonischen Wnt-Signals (Sakane et al. 2010).

### 1.2.3 Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege

Der Wnt/PCP-Weg wurde zuerst in *Drosophila* beschrieben und nimmt als  $\beta$ -Catenin-unabhängiger Weg über die Bestimmung der Zellpolarität eine wichtige Rolle in der Gewebeorganisation während der Embryonalentwicklung ein (Veeman et al. 2003). Auch für den Wnt/ $Ca^{2+}$ -Signalweg werden ähnliche Funktionen vermutet; so vermittelt dieser gastrulationsbedingte Zellwanderungen in der Entwicklung von Froschembryonen (Slusarski et al. 1997). In beiden nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen scheinen heterotrimere G-Proteine an der Signalweiterleitung beteiligt zu sein (Abb. 2). Im Fall des Wnt/PCP-Weges führt dies über das G-Protein Rac sowie über das kleine G-Protein Rho. Folge ist zum einen die Aktivierung der *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK)-Kaskade und zum anderen der Umbau des Cytoskeletts. Im Wnt/ $Ca^{2+}$ -Signalweg steht am Ende der cGMP-vermittelten *second messenger*-Reaktion die Freisetzung von Inositoltriphosphat, welches zu einer Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels führt. Die Folge hiervon ist die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) und der Proteinkinase C (PKC), die beide eine wichtige Rolle in Migration und Proliferation der Zelle übernehmen (Kuhl 2004).

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

Die verfügbare Menge an transkriptionell aktivem  $\beta$ -Catenin und damit die nukleäre Konzentration bestimmt maßgeblich den Aktivitätszustand des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (Shimizu et al. 1997). Bei Ausbleiben eines Wnt-Signals, wird das cytosolische  $\beta$ -Catenin von einem spezifischen Abbaukomplex mit den zentralen Komponenten APC (Adenomatosis Polyposis Coli), Axin und GSK-3 $\beta$  phosphoryliert (Liu et al. 2002). Dies ist die Voraussetzung für die Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin (Abb. 3A), welche als Markierung für die proteasomale Degradation dient (Aberle et al. 1997).

Bei Anwesenheit eines Wnt-Liganden (Abb. 3B) kommt es zu der Ausbildung des ternären Komplexes aus Wnt, Fzd und dem Korezeptor LRP5 bzw. LRP6 (He et al. 2004; Logan und Nusse 2004). Das führt zur Inaktivierung des spezifischen Abbaukomplexes und zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytosol (MacDonald et al. 2009). Dem schließt sich die Translokation des  $\beta$ -Catenins in den Nukleus an (Henderson und Fagotto 2002). Zusammen mit der Familie der Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor*) bestimmt es die Expression verschiedener Wnt-Zielgene, darunter Cyclin D1 aber auch Metalloproteininasen sowie Fzds und damit Komponenten des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges selbst (Hoppler und Kavanagh 2007; Logan und Nusse 2004; Vlad et al. 2008).

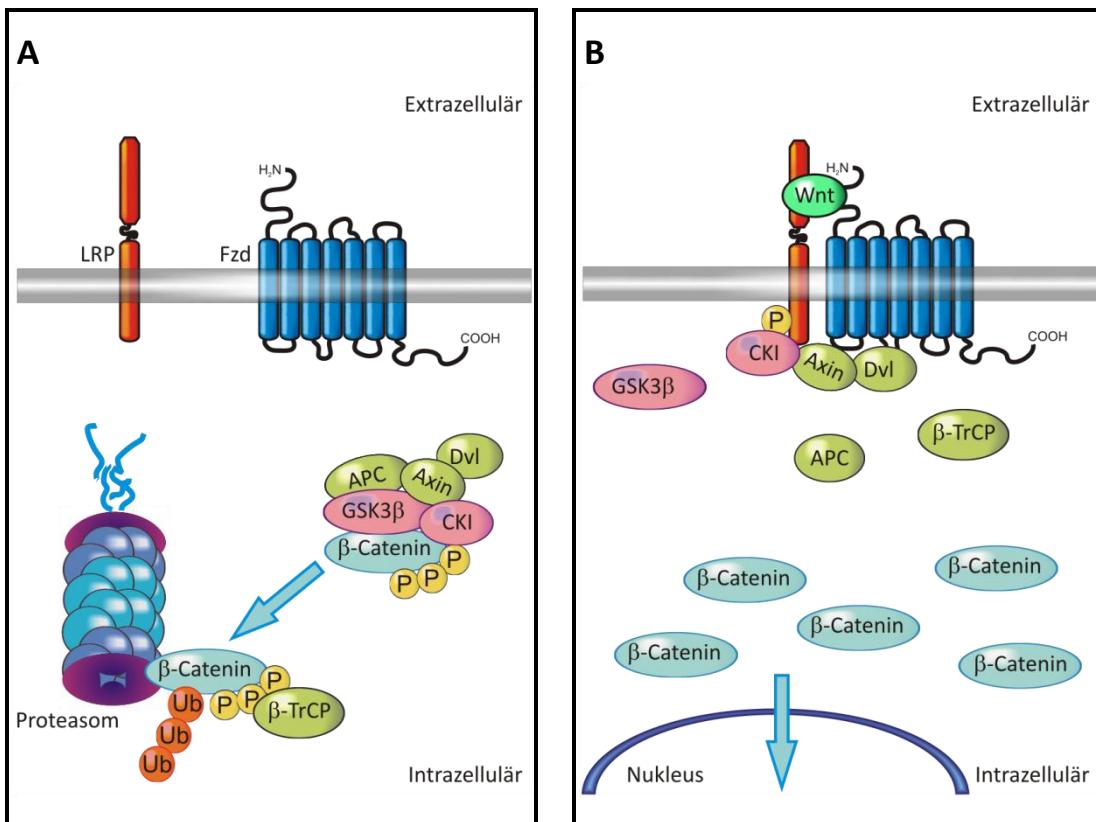


Abb. 3: Der Wnt/β-Catenin-Signalweg.

- A) Bei Abwesenheit eines Wnt-Liganden ist der Degradationskomplex im Cytosol aktiv und phosphoryliert gebundenes β-Catenin. Dieses wird – β-TrCP-vermittelt –ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut.
- B) Bei Ausbildung eines ternären Rezeptorkomplexes unter Anwesenheit eines Wnt-Liganden werden bestimmte Komponenten des Degradationskomplexes an die Membran rekrutiert. Dadurch akkumuliert neu synthetisiertes β-Catenin. APC = Adenomatosis Polyposis Coli, β-TrCP =  $\beta$ -Transducin repeat containing protein, CKI = Kaseinkinase 1, Dvl = *Dishvelled*, GSK-3 $\beta$  = Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (modifiziert nach Li et al. 2012).

## 1.2.5 Rezeption eines Wnt-Signals

Am Anfang eines Wnt-Signals steht die Bindung des Liganden an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus Fzd und LRP. Dabei umfasst in Vertebraten die Fzd-Familie 10 Mitglieder, die jeweils mit einem der beiden Korezeptoren LRP5 oder LRP6 als Heterodimer vorliegen können.

### 1.2.5.1 Die Frizzled-Rezeptoren

Die Bezeichnung „Frizzled“, welche in diesem Kontext mit eingedreht oder gekräuselt übersetzt werden kann, geht auf eine gleichnamige *Drosophila*-Mutante mit unnatürlich stark spiraling gewundenen Flügelhaaren zurück (Bridges und Brehme 1944).

In der Abb. 4 sind die wichtigsten gemeinsamen strukturellen Merkmale der Mitglieder der Fzd-Familie zusammengefasst.

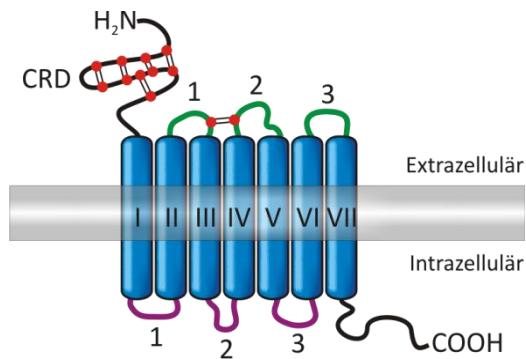


Abb. 4: Darstellung der Fzd-Struktur (modifiziert nach Schulte 2010).

Über die CRD bindet der Rezeptor Wnt-Liganden. In grün sind die extrazellulären Schleifen und in violett sind die intrazellulären Schleifen hervorgehoben. Transmembranregionen sind mit römischen Ziffern versehen. In der CRD befinden sich 5 Disulfidbrücken. Eine weitere ist zwischen den ersten beiden extrazellulären Schleifen lokalisiert. CRD = *cysteine rich domain*.

Im Durchschnitt umfasst die Länge der Fzds 500 bis 700 AS. Die aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Strukturmerkmale der Fzds führten zur Einordnung der Familie als Untergruppe in die Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Wie auch die GPCRs sind Fzds mit 7 Transmembrandomänen (7TM), bestehend aus hydrophoben  $\alpha$ -Helices, in der Plasmamembran verankert (Vinson et al. 1989). Die Domänen sind extrazellulär wie intrazellulär mit jeweils 3 *loops* untereinander verbunden. Charakteristisch für GPCRs befinden sich in den extrazellulären *loops* 1 und 2 konservierte Cysteine sowie geladene Aminosäuren im dritten intrazellulären *loop*. Jedoch fehlen der Fzd-Familie das DRY-Motiv, welches an der Spezifität wie auch der Bindung des G-Proteins beteiligt ist und das für die GPCRs typische NPXXXX Motiv (Wess 1998).

Extrazellulär schließt sich der Transmembranregion der N-Terminus mit den wichtigen Domänen für die Rezeption eines Wnt-Signals an. Der relativ kurzen Signalsequenz folgt im N-Terminus die *cysteine-rich domain* (CRD), welche durch 5 Disulfidbrücken – bestehend aus 10 in der Fzd-Familie hoch konservierten Cysteinen – stabilisiert wird. Neben der Fähigkeit die Dimerbildung mit anderen CRD-tragenden Proteinen zu vermitteln, ist sie für die Bindung von Wnt-Liganden unabdingbar (Dann et al. 2001; Janda et al. 2012). Innerhalb der CRD gibt es Hinweise auf posttranskriptionale Modifikationen in Form von N-Glykosylierungen. Hierbei scheinen die Glykosylreste bei der Erkennung des Wnt-Liganden und damit für die Funktionalität des Rezeptors von Bedeutung zu sein (Schulte 2010).

Intrazellulär befindet sich der C-Terminus mit den zentralen Domänen für die Transduktion eines Wnt-Signals. Dabei spielt die Sequenz KXXXXW, welche in allen 10 Fzd-Rezeptoren konserviert ist, eine zentrale Rolle. Als Bindestelle für atypische PDZ-Liganden ist sie an der Interaktion des Fzd mit dem Phosphoprotein *Dishevelled* (DVL) beteiligt. Dabei stellt DVL eine zentrale Signalkomponente der unterschiedlichen Wnt-Signalwege dar (Gao und Chen 2010). Weitere Bindestellen für dieses Protein werden

auch in den intrazellulären *loops* 1 und 3 vermutet. Ein zweiter konservierter Sequenzabschnitt X-S/T-X-L/V ermöglicht die Interaktion mit Klasse I PDZ-Liganden, die eine Vielzahl an unterschiedlichen Signalproteinen mit zum Teil noch ungeklärter Funktion umfassen (Wawrzak et al. 2009). Diese Konsensussequenz ist nicht in allen Fzds vorhanden und bildet das Endstück des C-Terminus in Fzd1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, jedoch nicht in Fzd6, 9 und 10.

Unter allen 7TM-Rezeptorklassen sind die Mitglieder der Fzd-Familie über die Vertreter der Tierstämme hinweg am höchsten konserviert (Schioth und Fredriksson 2005). Dabei lassen sich die Fzds, anhand ihrer Sequenzidentität, in vier Gruppen einteilen: Fzd1, Fzd2 und Fzd7 teilen nahezu 75 %, Fzd5 und Fzd8 70 %, Fzd4, Fzd9 und Fzd10 65 % und Fzd3 und Fzd6 50 % Sequenzidentität (Huang und Klein 2004).

Die Entdeckung, dass es sich bei der Fzd-Familie um Wnt-Rezeptoren handelt, wurde zuerst im Modellorganismus *Drosophila* gemacht. Es war bekannt, dass nach Stimulation durch Wg, DVL an der Stabilisierung des  $\beta$ -Catenin Orthologs *Armadillo* beteiligt war (Klingensmith et al. 1994). Nachdem Fzd- und DVL-Mutanten zu einem ähnlichen Phänotyp führten, konnten nachfolgende Untersuchungen zeigen, dass *Drosophila* Fzd2 (DFzd2) einen Wg-Rezeptor darstellt (Bhanot et al. 1996).

### 1.2.5.2 Die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6

An der Rezeption sowie Transduktion eines Wnt-Signals sind auch die Wnt-Korezeptoren LRP5 bzw. LRP6 beteiligt. Zusammen mit weiteren 8 verschiedenen LRP-Rezeptoren bilden sie eine Untergruppe der LDL-Rezeptorfamilie (Li et al. 2001). Diese spielen eine wichtige Rolle in der Endozytose, der Zell-Zell-Kommunikation, Embryogenese und im Lipidstoffwechsel (Go und Mani 2012). Wie alle LDL-Rezeptoren gehören sie zur Klasse der Typ I Transmembranproteine. Typisch in ihrem strukturellen Aufbau ist, dass sich der Transmembran-Region intrazellulär ein relativ kurzer C-Terminus anschließt, welcher die intrazellulären Domänen zur Signaltransduktion trägt. Extrazellulär befinden sich auf dem relativ großen N-Terminus die Bindungsstellen für die Wnt-Liganden. Die Bedeutung dieser Rezeptoren im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zeigen Versuche mit verkürzten LRP6-Rezeptormutanten. Wurde LRP6 ohne extrazelluläre Domäne exprimiert, kam es zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signals und bei einer Verkürzung der cytoplasmatischen Domäne zur Blockierung desselben (He et al. 2004). Die Rezeption eines Wnt-Signals erfolgt über die Bindung eines Wnt-Liganden an die Domänen E1-E4 im N-Terminus. Dabei zeigen sich Unterschiede in der Präferenz für den jeweiligen Wnt-Liganden. Während die Domänen E1-E2 Wnt1 binden, vermitteln E3-E4 die Bindung von Wnt3 und Wnt3a (Gong et al. 2010). Zusätzlich gibt es auch Hinweise, dass beide Wnt-Bindestellen gleichzeitig Liganden binden können (Bourhis et al. 2010).

Für die Ausbildung des Wnt-Signalosoms an der Plasmamembran ergibt sich damit folgendes Bild (Abb. 3B). Fzd und LRP5 bzw. LRP6 binden den Wnt-Liganden unter Ausbildung eines ternären Komplexes. Dabei können mehrere Wnt-Liganden mehrere Fzds aber auch mehrere LRP binden, was theoretisch eine Oligomerisierung des ternären Komplexes erlaubt (Bhanot et al. 1996; Janda et al. 2012). Intrazellulär rekrutieren die Rezeptoren daraufhin an der Membran die spezifischen Gerüstproteine. Dabei binden Fzd-Rezeptoren DVL und der Korezeptor LRP Axin. Diese Gerüstproteine interagieren ihrerseits untereinander, was die Bindung von Axin an LRP festigt (Clevers und Nusse 2012). Gleichzeitig wird die Axin-LRP-Interaktion durch die Phosphorylierung des cytoplasmatischen C-Terminus des Rezeptors nochmals verstärkt. Dies wird durch die beiden konstitutiv aktiven Serin-Threonin-Kinasen CK1 und GSK-3 $\beta$  vermittelt, die bei einem Wnt-Signal ebenfalls an die Membran rekrutiert werden (He et al. 2004; Tamai et al. 2004). Die Folge dieser weitreichenden intrazellulären Umverteilung der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkomponenten ist die Inaktivierung des Degradationskomplexes und damit die Hemmung der Ubiquitinierung des  $\beta$ -Catenins (Li et al. 2012).

### 1.2.6 Signalweiterleitung im Cytosol und Nukleus

In Abwesenheit eines Wnt-Signals bedingt die Aktivität des Degradationskomplexes die cytosolische Konzentration des  $\beta$ -Catenins. So bindet Axin als Gerüstprotein die Komponenten des Degradationskomplexes und bildet eine Interaktionsplattform für APC,  $\beta$ -Catenin und die beiden Kinasen CK1 und GSK-3 $\beta$ . Das relativ große APC spielt dabei eine zentrale Rolle, da es sowohl Axin als auch das  $\beta$ -Catenin bindet. Die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin wird durch repetitive Sequenzabschnitte mit einer Länge von 15 bzw. 20 Aminosäuren vermittelt, die in APC zwischen den drei Axin-Bindestellen lokalisiert sind (Klaus und Birchmeier 2008). Aufgrund einer hereditären oder somatischen Mutation, welche zur Expression einer verkürzten APC-Variante führen, können diese  $\beta$ -Catenin-Bindedomänen fehlen. Dadurch sind das mutierte APC und damit der Degradationskomplex nicht mehr funktional. Die daraus resultierende konstitutive Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität ist für 85 % der diagnostizierten Kolonkarzinome verantwortlich (Kinzler und Vogelstein 1996). Im funktionalen Degradationskomplex phosphorylieren die beiden Kinasen CK1 und GSK-3 $\beta$  fortlaufend  $\beta$ -Catenin-Moleküle. Betroffen davon sind N-terminal gelegene Ser/Thr-Reste, welche phosphoryliert in ihrer Gesamtheit als „degron“ Motiv von F-box/WD-Sequenzwiederholungen des  $\beta$ -Transducin repeat containing protein ( $\beta$ -TrCP) erkannt werden. Das  $\beta$ -TrCP ist Teil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Aberle et al. 1997), welcher das  $\beta$ -Catenin ubiquitiniert und somit dem proteasomalen Abbau zuführt (Abb. 3A).

Bei einem aktiven Wnt-Signal kommt es zur Sättigung des inaktiven Degradationskomplexes mit phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin. Aufgrund der ausbleibenden Ubiquitinierung,

akkumuliert neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin im Cytosol und die Translokation in den Nukleus ermöglicht die Regulation von Wnt-Zielgenen. Durch welche Mechanismen  $\beta$ -Catenin in den Kern geschleust wird, ist noch nicht vollständig verstanden, denn es weist weder ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) noch ein nukleäres Exportsignal (NES) auf (Fagotto et al. 1998). Zudem ist es mit 90 kDa doppelt so groß wie die Ausschlussgröße der Kernpore für die freie Diffusion. Studien konnten zeigen, dass hierbei sowohl von einem Transportprotein abhängige als auch davon unabhängige Mechanismen existieren (Koike et al. 2004; Wiechens und Fagotto 2001). Ein mögliches Transportprotein könnte APC darstellen, da es neben seiner Funktion im Degradationskomplex, mittels mehreren NLS- und NES-Sequenzen zwischen Kern und Cytosol pendeln kann (Henderson und Fagotto 2002; Neufeld 2009). Maßgeblich für die zelluläre Verteilung des  $\beta$ -Catenins scheinen auch die spezifischen Transkriptionsfaktoren B-Zelllymphom 9 (BCL9), Pygopus und *T-cell-specific transcription factor 4* (TCF4) zu sein. Wie Untersuchungen zeigen, fördern diese eine nukleäre Retention des  $\beta$ -Catenins und damit auch eine Akkumulation desselben im Kern (Krieghoff et al. 2006).

Die vorgenannten Transkriptionsfaktoren sind auch maßgeblich an der Vermittlung der transkriptionellen Aktivität des  $\beta$ -Catenins beteiligt. Eine zentrale Rolle spielen hierbei die Mitglieder der TCF/LEF-Familie, zu denen auch TCF4 gehört. Dabei ist die Komplexbildung aus  $\beta$ -Catenin und TCF bzw. LEF essentiell für die Transkription von Wnt-Zielgenen. Denn die Mitglieder der TCF/LEF-Familie vermitteln über die Bindung der HMG-Box-Domäne in der kleinen Furche der DNA-Helix die Spezifität des  $\beta$ -Catenins. Für die Erkennung ist die Konsensussequenz (A/T)(A/T)CAA(A/T)GG in Vertebraten und *Drosophila* identifiziert worden und als nachgeschaltete Sequenzwiederholungen ist diese Bestandteil der sogenannten TCF/LEF-Reportervektoren bzw. *TOPflash*-Systeme (Korinek et al. 1997; van de Wetering et al. 1997).

In Abwesenheit des  $\beta$ -Catenins (Abb. 5A) rekrutieren die Mitglieder der TCF/LEF-Familie transkriptionelle Repressoren darunter Groucho und CtBP (Hurlstone und Clevers 2002). Unter Wnt-Stimulation verdrängt  $\beta$ -Catenin in einem kompetitiven Mechanismus die Repressoren (Abb. 5B). Im Komplex mit TCF/LEF wirkt es dann als transkriptioneller Aktivator nachgeschalteter Wnt-Zielgene durch Rekrutierung von Komponenten des *chromatin remodeling complex* und Histon-modifizierenden Faktoren wie CBP und Brg1 (Stadeli et al. 2006). Weitere in *Drosophila* essentielle Transkriptionsfaktoren sind *Legless* (lgs) das Ortholog zu BCL9 und Pygopus, deren Bedeutung als Transkriptionsfaktoren für Wnt-Zielgene in Vertebraten noch weitgehend unklar ist (Brack et al. 2009; Schwab et al. 2007).

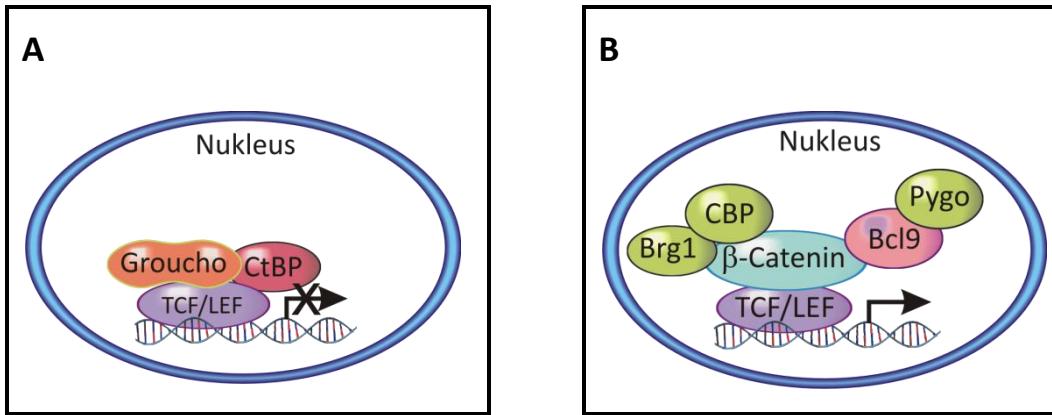


Abb. 5: Der Wnt/β-Catenin-Signalweg im Nukleus (modifiziert nach Li et al. 2012).

- A) In Abwesenheit eines Wnt-Signals reprimieren TCF und LEF zusammen mit den Korepressoren Groucho und CtBP die Transkription der Wnt-Zielgene.
- B) Akkumuliert β-Catenin im Kern, verdrängt es die Korepressoren von TCF/LEF und rekrutiert dafür Koaktivatoren und Histon-modifizierende Faktoren wie Brg1, CBP, Bcl9 und Pygo.
- BCL9 = B-Zelllymphom 9, Brg1 = *brahma-related gene 1*, CBP = CREB binding protein, CtBP = C-terminal binding protein, Pygo = Pygopus, TCF/LEF = T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor.

### 1.2.7 Zielgene des Wnt/β-Catenin-Signalweges

Die zentrale Bedeutung der TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren zeigt sich in der Charakterisierung von Wnt-Zielgenen. Diese werden definiert durch das Vorhandensein von TCF/LEF-Bindestellen, welche maßgeblich an der Transkription der Wnt-Zielgene beteiligt sind (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>). Zu diesen zählen viele Protoonkogene wie Cyclin D1 und c-Myc, die eine wichtige Funktion im Zellzyklus übernehmen (He et al. 1998; Tetsu und McCormick 1999). Weiter sind einige Metalloproteinasen, die im Fall der Invasion und Migration von Zellen eine bedeutende Rolle spielen, als Wnt-Zielgene beschrieben worden (Wu et al. 2007). Aber auch Komponenten des Wnt-Weges selbst, wie z.B. Fzd7 (Willert et al. 2002) wurden als Wnt-Zielgene identifiziert. Darunter auch die negativen Regulatoren des Wnt-Weges Axin2 und Dkk1, welche als Teil eines negativen *feedback loops* eine Feinabstimmung der Wnt/β-Catenin-Aktivität ermöglichen (Lustig et al. 2002; Niida et al. 2004).

### 1.2.8 Die Rolle des Wnt/β-Catenin-Signalweges in hMSC

Unterschiedliche Studien zeigen, dass in hMSC alle essentiellen Komponenten für ein aktives Wnt/β-Catenin-Signal vorhanden sind (Boland et al. 2004; Etheridge et al. 2004; Okoye et al. 2008; Sercan et al. 2010). Auffällig ist die große Anzahl der exprimierten Fzds und Wnts, was auf eine komplexe Regulation der hMSC-Population durch den Wnt/β-Catenin-Signalweg hindeutet. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass in fast allen Differenzierungsprozessen zeitlich spezifische Aktivitätsmuster des Wnt/β-Catenin-Signalweges eine große Rolle spielen (Ma et al. 2012). Dass bei der Adipogenese z.B. auch die Wnt-Korezeptoren eine zentrale Bedeutung haben, zeigten Knockdown und Überexpressionsstudien von LRP6 in hMSC (Peröbner et al. 2012).

Daneben zeigt eine konstante Stimulation der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität in hMSC durch Wnt3a zumindest *in vitro* eine starke Steigerung der Proliferations- und Invasionskapazität (Boland et al. 2004; Neth et al. 2006). Zudem scheint auch *in vivo* ein bestimmtes Wnt-Signalniveau bedeutend für den Erhalt von Stammzellnischen zu sein (Kuhnert et al. 2004). So konnten aus vielen Stammzellnischen bestimmte hMSC-Populationen isoliert werden, die wahrscheinlich nicht nur am Aufbau der Nische beteiligt sind, sondern auch auf diese regulativ einwirken (Alvarez et al. 2012).

## 2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Trotz intensiver Studien zu den einzelnen Komponenten des Wnt-Signalweges ist bis heute das genaue Zusammenspiel nur fragmentarisch bekannt. Gerade die Rezeption des Signals wirft zahlreiche Fragen auf und die Wirkung der einzelnen Wnt/Fzd/LRP-Kombinationen ist nur sehr wenig verstanden. Aufbauend auf den Arbeiten von Dr. Marisa Karow und Dr. Thomas Kolben (Karow 2008; Kolben 2011), die zeigen konnten, dass sich hMSC durch eine basale Wnt/β-Catenin-Aktivität auszeichnen und zudem neben den beiden Korezeptoren LRP5 und LRP6 auch zahlreiche Mitglieder der Fzd-Familie exprimieren, sollten in der hier vorliegenden Arbeit folgende Fragen näher untersucht werden:

- Welche Wnt-Liganden werden in hMSC exprimiert? Welche Wnt-Expressionsmuster zeigen sich vergleichend in den Zelllinien HEK293 und HT1080?
- Werden die Inhibitoren des Wnt-Weges sFRP1 und WIF1 in hMSC, HEK293- bzw. HT1080-Zellen exprimiert?
- Welche Fzds wirken kanonisch und sind damit an der Rezeption eines Wnt/β-Catenin-Signals beteiligt?
- Welche Auswirkungen hat eine Überexpression eines kanonischen Fzds auf die Stammzelleigenschaften von hMSC?

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden folgende Einzelziele formuliert:

1. Mittels einer qualitativen RT-PCR sollte das Expressionsmuster der 19 Wnts, sowie von sFRP1 und WIF1 in hMSC, HEK293- und HT1080-Zellen näher charakterisiert werden.
2. Um relative Änderungen im Status der Wnt/β-Catenin-Aktivität evaluieren zu können, sollte das TCF/LEF-Reporter-Vektorsystem in hMSC etabliert werden. In diesem Kontext sollten die Zellkulturbedingungen optimiert und mittels Aktivierung und Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalweges die TCF/LEF-Reporter-Aktivität in hMSC vergleichend analysiert werden.
3. Zur Identifizierung kanonischer Fzds sollten Knockdown- und Überexpressionsstudien in TCF/LEF-Reporter-hMSC durchgeführt werden. Für die Überexpression sollte hierfür eine flexible Klonierungsstrategie entworfen werden, die einen methodisch einfachen Austausch von Protein-tags ermöglichen sollte.
4. Neben der Charakterisierung der Überexpression einzelner kanonischer Fzds mittels quantitativer RT-PCR und Western-Blot sollten zudem die Auswirkungen der Überexpression auf die Wnt-Zielgenexpression Cyclin D1 sowie auf das Proliferationsverhalten der hMSC evaluiert werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Autoklav 3850	Systec GmbH, Wettenberg
Photometer:	
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Mikroplattenphotometer 3408	Mikrotek, Overath
Nanodrop 1000	PeqLab, Erlangen
CO <sub>2</sub> -Inkubator Galaxy S	RS Biotech, England
Eismaschine	Scotsman, USA
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur	PeqLab, Erlangen
Gel-Bilderfassungssystem Intas Gel Imager	Intas, Göttingen
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Image Scanner	Pharmacia, Freiburg
Kühlschrank (4 °C)	Siemens, München
Magnetrührer Ika-Combimag	RCO Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskope:	
IX50 mit	Olympus, Feldkirchen-Westerham
CCD Kamera Typ 3CCD	Sony, Köln
IX70 mit	Olympus, Feldkirchen-Westerham
POC Chamber	Pecon, Erbach
SensiCam QE	PCO CCD Imaging, Kehlheim
Tempcontrol 32-2	Pecon, Erbach
Mikrowellenofen R-6270	Sharp, Japan
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
Orbitalschüttler Certomat R	Braun Biotech International, Melsungen
Taumler	Bachofer, Reutlingen
PCR Thermal Cycler:	
LightCycler 1.5	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	BioRad, München
Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
Sicherheitswerkbänke:	
BDK 7419, Modell UVF 6.18S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Herasafe Typ HS12	Heraeus Instruments, Göttingen
Spannungsquellen:	
Consort E143	PeqLab, Erlangen
Phero Stab. 500	Bachofer, Reutlingen
Stickstofftank Locator 4	Sigma, Taufkirchen
Spectrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Tiefkühlgefrierschrank:	
Colora UF 85-300S (-80 °C)	Colora, Lorch
Liebherr Premium Frost (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Transilluminator DarkReader	Clare Chemical Research, USA
Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Waagen:	
Analysenwaage, A 120 S	Satorius, Göttingen
Technische Waage, MA AF200	Satorius, Göttingen
Wärmeschränke:	
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
Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf 5415 R, Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Universal 32R	Hettich Zenrifugen, Tuttlingen

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

#### 3.1.2.1 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
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Erlenmeyerkolben 50 und 250 ml	Wagner und Munz, München
Fernbachkolben 1800 ml	Wagner und Munz, München
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roche, Mannheim

Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc, Langenselbold
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen, Polystyrol 9 cm Ø	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### Bakterienstämme (Genotypen)

#### TOP10 (Invitrogen, Darmstadt):

F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ/*lacX*74 *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str*<sup>R</sup>) *endA1* *nupG* λ-

#### TOP10F' (Invitrogen, Darmstadt):

F' [*lacI*<sup>q</sup> *Tn10* (*Tet*<sup>R</sup>)] *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ/*lacX*74 *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

#### K12 JM109 (NEB):

F' *traD36* *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> Δ(*lacZ*)M15/ Δ(*lac-proAB*) *glnV44* *e14*<sup>-</sup> *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi* *hsdR17* *Nal*<sup>R</sup>

#### K12 ER2925 (NEB):

*ara-14* *leuB6* *fhuA31* *lacY1* *tsx78* *glnV44* *galK2* *galT22* *mcrA* *dcm-6* *hisG4* *rfbD1* R(*zgb210::Tn10*)*TetS* *endA1* *rpsL136* *dam13::Tn9* *xylA-5* *mtl-1* *thi-1* *mcrB1* *hsdR2* *Cam*<sup>R</sup>

#### XL10-Gold (Stratagene):

*Tet* Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcr CB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1* *sup E44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* Hte[F' *proAB* *lacI*<sup>q</sup>ΔM15 *Tn10*(*Tet*<sup>R</sup>) *Amy* *Cam*<sup>R</sup>]

### 3.1.2.2 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken

Die eingesetzten Chemikalien hatten alle den analytischen Reinheitsgrad „p.a.“. Die Reaktions- oder Kulturgefäße, sofern nicht steril bezogen, wurden bei 121 °C und 1 x 10<sup>5</sup> Pa Überdruck für 20 Min autoklaviert.

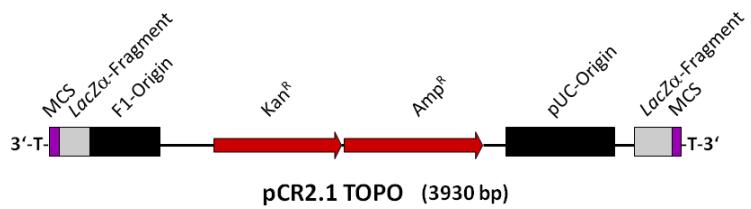
<i>Antarctic Phosphatase</i>	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
Biozym LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Calf intestine Phosphatase (CIP)</i>	NEB, Frankfurt
CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit	Invitrogen, Darmstadt
DNA-Auftragspuffer 6x	Fermentas, St.-Leon-Rot
DNA-Leiter II <i>Ultra low range</i>	PeqLab, Erlangen
DNA-Molekulargewichtsmarker <i>Generuler</i> 1 kb	Fermentas, St.-Leon-Rot

dNTPs	NEB, Frankfurt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gelextraktionskit MinElute	Qiagen, Hilden
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Klenow-Enzym	Roche, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
LightCycler TaqManMaster	Roche, Mannheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Phase Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen
Phusion Flash High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Finnland
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Finnland
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Quantitect-Reverse Transcription-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt
RNase A	Carl Roth, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
T4-DNA Ligase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Darmstadt

## Vektoren

### Klonierungsvektor: pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Darmstadt)

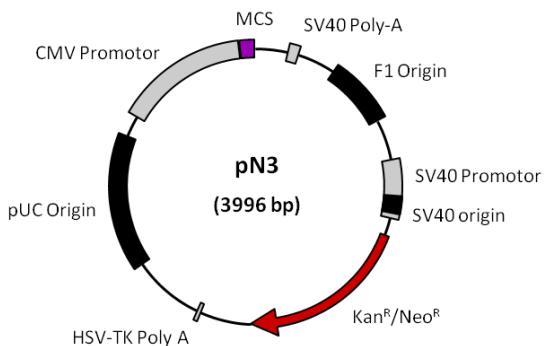
Dieser Vektor erlaubt eine vereinfachte Klonierung von PCR-Produkten. Dabei macht man sich die terminale Nukleosidtransferase-Aktivität der Taq-Polymerase zu Nutze, welche bevorzugt Matrizen-unabhängig Adenosin-Moleküle an das 3'-Ende anhängt. Der pCR2.1-TOPO liegt hierbei linearisiert vor mit jeweils einem 3'-Desoxythymidin-Rest und einer kovalent gebundenen Topoisomerase I, welche die Ligation der durch die Taq-Polymerase generierten PCR-Produkte katalysiert. Erfolgreich transformierte *E. coli*-Klone können über die Resistenzgene für Ampicillin oder Kanamycin mit den entsprechenden Antibiotika selektiert werden.

**Abb. 6 Vektorkarte von pCR2.1-TOPO.**

MCS: *multiple cloning site*, *LacZα*:  $\beta$ -Galaktosidase Reportergen, f1 Origin: Einzelstrang-Replikationsursprung, Kan<sup>R</sup>: Kanamycin-Resistenzgen, Amp<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenzgen, pUC-Origin: Plasmid-Replikationsursprung.

### pN3 (BD-Clontech, USA)

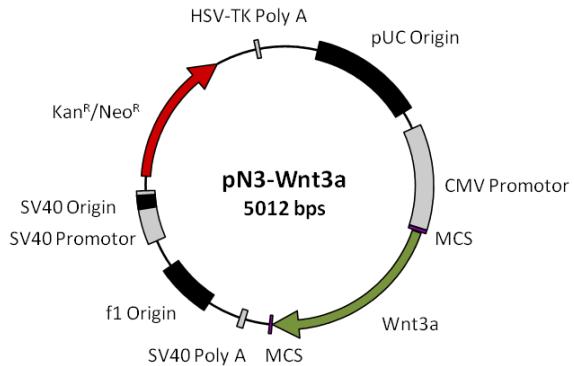
Dieser Überexpressionsvektor ging aus dem Vektor pEGFP-N3 von der Firma BD Clontech hervor und wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Marisa Karow erstellt. Dabei wurde durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Not*I die kodierende Sequenz für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) ausgeschnitten. Nach einer Auffüllreaktion durch das Klenow-Enzym wurde der Vektor religiert. Über das Antibiotika-Resistenzgen können sowohl *E. coli*-Klone, welche das Plasmid tragen, mit Hilfe von Kanamycin als auch stabil transfizierte eukaryotische Zellen mittels Neomycin selektiert werden.

**Abb. 7: Vektorkarte von pN3.**

CMV-Promotor: Humaner Cytomegalievirus Promotor MCS: *multiple cloning site*, SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignal des Polyomavirus SV40, f1 Origin: Einzelstrang-Replikationsursprung, SV40 Origin: Polyomavirus SV40 Replikationsursprung, Kan<sup>R</sup>/Neo<sup>R</sup>: Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen, HSV-TK Poly-A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex, pUC-Origin: Plasmid-Replikationsursprung.

### pN3-Wnt3a

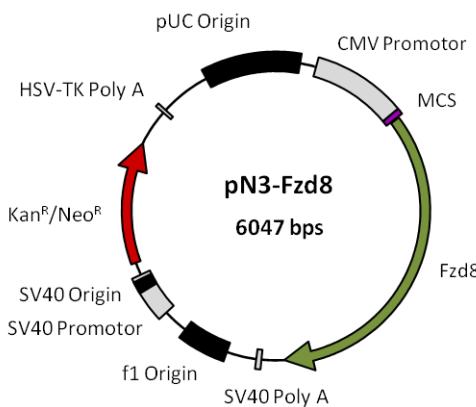
Der Überexpressionsvektor pN3-Wnt3a entstammt ebenfalls aus der Arbeit von Frau Dr. Karow. Hierbei wurde die kodierende Sequenz des humanen Wnt3a durch eine PCR mit cDNA aus humanen Plazenten als Matrize gewonnen. Über eine TOPO-TA-Klonierung wurde das Amplikon zur Sequenzierung in den Vektor pCR2.1-TOPO gebracht. Nach Sequenzprüfung durch Sequenzierung erfolgte die Umklonierung in den pN3-Vektor.

**Abb. 8: Vektor-Karte des pN3-Wnt3a.**

CMV-Promotor: Humaner Cytomegalievirus Promotor MCS: *multiple cloning site*, SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignal des Polyomavirus SV40, f1 Origin: Einzelstrang-Replikationsursprung, SV40 Origin: Polyomavirus SV40 Replikationsursprung, Kan<sup>R</sup>/Neo<sup>R</sup>: Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen, HSV-TK Poly-A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex, pUC-Origin: Plasmid-Replikationsursprung.

### pN3-Fzd8

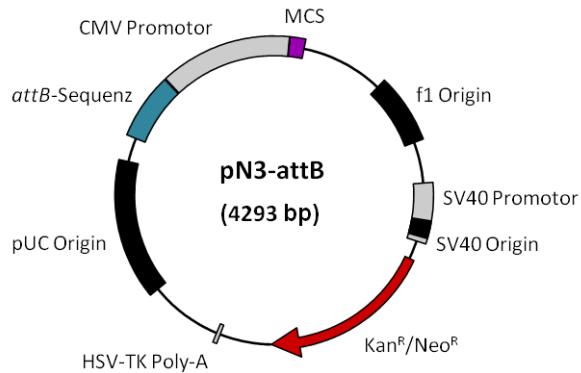
Analog zur Klonierung von Wnt3a wurde die kodierende Sequenz von Fzd8 in den Überexpressionsvektor pN3 eingebracht. Auch hier erfolgte dies über den Zwischen-schritt einer TOPO-TA-Klonierung (Kolben et al. 2012; Lechner 2011).

**Abb. 9: Vektor-Karte des pN3-Fzd8.**

CMV-Promotor: Humaner Cytomegalievirus Promotor MCS: *multiple cloning site*, SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignal des Polyomavirus SV40, f1 Origin: Einzelstrang-Replikationsursprung, SV40 Origin: Polyomavirus SV40 Replikationsursprung, Kan<sup>R</sup>/Neo<sup>R</sup>: Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen, HSV-TK Poly-A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex, pUC-Origin: Plasmid-Replikationsursprung.

### pN3-attB

Das Grundgerüst des pN3-attB stellt wie beschrieben der Vektor pEGFP-N3 dar. Zusätzlich wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Jürgen Hölters die *attB*-Sequenz aus dem Genom des Bakteriums *Streptomyces coelicolor* über die singuläre Asel-Schnittstelle des pN3-Vektors in denselben eingebracht (Hoelters 2009). Mittels dieser 291 bp langen Sequenz wird eine gerichtete stabile Transfektion – katalysiert durch die  $\Phi$ C31-Integrase – in pseudo *attP*-Sequenzen des eukaryotischen Genoms ermöglicht (Thyagarajan et al. 2001).

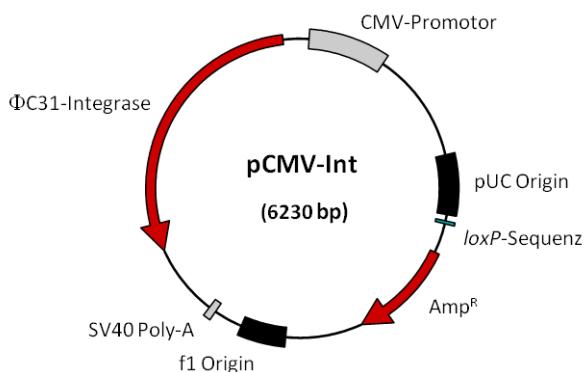


**Abb. 10: Vektor-Karte von pN3-attB.**

attB-Sequenz: bakterielle Bindungsstelle, CMV-Promotor: Humaner Cytomegalievirus Promotor, MCS: *multiple cloning site*, SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignal des Polyomavirus SV40, f1 Origin: Einzelstrang-Replikationsursprung, SV40 Origin: Polyomavirus SV40 Replikationsursprung, Kan<sup>R</sup>/Neo<sup>R</sup>: Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen, HSV-TK Poly-A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex, pUC-Origin: Plasmid-Replikationsursprung.

### pCMV-Int

Dieses Plasmid wurde von Frau Prof. Dr. Michele Calos (Department of Genetics, Stanford University, USA) bereitgestellt. Es gestattet die konstitutive Expression der  $\Phi$ C31-Integrase unter Kontrolle eines CMV-Promotors, die wiederum die stabile Transfektion von *attB*-Sequenz-tragenden Plasmiden vermittelt (Thyagarajan et al. 2001). Eine Selektion mittels Ampicillin hinsichtlich Plasmid-transformierter *E. coli*-Bakterien ist durch das auf dem Vektor kodierte Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht.



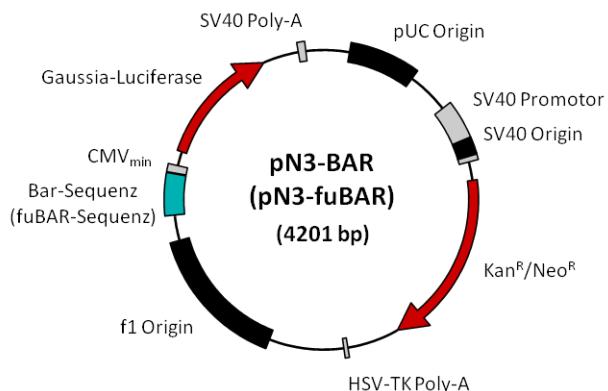
**Abb. 11: Vektor-Karte von pCMV-Int.**

$\Phi$ C31-Integrase: Integrase des Phagen  $\Phi$ C31, CMV-Promotor: Humaner Cytomegalievirus Promotor, pUC-Origin: Plasmid-Replikationsursprung, loxP-Sequenz: *LoxP*-Rekombinationssequenz, Amp<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenzgen, f1 Origin: Einzelstrang-Replikationsursprung, SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignal des Polyomavirus SV40.

### pN3-BAR ( $\beta$ -catenin *active response*) und pN3-fuBAR (*found unresponsive BAR*)

Als Grundgerüst kam auch hier wieder der pN3-Überexpressionsvektor zum Einsatz. Zuerst wurde mit *Hind*III und *Xba*I die kodierende Sequenz der *Gaussia-Luciferase* mit einer Länge von 614 bp aus dem Vektor SUPER8TOP geschnitten, um diese mittels einer Ligase-Reaktion mit einem über *Hind*III und *Xba*I geöffneten pN3-Vektor zu verknüpfen. Im zweiten Schritt wurde der CMV-Promotor des pN3-Vektors ausgetauscht.

Zum einen mit der BAR- und zum anderen für einen Kontrollvektor mit der fuBAR-Sequenz aus dem pGL3-BAR- bzw. pGL3-fuBAR-Vektor, die freundlicherweise von Prof. Dr. Randal T. Moon (Department of Pharmacology, University of Washington, USA) bereitgestellt worden waren. Die BAR-Sequenz besteht aus 12 Wiederholungen von TCF/LEF-Bindestellen mit der Konsensussequenz AGATCAAAGG, welche durch unterschiedlich zusammengesetzte Spacersequenzen (4 bp) voneinander getrennt sind (Biechele und Moon 2008). Damit steht die Gaussia-Luciferase unter direkter Kontrolle der Transkriptionsfaktoren TCF/LEF und  $\beta$ -Catenin. Über die Expression der Gaussia-Luciferase kann somit die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität von pN3-BAR-tranfizierten Zellen quantifiziert werden. Deshalb wird im Weiteren das pN3-BAR-Plasmid als TCF/LEF-Reportergen-Konstrukt bezeichnet. Im Kontrollvektor pN3-fuBAR liegen diese TCF/LEF-Sequenzen mutiert vor (AGGCCAAAGG), wodurch ein Binden der Transkriptionsfaktoren TCF/LEF und  $\beta$ -Catenin unterbleibt. Beide Vektoren wurden von Frau Claudia Geißler und Frau Dr. Marisa Karow generiert.



