

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten (IPEK)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber

Molekulare Regulationsmechanismen der Frizzled 8- Transkription in humanen Fibrosarkomzellen und mesenchymalen Stammzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johann Wenzeslaus Schicho

aus
Cham

2014

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

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Peter Neth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Dendorfer
Priv. Doz. Dr. Marcus Schlemmer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Peter Neth

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

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2014

*Meinem Großvater Dr. med. Hans Lermer gewidmet
(04. Dezember 1919 - 20. Mai 2012)*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
A ZUSAMMENFASSUNG	1
B EINLEITUNG	3
B.1 GESCHICHTE UND BEDEUTUNG DER WNT-SIGNALWEGE	3
B.2 EXTRAZELLULÄRE WNT-KOMPONENTEN	6
B.2.1 AKTIVATOREN DER WNT-SIGNALWEGE: DIE WNTS.....	6
B.2.2 INHIBITOREN DER WNT-SIGNALWEGE: SFRPs, DKK, WIF UND SOST	7
B.3 ELEMENTE DES KANONISCHEN WNT-SIGNALWEGES IN DER ZELLMEMBRAN	8
B.3.1 DIE FRIZZLED-REZEPTOREN	8
B.3.2 <i>LOW DENSITY LIPOPROTEIN RELATED PROTEINS</i> (LRP) 5/6 UND ARROW: FZD-KOREZEPTOREN	12
B.3.3 TRANSMISSION DES KANONISCHEN WNT-SIGNALS ÜBER DIE ZELLMEMBRAN.....	14
B.4 ELEMENTE DES KANONISCHEN WNT-SIGNALWEGES IM ZYTOSOL	16
B.4.1 DISHEVELLED	16
B.4.2 AXIN	17
B.4.3 <i>ADENOMATOUS POLIPOSIS COLI</i> (APC)	18
B.4.4 KINASEN, PHOSPHATASEN UND DIE E3-UBIQUITINLIGASE BTRCP	18
B.4.5 B-CATENIN.....	19
B.4.6 TRANSDUKTION DES KANONISCHEN WNT-SIGNALS IM ZYTOSOL.....	20
B.5 TRANSDUKTION DES KANONISCHEN WNT-SIGNALS IM NUKLEUS	22
B.5.1 TRANSPORT VON B-CATENIN IN DEN NUKLEUS	22
B.5.2 INTERAKTION VON B-CATENIN MIT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN TCF/LEF	22
B.5.3 ZIELGENE UND SELBSTREGULATION DES WNT-SIGNALWEGES.....	23
B.6 PHYSIOLOGISCHES UND ABERRANTES WNT/B-CATENIN-SIGNALING	24
B.6.1 STAMMZELSELBSTERNEUERUNG.....	24
B.6.2 BENIGNE ERKRANKUNGEN	24
B.6.3 MALIGN ERKRANKUNGEN.....	25
B.6.4 THERAPEUTISCHE ASPEKTE	25
C ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	27
D MATERIAL UND METHODEN	28
D.1 GERÄTE UND MATERIALIEN	28
D.1.1 GERÄTE	28
D.1.2 CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	29
D.1.2.1 Bakterien, Nährlösungen und Antibiotika	29
D.1.2.2 Oligonukleotide	30
D.1.2.3 Rekombinante Proteine und Antikörper	32
D.1.2.4 Small Interfering RNAs.....	32
D.1.2.5 Chemikalien, Enzyme und andere Materialien	32
D.1.3 SÄUGETIERZELLEN	34
D.1.3.1 hMSC-P (Prockop)	34
D.1.3.2 Fibrosarkomzellen HT1080	35
D.1.3.3 HEK293	35
D.1.4 PLASMIDE	35
D.1.4.1 pCR4.1-TOPO	35
D.1.4.2 pGLuc-Basic.....	36

D.1.4.3	pN3.....	37
D.1.4.4	pEGFP-N3.....	38
D.1.4.5	pN3-BAR-GLuc.....	39
D.1.5	BIOINFORMATISCHE HILFSMITTEL.....	40
D.2	METHODEN.....	41
D.2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	41
D.2.1.1	Klonierung rekombinanter DNA-Sequenzen.....	41
D.2.1.1.1	PCR.....	41
D.2.1.1.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese und Gelelution.....	42
D.2.1.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
D.2.1.1.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	43
D.2.1.1.5	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	44
D.2.1.1.6	DNA-Sequenzierung.....	45
D.2.1.2	RNA-Isolierung aus Zellen.....	45
D.2.1.3	Synthese von cDNA.....	45
D.2.1.4	Quantitative RT-PCR.....	46
D.2.2	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	49
D.2.2.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme.....	49
D.2.2.2	Kultivierung und Selektion transformierter <i>E. coli</i> -Stämme.....	49
D.2.2.2.1	Wachstumsmedium.....	49
D.2.2.2.2	Antibiotika als Selektionsmittel.....	50
D.2.2.2.3	Herstellung und Lagerung der Stammsammlung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	50
D.2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	50
D.2.3.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	50
D.2.3.2	Kultivierung von Zellen.....	51
D.2.3.3	Splitten von konfluenten Zellen.....	51
D.2.3.4	Zellzahlbestimmung.....	52
D.2.3.5	Transiente Transfektion von Plasmiden und siRNA.....	52
D.2.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	53
D.2.4.1	Isolierung von Zytoplasma- und Membranproteinen.....	53
D.2.4.2	Western Blot und Proteinnachweis.....	53
D.2.4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
D.2.4.2.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	54
D.2.4.2.3	Immundetektion der Zielproteine.....	54
D.2.4.3	Gaussia-Luciferase-Aktivitätsquantifizierung.....	55
D.2.4.4	BCA-Assay.....	56
D.2.4.5	Proteindetektion durch Fluoreszenznachweis.....	56
D.2.5	DATENANALYSE.....	57
E	ERGEBNISSE.....	58
E.1	KLONIERUNG DES FZD8-PROMOTORS UND TRUNKIERTER VARIANTEN.....	58
E.1.1	KARTIERUNG DES FZD8-TRANSKRIPTIONSSTARTS MITTELS DER RLM-RACE-METHODE.....	58
E.1.2	GENERIERUNG DES REPORTERPLASMIDS PGLUCBASIC-FZD8PROMOTOR.....	59
E.1.3	ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT VON PGLUCBASIC-FZD8PROMOTOR.....	61
E.1.4	ÜBERPRÜFUNG DER VOLLSTÄNDIGKEIT DER PUTATIVEN PROMOTORREGION.....	62
E.1.5	KLONIERUNG 5'- UND 3'-TERMINAL TRUNKIERTER PROMOTORVARIANTEN.....	64
E.1.6	SICHERSTELLUNG GLEICHER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZEN.....	64
E.2	FZD8-PROMOTORSTUDIEN IN HMSC, HT1080- UND HEK293-ZELLEN.....	65
E.2.1	FZD8-PROMOTORSTUDIEN IN HT1080-ZELLEN.....	66
E.2.1.1	Transfektion 5'-terminal-trunkierter Promotorvarianten.....	66
E.2.1.2	Transfektion 3'-terminal und beidseitig trunkierter Promotorvarianten.....	68
E.2.2	FZD8-PROMOTORSTUDIEN IN HMSC.....	69
E.2.2.1	Transfektion 5'-terminal-trunkierter Promotorvarianten.....	69
E.2.2.2	Transfektion 3'-terminal- und beidseitig trunkierter Promotorvarianten.....	70
E.2.3	FZD8-PROMOTORSTUDIEN IN HEK293-ZELLEN.....	71

E.2.4	ZUSAMMENFASSENDE ERGEBNISSE DER PROMOTORKARTIERUNG	72
E.3	EFFEKTE DES APC- UND B-CATENIN-KNOCKDOWNS AUF DIE FZD8-PROMOTORAKTIVITÄT	73
E.3.1	BESTIMMUNG DER SIRNA VERMITTELTE KNOCKDOWNEFFIZIENZEN VON APC- UND B-CATENIN IN HMSC UND HT1080-ZELLEN.....	73
E.3.2	FZD8-PROMOTORAKTIVITÄT UNTER B-CATENIN-KNOCKDOWN IN HT1080-ZELLEN	76
E.3.3	FZD8-PROMOTORAKTIVITÄT UNTER APC- UND B-CATENIN-KNOCKDOWN IN HMSC	76
E.4	IN SILICO-ANALYSE DES FZD8-PROMOTORS.....	79
E.5	ZF5 ALS PUTATIVER AKTIVATOR AM FZD8-PROMOTOR.....	80
E.5.1	ZF5-EXPRESSIONSVERGLEICH IN HMSC UND HT1080.....	80
E.5.2	ZF5 ALS POSITIVES WNT/B-CATENIN-ZIELGEN	80
E.5.2.1	<i>In silico</i> -Analyse der ZF5-Promotorregion.....	80
E.5.2.2	ZF5-Expression nach Wnt3a-Stimulation	81
E.5.2.3	ZF5-Expression nach APC- und β -Catenin-Knockdown.....	82
E.5.3	ÜBEREXPRESSION VON ZF5.....	83
E.5.3.1	Klonierung von pN3-ZF5	83
E.5.3.2	Effekte der ZF5-Überexpression auf die Fzd8-Expression	84
E.5.3.3	Effekt der ZF5-Überexpression auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg.....	85
F	DISKUSSION.....	86
F.1	STRUKTURELLE ASPEKTE DER FZD8-PROMOTORREGION	86
F.2	REPORTERGENVERSUCHE MIT DEM FZD8-PROMOTOR.....	89
F.2.1	KLONIERUNG DES FZD8-PROMOTORS UND VERKÜRZTER VARIANTEN.....	89
F.2.2	ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DES pGLUCBASIC-FZD8PROMOTORS	90
F.2.3	ÜBERPRÜFUNG DER VOLLSTÄNDIGKEIT DER PUTATIVEN PROMOTORREGION	90
F.2.4	SICHERSTELLUNG GLEICHER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZEN	90
F.2.5	FZD8-PROMOTORSTUDIEN IN HMSC, HT1080- UND HEK293-ZELLEN	91
F.2.6	DAS PUTATIVE FZD8-ENHANCER-ELEMENT.....	92
F.3	REGULATION DER FZD8-EXPRESSION DURCH DEN WNT/B-CATENIN-SIGNALWEG	94
F.4	ZF5 ALS MÖGLICHER AKTIVATOR DES FZD8-PROMOTORS	96
F.4.1	ZF5 ALS POSITIVES WNT/B-CATENIN-ZIELGEN	97
F.4.2	ÜBEREXPRESSION VON ZF5: EFFEKTE AUF DIE FZD8-EXPRESSION UND DEN WNT/B-CATENIN-SIGNALWEG	97
G	RESÜMEE UND AUSBLICK.....	99
H	LITERATURVERZEICHNIS	101
I	DANKSAGUNG.....	115

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
α MEM	<i>alpha-modified eagle medium</i>
Amp	Ampicillin
APC	<i>adenomatous poliposis coli</i>
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
Bcl9	B-cell CLL
bp	Basenpaare
BRE	<i>B recognition element</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
β TrCP	<i>β-transducin-repeat containing protein</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK1 γ	Caseinkinase 1 gamma
CMV	Cytomegalievirus
CpG-Insel	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Insel
CRD	<i>cysteine rich domain</i>
CTNNB1	β -Catenin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEP	<i>Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin domain</i>
DIX	<i>Dishevelled homologous domain</i>
DKK	Dickkopf
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Dsh	Drosophila <i>Dishevelled</i>
DTT	Dithiothreitol
Dvl	<i>Dishevelled</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EBV	Ebstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
f1 ori	f1 Phagen <i>origin of replication</i>
FBS	fetales bovines Serum
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
Fzd, DFzd, mFzd, rFzd	Frizzled, Drosophila/Maus/Ratte Frizzled
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 beta
HBV	Hepatitis B Virus
HEK-293	<i>human embryonic kidney cells-293</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HHV-8	humanes Herpesvirus 8
HIV	humanes Immunodefizienzvirus
HMG	<i>high mobility group</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HT1080	humane Fibrosarkomzellen
HTLV-I/II	humanes T-lymphotropes Virus I und II
HVC	Hepatitis C Virus
Int-1	<i>mouse mammary tumor virus integration site 1</i>
JNK	JUN N-terminale Kinase
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LEF	<i>lymohoid enhancer factor</i>
LNA	<i>locked nucleic acids</i>
LRP	<i>low density lipoprotein related protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT1-MMP	Membran Typ 1-Matrix Metalloproteinase
Neo	Neomycin

ori	<i>origin of replication</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>post synaptic density-95, discs large, zonula occludens-1-Protein</i>
Porc	<i>Porcupine-Protein</i>
PP2A	<i>Proteinphosphatase 2A</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RE	<i>Restriktionsenzym</i>
RGS	<i>regulator of G-protein signaling</i>
rhWnt	<i>rekombinantes humanes Wnt</i>
RLM-RACE	<i>RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA-ends</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
Ror2	<i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	<i>Reverse Transkriptase</i>
RT-PCR	<i>real time-polymerase chain reaction</i>
Ryk	<i>related to receptor tyrosine kinase-receptor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)</i>
sFRP	<i>secreted frizzled-related protein</i>
siRNA	<i>small interfering Ribonukleinsäure</i>
SMO	<i>Smoothened</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SOST	<i>Sclerostin</i>
Src	<i>Akronym aus sarcoma und cellular</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBST	<i>tris buffered saline with Tween-20</i>
TCF	<i>T-cell factor protein</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>
TLE	<i>transducin-like enhancer of split</i>
T _m	<i>Schmelztemperatur</i>

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	<i>transcriptional start site</i>
U	<i>Unit(s)</i>
UPL	<i>universal probe library</i>
Wg	<i>Wingless</i>
WIF	Wnt-inhibierender Faktor
Wnt	Akronym aus <i>Wingless</i> und Int-1
WRE	<i>wnt responsive element</i>
ZF5	Zinkfingerprotein 5

A Zusammenfassung

Der in der Evolution hochkonservierte Wnt-Signalweg spielt in der Embryonalentwicklung, der Stammzellbiologie sowie in der Entstehung von Tumoren eine tragende Rolle. Es werden dabei verschiedene Arten der Wnt-vermittelten Signalübertragung unterschieden: Einerseits der sogenannte kanonische, über β -Catenin vermittelte Wnt-Signalweg und andererseits der Wnt/ Ca^{2+} - sowie der *planar cell polarity* (PCP)-like-Weg, die beide die Signaltransduktion unabhängig von β -Catenin übermitteln.

Bislang sind die Mechanismen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges nur teilweise aufgeklärt, wobei insbesondere das Zusammenspiel von Wnts, Frizzleds und deren Korezeptoren auf funktioneller und struktureller Ebene bis heute nur rudimentär beschrieben wurden.

In unserer Arbeitsgruppe konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass der Frizzled-8-Rezeptor (Fzd8) in HT1080-Fibrosarkomzellen im Verhältnis zu den übrigen Fzds sehr stark exprimiert wird und seine erhöhte Expression mit einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges sowie mit einer erhöhten Invasivität und Proliferation assoziiert ist (Leitenstern et al., mündliche Mitteilung). Ferner wurde gezeigt, dass die Expression von Fzd8 durch Wnt3a bzw. den kanonischen Wnt-Signalweg negativ reguliert wird (Karow 2008; Kolben, Perobner et al. 2012).

Vor diesem Hintergrund sollte nun im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Reporterexperimenten die transkriptionelle Regulation von Fzd8 im Detail untersucht werden. Hierzu wurden die Fzd8-Promotorregion und verschiedene 5'- und 3'-terminale Verkürzungsvarianten in den Vektor pGLuc-Basic kloniert, der eine Quantifizierung der Promotoraktivität mittels des Reporterproteins Gaussia Luciferase erlaubt. Der Fzd8-Promotor konnte durch dieses Verfahren in aktivierende und repressive Elemente unterteilt werden, wobei auch ein putatives Enhancer-Element identifiziert werden konnte.

Unter Wnt3a-Stimulation zeigten alle untersuchten Promotorkonstrukte eine verringerte Reporterproteinaktivität, was auf eine negative Regulation von Fzd8 durch Wnt3a hinweist. Interessanterweise aber führten Manipulationen am Wnt/ β -Catenin-Signalweg weiter *downstream* zu entgegengesetzten Ergebnissen. So führte ein APC-Knockdown, der mit einer starken Aktivitätszunahme des Wnt/ β -Catenin-Signalweges einhergeht, zu einer Zunahme der

Fzd8-Promotoraktivität. Im Gegensatz hierzu ging ein Knockdown von β -Catenin, der einer Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges gleichkommt, mit einer verminderten Fzd8-Promotoraktivität einher. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wnt3a-vermittelte Repression von Fzd8 auch unabhängig vom kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg erfolgen könnte.

Des Weiteren wurde die Fzd8-Promotorregion einer *in silico*-Analyse mit der Software MatInspector unterzogen, um mögliche Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die für die Fzd8-Regulation maßgeblich sein könnten. Dabei zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor ZF5, der sowohl aktivierend als auch reprimierend an verschiedenen Promotoren wirken kann, aufgrund des Verteilungsmusters seiner Bindungsstellen am Fzd8-Promotor als möglicher Regulator fungieren könnte. ZF5 konnte dabei als putativ positives Wnt/ β -Catenin-Zielgen charakterisiert werden. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Fzd8 indirekt über ZF5 durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg induziert werden kann. Da ZF5 wie auch Fzd8 in HT1080-Fibrosarkomzellen stark exprimiert wird und die ZF5-Überexpression mit einer Zunahme des Wnt/ β -Catenin-Signals einhergeht, könnte hier ein positiver *feedback loop* vorliegen. Somit könnte diese Amplifikation des Wnt/ β -Catenin-Signals von maßgeblicher Bedeutung für die verstärkte Proliferation und Invasivität von mesodermalen Tumoren sein.

B Einleitung

B.1 Geschichte und Bedeutung der Wnt-Signalwege

Durch Wnt-Signalwege werden eine Vielzahl verschiedener Phänomene in Vertebraten gesteuert. Physiologisches *Wnt-Signaling* spielt in der Embryonalentwicklung, in der Selbsterneuerung von Stammzellen, in der Gewebshomöostase und auch in der Zelldifferenzierung in erwachsenen Lebewesen eine wichtige Rolle. Diese Erkenntnisse lassen bereits darauf schließen, dass aberrantes *Wnt-Signaling* zu verschiedenen schweren malignen oder degenerativen Krankheiten führen kann. Als Beispiele seien hier die familiäre Polyposis Coli (FAP), verursacht durch eine Mutation im APC-Gen (Kinzler, Nilbert et al. 1991) oder das metabolische Syndrom mit einer schweren Osteoporose aufgrund einer LRP6-Mutation (Mani, Radhakrishnan et al. 2007) genannt.

Zum ersten mal wurde das Proto-Onkogen Wnt1, das ursprünglich Int-1 genannt wurde und für ein zysteinreiches Protein kodiert, im Jahr 1982 beschrieben. Das Gen kann durch Integration des *mouse mammary tumor virus* aktiviert werden und wurde mit dem Auftreten von Brustkrebs in Mäusen assoziiert (Nusse and Varmus 1982). Später wurde festgestellt, dass das *Wingless*-Gen in der *Drosophila* homolog zu Int-1 ist (Cabrera, Alonso et al. 1987; Rijsewijk, Schuermann et al. 1987), weshalb die beiden Namen *Wingless* und Int-1 in einem Akronym zusammengeführt und fortan von Wnt1 gesprochen wurde (Nusse, Brown et al. 1991). In verschiedenen Studien in *Xenopus* und *Drosophila* konnten nach und nach weitere Elemente des *Wnt-Signalings* identifiziert werden (Noordermeer, Klingensmith et al. 1994) und erste Erkenntnisse über dessen Bedeutung in der Entwicklung von Vertebraten gesammelt werden (McMahon and Moon 1989). Mittels einer kombinierten Analyse dieser frühen Studien konnte sukzessiv der in der Evolution hochkonservierte kanonische Wnt-Signalweg identifiziert werden (Clevers and Nusse 2012), der seine Effekte über β -Catenin und die Familie der *T-cell factor / lymphoid enhancer-binding factor* (TCF/LEF) vermittelt.

Im menschlichen Genom sind 19 verschiedene Wnt-Gene lokalisiert, die für 19 entsprechende Wnt-Proteine kodieren. Schon in phylogenetisch sehr alten Organismen wie Seeanemonen und Süßwasserpolyphen lassen sich bereits verschiedene Wnts finden (Guder, Philipp et al. 2006). Nicht alle von ihnen wirken allein über den kanonischen β -Catenin-abhängigen Signalweg. Bisher wurde versucht, die verschiedenen Wnts je nach Signalvermittlung in „kanonische“ und „nicht-kanonische“ Wnts zu unterteilen. Die „kanonischen“ Wnts sind über die Akkumulation von β -Catenin (Shimizu, Julius et al. 1997) fähig, eine ektope Körperachse in *Xenopus* zu erzeugen (McMahon and Moon 1989) sowie C57MG Brustzellen der Maus in

Tumorzellen zu transformieren (Wong, Gavin et al. 1994). Den verschiedenen Wnt-Signalwegen wurden in der bisherigen Literatur meist unterschiedliche Funktionen zugesprochen. Der kanonische β -Catenin-abhängige Signalweg, der weiter unten im Detail erklärt wird, ist vor allem für die Steuerung von Zelldifferenzierung, Migration, Proliferation und Invasion verantwortlich (Neth, Ciccarella et al. 2006; Segditsas and Tomlinson 2006). Nichtkanonische Wnts sind bei der Initiation des PCP- und des Wnt/ Ca^{2+} -Signalweges beteiligt, wobei diese nicht eindeutig voneinander zu trennen sind.

Der Wnt/PCP-Signalweg (siehe Abbildung B-1) ist vor allem in *Xenopus* und *Drosophila* untersucht worden. Ihm kommt eine Bedeutung bei der Steuerung von Zellpolarität und gerichteter Zellmigration zu (Heisenberg, Tada et al. 2000). Hierbei bindet zunächst Wnt an Frizzled (Fzd), wobei das Signal nicht über β -Catenin transduziert, sondern durch das Zusammenspiel von Dishevelled (Dvl), Rho- und Rac-GTPasen sowie der JUN N-terminalen Kinase (Jnk) vermittelt wird (Habas, Kato et al. 2001; Habas, Dawid et al. 2003).

In manchen Fällen kann durch ein Wnt-Signal auch ein Ca^{2+} -Einstrom induziert werden. Über damit assoziierte Signaltransduktionsprozesse können sowohl transkriptionelle Effekte durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Dejmek, Saffholm et al. 2006) als auch eine Inhibition des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Ishitani, Kishida et al. 2003) vermittelt werden.