**Abb. 12: Vektorkarten der Vektoren pN3-BAR und pN3-fuBAR.**

BAR-Sequenz:  $\beta$ -catenin *active response*, fuBAR: *found unresponsive BAR*, Gaussia-Luciferase: Luciferase aus *Gaussia princeps*, CMV<sub>Min</sub>: Minimaler humarer Cytomegalievirus Promotor, SV40 Poly-A: Polyadenylierungssignal des Polyomavirus SV40, pUC-Origin: Plasmid-Replikationsursprung, SV40 Origin: Polyomavirus SV40 Replikationsursprung, Kan<sup>R</sup>/Neo<sup>R</sup>: Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen, HSV-TK Poly-A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex, f1 Origin: Einzelstrang-Replikationsursprung.

### Frizzled-Expressionsvektoren

Die in Tab. 2 aufgeführten Expressionsplasmide dienten zum einen – in unterschiedlichen Verdünnungen – als Standards für die quantitative RT-PCR und zum anderen als Matrize für präparative PCRs der Fzds zur Umklonierung in den pN3-Überexpressionsvektor. Als Vektorrückgrat kamen in den Konstrukten von Origene (Rockville, USA) der pCMV6-XL4 (4704 bp), der pCMV6-XL5 (4479) und der pCMV6-XL4 (4480) zum Einsatz. Im Fall des EST-Klons von Fzd7, bezogen von der Firma Imagene (Nottingham, Großbritannien), dient der pOTB7 als Vektorrückgrat. Nur der Rezeptor Fzd8 wurde nicht kommerziell erworben, sondern lag schon kloniert im pN3-Überexpressionsvektor vor (Lechner 2011).

	Vektorbezeichnung	Vektorrückgrat	Insert (bp)	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
Fzd1	SC117910	pCMV6-XL4	4300	Ampicillin	Origene
Fzd2	SC127603	pCMV6-XL4	2170	Ampicillin	Origene
Fzd3	SC107940	pCMV6-XL5	3900	Ampicillin	Origene
Fzd4	SC115479	pCMV6-XL6	4700	Ampicillin	Origene
Fzd5	SC117952	pCMV6-XL4	2500	Ampicillin	Origene
Fzd7	IRAU969F0465D	pOTB7	3061	Chloramphenicol	Imagene
Fzd8	pN3-Fzd8	pN3	2085	Ampicillin	Labor AG Neth
Fzd9	SC117912	pCMV6-XL4	2000	Ampicillin	Origene
Fzd10	SC115678	pCMV6-XL4	3000	Ampicillin	Origene

Tab. 2: Fzd-Vektoren.

## Oligonukleotide für Klonierungen und PCR

### Klonierungen für die Ligation in das Vektorrückgrat pN3

Mit Hilfe der in der Tab. 3 aufgeführten Oligonukleotide wurden Fzd1- und Fzd5-Amplikons zur Klonierung in den pN3-Überexpressionsvektor, generiert. In beiden Fällen trugen dafür die Oligonukleotide in der *forward*-Primer-Sequenz die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Hind*III und in der *reverse*-Primer-Sequenz für das Restriktionsenzym *Spe*l.

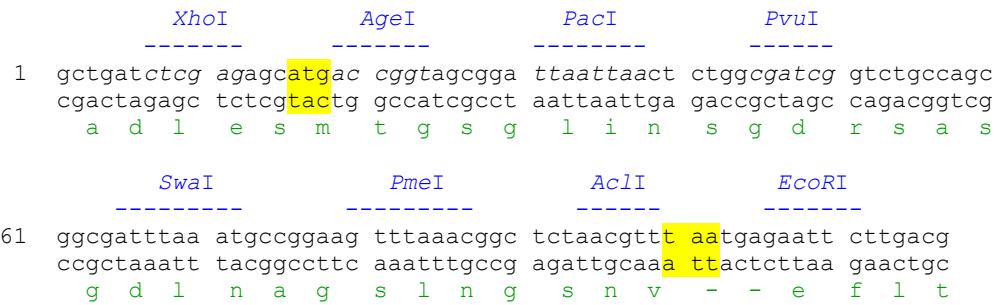
Kloniertes Gen (GenBank-ID)	Bezeichnung	Forward-Primer-Sequenz Reverse-Primer-Sequenz	Produkt (bp)
Fzd1 (NM_003505)	Cloning_Fzd1_f Cloning_Fzd1_r	5'-AAGCTT <b>ATGGCT</b> GAGGAGGA-3' 5'-ACTAG <b>TTCA</b> GACTGTAGTCTCCCCT-3'	1956
Fzd5 (NM_003468)	Cloning_Fzd5_f Cloning_Fzd5_r	5'-AAGCTT <b>ATGGCT</b> CGGCCTGACCCATC-3' 5'-ACTAG <b>TCTACAC</b> GTGCGACAGGGACAC-3'	1770

Tab. 3: Oligonukleotide zur Generierung der Fzd1- und Fzd5-Konstrukte im pN3-Rückgrat.

Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind in kursiver Schrift, Start- und Stoppkodon sind fett hervorgehoben.

### Oligonukleotide zur Erstellung des pN3-SoiToiGoi (Signal Sequence of interest; Tag of interest; Gene of interest)

Um eine Klonierung in modularen Schritten zu ermöglichen, wurden mittels der Soi-ToiGoi-Sequenz 6 Erkennungsstellen für selten schneidende Restriktionsenzyme in den pN3-Überexpressionsvektor eingebracht. Dies wurde über die Schnittstellen für *Xba*I und *Eco*RI an den Enden der Oligonukleotide bewerkstelligt (Abb. 13). Die Restriktionschnittstellen für die selten schneidenden Restriktionsenzyme sind dabei getrennt durch Spacersequenzen, die zusammen mit den Schnittstellen und den klonierten DNA-Fragmenten in einem Leserahmen liegen. Das Startkodon und das Stoppkodon sind gelb hinterlegt.

**Abb. 13: SoiToiGoi-Fragment zur Generierung einer **flexiblen cloning site** im pN3-Vektor.**

Dargestellt ist die DNA-Sequenz des SoiToiGoi-Fragments, welches durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide generiert wurde. In blau sind die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme eingezzeichnet. In grün sind die Aminosäuren dargestellt. Start- und Stoppkodon sind gelb hinterlegt.

#### Oligonukleotide für Klonierungen im Vektorrückgrat pN3-SoiToiGoi: Signalsequenz

Über die in Tab. 4 aufgeführten Primer wurden mittels einer PCR die Signalsequenzen von Fzd5 bzw. Wnt3a zur späteren Klonierung in den pN3-SoiToiGoi generiert. Die *forward*-Primer tragen hierbei die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *AgeI* und die *reverse*-Primer die Schnittstelle für *PacI*.

GenBank-ID	Bezeichnung	Forward-Primer-Sequenz Reverse-Primer-Sequenz	Produkt (bp)
Fzd5 (NM_003468)	Fzd5-Soi-for Fzd5-Soi-rev	5'-AGC <b>ATG</b> ACCGGTGCTCGGCCTGACCCATCCGC-3' 5'-CCAGAG <b>TTA</b> ATTAGGC <b>GGCC</b> GGCCACCA-3'	101
Wnt3a (NM_033131)	Wnt3a-Soi-for Wnt3a-Soi-rev	5'-AGC <b>ATG</b> ACCGGTATGGCCCCACTCGGATACTT-3' 5'-CCAGAG <b>TTA</b> ATTACGACC <b>ACAG</b> ATGGTAGC-3'	101

**Tab. 4: Oligonukleotide zur Generierung des pN3-Fzd5-Soi und des pN3-Wnt3a-Soi.**

Das Startkodon ist fett hervorgehoben und die Erkennungsssequenzen für die Restriktionsenzyme sind kursiv dargestellt.

#### Oligonukleotide für Klonierungen im Vektorrückgrat pN3-Fzd5-Soi und pN3-Wnt3a-Soi

Mittels der flexiblen Klonierungsstrategie wurden Fzd1, 3, 5, 6 und 7 sowie Wnt3 und Wnt3a in die pN3-Überexpressionsplasmide mit den entsprechenden Signalsequenzen eingebracht. In Tab. 5 sind die dafür notwendigen Primer aufgelistet, die *forward*-Primer-Sequenzen zeichnen sich hierbei durch eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *PmeI* und die *reverse*-Primer-Sequenzen durch eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *AclI* aus.

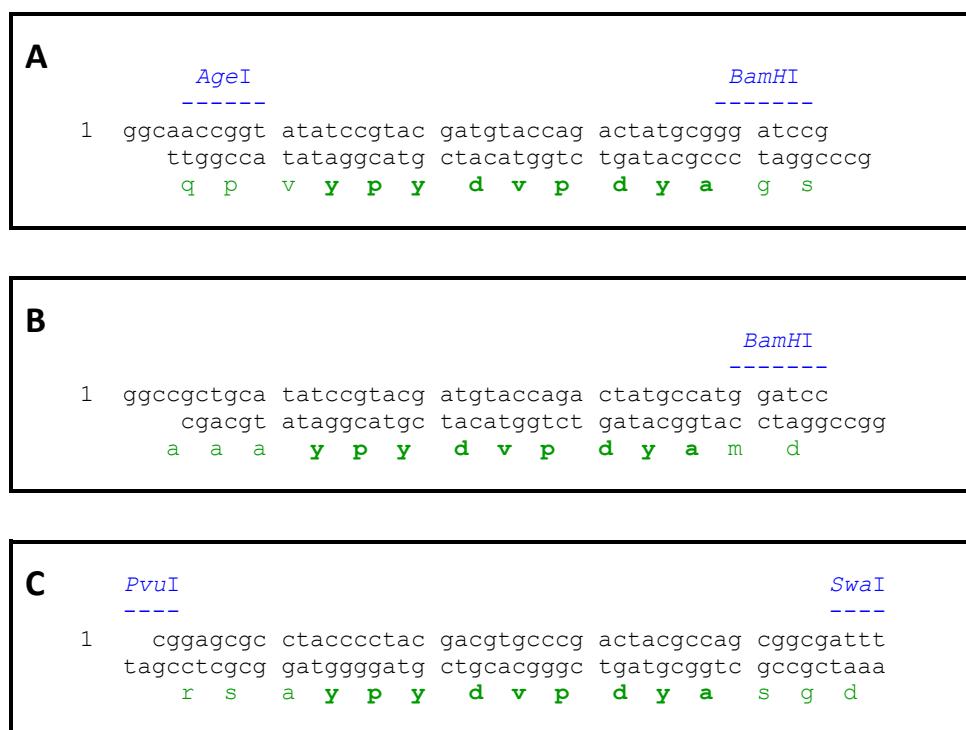
GenBank-ID	Bezeichnung	Forward-Primer-Sequenz Reverse-Primer-Sequenz	Prod. (bp)
Fzd1 (NM_003505)	Fzd1-Goi-for Fzd1-Goi-rev	5'-CCGGAAG <b>TTTAAAC</b> GTCGGGGCCAGGC <b>GGCGGG</b> -3' 5'-TCAT <b>TTAACGTT</b> CAGACTGTAGTCTCCCTTGTGCTG-3'	1763
Fzd3 (NM_017412)	Fzd3-Goi-for Fzd3-Goi-rev	5'-CCGGAAG <b>TTTAAAC</b> CACAGTTGTTCTTG <b>GAAC</b> -3' 5'-TCAT <b>TTAACGTT</b> AAGC <b>ACTGGTCC</b> CATCTTC-3'	1961
Fzd5 (NM_003468)	Fzd5-Goi-for Fzd5-Goi-rev	5'-CCGGAAG <b>TTTAAAC</b> GCGTCAAGGCCCGGTGTG-3' 5'-TCAT <b>TTAACGTT</b> CACGTGCGACAGGGACACCTGCTTG-3'	1703

Fzd5 (NM_003468)	Fzd5-Goi-rev mit Stopp intern	5'-TCATTAAACGTTCTACACGTGCGACAGGGACACCTGC-3'	1706
Fzd6 (NM_003506)	Fzd6-Goi-for Fzd6-Goi-rev	5'-CCGGAAGTTAAACACAGTCTTCACCTGTGA-3' 5'-TCATTAAACGTTCAAGTATCTGAATGACAACC-3'	2093
Fzd7 (NM_003507)	Fzd7-Goi-for Fzd7-Goi-rev	5'-CCGGAAGTTAAACCCAGCGTACCAACGGAGAGAA-3' 5'-TCATTAAACGTTCATACCGCAGTCTCCCC-3'	1655
Wnt3 (NM_030753)	Wnt3-Goi-for Wnt3-Goi-rev2	5'-CCGGAAGTTAAACGGCTACCCAATTGGTGGTC-3' 5'-TCATTAAACGTTCCAGCGCCCTGGTGCCCTA-3'	1048
Wnt3a (NM_033131)	Wnt3a-Goi-for Wnt3a-Goi-rev	5'-CCGGAAGTTAAACCTGGCTGTTGGGCCACAGTA-3' 5'-TCATTAAACGTTCTGCAGGTGTGCACGTCGTA-3'	1007

**Tab. 5: Oligonukleotide, mit deren Hilfe die Fzd- bzw. Wnt-Sequenzen zur Klonierung generiert wurden.**  
Kursiv sind die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme markiert, das Stoppkodon ist fett hervorgehoben.

### Oligonukleotide für die Klonierung der HA-tags

Alle in Abb. 14 dargestellten HA-tags gingen aus der Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotide hervor. Mit Hilfe der Überhänge an den hybridisierten Fragmenten wurden dieselben in die jeweiligen Überexpressionskonstrukte eingebracht. Die Sequenz des HA-tags in den Oligonukleotiden entspricht auf Proteinebene folgender Aminosäure-Sequenz: YPYDVPDYA.



**Abb. 14: Sequenzen der N-terminalen HA-tags.**

In blau sind die Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme eingezeichnet. In grün sind die Aminosäuren dargestellt. Die Sequenz des HA-tags ist hervorgehoben.

A) HA-tag, der in den pN3-Fzd1 über die 5'-Überhänge für die Schnittstelle *EcoO109I* kloniert wurde.

B) HA-tag, welcher in den pN3-Fzd5 über die 5'-Überhänge für die Schnittstelle *NotI* kloniert wurde.

C) Dieser HA-tag wurde über den 3'-Überhang für die Schnittstelle *PvuI* sowie dem stumpfen Ende einer *SwaI*-Schnittstelle in die pN3-SoiToiGoi-Konstrukte eingebracht.

### Oligonukleotide für die quantitative und semiquantitative RT-PCR

Die in Tab. 6 aufgeführten Oligonukleotide und die zugehörigen Sonden wurden über die Software *probe finder* ermittelt, welche über die Internetpräsenz von Roche abrufbar ist (<http://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>). Sie sind Teil des TaqMan-Systems von Roche, auf welches im Abschnitt über die quantitative RT-PCR (siehe 3.2.2.16) näher eingegangen wird.

GenBank-ID	Forward-Primer-Sequenz Reverse-Primer-Sequenz	Bindungsregion der Primer auf der mRNA	Amplikon (bp)	Sonde
Fzd1 (NM_0035015)	5'-CAGAACACGTCCGACAAGG-3' 5'-GTGCTGAGGGTTGCTGGT-3'	1101-1119 1155-1172	72	38
Fzd2 (NM_001466)	5'-CCATCCTATCTCAGCTACAAGTTCT-3' 5'-GCAGCCCTCCTCTGGTG-3'	754-779 1095-1113	360	1
Fzd3 (NM_017412)	5'-GGCAGCCTCCACAGATCA-3' 5'-GACATGCTGCCATGAGGTAG-3'	2237-2254 2303-2322	86	25
Fzd4 (NM_012193)	5'-ACACCGCTCATCCAGTACG-3' 5'-TGCACATGGCACATAAAC-3'	553-571 606-625	73	19
Fzd5 (NM_003468)	5'-CCTGGAGGTGCACCAGTT-3' 5'-TGGCGTGTACATAGAGCAT-3'	602-619 668-687	86	22
Fzd6 (NM_003506)	5'-GAAGCAAAAGACATGCACAGA-3' 5'-TTCGACTTCACTGATTGGATCT-3'	1760-1781 1815-1837	78	23
Fzd7 (NM_003507)	5'-AAGCGGTTGGATGAAAAGA-3' 5'-GATTACATGCCGTTATCA-3'	1976-1995 2024-2043	68	4
Fzd8 (NM_031866)	5'-CGGTCACTCAAGAACAGGA-3' 5'-TGTAGAGCACGGTGAACAGG-3'	1540-1558 1607-1626	87	78
Fzd9 (NM_003508)	5'-GGTCCTGACGCTCACCTG-3' 5'-AGGCAGCCATGTGGAAATAG-3'	1225-1242 1297-1316	92	71
Fzd10 (NM_007197)	5'-TTGGTTTCCAGCGAAGG-3' 5'-CCACAAATTAGTTACACAAGAGGCTA-3'	2400-2417 2436-2461	62	25
Wnt1 (NM_005430)	5'-CGAGTGAAGTGGCAGTTC-3' 5'-AACGCCGTTCTGACAG-3'	471-489 558-575	105	1
Wnt2 (NM_003391)	5'-CGAGGTCAACTCTCATGGTG-3' 5'-GGCACATTATCGCACATCAC-3'	363-383 415-434	72	25
Wnt2b (NM_024494)	5'-TGTAGAGAGTAATCCATAGGGACCAT-3' 5'-AACTCTTCCCAGGGCTAAG-3'	1239-1264 1282-1301	63	20
Wnt3 (NM_030753)	5'-GGCTGTGACTCGCATATAA-3' 5'-CACTAACACGCCGAAGTCAG-3'	436-455 503-522	87	11
Wnt3a (NM_033131)	5'-GGCTTGGAAATGCTCCAG-3' 5'-CAGGTGGTGGTCAAACC-3'	2035-2052 2090-2107	73	73
Wnt4 (NM_030761)	5'-AGCCCTCATGAACCTCCAC-3' 5'-CACCCGCATGTGTGTCAG-3'	653-671 699-716	64	4
Wnt5a (NM_003392)	5'-CCCGATTAGCAGTGTGCAGC-3' 5'-TTCTTGATTGGGAAGATCTGAA-3'	4817-4836 4865-4888	72	1
Wnt5b (NM_030775)	5'-ATGGACGGGTGACAGAGG-3' 5'-AGCAGAGCAGCCGTGAAAC-3'	110-127 204-221	112	37

Wnt6 (NM_006522)	5'-GGTGCTGCGTAGTACAGTGC-3' 5'-TGCAGCTGACAAACAGA-3'	1259-1278 1335-1353	95	70
Wnt7a (NM_004625)	5'-CATGAACTTGACAAACAGA-3' 5'-TGGCACTTACATTCCAGCTTC-3'	842-862 893-913	72	25
Wnt7b (NM_058238)	5'-CGCCTCATGAACCTGCATA-3' 5'-GCTGCATCCGGCTCTA-3'	629-647 672-689	61	4
Wnt8a (NM_058244)	5'-GGAGCTGCAGCATAACAGACA-3' 5'-CCTGGTCATACTTGGCCTT-3'	565-584 629-648	84	71
Wnt8b (NM_003393)	5'-TGTGATGACTCCCGAAC-3' 5'-CCGTGCATCCTGTCCTGT-3'	454-471 568-585	132	37
Wnt9a (NM_003395)	5'-CTGAAGCTGGAGCGGAAG-3' 5'-CAAAGCGGAACCTGGAACGTG-3'	195-212 291-309	115	22
Wnt9b (NM_003396)	5'-GTAAGTGCATGGCTATCA-3' 5'-AGCGCAGTTTCAGCACCT-3'	666-685 744-761	96	38
Wnt10a (NM_025216)	5'-GGGTGCTCCTGTTCTCCTA-3' 5'-GAGGCGGAGGTCCAGAACAT-3'	542-561 604-621	80	71
Wnt10b (NM_003394)	5'-GGCAAGCTGGTGAGCTGT-3' 5'-ACTCTGCCTCGGGACAGT-3'	761-778 844-862	102	11
Wnt11 (NM_004626)	5'-TGTGCTATGGCATCAAGTGG-3' 5'-GCACCTGTGCAGACACCA-3'	185-204 275-292	108	78
Wnt16 (NM_057168)	5'-ACACCACGGGCAAAGAAA-3' 5'-TGACATCAACTGGCGACAG-3'	823-840 892-911	89	11
sFRP1 (NM_003012)	5'-GCTAGAACAAAGGTCTCCTGATCC-3' 5'-AAGGAAAGCCACACAGCTACA-3'	1565-1587 1658-1678	114	38
WIF1 (NM_007191)	5'-TGCCTCACAAGGCATCAGT-3' 5'-TGTTGCCTTCAGAATTCTACAA-3'	525-543 610-632	108	87
GAPDH (NM_002046)	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' 5'-GCCAATACGACCAAATCC-3'	83-101 130-148	66	60

Tab. 6: Oligonukleotide und die zugehörigen Sonden, die über die Software *probe finder* ermittelt wurden.

### Oligonukleotide für die Sequenzierung

Für die von der Firma MWG-Biotech durchgeführten Sequenzierungen wurden die in Tab. 7 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Hierbei wurden die CMV-for- und M13-rev-Primer von MWG-Biotech gestellt. Alle anderen Primer wurden mit der zu sequenzierenden DNA zusammen an die Firma MWG-Biotech gesendet.

CMV-for	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
Fzd6 intern-for	5'-AGTGATGAGCTAGAGTTGC-3'
M13-rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
pCR2.1-Fzd5 Seq	5'-ATTCTGAAGGAGTCACAC-3'
pCR2.1-Fzd1 Seq	5'-AGAAGCGCAGCTCCTC-3'
pN3-Seq-rev2	5'-CAAGTTAACACAAACAATTGC-3'
pN3-Goi-Seq-for	5'-TCGGTCTGCCAGCGGC-3'

Tab. 7: Zur DNA-Sequenzierung verwendete Oligonukleotide.

### 3.1.2.3 Chemikalien und Materialien für zellbiologische Techniken

DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Österreich
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Einfrierbox	Nalgene, USA
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	PAA, Österreich und Sigma-Aldrich, Steinheim
Geniticin	PAA, Österreich
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LiCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Darmstadt
MEM alpha mit L-Glutamin, ohne Nukleoside	PAA, Österreich
Nutridoma	Roche, Mannheim
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	PAA, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich
Poly-D-Lysin	Upstate, USA
Polystyrol-Reaktionsgefäß (5 und 14 ml)	BD Falcon, USA
siRNA-Puffer	Qiagen, Hilden
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Österreich
Zellkulturgefäße (T25, T75)	Corning, USA
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96well)	Corning, USA

### siRNA-Sequenzen

In nachfolgender Tab. 8 sind die einzelnen siRNA-Oligonukleotide sowie deren Ziel-Sequenzen in den entsprechenden Genen dargestellt. Im Fall von Fzd8 wurden 2 unterschiedliche siRNA-Oligonukleotide eingesetzt, um die Effizienz der RNA-Interferenz zu maximieren. Alle siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Zielgen (GenBank ID)	Ziel-Sequenz <i>Sense-Sequenz</i> <i>Antisense-Sequenz</i>	Position der Zielsequenz auf der mRNA
negativ-control (nc)	---	---
	5'-r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)d(TT)-3' 5'-r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)d(TT)-3'	
APC (NM_000038)	5'-AATGAGAGCACTGATGATAAA-3' 5'-r(UGAGAGCACUGAUGAUAAA)d(TT)-3' 5'-r(UUUUAUCAUCAGUGCUCUCA)d(TT)-3'	3275-3293
β-Catenin (NM_001904)	5'-AATGGTTGCCTGCTCAACAA-3' 5'-r(UGGUUGCCUUGCUCACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUUGAGCAAGGCAACCA)d(TT)-3'	1111-1131
Fzd1 (NM_003505)	5'-(AAGCACGGACATCGCGTACAA)-3' 5'-r(GCACGGACAUCGCGUACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUACGCGAUGUCCGUGC)d(TT)-3'	784-800

Fzd2 (NM_001466)	5'-(AACGGTCTACATGATCAAATA)-3' 5'-r(CGGUCUACAUAGAUCAAAUA)d(TT)-3' 5'-r(UAUUUGAUCAUGUAGACCG)d(TT)-3'	1800-1819
Fzd3 (NM_017412)	5'-(AATGCCAAGATTGCCTTATA)-3' 5'-r(UGCCAAGAUUUGCCUUAUA)d(TT)-3' 5'-r(UAUAGGCAAAUCUUGGCA)d(TT)-3'	635-653
Fzd4 (NM_012193)	5'-(AACCATTTGTCATCTGATTAT)-3' 5'-r(CCAUUGUCAUCUUGAUUAU)d(TT)-3' 5'-r(AUAAUCAAGAUGACAAUGG)d(TT)-3'	1387-1407
Fzd5 (NM_003468)	5'-(AATCCTGTCATGGATTACAA)-3' 5'-r(UCCUCUGCAUGGAUUAACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUAAUCCAUGCAGAGGA)d(TT)-3'	844-862
Fzd6 (NM_003506)	5'-(AACAAAGAAACTTGACAGAAA)-3' 5'-r(CAAGAAACUUUGACAGAAA)d(TT)-3' 5'-r(UUUCUGUCAAAGUUUCUUG)d(TT)-3'	2065-2082
Fzd7 (NM_003507)	5'-r(AAGGAAATGTAAGAGGTTTG)-3' 5'-r(GGAAAUGUAAGAGGUUUG)d(TT)-3' 5'-r(CAAAACCUCUUACAUUUC)d(TT)-3'	2856-2876
Fzd8 #1 (NM_031866)	5' - AACTCTGTGCATGGACTACAA-3' 5'-r(CUCUGUGCAUGGACUACAA)d(TT)-3' 5'-r(UUGUAGUCCAUGCACAGAG)TT)-3'	440-460
Fzd8 #2 (NM_031866)	5'-AAGTACTTCATGTGCCTAGTA-3' 5'-r(GUACUCAUGUGCCUAGUA)d(TT)-3' 5'-r(UACUAGGCACAUGAAGUAC)TT)-3'	1770-1789

Tab. 8: Zusammenstellung der verwendeten siRNAs.

## Säugetierzellen

### HEK293 (Invitrogen, Darmstadt)

Die HEK293-Zelllinie ging 1973 aus der gerichteten Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen mit DNA-Fragmenten des Adenovirus 5 hervor (Graham et al. 1977). Die immortalisierte Zelllinie ist im Karyotyp hypotriploid, besitzt Epithelzellcharakter und wächst adhärent.

### hMSC-P (Prockop)

Die verwendeten hMSC wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Darwin Prockop (Tulane University, New Orleans, USA) aus dem oberen Beckenkamm eines männlichen 27 Jahre alten Spenders isoliert. Nach Dichtegradientenzentrifugation erfolgte die Anreicherung der hMSC-Subpopulation durch selektive Adhäsion an Plastik (Sekiya et al., 2002). Im selben Labor wurde auch die Differenzierungskapazität der hMSC in die osteogene, chondrogene und adipogene Richtung experimentell bestätigt. Das Expressionsprofil nach einer durchflusszytometrischen Analyse zeigte, dass die Zellen positiv

für CD29, CD44, CD49c, CD49f, CD59, CD90, CD105, CD147 und CD166 waren. Dagegen konnte keine Expression von CD34, CD36, CD45 und CD117 detektiert werden.

#### HT1080

Die Tumor-Zelllinie HT1080 entstammt der Biopsie eines wenig differenzierten Fibrosarkoms, das bei einem 35jährigen weißer Hautfarbe diagnostiziert wurde. Vollständig charakterisiert wurde die adhärenz wachsende Zelllinie erstmals 1974 (Rasheed et al. 1974).

#### **3.1.2.4 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken**

Acrylamid: Bisacrylamid (37,1:1)	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Carl Roth, Karlsruhe
BC-Assay	Interchim, Frankreich
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
DTT	Carl Roth, Karlsruhe
ECL Plus Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, USA
Gaussia Luciferase Assay Kit	NEB, Frankfurt
Gaussia-Juice	PJK, Kleinblittersdorf
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hypercasette	GE Healthcare, USA
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, USA
Iodacetamid	Fluka Chemie AG, Schweiz
Methanol	JT Baker, USA
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran Protran	Whatman, Dassel
Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope	Biorad, München
Protease Inhibitor Cocktail Set I	Calbiochem, USA
SDS 10 % Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Western-Lightning ECL	PerkinElmer, Rodgau
Whatman Filterpapier Nr. 1	Whatman/Vetter, Ammerbuch

**Rekombinante Proteine**

Humanes Dkk-1	R&D Systems, USA
Humanes Wnt3a	R&D Systems, USA
Murines R-Spondin 1	R&D Systems, USA
Murines Wnt3a	R&D Systems, USA

**Antikörper**

<i>rabbit</i> anti-Fzd5	Millipore, USA
<i>rat</i> anti-HA <i>High Affinity</i> , monoklonal	Roche, Mannheim

**Konjugate**

<i>donkey</i> anti- <i>rabbit HRP-linked</i>	GE Healthcare, USA
<i>goat</i> anti- <i>rat HRP-linked</i>	SCBT, USA
<i>rat</i> anti-HA-Peroxidase <i>High Affinity</i> , monoklonal	Roche, Mannheim

**3.1.3 Bioinformatische Hilfsmittel**

Chromas Lite V 2.01	Technelysium Pty Ltd, Australien
Clone Manager V9.03	SciEDSoftware, USA
Image Master Labscan 3.0	Pharmacia, Freiburg
Image Quest QV 770	Intas, Göttingen
LightCycler3 Software Front V 3.5.17	Roche, Mannheim
LightCycler3 Software Run V 5.32	Roche, Mannheim
LightCycler3 Software Data Analysis V 3.5.28	Roche, Mannheim
Microwin2000 V 4.07	Mikrotek, Overath
Nanodrop 1000 V 3.6.0	PeqLab, Erlangen
XFluor4 Safire2 V 4.62b	Tecan, Crailsheim

**3.2 Methoden****3.2.1 Mikrobiologische Methoden****3.2.1.1 Anzucht und Selektion von *E. coli* Stämmen**

Die Anzucht der *E. coli* Bakterien erfolgte in DYT-Medium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl), welches durch Autoklavieren für 20 Min sterilisiert wurde. Falls hitzelabile Zusätze nötig waren, wurden diese sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) und dem abgekühlten DYT-Medium unter der Sterilbank hinzugegeben. Für Anzuchtplatten mit festem Medium wurde das DYT-Medium vor dem Autoklavieren mit 15 g/l Agar versetzt.

Um resistente *E. coli*-Stämme oder Klone zu selektionieren, wurden zu den Anzucht-Medien bzw. -Platten Ampicillin oder Kanamycin gegeben. Für Ampicillin wurde hierbei eine Endkonzentration von 200 µg/ml und für Kanamycin 50 µg/ml gewählt. Die Stocks wurden als 200 mg/ml- bzw. 50 mg/ml-Lösungen für Ampicillin in 70 %igem Ethanol und für Kanamycin in Aqua dest. generiert.

### 3.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Permeabilität der Zellmembran von *E. coli*-Laborstämmen kann durch Behandlung mit einer Calcium-Chlorid-Lösung dahingehend gesteigert werden, dass Bakterien nackte DNA aus wässriger Lösung in größeren Mengen aufnehmen können. Diese Eigenschaft wird auch Kompetenz bzw. in diesem Fall auch chemische Kompetenz bezeichnet. Hierzu wurde der Laborstamm K12 ER2925 (NEB, Frankfurt) verwendet. Dabei wurden die Zellen in einer Vorkultur (100 ml DYT-Medium) über Nacht bei 37 °C und 200 upm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 400 ml DYT-Medium in einem Fernbach-Kolben mit 4 ml der Übernachtkultur angeimpft und für 2 Std wieder im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 erreicht hatte, wurden die Bakterien bei 2600 x g und 4 °C für 10 Min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 87,5 ml eiskalter Lösung 1 (100 mM MgCl<sub>2</sub>) vollständig resuspendiert und 5 Min auf Eis belassen. Darauf folgte wieder ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 2600 x g für 10 Min, um anschließend das Sediment in 17,5 ml eiskalter Lösung 2 (100 mM CaCl<sub>2</sub>) ausgiebig zu resuspendieren. Die Bakterien wurden nun für 30 Min auf Eis inkubiert, bevor sie bei 2600 x g und 4 °C für 10 Min zentrifugiert wurden. Im letzten Schritt wurde das Sediment in Lösung 3 (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin) resuspendiert und als 50 µl Aliquots bei -80 °C weggefroren.

### 3.2.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 50 µl Aliquots der bei -80 °C gelagerten chemisch kompetenten Zellen auf Eis für 2 Min aufgetaut und mit 2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes resuspendiert. Durch leichtes Antippen wurden die Zellen gemischt und für 30 Min auf Eis inkubiert. Im Wasserbad erfolgte anschließend der Hitzeschock für 45 Sek bei 42 °C. Damit die Antibiotika-Resistenz sich ausbilden konnte, wurden die Zellen daraufhin mit 200 µl SOC-Medium (5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM D(+)-Glukose) versetzt und für 45 Min bei 200 upm und 37 °C geschüttelt. In dieser Zeit wurden die Anzuchtplatten, welche das für die Selektion notwendige Antibiotikum enthielten, bei 37 °C vorgewärmt. Der Transformationsansatz konnte dann auf die Platten ausgestrichen werden und es folgte eine Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

Zur Erstellung von Dauerkulturen einzelner Klone wurde von den Platten eine Kolonie in 3 ml DYT-Medium für eine Übernachtkultur angeimpft. Am folgenden Tag wurde unter sterilen Bedingungen zur Übernachtkultur 530 µl Glycerin zugegeben und vermischt. Die Bakteriensuspension wurde auf Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C weggefroren.

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Plasmidisolierung und Aufreinigung aus *E. coli*

Alle verwendeten Kits für die Plasmidisolierung, der PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I von PeqLab sowie die HiSpeed Midi und Maxi Kits von Qiagen beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Für den Miniprep Kit wurden 3-5 ml *E. coli*-Übernachtkultur eingesetzt, im Fall des Midi Kits 50 ml (*high-copy* Plasmide) bzw. 150 ml (*low-copy* Plasmide) sowie für den Maxi Kit 150 ml (*high-copy* Plasmide) bzw. 250 ml (*low-copy* Plasmide) *E. coli*-Übernachtkultur. Die Elution der Plasmide erfolgte beim Miniprep Kit mit 50 µl Aqua dest., bei den Quiagen Kits mit 500 µl (Midi) und 1 ml (Maxi) TE-Elutionspuffer. Falls nach der Elution die Konzentration der Plasmide zu gering war, wurde zusätzlich eine Isopropanolfällung durchgeführt.

#### 3.2.2.2 Isopropanolfällung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren zu konzentrieren, wurde zuvor eine Alkoholfällung durchgeführt. Dazu wurde das Eluat mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und einem Volumen Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde bei 4 °C und 16.000 x g für 20 Min zentrifugiert, das Sediment mit Ethanol (70 %) gewaschen und luftgetrocknet. Sobald das Sediment durchsichtig war, wurde es in der gewünschten Menge Aqua dest. aufgenommen.

#### 3.2.2.3 Restriktion von DNA-Fragmenten

Die Restriktion wurde mit spezifischen Endonukleasen des Typs II durchgeführt. Dabei wurden entweder im präparativen Maßstab zur Subklonierung die entsprechenden DNA-Fragmente geschnitten und die Vektoren geöffnet, oder die Restriktion diente der Analyse von aus Ligationsreaktionen hervorgegangenen Plasmiden. Zur Ermittlung der benötigten Mengen an Restriktionsenzym (Formel 1) wurden folgende Parameter herangezogen: 1 U stellt dabei die Menge an Restriktionsenzym dar, bei welcher 1 µg genetischer DNA des Phage  $\lambda$  (48.000 bp) in einer Stunde verdaut wird.

$$\text{Menge an RE [U]} = \frac{\text{Anzahl bp im Phage } \lambda}{\text{Anzahl bp im Vektor bzw. Insert}} \times \frac{\text{Anzahl Schnittstellen im Vektor bzw. Insert}}{\text{Anzahl Schnittstellen im Phage } \lambda}$$

**Formel 1: Berechnung der Enzymmenge in Units für einen Restriktionsverdau.**

RE = Restriktionsenzym, U = Unit, bp = Basenpaar

Bei analytischen Restriktionen wurden bis zu 1 µg DNA für 1 Std und bei präparativen Restriktionsverdau-Ansätzen bis zu 12 µg DNA für bis zu 12 Std verdaut. Die aus der Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und im Fall von Subklonierungen aus dem Agarosegel eluiert.

### 3.2.2.4 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die komplementären in Aqua dest. gelösten Oligonukleotide wurden hierfür in gleichen molaren Verhältnissen gemischt und für 5 Min im Heizblock auf 90 °C aufgeheizt und dann in einem Styroporständner auf Raumtemperatur langsam heruntergekühlt.

### 3.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Generierung rekombinanter DNA-Konstrukte wurden die aus der Restriktion, Hybridisierung oder PCR erhaltenen DNA-Fragmente über eine Ligationsreaktion miteinander verknüpft. Im Fall von überhängenden Enden der beteiligten DNA-Fragmente wurde das Insert mit der Zielvektor-DNA im molaren Verhältnis von 3:1, wenn stumpfe Enden an den DNA-Fragmenten vorlagen, im Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Eine Gesamtmenge an DNA von 300 ng pro Ligationsansatz wurde hierbei nicht überschritten. Die Ligation der DNA-Fragmente wurde mittels 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) für 1 Std bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

### 3.2.2.6 TOPO-TA-Klonierung

Die Taq-Polymerase besitzt eine Matrizen-unabhängige terminale Transferase-Aktivität, welche zu einem Anhängen eines dNTP – bevorzugt eines dATPs – an 3'-Enden von PCR-Produkten führt. Diese Eigenschaft macht man sich im TOPO-TA-Cloning Kit von Invitrogen (Darmstadt) zu nutze. Über die an ein dTTP kovalent gebundene Topoisomerase I des linearisierten Vektors pCR2.1-TOPO wird eine effiziente Verknüpfung mit dem PCR-Produkt katalysiert. Da subklonierte PCR-Produkte mit der Phusion Polymerase (Finnzymes, Finnland) generiert wurden und diese Polymerase keine terminale Transferase-Aktivität besitzt, mussten mit der Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) dATPs in einem 50 µl Reaktionsansatz angehängt werden (Tab. 9). Die Reaktion wurde bei 72 °C für 30 Min ausgeführt.

Komponenten	Endkonzentration
PCR-Produkt	2 µg
10x PCR-Puffer	5 µl (1x)
5x Q-Solution	10 µl (1x)
dATPs (10 mM)	1 µl (200 µM)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl (2,5 U)
Aqua dest.	Auf 50 µl

Tab. 9: Reaktionsansatz zur Ausbildung eines 3'-A-Überhangs an PCR-Produkten mit glatten Enden.

Für die TOPO-TA-Klonierung wurden 2 µl des frischen PCR-Ansatzes mit 1 µl der mitgelieferten Salz-Lösung (TOPO-TA-Cloning Kit) sowie 1 µl des Vektors mit 2 µl Aqua dest. auf 6 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 10 Min bei RT inkubiert und konnte dann für die Transformation eingesetzt werden.

### 3.2.2.7 Klenow-Enzym-vermittelte Auffüllreaktion

Das Klenow-Enzym besteht aus der großen Untereinheit der DNA Polymerase I aus *E. coli* und ist durch eine 5'→3' Polymerase-Aktivität sowie einer 3'→5' Exonuklease-Aktivität charakterisiert. Diese Eigenschaften können zum einen genutzt werden, um 3'-Überhänge in 5'→3'-Richtung aufzufüllen oder um 5'-Überhänge zu trimmen. Pro µg DNA wurde 1 U Klenow-Enzym in einem Ansatz mit dNTPs in einer Endkonzentration von 33 µM in 1x NEBuffer 2 für 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von EDTA in der Endkonzentration von 1 mM und einer Inkubation für 20 Min bei 72 °C wurde das Klenow-Enzym inaktiviert.

### 3.2.2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR lassen sich DNA-Abschnitte nahezu exponentiell amplifizieren. Dies lässt sich u.a. für einen präparativen PCR-Ansatz nutzen, um ein spezifisches DNA-Fragment in Konzentrationen zu gewinnen, mit denen eine Subklonierung möglich ist. Die Amplifikation der DNA-Abschnitte wird durch eine zyklische Abfolge von Strangtrennung der DNA, Anlagerung von komplementären Oligonukleotiden und Verlängerung in 5'→3'-Richtung mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase erreicht. In Tab. 10 sind die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Polymerasen mit den benötigten Komponenten für die jeweiligen PCR-Ansätze aufgelistet. Bei der präparativen PCR kamen die Polymerasen Phusion *High Fidelity* und die Phusion *Flash* von Finnzymes (Finnland) zum Einsatz, da diese Polymerasen eine besonders niedrige Fehlerrate ( $4,4 \times 10^{-7}$ ) aufweisen. Für die qualitativen PCRs sowie analytischen Kolonie-PCRs wurde die Taq-Polymerase von Qiagen (Hilden) herangezogen. Dabei wurde im Fall der Kolonie-PCR pro *E. coli*-Klon eine Zahnstocherspitze Bakterien in den PCR-Ansatz getaucht.

Komponenten	Taq-Polymerase	Phusion High Fidelity	Phusion Flash
PCR-Puffer	1x Puffer	1x GC-Puffer	-
forward Primer	0,5 µM	1 µM	1 µM
reverse Primer	0,5 µM	1 µM	1 µM
Matrizen-DNA	12,5 ng	10-30 ng	10-30 ng
Additive	1x Q-Solution	3 % DMSO V/V	1x Reaktionsmix (enthält Polymerase, Additive und dNTPs)
Polymerase in U	0,75	0,04-0,08	
dNTPs	80 µM	200 µM	
Gesamtvolumen	15 µl	20 µl oder 50 µl	50 µl

Tab. 10: PCR-Ansätze für verschiedene Polymerasen.

Der Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) wurde für die PCR mit folgenden Programmen für die unterschiedlichen Polymerasen programmiert (Tab. 11).

Schritte	Taq-Polymerase			Phusion High Fidelity			Phusion Flash		
	Temp.	Zeit	Zykl.	Temp.	Zeit	Zykl.	Temp.	Zeit	Zykl.
Initiale Denaturierung	94 °C	4 Min	1	98 °C	1 Min	1	99 °C	10 Sek	1
Denaturierung	94 °C	30 Sek	35	99 °C	30 Sek	34	99 °C	1 Sek	32
Anlagerung	58 °C	30 Sek	35	65 °C	30 Sek	34	72 °C	5 Sek	32
Elongation	72 °C	1 Min/ 1 kb	35	72 °C	30 Sek/ 1 kb	34	72 °C	15 Sek/ 1 kb	32
Finale Elongation	72 °C	10 Min	1	72 °C	10 Min	1	72 °C	1 Sek	1

Tab. 11: PCR-Programme für verschiedene Polymerasen.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden entweder nach gelelektrophoretischer Auftrennung oder direkt über den Gelextraktionskit MinElute (Quiagen, Hilden) aufgereinigt.

### 3.2.2.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Wahrscheinlichkeit einer Religation linearisierter Vektoren kann durch eine Dephosphorylierung der 5'-Enden verringert werden. Diese enzymatische Reaktion wird von alkalinen Phosphatasen katalysiert. Im Rahmen der Arbeit wurden die *Calf intestine Phosphatase* (CIP) sowie die *Antarctic Phosphatase* von NEB verwendet. Im Fall der CIP wurden pro µg DNA 0,5 U Enzym eingesetzt und der Ansatz wurde mit 1x NEBuffer 3 für 1 Std bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der CIP wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt.

Bei der *Antarctic Phosphatase* kamen 5 U Enzym pro µg DNA zum Einsatz. Inkubiert wurde der Reaktionsansatz mit dem mitgelieferten Puffer für 15 Min bei 37 °C. Eine Isopropanolfällung war daraufhin nicht mehr nötig, da die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 5 Min gestoppt wurde.

### 3.2.2.10 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragment-Gemische trennen sich innerhalb eines Agarosegels unter Einfluss ionischer Pufferlösungen bei Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes der Größe nach auf. Dieses Verhalten macht man sich zu Nutze, um ein DNA-Fragment spezifisch zu isolieren, oder die Sequenzidentität einer DNA-Spezies zu überprüfen. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit Agaroseanteilen von 0,6-3 % generiert. So wurden beispielsweise Konzentrationen von 3 % bei Fragmentlängen unter 300 bp und Konzentrationen von 0,6 % Agarose bei Längen über 8000 bp gewählt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) durch Erhitzen in der Mikrowelle für etwa 3 Min gelöst. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf etwa 60 °C wurde Ethidiumbromid in der Endkonzentration von 0,05 % zugegeben. Nach Erstarren des Agarosegels wurden die Proben mit 6x Gel-Ladepuffer versehen und aufgetragen. Abhängig von der Konzentration der Agarose wurden bei hohen Konzentrationen 60 V und bei niedrigen Konzentrationen 120 V Spannung angelegt. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators (302 nm) konnte die DNA aufgrund der Interkalierung von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

### 3.2.2.11 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Für DNA-haltige Gelstücke, welche mit Hilfe eines Skalpells aus den Agarosegelen ausgeschnitten wurden, wurde zur Isolation der DNA der Gelextraktionskit MinElute von Qiagen verwendet. Dafür wurde die ausgeschnittene Gelbande mit einem 3fachen Volumen Guanidiniumsalz-Puffer versetzt und bei 50 °C für 10 Min im Wasserbad unter kurzen Vortex-Schritten gelöst. Durch die chaotrope Wirkung des Guanidiniumthiocyanats konnte dann eine Silicamembran mit der DNA beladen werden. Die Salze wurden daraufhin in mehreren Waschschritten mit Hilfe ethanolhaltiger Puffer ausgewaschen. Mit Aqua dest. wurde die DNA eluiert. Auch zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde der Gelextraktionskit MinElute verwendet, hierfür wurde aber der Heizschritt zu Beginn der Extraktion unterlassen.