Wnts können außerdem an die Rezeptortyrosinkinase Ror2, die eine ähnliche Bindungsdomäne für Wnts wie Fzd besitzt (Xu and Nusse 1998), binden. Eine Überexpression von Ror2 führt dabei zu einer Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signals (Mikels and Nusse 2006); hingegen vermittelt Ror2 die Wnt5a-abhängige Aktivierung des Jnk-Signalweges, über den unter anderem die Zellausrichtung während der Morphogenese von *Xenopus* gesteuert wird (Unterseher, Hefele et al. 2004).

Ein weiterer Rezeptor für Wnts ist Ryk, ebenfalls eine Rezeptortyrosinkinase, die über eine *wnt inhibitory factor* (WIF)-Domäne Wnts binden kann (Patthy 2000). Diese Interaktion scheint vor allem in der neuronalen Entwicklung durch Induktion des Src-Proteins eine Rolle zu spielen (Zinovyeva, Yamamoto et al. 2008). Es wurde in humanen Zellen gezeigt, dass sich ein Komplex aus Wnt, Fzd und Ryk ausbilden kann, der zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signals führt (Lu, Yamamoto et al. 2004). Der Ryk-Rezeptor spielt wiederum auch im PCP-Signalweg eine tragende Rolle (Macheda, Sun et al. 2012).

Abbildung B-1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Modelle der Wnt-Signalwege.

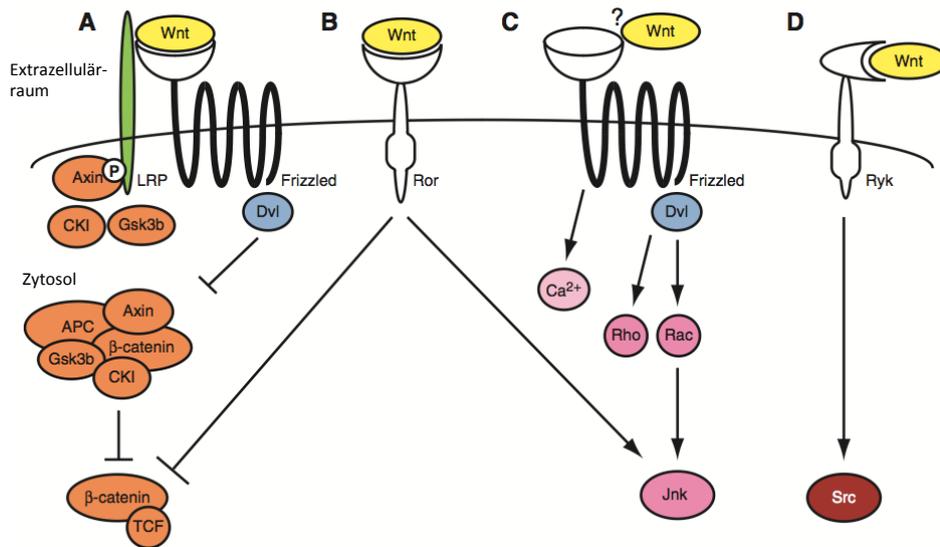


Abbildung B-1: Übersicht über die verschiedenen Wnt-Signalwege (modifiziert nach van Amerongen and Nusse 2009).

- A:** Schematische Darstellung des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweges
- B:** Transduktion des Wnt-Signals über die Rezeptortyrosinkinase Ror2
- C:** Der Wnt/PCP-Signalweg
- D:** Transduktion des Wnt-Signals über die Rezeptortyrosinkinase Ryk

CKI = Caseinkinase 1, Gsk3b = Gykogensynthasekinase-3-beta, Dvl = Dishevelled, APC = *adenomatous polyposis coli*, TCF = *T-cell factor*, JNK = JUN N-terminale Kinase, Src = nicht-Rezeptortyrosinkinase *Sarcoma*

Nach neueren Erkenntnissen muss die strikte Unterteilung der Wnts in kanonisch oder nicht-kanonisch jedoch in Frage gestellt werden. Sie stammt aus einer Zeit vor der Entdeckung der Fzd-Korezeptoren LRP 5 und 6 und der Wnt-Rezeptoren Ryk und Ror2. Mittlerweile konnte jedoch vielfach gezeigt werden, dass die Wirkung eines Wnts vielmehr vom jeweiligen Gewebe- und Rezeptorkontext abhängt (van Amerongen and Nusse 2009). Es wurde in diesem Zusammenhang nachgewiesen, dass zuvor als „kanonisch“ deklarierte Wnts auch über nicht-β-Catenin-abhängige Wege ihr Signal vermitteln können (Kuhl, Sheldahl et al. 2000) und umgekehrt, dass „nicht-kanonische“ Wnts wie zum Beispiel Wnt5a unter Umständen auch über β-Catenin-abhängige Wege wirken können (Mikels and Nusse 2006). Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass die verschiedenen Wnt-Signalwege nicht länger als linear bzw. parallel zueinander angesehen werden können, sondern vielmehr von komplexen *cross talks*-zwischen ihnen auszugehen ist, was die Wirkung eines bestimmten Wnts je nach Kontext sehr unterschiedlich ausfallen lassen kann (van Amerongen and Nusse 2009).

B.2 Extrazelluläre Wnt-Komponenten

B.2.1 Aktivatoren der Wnt-Signalwege: die Wnts

Den 19 Wnt-Proteinen, die in allen Säugetierearten konserviert sind sind sehr cysteinreich und weisen in etwa eine Größe von 40 kDa auf (Tanaka, Kitagawa et al. 2002). Zwischen den 22 konservierten Cysteinen werden Disulfidbrücken ausgebildet, die für eine korrekte Faltung der Proteine verantwortlich sind (Mikels and Nusse 2006). An ihrem N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid, über das ihr Transport in das endoplasmatische Retikulum bewerkstelligt wird, wo mehrere posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Lipidmodifikationen stattfinden.

Das erste Wnt, das isoliert und charakterisiert werden konnte, war Wnt3a (Willert, Brown et al. 2003). Tatsächlich hielt man Wnts wegen ihrer Aminosäurezusammensetzung zunächst für hydrophile Proteine, allerdings stellte man fest, dass sie durch die Lipidmodifikationen in ihrer Wasserlöslichkeit erheblich eingeschränkt sind und sie dadurch eine hohe Affinität zu Zellmembranen besitzen (Willert, Brown et al. 2003). Eine dieser Lipidmodifikationen von Wnt3a ist die Addition von Palmitoylsäure an ein N-terminales Cystein an Position 77, die für dessen Sekretion maßgeblich ist (Willert, Brown et al. 2003). Dieses Cystein ist auch in den anderen Wnts konserviert und dessen Palmitoylierung konnte auch an Wnt1, Wnt5a und *Drosophila Wingless* (Wg) gezeigt werden (Zhai, Chaturvedi et al. 2004; Galli, Barnes et al. 2007; Kurayoshi, Yamamoto et al. 2007). Eine zweite Lipidmodifikation konnte an Wnt3a an Serin 209 in Form einer Palmitinsäure-Addition identifiziert werden (Takada, Satomi et al. 2006). Auch diese Modifikation ist unter den Wnts hochkonserviert.

Mit der Acetyltransferase *Porcupine* (Porc) konnte in *Drosophila* zum ersten mal ein Protein identifiziert werden, das für die Lipidmodifikation an Wnts verantwortlich ist (van den Heuvel, Harryman-Samos et al. 1993; Hofmann 2000). Ein Funktionsverlust von *Porcupine* in *Drosophila* führte zur Akkumulation von Wg im endoplasmatischen Retikulum (Kadowaki, Wilder et al. 1996).

Eine weitere wichtige posttranslationale Modifikation der Wnts findet in Form von N-Glykosylierungen statt, was durch Studien unter Einsatz eines Glykosylierungsinhibitors gezeigt wurde (Smolich, McMahon et al. 1993). Allerdings ist bislang nicht klar, ob N-Glykosylierungen der Wnts für deren Sekretion notwendig sind (Mason, Kitajewski et al. 1992; Komekado, Yamamoto et al. 2007; Kurayoshi, Yamamoto et al. 2007). Studien an Wg und Wnt3a belegen zum Teil, dass *Porcupine* einen Knotenpunkt zwischen N-Glykosylierung und Lipidmodifikationen darstellt und sich die beiden Vorgänge wechselseitig beeinflussen können (Tanaka, Kitagawa et al. 2002; Komekado, Yamamoto et al. 2007).

Im Jahr 2006 konnte mit dem Transmembranprotein *Wntless* ein Molekül charakterisiert werden, das für die Sekretion von Wnts von größter Bedeutung ist (Banziger, Soldini et al. 2006). *Wntless* findet sich in den Membranen des Golgi-Apparates, der Plasmamembran und in Endosomen; in Abwesenheit von *Wntless* akkumuliert Wnt im Golgi-Apparat (Banziger, Soldini et al. 2006; Port, Kuster et al. 2008). Nach dem Transport der Wnts vom Golgi-Apparat zur Zellmembran wird *Wntless* über den Proteinkomplex *Retromer*, dem schon in früheren Studien eine Rolle im *Wnt-Signaling* zugeschrieben worden ist (Coudreuse, Roel et al. 2006; Prasad and Clark 2006), wieder endozytotisch in die Zelle aufgenommen und wiederverwertet (Belenkaya, Wu et al. 2008; Pan, Baum et al. 2008; Port, Kuster et al. 2008).

Allgemein werden Wnts als Morphogene betrachtet, die konzentrationsabhängig über größere Distanzen hinweg ihr Signal übertragen können, so wie es für Wg gezeigt worden ist. Allerdings scheint Wg hierbei auf eine Interaktion mit verschiedenen Lipoproteinen angewiesen zu sein (Zecca, Basler et al. 1996; Panakova, Sprong et al. 2005; Mulligan, Fuerer et al. 2012), die seinen Transport über größere Distanzen ermöglichen. Neuere Studien weisen darauf hin, dass es problematisch ist, Wnts als klassische Morphogene zu definieren, da sie in den meisten Geweben ihre Signale kontaktabhängig oder nur über sehr geringe Distanzen übertragen (Korkut, Ataman et al. 2009; Sato, van Es et al. 2011; Strand and Micchelli 2011).

B.2.2 Inhibitoren der Wnt-Signalwege: sFRPs, DKK, WIF und SOST

Es existieren verschiedene Proteinfamilien, die *Wnt-Signaling* inhibieren oder modulieren können. *Secreted frizzled-related proteins* (sFRPs) und das Wnt-inhibierende-Protein (WIF) können Wnt-Moleküle binden und auf diese Art sowohl Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg als auch auf nicht-kanonische Signalwege nehmen (Bovolenta, Esteve et al. 2008). Die sFRPs besitzen eine *cysteine rich domain* (CRD), die der CRD der Fzds sehr ähnlich ist und für die Bindung der Wnt-Liganden verantwortlich gemacht wird (Lin, Wang et al. 1997). sFRPs können allerdings auch agonistisch auf das *Wnt-Signaling* wirken (Uren, Reichsman et al. 2000), wobei der Mechanismus dabei noch nicht aufgedeckt wurde. Ihnen wird demnach eher eine modulatorische als eine rein antagonistische Wirkung zugeschrieben (Bovolenta, Esteve et al. 2008).

WIF hingegen hat strukturell keine Ähnlichkeit mit der CRD der Fzd-Rezeptoren, dafür aber mit einem Abschnitt des Ryk-Rezeptors, die dessen Wnt-Bindedomäne darstellt. WIF interagiert dabei mit den Palmitoylsäureresten der Wnts (Liepinsh, Banyai et al. 2006).

Spezifische Inhibitoren des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges hingegen stellen die Dickkopf- (DKK) und SOST-Proteine dar, die als Liganden bzw. Antagonisten von LRP5 und 6 fungieren (Mao, Wu et al. 2001; Semenov, Tamai et al. 2005). Zunächst wurde angenommen, dass eine DKK-vermittelte Inhibition des Wnt-Signals durch Internalisierung und anschließende Degradation von LRP6 erfolgt. Hierfür wird zusätzlich das Transmembranprotein Kremen (Krm) benötigt. (Mao, Wu et al. 2002). Andere Studien belegen aber, dass in Anwesenheit von DKK der Wnt-abhängige Komplex aus LRP6 und einem Fzd-Rezeptor zerfällt (Semenov, Tamai et al. 2001); Krm kommt in diesem Modell eine rein modulatorische Rolle zu (Ellwanger, Saito et al. 2008).

Die SOST-Gene, die für die Sclerostin-Proteine kodieren, haben eine ähnliche Rolle wie DKK in Bezug auf LRP5/6. Auch sie können einen Zerfall des Wnt-abhängigen Komplexes aus LRP5/6 und Fzd bewirken (Itasaki, Jones et al. 2003; Li, Zhang et al. 2005).

B.3 Elemente des kanonischen Wnt-Signalweges in der Zellmembran

B.3.1 Die Frizzled-Rezeptoren

Zur Familie der Frizzled-Rezeptoren (Fzds) in Säugetieren gehören laut Definition der *Union of Basic and Clinical Pharmacology* zehn Fzds, die alle im humanen Genom vorkommen und als für funktionelle Proteine kodierende Gene charakterisiert wurden (Wang, Samos et al. 1997; Sagara, Toda et al. 1998; Tokuhara, Hirai et al. 1998; Kirikoshi, Sagara et al. 1999; Koike, Takagi et al. 1999; Kirikoshi, Koike et al. 2000; Saitoh, Hirai et al. 2001; Saitoh, Hirai et al. 2001). Des Weiteren beinhaltet diese Familie den Rezeptor *Smoothed* (SMO) (Foord, Bonner et al. 2005); letzterer ist in der Weiterleitung des *Hedgehog*-Signals von Bedeutung (Wang, Inzunza et al. 2013). Die Größe der verschiedenen Fzds liegt zwischen ca. 500 AS (Fzd4) und 700 AS (Fzd6) (Wang, Liu et al. 2006).

Zur Namensgebung der Fzds trugen maßgeblich Experimente in *Drosophila* mit Mutationen in den Dfz1- und Dfz2-Genen bei, die mit einem Phänotyp mit irregulär angeordnetem und stark gekräuseltem Haar an Thorax, Beinen und Flügeln der Fliegen einhergingen. Der Phänotyp erweckte den Eindruck, als sei das Haar der Fliegen verbrannt (Vinson and Adler 1987; Chan, Karpf et al. 1992). Daher stammt der Name „*frizzled*“, der sich auf Deutsch mit „gekräuselt“ übersetzen lässt.

1996 wurde Dfz2 als Rezeptor für Wg beschrieben (Bhanot, Brink et al. 1996). Diese Interaktion führte zur Stabilisierung und Anreicherung von Armadillo, dem *Drosophila*-Ortholog zu

β -Catenin. So wurde der Zusammenhang von Fzds und Wnt/ β -Catenin-*Signaling* zum ersten mal gezeigt.

Homologieanalysen der Fzds ergaben, dass sie in ihrer Aminosäurezusammensetzung zwischen 20 % und 40 % identisch sind. Allerdings ist die Homologie innerhalb der vier Untergruppen beträchtlich höher: Fzd1, 2 und 7 besitzen eine Homologie von 75 %, Fzd5 und 8 von 70 %, während die Untergruppen von Fzd4, 9 und 10 und die von Fzd3 und 6 jeweils eine Homologie von 50 % aufweisen (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003). Abbildung B-2 gibt eine Übersicht über die einzelnen phylogenetisch verwandten Fzd-Untergruppen.

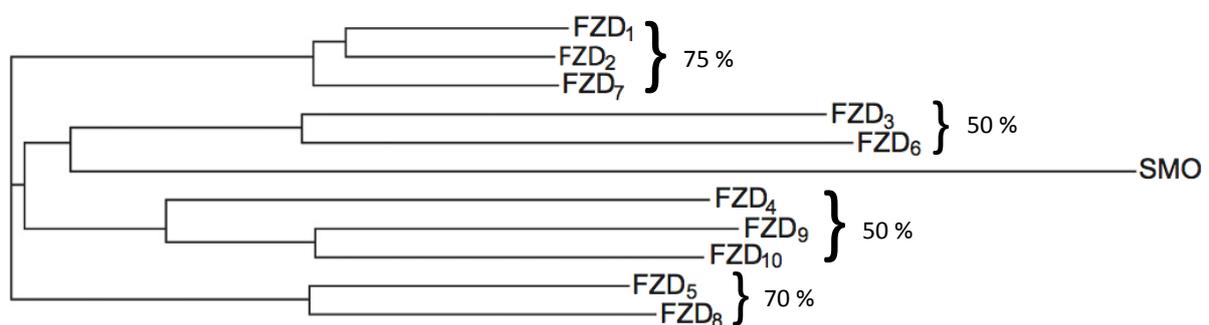


Abbildung B-2 Phylogenetischer Stammbaum der Fzd-Rezeptoren und SMO (modifiziert nach Schulte 2010).

Die Prozentangaben in der Abbildung geben die Aminosäuresequenzhomologie innerhalb einer Fzd-Untergruppe an.

Fzd-Proteine besitzen sieben hydrophobe Transmembrandomänen α -helikaler Sekundärstruktur, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus (Vinson and Adler 1987), was bereits durch einen Kyte-Doolittle Hydropathieplot vorhergesagt werden konnte (Kyte and Doolittle 1982). Diese Struktur erinnert an die von klassischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Pierce, Premont et al. 2002).

Allerdings unterscheiden sich die Fzds von diesen in einigen Eigenschaften, so dass man sie innerhalb dieser Klasse von Rezeptoren einer eigenen Familie zuordnete (Foord, Bonner et al. 2005). Abbildung B-3 gibt eine schematische Überblick über die Struktur eines Fzd-Rezeptors.

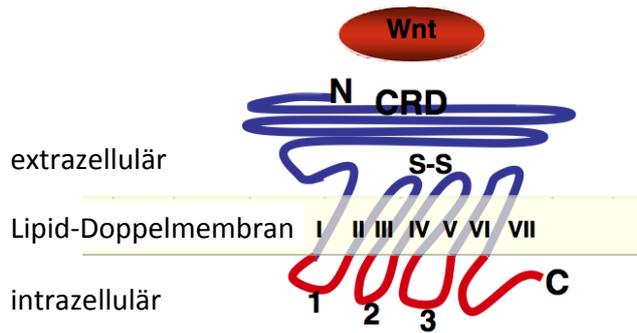


Abbildung B-3: Schematische Darstellung der Fzd-Struktur (modifiziert nach Wang, Liu et al. 2006).

Die Abbildung zeigt schematisch die N-terminale (N) extrazelluläre *cysteine rich domain* (CRD) des Frizzled-Rezeptors, die für die Bindung von Wnt-Liganden verantwortlich ist. Mit I-VII sind die Transmembrandomänen bezeichnet. Zwischen zwei extrazellulären Schleifen bildet sich eine Disulfidbrücke (S-S), die für die Funktionalität des Rezeptors von Bedeutung ist. Intrazellulär befinden sich der C-Terminus (C) und die Schleifen 1-3, die unter anderem durch die Interaktion mit G-Proteinen an der Signalweiterleitung beteiligt sind.

N-terminal besitzen die Fzds eine Signalsequenz, die für die richtige Prozessierung und Membranverankerung der Rezeptoren verantwortlich und ca. 40 Aminosäuren lang ist. Diesem Signalpeptid schließt sich die *cysteine rich domain* (CRD) an, die in allen Fzds hochkonserviert und für die Bindung von Wnts verantwortlich ist (Bhanot, Brink et al. 1996; Xu and Nusse 1998; Hsieh, Rattner et al. 1999). Sie umfasst etwa 120 Aminosäuren (Schulte 2010) und besitzt N-terminal zwei β -Faltblattstrukturen und C-terminal vier α -Helices, wie die Strukturanalyse der CRD von Fzd8 und sFRP ergeben hat (Dann, Hsieh et al. 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die CRD in Abhängigkeit der Konzentration Homodimere bilden kann. Ferner konnten in der CRD zehn Cysteine identifiziert werden, die in den Fzds aller Spezies hochkonserviert sind (Dann, Hsieh et al. 2001). Zwischen diesen Cysteinen bilden sich fünf Disulfidbrücken aus, die zur Ausbildung der richtigen Tertiärstruktur der CRD wichtig sind. N-terminal finden sich außerdem potentielle N-Glykosylierungsstellen (George, Ruoho et al. 1986), deren Mutation aber bisher mit keiner Veränderung der Rezeptoreigenschaften einherging (Dann, Hsieh et al. 2001).

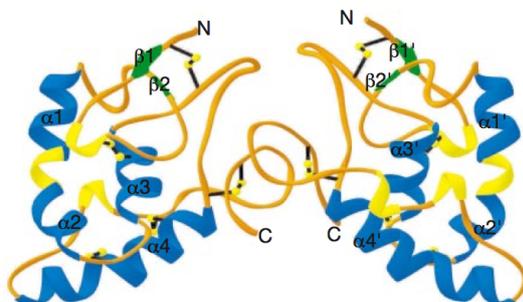


Abbildung B-4: Kristallstruktur des murinen Fzd8-CRD-Dimers (mFzd8CRD) (Dann, Hsieh et al. 2001).

In der Abbildung sind die vier α -Helices blau, die zwei β -Faltblattstrukturen grün und die Disulfidbrücken der CRD als schwarze Striche mit gelben Kugeln dargestellt.

Der CRD schließt sich in Richtung C-Terminus eine *linker*-Region variabler Länge an; danach kommen die Transmembrandomänen I-VII, die so angeordnet sind, dass sich drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen und ein C-Terminus von unterschiedlicher Länge ausbilden. In den extrazellulären Abschnitten der Transmembrandomänen III und IV befinden sich Cysteinreste, zwischen denen sich eine Disulfidbrücke ausbildet, die essenziell für die Funktionstüchtigkeit des Rezeptors ist (Moxham and Malbon 1985). Die Schleifen zwischen den Transmembrandomänen I und II, III und IV und zwischen V und VI (bezeichnet als i-Loop1 bis iLoop3) sowie der C-Terminus liegen intrazellulär. Durch Röntgenstrukturanalyse von Rhodopsin konnte darauf geschlossen werden, dass die Fzd-Domänen nicht linear angeordnet sind, sondern in einem Bündel zusammenliegen (Palczewski, Kumasaka et al. 2000). Für iLoop1 und 3 konnte eine aktivierende Rolle im Wnt/ β -Catenin-Signalweg nachgewiesen werden, iLoop2 hingegen scheint diesbezüglich keine Rolle zu spielen (Cong, Schweizer et al. 2004; Wang, Liu et al. 2006). Die iLoops in den Fzds sind weitgehend konserviert, allerdings findet man im C-Terminus zwischen den Fzds große Unterschiede. Größte Ähnlichkeit findet man in den ersten 25 Aminosäuren nach der siebten Transmembrandomäne. Dies legt nahe, dass Unterschiede in der Signalweiterleitung verschiedener Fzds durch Unterschiede in ihrem C-Terminus bedingt sein könnten (Wang, Liu et al. 2006).