### 3.2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurde von der Firma MWG-Biotech vorgenommen und beruhen auf dem Prinzip der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Zur Probenvorbereitung wurde die zu sequenzierende DNA auf eine Konzentration von 100 ng/µl gebracht und – falls Primer mitgesendet wurden – diese auf eine Endkonzentration von 2 µM eingestellt. Die Auswertung der Elektropherogramme wurde mit Hilfe des Programms Chromas Lite durchgeführt und die Identität der Sequenzen durch

Alignments im Clone Manager Programm oder über die Datenbank NCBI BLAST überprüft.

### 3.2.2.13 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung der RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Dazu wurden die Zellen entweder vorher aus den Kavitäten trypsiniert und nach einem Waschschritt mit PBS als Sediment oder direkt in den Kavitäten nach dem Waschen mit PBS in 350 µl RLT-Lysepuffer aufgenommen. Zur Beseitigung von Zelltrümmern und Reduktion der Viskosität wurde das Lysat auf eine QIAshredder-Säule geladen und für 2 Min bei maximaler Geschwindigkeit (16.400 x g) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Filtrat wurde dann mit dem gleichen Volumen (350 µl) 70 %igem Ethanol versetzt und nach Mischen durch Auf- und Abpipettieren in eine RNeasy-Mini Säule überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 Sek bei max. Geschwindigkeit. Die an die Säule gebundene RNA wurde nach Zugabe von 700 µl RW1-Puffer durch Zentrifugation (15 Sek bei max. Geschwindigkeit) gewaschen. Daraufhin folgten 2 Waschschritte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer unter gleichen Zentrifugationsbedingungen. Zur Trocknung wurden die RNeasy-Mini Säulen für 2 Min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA mit 30 µl RNAse-freiem Wasser durch Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit für 1 Min eluiert.

### 3.2.2.14 Photometrische Quantifizierung der DNA und RNA

Zur Messung der Konzentration und Bestimmung der Reinheit der DNA- und RNA-Lösungen wurde im Nanodrop-Photometer die Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dazu wurden 1,5 µl der zu vermessenden Nukleotid-Lösung am Nanodrop 1000 unverdünnt gemessen. Die Konzentration der Nukleotide wird vom Photometer dabei automatisch berechnet: bei doppelsträngiger DNA entspricht dabei eine OD<sub>260nm</sub> von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml und bei einzelsträngiger RNA von 44 µg/ml. Der Koeffizient OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> gibt die Reinheit an. Es wurde immer nur DNA mit einem OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>-Verhältnis zwischen 1,6-2,0 sowie RNA mit einer Ratio über 1,9 verwendet.

### 3.2.2.15 cDNA-Synthese

Die einzelsträngige cDNA für die qualitative und quantitative PCR wurde mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription-Kit (Qiagen, Hilden) generiert. Die Reverse Transkriptase besitzt zwei dafür notwendige enzymatische Aktivitäten. Im ersten Schritt wird die einzelsträngige RNA durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität zu einem doppelsträngigen RNA-DNA-Hybrid ergänzt, während im zweiten Schritt mittels der

RNAse H-Aktivität die RNA abgebaut wird, wobei die einzelsträngige cDNA verbleibt. Die eingesetzte Menge für das Umschreiben der Total-RNA betrug entweder 250 ng oder 1000 ng in einem Gesamtvolumen von 12 µl Aqua dest. Zuerst erfolgte ein Verdau der Reste an genomicscher DNA in der Total-RNA für 2 Min bei 42 °C durch Zugabe von 2 µl gDNA *Wipeout Buffer*. Nach Überführen der Proben auf Eis konnten nun die restlichen Komponenten zur reversen Transkription in Form eines Mastermixes wie folgt hinzupipettiert werden (Tab. 12).

Komponenten	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
QuantiTect Reverse Transkriptase	1 µl	
QuantiTect RT Puffer 5 x	4 µl	1x
RT-Primer-Mix	1 µl	700 nM
Total-RNA nach gDNA-Elimination	14 µl	250 ng oder 1000 ng

Tab. 12: cDNA-Synthese-Ansatz.

Der eingesetzte RT-Primer-Mix besteht aus Oligo-dT- sowie randomisierten Hexamer-Oligonukleotiden, was ein Umschreiben sowohl der 3'- als auch 5'-Regionen der mRNA erlaubt. Nach der reversen Transkription der RNA im Ansatz bei 42 °C für 30 Min wurde die Reverse Transkriptase bei 95 °C für 3 Min inaktiviert.

### 3.2.2.16 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der mRNA-Transkriptmengen mittels des LightCycler-Systems der Firma Roche wurden mit dem SYBR Green I-System und dem TaqMan-Prinzip zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Bei beiden Verfahren erfolgte eine relative Quantifizierung mit externen Standards. Hierbei wurde zur Berechnung der mRNA-Kopienzahlen mittels einer Standardkurve die in der LightCycler Software implementierte *Second derivative Maximum* Methode verwendet (Rasmussen 2001).

Da die Versuche immer als biologische Triplikate angelegt waren, wurden die Transkriptmengen in jeweils 3 Proben und 3 Kontrollen zur Evaluierung einer Versuchsbedingung quantifiziert. Neben der Bestimmung der spezifischen Transkriptmenge des untersuchten Gens wurde auch die mRNA-Menge des *housekeeping* Gens GAPDH quantifiziert. Die Expression wurde daraufhin auf die GAPDH-Kopienzahl normalisiert oder relativ zur Expression des untersuchten Gens in der Kontrolle gesetzt.

#### SYBR Green I-System

Diese Quantifizierungsmethode beruht auf dem Farbstoff SYBR Green I. Sobald dieser in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkaliert, wird bei gleicher Intensität der Absorption ( $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$ ) die emittierte Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ ) um ein Vielfaches verstärkt. Die Intensität der Fluoreszenz wiederum ist direkt proportional zur

Anzahl der vorhandenen Doppelstränge. Im LightCycler-System macht man sich diese Eigenschaft des Farbstoffs bei der Neusynthese von DNA-Doppelsträngen durch eine Taq-Polymerase innerhalb der exponentiellen Phase der PCR zu Nutze, indem man aufgrund der Spezifität der Primer über die Verdopplung der Intensität der Fluoreszenz nach jedem Zyklus direkt auf die Menge des vorhandenen mRNA-Transkripts rückschließen kann.

Voraussetzung für die exakte Quantifizierung ist eine Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter Kopienanzahl des mRNA-Transkripts. Die spezifischen Primersets sowie die zugehörigen Standards wurden als Kits von der Firma Search-LC ([www.search-lc.de](http://www.search-lc.de)) bezogen. Die weiteren Zusätze waren Teil des FastStart SYBR Green Master Kit I (Roche, Mannheim) und beinhalteten eine *Hot Start* Taq-Polymerase sowie dNTPs und MgCl<sub>2</sub> in einem PCR-Puffer-Mix. Für einen Ansatz wurden jeweils 1 µl des Primersets, des FastStart SYBR Green Mix sowie der cDNA bzw. des Standards oder der Wasserkontrolle mit 7 µl Aqua dest. in einer LC-Kapillare auf das Gesamtvolumen von 10 µl zusammengeführt. Das Programm für die qRT-PCR wurde anhand der Vorgaben von Search-LC durchgeführt (Tab. 13). Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Ansätze auf 58 °C temperiert und mit 0,1 °C/Sek auf 95 °C geheizt.

Schritte	Temp.	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min	1
Denaturierung	95 °C	10 Sek	35
Anlagerung	68 °C → 58 °C (0,5 °C pro Zyklus)	10 Sek	35
Elongation	72 °C	16 Sek	35
Schmelzkurve	58°C → 95 °C (10 Sek, 0,1 °C pro Sek)	6 Min 10 Sek	1

Tab. 13: qRT-PCR-Programm mit Schmelzkurvenanalyse für das SYBR Green I-System.

### TaqMan-Prinzip

Bei diesem Verfahren wurde die *Universal Probe Library* (UPL) von der Firma Roche verwendet. Dabei wird das Phänomen des *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) genutzt. Zwei Fluorochrome liegen auf einem kurzen Oligonukleotid, der sogenannten Sonde, in direkter räumlicher Nähe. Ein Fluorochrom übernimmt dabei die Funktion des Reporters und das andere die des Quencher. Wird der Reporter mit seiner spezifischen Wellenlänge angeregt, kommt es durch den FRET zu einer Übertragung der Energie auf den Quencher, wobei die Fluoreszenzemission unterdrückt wird. Bindet nun eine Sonde zwischen den Primern, wird bei der PCR durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase die Sonde abgebaut. Dabei werden beide Fluorochrome freigesetzt, wodurch die Fluoreszenz des Reporters, welche in der Gesamtheit proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge ist, gemessen werden kann. Für die Auswahl der Transkript-spezifischen Sonden und Primer wurde die auf

der Internetpräsenz von Roche angebotene Software *probe finder* genutzt. Dabei wurden Sonde und Primer anhand der von Roche empfohlenen qRT-PCR-Bedingungen ausgewählt.

Für die Standards wurden die in Tab. 2 (S. 13) aufgeführten oder die in dieser Arbeit generierten Plasmide verwendet. Dafür wurde zuerst mit Hilfe der Formel 2 die Masse von 10 Milliarden Plasmid-Kopien in Nanogramm ermittelt, um Stocklösungen für die Standards zu erstellen. Ausgehend von der Stocklösung wurden in 10er Schritten die Verdünnungen bis zu den gewünschten Kopienzahlen erstellt.

$$\frac{\text{Anzahl bp Plasmid} \cdot \text{MG eines bp} \cdot 10^{19} \text{ Kopien}}{N_A} = \text{Masse von 10 Milliarden Plasmidkopien [ng]}$$

**Formel 2: Berechnung der Plasmid-Stocklösungen für die Standards.**

bp = Basenpaar, MG = Molekulargewicht,  $N_A$  = Avogadro-Konstante ( $\approx 6,022 \times 10^{23}$ )

Unter Verwendung der Komponenten des LightCycler TaqMan Master Kit (Roche, Mannheim) wurden die Proben, Standards und die Wasserkontrolle wie in Tab. 14 beschrieben in die jeweiligen Reaktionsansätze pipettiert. Dabei waren eine *Hot Start* Taq-Polymerase sowie dNTPs und MgCl<sub>2</sub> in einem PCR-Puffer-Mix enthalten.

Komponenten	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
5x TaqMan Master Mastermix	2 µl	1x
Sonde	0,1 µl	100 nM
Forward Primer	0,2 µl	2 µM
Reverse Primer	0,2 µl	2 µM
cDNA oder Standard bzw. Aqua dest.	1 µl	12,5 ng oder 50 ng
Aqua dest.	6,5 µl	-
Gesamtvolumen	10 µl	

Tab. 14: Ansatz für die qRT-PCR nach dem TaqMan-Prinzip.

Das Programm der qRT-PCR wurde nach den Vorgaben von Roche für das UPL-System entworfen und umfasst folgende Schritte:

Schritte	Temp.	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min	1
Denaturierung	95 °C	10 Sek	45
Anlagerung	60 °C	30 Sek	45
Elongation	72 °C	1 Sek	45
Finale Verlängerung	40 °C	30 Sek	1

Tab. 15: qRT-PCR-Programm für das TaqMan-Prinzip.

### 3.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die Kryokonservierung der hMSC und HEK293 erfolgte unter gleichem Prozedere, allerdings mit unterschiedlichen Einfriermedien und abweichenden Zellzahlen.

	Medium [%]	FBS [%]	DMSO [%]	Zellzahlen
hMSC	$\alpha$ Mem (65)	30	5	$0,3\text{--}1,2 \times 10^6$
HEK293	DMEM (70)	20	10	$2 \times 10^6$

Die Zellen wurden hierfür bei  $500 \times g$  und 5 Min sedimentiert, mit dem entsprechenden Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml Aliquots in die Kryoröhrchen verteilt. In einer Einfrierbox (Nalgene, USA), die ein gleichmäßiges Abkühlen der Zellen von  $1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  pro Minute im  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  Tiefkühler erlaubt, wurden die Kryoröhrchen für 12-16 Std herabgekühlt, um dann in den Stickstofftank überführt zu werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen bis zum Verbleib eines kleinen Eisklumpens fast vollständig im Wasserbad bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und im Fall der hMSC mit warmem Kulturmedium (10 ml) gemischt und sedimentiert ( $500 \times g$ , 5 Min). Die Zellen wurden anschließend mit Kulturmedium (10 ml pro T75) resuspendiert und in Kulturflaschen überführt. Für die HEK293-Zellen wurden ebenfalls die Zellen wie oben beschrieben im Wasserbad aufgetaut, jedoch dann in eine T25 gegeben, die mit 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium befüllt war. Nach einer halben Stunde im Brutschrank wurden alle nicht adhärenten Zellen vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit frischem Kulturmedium vorsichtig überschichtet.

#### 3.2.3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Zellen wurde bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 90 % Luftfeuchtigkeit im  $\text{CO}_2$ -Inkubator Galaxy S durchgeführt. Im Fall der hMSC wurde alle 3 bis 4 Tage das entsprechende Kulturmedium ( $\alpha$ Mem, 16,5 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin) gewechselt. War in der Zellkultur-Kavität eine Konfluenz von 90-95 % erreicht – was abhängig von der Passage nach 1-4 Wochen der Fall war – wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung gesplittet oder für nachfolgende Experimente in die entsprechenden Zellkulturkavitäten ausgesät bzw. geerntet. Im Fall der HEK293-Zellen mussten die Zellen alle 3-4 Tage gesplittet und in DMEM-Kulturmedium (DMEM, 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin sowie 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin) kultiviert werden.

### 3.2.3.3 Splitten konfluenter Zellen

Wenn hMSC zur Expansion subkultiviert wurden, mussten die adhärenen Zellen zuerst mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung (PBS, 0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA) abgelöst werden. Dazu wurden die Zellen in den Kultur-Kavitäten mit PBS gründlich gewaschen, um vorhandene Mediumreste, welche das Trypsin inhibieren, zu beseitigen. Nach Zugabe der Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation bei 37 °C für 5-10 Min wurde die Reaktion durch Zugabe von vorgewärmtem Kulturmedium abgestoppt. Die hMSC wurden zentrifugiert (500 x g, 5 Min) und in neue Zellkultur-Kavitäten transferiert. Die HEK293-Zellen wurden nach dem Abstoppen des Trypsins direkt in einer 1:10 Verdünnung mit frischem Kulturmedium in eine neue Kavität überführt.

### 3.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Hierzu wurde auf eine Neubauer-Zählkammer zurückgegriffen, in der die Zellen mikroskopisch ausgezählt wurden. Mit Hilfe nachstehender Formel konnte auf die Gesamtzellzahl rückgeschlossen werden.

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{ml Zellsuspension}} = \frac{n_{\text{Zellen aller Quadrate}}}{\text{Anzahl Quadrate}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.2.3.5 Transfektion von Plasmiden und siRNA

Für die Transfektion der hMSC sowie HEK293 wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Darmstadt) eingesetzt. Dieses Transfektionsreagenz bildet, beruhend auf dem Prinzip der Lipofektion, als kationisches Amphiphil Mizellen in wässrigen Lösungen aus, wobei die anionische DNA bzw. RNA komplexiert wird. Diese Lipofektionskomplexe können dadurch mit der Zellmembran verschmelzen, wobei die DNA bzw. RNA in das Cytosol entlassen wird.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 35 % in die entsprechenden Zellkultur-Kavitäten ausgesät. Die eingesetzten Mengen an Lipofectamine sowie DNA bzw. RNA richteten sich nach der verwendeten Zellkultur-Kavität aber auch nach den eingesetzten Zellen. Die genauen Mengen sind in der Tab. 16 vermerkt. Zuerst wurden die DNA bzw. RNA und das Lipofectamine 2000 in getrennten Verdünnungen in serumfreien DMEM aufgenommen und nach gutem Mischen für 5 Min inkubiert. Daraufhin wurden beide Verdünnungen vereinigt, nochmals kräftig gemischt und für 20 Min inkubiert, um dann als Transfektionsmix tropfenweise in die Zellkultur-Kavitäten pipettiert zu werden. Innerhalb der 20minütigen Inkubation wurde das Kulturmedium der frisch ausgesäten Zellen nochmals gewechselt, abzüglich des Volumens an zugesetztem Transfektionsmix. Nach 6stündiger Inkubation mit dem Transfektionsmix wurde das Kulturmedium erneuert.

Zellen	DNA	Lipofectamine 2000 (x-fache Menge an DNA [ $\mu$ g])	Zellkultur-Kavität (Verdünnungen)
HEK293	0,4 $\mu$ g/cm <sup>2</sup>	1,5	6-well (250 $\mu$ l)
hMSC-Prockop	0,2 $\mu$ g/cm <sup>2</sup>	1,5	10 cm Kulturschale (1,5 ml)
hMSC-Prockop	0,2 $\mu$ g/cm <sup>2</sup>	1,5	6-well (250 $\mu$ l)
hMSC-Prockop	0,2 $\mu$ g/cm <sup>2</sup>	1,5	12-well (125 $\mu$ l)
hMSC-Prockop	0,2 $\mu$ g/cm <sup>2</sup>	1,5	24-well (50 $\mu$ l)
Zellen	RNA	Lipofectamine 2000 (x-fache Menge an siRNA [ $\mu$ l])	Zellkultur-Kavität (Verdünnungen)
hMSC-Prockop	40 nM	2	6-well (250 $\mu$ l)
hMSC-Prockop	40 nM	2	12-well (125 $\mu$ l)

Tab. 16: Transfektionsbedingungen für hMSC und HEK293.

### 3.2.3.6 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferation eukaryotischer Zellen wurde der CyQuant-Assay Proliferation Kit von Invitrogen (Darmstadt) verwendet. Diese Methode macht sich die Eigenschaft des fluoreszierenden Farbstoffs CyQuant zu Nutze, welcher unspezifisch in Doppelstrang-DNA interkaliert, wobei über die Intensität der Fluoreszenz die DNA-Menge quantifiziert werden kann. Zur Bestimmung der Zellzahl in den Proben muss vergleichend die Fluoreszenz einer Verdünnungsreihe mit definierter Zellzahl zur Erstellung einer Standardkurve vermessen werden. Die Zellen müssen hierzu zuerst lysiert werden, um die DNA dem Farbstoff zugänglich zu machen. Dazu wurden die Zellen nach 5 oder 7 Tagen mit PBS gewaschen und direkt in den Zellkultur-Kavitäten im Tiefkühlschrank bei -80 °C eingefroren. Für die Standardkurve wurde eine definierte Menge Zellen als Sediment in einem Reaktionsgefäß eingefroren. Die Lyse der Zellen wurde mit 400  $\mu$ l des mitgelieferten Lysepuffers für 30 Min bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch Zugabe von RNase A (0,5  $\mu$ g/ml in Lysepuffer) wurde der Abbau der RNA erreicht. Danach wurde das Lysat aus den Zellkultur-Kavitäten in Reaktionsgefäß überführt und gut gevortext, bevor 100  $\mu$ l in die Vertiefungen einer durchsichtigen 96-well Kavitäten-Platte pipettiert wurden. Für die Standardkurve wurden folgende Zellzahlen als Verdünnungen in 100  $\mu$ l Gesamtvolumen pipettiert: 1.000, 5.000, 10.000, 20.000, 30.000 und 40.000. Zu den 100  $\mu$ l der Proben und der Standards sowie einer Negativ-Kontrolle wurde nun der Farbstoff als 1:200 Verdünnung im Lysepuffer zugegeben. Durch Anregung des Farbstoffs CyQuant bei einer Wellenlänge von 480 nm konnte die Fluoreszenz bei 520 nm quantifiziert werden.

### 3.2.3.7 Apoptose-Assay

Zur Identifizierung apoptotischer und nekrotischer Prozesse wurde das Annexin-V-FLUOS staining kit (Roche, Mannheim) eingesetzt. Es erlaubt über die Verwendung zweier Farbstoffe die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zel-

len. In frühen Apoptose-Stadien kommt es zu einer Änderung der Zusammensetzung der Membranlipide in der Plasmamembran. Hierbei gelangt vermehrt Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Membran an die Außenseite. Annexin V ist ein Kalzium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu PS und bei Bindung an apoptotische Zellen leuchten diese unter dem Fluoreszenzmikroskop grünlich, aufgrund der Konjugation des Annexin-V mit Fluorescein. Über den zweiten Farbstoff, dem Propidiumiodid (PI), welches in die DNA interkalieren kann, lassen sich die Kerne der nekrotischen Zellen rötlich anfärben. Dabei macht man sich zunutze, dass das PI nicht die Membran intakter Zellen überwinden kann. Für den Assay wurden die Zellen an Tag 7 mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die einzelnen Kavitäten mit 600 µl der zuvor frisch erstellten Annexin-FLUOS Färbe-Lösung bedeckt. Nach einer Inkubation für 15 Min erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop durch Anregung der Farbstoffe mittels Licht der Wellenlänge 450-500 nm. Apoptotische Zellen zeigten hierbei eine grünliche Fluoreszenz, während nekrotische Zellen sich zusätzlich durch eine rötliche Färbung des Kerns auszeichneten.

### 3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.4.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

HEK293: Für die Extraktion der Frizzled-Rezeptoren nach Überexpression wurden die Zellen 2 Tage nach Transfektion in einer Kavität eines 6-wells mit PBS vorsichtig gewaschen und dann mit 300 µl Lysepuffer (10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 25 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, Proteinase Inhibitor 1:500) versetzt. Die Zellen wurden abgeschabt und das Lysat in ein Eppendorfgefäß zusammen mit den Zelltrümmern pipettiert und gut gevortext. Nun erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 Min bei 17.000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und mit Lämmli-Puffer versetzt, der in 1-facher Konzentration aus folgenden Komponenten bestand: 2 % (w/v) SDS, 50 mM Tris HCl pH 6,8, 0,2 mg/ml Bromphenolblau, 0,1 M DTT und 10 % (V/V) Glycerin.

hMSC: Die Frizzled-Rezeptoren wurden nach der Überexpression in den hMSC an Tag 3 isoliert. Hierbei wurde eine komplette Zellkulturschale ( $\varnothing$  10 cm) auf Eis mit PBS gründlich gewaschen, danach wurden tropfenweise 100 µl des Lyse-Puffers (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % Triton X100, 0,1 % SDS, 5 mM Iodacetamid) zugegeben und für 5 Min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abgeschabt und das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt und unter mehrmaligem intensiven Vortexen nochmals für 30 Min auf Eis belassen. Um die Zelltrümmer zu beseitigen, erfolgte noch ein Zentrifugationsschritt für 5 Min bei 16.000 x g. Der Überstand wurde mit Lämmli-Puffer versetzt. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Quantifizierung von Proteinmengen in Lysaten oder Zellkultur-Überständen wurde auf das colorimetrische Biuret-Prinzip zurückgegriffen. Dabei kam der BC Assay (Interchim, Frankreich) zum Einsatz. Hierbei bildet sich ein blauer Cu<sup>2+</sup>-Chelatkomplex, bei dem das Kupfer als Zentralion zwischen der Peptidbindung und Bicinchoninsäure (BCA) quadratisch planar zum liegen kommt. Durch die Intensität der Blaufärbung bei 560 nm lässt sich auf die Anzahl der Chelatkomplexe und damit auf die Menge der beteiligten Peptidbindungen rückschließen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde ein Standard aus BSA-Verdünnungen mit bekannten Konzentrationen vermessen. Nach einer Inkubation für 30 Min bei 37 °C wurden die Messungen mit 100 µl verdünnter Probe bzw. Standard sowie 100 µl BCA/Cu<sup>2+</sup>-Lösung (24:1) in den Vertiefungen einer transparenten 96-well Kavitäten-Platte durchgeführt.

### 3.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip der SDS-PAGE beruht auf der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Ornstein, welche zu einer hohen Bandenschärfe bei der Auftrennung der Proteine führt (Ornstein 1964). Die Diskontinuität der pH-Werte zwischen Sammelgel und Trenngel ist dabei das Hauptmerkmal dieser Methode. Im Sammelgel werden die Proteine durch die Ionen im Puffer zu einer scharfen Bande fokussiert, um an der pH-Grenze am Trenngel der Größe und Ladung nach aufgetrennt zu werden. Im Fall der SDS-PAGE nach Lämmli handelt es sich um ein Tris/Glycin-Puffersystem, bei dem durch die Anlagerung des Detergenz SDS an die Proteine, ein anionisches konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis der Proteine generiert wird (Laemmli 1970). Dadurch wird eine Auftrennung anhand der Masse im Trenngel ermöglicht. Die Gele wurden nach Angaben und mit Hilfe der Apparaturen der Firma Biorad selbst gegossen, wobei das Sammelgel mit pH 6,8 eine 5 %ige und die Trenngele mit pH 8,8 eine 8-10 %ige Polyacrylamidkonzentration aufwiesen. Zuerst wurden die Proben im Sammelgel bei 80 V für 15 Min im SDS-haltigen Laupuffer (25 mM Tris-Base, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) konzentriert, um dann bei 120 V für 60-90 Min elektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Neben den Proben, welche vor dem Auftragen für 7 Min bei 94 °C gekocht wurden, wurde immer ein farbiger Molekulargewichtsmarker mit appliziert, damit die Molekulargewichte der Proteinbanden bestimmt werden konnten.

### 3.2.4.4 Western Blot-Transfer der Proteine

Nach dem eine ausreichende Auftrennung der Proteine erreicht war, erfolgte deren Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran. Dies wurde mit der Methode des Tankblotting durchgeführt. Hierbei wurde das Transfersystem in einer festen Reihenfolge

(Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrocellulosemembran, Filterpapier, Schwamm) in einem vertikalen Puffertank zwischen Kathode und Anode, welche integriert in den Seitenwänden vorliegen, fixiert. Zuvor wurden alle Komponenten des Transfersystems in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol) getränkt. Das Methanol dient hier zur Aktivierung der Proteinbindestellen der Nitrozellulose-Membran. Bei einer Stromstärke von 70 mA wurde der Transfer für 90 Min durchgeführt.

### 3.2.4.5 Immunodetektion von Proteinen

Die Detektion der Zielproteine erfolgte unter Verwendung kommerziell erhältlicher Antikörper, die in folgender Tab. 17 nach Herstellerangaben verdünnt wurden. Falls notwendig, wurden die Primärantikörper wiederum mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert.

Antikörper	Verdünnung	HRP-Konjugat	Verdünnung
anti-Fzd5	1:500-1:2.000	anti <i>rabbit</i>	1:10.000
anti-HA	1:2.000	anti <i>rat</i>	1:10.000
		anti-HA-HRP	1:500-1:2.000

Tab. 17: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper.

Alle Verdünnungen der Erstantikörper wurden in TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton X-100) erstellt. Zur Blockierung ungesättigter Proteinbindestellen auf der Nitrozellulose-Membran wurde Magermilchpulver 5 %ig (w/v) in TBS-T gelöst. Zum Teil wurden auch die Zweitantikörper sowie der anti-HA-HRP in dieser Blockierlösung zur Minimierung des Hintergrundsignals verdünnt. Im ersten Schritt wurde die Nitrozellulose-Membran in der Blockierlösung über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler belassen, um am Folgetag mit dem Erstantikörper für 1 Std bei RT inkubiert zu werden. Ungebundener Erstantikörper wurde dann durch 3 Waschschritte mit TBS-T für jeweils 10 Min entfernt, worauf – falls notwendig – die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 1 Std bei RT erfolgte. Überschüssiger Zweitantikörper wurde mittels 3 zehnminütigen Waschschritten entfernt. Alle Inkubations- sowie Waschschritte wurden auf dem Taumler ausgeführt. Die Visualisierung erfolgte über die an den HRP-Konjugaten befindliche Meerrettichperoxidase mittels Chemilumineszenz. Nach Zugabe der Western-Lightning ECL-Reagenz (PerkinElmer, Rodgau) und Inkubation für 1 Minute, wurde die Membran in eine Filmkassette (Hypercassette, GE Healthcare) überführt und mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) bedeckt. Die Belichtungszeiten lagen meist zwischen 1-5 Min, in seltenen Fällen auch bei mehreren Stunden.

### 3.2.4.6 Messung der Gaussia-Luciferase-Aktivität in Zellkulturüberständen

Zur Quantifizierung der Gaussia-Luciferase-Aktivität kamen der Gaussia-Luciferase-Kit (NEB, Frankfurt) sowie der Gaussia-Juice (PJK, Kleinblittersdorf) zum Einsatz. Beide Kits beinhalten das Substrat Coelenterazin, welches von der Gaussia-Luciferase unter Freisetzung einer Biolumineszenz quantitativ umgesetzt wird. Deswegen konnte in hMSC, welche transient oder stabil mit dem TCF/LEF-Reportergen-Konstrukt pN3-BAR transfiziert waren, die Menge des transkriptionell aktiven  $\beta$ -Catenins quantitativ erfasst werden. Denn nur nukleäres  $\beta$ -Catenin kann im Komplex mit TCF/LEF an die Konsensus-Sequenzen im Reportergen-Konstrukt binden und so die Expression der Gaussia-Luciferase induzieren.

Da es sich bei der Gaussia-Luciferase um eine sekretierte Form handelt, kann deren Aktivität im Zellkultur-Überstand über einen bestimmten Zeitverlauf quantifiziert werden. Dazu wurden von den TCF/LEF Reporter-hMSC im Fall von Knockdown-Studien an Tag 1, 5 und 7 bzw. bei Überexpressionen an Tag 1, 3, und 5 jeweils 25  $\mu$ l Zellkultur-Überstand abgenommen und in eine schwarze 96 Kavitäten-Platte überführt. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l des verdünnten Substrats wurden im Luminometer 4 bis maximal 6 Proben bei einer Wellenlänge von 470 nm vermessen. Zur Normierung der erhaltenen *relative light units* (RLU) wurden die vermessenen Überstände mit 120  $\mu$ l Lysepuffer versetzt (50 mM HEPES/KOH, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, pH 7,4) und für 2 Std bei RT inkubiert, bevor mit 100  $\mu$ l des Lysats eine Proteinbestimmung durchgeführt wurde.

### 3.2.5 Datenanalyse

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der in Excel (Microsoft Office) implementierte studentische T-Test herangezogen. Die dabei zu vergleichenden Mittelwerte gingen aus 2 Triplikaten hervor, wobei immer die zweiseitige Signifikanz ausgegeben wurde. Waren dabei die erhaltenen P-Werte kleiner als 0,05 (\*), 0,01 (\*\*) oder 0,001 (\*\*\*) wurden Unterschiede als signifikant angesehen, da sie mit einer Fehlerquote von  $\leq 5\%$ , 1% bzw. 0,1% behaftet waren.

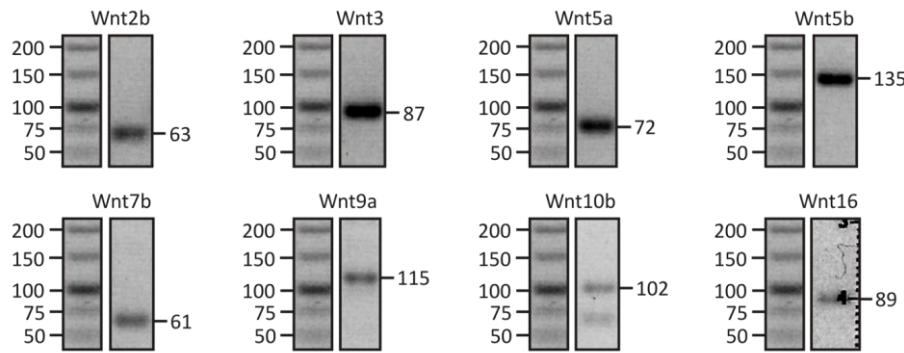
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Evaluierung von Wnt-Signalwegkomponenten in hMSC, HT1080 und HEK293

Die Aktivierung der Wnt-Signalwege erfolgt durch die Bindung von Wnt-Liganden an die entsprechenden Wnt-Rezeptoren, wobei hier der Familie der Fzd-Rezeptoren (Fzd) eine Schlüsselrolle zukommt. Zusätzlich sind im kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg die Korezeptoren LRP5 und LRP6 an der Bindung der Wnts beteiligt. Berücksichtigt man die Zahl von im Genom der Vertebraten kodierten Wnts (19) und Fzds (10), ergibt sich eine große Zahl von unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten. Jedoch zeigen Untersuchungen, dass nur bestimmte Kombinationen aus Fzds und Wnts mit den entsprechenden Korezeptoren LRP5 bzw. LRP6 in ein kanonisches Wnt-Signal münden (Gazit et al. 1999). Um nun die relevanten Kombinationen von Wnts, Fzds und LRP5 zu eruieren, wurden zunächst mRNA-Expressionsprofile potentieller Liganden des Wnt-Weges erstellt. Zusätzlich wurde auch die Expression der Inhibitoren sFRP1 und WIF1 evaluiert, da diese die Bildung des ternären Wnt/Fzd/LRP-Komplexes und damit die Weiterleitung eines Wnt-Signals unterbinden können.

#### 4.1.1 Wnt-Expression in hMSC

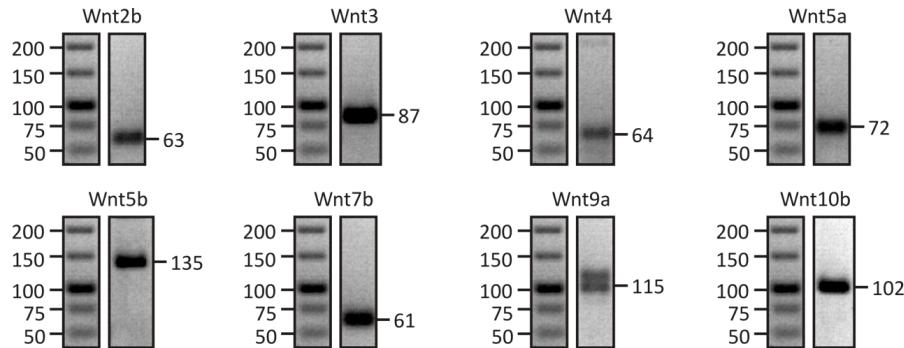
In diesem qualitativen RT-PCR Ansatz konnten neben der Expression des kanonisch wirkenden Wnt3 auch die mRNA-Transkripte von Wnt2b, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7b, Wnt9a, Wnt10b und Wnt16 nachgewiesen werden. Dagegen konnte Wnt1, Wnt3a, Wnt4, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9b, Wnt10a, Wnt11 in hMSC auf mRNA-Ebene nicht detektiert werden.

**Abb. 15: Wnt-Expression in hMSC.**

Der qualitative Nachweis von Wnt2b, Wnt3, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7b, Wnt9a, Wnt10b und Wnt16 erfolgte in hMSC-cDNA, die aus 50 ng Total-RNA generiert worden war. Im Fall von Wnt16 ist am rechten Rand der Abbildung die Millimeterskala des Gelträgers zu erkennen.

#### 4.1.2 Wnt-Expression in HT1080

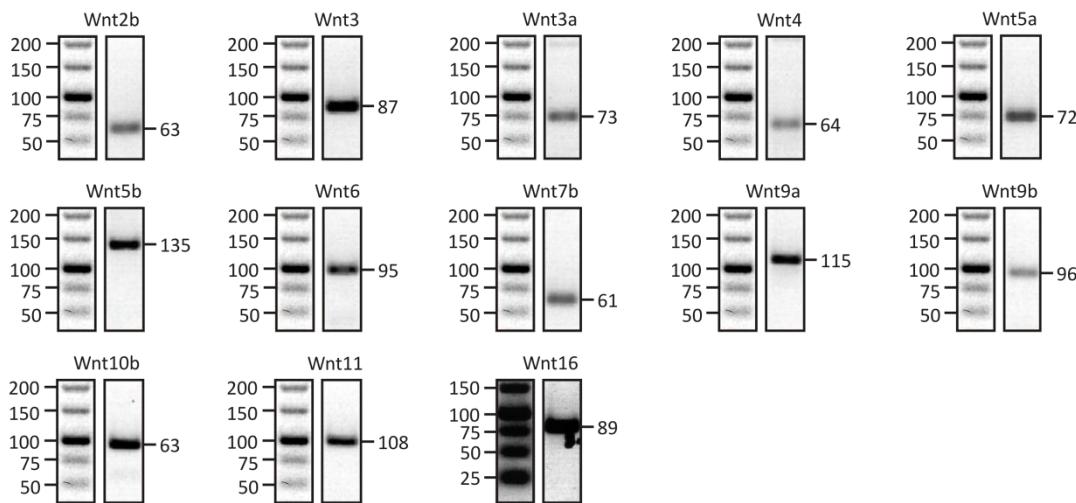
Die HT1080-Zelllinie zeigte ein ähnliches Wnt-Expressionsprofil wie das von hMSC. Unterschiede ergaben sich durch eine DNA-Doppelbande bei Wnt9a sowie eine Expression von Wnt4 in den HT1080-Zellen, während eine mRNA-Expression von Wnt16 nicht nachgewiesen wurde. Auch die mRNA-Transkripte für Wnt1, Wnt3a, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9b, Wnt10a, Wnt11 und Wnt16 wurden nicht detektiert.

**Abb. 16: Wnt-Expression in HT1080.**

Die PCR wurde mit 50 ng revers transkribierter HT1080-RNA durchgeführt und zeigte einen qualitativen Nachweis der mRNA-Transkripte für Wnt2b, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7b, Wnt9a und Wnt10b. Zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker wurden die PCR-Produkte über ein Agarosegel aufgetrennt.

#### 4.1.3 Wnt-Expression in HEK293

In der HEK293-Zelllinie konnten hingegen deutlich mehr Mitglieder der Wnt-Familie detektiert werden. Darunter befanden sich auch die beiden kanonisch-wirkenden Wnt-Liganden, nämlich Wnt3 und Wnt3a. Im Vergleich zu den 8 exprimierten Wnts in hMSC und HT1080 konnten in den HEK293 Zellen 13 der 19 Wnts nachgewiesen werden. Für die mRNA-Transkripte von Wnt1, Wnt2, Wnt7a, Wnt8a, Wnt8b sowie Wnt10a konnte kein Nachweis erbracht werden.

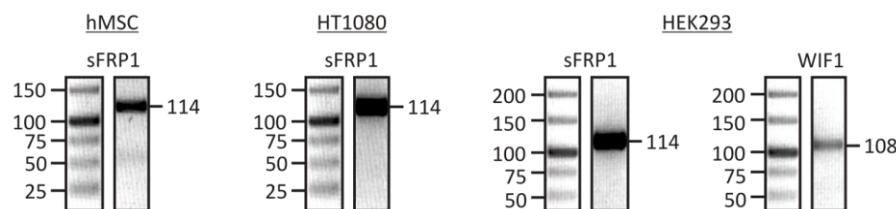


**Abb. 17: Wnt-Expression in HEK293.**

Die PCR wurde mit 50 ng revers transkribierter HEK293-RNA durchgeführt. Dabei wurden die mRNA-Transkripte von Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11 und Wnt16 detektiert.

#### 4.1.4 Expressionsanalyse der Wnt-Inhibitoren sFRP1 und WIF1

Neben sFRP1, das in allen 3 Zellentitäten detektiert werden konnte, zeigte sich in den HEK293-Zellen zusätzlich eine Expression von WIF1.

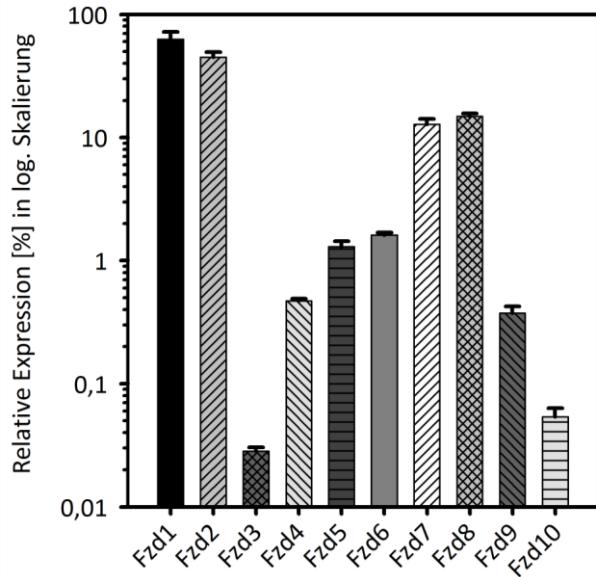


**Abb. 18: Expressionsanalyse von sFRP1 und WIF1 in hMSC, HT1080 und HEK293.**

Die PCR wurde jeweils mit 50 ng revers transkribierter RNA durchgeführt.

#### 4.1.5 Expressionsprofil der Fzd-Rezeptoren in hMSC

Die Evaluierung der transkriptionellen Expression der Fzds erfolgte über quantitative RT-PCR im LightCycler. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden mittels der GAPDH Expression normalisiert. Hierbei zeigte sich, dass Fzd1 mit etwa 62% der GAPDH-Expression von allen Fzds am stärksten exprimiert wurde. Danach folgte Fzd2 mit 45 % und mit etwas größerem Abstand Fzd7 und Fzd8 mit 13 % bzw. 15 % der GAPDH-Expression. Die übrigen Fzds lagen im Schnitt unter 2 % der GAPDH-Expression. Die niedrigsten Expressionsniveaus wiesen Fzd3, Fzd9 und Fzd10 auf.



**Abb. 19: Expressionsprofil der Fzd-Rezeptoren in hMSC.**

Die qRT-PCR wurde jeweils mit 12,5 ng cDNA revers transkribierter RNA aus hMSC (5. Passage) durchgeführt. Die Kopienzahlen wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes.

## 4.2 Das TCF/LEF-Reporter-Vektor-System

Wnt/ $\beta$ -Catenin-Zielgene wie z.B. Cyclin D1 oder Fzd7 besitzen in ihren Promotoren TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen, an welche Transkriptionskomplexe – bestehend aus einem Mitglied der TCF/LEF-Familie und  $\beta$ -Catenin – binden und somit die Transkription initiieren können. Das TCF/LEF-Reporter-Vektor-System erlaubt durch seine konsekutive Anordnung von TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen in Kombination mit einem minimalen Promotor (CMV<sub>min</sub>) vor dem Reporterogen Gaussia-Luciferase eine sehr sensitive Quantifizierung von transkriptionell aktiven TCF/LEF/ $\beta$ -Catenin-Komplexen, welche durch die Aktivität des Reporterproteins erfasst werden kann.

### 4.2.1 Stabile Transfektion des TCF/LEF-Reporter-Vektor-Systems

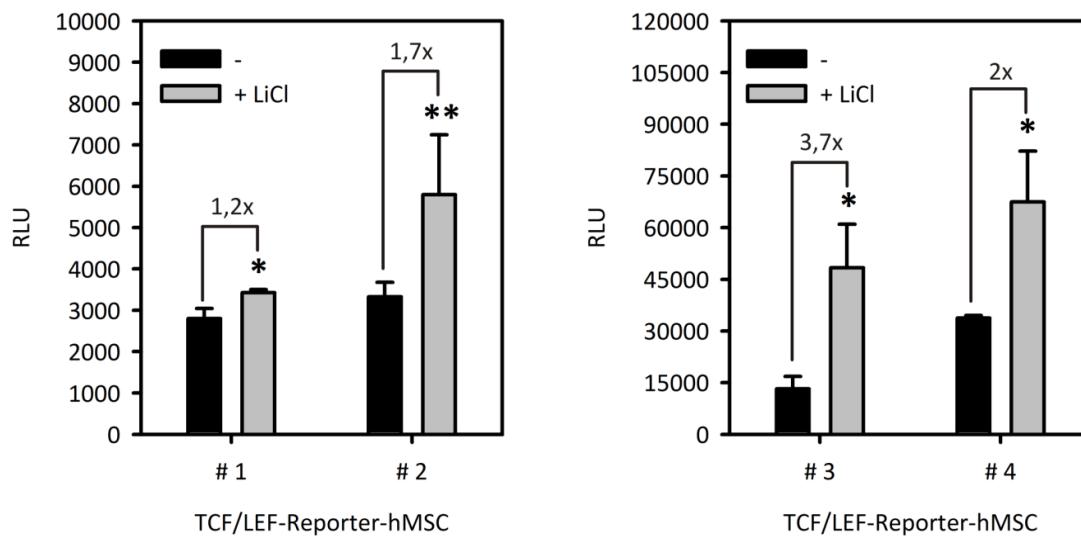
Zur stabilen Transfektion des TCF/LEF-Plasmids wurden hMSC an Tag 2 nach der Transfektion mit dem Antibiotikum G418 (100  $\mu$ g/ml) selektiert. Zur Kontrolle wurden untransfizierte hMSC mit gleicher G418-Konzentration eingesetzt. Sobald keine untransfizierten hMSC mehr vorhanden waren, wurden die verbliebenen stabil-transfizierten hMSC durch Splitten weiter expandiert, auf Funktionalität getestet und bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

## 4.2.2 Evaluierung der TCF/LEF-Reporter-hMSC

### 4.2.2.1 Stimulation mit LiCl

Bei der ungerichteten Integration des TCF/LEF-Reporter-Plasmids hängt die Aktivität bzw. Sensitivität des Reporters u.a. vom Linearisierungs-ort des Plasmids, dem Integrationsort im Genom der hMSC und der Häufigkeit des Integrationsereignisses ab. Daher mussten die aus einer Zellkultur-Kavität – meist eine Vertiefung einer 6-Kavitäten-Platte – hervorgegangenen TCF/LEF-Reporter-hMSC vor der weiteren Verwendung auf ihre Gaussia-Luciferase-Aktivität getestet werden. Hierfür wurden die Zellen mit LiCl-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Lithium führt über die Inhibition der GSK-3 $\beta$  zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und damit einhergehend zu einer Steigerung der Wnt/ $\beta$ -Catenin Aktivität.

Wie aus der Abb. 20 ersichtlich, wiesen die verschiedenen Reporter-hMSC-Populationen unterschiedliche basale Reporterprotein-Aktivitäten auf (3000 bis 30.000 RLU). Aber auch die Induktionsraten der Gaussia-Luciferase-Aktivität zeigten in den verschiedenen TCF/LEF-Reporter-hMSC erhebliche Unterschiede (1,2 bis 3,6fach). Deshalb wurden alle folgenden Versuchsreihen jeweils immer mit einer stabilen TCF/LEF-Reporter-hMSC-Population vorgenommen.

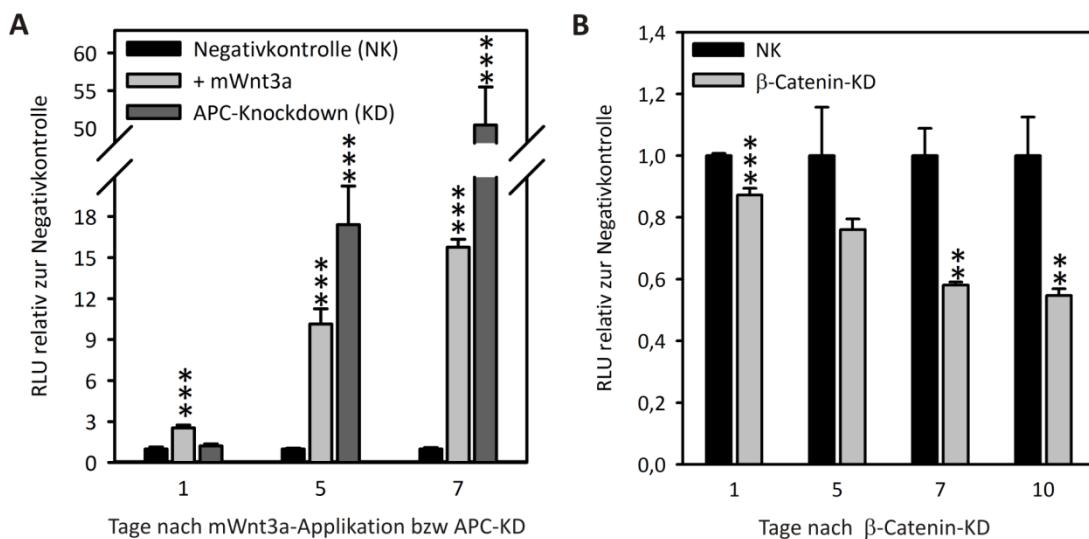


**Abb. 20: Gaussia-Luciferase-Aktivität von TCF/LEF-Reporter-hMSC nach LiCl-Stimulation.**

Zur Überprüfung der Funktionalität der einzelnen TCF/LEF-Reporter-hMSC-Populationen (# 1- 4) wurde die Gaussia-Luciferase-Aktivität nach 5 Tagen in Zellkulturüberständen ohne und mit 4 mM LiCl bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*P< 0,05; \*\*P< 0,01. Die Induktionsraten der Gaussia-Luciferase-Aktivität sind numerisch vermerkt. Abkürzung: RLU: *relative light units*.

#### 4.2.2.2 siRNA-induzierter Knockdown von APC sowie $\beta$ -Catenin

Um die Sensitivität des TCF/LEF-Reporter-Systems näher zu evaluieren, wurde eine vergleichende Analyse mit exogener und endogener Aktivierung (Wnt3a-Stimulation bzw. APC-Knockdown) sowie Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ( $\beta$ -Catenin-Knockdown) durchgeführt. Die Knockdown-Effizienzen auf mRNA-Ebene wurden in der Doktorarbeit von Frau Dr. Marisa Karow mit über 90 % an Tag 1 für APC und  $\beta$ -Catenin bestimmt (Karow 2008). Während an Tag 1 nach Knockdown von APC im Vergleich zur Negativkontrolle noch keine signifikante Änderung der Gaussia-Luciferase-Aktivität zu beobachten war, zeigte sich an Tag 3 und 7 eine nachhaltige Steigerung der Reporterprotein-Aktivität, die deutlich über dem Niveau der Wnt3a-Stimulation lag (Abb. 21A). Der Knockdown von  $\beta$ -Catenin (Abb. 21B) war dagegen mit einer Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität assoziiert. An Tag 10 nach Knockdown von  $\beta$ -Catenin war die Gaussia-Luciferase-Aktivität auf etwa die Hälfte reduziert.



**Abb. 21: Gaussia-Luciferase-Aktivität nach mWnt3a-Stimulation und APC-Knockdown sowie nach  $\beta$ -Catenin-Knockdown in TCF/LEF-Reporter-hMSC.**

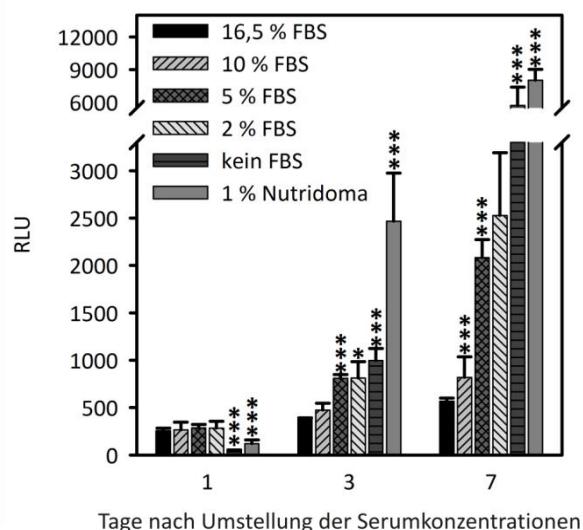
Die Abnahme der Zellkulturüberstände erfolgte 1, 5, 7 und 10 Tage nach siRNA-Transfektion bzw. Stimulation der TCF/LEF-Reporter-hMSC. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit nc-siRNA transfiziert. Die *relative light units* (RLUs) sind auf die Gesamtproteinmenge in den Zellkulturüberständen normalisiert und relativ zu den Negativkontrollen dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

A) Applikation von mWnt3a (150 ng/ml) bzw. Transfektion mit APC-siRNA.

B) Transfektion mit nc-siRNA (NK) bzw.  $\beta$ -Catenin-siRNA ( $\beta$ -Catenin-Knockdown).

#### 4.2.2.3 Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die TCF/LEF-Reporter-hMSC

Mit dem Ziel den Einfluss von unterschiedlichen FBS-Konzentrationen auf den Wnt/β-Catenin Status in hMSC zu evaluieren, wurden verschiedene FBS-Konzentrationen in TCF/LEF-Reporter-hMSC getestet (Abb. 22). Zusätzlich wurden vergleichende Versuche mit dem Serumersatz Nutridoma durchgeführt. Die TCF/LEF-Reporter-hMSC wurden für die Versuchsreihen in 16,5 % FBS-haltigem Kulturmedium in die Kavitäten ausgesät. Bei Umstellung der Serumkonzentrationen zeigte sich über den Zeitraum von 7 Tagen eine umgekehrte Proportionalität zwischen Gaussia-Luciferase-Aktivität und Serumkonzentration. D.h. mit sinkenden Serumanteilen war eine gesteigerte Gaussia-Luciferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen messbar. So lag die basale Gaussia-Luciferase-Aktivität bei Abwesenheit des FBS 10fach höher als unter Standardbedingungen mit 16,5 % FBS. Die höchste basale Aktivität der Gaussia-Luciferase zeigte sich jedoch bei Verwendung des Serumersatzes Nutridoma an Tag 3 und 7.

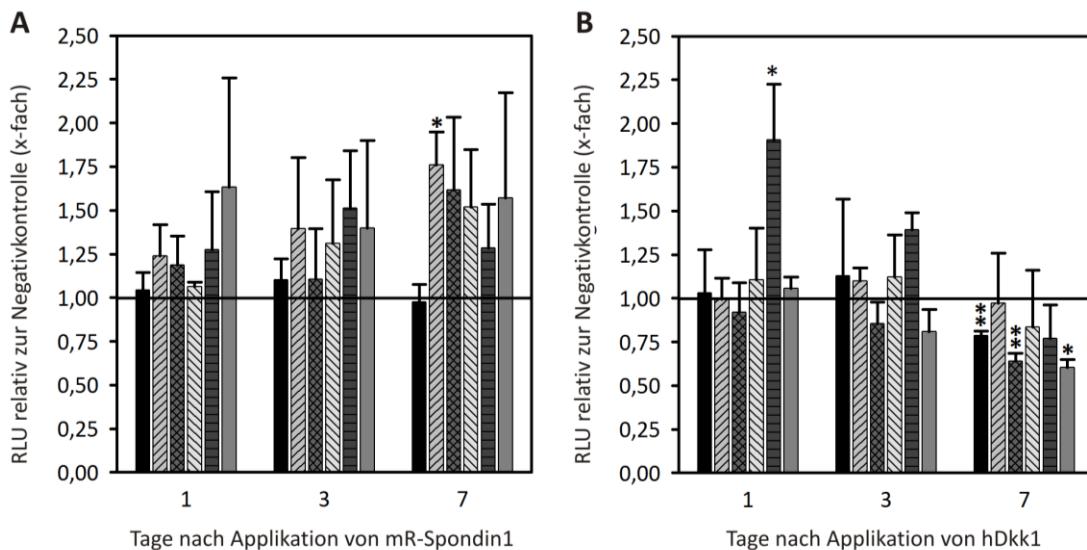


**Abb. 22: Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf die Gaussia-Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-hMSC.**

Vor den Versuchsreihen wurden die Zellen in den Kavitäten mit 16,5 % FBS-haltigem αMEM ausgesät. Die Zellkulturüberstände wurden nach Umstellung der Serumkonzentrationen an Tag 1, 3 und 7 abgenommen. Die RLU wurden auf die Gesamtproteinmenge normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*P<0,05; \*\*\*P<0,001. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die RLU-Werte in 16,5 % FBS.

In einem weiteren Ansatz wurde mit derselben TCF/LEF-Reporter-hMSC-Population die Wirkung von murinem R-Spondin1 und humanem Dkk1 auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg getestet (Abb. 23). Der Effekt von R-Spondin1 sowie Dkk1 zeigte sich mit signifikanter Wirkung nur an Tag 7, bei R-Spondin1 mit einer Steigerung und für Dkk1 mit einer Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität. Während bei R-Spondin1 ein signifikanter Effekt bei 10 % FBS zu beobachten war, zeigte sich für Dkk1 an Tag 7 eine

partielle Proportionalität zwischen Reduktion der Serumkonzentration und Abnahme der Gaussia-Luciferase-Aktivität.



**Abb. 23: Wirkung von mR-Spondin1 und hDkk1 bei unterschiedlichen Serum-**

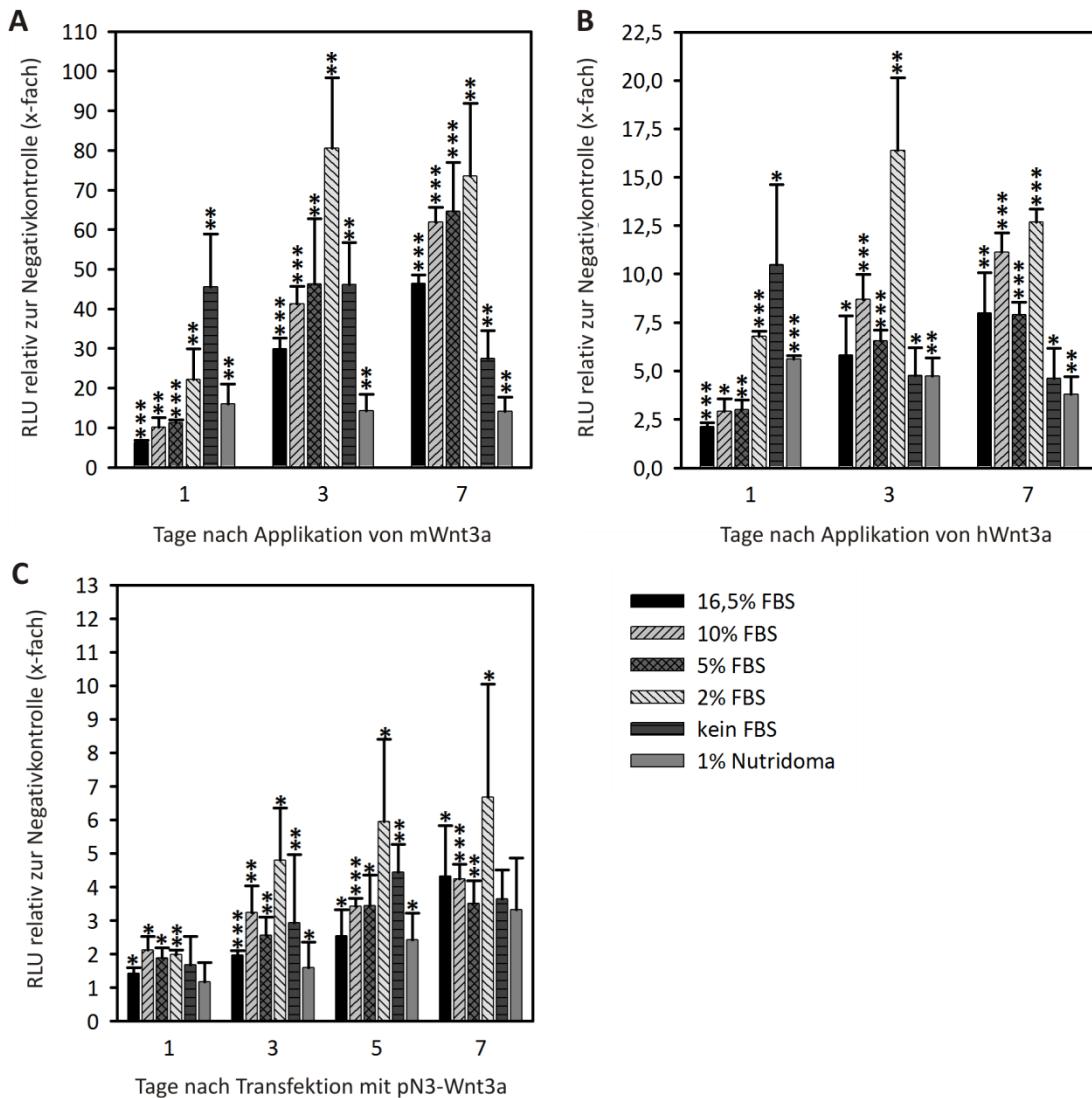
**Bedingungen auf die Gaussia-Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-hMSC.** Die Zellkulturüberstände wurden nach der Umstellung der Serumkonzentration und gleichzeitiger Applikation der jeweiligen Liganden an Tag 1, 3 und 7 abgenommen. Die RLU-Werte wurden über die Gesamtproteinmenge im Überstand normalisiert und relativ zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollansätzen (Negativkontrolle) gesetzt. Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*P< 0,05; \*\*P< 0,01. Die P-Werte wurden relativ zu den RLU-Werten der jeweiligen Negativkontrolle bestimmt.

A) Applikation mit rekombinantern murinem R-Spondin1 (500 ng/ml).

B) Applikation von rekombinantern humanem Dkk1 (100 ng/ml).

- 16,5 % FBS
- ▨ 10 % FBS
- ▨ 5 % FBS
- ▨ 2 % FBS
- kein FBS
- ▨ 1 % Nutridoma

Zur Evaluierung unterschiedlicher Serumkonzentrationen sowie des Serumersatzes Nutridoma bei Applikation bzw. Transfektion eines kanonischen Wnt-Liganden (Abb. 24) wurde zum einen Wnt3a als rekombinantes Protein murinen bzw. humanen Ursprungs zugegeben und zum anderen eine Transfektion mit einem Wnt3a-Überexpressionsplasmid durchgeführt. In allen 3 Ansätzen zeigte sich an Tag 3 und 7 die höchste Aktivität der Gaussia-Luciferase bei einer Serumkonzentration von 2 %, während hingegen bei höheren Serum-Konzentrationen – aber auch bei Abwesenheit von Serum – die Gaussia-Luciferase-Aktivität im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle ohne Stimulation deutlich abnahm. Zudem zeigte sich, dass murines Wnt3a im Vergleich zu humanem Wnt3a eine stärkere Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges bewirkte. Die niedrigsten Aktivierungsraten gingen mit der Plasmid-basierten ektopischen Expression von humanem Wnt3a einher. Für alle weiteren Versuche wurden TCF/LEF-Reporter-hMSC für die Versuchsdauer deshalb in αMEM mit 2 % FBS kultiviert.



**Abb. 24: Wirkung von Wnt3a auf die Gaussia-Luciferase-Aktivität bei unterschiedlichen Serum-Bedingungen in TCF/LEF-Reporter-hMSC.**

Die Abnahme der Zellkulturüberstände erfolgte nach Umstellung der Serumbedingungen bei gleichzeitiger Applikation bzw. Transfektion von Wnt3a. Bei der Applikation von Wnt3a in Form der rekombinanten Proteine wurden die Überstände von Tag 1, 3 und 7, im Fall der Transfektion des Wnt3a-Überexpressionsvektors noch zusätzlich an Tag 5 abgenommen. Die RLU-Werte wurden über die Gesamtproteinmenge im Überstand normalisiert und relativ zu den jeweiligen Negativkontrollen (unstimulierte bzw. untransfizierte Bedingungen) gesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ . Die P-Werte wurden relativ zu den RLU-Werten der jeweiligen Negativkontrolle bestimmt.

A) Stimulation der TCF/LEF-Reporter-hMSC mit murinem Wnt3a (150 ng/ml).

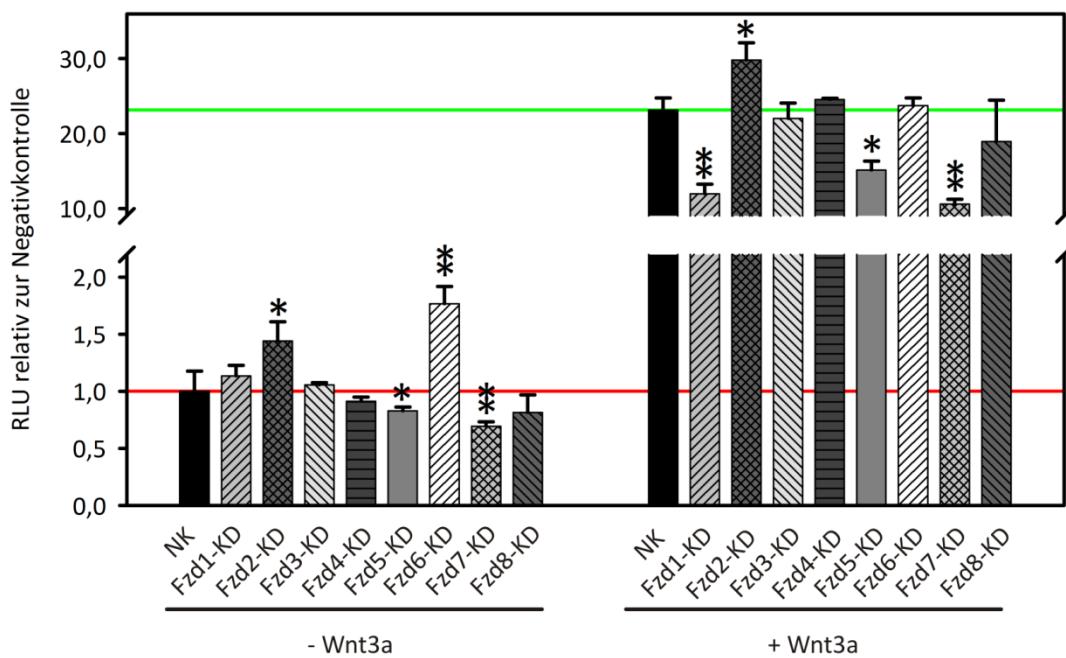
B) Stimulation der TCF/LEF-Reporter-hMSC mit humanem Wnt3a (75 ng/ml).

C) Transfektion der TCF/LEF-Reporter-hMSC mit dem Überexpressionsvektor pN3-Wnt3a.

### 4.3 SiRNA-vermittelter Knockdown von Fzd-Rezeptoren

hMSC zeichnen sich durch eine basale Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges aus (Abdallah und Kassem 2008; Etheridge et al. 2004; Karow 2008; Kolben et al. 2012; Peröbner et al. 2012). Dies zeigte sich auch in der hier vorliegenden Arbeit durch die basale Aktivität der Gaussia-Luciferase in den TCF/LEF-Reporter-hMSC (Abb. 25). Um festzustellen, ob bzw. in welcher Weise Fzd-Rezeptoren an der Aufrechterhaltung der Wnt/β-Catenin-Aktivität beteiligt sind, wurden mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie einzelne Fzds herabreguliert. Die Knockdown-Effizienz der einzelnen Fzds wurde bereits in der Doktorarbeit von Herrn Dr. Thomas Kolben bestimmt und überstiegen am ersten Tag für alle Fzds 70 % (Kolben 2011; Kolben et al. 2012).

In den TCF/LEF-Reporter-hMSC war ohne Wnt3a-Stimulation nach Knockdown von Fzd5 und 7 eine signifikante Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität zu beobachten. Unter Applikation von humanem Wnt3a zeigte sich bei Knockdown der erwähnten Fzds sowie zusätzlich auch bei Knockdown von Fzd1 ein signifikanter Einbruch der Gaussia-Luciferase-Aktivität. Ein gegenteiliger Effekt, d.h. eine Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität, konnte bei Knockdown von Fzd2 und Fzd6 unter unstimulierten Bedingungen sowie unter Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen bei RNAi gegen Fzd2 beobachtet werden.



**Abb. 25: Knockdown einzelner Fzds in TCF/LEF-Reporter-hMSC.**

Für die Negativkontrolle (NK) wurden die Zellen mit nc-siRNA transzisiert. Die Zellkulturüberstände wurden an Tag 7 nach Knockdown vermessen. Die RLU wurden auf die Gesamtproteinmenge normalisiert und auf die Negativkontrolle des nicht stimulierten Ansatzes (1,0) bezogen. Die rote Linie stellt den Gaussia-Aktivitätslevel der Negativkontrolle aus den nicht stimulierten Ansätzen dar. Die grüne Linie zeigt den Gaussia-Aktivitätslevel der Negativkontrolle unter Wnt3a-Stimulation. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ .

## 4.4 Ektopische Expression kanonischer Fzds und Wnts

Aufgrund der Tatsache, dass der Knockdown von Fzd1, Fzd5 und Fzd7 unter Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen mit einer deutlich verminderten Wnt/β-Catenin-Aktivität assoziiert war, sollten diese Befunde in einem reversen Ansatz mittels ektopischer Expression von Fzd1, Fzd5 und Fzd7 überprüft werden. In diesem Zusammenhang wurde neben den Überexpressionsvektoren für die Fzds auch ein Vektor für die ektopische Expression von Wnts generiert.

### 4.4.1 Klonierung von Fzd1 und Fzd5 in den Überexpressionsvektor pN3

In einem ersten Klonierungsansatz wurden die beiden Rezeptoren zusammen mit ihren Signalsequenzen ohne die 5'- und 3'-UTRs als PCR-Produkte (Fzd1 mit 1956 bp und Fzd5 mit 1770 bp) mit Hilfe der Phusion Hot Start Polymerase amplifiziert (Abb. 26A). Als Matrize dienten die Vektoren pCMV6-XL4-Fzd1 und pCMV6-XL4-Fzd5. Die PCR-Produkte wurden darauf mit einer Taq-Polymerase zum Anhängen der Adenosin-Nukleotide inkubiert, damit im Anschluss eine TOPO-TA-Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor (Abb. 26B) durchgeführt werden konnte.

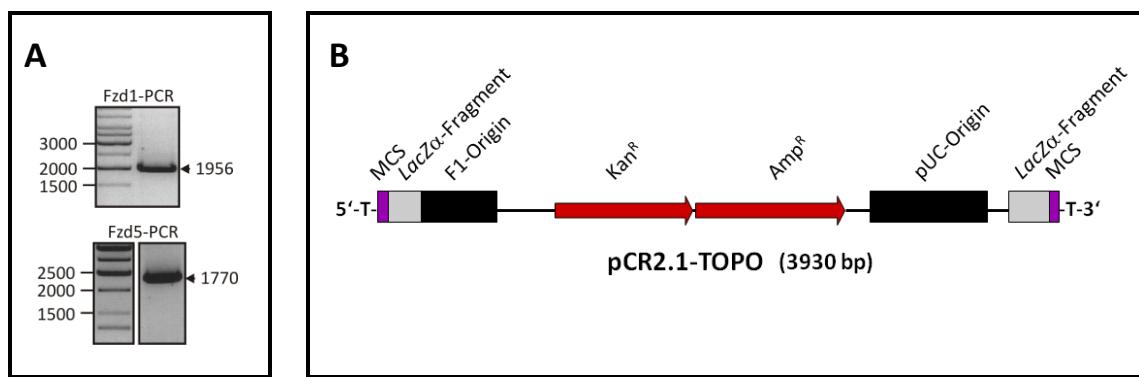


Abb. 26: Klonierung der PCR-Produkte von Fzd1 und Fzd5 in den pCR2.1-TOPO (Teil I).

- A) PCR-Produkte von Fzd1 und Fzd5.  
 B) Schematische Darstellung des pCR2.1-TOPO.

Nach Bestätigung des korrekten Einbaus der PCR-Produkte in den pCR2.1-TOPO-Vektor durch einen analytischen Restriktionsverdau (Abb. 27A), konnte nach Sequenzierung die Sequenzidentität durch ein Alignment mit den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen für Fzd1 (NM\_003505) und Fzd5 (NM\_003468) bestätigt werden. Ein schematischer Aufbau des pCR2.1-Fzd1 bzw. pCR2.1-Fzd5 zeigt Abb. 27B.

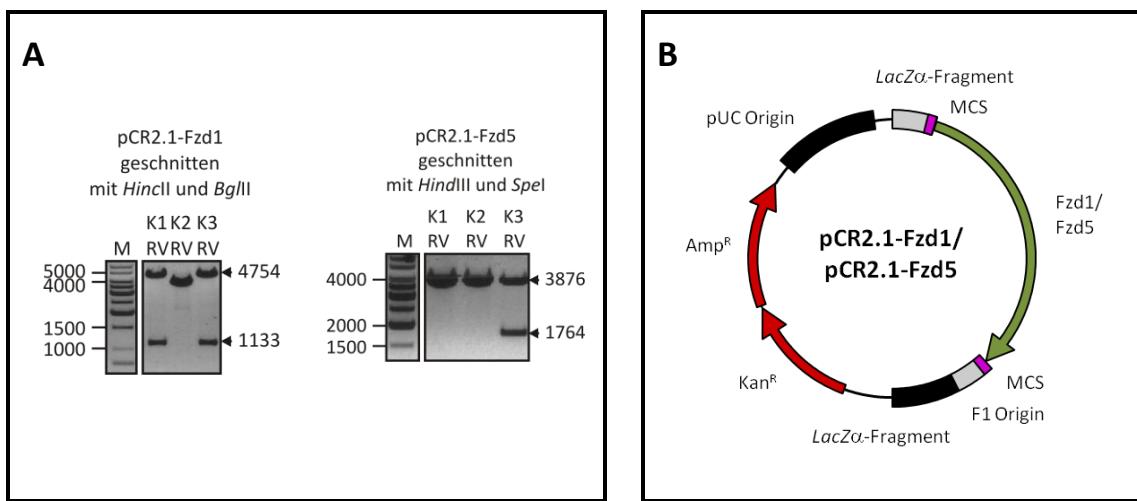


Abb. 27: Klonierung der PCR-Produkte von Fzd1 und Fzd5 in pCR2.1-TOPO (Teil II)

A) Analytischer Restriktionsverdau von pCR2.1-Fzd1 und pCR2.1-Fzd5. Der Doppelverdau mit *HincII* und *BgII* führt aufgrund der *HincII*-Schnittstelle in der Fzd1-Sequenz zur Exzision von 1133 bp (Klon 1, 3). Beim analytischen Restriktionsverdau des pCR2.1-Fzd5 wurde nach Doppelverdau mit *HindIII* und *SpeI* die eingebrachte Fzd5-Sequenz wieder ausgeschnitten (1764 bp). Bei Religation des pCR2.1-TOPO führte der Restriktionsverdau zu einer Linearisierung des Vektors und damit einer DNA-Bande bei ungefähr 4000 bp (Klon 2 bzw. Klon 1 und 2). M = Marker, K = Klon, RV = Restriktionsverdau.

B) Schematische Darstellung der Vektoren pCR2.1-Fzd1 bzw. pCR2.1-Fzd5.

Die Sequenzabschnitte für Fzd1 und Fzd5 wurden anschließend aus den entsprechenden pCR2.1-Vektoren (Abb. 27B) über einen Doppelverdau mit *HindIII* und *EcoRI* ausgeschnitten. Der Zielvektor pN3-Mock (Abb. 29A) wurde mit demselben Doppelverdau geöffnet (Abb. 29B) und nach einer Ligationsreaktion war die Umlklonierung von Fzd1 und Fzd5 abgeschlossen.

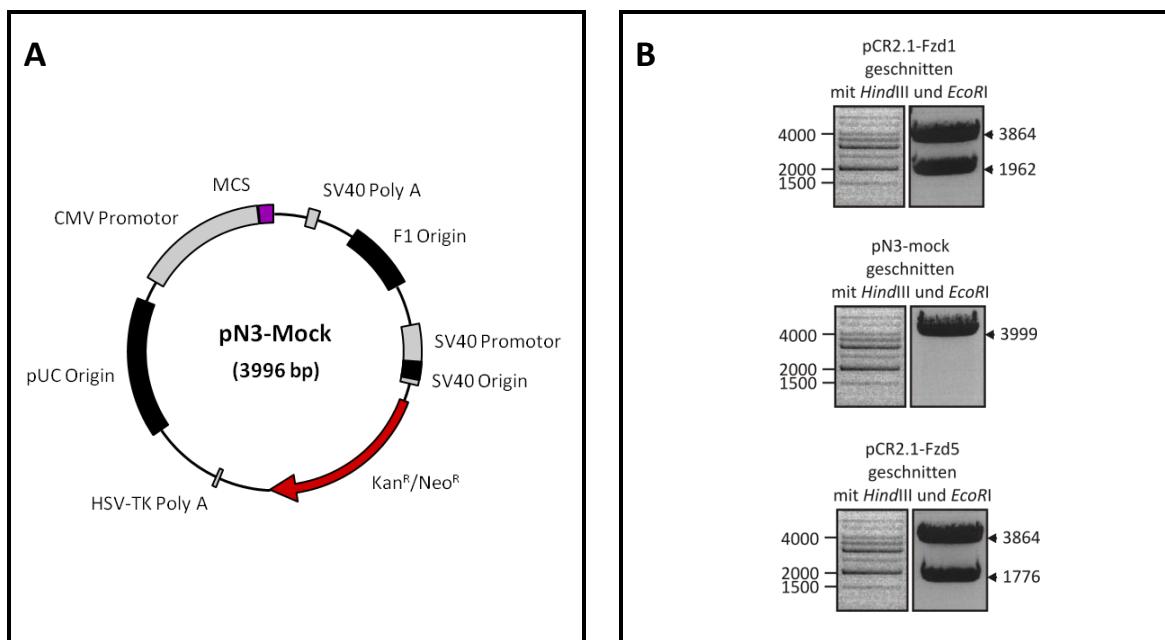


Abb. 28: Umlklonierung von Fzd1 und Fzd5 in den Überexpressionsvektor pN3 (Teil I).

A) Schematische Darstellung des Zielvektors pN3-Mock.

B) Exzision von Fzd1 und Fzd5 aus dem pCR2.1-Vektor über die Schnittstellen für *HindIII* und *EcoRI* sowie Öffnung des Zielvektors mit selbigem Doppelverdau.

Nach der Bestätigung des erfolgten Einbaus der Sequenzabschnitte für Fzd1 und Fzd5 über einen analytischen Restriktionsverdau (Abb. 29A) standen die Vektoren (Abb. 29B) für die entsprechenden Überexpressionsexperimente zur Verfügung.

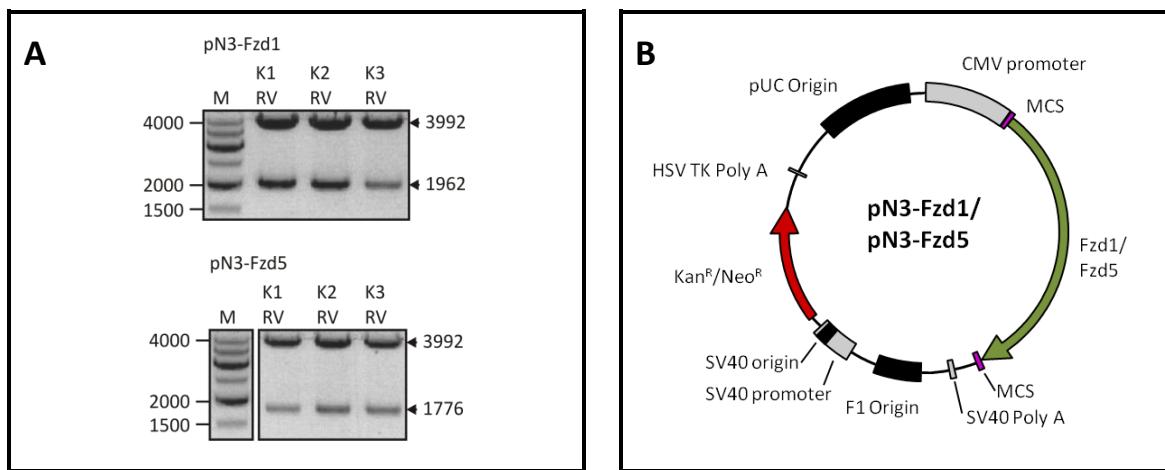


Abb. 29: Umlonierung von Fzd1 und Fzd5 in den Überexpressionsvektor pN3 (Teil II).

A) Restriktionsanalyse der Überexpressionsvektoren pN3-Fzd1 (*Hind*III, *Eco*RI) sowie pN3-Fzd5 (*Hind*III, *Eco*RI). M = Marker, K = Klon, NK = Negativkontrolle, RV = Restriktionsverdau.

B) Schematische Darstellung der Überexpressionsvektoren pN3-Fzd1 bzw. pN3-Fzd5.

Um die ektopisch exprimierten Fzd-Rezeptoren verlässlich nachweisen zu können, wurde ein synthetischer HA-tag im N-terminalen Bereich dieser Rezeptoren eingeführt. Dazu war es zunächst notwendig, eine singuläre Restriktionsschnittstelle in den Vektoren pN3-Fzd1 und pN3-Fzd5 zu finden, welche nahe an der Signalsequenz der Rezeptoren lokalisiert war. Im Fall von Fzd1 war dies über die Restriktionsschnittstelle *Eco*O109I möglich und im Fall von Fzd5 über *Not*I. Mit diesen Restriktionsenzymen wurden die Vektoren pN3-Fzd1 und pN3-Fzd5 linearisiert (Abb. 30A). Die HA-tags wurden jeweils aus zwei synthetisch hergestellten Oligonukleotiden generiert, welche nach der Hybridisierung die komplementären Enden zu den entsprechend linearisierten Vektoren aufwiesen. Nach Identifizierung von Klonen mit korrekt eingebautem HA-tag mittels analytischem Restriktionsverdau (Abb. 30B) wurde die Sequenzidentität des tags durch eine DNA-Sequenzierung überprüft. Die Aminosäuresequenz des HA-tags setzt sich aus der Abfolge der Aminosäuren YPYDVPDYA zusammen. In Abb. 30C ist der schematische Aufbau der Überexpressionsvektoren pN3-HA-Fzd1 und pN3-HA-Fzd5 dargestellt.

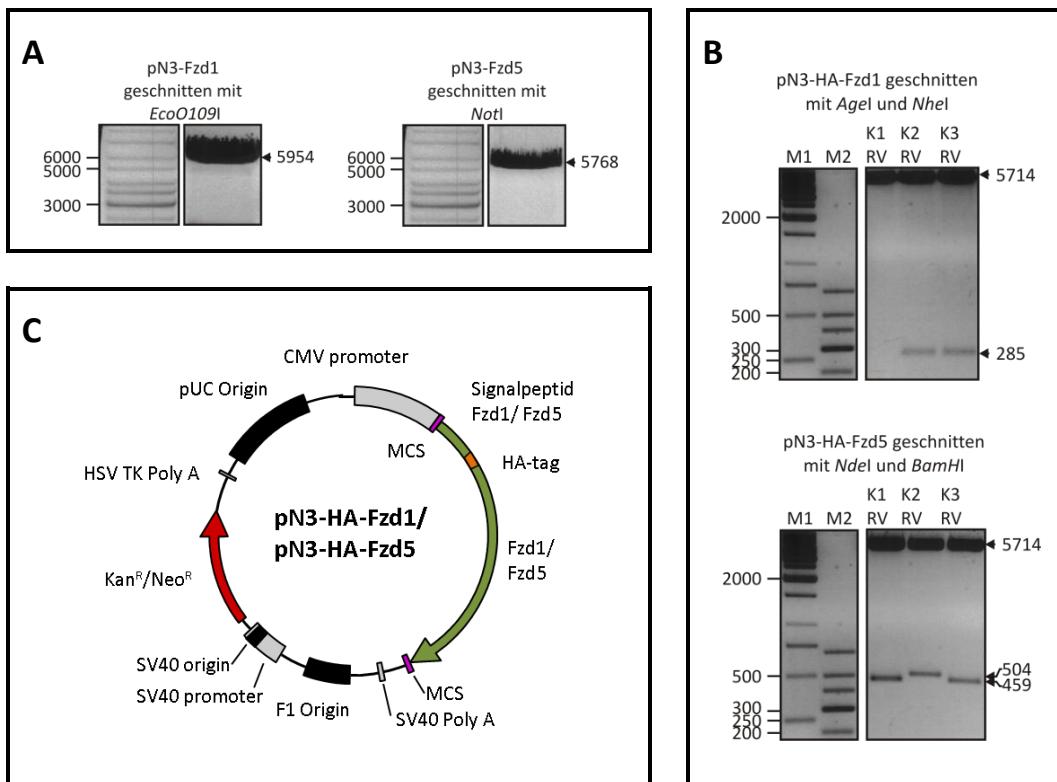


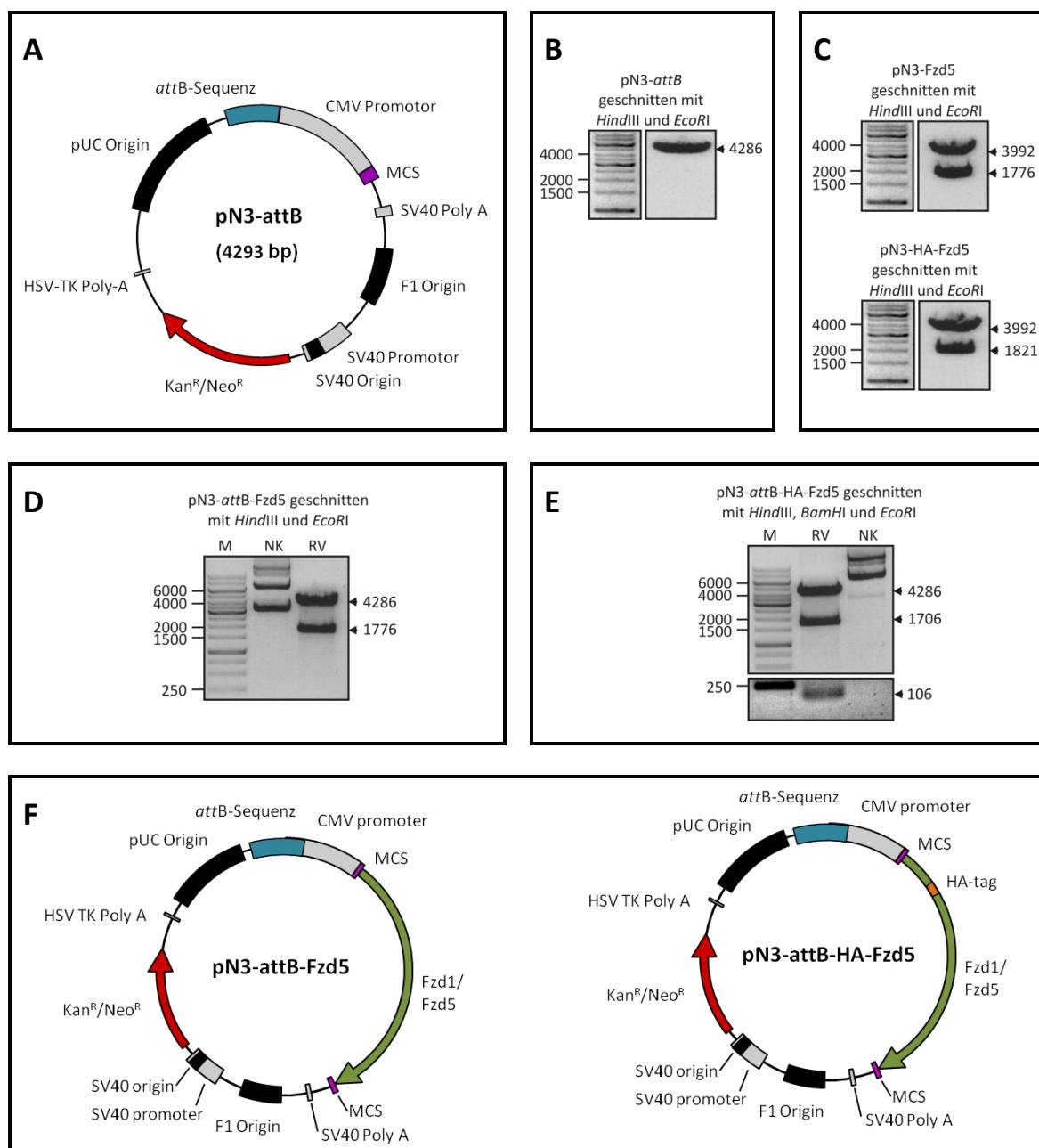
Abb. 30: Klonierung eines HA-tags in die Überexpressionsvektoren pN3-Fzd1 und pN3-Fzd5.

A) Der Vektor pN3-Fzd1 wurde mit *EcoO109I* und der pN3-Fzd5 mit *NotI* linearisiert.  
 B) Restriktionsanalyse des Überexpressionsvektors pN3-HA-Fzd1 mittels Doppelverdau aus *AgeI* und *NheI*. Mit dem HA-tag wurde auch eine *NheI* Schnittstelle in den Zievektor eingebracht, so dass positive Klone nach Restriktionsverdau eine DNA-Bande bei 285 bp aufwiesen (K2, K3). Im Fall des pN3-HA-Fzd5 wurde mit dem HA-tag eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt. Nach einem Doppelverdau aus *NdeI* und *BamHI* zeigte sich ein Einbau des HA-tags in korrekter Orientierung durch eine Bande bei 504 bp (K2) und bei invertierter Orientierung durch eine Bande bei 459 bp (K1, K3). M1 = 1 kb DNA-Leiter, M2 = Ultra low range DNA-Leiter, K = Klon, RV = Restriktionsverdau.  
 C) Schematische Darstellung der Überexpressionsvektoren pN3-HA-Fzd1 und pN3-HA-Fzd5 mit einem N-terminalen HA-tag.

#### 4.4.2 Klonierung von Fzd5 in den Überexpressionsvektor pN3-*attB*

Die 291 bp lange *attB*-Sequenz – prokaryotischen Ursprungs – erlaubt eine spezifische Integration eines Vektors in das Genom. Die Integration wird von der  $\Phi$ C31-Integrase katalysiert und findet im Genom von Eukaryoten an sogenannten pseudo *attP*-Sequenzen statt. Ziel dieser Methode ist mittels der gerichteten Integration die Ausbeute an stabilen Klonen gegenüber einer ungerichteten Integration zu erhöhen. Für die stabile Transfektion von Fzd5 wurde die schon im pN3-Fzd5 klonierte Rezeptor-Sequenz mit Signalsequenz (NM\_003468) in den pN3-*attB* (Abb. 31A) umkloniert. Dazu wurde über einen Doppelverdau mit *HindIII* und *EcoRI* der pN3-*attB* geöffnet (Abb. 31B) und die Fzd5-Sequenz mit und ohne HA-tag aus den Vektoren pN3-Fzd5 bzw. pN3-HA-Fzd5 ausgeschnitten (Abb. 31C). Danach wurde über eine Ligationsreaktion die Fzd5-Sequenz sowohl mit als auch ohne HA-tag in den pN3-*attB*-Vektor eingebracht. Mit Hilfe eines analytischen Restriktionsverdaus wurde der korrekte Einbau für den

pN3-*attB*-Fzd5 und pN3-*attB*-HA-Fzd5 überprüft (Abb. 31D bzw. E). Die Abb. 31F zeigt den schematischen Aufbau der Vektoren.



**Abb. 31: Klonierung von Fzd5 sowie HA-Fzd5 in den Überexpressionsvektor pN3-*attB*.**

A) Schematische Darstellung des pN3-*attB*.

B) Restriktion des Zielvektors pN3-*attB* mit HindIII und EcoRI.

C) Exzision von Fzd5 (1776 bp) sowie HA-Fzd5 (1821 bp) aus den Vektoren pN3-Fzd5 und pN3-HA-Fzd5 mittels HindIII und EcoRI Doppelverdau.

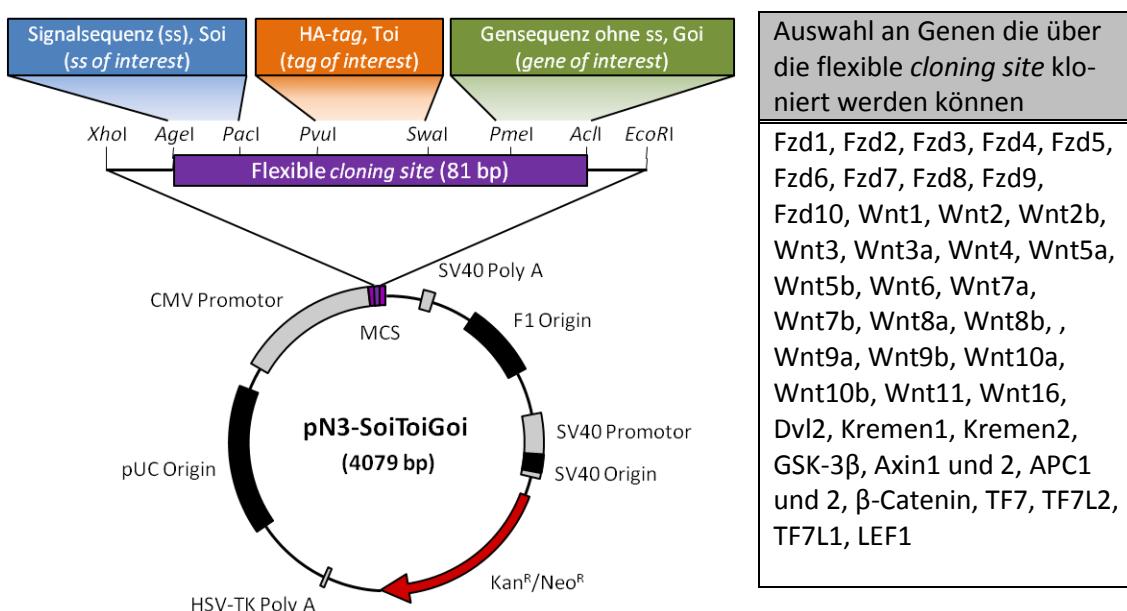
D) Restriktionsanalyse des pN3-*attB*-Fzd5 durch Doppelverdau von HindIII und EcoRI. Der positive Klon weist die Exzision der Fzd5-Rezeptorsequenz (1776 bp) auf.