Durch *in silico*-Analyse wurde die Interaktion von Fzds mit G-Proteinen der $G_{ai/o}$ -, G_{aq} - und G_{as} -Gruppen vorhergesagt (Moller, Vilo et al. 2001), was in *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten belegt werden konnte. Tatsächlich konnte für Fzd1 durch Einsatz von Pertussistoxin, das selektiv die Proteine der $G_{ai/o}$ -Gruppe hemmt, gezeigt werden, dass es einen inhibierenden Effekt auf das kanonische Wnt/ β -Catenin-Signal ausübt. Dabei wurde die Wnt3a-abhängige Ausbildung von primitivem Endoderm in *Xenopus*-Embryos gehemmt (Liu, DeCostanzo et al. 2001). Auch durch Knockdown-Experimente wurde die Rolle des G-Proteins G_{aq} als Aktivator im kanonischen Wnt-Signalweg belegt (Liu, DeCostanzo et al. 2001). Andere Studien zeigen wiederum, dass Pertussistoxin auch nicht-kanonisches Wnt-Signaling (vermittelt durch den Fzd2) hemmen kann (Liu, Liu et al. 1999; Ahumada, Slusarski et al. 2002). Auch diese Daten konnten durch Knockdown-Experimente gestützt werden, da Knockdown von G_{ao} und G_{at2} zu einer Inhibition des nicht-kanonischen Wnt-Signalings führte (Ahumada, Slusarski et al. 2002). In den meisten Studien wurde angenommen, dass die Interaktion von G-Proteinen und Fzds durch Dishevelled (Dvl) vermittelt sein muss. Durch eine *loss of function*-Mutation von Dvl konnte aber belegt werden, dass die Interaktion auch ohne dieses Molekül stattfindet. Von Katanaev et al. wurde daher postuliert, dass diese G-Proteine *upstream* von Dvl wirken müssen (Katanaev, Ponzielli et al. 2005).

Im C-Terminus der Fzd-Rezeptoren findet man das KTXXXW-Motiv, das durch eine Interaktion mit Dvl (Wong, Bourdelas et al. 2003; Kay and Kehoe 2004) für die Weiterleitung des Wnt/ β -Catenin-Signals notwendig ist (Umbhauer, Djiane et al. 2000). Punktmutationen in dieser Domäne in einem Fzd-Homolog von *C. elegans* bewirken eine Verminderung der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion (Rocheleau, Downs et al. 1997; Thorpe, Schlesinger et al. 1997; Sato, Kojima et al. 1999).

Am C-Terminus ist in einigen Fzds das Motiv Ser/Thr-X-X-X-Val lokalisiert, das ebenfalls eine Bindungsstelle für Proteine mit einer PDZ-Domäne wie Dvl darstellt (Kay and Kehoe 2004). Es ist in den Fzds 1, 2, 4, 5, 7, 8 und 10 erhalten, nicht aber in Fzd 3, 6 und 9.

B.3.2 *Low density lipoprotein related proteins* (LRP) 5/6 und Arrow: Fzd-Korezeptoren

LRP5/6 sowie das *Drosophila*-Ortholog Arrow stellen wichtige Fzd-Korezeptoren dar. In *Drosophila* wurde festgestellt, dass Arrow *loss of function*-Mutanten phänotypisch Wg-Mutanten ähnlich sind (Wehrli, Dougan et al. 2000). In *Xenopus* konnte hingegen in Versuchen gezeigt werden, dass eine Überexpression von LRP6 mit Aktivierung des Wnt/ β -catenin-Signalweges einhergeht (Tamai, Semenov et al. 2000). In der Maus konnte auch für LRP5 gezeigt werden, dass es eine aktivierende Rolle im Wnt/ β -catenin-Signaling spielt (Kelly, Pinson et al. 2004). Im Gegensatz zu den Fzds sind LRP5/6 und Arrow ausschließlich an der Weiterleitung des kanonischen Wnt-Signals beteiligt. Ein Einfluss von Arrow auf den PCP-Signalweg konnte ausgeschlossen werden (Wehrli, Dougan et al. 2000). Ferner konnte gezeigt werden, dass es unter Vermittlung von Wnt1 eine Interaktion zwischen der Fzd8-CRD der Maus und LRP5/6 gibt, die für die Signaltransduktion des kanonischen Wnt-Weges von Bedeutung ist (Tamai, Semenov et al. 2000; Semenov, Tamai et al. 2001).

LRP5 und 6 weisen zu 70 % Aminosäure-Identität auf, Arrow besitzt zu LRP5 und LRP6 jeweils 40 % Homologie (He, Semenov et al. 2004). Ihre Expression spielt eine wichtige Rolle während der Embryogenese (Dong, Lathrop et al. 1998; Hey, Twells et al. 1998; Pinson, Brennan et al. 2000). LRP6^{-/-}-Mäuse sterben noch vor der Geburt und zeigen Phänotypen, die denen von Wnt1-, Wnt3a- und Wnt7a-*loss of function*-Mausmutanten ähnlich sind (Pinson, Brennan et al. 2000). Die Embryogenese von LRP5^{-/-}-Mäusen verläuft hingegen normal, allerdings entwickeln sie in ihrem späteren Leben Osteoporose (Kato, Patel et al. 2002) sowie andere Stoffwechselerkrankungen wie z.B. erhöhtes Cholesterin und einen gestörten Glucosestoffwechsel (Fujino, Asaba et al. 2003; Magoori, Kang et al. 2003). Experimente mit LRP5^{-/-}

- und LRP6^{-/-}-Mäusen ergaben Hinweise auf eine zumindest partielle funktionelle Redundanz zwischen LRP5 und 6, da beide Rezeptoren zusammen für eine erfolgreiche Gastrulation notwendig sind (Kelly, Pinson et al. 2004).

LRP5/6 und Arrow stellen eine Unterfamilie der LDL-Rezeptoren (LDLR) dar. LRP5 des Menschen wurde durch seine Homologie zum LDLR entdeckt (Dong, Lathrop et al. 1998; Hey, Twells et al. 1998; Kim, Inagaki et al. 1998); LRP6 wiederum durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu LRP5 (Brown, Twells et al. 1998). LRP5/6 und Arrow sind Typ-I Transmembranproteine mit einer Transmembrandomäne. Sie besitzen eine Größe von ca. 1600 AS. Es wurde bisher mittels Koimmunopräzipitationsexperimenten gezeigt, dass LRP5/6 Wnt1, Wnt3a, Wnt4, Wnt9b und *Xenopus* Wnt8 binden können (Tamai, Semenov et al. 2000; Mao, Wu et al. 2001; Kato, Patel et al. 2002; Itasaki, Jones et al. 2003; Liu, Bafico et al. 2003; Bourhis, Tam et al. 2010). Die Affinität von Wnt an LRP5/6 war in allen Fällen aber geringer als die von Wnt zu Fzd-Rezeptoren (He, Semenov et al. 2004). Die extrazelluläre Domäne von LRP5/6 und Arrow, die den Großteil der Rezeptoren ausmacht, beinhaltet drei verschiedene Elemente (He, Semenov et al. 2004): vier β -Propeller-Domänen vom YWTD-Typ werden jeweils gefolgt von einer EGF (*epidermal growth factor*)-Domäne. Die β -Propeller-Domänen bilden eine propellerartige, sechsblättrige Struktur (siehe Abbildung B-5). Der dritte für LDL-Rezeptoren definierende Abschnitt ist eine LDLR (*low density lipoprotein receptor*)-Typ A-Domäne, die in dreifacher Wiederholung kurz vor der Transmembrandomäne vorliegt. Diese und auch die β -Propeller-EGF-Domänen sind als Bindungsstellen für Lipoproteine und damit auch für die lipidmodifizierten Wnts anzusehen (He, Semenov et al. 2004; Go and Mani 2012).

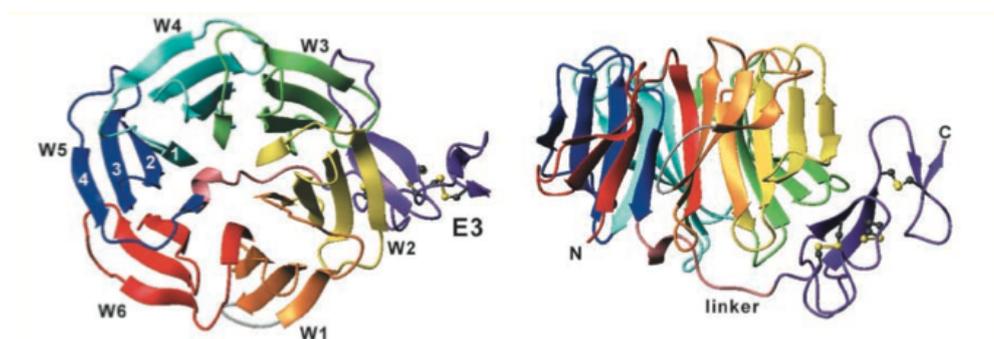
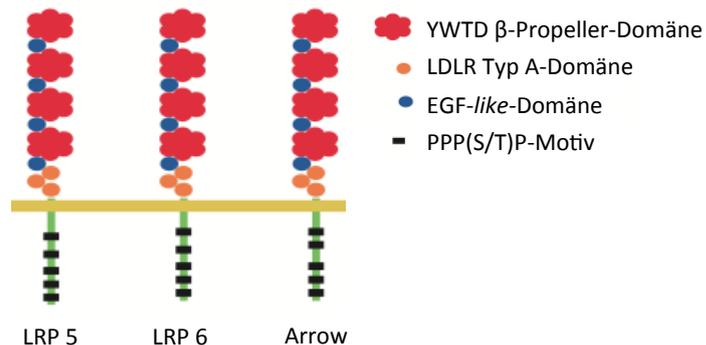


Abbildung B-5: 3D-Struktur der β -Propeller-Domänen (W1-W6) und der EGF-Domäne von LRP5/6 und Arrow (He, Semenov et al. 2004).

Auf der intrazellulären Seite besitzen LRP5/6 fünf PPP(S/T)P-Motive, die die Bindungsstelle für Axin bilden (Tamai, Zeng et al. 2004). Ohne intrazelluläre Domäne ist LRP6 inaktiv und

blockiert somit das kanonische Wnt-Signal (Tamai, Semenov et al. 2000). LRP-Mutanten, die dagegen nur den intrazellulären Abschnitt besitzen, führten zu konstitutiver Aktivierung des kanonischen Wnt-Signals in Säugetierzellen (Mao, Wu et al. 2001; Mao, Wang et al. 2001; Liu, Bafico et al. 2003) und in *Xenopus*-Embryos (Tamai, Zeng et al. 2004). Abbildung B-6 gibt eine schematische Übersicht über die verschiedenen intra- und extrazellulären Abschnitte von LRP5/6 und Arrow.

Abbildung B-6: Schematische Darstellung der extra- und intrazellulären Bereiche von LRP5/6 und Arrow (modifiziert nach He, Semenov et al. 2004).



Einige Studien weisen darauf hin, dass LRP6 nicht-kanonisches Wnt-Signaling *in vivo* antagonisieren kann. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass LRP6 als kompetitiver Rezeptor für Wnt-Liganden fungiert (Bryja, Andersson et al. 2009).

B.3.3 Transmission des kanonischen Wnt-Signals über die Zellmembran

Viele vorliegende Studien deuten an, dass Wnt die Ausbildung eines ternären Komplexes bestehend aus Fzd, LRP5/6 und Wnt induzieren kann (He, Semenov et al. 2004), der zur Initiation des kanonischen Wnt-Signals notwendig ist. Außer diesem ternären Komplex sind aber noch weitere Komponenten für die Signalübertragung über die Zellmembran notwendig.