E) Restriktionsanalyse des pN3-*attB*-HA-Fzd5. Nach einem Dreifachverdau aus HindIII, BamHI und EcoRI zeigt der positive Klon neben der teilweisen Exzision der Fzd5-Rezeptorsequenz (1706 bp) zusätzlich – bedingt durch die BamHI-Schnittstelle im HA-tag – eine Bande bei 106 bp. Abkürzungen M = Marker, NK = Negativkontrolle, RV = Restriktionsverdau.

F) Schematische Darstellung der Vektoren pN3-*attB*-Fzd5 und pN3-*attB*-HA-Fzd5.

### 4.4.3 Entwicklung des modularen Klonierungssystems pN3-SoiTogi

Für die Klonierung weiterer Fzds wurde eine flexible Klonierungsstrategie etabliert, die ein standardisiertes Verfahren zur Generierung von Überexpressionsvektoren erlaubt, ohne dabei auf einen Zwischenschritt mit einer TOPO-TA-Klonierung zurückgreifen zu müssen. Das zentrale Element dieses Ansatzes stellen 6 Erkennungsstellen (Abb. 32) für die sehr selten schneidenden Restriktionsenzyme *Agel*, *Pacl*, *Pvul*, *Swal*, *Pmel* und *Acl1* dar. In Abb. 32 sind Gene für Komponenten des Wnt/β-Catenin-Signalweges aufgeführt, die mit dieser Kombination an Restriktionsenzymen kloniert werden können. Dazu wurde über eine PCR mit Hilfe von modifizierten Primern Erkennungsstellen für diese Restriktionsenzyme an den Enden der jeweiligen Amplikons eingeführt.



**Abb. 32: Aufbau und Anwendung des modularen Klonierungssystems.**

Schematischer Aufbau der flexiblen *cloning site*, welche sich durch die Kombination der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Agel*, *Pacl*, *Pvul*, *Swal*, *Pmel* und *Acl1* zusammensetzt.

Das in Abb. 33A aus einer Hybridisierung zweier Oligonukleotide generierte DNA-Fragment (99bp), enthielt die 81 bp lange flexible *cloning site*, bei der die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme durch Spacersequenzen voneinander getrennt sind. Das erleichtert zum einen das sequentielle Klonieren und zum anderen führen diese Spacersequenzen zu einer größeren Flexibilität in der Polypeptidkette. Mit den Überhängen (19 bp) von *Xhol* und *EcoRI* wurde die flexible *cloning site* (81bp) in den pN3-Überexpressionsvektor eingebracht, der im folgenden pN3-SoiTogi genannt wird. Dabei steht Soi für *signal sequence of interest*, Toi für *tag of interest* und Goi für *gene of interest*. Nach einem Restriktionsverdau zur Prüfung des korrekten Einbaus (Abb. 33B) wurde die korrekte Sequenzidentität durch eine DNA-Sequenzierung überprüft.

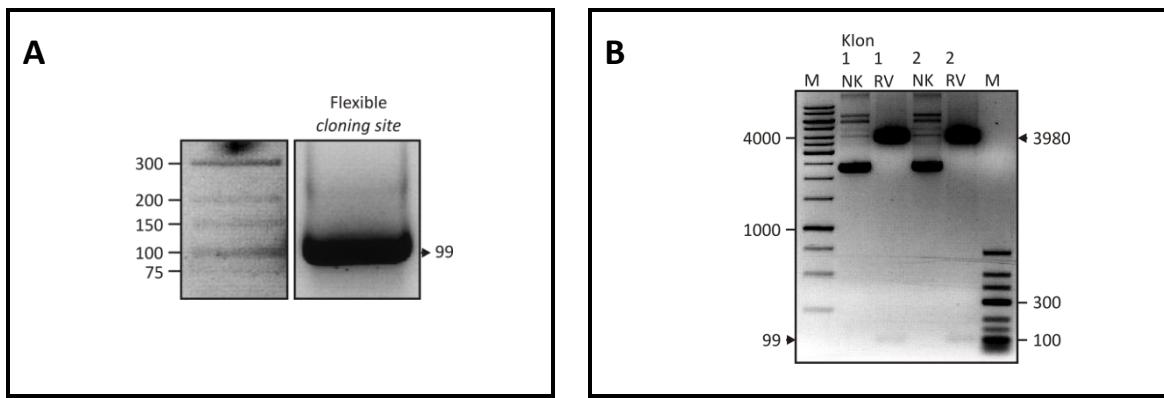


Abb. 33: Generierung des modularen Klonierungssystems.

A) Flexible *cloning site* (81 bp) mit Überhängen (18 bp) für die Restriktionsschnittstellen *Xhol* und *EcoRI* zur Einbringung in den entsprechend linearisierten pN3-Mock Vektor.  
 B) Analyse des pN3-SoiToiGoi nach Klonierung der flexiblen *cloning site* in den pN3-Vektor. Exzision der flexiblen *cloning site* durch *Xhol* und *EcoRI* Doppelverdau. M = Marker, NK = Negativkontrolle, RV = Restriktionsverdau.

#### 4.4.4 Klonierung von Fzd1, 3, 5, 6 und 7 in den pN3-SoiToiGoi-Vektor

In einem ersten Schritt wurde in den pN3-SoiToiGoi die Signalsequenz des Fzd5-Rezeptors (85 bp) kloniert. Dazu wurde eine PCR mit modifizierten Primern durchgeführt, welche die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *AgeI* und *PacI* sowie zusätzlich Überhänge von jeweils 6 bp an den Enden des PCR-Produkts (101 bp) einführten (Abb. 34A). Danach wurde der Zielvektor pN3-SoiToiGoi über den Doppelverdau mit *AgeI* und *PacI* linearisiert (Abb. 34B) und das PCR-Produkt (Abb. 35A) mit dem gleichen Doppelverdau auf 85 bp getrimmt, um nach einer Ligationsreaktion den pN3-Fzd5-Soi zu erhalten.

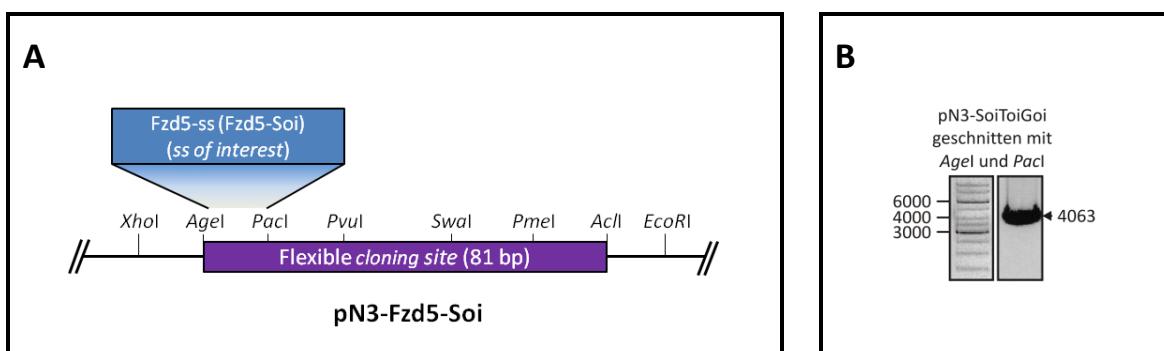


Abb. 34: Klonierung des pN3-Fzd5-Soi-Vektors (Teil I).

A) Die Insertion der Nukleinsäuresequenz, die für das Signalpeptid von Fzd5 kodiert, erfolgte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *AgeI* und *PacI*.  
 B) Restriktionsverdau des Zielvektors pN3-SoiToiGoi mit *AgeI* und *PacI*.

Über einen analytischen Restriktionsverdau wurde der Einbau der Nukleinsäuresequenz, die für das Signalpeptid kodiert, überprüft (Abb. 35B). Zusätzlich wurde über eine DNA-Sequenzierung mit nachfolgendem Alignment die Sequenzidentität verifiziert. In Abb. 35C ist der Aufbau des pN3-Fzd5-Soi schematisch dargestellt.

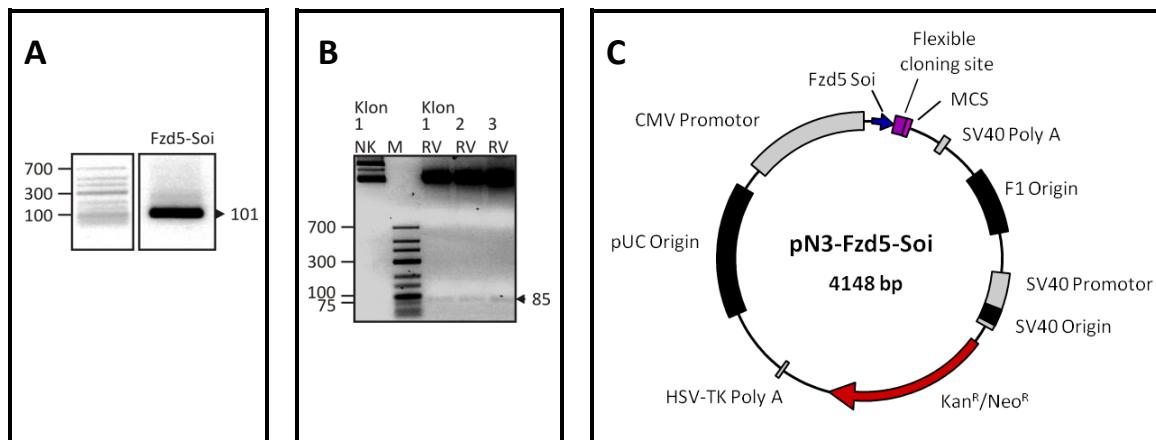


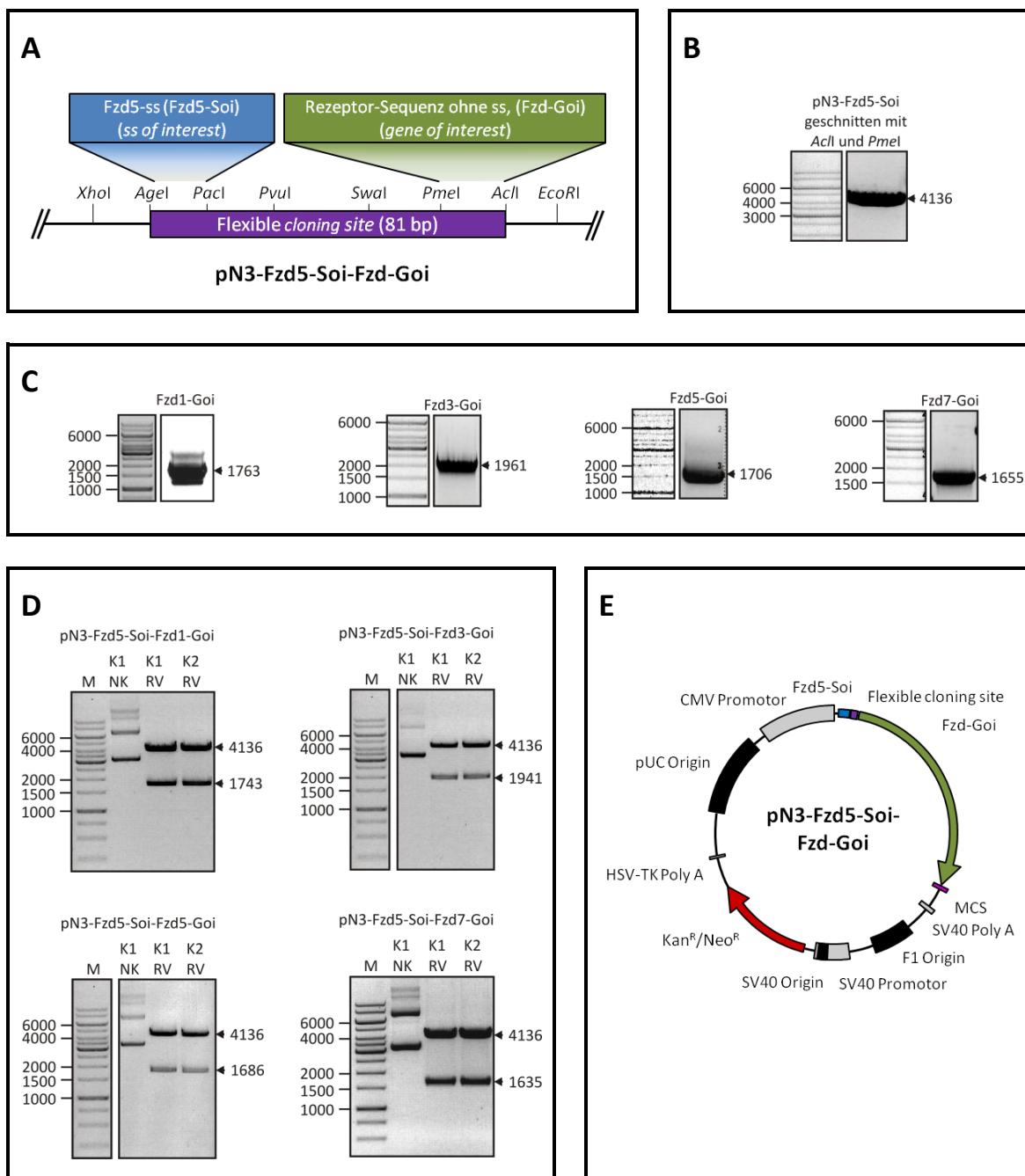
Abb. 35: Klonierung des pN3-Fzd5-Soi-Vektors (Teil II).

A) PCR Produkt der Fzd5-Signalsequenz mit den Schnittstellen für *AgeI* und *PalI*. Als Matrize diente pCMV6-XL4-Fzd5.

B) Restriktionsanalyse dreier positiver Klone über Exzision der Nukleinsäuresequenz, welche für die Fzd5-Signalsequenz (85 bp) kodiert, durch einen Doppelverdau mit *AgeI* und *PalI*. NK = Negativkontrolle, M = Marker, RV = Restriktionsverdau.

C) Schematische Darstellung von pN3-Fzd5-Soi.

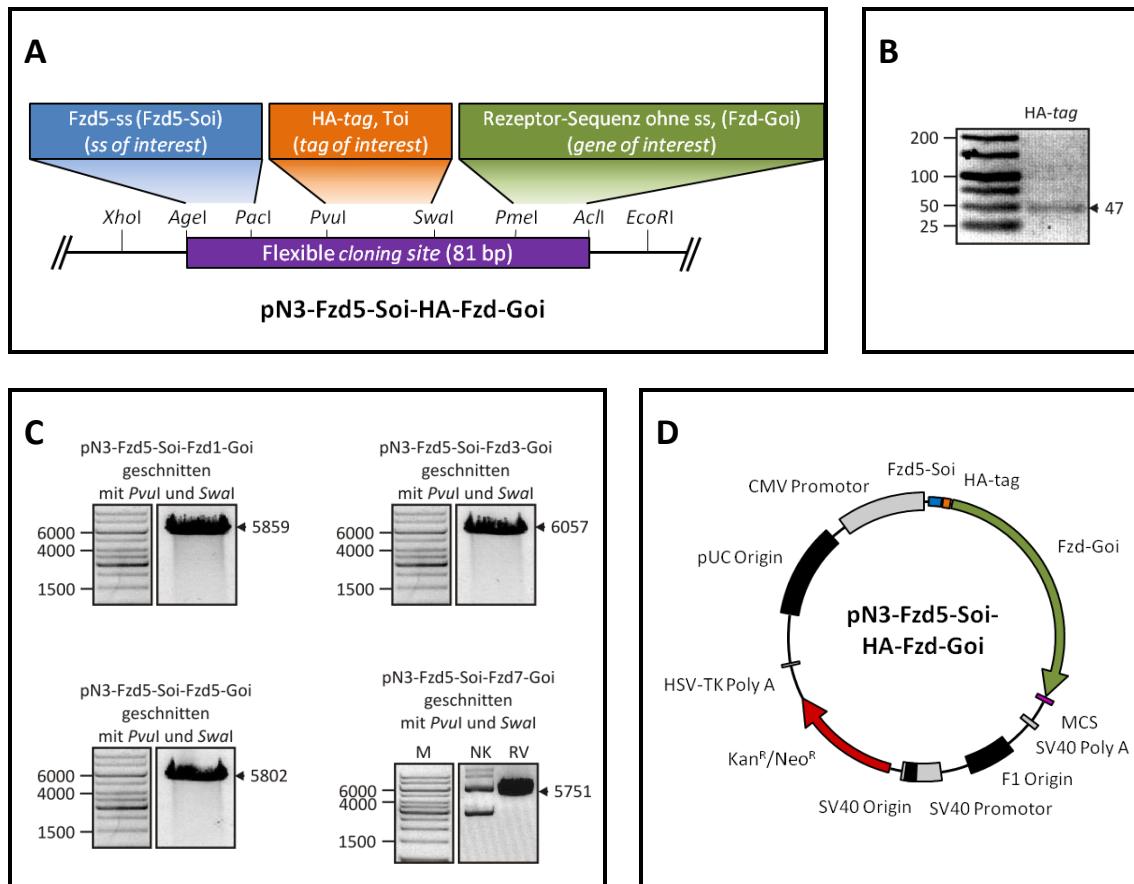
In den nächsten Klonierungsschritten wurden Fzd1, 3, 5 und 7 ohne ihre zugehörigen Signalsequenzen (Abb. 36A) in den pN3-Fzd5-Soi (Abb. 36B) kloniert. Dafür wurden wieder über eine PCR (Abb. 36C) an den Enden der Amplikons Schnittstellen eingeführt – diesmal für die Enzyme *PmeI* und *AcI* – sowie jeweils 6 bp zusätzlich, um die Effizienz des Restriktionsverdaus zu erhöhen. Als Matrize dienten die Vektoren von den Firmen Origene und Imagene. Durch den Doppelverdau mit *PmeI* und *AcI* wurde der Zielvektor pN3-Fzd5-Soi linearisiert (Abb. 36B) sowie die Amplikons um die oben genannten 6 bp getrimmt. Danach wurden über eine Ligasereaktion die codierenden Sequenzen für die jeweiligen Fzd-Rezeptoren in den pN3-Fzd5-Soi eingebracht. Die erhaltenen Fzd-Überexpressionsvektoren wurden mittels eines analytischen Restriktionsverdaus auf den korrekten Einbau der PCR-Produkte geprüft (Abb. 36D) und mittels DNA-Sequenzierung und nachfolgendem Alignment die Übereinstimmung der Sequenzidentität mit den Datenbanksequenzen für Fzd1 (NM\_003505), Fzd3 (NM\_017412), Fzd5 (NM\_003468) und Fzd7 (NM\_003507) abgeglichen. Eine schematische Darstellung des Aufbaus der generierten Fzd-Überexpressionsvektoren geht aus Abb. 36E hervor.



**Abb. 36: Klonierung der Überexpressionsvektoren pN3-Fzd5-Soi-Fzd1-Goi, pN3-Fzd5-Soi-Fzd3-Goi, pN3-Fzd5-Soi-Fzd5-Goi und pN3-Fzd5-Soi-Fzd7-Goi.**

- A) Die Insertion der für den jeweiligen Rezeptor kodierenden Sequenzen erfolgte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Pmel* und *AclI*.
- B) Restriktionsverdau des Zielvektors pN3-Fzd5-Soi mit *Pmel* und *AclI*.
- C) PCR Produkte der Rezeptor-Sequenzen ohne Signalsequenz (ss) mit den Schnittstellen für *Pmel* und *AclI*. Als Matrize dienten die Vektoren von Origene (Fzd1, 3, 5) sowie von Imagene (Fzd7).
- D) Restriktionsanalysen der Fzd-Überexpressionsvektoren. Positive Klone wiesen nach Doppelverdau durch *Pmel* und *AclI* eine Exzision der klonierten Fzd-Fragmente auf. Die DNA-Bande bei 4136 bp repräsentiert den Zielvektor pN3-Fzd5-Soi und die untere Bande das jeweilig klonierte Fzd-Fragment. M= Marker, K = Klon, NK = Negativkontrolle, RV = Restriktionsverdau.
- E) Schematische Darstellung der Überexpressionsvektoren pN3-Fzd5-Soi-Fzd-Goi.

Der letzte Klonierungsschritt bestand nun in der Einführung eines HA-tags zwischen der Sequenz, die für das Signalpeptid codiert, und der codierenden Sequenz für die CRD des jeweiligen Fzd-Rezeptors (Abb. 37A). Hierfür wurde zuerst der 47 bp lange *tag* mittels Hybridisierung zweier Oligonukleotide generiert (Abb. 37B), welcher danach die kompatiblen Enden für die Klonierung über die Schnittstellen *Pvu*I und *Swal* aufwies. Nach Linearisierung der Fzd1-, 3-, 5- und Fzd7-Überexpressionsvektoren (Abb. 37C) über einen Doppelverdau mit *Pvu*I und *Swal* konnte im Anschluss daran mittels Ligasereaktion der HA-tag in die Vektoren eingebracht werden. Die Sequenzidentität des HA-tags wurde über DNA-Sequenzierung bestätigt. Das Grundgerüst dieser Vektoren ist in Abb. 37D dargestellt.



**Abb. 37: Klonierung des HA-tags in die Fzd-Überexpressionsvektoren.**

- A) Die Insertion des HA-tags erfolgte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Pvu*I und *Swal*.
- B) Der HA-tag wurde durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide generiert.
- C) Restriktionsverdau der Fzd-Überexpressionsvektoren durch *Pvu*I und *Swal* als Vorbereitung zur Klonierung des HA-tags.
- D) Schematische Darstellung der Fzd-Überexpressionsvektoren mit einem N-terminalen HA-tag. Positive Klone wurden über Sequenzierung bestätigt.

Für die Klonierung des Fzd6-Rezeptors kam ebenso der pN3-Fzd5-Soi zum Einsatz, diesmal aber mit vorhandenem HA-tag im Vektor. Der Aufbau des Fzd6-Rezeptors ist schematisch in Abb. 38A dargestellt. Im ersten Schritt wurde dem pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd5-Goi in einem Doppelverdau mit *Pmel* und *AclI* die für den Fzd5-Rezeptor kodierende Sequenz (1686 bp) ausgeschnitten (Abb. 38B). Nachfolgend wurde in einer PCR die Nukleinsäuresequenz des Fzd6-Rezeptors (2073 bp) ohne Signalsequenz amplifiziert. Als Matrize diente eine aus HEK293 revers transkribierte total-RNA. Für die PCR (Abb. 38C) wurden Primer verwendet, die neben den Restriktionsschnittstellen für *Pmel* und *AclI* noch jeweils 6 bp an die Enden des Amplikons (2093 bp) einführten, welche die Effizienz des nachfolgenden Doppelverdaus mit *Pmel* und *AclI* erhöhen sollten. Darauf erfolgte die Ligationsreaktion des Fzd6-Goi-Fragments mit dem linearisierten Vektor pN3-Fzd5-Soi-HA. Über einen analytischen Restriktionsverdau mit *Pmel* und *AclI* wurde der Einbau des Fzd6-Goi-Fragments (2073 bp) überprüft (Abb. 38D) und mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung die Sequenzidentität der Datenbanksequenz von Fzd6 (NM\_003506) abgeglichen. Der fertiggestellte Vektor ist in (Abb. 38E) dargestellt.

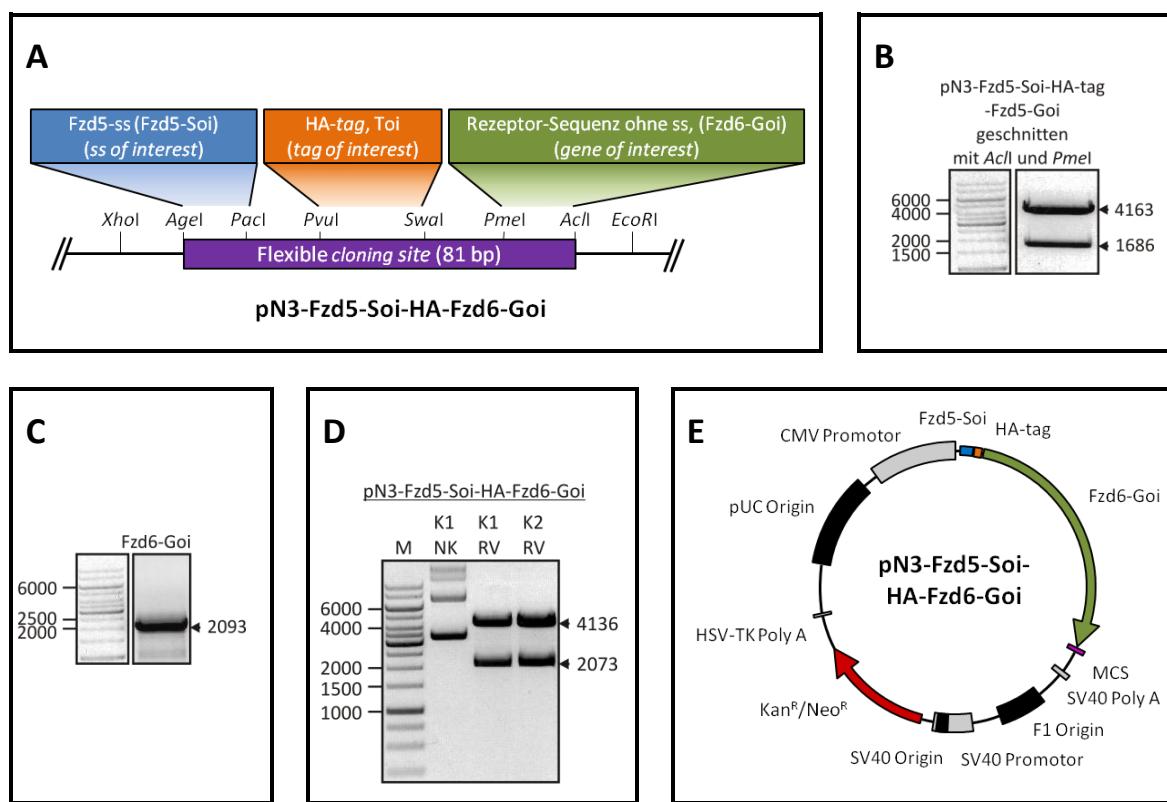


Abb. 38: Klonierung des Überexpressionsvektors pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd6.

- A) Die Insertion der Fzd6-Sequenz erfolgte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Pmel* und *AclI*.
- B) Restriktionsverdau des Zielektors pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd5-Goi mit *Pmel* und *AclI*.
- C) PCR Produkt der Fzd6-Rezeptor-Sequenz mit den Schnittstellen für *Pmel* und *AclI*.
- D) Restriktionsanalyse des pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd6-Goi über einen Doppelverdau mit *Pmel* und *AclI*. Positive Klone weisen sich durch eine Exzision der Fzd6-Rezeptor-Sequenz (2073 bp) aus. M= Marker, K = Klon, NK = Negativkontrolle, RV = Restriktionsverdau.
- E) Schematische Darstellung des Überexpressionsvektors pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd6-Goi mit N-terminalen HA-tag.

#### 4.4.5 Klonierung von Wnt3 und Wnt3a in den pN3-SoiToiGoi-Vektor

Für die Klonierung von Wnt3 und Wnt3a wurde ebenfalls das flexible Klonierungssystem im pN3-SoiToiGoi-Vektor genutzt. Wie auch bei den Fzds wurde die Nukleinsäuresequenz, welche für die Signalsequenz kodiert, unabhängig vom restlichen Wnt-Fragment und dem HA-tag kloniert (Abb. 39A). Als Signalsequenz wurde die von Wnt3a (85 bp) gewählt und mittels einer PCR wurden die Restriktionsschnittstellen für *AgeI* und *PacI* sowie zusätzlich jeweils 8 bp an den Enden des Amplikons (101 bp) eingeführt (Abb. 39B). Als Matrize für die PCR diente das pN3-Wnt3a-Plasmid. Nach einem Doppelverdau des Amplikons und des pN3-SoiToiGoi mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *PacI* wurde über eine Ligationsreaktion das Wnt3a-Soi-Fragment in den pN3-SoiToiGoi eingebracht. Der dabei generierte pN3-Wnt3a-Soi wurde mittels Restriktionsverdau auf den korrekten Einbau des Wnt3a-Soi-Fragments hin überprüft (Abb. 39C) und mittels DNA-Sequenzierung wurde die erhaltene Sequenz mit der aus der Datenbank für Wnt3a (NM\_033131) abgeglichen. Die schematische Darstellung von pN3-Wnt3a-Soi zeigt Abb. 39D.

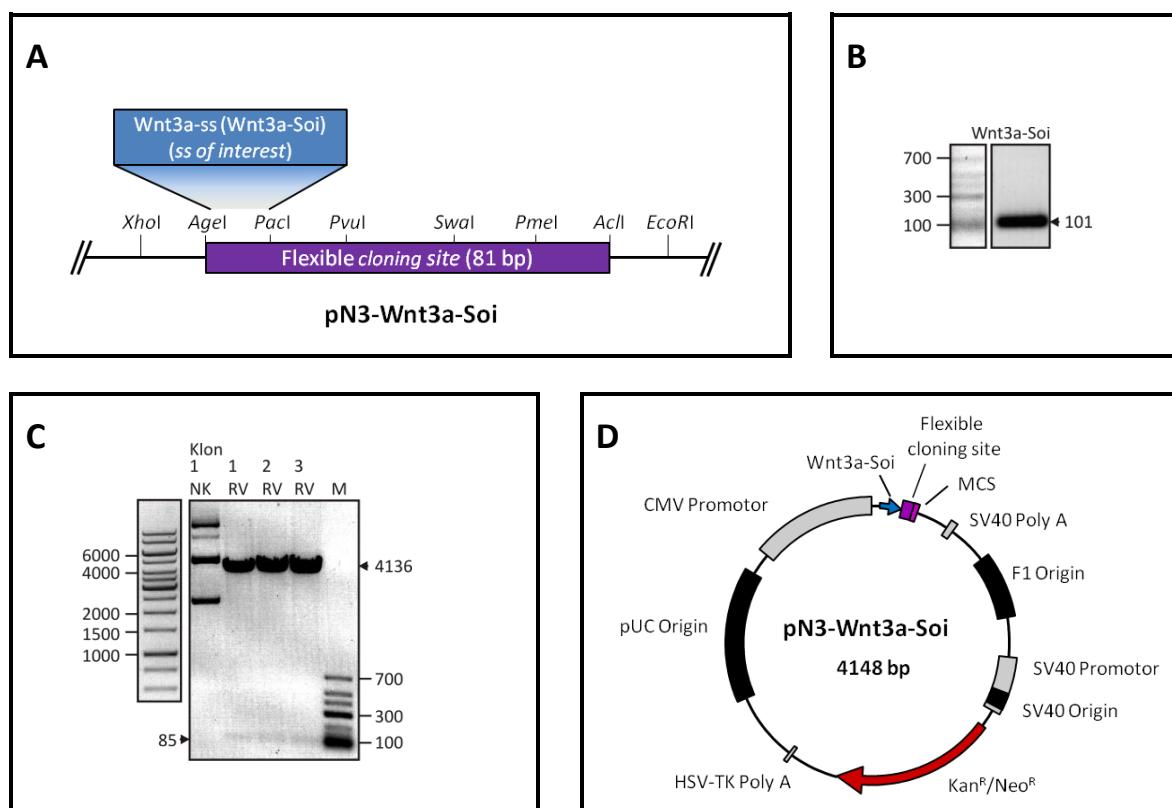
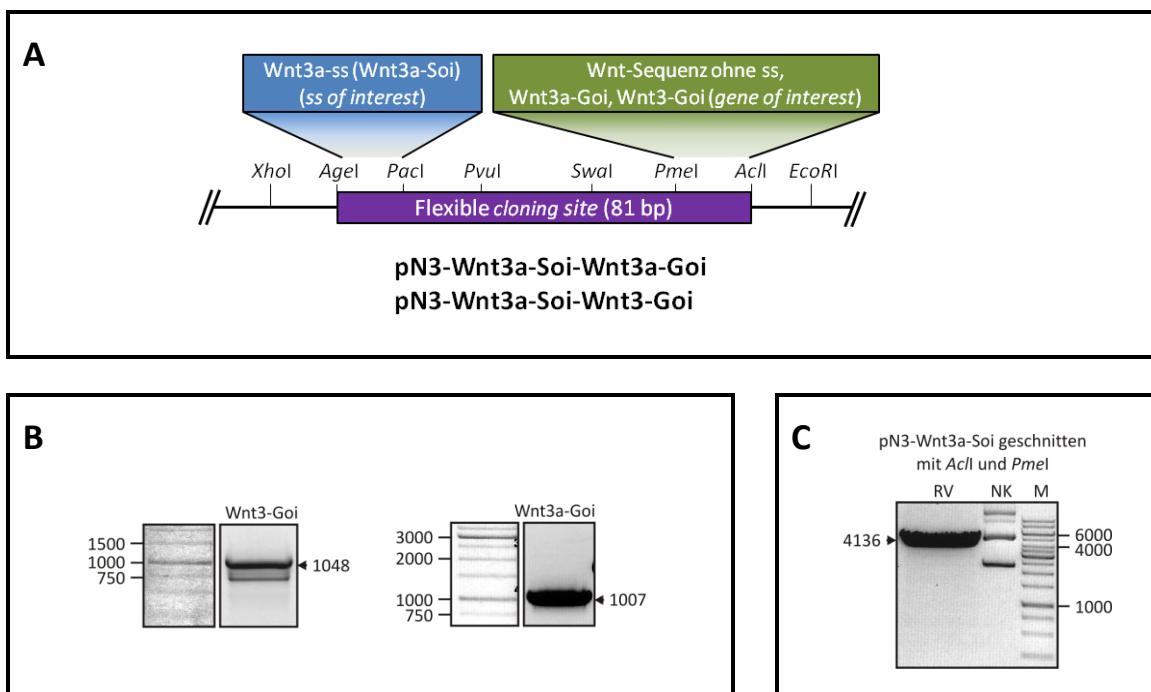


Abb. 39: Klonierung des pN3-Wnt3a-Soi Vektors.

- A) Die Insertion der Signalsequenz von Wnt3a erfolgte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *AgeI* und *PacI*.
- B) PCR-Produkt der Signalsequenz von Wnt3a mit den Schnittstellen für *AgeI* und *PacI*.
- C) Restriktionsanalyse dreier positiver Klonen über Exzision der Wnt3a-Signalsequenz (85 bp) mittels eines Doppelverdaus aus *AgeI* und *PacI*. NK = Negativkontrolle, M = Marker, RV = Restriktionsverdau.
- D) Schematische Darstellung des Überexpressionsvektors pN3-Wnt3a-Soi.

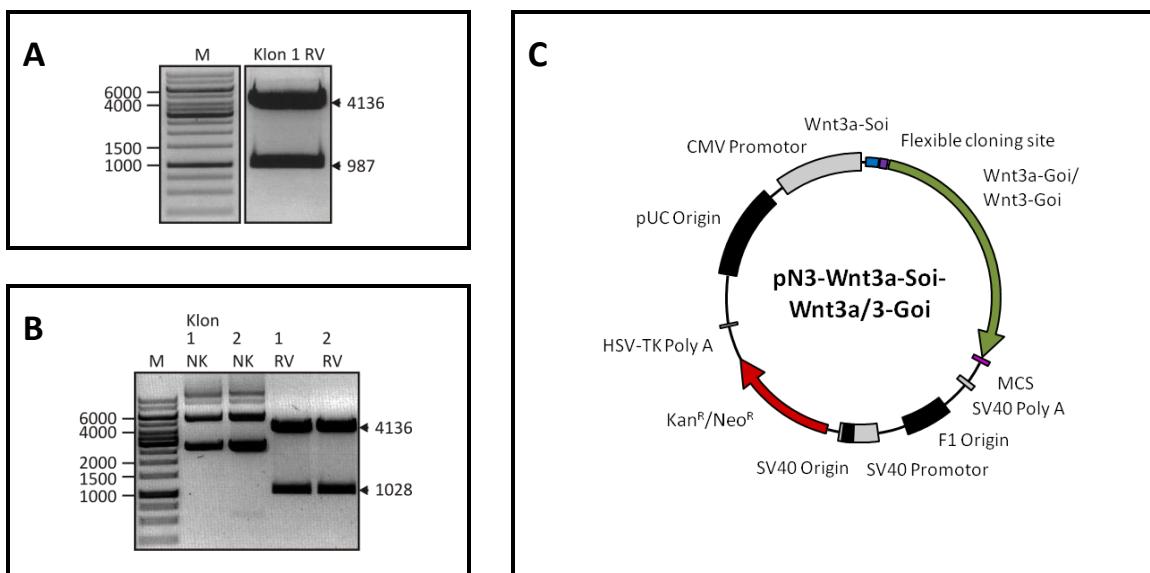
Im nächsten Schritt wurden die kodierenden Sequenzen von Wnt3a und Wnt3 jeweils ohne Signalsequenz in den pN3-Wnt3a-Soi eingebracht (Abb. 41A). Dazu wurden die Wnt3a- bzw. Wnt3-Sequenz (987 bp bzw. 1028 bp) durch PCR mit elongierten Primern amplifiziert. Diese führten neben den Restriktionsschnittstellen für *Pmel* bzw. *AcII* zusätzlich jeweils 6 bp an den Enden des Amplikons ein (Abb. 41B), was den nachfolgenden Restriktionsverdau mit *Pmel* und *AcII* erleichterte. Als Matrize diente für Wnt3a der pN3-Wnt3a und im Fall von Wnt3 cDNA, die aus total-RNA von HEK293-Zellen hergestellt worden war. Nach Doppelverdau des Amplikons sowie des Zielvektors pN3-Wnt3a-Soi mit *Pmel* und *AcII* (Abb. 41C) erfolgte die Ligationsreaktion



**Abb. 40: Klonierung der Überexpressionsvektoren pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3a/Wnt3-Goi (Teil I).**

- A) Die Insertion der Wnt-Sequenzen erfolgte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Pmel* und *AcII*.
- B) PCR-Produkte der Wnt3a- und Wnt3-Sequenzen ohne Signalsequenz mit den Schnittstellen für *Pmel* sowie *AcII*.
- C) Restriktionsverdau des Zielvektors pN3-Wnt3a-Soi mit *Pmel* und *AcII*.

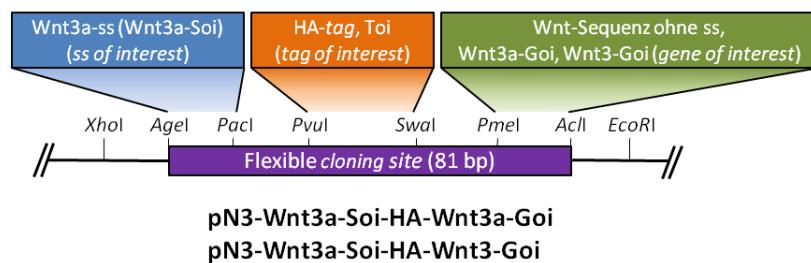
Die erhaltenen Wnt3a- und Wnt3- Überexpressionsvektoren wurden mittels analytischen Restriktionsverdau auf den korrekten Einbau der Amplikons geprüft (Abb. 41A, B). Abschließend wurde ein Alignment mit den aus der DNA-Sequenzierung und den aus der Datenbank für Wnt3a (NM\_033131) und Wnt3 (NM\_030753) erhaltenen Sequenzen durchgeführt. Eine schematische Übersicht dieser Vektoren ist in Abb. 41C dargestellt.



**Abb. 41: Klonierung der Überexpressionsvektoren pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3a/Wnt3-Goi (Teil II).**

- A) Restriktionsanalyse des Überexpressionsvektors pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3a-Goi mittels eines Restriktionsverdaus aus *Pmel* und *AclI* sowie Exzision des Wnt3a-Goi-Fragments (987 bp).
- B) Restriktionsanalyse des Überexpressionsvektors pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3-Goi durch einen Restriktionsverdau mit *Pmel* und *AclI* sowie Exzision des Wnt3-Goi-Fragments (1028 bp). M= Marker, RV = Restriktionsverdau.
- C) Schematische Darstellung der Überexpressionsvektoren pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3a-Goi und pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3-Goi.

Im letzten Schritt wurde in die Wnt-Überexpressionsvektoren noch ein N-terminaler HA-tag eingebracht (Abb. 42).



**Abb. 42: Klonierung des HA-tags in die Überexpressionsvektoren pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3a/Wnt3-Goi (Teil I).**  
Die Insertion des HA-tags erfolgte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Pvul* und *Swal*.

Nach Linearisierung der Wnt3a- und Wnt3-Überexpressionsvektoren durch Doppelverdau mit *Pvul* und *Swal* (Abb. 43A, B) wurde der HA-tag mittels einer Ligationsreaktion in die Vektoren eingebracht. Der Einbau des HA-tags wurde hierbei über einen analytischen Restriktionsverdau überprüft (Abb. 43C, D). Abb. 43E zeigt die schematische Darstellung von pN3-Wnt3a-Soi-HA-Wnt3a/Wnt3-Goi.

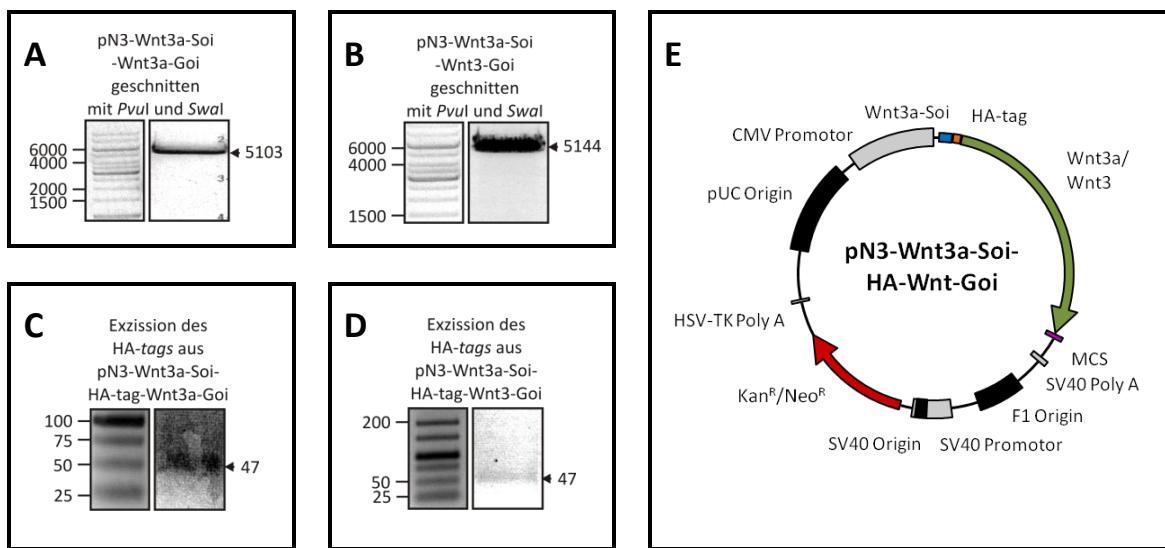


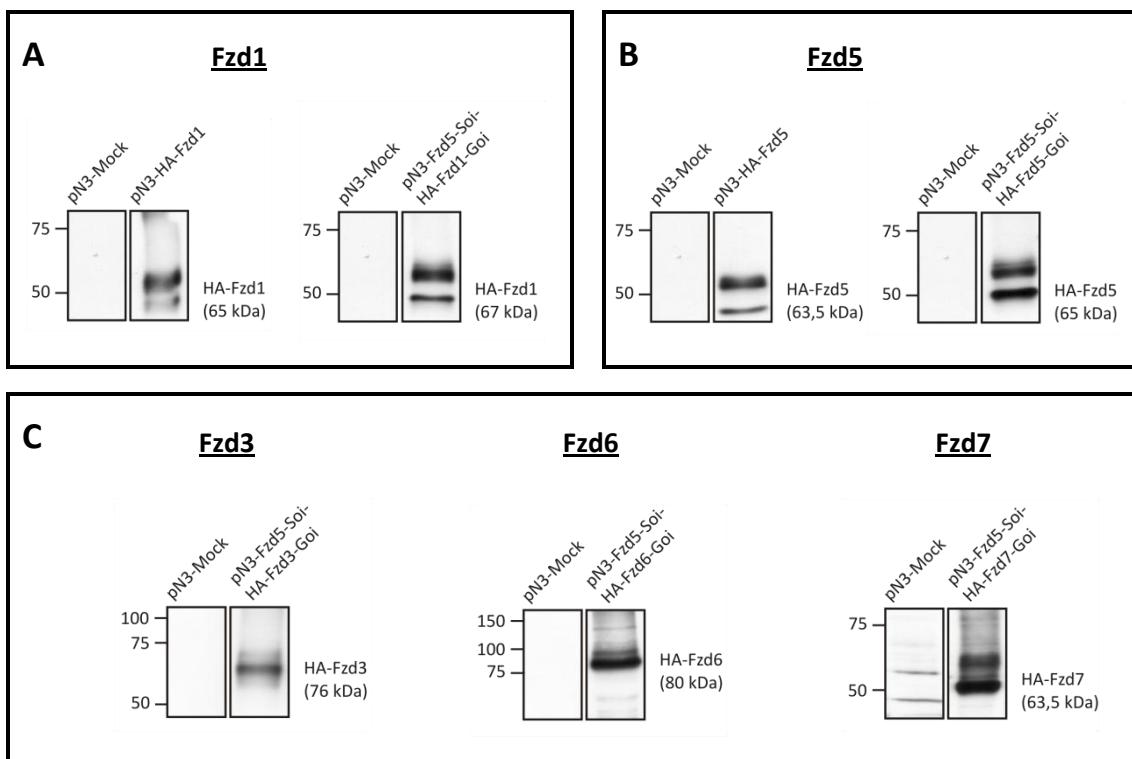
Abb. 43: Klonierung des HA-tags in die Überexpressionsvektoren pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3a/Wnt3-Goi (Teil II).

- A) Restriktionsverdau des Zielvektors pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3a-Goi mit Pvul und Swal.
- B) Restriktionsverdau des Zielvektors pN3-Wnt3a-Soi-Wnt3-Goi mit Pvul und Swal.
- C) Restriktionsanalyse des pN3-Wnt3a-Soi-HA-Wnt3a-Goi mit Pvul und Swal.
- D) Restriktionsanalyse des pN3-Wnt3a-Soi-HA-Wnt3-Goi mit Pvul und Swal.
- E) Schematische Darstellung der Überexpressionsvektoren pN3-Wnt3a-Soi-HA-Wnt3a-Goi und pN3-Wnt3a-Soi-HA-Wnt3-Goi.

#### 4.4.6 Nachweis der Überexpression von Fzds sowie Wnts auf mRNA- und Protein-Ebene

Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades innerhalb der Frizzled- und Wnt-Familie – mit bis zu 75 % bzw. 95 % Sequenzidentität zwischen einzelnen Mitgliedern der Familien – sind bislang nur wenig spezifische Antikörper käuflich zu erwerben. Aufgrund dieser Tatsache wurden deshalb HA-getaggte Proteine ektopisch exprimiert, um diesen über Anti-HA-Antikörper nachweisen zu können.

Der Nachweis der Überexpression wurde zunächst in HEK293 Zellen durchgeführt. In Abb. 45A und B sind Western-Blots von Zelllysaten der beiden verschiedenen Überexpressionsansätze für Fzd1 und Fzd5 vergleichend nebeneinander dargestellt. Im Fall der pN3-SoiToiGoi-Konstrukte wiesen die Proteinbanden ein höheres Molekulargewicht auf. Dies ist auf die Einbringung von Spacersequenzen zusammen mit dem HA-tag zurückzuführen. Sowohl bei Fzd1 als auch bei Fzd5 und Fzd7 war jeweils eine ausgeprägte Doppelbande im Western Blot nachweisbar, wobei die untere der beiden Banden im Vergleich zum errechneten Molekulargewicht eine um etwa 10 kDa geringere Masse aufwies. Die Überexpression von Fzd3 (Abb. 45C) zeigte ebenfalls eine Bande bei geringerem Molekulargewicht (65 kDa anstelle des erwarteten Molekulargewichts von 76 kDa).



**Abb. 44: Ektopische Expression von HA-Fzd1, 3, 5, 6 und 7 in HEK293-Zellen.**

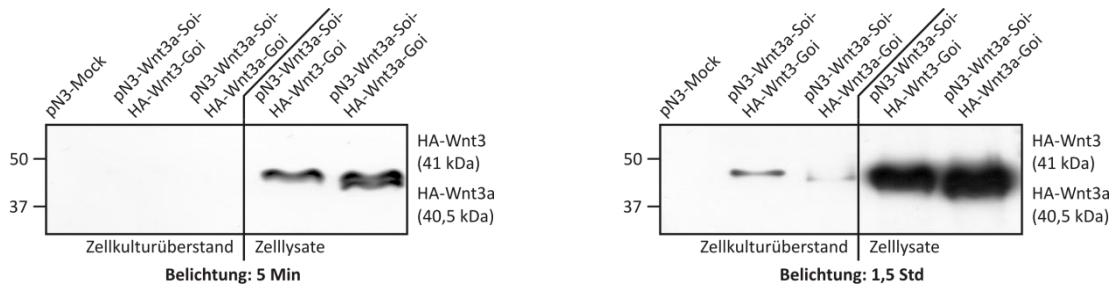
Die Immundetektion wurde mittels eines Anti-HA-Antikörpers durchgeführt.

A) Vergleichende Überexpression von HA-Fzd1 mittels pN3-HA-Fzd1 und pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd1-Goi in HEK293-Zellen. Die Lysate wurden an Tag 2 nach Transfektion generiert.

B) Vergleichende Überexpression von HA-Fzd5 mittels pN3-HA-Fzd5 und pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd5-Goi in HEK293-Zellen. Die Lysate wurden an Tag 2 nach Transfektion generiert.

C) Überexpression von HA-Fzd3, 6 sowie von 7 in HEK293-Zellen an Tag 2 nach Transfektion.

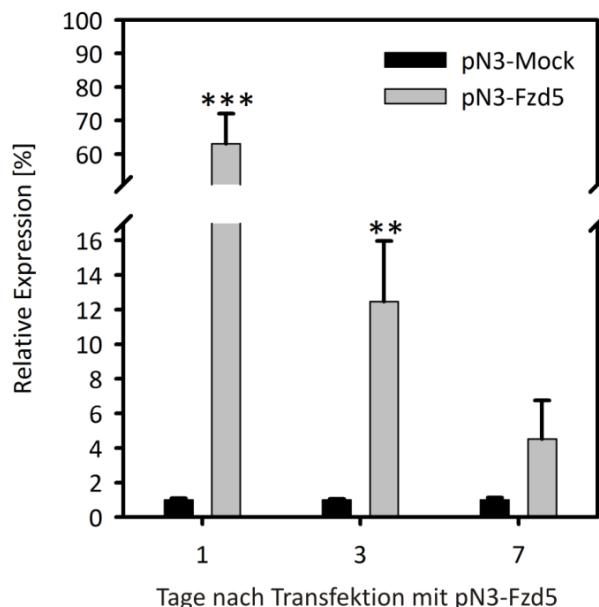
Auch der funktionelle Nachweis der HA-Wnt3a und HA-Wnt3-Überexpressionskonstrukte (Abb. 45) wurde in HEK293-Zellen durchgeführt. Basierend auf der Gegebenheit, dass es sich hierbei um sezernierte Moleküle handelt, wurden nicht nur die Zelllysate, sondern auch die jeweiligen Zellkulturüberstände mittels Western Blot analysiert. Wie Abb. 45 zeigt, war die Überexpression hauptsächlich in den Zelllysaten nachweisbar, während in den Zellkulturüberständen nur eine geringe Menge Wnt3a detektiert werden konnte. Zudem zeigte sich bei der Wnt3a-Überexpression eine Doppelbande. Die Molekulargewichte der detektierten Banden stimmten mit den erwarteten Molekulargewichten weitgehend überein.



**Abb. 45: Ektopische Expression von HA-Wnt3 und HA-Wnt3a in HEK293-Zellen.**

Die Immundetektion wurde mittels eines Anti-HA-Antikörpers durchgeführt. Ektopische Expression von Wnt3 und Wnt3a in den HEK293-Zellen. Die Zellkulturüberstände wurden an Tag 2 abgenommen. Auch am gleichen Tag wurden die Lysate generiert. Die beiden Bilder zeigen unterschiedlich lang belichtete (links 5 Min und rechts 1,5 Std) Filme einer Membran.

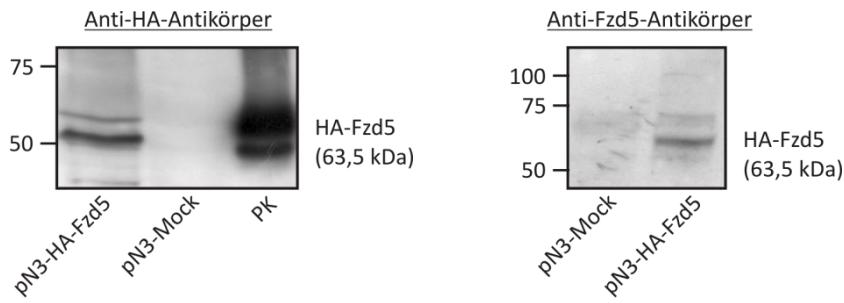
Im nächsten Schritt wurde die Überexpression von Fzd5 mittels des pN3-HA-Fzd5-Konstruktes in hMSC auf RNA-Ebene (Abb. 46) wie auch auf Proteinebene (Abb. 47) evaluiert. Auf RNA-Ebene lag die Überexpression an Tag 1 bei 63 % der GAPDH-Expression. Dies entsprach im Vergleich zu den Mock-transfizierten Kontrollansätzen mit etwa 1 % der GAPDH-Expression einer Steigerung der Fzd5-Kopienzahl auf das 58fache, während an Tag 7 die Expressionssteigerung auf das 4,5-fache zurückging.



**Abb. 46: Fzd5-Überexpression in hMSC auf mRNA-Ebene.**

Ektopische Expression von Fzd5 nach Transfektion von pN3-Fzd5. Für die Quantifizierung wurden 12,5 ng cDNA eingesetzt. Die Kopienzahlen wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

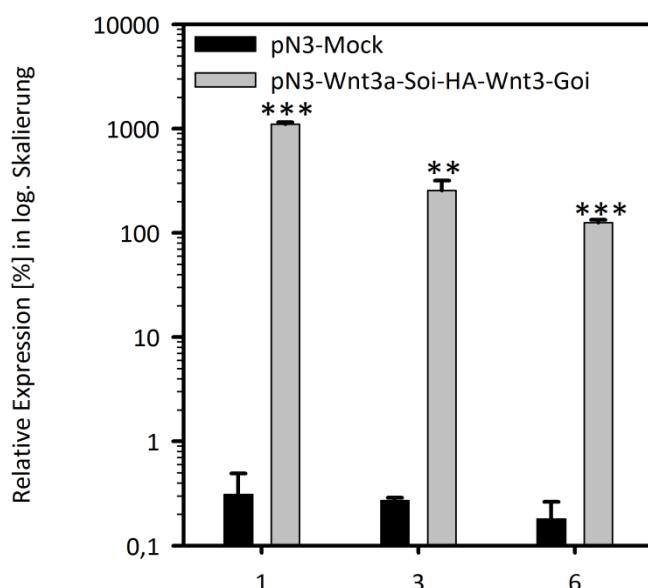
Auf Proteinebene konnte das HA-Fzd5-Konstrukt sowohl über den Anti-HA-Antikörper als auch über einen Anti-Fzd5-Antikörper detektiert werden. Es zeigte sich – wie auch bei HEK293-Zellen – eine Doppelbande. Allerdings wies die obere Bande eine deutlich schwächere Intensität auf.



**Abb. 47: Überexpression von HA-Fzd5 in hMSC auf Proteinebene**

Auf Protein-Ebene wurden die Lysate an Tag 3 nach Transfektion generiert. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-HA-Antikörper und mittels eines Anti-Fzd5-Antikörpers. PK = Positivkontrolle, für diese wurde ein Lysat nach Überexpression von Fzd5 in HEK293-Zellen aufgetragen.

Im Vergleich zur HA-Fzd5-Überexpression wies die ektopische Expression von HA-Wnt3 eine deutlich höhere Expression auf. So war HA-Wnt3 an Tag 1 im Vergleich zu HA-Fzd5 18fach stärker exprimiert (Abb. 48). In Relation zur Negativkontrolle (pN3-Mock) mit Kopienzahlen weniger als 1 % der GAPDH-Expression wiesen die mit pN3-Wnt3a-Soi-HA-Wnt3-Goi transfizierten hMSC eine mehr als 3000fach höhere Expressionsrate auf. Auch an Tag 3 und Tag 6 nach Transfektion waren die normalisierten Kopienzahlen von HA-Wnt3 mit 255 % bzw. 125 % der GAPDH-Expression relativ hoch (Abb. 48).



**Abb. 48: Überexpression von HA-Wnt3 in hMSC.**

Verlauf der Überexpressionsraten nach Transfektion von pN3-Wnt3a-Soi-HA-Wnt3-Goi. Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wurden jeweils 12,5 ng cDNA eingesetzt. Die Kopienzahlen wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*\*P< 0,01; \*\*\*P< 0,001.

#### 4.4.7 Ektopische Expression von Fzds in TCF/LEF-Reporter-hMSC

Mit dem Ziel den Einfluss der ektopischen Expression von Fzd-Rezeptoren auf den Wnt/β-Catenin-Weg in hMSC zu evaluieren, wurden stabile TCF/LEF-Reporter-hMSC-Populationen mit verschiedenen pN3-Fzd5-Soi-HA-Fzd-Goi-Konstrukten transfiziert. Eine Ausnahme hierzu stellte Fzd8 dar, welcher im Vektorgerüst des pN3 vorlag. Wie aus Abb. 49 hervorgeht, zeigte sich unter basalen Bedingungen an Tag 5 nach Überexpression von Fzd3, 5 und 8 im Vergleich zur Negativkontrolle (rote Linie) eine signifikante Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität. Unter Wnt3a-Stimulation ergab sich ein verändertes Bild. Die ektopische Expression von Fzd3, 5, 6 und 8 ging mit einer signifikanten Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität einher, wobei die Überexpression von Fzd3 bzw. Fzd6 die höchsten Reporterprotein-Aktivitäten zeigten.

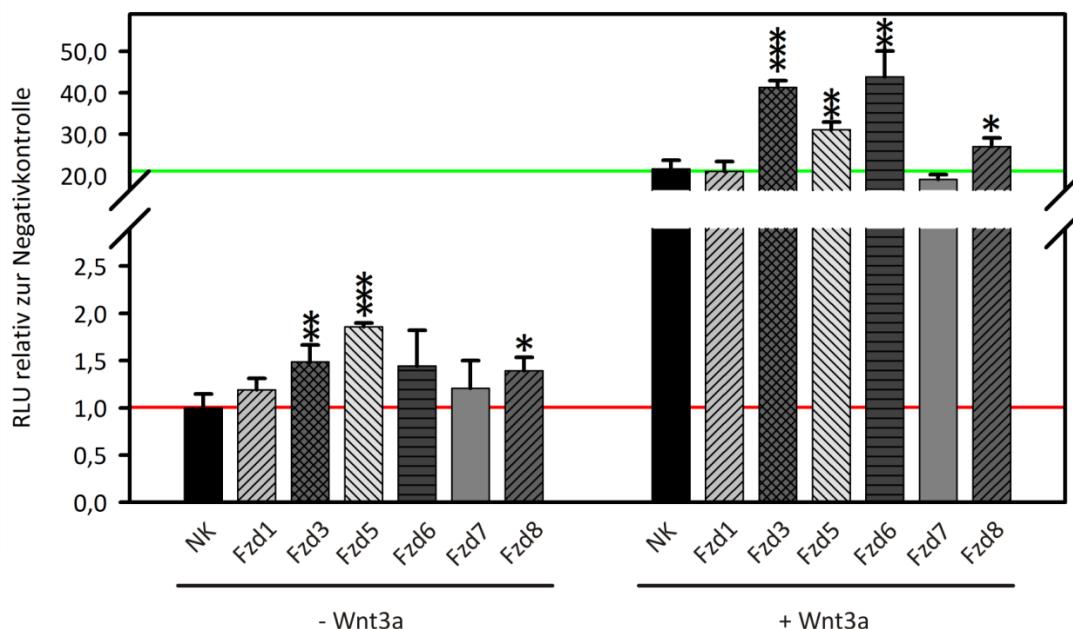


Abb. 49: Überexpression der pN3-Fzd-SoiToiGoi-Konstrukte in TCF/LEF-Reporter-hMSC.

Für die NK (Negativkontrolle) wurden die Zellen mit pN3-Mock transfiziert. Die Zellkulturüberstände wurden an Tag 5 abgenommen und die gemessenen RLU's (*relative light units*) auf die Gesamtproteinmenge normalisiert und relativ zur NK der nicht-stimulierten Ansätze bezogen. Die rote Linie stellt den Gaussia-Aktivitätslevel der NK aus den nicht-stimulierten Ansätzen dar. Die grüne Linie zeigt den Gaussia-Aktivitätslevel der NK unter Wnt3a-Stimulation. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*P< 0,05; \*\*P< 0,01; \*\*\*P< 0,001.

#### 4.4.8 Ektopische Expression von Wnts in TCF/LEF-Reporter-hMSC

Die Überexpression der Wnt-Liganden Wnt3a und Wnt3 wiesen starke Unterschiede in der Gaussia-Luciferase-Aktivität auf (Abb. 50). So war schon an Tag 1 nach Transfektion der Wnt3-Konstrukte eine Aktivierung des Reportergens zu beobachten; dieses Gaussia-Luciferase-Niveau lag in einem vergleichbaren Bereich wie nach Stimulation mit rhWnt3a. An Tag 3 und 7 war nach Transfektion des Wnt3-Plasmids die höchste Reportergen-Aktivität messbar – deutlich höher als die nach Stimulation mit rhWnt3a. Die HA-getaggte Variante von Wnt3 zeigte im Vergleich hierzu niedrigere Gaussia-Luciferase-Aktivitäten. Demgegenüber waren bei der Transfektion der Wnt3a-Konstrukte deutlich niedrigere Reportergen-Aktivitäten zu verzeichnen, wobei allerdings die HA-getaggte Variante von Wnt3a ein höheres Aktivierungspotential als Wnt3a ohne HA-tag aufwies.

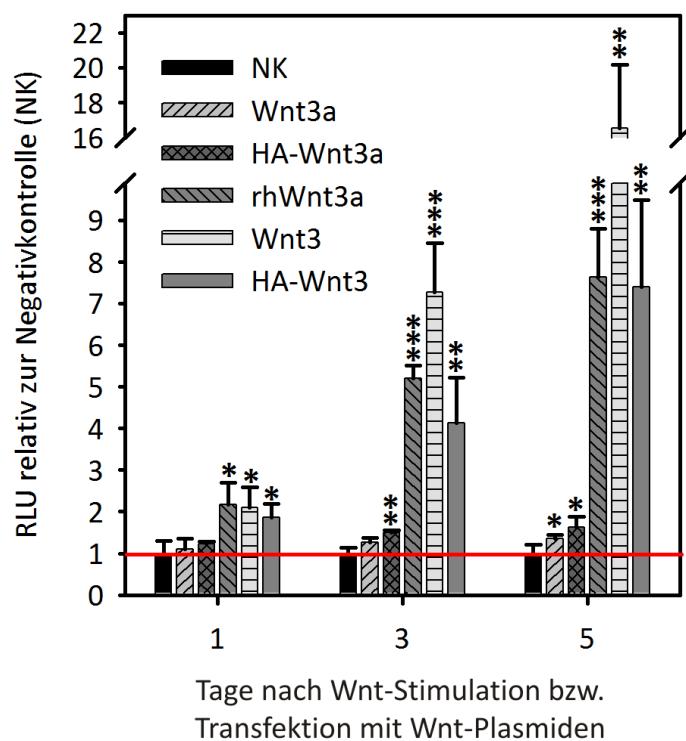


Abb. 50: Ektopische Expression von Wnt3a/HA-Wnt3a und Wnt3/HA-Wnt3 in TCF/LEF-Reporter-hMSC.

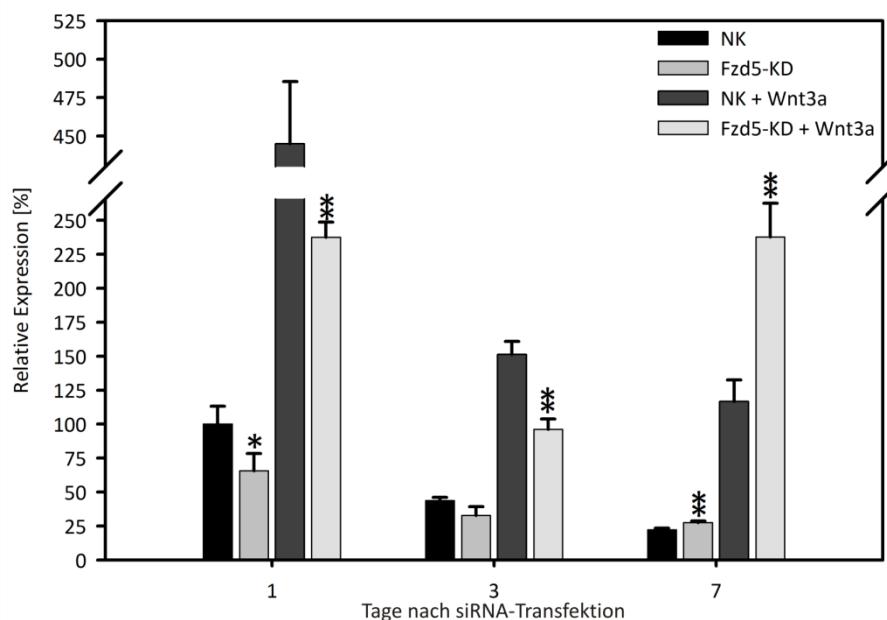
Die RLU wurden an Tag 1, 3 und 5 bestimmt und über die Gesamtproteinmenge normalisiert. Die rote Linie stellt den Gaussia-Aktivitätslevel der pN3-Mock (NK) transfizierten TCF/LEF-Reporter-hMSC dar. Im Fall der Überexpressionen von Wnt3 bzw. Wnt3a und den korrespondierenden HA-tag-Varianten wurden die jeweiligen SoiToiGoi-Konstrukte transfiziert. Vergleichend hierzu wurden pN3-Mock-transfizierte TCF/LEF-Reporter-hMSC mit rekombinantem humanem Wnt3a (rhWnt3a) stimuliert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

## 4.5 Knockdown von Fzd5: Einfluss auf Proliferation und Apoptose

Nachdem die Knockdown- bzw. Überexpressionsstudien bzgl. Fzd5 gezeigt hatten, dass dieser Fzd-Rezeptor einen nachhaltigen Einfluss auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg ausübt, wurde im Anschluss daran die Beteiligung dieses Wnt-Rezeptors an der Wnt-Zielgenexpression, Proliferation sowie am Apoptoseverhalten von hMSC untersucht.

### 4.5.1 Wnt-Zielgen Cyclin D1

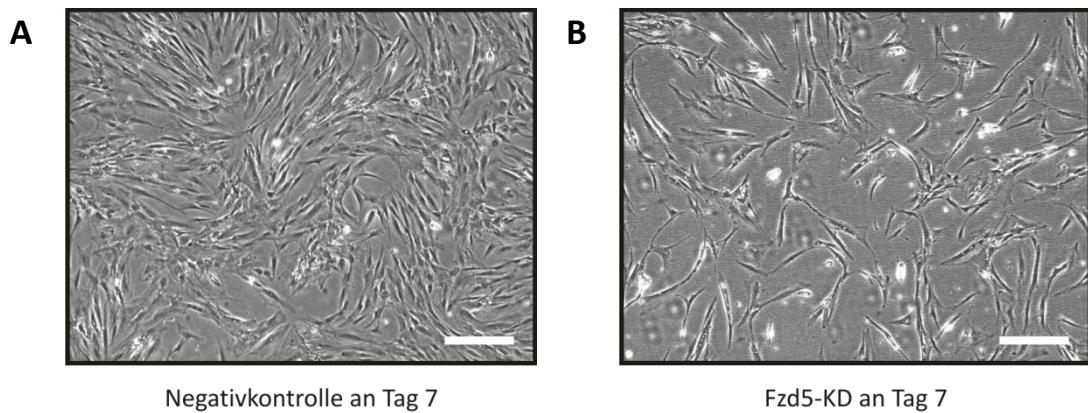
Die Proliferationsrate wird hauptsächlich durch den Zellzyklus gesteuert. Hierbei kommt den Cyclinen eine Schlüsselfunktion zu, wobei das Wnt-Zielgen Cyclin D1 maßgeblich am Übergang der G1 zur S-Phase beteiligt ist (Resnitzky et al. 1994). Vor diesem Hintergrund wurde deshalb nach Knockdown von Fzd5 an Tag 1, 3 und 7 aus den hMSC RNA isoliert und mittels einer qRT-PCR die Transkriptmenge von Cyclin D1 bestimmt (Abb. 51). Dies erfolgte sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit hWnt3a. Dabei zeigte sich, dass nach RNAi gegen Fzd5 die Cyclin D1-Kopien an Tag 1 und 3 bei beiden Versuchsbedingungen deutlich reduziert waren. An Tag 7 war hingegen eine Induktion von Cyclin D1 zu beobachten. Grundsätzlich waren die Kopienzahlen von Cyclin D1 unter Wnt3a-Stimulation stark erhöht, was die Eigenschaft von Cyclin D1 als positives Wnt-Zielgen widerspiegelt.



**Abb. 51: Cyclin D1-Expression nach Fzd5-Knockdown unter basalen und Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen.**  
Mittels qRT-PCR erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von Cyclin D1 in nc-(NK) bzw. Fzd5-siRNA (Fzd5-KD) transzituierten hMSC an Tag 1, 3 und 7. Für eine qRT-PCR wurden 12,5 ng cDNA eingesetzt. Die Kopienzahlen wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert und relativ zur Negativkontrolle unter basalen Bedingungen an Tag 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.5.2 Proliferation

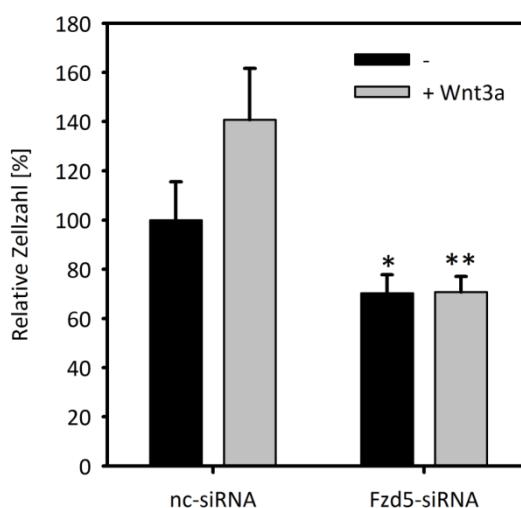
Nach RNAi gegen Fzd5 zeigte sich bei mikroskopischen Analysen, dass die Zellzahl im Fzd5-Knockdown-Ansatz deutlich verringert war (Abb. 52A, B).



**Abb. 52: Transfektion von hMSC in der 5. Passage mit nc-siRNA (A) bzw. Fzd5-siRNA (B).**

Die Bilder wurden an Tag 7 nach der Transfektion der jeweiligen siRNA am Mikroskop erstellt (Skalierungsbalken = 200 µm).

Deshalb wurde die Zellzahl mit Hilfe des CyQuant-Assays an Tag 7 nach Knockdown von Fzd5 sowohl unter unstimulierten als auch unter Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen bestimmt (Abb. 53). Dabei führte der Knockdown von Fzd5 unter beiden Bedingungen zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl. Hierbei war die Reduktion unter stimulatorischen Bedingungen stärker ausgeprägt. Während nach Fzd5-Knockdown unter basalen Bedingungen eine Abnahme der Zellzahl um knapp 30 % zu beobachten war, halbierte sich die Zellzahl unter Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen.



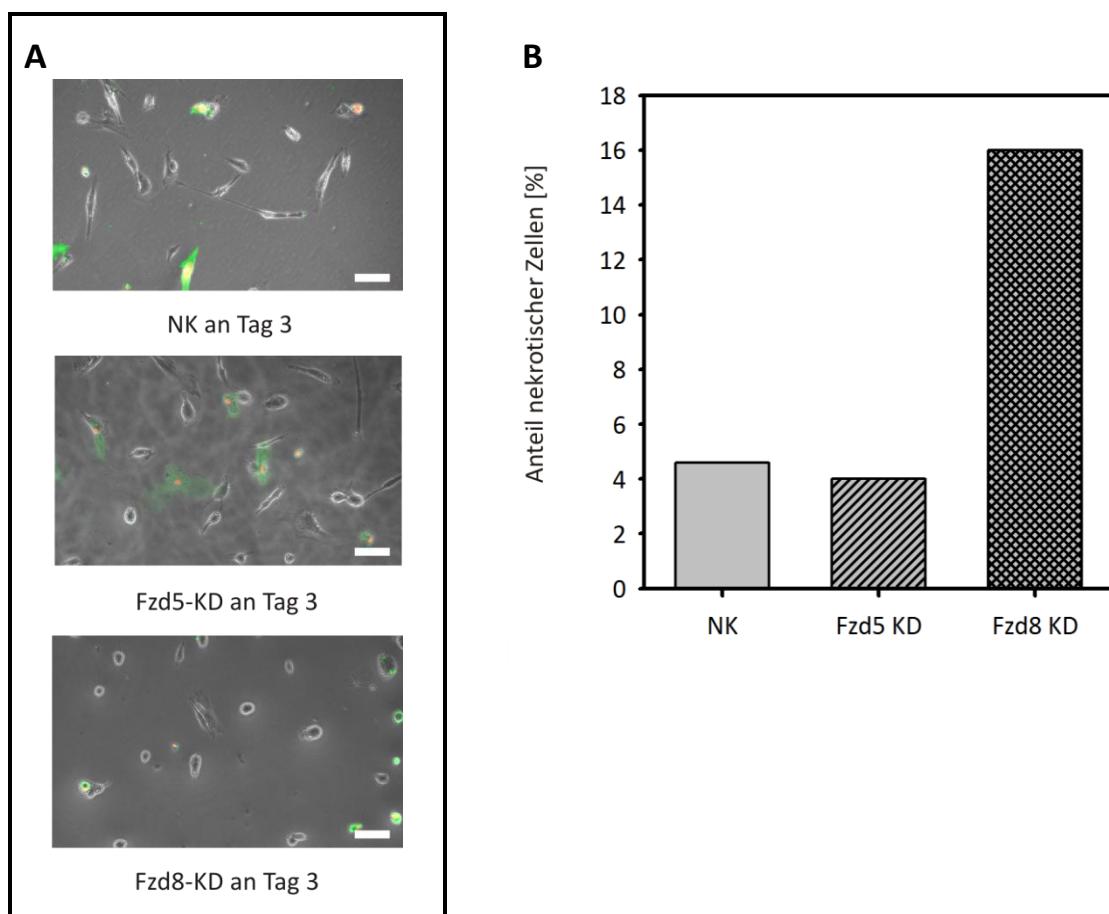
**Abb. 53: Zellzahlbestimmung von hMSC nach Knockdown von Fzd5.**

Die Zellzahlen wurden an Tag 7 nach Transfektion mit Hilfe des CyQuant-Assays bestimmt und auf die Zellzahlen der Negativkontrolle (nc-siRNA) unter unstimulierten Bedingungen normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD eines Triplikat-Ansatzes. \*P<0,05; \*\*P<0,01.

### 4.5.3 Apoptose und Nekrose

Da neben einer Reduktion der Proliferationsrate auch Apoptose-Vorgänge am Rückgang von Zellzahlen beteiligt sein können, wurde mittels eines Apoptose-Assay der Knockdown von Fzd5 bzw. Fzd8 in hMSC untersucht. Wie aus Abb. 54A ersichtlich, wiesen dabei apoptotische Zellen vermittelt durch Fluorescein eine grünliche Färbung und nekrotische Zellen zusätzlich, aufgrund des in die DNA interkalierenden Farbstoffs Propidiumiodid, einen rötlichen Zellkern auf. Auffallend war, dass das Färbemuster vorwiegend nekrotische jedoch kaum apoptotische Zellen auswies.

In Abb. 54B ist die Rate der nekrotischen Zellen im Knockdown von Fzd5 bzw. Fzd8 dargestellt. So wurde beobachtet, dass nach Transfektion von Fzd8-siRNA 16 % der Zellen nekrotisch waren, was gegenüber der Transfektion mit nc-siRNA (NK) einer 4-fach höheren Zahl an nekrotischen Zellen entspricht. Dagegen zeigte sich im Fall des Knockdown von Fzd5 kein Unterschied im Anteil der nekrotischen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle.



**Abb. 54: Annexin V-Apoptose-Assay nach Fzd5- bzw. Fzd8-Knockdown.**

Die Zellen wurden an Tag 3 mit einer Lösung von Fluorescein-markiertem Annexin V und Propidiumiodid inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit nc-siRNA transfiziert.

A) Dabei zeigen apoptotische Zellen eine grüne Färbung und nekrotische Zellen zusätzlich eine rötliche Verfärbung des Zellkerns.

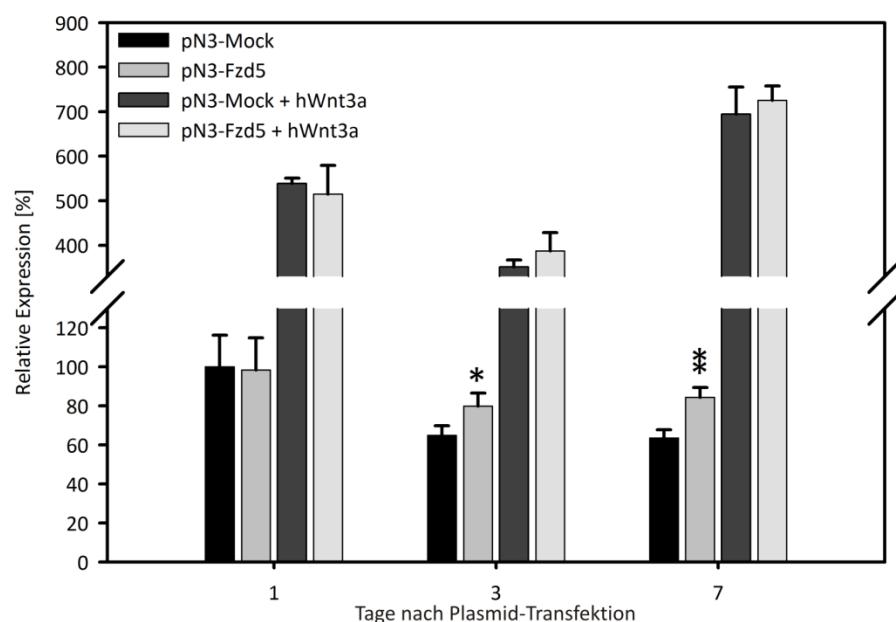
B) Auszählung aller apoptotischen und nekrotischen Zellen eines Gesichtsfeldes bei 1000facher Vergrößerung (Skalierungsbalken = 100 µm).

## 4.6 Transiente und stabile Überexpression von Fzd5

Aufgrund der Tatsache, dass der Knockdown von Fzd5 mit einer Verringerung der Cyclin D1-Kopienzahlen sowie mit einer Proliferationsabnahme assoziiert war, sollte in nachfolgenden Versuchen die Wirkung der ektopischen Expression von Fzd5 hinsichtlich der obengenannten Parameter näher evaluiert werden.

### 4.6.1 Transiente Überexpression von Fzd5: Effekt auf Cyclin D1-Expression und Proliferation

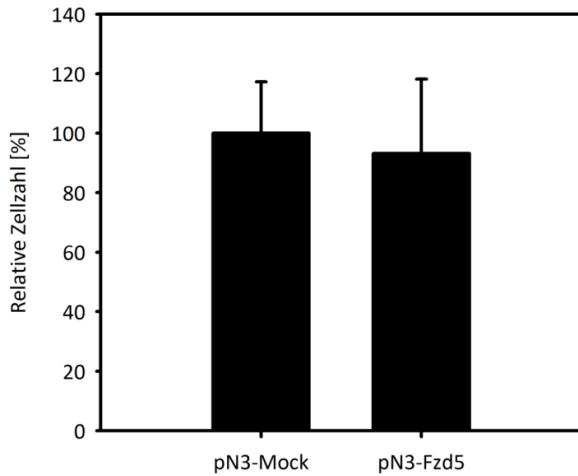
Wie auch beim Knockdown wurden als Wnt-Zielgen die Transkriptmengen von Cyclin D1 quantifiziert. Dabei zeigte sich unter unstimulierten Bedingungen signifikant an Tag 3 und 7 eine leichte Steigerung der Cyclin D1-Kopienzahl (Abb. 55). Unter Wnt3a-Stimulation und gleichzeitiger Überexpression von Fzd5 zeigten sich jedoch keine Auswirkungen auf die Cyclin D1-Kopien im Vergleich zur Negativkontrolle.



**Abb. 55: Cyclin D1-Expression nach ektopischer Expression von Fzd5 unter basalen und Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen.**

Mittels qRT-PCR erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von Cyclin D1 in pN3-Mock- bzw. pN3-Fzd5-transfizierten hMSC an Tag 1, 3 und 7. Die Transkriptmengen pro Ansatz wurden in 12,5 ng cDNA quantifiziert. Die Kopienzahlen wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert und relativ zur Negativkontrolle unter basalen Bedingungen an Tag 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Zur Bestimmung der Zellzahl nach Überexpression von Fzd5 wurde der CyQuant-Assay durchgeführt. Im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen zeigte sich kein Einfluss der Fzd5-Überexpression auf die Proliferation der hMSC (Abb. 56).

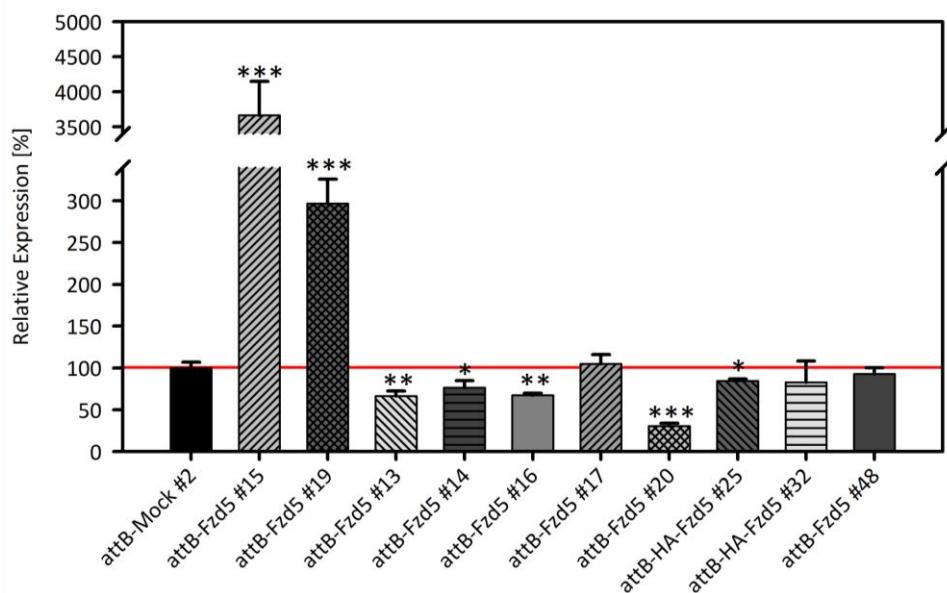


**Abb. 56: Zellzahlbestimmung von hMSC nach Überexpression von Fzd5.**

Die Zellzahlen wurden nach Transfektion der Plasmide pN3-Mock bzw. pN3-Fzd5 an Tag 7 mit Hilfe des CyQuant-Assays bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes.

#### 4.6.2 Stabile Überexpression von Fzd5: Effekt auf Cyclin D1-Expression

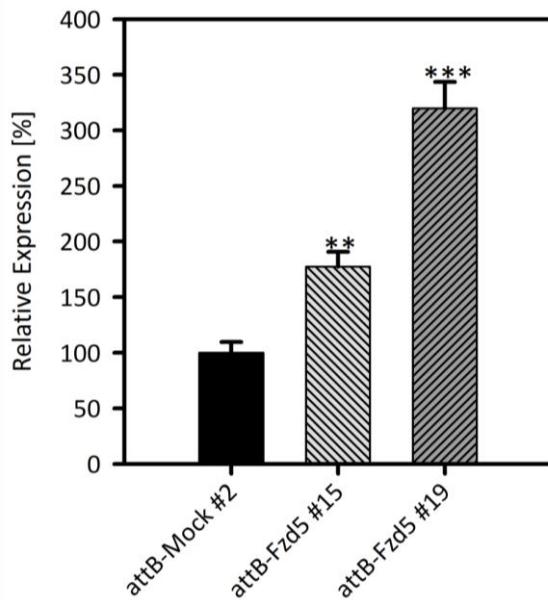
Der Vorteil einer stabilen Transfektion liegt darin, dass es zu einer persistierenden Akkumulation der durch das Transgen kodierten Genprodukte kommt. Dies beruht im Allgemeinen auf einer Integration des Transgen-tragenden Plasmids in das Genom der Zelle, wodurch Langzeiteffekte einer ektopischen Expression untersucht werden können. In Abb. 57 ist die relative transkriptionelle Expression in den stabil Fzd5-transfizierten hMSC-Populationen dargestellt.



**Abb. 57: Stabile Überexpression von Fzd5 in unterschiedlichen hMSC-Populationen.**

Die RT-PCR wurde mit 12,5 ng cDNA pro Ansatz durchgeführt. Die Kopienzahlen wurden auf die Fzd5-Expression der Kontrolle (attB-Mock #2) normalisiert (rote Linie). Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001.

Aus ursprünglich 40 transfizierten 6-well-Kavitäten waren 10 hMSC-Populationen hervorgegangen, welche eine Antibiotikaresistenz (G418) besaßen. Bei 5 der 10 Populationen wurde eine Reduktion der Fzd5-Expression im Vergleich zur Kontrollpopulation (pN3-*attB*-Mock #2) beobachtet. Nur die Populationen #15 sowie #19 wiesen eine 360fache bzw. 30fache Überexpression von Fzd5 auf. Dies spiegelte sich auch in der Expressionsrate des Wnt-Zielgens Cyclin D1 wider, welche in beiden stabil Fzd5-überexprimierenden hMSC-Populationen im Vergleich zur Mock-Kontrolle 17fach bzw. 32fach erhöht war (Abb. 58).



**Abb. 58: Cyclin-D1 Expression in stabil Fzd5-überexprimierenden hMSC-Populationen.**

Die Kopienzahlen wurden auf die Cyclin D1-Expression der Kontrolle (*attB*-Mock #2) normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines Triplikat-Ansatzes. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

## 5 DISKUSSION

Der Wnt/β-Catenin-Signalweg nimmt im Signaltransduktionsnetzwerk von mesenchymalen Stammzellen eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Stammzelleigenschaften ein, wodurch Selbsterneuerung, Invasivität und Differenzierungskapazität nachhaltig beeinflusst werden (Nusse et al. 2008; Neth et al. 2006). Aufgrund der wachsenden Bedeutung von Stammzelltherapien mit hMSC (Abdallah und Kassem 2008), kommt der Funktionsaufklärung der Komponenten, welche an der Signalintegration des Wnt/β-Catenin-Signalweges beteiligt sind, eine besondere Bedeutung zu. Dabei steht am Anfang der Wnt/β-Catenin-Signalkaskade der ternäre Komplex aus Frizzled-Rezeptor, LRP-Korezeptor und Wnt-Ligand. Während in den Arbeiten von Herrn Dr. Thomas Kolben und Frau Dr. Marisa Karow (Kolben 2011; Karow 2008; Kolben et al. 2012; Peröbner et al. 2012) die Expression aller Mitglieder der Fzd-Familie sowie der beiden Korezeptoren LRP5 und LRP6 in hMSC nachgewiesen wurden, konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die mRNA von 8 der 19 Wnts in hMSC detektiert werden.

Um die Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges quantifizieren zu können, bestand ein Teil der hier vorliegenden Arbeit in der Etablierung des TCF/LEF-Reporter-Systems in hMSC. Mit diesem Reporter-System war es möglich, die Wirkung unterschiedlicher Aktivatoren und Inhibitoren des Wnt/β-Catenin-Signalweges auf hMSC bei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen zu untersuchen. Weiter wurden über RNAi gegen einzelne Fzd-Rezeptoren sowie Fzd-Überexpressionsstudien in TCF/LEF-Reporter-hMSC Rezeptoren identifiziert, welche an der Initiation eines Wnt/β-Catenin-Signals beteiligt sind.

## 5.1 Das Wnt-Expressionsprofil in hMSC, HT1080 und HEK293

Von den 19 bekannten Wnts in Vertebraten wurden im Rahmen dieser Arbeit in hMSC Prockop 8 Wnts nachgewiesen. In der ersten Spalte der Tab. 18 sind die exprimierten Mitglieder der Wnt-Familie in hMSC Prockop dargestellt.

	hMSC Prockop	Etheridge et al. (2004)	Boland et al. (2004)	Okoye et al. (2008)	Shen et al. (2009)	Sercan et al. (2010)
Wnt1	-	-	✓	-		-
Wnt2	-	✓	-	✓	✓	-
Wnt2b	✓	-	✓	✓	✓	-
Wnt3	✓	-	✓	✓	✓	✓
Wnt3a	-	-	-	✓		-
Wnt4	-	✓	-	✓	✓	-
Wnt5a	✓	✓	✓	✓	✓	-
Wnt5b	✓	n.b.	-	✓	✓	-
Wnt6	-	-	-	✓	✓	-
Wnt7a	-	-	-	✓		-
Wnt7b	✓	-	-	✓	✓	n.b.
Wnt8a	-	-	-	-	-	n.b.
Wnt8b	-	-	-	-	-	n.b.
Wnt9a	✓	-	✓	✓	✓	-
Wnt9b	-	-	-	-	-	-
Wnt10a	-	-	-	-		✓
Wnt10b	✓	-	✓	✓	✓	-
Wnt11	-	✓	✓	-	✓	-
Wnt16	✓	✓	-	✓	✓	-

Tab. 18: Vergleich der Wnt-Expression in hMSC aus unterschiedlichen Studien.

In der ersten Spalte ist das Wnt-Expressionsmuster aus der hier vorliegenden Arbeit dargestellt, nachfolgend die Ergebnisse von 5 anderen Arbeitsgruppen. Alle Ergebnisse beruhen auf qualitativen Analysen. n.b. = nicht bestimmt.

Beim Vergleich der Ergebnisse der 6 Studien fällt besonders die Expression von Wnt2b, 3, 5a, 5b, 9a, 10b und 16 auf, da diese in mindestens 4 der 6 Arbeiten nachgewiesen werden konnten. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich hier um ein spezifisches Wnt-Expressionsmuster handelt, welches charakteristisch für hMSC ist. Dagegen war in keiner der Studien eine Expression von Wnt8a, 8b, und 9b in hMSC nachweisbar.

Abgesehen von diesem Expressionsmuster variiert die Anzahl der nachgewiesenen Wnts innerhalb und zwischen den einzelnen Studien dagegen teilweise sehr deutlich. Während im Fall der Arbeitsgruppe von Okoye et al. (2008) 13 der 19 Wnts detektiert wurden, gelang dies im Rahmen der Arbeit von Sercan et al. (2010) nur für Wnt3 und Wnt10a in 8 der 16 untersuchten hMSC-Populationen. Diese Diskrepanz in der Anzahl

der exprimierten Wnts spiegelt zum einen die Heterogenität innerhalb (Motaln et al. 2010) und zwischen hMSC-Populationen wieder, welche sich auf die unterschiedlichen Ursprungsgewebe der hMSC, dem Alter sowie dem Gesundheitszustand der Spender gründet (Kern et al. 2006; Stolzing et al. 2008). So vermuten Sercan et al. (2010) in ihrer Arbeit, dass die geringen Übereinstimmungen im Wnt-Expressionsmuster der 16 getesteten hMSC-Populationen auf die Spannbreite des Spenderalters (4 bis 82) zurückzuführen sei. Dies wird auch durch die Arbeit von Shen et al. (2009) bestätigt, bei der gezeigt werden konnte, dass einige Wnts hinsichtlich des Spenderalters differentiell exprimiert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte ein Vergleich der Wnt-Expressionsmuster von hMSC und HT1080 (Tab. 19), das sich diese lediglich durch das Vorkommen von Wnt16 in hMSC und von Wnt4 in HT1080 unterschieden. Damit teilen beide Zellpopulationen ein ähnliches Wnt-Expressionsprofil, was als eine Konsequenz des mesodermalen Ursprungs der HT1080-Zelllinie interpretiert werden kann. Im Fall der HEK293 konnten neben den in hMSC und HT1080 detektierten Wnts zusätzlich Wnt3a, 6, 9b und 11 nachgewiesen werden. Dabei deckt sich das Wnt-Expressionsmuster in den HEK293 aus der vorliegenden Arbeit großteils mit dem aus der Promotionsschrift von Dr. Roman Anton (2008). Ausnahmen dabei sind eine fehlende Expression von Wnt6 und 16 und eine zusätzliche Expression von Wnt8a. Die relativ hohe Anzahl an exprimierten Wnts lässt auf die embryonale Herkunft der HEK293-Zelllinie schließen.