Unter Wnt-Stimulation können LRP5/6 und Arrow innerhalb von wenigen Minuten Axin binden (Mao, Wang et al. 2001; Liu, Bafico et al. 2003; Tolwinski, Wehrli et al. 2003; Tamai, Zeng et al. 2004). Diese Bindungsfähigkeit von Axin an LRP5/6 ist dadurch bedingt, dass die PPP(S/T)P-Domäne im intrazellulären Abschnitt von LRP5/6 phosphoryliert wird (Tamai, Zeng et al. 2004), was durch GSK3 β vermittelt wird (Davidson, Wu et al. 2005; Zeng, Tamai et al. 2005). Durch die Bindung an LRP5/6 wird Axin an die Plasmamembran rekrutiert, was zum Zerfall des β -Catenin-Degradationskomplexes und zu einer Anreicherung von β -Catenin führt. Der Komplex aus Axin und GSK3 β , der sich nun an LRP5/6 gebunden findet, führt zu einer weiteren Phosphorylierung der PPP(S/T)P-Domäne (Huang and He 2008; Zeng, Huang et al. 2008).

Einen weiteren Faktor für die Wnt-abhängige Phosphorylierung von LRP5/6 stellt Fzd dar. Wird Fzd in räumliche Nähe zu LRP5/6 gebracht, erfolgt die Phosphorylierung von LRP5/6, was auch Wnt-unabhängig gezeigt werden konnte. Durch die Phosphorylierung kann die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signals initiiert werden (Zeng, Huang et al. 2008).

Ein weiterer intrazellulärer Interaktionspartner von Wnt, Fzd und LRP5/6 ist Dvl. Es wurde gezeigt, dass dieses Protein sowohl in der Transmission des kanonischen wie auch des nicht-kanonischen Wnt-Signalings von Bedeutung ist (Boutros, Paricio et al. 1998). Dvl kann über seine PDZ-Domäne direkt an den intrazellulären C-Terminus von Fzd binden und wird dadurch ebenfalls an die Zellmembran rekrutiert und oligomerisiert dort nach seiner Phosphorylierung (Chen, ten Berge et al. 2003; Wong, Bourdelas et al. 2003). Diese Reaktion wird durch G-Proteine vermittelt (Egger-Adam and Katanaev 2010). Tatsächlich ist auch die Interaktion von Dvl und Fzd von Bedeutung für eine weitere Phosphorylierung von LRP5/6 (Bilic, Huang et al. 2007; Zeng, Huang et al. 2008). Ferner wurde postuliert, dass Dvl zusammen mit Fzd dafür verantwortlich ist, dass Axin/GSK3 β unter Wnt-Stimulation an die Zellmembran rekrutiert wird (Cliffe, Hamada et al. 2003), was erst die Phosphorylierung von LRP5/6 und damit die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signals ermöglicht (Zeng, Huang et al. 2008). All diese Erkenntnisse lassen sich unter der Hypothese eines positiven *feedback loops* oder im sogenannten *initiation-amplification*-Modell zusammenfassen (MacDonald, Tamai et al. 2009): Axin/GSK3 β und Dvl sind notwendig für die erste Phosphorylierung von LRP5/6 (*initiation*) und phosphoryliertes LRP5/6 hat wiederum eine höhere Affinität zu Axin/GSK3 β , was zu einer weiteren Phosphorylierung und Verstärkung des kanonischen Wnt-Signals führt (*amplification*) (siehe Abbildung B-7 A).

Mit der zellmembranverankerten Caseinkinase 1 γ (CK1 γ) konnte ein Enzym identifiziert werden, das Wnt-abhängig eine Phosphorylierung von LRP5/6 außerhalb der PPP(S/T)P-Domäne in einem konservierten S/T-Cluster katalysiert (Davidson, Wu et al. 2005). Diese Phosphorylierung könnte ebenfalls ausschlaggebend für die Interaktion von LRP5/6 und GSK3 β sein bzw. sie erst möglich machen (Zeng, Tamai et al. 2005; Mi, Dolan et al. 2006).

Es wurde ferner gezeigt, dass sich unter Wnt-Stimulation Cluster aus mehreren Fzd/LRP5/6-Komplexen ausbilden können. Diese Cluster-Bildung ist abhängig von Dvl, Axin und GSK3 β (Bilic, Huang et al. 2007; Schwarz-Romond, Fiedler et al. 2007). Man spricht daher von der Ausbildung eines „Signalosoms“ (MacDonald, Tamai et al. 2009). Siehe auch Abbildung B-7 B.

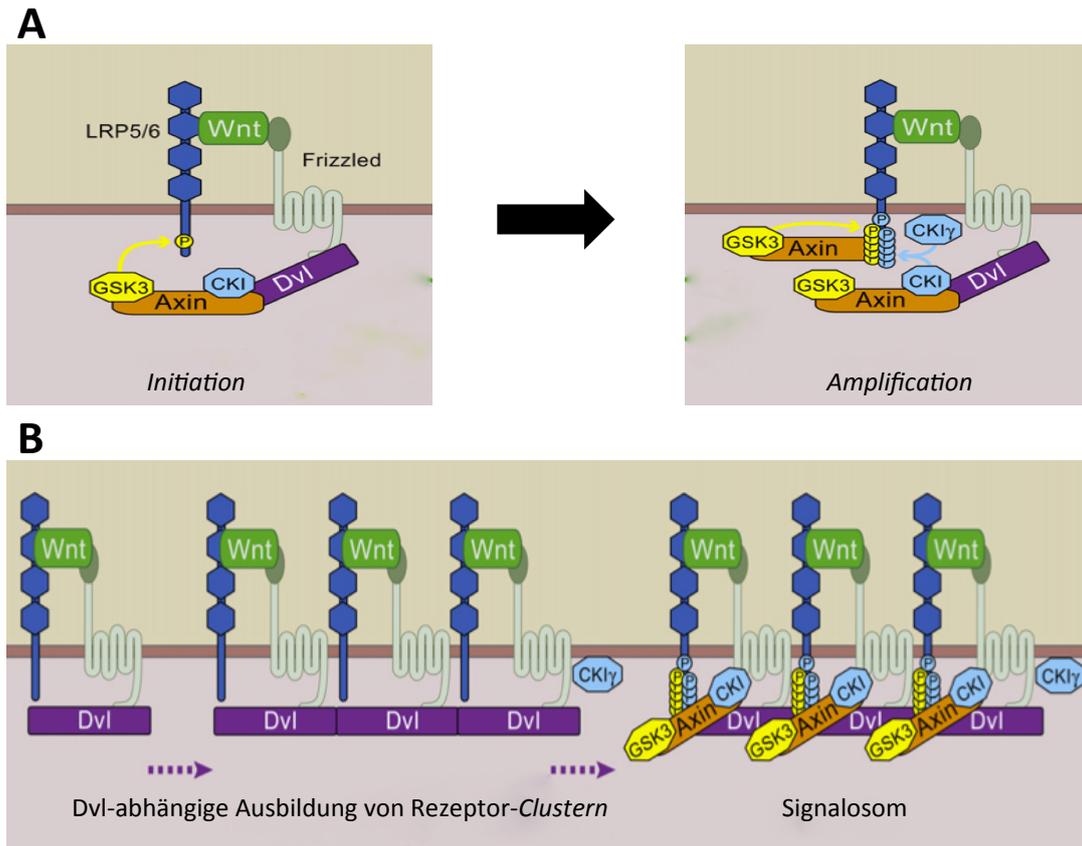


Abbildung B-7: Mechanismen des kanonischen Wnt-Signalweges an der Zellmembran (modifiziert nach MacDonald, Tamai et al. 2009).

A: Unter Wnt-Stimulation bildet sich ein Komplex aus Wnt, LRP5/6, Fzd und Dvl aus. Danach erfolgt Dvl-abhängig die Rekrutierung des Komplexes aus GSK3, Axin und CK1 an die Zellmembran, LRP5/6 wird innerhalb eines PPP(S/T)P-Motifs zum ersten mal phosphoryliert (*initiation*), das bahnt den Weg für weitere Phosphorylierungen durch Axin und GSK3 (*amplification*).

B: Durch die Fähigkeit von Dvl Oligomere auszubilden, kommt es zur Ausbildung von Aggregaten aus mehreren LRP5/6-Fzd-Wnt-Komplexen. Es bildet sich ein sogenanntes Signalosom aus, welches wiederum Axin/GSK3/CK1 an die Zellmembran rekrutieren kann.

CK1 = Caseinkinase 1, CK1 γ = Caseinkinase 1 γ , Dvl = Dishevelled, GSK3 = Glykogensynthasekinase 3 beta, LRP5/6 = *Low density lipoprotein related proteins 5/6*, P = Phosphatrest

B.4 Elemente des kanonischen Wnt-Signalweges im Zytosol

B.4.1 Dishevelled

Dvl spielt sowohl im kanonischen wie auch in nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen eine wichtige Rolle. Das zytoplasmatische Phosphoprotein hat direkt *downstream* der Fzds seinen Wirkungsort (Penton, Wodarz et al. 2002). Seinen Namen bekam Dvl, was sich auf Deutsch in etwa mit „ungekämmt“ übersetzen lässt, nach seiner Entdeckung in *Drosophila*. Mutationen in diesem Gen führten - ähnlich wie Fzd-Mutanten - zu unregelmäßiger Anordnung der Haare auf Körper und Flügeln der Fliegen (Wallingford and Habas 2005). Im menschlichen

Genom finden sich drei verschiedene Dvl-Gene (Dvl 1-3) (Semenov and Snyder 1997), die funktionell partiell redundant sind (Dillman, Minor et al. 2013).

Dvl besitzt drei konservierte Domänen: ein N-terminales DIX (Dishevelled und Axin)-Motif, die zentral gelegene PDZ (*post synaptic density-95, discs large und zonula occludens-1*)-Domäne und eine C-terminale DEP (Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin)-Domäne (Penton, Wodarz et al. 2002; Gao and Chen 2010). Dvl besteht in etwa zu 15 % aus Serin- und Threonin-Resten, von denen viele phosphoryliert sind (Dillman, Minor et al. 2013), allerdings ist die funktionelle Relevanz dieser Phosphorylierungsmuster bisher nicht endgültig geklärt (Yanfeng, Berhane et al. 2011). Über die DIX-Domäne kann Dvl zusammen mit Axin, das die gleiche Domäne besitzt, oligomerisieren (Wharton 2003; Schwarz-Romond, Fiedler et al. 2007). Das bereits beschriebene *Clustering* von Wnt-Rezeptorkomplexen ist ebenfalls abhängig von der DIX-Domäne (Bilic, Huang et al. 2007; Schwarz-Romond, Fiedler et al. 2007). Über die PDZ-Domäne bindet Dvl an Fzd (Wong, Bourdelas et al. 2003). Diesen beiden Domänen kommt eine aktivierende Rolle im kanonischen Wnt-Signalweg zu. Die Funktion der DEP-Domäne ist nicht abschließend geklärt, aber es wird diskutiert, dass Dvl über diese mit Lipidmolekülen in der Zellmembran interagieren kann (Simons, Gault et al. 2009). Durch verschiedene Kinasen (CK1, 2 und PAR-1) kann Dvl phosphoryliert werden, dies spielt ebenfalls eine Rolle in der Transduktion des kanonischen Wnt-Signals (Gao and Chen 2010). Dvl kommt im kanonischen Wnt-Signaling eine aktivierende Rolle zu, da es für die Wnt-abhängige Phosphorylierung von LRP5/6 notwendig ist (Bilic, Huang et al. 2007; Zeng, Huang et al. 2008). Zudem ist es für die Rekrutierung von Axin-GSK3 β an die Zellmembran zuständig (Cliffe, Hamada et al. 2003).