Wnt	1	2	2b	3	3a	4	5a	5b	6	7a	7b	8a	8b	9a	9b	10a	10b	11	16
hMSC	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓	-	✓
HT1080	-	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓	-	-
HEK293	-	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	-	✓	✓	-	✓	✓	✓

Tab. 19: Wnt-Expression in hMSC, HT1080 und HEK293.

Die Tatsache, dass in allen drei Zellpopulationen neben unterschiedlichen Fzd-Rezeptoren und den Korezeptoren LRP5 und LRP6 auch zahlreiche Wnts exprimiert werden, legt den Schluss nahe, dass eine basale Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges über auto- bzw. parakrine Sekretion der Wnts induziert wird (Etheridge et al. 2004).

Dies wirft die Frage auf, welche der aus Tab. 19 exprimierten Wnts die basale Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges in hMSC steuern könnten. Mögliche Kandidaten hierfür wären Wnt2b, Wnt3 sowie Wnt3a, denn diese werden neben Wnt1, 8a und 8b zu den kanonischen Wnts gezählt, da sie als starke Aktivatoren des Wnt/β-Catenin-Signalweges fungieren können (Li et al. 2006; Liu et al. 2011a). Ein weiterer Kandidat ist Wnt10b, das bei Überexpression in hMSC zu einer erhöhten Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges führt, was wiederum mit einer gesteigerten Expression des Wnt-

Zielgens Cyclin D1 assoziiert ist (Bennett et al. 2007). Dagegen weisen  $Wnt10b^{-/-}$ -Mäuse eine massive Reduktion der mMSC in der Stammzellniche auf (Stevens et al. 2010). Nicht kanonische Wnt-Liganden zeigen in neueren Studien ein ambivalentes Verhalten, welches eine klare Einteilung in die beiden Klassen erschwert (Kuhl et al. 2000). Hierbei scheint, dass neben dem Expressionsmuster der Wnts vor allem der jeweilige Rezeptorkontext eine wichtige Rolle bei der Initiation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signales spielt (Li et al. 2006; van Amerongen und Nusse 2009).

## 5.2 Die Expression der Inhibitoren sFRP1 und WIF1 in hMSC, HT1080 und HEK293

Die beiden Inhibitoren sFRP1 und WIF1 gehören zur Gruppe der sekretierten Wnt-Inhibitoren, die direkt mit den Wnt-Molekülen interagieren können und als Folge eine Interaktion mit den Fzd-Rezeptoren unterbinden (Bhat et al. 2007; Malinauskas et al. 2011). So führt die Abwesenheit dieser Inhibitoren zu einer erhöhten Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges und übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnten verschiedene Arbeitsgruppen nachweisen, dass in unterschiedlichen Tumoren die Expression von sFRP1 sowie WIF1 durch epigenetische Inaktivierung herabreguliert ist (Kansara et al. 2009; Kinoshita et al. 2011; Meng et al. 2011). Weiter spielen beide Inhibitoren eine wichtige Rolle in der Differenzierung von MSC. So wies die Arbeitsgruppe um Gaur et al. (2006) nach, dass sFRP1 und WIF1 in der frühen Chondrogenese vermehrt gebildet werden, während in sFRP1 $^{-/-}$ -Mäusen mMSC bevorzugt in die osteogene Linie differenzieren, was eine erhöhte Knochenmasse zur Folge hatte (Gaur et al. 2009). Diese Arbeiten lassen den Schluss zu, dass die Feinabstimmung der Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges über die inhibierende Wirkung von sFRP1 einen großen Einfluss darauf nimmt, ob MSC in die chondrogene oder osteogene Richtung differenzieren.

Die in der hier vorliegenden Arbeit in hMSC nachgewiesene Expression von sFRP1 lässt nun vermuten, dass diese Feinabstimmung auch am basalen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Status der hMSC beteiligt ist. Dies wird gestützt durch Ergebnisse aus der Arbeit von Sercan et al. (2010). Während hier in allen 16 untersuchten hMSC-Populationen eine Expression von sFRP1 detektiert wurde, zeigte sich für die anderen Familienmitglieder sFRP2, 3, 4 und 5 ein deutlich divergenteres Expressionsmuster. Somit könnte sFRP1 maßgeblich an einem negativen Rückkopplungsmechanismus beteiligt sein, um eine überschließende Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in hMSC zu vermeiden (Nemeth und Bodine 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Expression von sFRP1 in den HT1080-Zellen könnte durch den mesodermalen Ursprung dieser Tumorzelllinie

erklärt werden. Aufgrund des qualitativen Ansatzes lässt sich jedoch nicht klären, ob das Expressionsniveau im Vergleich zu hMSC differiert. Jedoch ist gegenüber hMSC eine verminderte Expression zu erwarten, da eine Herabregulierung der sFRP1-Expression in vielen Magen-, Leber-, Kolon- und Schleimhautkarzinomen beobachtet wurde (Caldwell et al. 2004; Meng et al. 2011; Wu et al. 2012; Zhao et al. 2007). Überraschend zeigte sich im Fall der HEK293 sowohl eine Expression von sFRP1 und WIF1, aber auch hier wäre die quantitative Expression zur Interpretation des Ergebnisses von nachhaltiger Bedeutung. Denkbar wäre aber auch, dass in den HEK293 aufgrund der großen Anzahl der exprimierten Wnts die Sequestrierung nicht kanonischer Wnts durch sFRP1 und WIF1 eine Steigerung des Wnt/β-Catenin-Signalweges bewirkt (Bovolenta et al. 2008).

### 5.3 Das Fzd-Expressionsprofil in hMSC

Die quantitativen Analysen zeigten eine Expression aller bisher in Vertebraten beschriebenen Mitglieder der Fzd-Familie. Damit bestätigen diese auch die früheren Ergebnisse von Dr. Thomas Kolben (Kolben 2011). In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch zur relativen Quantifizierung der mRNA-Kopienzahlen statt der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) die relative Quantifizierung mit externen Standards verwendet (Rasmussen 2001). Vorteil beim Einsatz von Standardkurven ist die Berücksichtigung der Effizienz der qRT-PCR-Reaktion. Dadurch können die Verhältnisse der Fzd-Expressionslevel zueinander realistisch abgebildet werden, was unmittelbare Vergleiche der verschiedenen Fzd-Expressionen ermöglicht. Dies ergab nun für Fzd1 und Fzd2 die stärkste Expression in hMSC, gefolgt von Fzd7 und Fzd8. Dagegen wiesen die übrigen Fzds mit weniger als 3 % der Fzd1-Kopienzahlen eine relativ geringe Expression auf. Wobei Fzd3 und Fzd10 mit einer Expression, die relativ zu der von Fzd1 unter einer Promille liegt, die geringsten Werte zeigten.

Im Vergleich zu rein qualitativen Arbeiten fällt zuerst auf, dass neben der einzigen semiquantitativen Studie von Boland et al. (2004) nur noch in der hier vorliegenden Arbeit alle Vertreter der Fzd-Familie detektiert wurden (Tab. 20). In Übereinstimmung mit den semiquantitativen Analysen zeigten Fzd3, 9 und 10 auch in unseren quantitativen Versuchen sehr niedrige Expressionsniveaus. Während die Arbeitsgruppe um Okoye et al. (2008) 9 der 10 bekannten Fzds nachweisen konnten, wurden in den Studien um Sercan et al. (2010) und Etheridge et al. (2004) nur 5 Fzd-Rezeptoren detektiert. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass in allen erwähnten Studien bis auf die hier vorliegende Arbeit für die RT-PCR mehr als 250 ng RNA eingesetzt wurden. Im Gegenzug wurde in den hier durchgeführten qRT-PCR-Analysen die Zyklenzahl von

35 auf 45 erhöht, wodurch eine Detektion von Fzd9 und 10 erst möglich wurde (Kolben 2011).

Fzd \	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hMSC Prockop	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Etheridge et al. (2004)	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	n.b.	-
Boland et al. (2004)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Okoye et al. (2008)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓
Sercan et al. (2010)	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	n.b.

**Tab. 20: Vergleich der Fzd-Expression in hMSC aus unterschiedlichen Studien.**

In der ersten Reihe ist das Fzd-Expressionsprofil aus der hier vorliegenden Arbeit dargestellt, das im Unterschied zu allen anderen Studien das Ergebnis einer quantitativen RT-PCR war. Im Fall von Okoye et al. (2008) wurde die Expression der Fzd-Rezeptoren semiquantitativ erfasst. n.b. = nicht bestimmt.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass Fzd-Rezeptoren fast in jedem Gewebe oder Organ- system exprimiert werden (Huang und Klein 2004). Dabei spielt die dynamische Expression der gewebespezifischen Fzds während der Entwicklung der Organsysteme eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Fzd9 in der Maus maßgeblich an der Osteogenese beteiligt ist (Albers et al. 2011). Im Fall von Fzd1-Knockout-Mäusen sind Einbußen in der Fertilität beschrieben worden (Lapointe et al. 2012). Ein Doppel-knockout von Fzd3 und Fzd6 geht mit schweren entwicklungsbedingten Defekten im Mittelhirn einher (Stuebner et al. 2010). Der Doppelknockout von Fzd2 und 7 hingegen häufig mit einem ventrikulären Septumdefekt (Yu et al. 2012). Daneben scheinen aber auch Fzd4, 9 und 10 wichtigen Anteil an der Entwicklung des Frontalhirns und Kleinhirns zu besitzen (Wang et al. 2001; Yan et al. 2009; Zhao et al. 2007). Bei Knockout von Fzd8 sind in Mäusen keine schwereren Defekte beschrieben worden (Schulte 2010). Dagegen ist der Knockout von Fzd5 in Mäusen postnatal letal (Ishikawa et al. 2001). Direkte Verknüpfungen von hereditären Erbkrankheiten mit Mutationen in Fzd-Rezeptoren sind bis jetzt nur im Fall von Fzd4 beschrieben (Schulte 2010). So sind mehrere Mutationen im Fzd4-Gen bekannt, die mit der familiären exsudativen Vitreoretinopathie assoziiert sind (Robitaille et al. 2011).

## 5.4 Evaluierung des TCF/LEF-Reporter-Vektor-Systems in hMSC

Das TCF/LEF-Reporter-Vektor-System pN3-Bar erlaubt nach Transfektion eine Quantifizierung der Wnt/β-Catenin-Aktivität in hMSC. Erstmals wurden 1997 TCF/LEF-Bindestellen im Promotor eines Reportergens genutzt um eine β-Catenin-abhängige Expression darzustellen (Korinek et al. 1997). Die TCF/LEF-Bindestellen für den pN3-Bar

sowie für den Kontrollvektor pN3-fuBAR entstammen den Vektoren pGL3-BAR bzw. pGL3-fuBAR, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Randal T. Moon (Department of Pharmacology, University of Washington, USA) bereit gestellt wurden. Als Reporterprotein kam eine sezernierte Form der Luciferase aus dem Tiefsee-Cephalopoden *Gaussia princeps* zum Einsatz (Tannous et al. 2005). Im Rahmen erster transienter Transfektionen des pN3-Bar in hMSC zeigte sich im Vergleich zum Kontrollvektor fuBAR eine erhöhte Expression der Gaussia-Luciferase, was auf eine basale Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges in hMSC schließen lässt. Dass diese basale Aktivität auch essentiell für mesenchymale Stammzellen ist, wurde durch frühere Untersuchungen nachgewiesen (Ling et al. 2009).

Da bei transienten Transfektionen ein rascher Abbau des Vektors und damit auch eine Abnahme des Reportergens Gaussia-Luciferase stattfindet, lassen sich Ergebnisse nur in einem kurzen Zeitfenster reproduzierbar messen. Um Verzerrungen der Ergebnisse zu vermeiden sowie Beobachtungen über längere Zeit zu ermöglichen, wurden durch Antibiotika-Selektion stabil pN3-Bar transfizierte TCF/LEF-Reporter-hMSC generiert.

#### 5.4.1 Stimulation der Wnt/β-Catenin-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-hMSC

Zur Prüfung der Funktionalität der TCF/LEF-Reporter-hMSC wurden die Zellen zunächst mit LiCl stimuliert. LiCl führt durch Hemmung der GSK-3β zu einer vermehrten Translokation des β-Catenins in den Zellkern. Dies konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit durch eine gesteigerte Gaussia-Luciferase-Aktivität gezeigt werden. Im Vergleich dazu ergab sich jedoch nach Wnt3a-Simulation eine mehr als dreimal so starke Aktivität des Reportergens. Diese Unterschiede in der Stärke des Stimulus zwischen LiCl und Wnt3a wurden in der Literatur bereits beschrieben (Sievers et al. 2006). Eine der möglichen Erklärungen ist die artifizielle Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges bei Inhibition der GSK-3β im Gegensatz zur Stimulation mit dem spezifischen Liganden Wnt3a. So repräsentiert GSK-3β nicht nur einen Bestandteil des Degradationskomplexes von β-Catenin, sondern auch eine zentrale Kinase des zellulären Stoffwechsels (Force und Woodgett 2009). Zudem gibt es Hinweise, dass GSK-3β auch bei der Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges beteiligt ist (Wu und Pan 2010).

Eine massive Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität dagegen zeigte sich bei RNAi gegen APC, welches eine weitere zentrale Komponente des Degradationskomplexes darstellt. Gegenüber der GSK-3β übernimmt APC eine zusätzliche Funktion im Zellkern. Denn neben der Eigenschaft als Teil des cytoplasmatischen β-Catenin-Abbaukomplexes sequestriert APC überschüssiges β-Catenin im Nukleus (Neufeld 2009). Damit scheint APC sowohl die cytoplasmatische Konzentration als auch die transkriptionelle Aktivität von β-Catenin mitzubestimmen. Dies könnte erklären, weshalb Studien zeigen, dass

die Mehrzahl kolorektaler Krebserkrankungen – neben der gesteigerten Wnt/β-Catenin-Aktivität – mit einer verminderten APC-Expression einhergehen (Fodde 2002). Vergleicht man die Stimuli nach Wnt3a-Zugabe und APC-Knockdown zeigte sich für Tag 1 eine geringere Gaussia-Luciferase-Aktivität im Fall des APC-Knockdown. Dies ist wohl auf die Halbwertszeit des APC-Proteins und damit der verzögerten Wirkung des Knockdown zurückzuführen. Dass die Gaussia-Luciferase-Aktivität nach APC-Knockdown an Tag 3 und 7 deutlich stärker induziert war, lässt sich mit der nicht-physiologischen Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges durch APC-Knockdown erklären. So zeigen frühere Studien, dass negative Rückkopplungsmechanismen nach Wnt-Stimulus auf die Wnt/β-Catenin-Aktivität inhibierend wirken (Lustig et al. 2002). Voraussetzung hierfür ist ein intakter Degradationskomplex, der jedoch bei APC-Knockdown im Vergleich zum Wnt3a-Stimulus nicht mehr vorhanden ist.

#### **5.4.2 Inhibition der Wnt/β-Catenin-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-hMSC**

Neben der Stimulation kann auch die Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalweges über das TCF/LEF-Reporter-System quantitativ erfasst werden (Karow 2008). Dazu wurde in der hier vorliegenden Arbeit in TCF/LEF-Reporter-hMSC ein Knockdown von β-Catenin durchgeführt, was die Gaussia-Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle an Tag 10 auf etwa die Hälfte reduzierte. Berücksichtigt man die Rolle von β-Catenin als zentralen Transkriptionsfaktor im Wnt/β-Catenin-Signalweg sowie die Existenz einer basalen Wnt/β-Catenin-Aktivität in hMSC, wäre ein stärkerer Einbruch der Gaussia-Luciferase-Aktivität zu erwarten gewesen. Grund für die Restaktivität der Gaussia-Luciferase ist die hohe Stabilität des β-Catenins auf Proteinebene. So verbleibt noch an Tag 7 nach Knockdown ein Drittel der β-Catenin Menge in den hMSC im Vergleich zur Negativkontrolle (Karow 2008).

#### **5.4.3 Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die Reporterprotein-Aktivität**

Die Bedingungen unter denen hMSC *in vitro* kultiviert werden, beeinflussen nicht nur maßgeblich die Stammzelleigenschaften wie Proliferation, Invasion und Differenzierungskapazität, sondern auch Seneszenzprozesse und immunologische Eigenschaften von hMSC (Sotiropoulou et al. 2006; Tonti und Mannello 2008). Dabei nehmen der O<sub>2</sub>-Partialdruck (Dos Santos et al. 2010) und vor allem die Wahl des Mediumadditivs großen Einfluss (Tonti und Mannello 2008). Als Additive werden entweder vordefinierte Mischungen aus Wachstumsfaktoren und Cytokinen oder tierische sowie menschliche Seren eingesetzt. Dabei zeigen Untersuchungen, dass sich gerade bei Seren unterschiedlicher Herkunft – sei es tierisch in Form von FBS oder menschlich als autologes

bzw. allogenem Serum – starke Unterschiede in der Proliferation, Differenzierungskapazität und Motilität von hMSC ergeben (Kobayashi et al. 2005; Shahdadfar et al. 2005; Turnovcova et al. 2009). Im Vergleich der Seren zeigen hMSC in FBS-haltigem Medium einen prolongierten Zellzyklus, erhöhte replikative Seneszenz sowie eine zum Teil beschleunigte Differenzierung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Wahl des Mediumadditivs auch Einfluss auf die Wnt/β-Catenin-Aktivität der kultivierten hMSC besitzt. So zeigten schon Untersuchungen von Dr. Marisa Karow, dass die Kultivierung muriner TCF/LEF-Reporter-MSC bei hoher Serumkonzentration mit reduzierten Gaussia-Luciferase-Aktivitäten einherging. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Wirkung unterschiedlicher FBS-Konzentrationen sowie des Serumersatzes Nutridoma auf die Gaussia-Luciferase-Aktivität der TCF/LEF-Reporter-hMSC getestet. So sollten für die nachfolgenden Versuche die optimalen Kulturbedingungen eruiert werden. Im Vergleich der basalen Wnt/β-Catenin-Aktivitäten der Kontrollen zeigte sich für die Tage 3 und 7, dass steigende FBS-Konzentrationen mit sinkenden Gaussia-Luciferase-Aktivitäten einhergingen. Die höchsten Reporterprotein-Aktivitäten ergaben sich jedoch unter Verwendung von Nutridoma. Der starke Einbruch der Gaussia-Luciferase-Aktivität an Tag 1 bei serumfreien und Nutridoma-haltigen Medium ist vermutlich der Umstellung der Kulturbedingungen geschuldet. So kann die plötzliche Serumdeprivation bei hMSC zu einem Proliferationsstopp und zusätzlich unter hypoxischen Bedingungen zu apoptotischen Prozessen führen (Gronthos und Simmons 1995; Potier et al. 2007).

Besonders stark ausgeprägt war diese umgekehrte Proportionalität zwischen FBS-Konzentrationen bzw. Nutridoma und Gaussia-Luciferase-Aktivität bei Stimulation des Wnt/β-Catenin-Signalweges nach Wnt3a-Applikation. Hier zeigte sich für Wnt3a muriner Herkunft an Tag 3 im Fall der Kultivierung mit 2% FBS eine 80fache Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne Wnt3a. Im Gegensatz dazu erreichte die Wnt3a-Stimulation unter 16,5% FBS nur eine Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität um etwa das 30fache. Damit fällt eine Wnt3a-Stimulation unter Kultivierung der TCF/LEF-Reporter-hMSC bei 2% FBS im Vergleich zu 16,5% FBS um das 2,6 fache stärker aus. Dies bestätigt sich, wenn auch nicht so ausgeprägt, für die Stimulation mittels hWnt3a sowie bei Transfektion mit dem pN3-Wnt3a Überexpressionsvektor. Diese Ergebnisse legen nicht nur nahe, dass FBS inhibierend auf den basalen Wnt/β-Catenin-Signalweg wirkt, sondern auch die Stimulationskapazität von Wnt3a mindert. Dagegen fielen an den Tagen 3 und 7 bei serumfreien-Bedingungen sowie Nutridoma-haltigem Medium die Induktionsraten der Gaussia-Luciferase-Aktivität nach Wnt3a-Stimulation wieder sehr viel schwächer aus. Hier könnte der Mangel an Wachstumsfaktoren und Cytokinen sich inhibierend auf die Induktion des Wnt/β-Catenin-Signalweges auswirken (Mannello und Tonti 2007).

Neben Wnt3a wurden auch Testreihen mit murinem R-Spondin1 und humanem Dkk1 durchgeführt. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass R-Spondin1 sowie Dkk1 die Verfügbarkeit des Korezeptors LRP6 an der Zelloberfläche maßgeblich bestimmen (Wei et al. 2007). Hierbei unterdrückt Dkk1 die Wnt3a-vermittelte Phosphorylierung von LRP6 und führt zur Internalisierung von LRP6 und zur Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalweges (Sakane et al. 2010). R-Spondin1 weist nun die entgegengesetzte Wirkung auf, so verstärkt sich bei zusätzlicher Anwesenheit von Wnt3a oder Wnt1 die Phosphorylierung von LRP6 nachhaltig, was mit einer deutlichen Steigerung der Wnt-vermittelten Aktivierung des Wnt-Weges einhergeht (Binnerts et al. 2007; Kim et al. 2008). Allerdings werden in der hMSC-Population aus der vorliegenden Arbeit weder Wnt1 noch Wnt3a exprimiert. Dies könnte erklären, weshalb auch in TCF/LEF-Reporter-hMSC nach Applikation von mR-Spondin1 nur eine schwache Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität zu beobachten war. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Applikation von hDkk1 eine moderate Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität und damit die erwartete Inhibition des basalen Wnt/β-Catenin-Signalweges in den hMSC.

## 5.5 Einfluss der Fzd-Expression auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg

Folgende Aspekte der Fzd-Expression in hMSC werfen in Bezug auf die Wnt-Signal-Transduktion einige Fragen auf. So ist noch nicht verstanden warum eine solch große Anzahl an Fzd-Rezeptoren in hMSC exprimiert wird und warum der Wnt-Weg die Expression einiger dieser Fzds durch eine Feedback-Schleife reguliert (Kolben 2011). Wenig verstanden ist auch inwieweit hierbei unterschiedliche Bindungsaffinitäten zwischen Fzd-Rezeptoren und verschiedenen Wnt-Liganden von Bedeutung sind (Carmon und Loose 2010). So ist bislang noch nicht geklärt, welche der Fzd-Rezeptoren an einer basalen Wnt/β-Catenin-Aktivität bzw. welche an der Vermittlung eines Wnt3a-Stimulus in hMSC beteiligt sind.

### 5.5.1 Auswirkung des Knockdown von Frizzled-Rezeptoren auf die Wnt/β-Catenin-Aktivität

Vergleichende Expressionsanalysen von verschiedenen hMSC-Populationen zeigten, dass die Fähigkeit der Selbsterneuerung sowie der Multipotenz mit hohen Fzd7- und Fzd1-Expressionsraten korrelierten (Song et al. 2006). Dass der Stammzellstatus über die Wnt/β-Catenin-Aktivität maßgeblich reguliert wird, lässt in der hier vorliegenden Arbeit der Knockdown der unterschiedlichen Fzds in den TCF/LEF-Reporter-hMSC vermuten. So wurde der stärkste Einbruch der Gaussia-Luciferase-Aktivität bei Knockdown

von Fzd7 unter basalen Bedingungen, sowie unter Wnt3a-Stimulation beobachtet. Im Fall von Fzd1 zeigte sich eine Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität nur bei Wnt3a-Stimulation. Dies lässt vermuten, dass Fzd7 in Bezug auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg der wichtigste Wnt-Rezeptor für die in hMSC exprimierten Wnts darstellt, welche ein β-Catenin-vermitteltes Signal induzieren. Zudem ist Fzd7, wie auch Fzd1, maßgeblich an der Weiterleitung eines Wnt3a-Stimulus beteiligt. Daneben zeigten beide Rezeptoren, wie aus den Arbeiten von Dr. Thomas Kolben hervorgeht, als positive Wnt-Zielgene eine gesteigerte Expression auf mRNA-Ebene nach Wnt3a-Stimulus. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Fzd7 und Fzd1 mittels eines positiven Rückkopplungsmechanismus einen Wnt-Stimulus verstärken können.

Als weitere kanonische Wnt-Rezeptoren sind Fzd5 und Fzd8 anzusehen, denn auch bei RNAi gegen diese Rezeptoren konnte eine Reduktion der Gaussia-Luciferase-Aktivität beobachtet werden. Im Gegensatz zu Fzd1 und Fzd7 sind diese Rezeptoren, wie aus der Arbeit von Dr. Thomas Kolben (Kolben 2011) hervorgeht, negative Wnt-Zielgene. Dadurch könnte über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Wnt/β-Catenin-Aktivität abgeschwächt werden.

Im Fall von Fzd2 und Fzd6 zeigte sich nach Knockdown eine Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität, welche bei Wnt3a-Stimulus nur noch für Fzd2 beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse stützen frühere Studien in denen gezeigt wurde, dass Fzd2 und Fzd6 den Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg aktivieren können. Dies führt zu einer Repression des Wnt/β-Catenin-Signalweges (Golan et al. 2004; Ishitani et al. 2003). In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch den Knockdown von Fzd2 und Fzd6 diese reprimierende Wirkung auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg aufgehoben werden.

Von den untersuchten Rezeptoren zeigte sich bei Knockdown von Fzd3 und Fzd4 sowohl unter basalen als auch Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen keine Veränderung der Gaussia-Luciferase-Aktivität. Beide weisen in hMSC neben Fzd9 und Fzd10 die geringste Expression auf und spielen möglicherweise deshalb auch keine aktive Rolle im basalen Wnt/β-Catenin-Signalweg.

## 5.6 Ektopische Expression kanonischer Fzds und Wnts

Die vorhergehenden Versuche wiesen Fzd1, 5, und 7 als potentielle Kandidaten für eine Weiterleitung eines Wnt/β-Catenin-Signals in hMSC aus. Hierbei könnte Wnt3 – als Teil des Wnt-Expressionsprofils in hMSC unter basalen Bedingungen – ein kanonischer Ligand dieser Fzd-Rezeptoren sein. Um die Rolle der Fzd-Rezeptoren und Wnts sowie deren Interaktion im Wnt/β-Catenin-Signalweg mittels ektopischer Expressionsanalysen zu untersuchen, wurden diese Komponenten des Signalweges in den Express-

sionsvektor pN3 kloniert. Für die Klonierungen kamen dabei pN3-Varianten zum Einsatz, die eine transiente und im Fall von Fzd5 auch stabile ektopische Expression erlaubten. Die Effizienz der liposomalen Transfektion des Expressionsvektors pN3 sowie die Vitalität der erhaltenen genetisch modifizierten hMSC wurde in den Arbeiten von Dr. Jürgen Hölters untersucht. So zeigte sich, dass die erreichte Effizienz mit bis zu 50 % bei einer Überlebensrate von bis zu 86 % im Vergleich zu anderen Arbeiten relativ hoch war (Hoelters 2009; Hoelters et al. 2005).

### 5.6.1 Das modulare Klonierungssystem pN3-Soi-Toi-Goi

Ziel des modularen Klonierungssystems war die Standardisierung der Klonierung unterschiedlicher Fdzs und Wnts. Dabei sollte vor allem das Einbringen eines Protein-*tags* vereinfacht werden. Über den Protein-*tag* kann zum einen der Nachweis der ektopischen Expression erfolgen und zum anderen eröffnet ein Protein-*tag*, mit Hilfe einer nachfolgenden Immunpräzipitation, Interaktionen zwischen Fdzs und Wnts effizienter zu untersuchen.

Da der C-Terminus der Fdzs wichtige Domänen für die Bindung zahlreicher intrazellulärer Proteine trägt (Schulte und Bryja 2007) wurde der HA-*tag* im N-terminalen Bereich der Fdzs inseriert. Für diese Variante musste jedoch der *tag* zwischen der Signalsequenz und dem reifen Rezeptor bzw. Liganden platziert werden, um den Verlust des *tags* bei der Prozessierung des Signalpeptides im endoplasmatischen Retikulum zu vermeiden. Deshalb wurde die Klonierung in drei Module unterteilt. Dies ermöglichte Signalsequenz (Soi: *signal sequence of interest*) und *tag* (Toi: *tag of interest*) unabhängig von der Rest-Sequenz des Gens (Goi: *gene of interest*) in den pN3-SoiToiGoi zu klonieren. Voraussetzung für diese Strategie war das Einbringen von Restriktionschnittstellen an den Enden der zu klonierenden Fragmente über eine PCR.

Mittels eines DNA-Sequenz-Alignments wurden der Vektor pN3 sowie die proteinkodierenden Sequenzen aller FZD- und WNT-Gene hinsichtlich eines Sets an Erkennungsstellen für selten schneidende Restriktionsenzyme untersucht. Es zeigte sich, dass weder der Vektor pN3 noch die FZD- und WNT-Gene Erkennungsstellen für *Agel*, *Pacl*, *Pvul*, *Swal*, *Pmel* und *AcII* tragen. Diese Restriktionsschnittstellen wurden deshalb als zusätzliche flexible *cloning site* in den pN3-Vektor eingebracht. Ein kommerzielles Klonierungssystem mit dem Namen Flexi®-Vektor Technologie von Promega verwendet mit *Sgfl* und *Pmel* nur 2 selten schneidende Enzyme. In diesem Ansatz ist mit den 6 Erkennungsstellen für selten schneidende Restriktionsenzyme eine sehr viel komplexe Klonierungsstrategie möglich, die für zahlreiche Komponenten des Wnt-Signalweges eine flexible und doch standardisierte Klonierung ermöglicht (Tab. 21).

Gene die über die flexible cloning site kloniert werden können
Fzd1, Fzd2, Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd6, Fzd7, Fzd8, Fzd9, Fzd10, Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, , Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, Dvl2, Kremen1, Kremen2, GSK-3 $\beta$ , Axin1 und 2, APC1 und 2, $\beta$ -Catenin, TF7, TF7L2, TF7L1, LEF1

**Tab. 21: Auswahl an Genen aus dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.**

Der proteinkodierende Teil dieser Gene trägt keine Erkennungsstellen für die selten schneidenden Restriktionsenzyme *Agel*, *Pacl*, *Pvul*, *Swal*, *Pmel* und *Acl*. Dies ermöglicht die Klonierung dieser Gene über das pN3-SoiToiGoi-System.

Für die Fzd-Expressionsvektoren wurden die proteinkodierenden DNA-Sequenzen von Fzd1, 3, 5, 6 und 7 ohne deren Signalsequenz in den pN3-Fzd5-Soi bzw. pN3-Fzd5-Soi-HA-Toi kloniert. Beide Vektoren tragen die Signalsequenz von Fzd5 und im letzteren Falle noch zusätzlich die Sequenz des HA-tags. Im Fall der Wnts wurden die proteinkodierenden DNA-Sequenzen von Wnt3 und Wnt3a, auch hier ohne den Teil für die Signalsequenz, in den zuvor erstellten pN3-Wnt3a-Soi bzw. pN3-Wnt3a-Soi-HA-Toi eingebracht.

### 5.6.2 Nachweis der Überexpression auf mRNA- und Protein-Ebene

Für den Nachweis der Funktionalität der Fzd- und Wnt-Überexpressionsvektoren auf Protein-Ebene wurden in einem Testansatz die HA-tag Varianten in HEK293-Zellen transfiziert. Dabei wurden neben den pN3-SoiToiGoi-Konstrukten zwei Expressionsvektoren (pN3-HA-Fzd1 bzw. pN3-HA-Fzd5) eingesetzt, bei welchen in einem Klonierungsschritt Signalsequenz und reifes Protein eingebracht wurden. So konnte gerade im Fall von Fzd1 über den Immunblot auch gezeigt werden, dass die Einführung der Fzd5-Signalsequenz in die pN3-SoiToiGoi-Variante des Fzd1-Rezeptors keine Auswirkung auf das Immunblot-Signal hatte. Lediglich eine Verschiebung der Doppelbande, aufgrund des höheren Molekulargewichts der pN3-SoiToiGoi-Konstrukte, war zu beobachten. Die Doppelbanden die bei allen Überexpressionen zu beobachten waren, deuten auf posttranskriptionale Modifikationen hin. So weist die Proteinsequenz der Fzd-Rezeptoren potentielle Glykosylierungs- und Palmitoylierungsstellen auf (Schulte 2010). Im Fall des Fzd3 aus dem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) konnte die Arbeitsgruppe um Yangfeng die Doppelbande als Ergebnis einer Phosphorylierung identifizieren (Yanfeng et al. 2006). Auffallend in diesen Studien ist, dass das Immunblot-Signal für Fzd3 mit 63 kDa Molekulargewicht um 10 kDa von den erwarteten 74 kDa abweicht. Dieser Effekt konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bis auf Fzd6 waren alle beobachteten Molekulargewichte um etwa 10 kDa geringer als erwartet. Das Phänomen – auch unter *gel shifting* bekannt – zeigt sich bei vielen Immunblots von Membranproteinen und lässt sich auf eine unvollständige Denaturierung der Transmembranregion zurückführen (Rath et al. 2009). Dadurch erhöht sich die Mobilität.

tät des Membranproteins innerhalb des Gels, was zur Folge hat, dass die beobachteten Molekulargewichte geringer ausfallen als erwartet.

Im Gegensatz dazu stimmen bei den Wnt-Liganden erwartete und beobachtete Molekulargewichte überein. Im Fall von Wnt3a zeigte sich jedoch analog zu den Fzd-Rezeptoren eine Doppelbande. Diese kann mit den bekannten posttranslationalen Modifikationen von Wnts in Verbindung gebracht werden. So ist für Wnt3a neben einer Palmitoylierung auch eine Glykosylierung nachgewiesen worden, die beide essentiell für die Funktionalität des reifen Liganden sind (Komekado et al. 2007). Die Modifikationen steigern die Hydrophobizität und wurden auch im Fall von Wnt5a beobachtet (Kurayoshi et al. 2007). Eine in der Literatur und in der hier vorliegenden Arbeit aufgezeigte Folge ist, dass sich die überwiegende Menge des ektopisch exprimierten Wnt3 und Wnt3a, an der Zelloberfläche assoziiert ist. Dadurch findet man die Wnt-Liganden hauptsächlich im Zelllysat und nicht wie erwartet im Zellkulturüberstand (Mikels und Nusse 2006b).

### 5.6.3 Ektopische Expression der Fzds in TCF/LEF-Reporter-hMSC

Die Reduktion der Reporterprotein-Aktivität bei Knockdown von Fzd1, 5, 7 und 8 wiesen diese als potentielle kanonische Wnt-Rezeptoren aus. Komplementär ist bei ektopischer Expression dieser kanonischen Fzds eine Steigerung der Wnt/β-Catenin-Aktivität zu erwarten. Diese Annahme bestätigen auch Ergebnisse aus Überexpressionsversuchen in HEK293-Reporterzelllinien, welche moderate Steigerungen der Gaussia-Luciferase nach Überexpression der oben genannten Fzds beobachteten (Wei et al. 2007). In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität bei Überexpression von Fzd3, 5, 6 und 8 sowohl unter basalen als auch unter Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen. Auffallend ist, dass auch bei den Ergebnissen von der Arbeitsgruppe um Wei et al. (2007) mit der ektopischen Expression von Fzd5 und 8 die höchsten Reporterprotein-Aktivitäten einhergingen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch eine Überexpressionsstudie in der Drosophila-Zelllinie S2 erhalten, bei der die ektopische Expression von Fzd5 mit der stärksten Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität einherging (Binnerts et al. 2007).

Abweichend zu den beiden Überexpressions-Studien, bei denen die ektopische Expression von Fzd3 und Fzd6 die geringsten Steigerungen der Gaussia-Luciferase-Aktivität aufwies, wurden gerade bei diesen beiden Rezeptoren in der hier vorliegenden Arbeit die stärksten Steigerungen unter Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen beobachtet. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die Fzd-Rezeptoren abhängig vom untersuchten zellulären System unterschiedliche Wirkungen auf den Wnt/β-Catenin-Status vermitteln. Dies wird auch bestätigt von Ergebnissen aus der Studie von Golan et al. (2004), die bei einer Überexpression von Fzd6 eine inhibitorische Wirkung auf den Wnt/β-

Catenin-Signalweg in HEK293-Zellen nachweisen konnten. Deshalb wurden für weitere Untersuchungen mit Fzd5 und Fzd8 die Rezeptoren ausgewählt, bei denen sich die höchste Kongruenz in der Auswirkung auf den Wnt/β-Catenin-Status über die erwähnten Studien hinweg beobachten ließen.

#### 5.6.4 Ektopische Expression von Wnt3 und Wnt3a in TCF/LEF-Reporter-hMSC

Im Fall von Wnt3a zeigte sich, dass die Applikation des rekombinanten hWnt3a eine sehr viel stärkere Aktivierung der Gaussia-Luciferase nach sich zog als eine Wnt3a-Überexpression. Dieser Effekt wurde in der hier vorliegenden Arbeit auch bei den Versuchen mit den unterschiedlichen FBS-Konzentrationen (siehe 4.2.2.3) beobachtet und könnte auf einen Unterschied zwischen para- und autokriner Wirkung des Wnt3a beruhen. Die bei der Überexpression beobachtete starke Akkumulation des Wnt3a im Zelllysat lässt auf eine fast ausschließlich autokrine Wirkung bei Überexpression schließen, während die Applikation des Wnt3a eine parakrine Wirkung zur Folge hat. Im Gegensatz hierzu konnten Baksh und Tuan (2007) nachweisen, dass autokriner und parakriner Wnt3a-Stimulation in hMSC zu vergleichbaren Aktivitäten der Gaussia-Luciferase führten. Ausschlaggebend für die Wnt/β-Catenin-Aktivität scheint jedoch die Konzentration des Wnt3a zu sein. So zeigten Versuche von Dr. Marisa Karow, dass eine Erhöhung der Wnt3a-Konzentration über das Optimum hinaus, wieder mit sinkenden Gaussia-Luciferase-Aktivitäten einhergingen (Karow 2008). Dies wird auch *in vivo* durch Ergebnisse bestätigt, die gerade in der Stammzellniche eine morphogene Wirkung des Wnt3a nahe legen (Luis et al. 2011). Diese Gegebenheiten könnten eine Erklärung dafür sein, weshalb trotz Überexpression des Wnt3a und zellulärer Anreicherung die Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität sehr viel schwächer ausfällt als nach Applikation von Wnt3a.

Ganz im Gegensatz dazu wies die Wnt3-Überexpression schon an Tag 1 eine zur Wnt3a-Applikation vergleichbare Steigerung der Gaussia-Luciferase-Aktivität auf und übertraf diese an Tag 5 um mehr als das doppelte. Berücksichtigt man die hohe Sequenzidentität von 84 % zwischen Wnt3 und Wnt3a erstaunt die sehr viel stärkere Aktivierung des Reporter-Systems durch Wnt3. Da die Überexpression der beiden Wnts auf Proteinebene vergleichbare Expressionslevel zeigte, lässt sich dies als Grund für mögliche Unterschiede in der Gaussia-Luciferase-Aktivität ausschließen.

Unterschiede sind jedoch in der endogenen Expression der beiden Wnts in hMSC bekannt: So wird Wnt3 als früher mesodermaler Marker beschrieben (Liu et al. 2011b) und konnte auch in der hier vorliegenden hMSC-Population auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Dagegen ist eine Expression von Wnt3a weder in den hier verwendeten hMSC noch *in vivo* in hMSC der Stammzellniche nachgewiesen worden (Baksh und

Tuan 2007). Dies legt nahe, dass Wnt3 als zentraler Wnt-Ligand maßgeblich die Wnt/β-Catenin-Aktivität in hMSC reguliert. Weiter zeigte sich bei der Quantifizierung der Wnt3-Überexpression, dass noch an Tag 6 große Mengen an mRNA-Transkripte nachgewiesen werden konnten. Dies lässt auf eine hohe Stabilität des Transkripts und Proteins in hMSC schließen, was Gründe für eine starke Akkumulation auf Proteinebene und damit Aktivierung der Gaussia-Luciferase vor allem an Tag 6 sein könnte.

Stellt man die Gaussia-Luciferase-Aktivitäten nach Wnt-Überexpression mit und ohne HA-*tag* gegenüber, zeigte sich im Fall von HA-Wnt3, dass die Steigerungen weit hinter denen der Variante ohne *tag* verblieben. So halbierten sich schon an Tag 3 der Überexpression von HA-Wnt3 die Induktionsraten der Gaussia-Luciferase-Aktivität im Vergleich zum nicht markierten Wnt3. Im Gegensatz hierzu waren bei der Überexpression von Wnt3a keine signifikanten Unterschiede in der Gaussia-Luciferase-Aktivität zur HA-*tag* Variante zu beobachten. Diese Ergebnisse sowie der Umstand, dass der HA-*tag* im Protein N-terminal lokalisiert ist, könnten die starken Unterschiede der kanonischen Wirkung von Wnt3 und Wnt3a näher aufklären. So ist es vorstellbar, dass bei HA-Wnt3 der HA-*tag* die Wnt-Bindung stört. Da dieser Effekt im Fall von Wnt3a nicht auftritt lässt dies vermuten, dass dies im Zusammenhang mit einer N-terminalen Struktur stehen könnte, welche zwischen den beiden Wnts differiert und die Unterschiede in der kanonischen Wirkung erklären könnte. Röntgenstrukturanalysen von Wnt-Fzd-Komplexen legen nahe, dass der N-Terminus von Wnt-Liganden für die Dimerisierung derselben von Bedeutung ist (Janda et al. 2012). Darüber hinaus scheint die Oligomerisierung von Wnt-Fzd-Komplexen für die Weiterleitung eines Wnt/β-Catenin-Signals und damit auch für die Stärke der kanonischen Wirkung eines Wnts wichtig zu sein (Cong et al. 2004).

## 5.7 Knockdown von Fzd5: Einfluss auf Proliferation und Wnt-Zielgene

Bei Knockdown von Fzd5 war nach 7 Tagen im Vergleich zur NK unter dem Mikroskop eine deutliche Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen. Dies zeigte auch die Messung durch einen Proliferations-Assay, welche eine Reduktion der Zellzahl um 30 % bestätigte. Mittels des Annexin-V-FLUOS *staining kit* konnten hierbei apoptotische Prozesse während des Knockdowns von Fzd5 ausgeschlossen werden. Dass im Apoptose-Assay zwischen apoptotischen und nekrotischen Prozessen nicht unterschieden werden konnte, gründet sich auf der Abwesenheit von Makrophagen in der Zellkultur. Dies führt bei apoptotischen Zellen *in vitro* zur Einleitung der Nekrose. Damit ist die späte Apoptose *in vitro* nicht mehr von der Nekrose zu unterscheiden (Kroemer et al. 1998).

Zusammen mit den Ergebnissen von Dr. Thomas Kolben, der ebenso eine signifikante Abnahme der Zellzahl nach Fzd8-Knockdown (Kolben 2011) feststellte, legt dies nahe, dass unter basalen Bedingungen in hMSC proliferative Signale über Fzd5 und Fzd8 weitergeleitet werden. In Übereinstimmung dazu zeigen Untersuchungen, dass viele Tumore erhöhte Fzd-Expressionslevels aufweisen (Ueno et al. 2012). Eine in der Mehrzahl in renalen Tumoren nachgewiesene Fzd5-Überexpression korrelierte dabei stark mit erhöhten Cyclin D1-Expressionen (Janssens et al. 2004).

Gerade Cyclin D1 aber auch c-Myc, die beide eine zentrale Rolle im Zellzyklus einnehmen, werden als positive Wnt-Zielgene durch den Wnt/β-Catenin-Signalweg reguliert. So ist in hMSC die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges mittels Wnt3a in vielen Studien mit einem proliferativen Effekt des Liganden auf hMSC beschrieben worden (Boland et al. 2004; Yun et al. 2005; Neth et al. 2006). Auch in der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle der proliferative Effekt der Wnt3a-Stimulation auf hMSC. So war über 7 Tage die Zellzahl auf das 1,4fache der Negativkontrolle angewachsen. In diesem Zusammenhang zeigte der Fzd5-Knockdown, dass der proliferative Effekt von Wnt3a komplett aufgehoben wurde. Dies legt nahe, dass die Wirkung des Wnt3a auf die Proliferation von hMSC maßgeblich über den Fzd5-Rezeptor vermittelt wird. Dies bestätigte auch die Quantifizierung der Cyclin D1-Transkriptmengen. So reduzierten sich bei Fzd5-Knockdown die Zellzahl als auch die Cyclin D1-Transkriptmenge unter unstimulierten Bedingungen um 30 %, während bei Wnt3a-Applikation und Knockdown sich beides halbierte. Diese starke Korrelation der prozentualen Abnahmen von Cyclin D1-Transkriptmenge und Zellzahlen wurden jedoch nur an den ersten beiden Tagen beobachtet. An Tag 7 nahm die Cyclin D1 Transkriptmenge im Fzd5-Knockdown wieder signifikant zu. Dies lässt sich auf eine Kombination zweier Effekte zurückführen. Zum einen lässt der transiente Knockdown von Fzd5 und damit auch die Unterbrechung proliferativer Signale in hMSC über die Versuchsstufe hinweg nach. Gestützt wird dies durch die Beobachtung, dass nach Knockdown von Fzd5 und dem proliferativen Effekt der Wnt3a-Applikation an Tag 7 eine stärkere Zunahme der Cyclin D1-Transkriptmenge zu beobachten war als unter unstimulierten Bedingungen.

Zum anderen tritt nach Erreichen hoher Konfluenzen eine Kontaktinhibition ein, welche einen anti-proliferativen Effekt auf die Zellen besitzt (Chassot et al. 2008). Dass dieser Effekt im Versuchsansatz auch greift, zeigte sich an der Reduktion der Cyclin D1 Transkriptmenge über 7 Tage hinweg. So halbiert sich bei allen Bedingungen die Transkriptmenge entsprechend zur Kontrolle von Tag 1 auf Tag 3. Da nun unter Fzd5-Knockdown im Vergleich zur NK die Zelldichte erheblich geringer ist, treten an Tag 7 im Knockdown die Kontaktinhibition und damit auch der anti-proliferative Effekt schwächer ein.

## 5.8 Überexpression von Fzd5: Effekt auf Proliferation und Wnt-Zielgene

Überexprimierte Fzds in Tumoren übernehmen wichtige Funktionen in Erhalt und Progression derselben (King et al. 2012; Wang et al. 2012). So konnte auch bei Überexpression von Fzd5 in hMSC bei transienter Transfektion unter unstimulierten Bedingungen eine Steigerung von Cyclin D1 beobachtet werden. Unter allen anderen Bedingungen zeigten sich bei der transienten Überexpression keine signifikanten Veränderungen beider Wnt-Zielgene. Dieser schwache Effekt der Überexpression ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Zum einen scheint die Plasmidtransfektion selbst stark die Vitalität von hMSC zu beeinträchtigen, was sich in einer starken Abnahme der Zellzahl zeigte. Dies geht aus den Ergebnissen des Proliferations-Assay aber auch aus dem Anstieg der positiven Wnt-Zielgene über die Tage hinweg hervor. Beides weist auf ein Ausbleiben der Kontaktinhibition hin, zumindest in der Stärke wie sie im Fall des Knockdowns beobachtet wurde. Zum anderen induziert die transiente Plasmidtransfektion für nur wenige Tage eine Überexpression, da schon an Tag 5 nur noch ein Bruchteil der Plasmidmenge vorhanden war. Deshalb wurden stabile Transfektionen durchgeführt. Dabei konnte die beschriebene Korrelation zwischen Fzd5-Überexpression und Steigerung der Cyclin D1-Transkriptmenge signifikant bestätigt werden (Janssens et al. 2004).

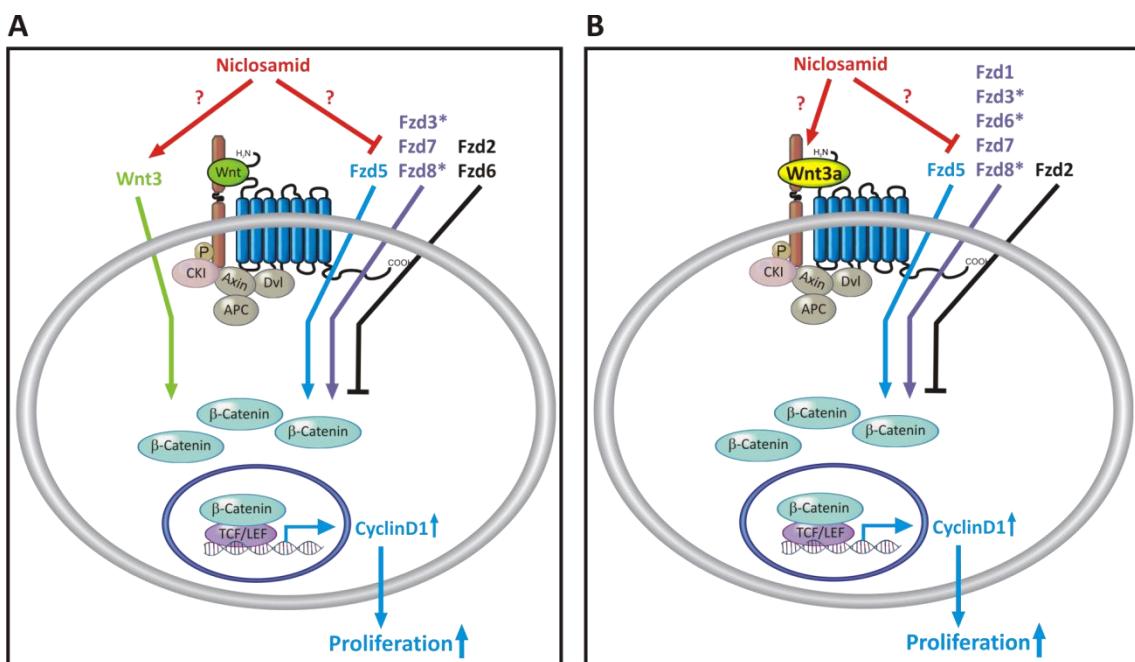
Von den anfänglich 40 transfizierten hMSC-Populationen wiesen jedoch nach Antibiotika-Selektion nur noch 2 hMSC-Populationen eine stabile Fzd5-Überexpression auf. Die hierbei erzielte Transfektionseffizienz von 5 % liegt weit unter den 50% die bei transienten Transfektionen erreicht werden. Diese Differenz in den Effizienzen gründet sich auf die Unterschiede in den Transfektionsmethoden. Im Gegensatz zur transienten Transfektion bei der die Plasmide episomal vorliegen ist die Voraussetzung einer stabilen Transfektion die Integration des Plasmids in das Chromosom. Auch wenn durch die kotransfizierte  $\Phi$ -Integrase die Wahrscheinlichkeit für die Integration des Plasmids in das Wirts-Genom gesteigert wird (Ehrhardt et al. 2005; Thyagarajan et al. 2001), handelt es sich um ein seltenes Ereignis (Hoelters 2009), was auch die geringe Ausbeute an stabil Fzd5-transfizierten hMSC-Populationen in der hier vorliegenden Arbeit begründet. Unter den übrigen aus der Antibiotika-Selektion hervorgegangenen hMSC-Populationen wiesen 4 eine Reduktion der Fzd5-Expression um bis zu 70 % relativ zur Negativkontrolle auf. Grund hierfür könnte die ungerichtete Integration des Transgens in das Genom sein. So kann das Transgen zusätzlich unter die Kontrolle eines benachbarten Antisense-Promotors gelangen. Kommt es daraufhin zur Transkription von Antisense-RNA kann diese unter Bildung von dsRNA-Spezies die RNA-Interferenz aktivieren (Ecker und Davis 1986; Pal-Bhadra et al. 1997).

## 6 RESÜMEE UND AUSBLICK

Während im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Fzd5 aufgrund seiner kanonischen Wirkung die Proliferationskapazität der hMSC maßgeblich bestimmt, könnten zukünftige Studien mit stabil Fzd5-transfizierten hMSC-Populationen auch die Rolle des Rezeptors bei Invasion bzw. Migration sowie bei Differenzierungsprozessen näher aufklären. Die Tatsache, dass Fzd5 und Fzd7 auch an der Weiterleitung eines endogenen Wnt-Signals und damit an einer basalen Wnt/β-Catenin Aktivität in hMSC beteiligt sind, wirft die Frage auf, welcher Wnt-Ligand dafür verantwortlich ist. Von den detektieren 8 Wnts wäre neben Wnt3 auch Wnt10b ein interessanter Kandidat, da letzteres nachweislich wichtige Funktionen im Erhalt der Stammzelleigenschaften besitzt (Wend et al. 2012). Im Fall von Wnt3 konnte bei Überexpression in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass der Ligand innerhalb der hMSC-Population einen sehr viel stärkeren Aktivator des Wnt/β-Catenin-Signalweges darstellt als Wnt3a. Beide Wnts scheinen mit dem Erhalt der Stammzelleigenschaften in hMSC eng verknüpft zu sein, da sie Proliferation und Dedifferenzierungsprozesse steuern (Boland et al. 2004; Ma et al. 2012). Weitere Studien könnten den für Wnt3 spezifischen Wnt-Rezeptor in hMSC aufklären. Ein vielversprechender Ansatz wäre hier ein Knockdown verschiedener Fzds vornehmlich Fzd1, 5 und 7 bei gleichzeitiger Überexpression von Wnt3 in den TCF/LEF-Reporter-hMSC. Darüber hinaus könnten über diesen Ansatz auch andere Wnt/Fzd aber auch Fzd/Fzd-Kombinationen auf eine kanonische Wirkung hin überprüft werden. Das für diese Zwecke notwendige Klonierungssystem wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert. Das einfache Einbringen von Protein-tags erlaubt auch bei Co-Überexpressionen von Wnts und Fzds mittels nachfolgender Immunpräzipitation verschiedene Wnt/Fzd- und Fzd/Fzd-Interaktionen zu detektieren.

Zusammenfassend lassen sich mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden auch in Zukunft wichtige Informationen über die Rezeption eines Wnt/β-Catenin-Signals gewinnen. Gerade hier erweist sich das TCF/LEF-Reportervektor-System als ein zentrales Werkzeug um einen tieferen Einblick in das komplex regulierte Wnt/β-Catenin-Signalnetzwerk in hMSC zu erlangen. Darauf aufbauend könnten in verschiedenen Ansätzen die Wirkung weiterer natürlicher Modulatoren wie sFRP1 und R-Spondine, aber auch synthetischer Verbindungen auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg getestet werden. Hier öffnet das Feld der *small molecules* interessante Möglichkeiten in die Rezeption eines Wnt-Signals einzugreifen. So ist es kürzlich in einer Studie gelungen, Niclosamid-Verbindungen zu identifizieren, welche die Internalisierung von Fzd1 steigern und somit die Wnt3a-vermittelte Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges

inhibieren. Gleichzeitig gelang es mit DK3-1 eine Niclosamid-Substanz zu isolieren, die synergistisch die Wnt3a-vermittelte Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges steigerte (Mook et al. 2013). Zukünftige Studien könnten die Wirkung dieser Niclosamide in den TCF/LEF-Reporter-hMSC näher untersuchen. Hierbei wäre von Interesse, ob auch andere Fzd-Rezeptoren eine gesteigerte Internalisierung bei Applikation von Niclosamid aufweisen. Daneben könnte auch im Fall der Niclosamid-Substanz DK3-1 geprüft werden, ob diese ebenso wie bei Wnt3a auch die Wirkung von Wnt3 oder anderer Wnts potenzieren kann (Abb. 59). So könnten diese spezifischen Manipulationen des Wnt/β-Weges die *ex vivo* Expansion von hMSC effizienter und sicherer machen. Da gerade die systemische Therapie mit hMSC immer mehr an Bedeutung gewinnt, ermöglicht das detaillierte Wissen über den Wnt/β-Catenin-Signalweg zukünftig wichtige klinische Therapieoptionen (Alvarez et al. 2012).



**Abb. 59: Darstellung der Ergebnisse.**

Die aus den Knockdown- und Überexpressionsstudien erhaltenen Ergebnisse wurden in Zusammenhang gebracht und schematisch dargestellt. Die mit einem Stern markierten Fzd-Rezeptoren zeigten nur nach Überexpression eine Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges in hMSC. Zusätzlich wurden potentielle Wirkungen der Niclosamide auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg in hMSC dargestellt (Mook et al. 2013).

A) Wnt/β-Catenin-Signalweg in hMSC unter basalen Bedingungen. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass an der basalen Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalweges in hMSC Wnt3 beteiligt ist. Im Fall der Fzds weisen die Knockdown-Versuche Fzd5 und Fzd7 sowie die Überexpressionsstudien Fzd3 und Fzd8 als kanonische Wnt-Rezeptoren aus. Demgegenüber stehen Fzd2 und Fzd6, die unter basalen Bedingungen eine inhibierende Wirkung auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg aufwiesen. Weiter konnte gezeigt werden, dass Fzd5 in hMSC an der Vermittlung eines proliferativen Signals beteiligt ist.

B) Wnt/β-Catenin-Signalweg in hMSC unter Wnt3a-stimulatorischen Bedingungen. Hier zeigte sich bei den Knockdown und Überexpressionsstudien, dass bis auf Fzd2 alle untersuchten Wnt-Rezeptoren (Fzd1, Fzd3, Fzd5, Fzd6, Fzd7, Fzd8) an der Weiterleitung eines Wnt/β-Catenin-Signals beteiligt sind. Dabei wies Fzd5 eine maßgebliche Beteiligung an der Wnt3a-vermittelten Steigerung der Proliferation auf.

# LITERATURVERZEICHNIS

- Abdallah, B. M., und M. Kassem. 2008. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther* 15 (2):109-116.
- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, und R. Kemler. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16 (13):3797-3804.
- Albers, J., J. Schulze, F. T. Beil, M. Gebauer, A. Baranowsky, J. Keller, R. P. Marshall, K. Wintges, F. W. Friedrich, M. Priemel, A. F. Schilling, J. M. Rueger, K. Cornils, B. Fehse, T. Streichert, G. Sauter, F. Jakob, K. L. Insogna, B. Pober, K. P. Knobeloch, U. Francke, M. Amling, und T. Schinke. 2011. Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *J Cell Biol* 192 (6):1057-1072.
- Alvarez, C. V., M. Garcia-Lavandeira, M. E. Garcia-Rendueles, E. Diaz-Rodriguez, A. R. Garcia-Rendueles, S. Perez-Romero, T. V. Vila, J. S. Rodrigues, P. V. Lear, und S. B. Bravo. 2012. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol* 49 (2):R89-111.
- Anton, R. 2008. Der Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Aufrechterhaltung und Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen. Dissertation, Fakultät für Naturwissenschaften, Universität Ulm, Ulm.
- Arinze, T. L., S. J. Peter, M. P. Archambault, C. van den Bos, S. Gordon, K. Kraus, A. Smith, und S. Kadiyala. 2003. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am* 85-A (10):1927-1935.
- Baeyens, A., und T. Goffin. 2012. European Court of Justice: ECJ 2011/01, Oliver Brustle v. Greenpeace e. V., 18 October 2011 (Case C-34/10). *Eur J Health Law* 19 (1):101-106.
- Baksh, D., und R. S. Tuan. 2007. Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 212 (3):817-826.
- Battula, V. L., P. M. Bareiss, S. Treml, S. Conrad, I. Albert, S. Hojak, H. Abele, B. Schewe, L. Just, T. Skutella, und H. J. Buhring. 2007. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 75 (4):279-291.
- Beddington, R. S., und E. J. Robertson. 1989. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105 (4):733-737.
- Bennett, C. N., H. Ouyang, Y. L. Ma, Q. Zeng, I. Gerin, K. M. Sousa, T. F. Lane, V. Krishnan, K. D. Hankenson, und O. A. MacDougald. 2007. Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 22 (12):1924-1932.
- Bhanot, P., M. Brink, C. H. Samos, J. C. Hsieh, Y. Wang, J. P. Macke, D. Andrew, J. Nathans, und R. Nusse. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382 (6588):225-230.
- Bhat, R. A., B. Stauffer, B. S. Komm, und P. V. Bodine. 2007. Structure-function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function. *J Cell Biochem* 102 (6):1519-1528.

- Biechele, T. L., und R. T. Moon. 2008. Assaying beta-catenin/TCF transcription with beta-catenin/TCF transcription-based reporter constructs. *Methods Mol Biol* 468:99-110.
- Binnerts, M. E., K. A. Kim, J. M. Bright, S. M. Patel, K. Tran, M. Zhou, J. M. Leung, Y. Liu, W. E. Lomas, 3rd, M. Dixon, S. A. Hazell, M. Wagle, W. S. Nie, N. Tomasevic, J. Williams, X. Zhan, M. D. Levy, W. D. Funk, und A. Abo. 2007. R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (37):14700-14705.
- Boland, G. M., G. Perkins, D. J. Hall, und R. S. Tuan. 2004. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 93 (6):1210-1230.
- Bortin, M. M. 1970. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 9 (6):571-587.
- Bourhis, E., C. Tam, Y. Franke, J. F. Bazan, J. Ernst, J. Hwang, M. Costa, A. G. Cochran, und R. N. Hannoush. 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.
- Bovolenta, P., P. Esteve, J. M. Ruiz, E. Cisneros, und J. Lopez-Rios. 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121 (Pt 6):737-746.
- Brack, A. S., F. Murphy-Seiler, J. Hanifi, J. Deka, S. Eyckerman, C. Keller, M. Aguet, und T. A. Rando. 2009. BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration. *Dev Biol* 335 (1):93-105.
- Bridges, C. B., und K. S. Brehme. 1944. *The mutants of Drosophila melanogaster*: Carnegie Institution.
- Caldwell, G. M., C. Jones, K. Gensberg, S. Jan, R. G. Hardy, P. Byrd, S. Chughtai, Y. Wallis, G. M. Matthews, und D. G. Morton. 2004. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 64 (3):883-888.
- Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9 (5):641-650.
- Carmon, K. S., und D. S. Loose. 2010. Development of a bioassay for detection of Wnt-binding affinities for individual frizzled receptors. *Anal Biochem* 401 (2):288-294.
- Chassot, A. A., G. Lossaint, L. Turchi, G. Meneguzzi, D. Fisher, G. Ponzio, und V. Dulic. 2008. Confluence-induced cell cycle exit involves pre-mitotic CDK inhibition by p27(Kip1) and cyclin D1 downregulation. *Cell Cycle* 7 (13):2038-2046.
- Chen, J. Y., P. Oliveri, C. W. Li, G. Q. Zhou, F. Gao, J. W. Hagadorn, K. J. Peterson, und E. H. Davidson. 2000. Precambrian animal diversity: putative phosphatized embryos from the Doushantuo Formation of China. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (9):4457-4462.
- Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, Y. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes, und D. T. Scadden. 2000. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287 (5459):1804-1808.
- Chien, A. J., W. H. Conrad, und R. T. Moon. 2009. A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol* 129 (7):1614-1627.
- Choumerianou, D. M., H. Dimitriou, und M. Kalmanti. 2008. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev* 14 (1):53-60.

- Chung, Y., I. Klimanskaya, S. Becker, T. Li, M. Maserati, S. J. Lu, T. Zdravkovic, D. Ilic, O. Genbacev, S. Fisher, A. Krtolica, und R. Lanza. 2008. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2 (2):113-117.
- Clevers, H., und R. Nusse. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149 (6):1192-1205.
- Cohen, E. D., Y. Tian, und E. E. Morrisey. 2008. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development* 135 (5):789-798.
- Colter, D. C., I. Sekiya, und D. J. Prockop. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (14):7841-7845.
- Cong, F., L. Schweizer, und H. Varmus. 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.
- Cornwell, G. 2006. Ethical issues in deriving stem cells from embryos and eggs. *Br J Nurs* 15 (12):640-644.
- D'Ippolito, G., S. Diabira, G. A. Howard, P. Menei, B. A. Roos, und P. C. Schiller. 2004. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117 (Pt 14):2971-2981.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, A. Rattner, D. Sharma, J. Nathans, und D. J. Leahy. 2001. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* 412 (6842):86-90.
- De Miguel, M. P., F. Arnalich Montiel, P. Lopez Iglesias, A. Blazquez Martinez, und M. Nistal. 2009. Epiblast-derived stem cells in embryonic and adult tissues. *Int J Dev Biol* 53 (8-10):1529-1540.
- De Miguel, M. P., S. Fuentes-Julian, und Y. Alcaina. 2010. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev* 6 (4):633-649.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, und E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4):315-317.
- Dos Santos, F., P. Z. Andrade, J. S. Boura, M. M. Abecasis, C. L. da Silva, und J. M. Cabral. 2010. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol* 223 (1):27-35.
- Du, S. J., S. M. Purcell, J. L. Christian, L. L. McGrew, und R. T. Moon. 1995. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 15 (5):2625-2634.
- Ecker, J. R., und R. W. Davis. 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (15):5372-5376.
- Ehrhardt, A., H. Xu, Z. Huang, J. A. Engler, und M. A. Kay. 2005. A direct comparison of two nonviral gene therapy vectors for somatic integration: in vivo evaluation of the bacteriophage integrase phiC31 and the Sleeping Beauty transposase. *Mol Ther* 11 (5):695-706.

- Etheridge, S. L., G. J. Spencer, D. J. Heath, und P. G. Genever. 2004. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22 (5):849-860.
- Evans, M. J., und M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 (5819):154-156.
- Fagotto, F., U. Gluck, und B. M. Gumbiner. 1998. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 8 (4):181-190.
- Fodde, R. 2002. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 38 (7):867-871.
- Force, T., und J. R. Woodgett. 2009. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J Biol Chem* 284 (15):9643-9647.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, und K. S. Lalykina. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3 (4):393-403.
- Gao, C., und Y. G. Chen. 2010. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22 (5):717-727.
- Gaur, T., L. Rich, C. J. Lengner, S. Hussain, B. Trevant, D. Ayers, J. L. Stein, P. V. Bodine, B. S. Komm, G. S. Stein, und J. B. Lian. 2006. Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. *J Cell Physiol* 208 (1):87-96.
- Gaur, T., J. J. Wixted, S. Hussain, S. L. O'Connell, E. F. Morgan, D. C. Ayers, B. S. Komm, P. V. Bodine, G. S. Stein, und J. B. Lian. 2009. Secreted frizzled related protein 1 is a target to improve fracture healing. *J Cell Physiol* 220 (1):174-181.
- Gazit, A., A. Yaniv, A. Bafico, T. Pramila, M. Igarashi, J. Kitajewski, und S. A. Aaronson. 1999. Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene* 18 (44):5959-5966.
- Go, G. W., und A. Mani. 2012. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med* 85 (1):19-28.
- Golan, T., A. Yaniv, A. Bafico, G. Liu, und A. Gazit. 2004. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J Biol Chem* 279 (15):14879-14888.
- Goldring, C. E., P. A. Duffy, N. Benvenisty, P. W. Andrews, U. Ben-David, R. Eakins, N. French, N. A. Hanley, L. Kelly, N. R. Kitteringham, J. Kurth, D. Ladenheim, H. Laverty, J. McBlane, G. Narayanan, S. Patel, J. Reinhardt, A. Rossi, M. Sharpe, und B. K. Park. 2011. Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* 8 (6):618-628.
- Gong, Y., E. Bourhis, C. Chiu, S. Stawicki, V. I. DeAlmeida, B. Y. Liu, K. Phamluong, T. C. Cao, R. A. Carano, J. A. Ernst, M. Solloway, B. Rubinfeld, R. N. Hannoush, Y. Wu, P. Polakis, und M. Costa. 2010. Wnt isoform-specific interactions with coreceptor specify inhibition or potentiation of signaling by LRP6 antibodies. *PLoS One* 5 (9):e12682.
- Greenow, K., und A. R. Clarke. 2012. Controlling the stem cell compartment and regeneration in vivo: the role of pluripotency pathways. *Physiol Rev* 92 (1):75-99.
- Gronthos, S., und P. J. Simmons. 1995. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 85 (4):929-940.

- Gurudutta, G. U., N. K. Satija, V. K. Singh, Y. K. Verma, P. Gupta, und R. P. Tripathi. 2012. Stem cell therapy: a novel & futuristic treatment modality for disaster injuries. *Indian J Med Res* 135:15-25.
- He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein, und K. W. Kinzler. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281 (5382):1509-1512.
- He, X., M. Semenov, K. Tamai, und X. Zeng. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131 (8):1663-1677.
- Health, N. I. o. 2004. *Stem cells: scientific progress and future research directions*: University Press of the Pacific.
- . 2006. *Regenerative medicine*: University Press of the Pacific.
- Henderson, B. R., und F. Fagotto. 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* 3 (9):834-839.
- Hipp, J., und A. Atala. 2008. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 4 (1):3-11.
- Hoelters, J. 2009. Zielgerichtete genetische Modifikation humaner mesenchymaler Stammzellen mittels liposomaler Transfektion nicht-viraler Vektoren. Dissertation, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hoelters, J., M. Ciccarella, M. Drechsel, C. Geissler, H. Gulkan, W. Bocker, M. Schieker, M. Jochum, und P. Neth. 2005. Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* 7 (6):718-728.
- Hoppler, S., J. D. Brown, und R. T. Moon. 1996. Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in Xenopus embryos. *Genes Dev* 10 (21):2805-2817.
- Hoppler, S., und C. L. Kavanagh. 2007. Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* 120 (Pt 3):385-393.
- Hsu, Y. C., H. A. Pasolli, und E. Fuchs. 2011. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* 144 (1):92-105.
- Huang, H. C., und P. S. Klein. 2004. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* 5 (7):234.
- Hurlstone, A., und H. Clevers. 2002. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J* 21 (10):2303-2311.
- Ishikawa, T., Y. Tamai, A. M. Zorn, H. Yoshida, M. F. Seldin, S. Nishikawa, und M. M. Taketo. 2001. Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development* 128 (1):25-33.
- Ishitani, T., S. Kishida, J. Hyodo-Miura, N. Ueno, J. Yasuda, M. Waterman, H. Shibuya, R. T. Moon, J. Ninomiya-Tsuji, und K. Matsumoto. 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.
- Ivanova, N. B., J. T. Dimos, C. Schaniel, J. A. Hackney, K. A. Moore, und I. R. Lemischka. 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298 (5593):601-604.
- Janda, C. Y., D. Waghray, A. M. Levin, C. Thomas, und K. C. Garcia. 2012. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337 (6090):59-64.

- Janssens, N., L. Andries, M. Janicot, T. Perera, und A. Bakker. 2004. Alteration of frizzled expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 25 (4):161-171.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada, und C. M. Verfaillie. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 (6893):41-49.
- Kansara, M., M. Tsang, L. Kodjabachian, N. A. Sims, M. K. Trivett, M. Ehrich, A. Dobrovic, J. Slavin, P. F. Choong, P. J. Simmons, I. B. Dawid, und D. M. Thomas. 2009. Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J Clin Invest* 119 (4):837-851.
- Karow, M. 2008. Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Analyse einzelner Signalkomponenten und deren funktioneller Bedeutung bei Proliferation und Invasion. Dissertation, Fakultät der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Katayama, Y., M. Battista, W. M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas, und P. S. Frenette. 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124 (2):407-421.
- Kawano, Y., und R. Kypta. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116 (Pt 13):2627-2634.
- Kerkis, I., A. Kerkis, D. Dozortsev, G. C. Stukart-Parsons, S. M. Gomes Massironi, L. V. Pereira, A. I. Caplan, und H. F. Cerruti. 2006. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 184 (3-4):105-116.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter, und K. Bieback. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24 (5):1294-1301.
- Kestler, H. A., und M. Kuhl. 2008. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363 (1495):1333-1347.
- Kim, K. A., M. Wagle, K. Tran, X. Zhan, M. A. Dixon, S. Liu, D. Gros, W. Korver, S. Yonkovich, N. Tomasevic, M. Binnerts, und A. Abo. 2008. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell* 19 (6):2588-2596.
- King, T. D., W. Zhang, M. J. Suto, und Y. Li. 2012. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal* 24 (4):846-851.
- Kinoshita, T., S. Nomoto, Y. Kodera, M. Koike, M. Fujiwara, und A. Nakao. 2011. Decreased expression and aberrant hypermethylation of the SFRP genes in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 58 (107-108):1051-1056.
- Kinzler, K. W., und B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 (2):159-170.
- Klaus, A., und W. Birchmeier. 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8 (5):387-398.
- Klingensmith, J., R. Nusse, und N. Perrimon. 1994. The Drosophila segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev* 8 (1):118-130.
- Kobayashi, T., H. Watanabe, T. Yanagawa, S. Tsutsumi, M. Kayakabe, T. Shinozaki, H. Higuchi, und K. Takagishi. 2005. Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal

- stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg Br* 87 (10):1426-1433.
- Koike, M., S. Kose, M. Furuta, N. Taniguchi, F. Yokoya, Y. Yoneda, und N. Imamoto. 2004. beta-Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores. *J Biol Chem* 279 (32):34038-34047.
- Kolben, T. 2011. Wnt/β-Catenin-Signalling an der Oberfläche von humanen mesenchymalen Stammzellen: Expression und Regulation der Frizzled-Rezeptoren. Dissertation, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Kolben, T., I. Perobner, K. Fernsebner, F. Lechner, C. Geissler, L. Ruiz-Heinrich, S. Capovilla, M. Jochum, und P. Neth. 2012. Dissecting the impact of Frizzled receptors in Wnt/beta-catenin signaling of human mesenchymal stem cells. *Biol Chem* 393 (12):1433-1447.
- Komekado, H., H. Yamamoto, T. Chiba, und A. Kikuchi. 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, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, und H. Clevers. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275 (5307):1784-1787.
- Koso, H., Y. Ouchi, Y. Tabata, Y. Aoki, S. Satoh, K. Arai, und S. Watanabe. 2006. SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway. *Dev Biol* 292 (1):265-276.
- Krieghoff, E., J. Behrens, und B. Mayr. 2006. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* 119 (Pt 7):1453-1463.
- Kroemer, G., B. Dallaporta, und M. Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60:619-642.
- Kucia, M., R. Reca, F. R. Campbell, E. Zuba-Surma, M. Majka, J. Ratajczak, und M. Z. Ratajczak. 2006. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20 (5):857-869.
- Kuhl, M. 2004. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 9:967-974.
- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, M. Park, J. R. Miller, und R. T. Moon. 2000. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16 (7):279-283.
- Kuhnert, F., C. R. Davis, H. T. Wang, P. Chu, M. Lee, J. Yuan, R. Nusse, und C. J. Kuo. 2004. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (1):266-271.
- Kurayoshi, M., H. Yamamoto, S. Izumi, und A. Kikuchi. 2007. Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J* 402 (3):515-523.
- Kusserow, A., K. Pang, C. Sturm, M. Hrouda, J. Lentfer, H. A. Schmidt, U. Technau, A. von Haeseler, B. Hobmayer, M. Q. Martindale, und T. W. Holstein. 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433 (7022):156-160.
- Kuznetsov, S. A., P. H. Krebsbach, K. Satomura, J. Kerr, M. Riminucci, D. Benayahu, und P. G. Robey. 1997. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 12 (9):1335-1347.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lapointe, E., A. Boyer, C. Rico, M. Paquet, H. L. Franco, J. Gossen, F. J. DeMayo, J. S. Richards, und D. Boerboom. 2012. FZD1 regulates cumulus expansion genes and is required for normal female fertility in mice. *Biol Reprod* 87 (5):104.
- Lechner, F. 2011. Die Bedeutung verschiedener Frizzled8-Isoformen und Wnt8B im Wnt/β-Catenin-Signalweg von mesodermalen Tumorzellen. Dissertation, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Li, F., Z. Z. Chong, und K. Maiese. 2006. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histol Histopathol* 21 (1):103-124.
- Li, V. S., S. S. Ng, P. J. Boersema, T. Y. Low, W. R. Karthaus, J. P. Gerlach, S. Mohammed, A. J. Heck, M. M. Maurice, T. Mahmoudi, und H. Clevers. 2012. Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149 (6):1245-1256.
- Li, Y., J. Cam, und G. Bu. 2001. Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction. *Mol Neurobiol* 23 (1):53-67.
- Ling, L., V. Nurcombe, und S. M. Cool. 2009. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 433 (1-2):1-7.
- Liu, C., Y. Li, M. Semenov, C. Han, G. H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, und X. He. 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108 (6):837-847.
- Liu, D., K. Kadota, M. Ueno, N. Nakashima, H. Yokomise, und C. L. Huang. 2011a. Adenoviral vector expressing short hairpin RNA targeting Wnt2B has an effective antitumour activity against Wnt2B2-overexpressing tumours. *Eur J Cancer*.
- Liu, Y., X. Wang, D. S. Kaufman, und W. Shen. 2011b. A synthetic substrate to support early mesodermal differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 32 (32):8058-8066.
- Livak, K. J., und T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-408.
- Logan, C. Y., und R. Nusse. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.
- Loh, Y. H., Q. Wu, J. L. Chew, V. B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K. Y. Wong, K. W. Sung, C. W. Lee, X. D. Zhao, K. P. Chiu, L. Lipovich, V. A. Kuznetsov, P. Robson, L. W. Stanton, C. L. Wei, Y. Ruan, B. Lim, und H. H. Ng. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38 (4):431-440.
- Luis, T. C., B. A. Naber, P. P. Roozen, M. H. Brugman, E. F. de Haas, M. Ghazvini, W. E. Fibbe, J. J. van Dongen, R. Fodde, und F. J. Staal. 2011. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell* 9 (4):345-356.
- Luo, J., J. Chen, Z. L. Deng, X. Luo, W. X. Song, K. A. Sharff, N. Tang, R. C. Haydon, H. H. Luu, und T. C. He. 2007. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab Invest* 87 (2):97-103.
- Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P. M. Schlag, W. Birchmeier, und J. Behrens. 2002. Negative feedback loop of

- Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22 (4):1184-1193.
- Ma, B., E. B. Landman, R. L. Miclea, J. M. Wit, E. C. Robanus-Maandag, J. N. Post, und M. Karperien. 2012. WNT Signaling and Cartilage: Of Mice and Men. *Calcif Tissue Int.*
- MacDonald, B. T., K. Tamai, und X. He. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17 (1):9-26.
- Malinauskas, T., A. R. Aricescu, W. Lu, C. Siebold, und E. Y. Jones. 2011. Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1. *Nat Struct Mol Biol* 18 (8):886-893.
- Mannello, F., und G. A. Tonti. 2007. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 25 (7):1603-1609.
- Martin, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (12):7634-7638.
- McMahon, A. P., und R. T. Moon. 1989. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58 (6):1075-1084.
- Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, und P. S. Frenette. 2010. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466 (7308):829-834.
- Meng, Y., Q. G. Wang, J. X. Wang, S. T. Zhu, Y. Jiao, P. Li, und S. T. Zhang. 2011. Epigenetic Inactivation of the SFRP1 Gene in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Dig Dis Sci.*
- Mikels, A. J., und R. Nusse. 2006a. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4 (4):e115.
- . 2006b. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25 (57):7461-7468.
- Mikkers, H., und J. Frisen. 2005. Deconstructing stemness. *EMBO J* 24 (15):2715-2719.
- Mook, R. A., Jr., M. Chen, J. Lu, L. S. Barak, H. K. Lyerly, und W. Chen. 2013. Small molecule modulators of Wnt/beta-catenin signaling. *Bioorg Med Chem Lett* 23 (7):2187-2191.
- Morrison, S. J., und J. Kimble. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441 (7097):1068-1074.
- Motaln, H., C. Schichor, und T. T. Lah. 2010. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 116 (11):2519-2530.
- Nemeth, M. J., und D. M. Bodine. 2007. Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res* 17 (9):746-758.
- Neth, P., M. Ciccarella, V. Egea, J. Hoelters, M. Jochum, und C. Ries. 2006. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24 (8):1892-1903.
- Neufeld, K. L. 2009. Nuclear APC. *Adv Exp Med Biol* 656:13-29.

- Niida, A., T. Hiroko, M. Kasai, Y. Furukawa, Y. Nakamura, Y. Suzuki, S. Sugano, und T. Akiyama. 2004. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23 (52):8520-8526.
- Nusse, R., A. Brown, J. Papkoff, P. Scambler, G. Shackleford, A. McMahon, R. Moon, und H. Varmus. 1991. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 64 (2):231.
- Nusse, R., C. Fuerer, W. Ching, K. Harnish, C. Logan, A. Zeng, D. ten Berge, und Y. Kalani. 2008. Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:59-66.
- Nusse, R., und 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.
- Okoye, U. C., C. C. Malbon, und H. Y. Wang. 2008. Wnt and Frizzled RNA expression in human mesenchymal and embryonic (H7) stem cells. *J Mol Signal* 3:16.
- Ornstein, L. 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121:321-349.
- Pal-Bhadra, M., U. Bhadra, und J. A. Birchler. 1997. Cosuppression in Drosophila: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell* 90 (3):479-490.
- Peröbner, I., M. Karow, M. Jochum, und P. Neth. 2012. LRP6 mediates Wnt/beta-catenin signaling and regulates adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44 (11):1970-1982.
- Petersen, C. P., und P. W. Reddien. 2009. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139 (6):1056-1068.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, und D. R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411):143-147.
- Polakis, P. 2012. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (5).
- Potier, E., E. Ferreira, A. Meunier, L. Sedel, D. Logeart-Avramoglou, und H. Petite. 2007. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng* 13 (6):1325-1331.
- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S. M. Kutepov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon, und M. Marcacci. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344 (5):385-386.
- Ramalho-Santos, M., S. Yoon, Y. Matsuzaki, R. C. Mulligan, und D. A. Melton. 2002. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298 (5593):597-600.
- Rasheed, S., W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein, und M. B. Gardner. 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33 (4):1027-1033.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler. In *Rapid Cycle Real-Time PCR*, edited by S. Meuer, C. Wittwer and K.-I. Nakagawara: Springer Berlin Heidelberg, 21-34.
- Rath, A., M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen, und C. M. Deber. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (6):1760-1765.

- Resnitzky, D., M. Gossen, H. Bujard, und S. I. Reed. 1994. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14 (3):1669-1679.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel, und R. Nusse. 1987. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50 (4):649-657.
- Robitaille, J. M., B. Zheng, K. Wallace, M. J. Beis, C. Tatlidil, J. Yang, T. G. Sheidow, L. Siebert, A. V. Levin, W. C. Lam, B. W. Arthur, C. J. Lyons, E. Jaakkola, E. Tsilou, C. A. Williams, R. G. Weaver, Jr., C. L. Shields, und D. L. Guernsey. 2011. The role of Frizzled-4 mutations in familial exudative vitreoretinopathy and Coats disease. *Br J Ophthalmol* 95 (4):574-579.
- Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci, und P. Bianco. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131 (2):324-336.
- Sakane, H., H. Yamamoto, und A. Kikuchi. 2010. LRP6 is internalized by Dkk1 to suppress its phosphorylation in the lipid raft and is recycled for reuse. *J Cell Sci* 123 (Pt 3):360-368.
- Schiott, H. B., und R. Fredriksson. 2005. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* 142 (1-2):94-101.
- Schulte, G. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev* 62 (4):632-667.
- Schulte, G., und V. Bryja. 2007. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28 (10):518-525.
- Schwab, K. R., L. T. Patterson, H. A. Hartman, N. Song, R. A. Lang, X. Lin, und S. S. Potter. 2007. Pygo1 and Pygo2 roles in Wnt signaling in mammalian kidney development. *BMC Biol* 5:15.
- Sercan, Z., M. Pehlivan, und H. O. Sercan. 2010. Expression profile of WNT, FZD and sFRP genes in human hematopoietic cells. *Leuk Res* 34 (7):946-949.
- Shahdadfar, A., K. Fronsdal, T. Haug, F. P. Reinholt, und J. E. Brinchmann. 2005. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23 (9):1357-1366.
- Sharma, R. P., und V. L. Chopra. 1976. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 48 (2):461-465.
- Shen, L., S. Zhou, und J. Glowacki. 2009. Effects of age and gender on WNT gene expression in human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 106 (2):337-343.
- Shimizu, H., M. A. Julius, M. Giarre, Z. Zheng, A. M. Brown, und J. Kitajewski. 1997. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8 (12):1349-1358.
- Sievers, S., C. Fritzsch, M. Grzegorczyk, C. Kuhnen, und O. Muller. 2006. Absolute beta-catenin concentrations in Wnt pathway-stimulated and non-stimulated cells. *Biomarkers* 11 (3):270-278.
- Slusarski, D. C., V. G. Corces, und R. T. Moon. 1997. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390 (6658):410-413.

- Snippert, H. J., und H. Clevers. 2011. Tracking adult stem cells. *EMBO Rep* 12 (2):113-122.
- Song, L., N. E. Webb, Y. Song, und R. S. Tuan. 2006. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 24 (7):1707-1718.
- Sotiropoulou, P. A., S. A. Perez, M. Salagianni, C. N. Baxevanis, und M. Papamichail. 2006. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24 (2):462-471.
- Stadeli, R., R. Hoffmans, und K. Basler. 2006. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol* 16 (10):R378-385.
- Stevens, J. R., G. A. Miranda-Carboni, M. A. Singer, S. M. Brugger, K. M. Lyons, und T. F. Lane. 2010. Wnt10b deficiency results in age-dependent loss of bone mass and progressive reduction of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res* 25 (10):2138-2147.
- Stolzing, A., E. Jones, D. McGonagle, und A. Scutt. 2008. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129 (3):163-173.
- Stuebner, S., T. Faus-Kessler, T. Fischer, W. Wurst, und N. Prakash. 2010. Fzd3 and Fzd6 deficiency results in a severe midbrain morphogenesis defect. *Dev Dyn* 239 (1):246-260.
- Tamai, K., X. Zeng, C. Liu, X. Zhang, Y. Harada, Z. Chang, und X. He. 2004. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13 (1):149-156.
- Tannous, B. A., D. E. Kim, J. L. Fernandez, R. Weissleder, und X. O. Breakefield. 2005. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther* 11 (3):435-443.
- Tetsu, O., und F. McCormick. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398 (6726):422-426.
- Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., W. C. Lu, und J. W. Ferrebee. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257 (11):491-496.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, und J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391):1145-1147.
- Thyagarajan, B., E. C. Olivares, R. P. Hollis, D. S. Ginsburg, und M. P. Calos. 2001. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* 21 (12):3926-3934.
- Tonti, G. A., und F. Mannello. 2008. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol* 52 (8):1023-1032.
- Traynor, A. E., J. Schroeder, R. M. Rosa, D. Cheng, J. Stefka, S. Mujais, S. Baker, und R. K. Burt. 2000. Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high-dose chemotherapy and haemopoietic stem-cell transplantation: a phase I study. *Lancet* 356 (9231):701-707.
- Turnovcova, K., K. Ruzickova, V. Vanecek, E. Sykova, und P. Jendelova. 2009. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy* 11 (7):874-885.

- Ueno, K., H. Hirata, Y. Hinoda, und R. Dahiya. 2012. Frizzled homolog proteins, microRNAs and Wnt signaling in cancer. *Int J Cancer*.
- Uysal-Oganer, P., und R. M. Kypta. 2012. Wnt11 in 2011 - the regulation and function of a non-canonical Wnt. *Acta Physiol (Oxf)* 204 (1):52-64.
- van Amerongen, R., und R. Nusse. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136 (19):3205-3214.
- van de Wetering, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. van Beest, J. van Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin, und H. Clevers. 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* 88 (6):789-799.
- Veeman, M. T., J. D. Axelrod, und R. T. Moon. 2003. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5 (3):367-377.
- Vinson, C. R., S. Conover, und P. N. Adler. 1989. A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 338 (6212):263-264.
- Vlad, A., S. Rohrs, L. Klein-Hitpass, und O. Muller. 2008. The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal* 20 (5):795-802.
- Wang, H. Q., M. L. Xu, J. Ma, Y. Zhang, und C. H. Xie. 2012. Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 417 (1):62-66.
- Wang, Y., D. Huso, H. Cahill, D. Ryugo, und J. Nathans. 2001. Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the frizzled-4 gene. *J Neurosci* 21 (13):4761-4771.
- Wawrzak, D., A. Luyten, K. Lambaerts, und P. Zimmermann. 2009. Frizzled-PDZ scaffold interactions in the control of Wnt signaling. *Adv Enzyme Regul* 49 (1):98-106.
- Wei, Q., C. Yokota, M. V. Semenov, B. Doble, J. Woodgett, und X. He. 2007. R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 282 (21):15903-15911.
- Wend, P., K. Wend, S. A. Krum, und G. A. Miranda-Carboni. 2012. The role of WNT10B in physiology and disease. *Acta Physiol (Oxf)* 204 (1):34-51.
- Wess, J. 1998. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 80 (3):231-264.
- Wiechens, N., und F. Fagotto. 2001. CRM1- and Ran-independent nuclear export of beta-catenin. *Curr Biol* 11 (1):18-27.
- Willert, J., M. Epping, J. R. Pollack, P. O. Brown, und R. Nusse. 2002. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol* 2:8.
- Willert, K., J. D. Brown, E. Danenber, A. W. Duncan, I. L. Weissman, T. Reya, J. R. Yates, 3rd, und R. Nusse. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423 (6938):448-452.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, und K. H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (6619):810-813.
- Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lio, H. R. Macdonald, und A. Trumpp. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135 (6):1118-1129.

- Wong, G. T., B. J. Gavin, und A. P. McMahon. 1994. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14 (9):6278-6286.
- Wu, B., S. P. Crampton, und C. C. Hughes. 2007. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26 (2):227-239.
- Wu, D., und W. Pan. 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 35 (3):161-168.
- Wu, Y., J. Li, C. Y. Sun, Y. Zhou, Y. F. Zhao, und S. J. Zhang. 2012. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 in hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasma* 59 (3):326-332.
- Xiong, A., T. W. Austin, E. Lagasse, N. Uchida, S. Tamaki, B. B. Bordier, I. L. Weissman, J. S. Glenn, und M. T. Millan. 2008. Isolation of human fetal liver progenitors and their enhanced proliferation by three-dimensional coculture with endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 14 (6):995-1006.
- Xu, Q., Y. Wang, A. Dabdoub, P. M. Smallwood, J. Williams, C. Woods, M. W. Kelley, L. Jiang, W. Tasman, K. Zhang, und J. Nathans. 2004. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116 (6):883-895.
- Yan, Y., Y. Li, C. Hu, X. Gu, J. Liu, Y. A. Hu, Y. Yang, Y. Wei, und C. Zhao. 2009. Expression of Frizzled10 in mouse central nervous system. *Gene Expr Patterns* 9 (3):173-177.
- Yanfeng, W. A., C. Tan, R. J. Fagan, und P. S. Klein. 2006. Phosphorylation of frizzled-3. *J Biol Chem* 281 (17):11603-11609.
- Yu, H., D. Fang, S. M. Kumar, L. Li, T. K. Nguyen, G. Acs, M. Herlyn, und X. Xu. 2006. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 168 (6):1879-1888.
- Yu, H., X. Ye, N. Guo, und J. Nathans. 2012. Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes. *Development* 139 (23):4383-4394.
- Yun, M. S., S. E. Kim, S. H. Jeon, J. S. Lee, und K. Y. Choi. 2005. Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J Cell Sci* 118 (Pt 2):313-322.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, und L. Li. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425 (6960):836-841.
- Zhao, C. H., X. M. Bu, und N. Zhang. 2007. Hypermethylation and aberrant expression of Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 13 (15):2214-2217.

## **DANKSAGUNG**

Hiermit möchte ich Frau Professor Dr. Marianne Jochum danken, dass sie mir als ehemalige Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Frau Professor Dr. Vollmar möchte ich danken für die Übernahme der Erstgutachterin und der externen Vertretung der Doktorarbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie. Weiter danke ich meinem Betreuer der Doktorarbeit PD Dr. Peter Neth für all seine Unterstützung. Nicht zuletzt möchte ich allen Danken die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.