B.4.2 Axin

Im menschlichen Genom finden sich zwei Axin-Gene, die für zwei unterschiedliche Proteine (Axin-1 und -2) kodieren, welche aber funktionell eine ausgeprägte Redundanz aufweisen. Axin bildet das Zentrum des β -Catenin-Degradationskomplexes, an das die anderen Komponenten über unterschiedliche Domänen binden können. Da in Zellen nur eine sehr geringe Konzentration von Axin vorhanden ist, ist es denkbar, dass die Anzahl der Degradationskomplexe durch die Axin-Konzentration limitiert wird (Lee, Salic et al. 2003). Damit kommt Axin eine zentrale Rolle in der Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges zu. Es koordiniert die Abfolge der Phosphorylierungsschritte von β -Catenin (Kimelman and Xu 2006), was für die Regulation von dessen weiterer Ubiquitinierung von zentraler Bedeutung ist. Axin besitzt weiterhin eine RGS (*regulator of G-protein signaling*)-Domäne, über die es mit APC intera-

giert (Kimelman and Xu 2006). Wie auch bei Dvl finden sich im Axinprotein mehrere Domänen, über die es Homo- oder Heterodimere ausbilden kann (Luo, Zou et al. 2005). Über die DIX-Domäne wird die Bildung von Axin-APC-Multimeren vermittelt (Schwarz-Romond, Fiedler et al. 2007).

B.4.3 *Adenomatous Poliposis Coli (APC)*

Das APC-Protein umfasst 2843 AS und sein gleichnamiges Gen ist in 80 % aller Darmkrebsarten mutiert (Kimelman and Xu 2006). Diese Mutation führt zu einer erhöhten Konzentrationen von β -Catenin, woraus auf die inhibierende Funktion von APC im kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg geschlossen werden kann (Rubinfeld, Souza et al. 1993). Überraschend ist die Feststellung, dass APC und Axin an β -Catenin um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Es wurde deshalb ein Modell entworfen, demzufolge APC bereits phosphoryliertes β -Catenin von Axin entfernt, damit dessen Bindungsstelle für das nächste β -Catenin-Molekül frei wird (Xing, Clements et al. 2003; Kimelman and Xu 2006). Zudem kommt APC auch eine Rolle im Transport von β -Catenin aus dem Nukleus zu (Kimelman and Xu 2006).

Einige Studien weisen darauf hin, dass es eine wechselseitige Kontrolle zwischen Axin und APC gibt, über die die Folgen eines Funktionsausfalls eines der beiden Proteine durch Konzentrationserhöhung des anderen zumindest partiell kompensiert werden können. Erste Hinweise für einen solchen Mechanismus deuten darauf hin, dass APC auch die Degradation von Axin einleiten kann (Lee, Salic et al. 2003; Takacs, Baird et al. 2008) und umgekehrt Axin mit der Degradation von APC zusammenhängt (Choi, Park et al. 2004). Im Falle einer Konzentrationsveränderung von APC könnten dadurch zu starke Auswirkungen auf die β -Catenin-Konzentration verhindert werden (Lee, Salic et al. 2003). Die APC-abhängige Degradation von Axin wird dabei durch die aminoternale Domäne von APC vermittelt (Takacs, Baird et al. 2008).

Dieses Modell deckt sich mit der Erkenntnis, dass in Darmkrebszellen von APC oft nur noch dieser aminoternale Abschnitt von APC funktionstüchtig ist (Kimelman and Xu 2006).

B.4.4 Kinasen, Phosphatasen und die E3-Ubiquitinligase β TrCP

Der Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3 β) kommt neben vielen anderen Funktionen in der Zelle eine duale Rolle im Wnt-Signalweg zu (siehe B.3.3). Es bindet an eine zentrale Stelle von Axin, indem ein kleiner Abschnitt dieses Proteins in eine hydrophobe Tasche im C-Terminus der GSK3 β greift (Dajani, Fraser et al. 2003). GSK3 β hat innerhalb des kanonischen Wnt-Signalweges vor allem die Rolle, β -Catenin zu phosphorylieren, wodurch dessen Ubiquitinierung und Abbau eingeleitet wird (Yost, Torres et al. 1996; Amit, Hatzubai et al.

2002). Studien deuten darauf hin, dass die Aktivität der GSK3 β durch Konformationsänderungen von Axin gehemmt werden kann (Hedgepeth, Deardorff et al. 1999). GSK3 β wiederum kann auch durch Phosphorylierungen die Interaktionseigenschaften von APC, Axin und β -Catenin beeinflussen und so modulierend in das kanonische Wnt-Signal eingreifen (Huang and He 2008).

Auch die Caseinkinase 1 (CK1) ist an Axin gebunden und erfüllt eine ähnliche Rolle wie die GSK3 β . Sie phosphoryliert β -Catenin initial an Serin 45, um weitere Phosphorylierungen durch die GSK3 β erst zu ermöglichen (Amit, Hatzubai et al. 2002; Liu, Li et al. 2002; Yanagawa, Matsuda et al. 2002). Ebenfalls gibt es Hinweise darauf, dass CK1, wie auch die GSK3 β , APC und Axin phosphorylieren kann (Tickenbrock, Kossmeier et al. 2003; Xing, Clements et al. 2003; Ha, Tonzuka et al. 2004).

Letztendlich bewirken also GSK3 β und CK1 eine Phosphorylierung von β -Catenin in dessen Serin- und Threonin-reicher Sequenz. Dies ermöglicht, dass der E3-Ubiquitinligasekomplex mittels des F-Box-Proteins β TrCP β -Catenin ubiquitinieren kann, wodurch dessen Abbau im Proteasom vermittelt wird (Stamos and Weis 2013).

B.4.5 β -Catenin

β -Catenin wird im Menschen durch das Gen CTNNB1 kodiert; das Ortholog in *Drosophila* wird Armadillo genannt. β -Catenin stellt ein zentrales Element im kanonischen Wnt-Signalweg dar. Das 781 AS umfassende Protein besitzt in seinem Zentrum zwölf Wiederholungen von drei Helices, die sogenannten *armadillo repeats* (Huber, Nelson et al. 1997). Dieser Abschnitt dient als Interaktionsstelle für viele andere Proteine wie Axin, APC und TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren (Graham, Weaver et al. 2000; Spink, Polakis et al. 2000; Xing, Clements et al. 2003; Ha, Tonzuka et al. 2004; Liu, Xing et al. 2006). Viele der Interaktionspartner binden an β -Catenin durch die gleichen beiden Lysinreste in den *armadillo repeats* 5 und 8 (Graham, Weaver et al. 2000). Die kurzen N- und C-terminalen Enden des Proteins scheinen hauptsächlich als Bindungsdomänen für weitere Transkriptionsfaktoren zu dienen (Kimelman and Xu 2006). Die Phosphorylierung von β -Catenin findet im Falle seiner Bindung an den Degradationskomplex am N-Terminus statt, an zwei Phosphorylierungsstellen kann es danach vom E3-Ubiquitinligasekomplex ubiquitiniert werden (Kikuchi, Kishida et al. 2006).

B.4.6 Transduktion des kanonischen Wnt-Signals im Zytosol

Wnt-OFF-Status:

Liegt kein stimulierendes Wnt-Signal vor, kann sich der β -Catenin-Destruktionskomplex bestehend aus Axin, APC, GSK3 β und CK1 ausbilden (Spink, Polakis et al. 2000; Liu, Li et al. 2002; Dajani, Fraser et al. 2003; Sobrado, Jedlicki et al. 2005). β -Catenin bindet zunächst an Axin über eine Bindungsstelle zwischen dem dritten und vierten *armadillo repeat* (Xing, Clements et al. 2003). Durch diese Bindung wird der Aminoterminus von β -Catenin in die Nähe der katalytischen Zentren von CK1 und GSK3 β gebracht. Nach Phosphorylierung von β -Catenin durch CK1 an Ser45, wird es abschließend durch GSK3 β an Thr41, Ser37 und Ser33 phosphoryliert (Amit, Hatzubai et al. 2002; Liu, Li et al. 2002; Yanagawa, Matsuda et al. 2002).

Ein durch Phosphorylierung aktivierter Abschnitt auf APC bindet an die β -Catenin *armadillo repeats* 3 und 4 (Ha, Tonzuka et al. 2004; Xing, Clements et al. 2004), die auch die Bindungsstelle für Axin darstellen. Phosphoryliertes APC weist im Vergleich zu seiner unphosphorylierten Variante eine ca. 140-fach höhere Affinität zu β -Catenin auf (Ha, Tonzuka et al. 2004; Xing, Clements et al. 2004; Liu, Xing et al. 2006). APC löst phosphoryliertes β -Catenin aus seiner Bindung an Axin heraus, wodurch weiteres β -Catenin an Axin binden kann (Xing, Clements et al. 2004). Phosphoryliertes β -Catenin wird danach durch den E3-Ubiquitinligasekomplex gebunden und an Lys49 und Lys19 ubiquitiniert (Liu, DeCostanzo et al. 2001; Wu, Xu et al. 2003). In dieser Form dissoziiert es vom Degradationskomplex und wird im Proteasom abgebaut (siehe Abbildung B-8 A).

Wnt-ON-Status:

Bindet Wnt an Fzd und LRP5/6, kommt es zu einer Phosphorylierung von LRP5/6 und Axin sowie GSK3 β werden an die Zellmembran rekrutiert (Cliffe, Hamada et al. 2003). Dadurch fehlt dem Degradationskomplex eine wichtige Stabilitätskomponente und er zerfällt. Die Konzentration von β -Catenin steigt nun intrazellulär an und in den Zellkern transferiert, wo es durch die Interaktion mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Expression von verschiedenen Genen nimmt (siehe Abbildung B-8 A).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wird ein alternatives Modell bzgl. der intrazellulären Regulation postuliert. Darin wird gezeigt, dass durch Wnt-Stimulation der gesamte Degradationskomplex an phosphoryliertes LRP5/6 rekrutiert wird. Der Destruktionskomplex phosphoryliert dort zwar weiterhin β -Catenin, allerdings findet keine Ubiquitinierung mehr statt, wodurch β -Catenin am Degradationskomplex gebunden bleibt, bis dessen Bindungsstellen

abgesättigt sind (siehe Abbildung B-8 B). Das verbleibende β -Catenin kann nun im Zytosol akkumulieren (Li, Ng et al. 2012). Auch den Wnt-OFF-Status skizziert diese Arbeit etwas anders, nämlich dass bereits ubiquitiniertes β -Catenin am Degradationskomplex gebunden bleibt und in dieser Form vom Proteasom abgebaut wird (Li, Ng et al. 2012).

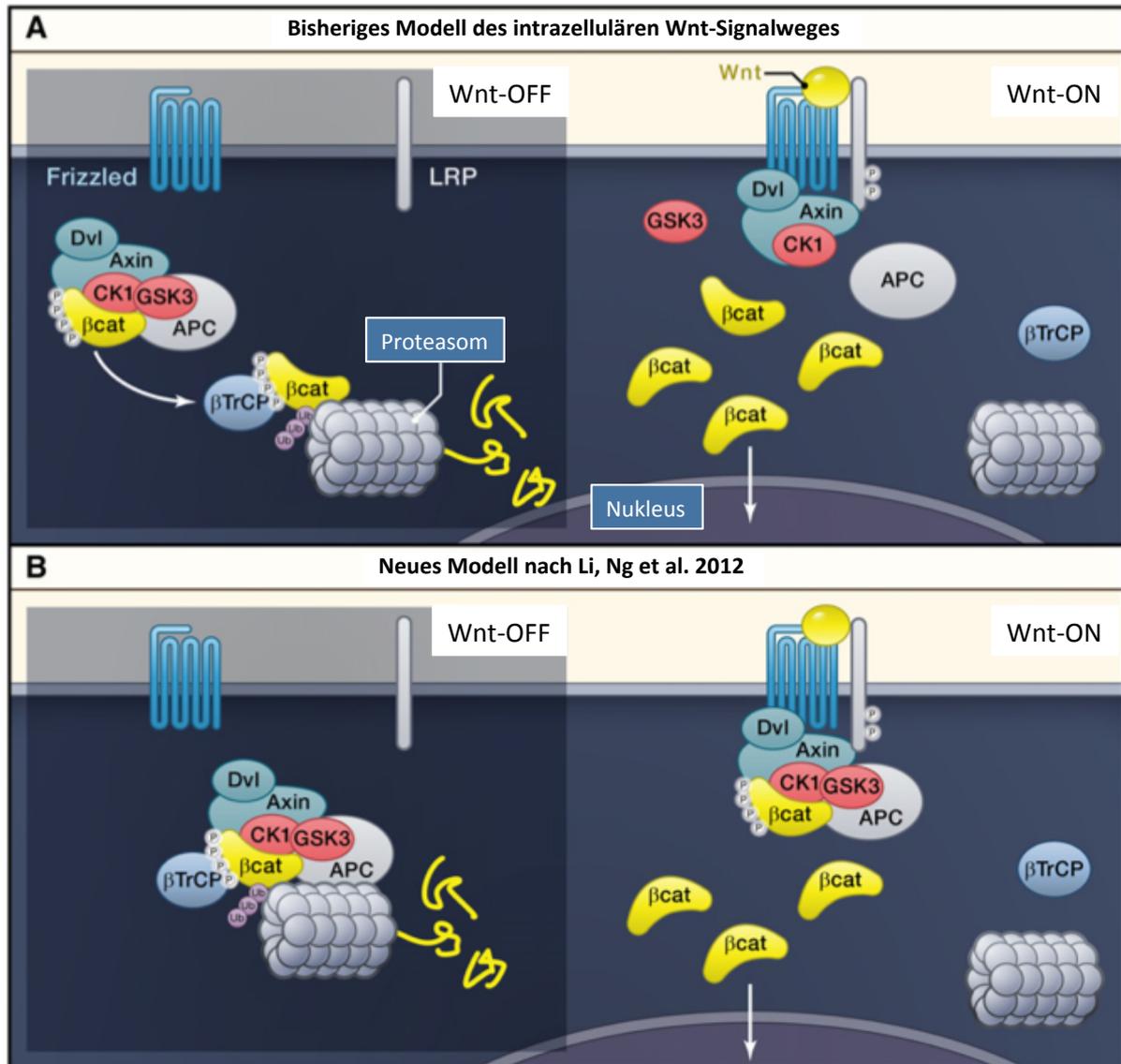


Abbildung B-8: Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges im Zytosol: altes (A) und neues (B) Modell (modifiziert nach Clevers and Nusse 2012).

Das neue Modell postuliert, dass im Wnt-ON-Status der Degradationskomplex nicht zerfällt, sondern vielmehr komplett an die Zellmembran rekrutiert wird, wo er zwar weiteres β -Catenin bis zur Absättigung bindet, aber nicht ubiquitiniert. Verbleibendes β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma.

Im Wnt-OFF-Status dissoziiert ubiquitiniertes β -Catenin nicht vom Degradationskomplex, sondern wird an den Komplex gebunden dem Proteasom zugeführt.

APC = *adenomatous poliposis coli*-Protein, CK1 = Caseinkinase 1, Dvl = Dishevelled, GSK3 = Glykogensynthasekinase 3 beta, LRP = *low density lipoprotein related protein*, P = Phosphatrest, Ub = Ubiquitin, β cat = β -Catenin, β TrCP = *β -transducin-repeat containing protein*

B.5 Transduktion des kanonischen Wnt-Signals im Nukleus

B.5.1 Transport von β -Catenin in den Nukleus

Der Mechanismus, der den Transport von β -Catenin in den Nukleus vermittelt, ist nicht endgültig aufgeklärt; es existieren hierzu verschiedene Theorien. Henderson und Fagotto postulierten, dass β -Catenin direkt mit den Porenkomplexen des Nukleus interagieren kann (Henderson and Fagotto 2002). Der Export von β -Catenin aus dem Nukleus wird in dieser Arbeit als APC- und Axin-abhängig beschrieben (Henderson and Fagotto 2002; Cong, Schweizer et al. 2004). Eine neuere Studie zeigt, dass die Akkumulation von β -Catenin alleine nicht ausreichend für dessen Transport in den Nukleus ist, sondern dies vor allem von einer Aktivierung der Rac1-GTPase abhängig ist (Wu, Tu et al. 2008). Wu et al. konnten hierbei zeigen, dass β -Catenin, Rac1 und JNK einen Komplex bilden und dieser über die Membran des Nukleus transportiert wird. Diese Studie deutet an, dass eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges auch von parallel ablaufendem nicht-kanonischen Wnt-*Signaling* abhängen könnte. In weiteren Arbeiten wurden auch andere Funktionen von Rac1 beschrieben, unter anderem dass es auch Bestandteil des Transkriptionskomplexes aus TCF und β -Catenin sein kann. Auch eine Funktion als Antagonist des Degradationskomplexes wird diskutiert (Esufali and Bapat 2004; Schlessinger, Hall et al. 2009). Eine neuere Studie hat Hinweise darauf gefunden, dass der Transport von β -Catenin in den Nukleus aktiv erfolgt und durch Mikrotubuli geleitet wird (Sugioka, Mizumoto et al. 2011).

B.5.2 Interaktion von β -Catenin mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF

Im Nukleus interagiert β -Catenin mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (Arce, Yokoyama et al. 2006; Hoppler and Kavanagh 2007), die in Abwesenheit von β -Catenin mit *Drosophila* Groucho (im Menschen homolog dazu *transducin-like enhancer of split*, kurz TLE) interagieren, was zu repressiven Effekten an den entsprechenden Genen führt, denn Groucho/TLE wirkt deacetylierend auf Histone und verdichtet so die Chromatinstruktur (Cavallo, Cox et al. 1998; Billin, Thirlwell et al. 2000). β -Catenin aber kann Groucho an TCF ersetzen (Daniels and Weis 2005), dies ändert die Struktur von TCF, wodurch es zur Transkriptionsaktivierung kommt.

Im menschlichen Genom existieren vier verschiedene TCF-Gene (TCF1-4). Darüber hinaus führt alternatives *Splicing* zu einer großen Vielfalt innerhalb der Gruppe dieser Proteine, die wiederum unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können (Arce, Yokoyama et al. 2006; Hoppler and Kavanagh 2007). LEF1 hat meist aktivierende Funktionen, TCF1 und TCF4 können sowohl aktivierend als auch repressiv wirken, während TCF3 hauptsächlich repressiv

ve Eigenschaften zugeschrieben werden (Arce, Yokoyama et al. 2006; Hoppler and Kavanagh 2007). TCFs gehören zur Familie der *high mobility group* (HMG)-Proteine. Deren Bindung kann zu starken Biegungen (*bending*) der entsprechenden DNA-Sequenz führen. Hierbei interagieren sie mit sogenannten *wnt responsive elements* (WRE) mit der Konsensussequenz 5'-A(A/T)CAA(A/T)G-3' (van Beest, Dooijes et al. 2000). Durch diese Strukturveränderung der DNA können Interaktionsstellen für diverse Koaktivatoren wie z.B. Pygopus, Legless oder Bcl9 zugänglich werden (Giese, Cox et al. 1992). Diese Koaktivatoren bewirken durch Acetylierung der Histone eine Dekondensierung der Chromatinstruktur, wodurch die Initiierung der Transkription gefördert wird (Hecht, Vleminckx et al. 2000; Belenkaya, Han et al. 2002).

B.5.3 Zielgene und Selbstregulation des Wnt-Signalweges

Dem kanonischen Wnt-Signalweg kommen sehr unterschiedliche Aufgaben in der Steuerung von Zellproliferation, -migration und -differenzierung bzw. der Gewebekomöostase zu, was u.a. durch die Vielzahl verschiedener Wnt-Zielgene bedingt ist (Vlad, Rohrs et al. 2008). Typische direkte Wnt-Zielgene zeichnen sich dadurch aus, dass sie TCF/LEF-Konsensussequenzen in ihren Promotorregionen tragen, die für deren Transkriptionsregulation von Bedeutung sind. Man muss aber darüber Hinaus auch von einer Vielzahl von indirekten Wnt-Zielgenen ausgehen, die nach Wnt-abhängiger Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Absolute Aussagen über Wnt-Targetgene lassen sich kaum treffen, denn der Effekt des kanonischen Wnt-Signals ist meist Zell- und Kontextabhängig (Logan and Nusse 2004). Der kanonische Wnt-Signalweg reguliert sich über die Transkriptionssteuerung einiger seiner Komponenten durch negative *feedback loops* selbst. Durch *Wnt-Signaling* können zum Beispiel Axin2 oder DKK1 induziert, LRP6 hingegen reprimiert werden (Logan and Nusse 2004). Auf der anderen Seite kann es auch zu positiven *feedback loops* kommen, z.B. durch die Wnt-abhängige Induktion von TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren (Arce, Yokoyama et al. 2006; Hoppler and Kavanagh 2007), die auch bei der Entstehung von verschiedenen Tumoren beteiligt sind.

B.6 Physiologisches und aberrantes Wnt/ β -Catenin-Signaling

B.6.1 Stammzellselbsterneuerung

Stammzellen zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, sich selbst zu erneuern und sich in spezialisierte Zellen zu differenzieren. Diese Vorgänge werden neben intrinsischen Faktoren maßgeblich von extrinsischen Signalen gesteuert, die von Zellen in der Stammzellnische vermittelt werden (Losick, Morris et al. 2011). Als eines dieser Signale konnte der Wnt/ β -Catenin-Signalweg identifiziert werden. Zum ersten mal fand man einen Zusammenhang zwischen Wnt-Signaling und Stammzellerneuerung, als man feststellte, dass Mutationen in TCF4 der Maus zu einem Totalverlust von Stammzellen im Gastrointestinaltrakt führt (Korinek, Barker et al. 1998). Auch in Haarfollikeln spielt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in der Regulation von Stammzellen eine tragende Rolle (DasGupta and Fuchs 1999). Eine Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch Überexpression von DKK ging dabei mit dem Verlust von Haarfollikeln und Brustdrüsen einher (Andl, Reddy et al. 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von hämatopoetischen Stammzellen durch Überexpression von Axin abnimmt (Reya, Duncan et al. 2003; Reya and Clevers 2005). Umgekehrt geht eine Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit einer Zunahme der Anzahl von Stammzellen in Haarfollikeln sowie im hämatopoetischen System einher (Gat, DasGupta et al. 1998). In der Zellkultur macht man sich diese Erkenntnisse zur einfacheren Kultivierung von Stammzellen zu Nutze, indem man dem Medium Wnts zusetzt (Zeng and Nusse 2010; Sato, van Es et al. 2011; ten Berge, Kurek et al. 2011). Bis heute ist allerdings unklar, wie genau das Wnt-Signaling dazu beiträgt, dass sich Stammzellen selbst erneuern. Eine Hypothese hierzu besagt, dass durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs die Expression bestimmter, zur Differenzierung notwendiger Gene supprimiert wird (Clevers and Nusse 2012).

B.6.2 Benigne Erkrankungen

Gong et al. konnten 2001 einen Zusammenhang von Wnt-Signaling und der Knochendichte nachweisen, als man eine LRP5-*loss-of-function*-Mutation in Patienten mit Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom feststellte (Gong, Slee et al. 2001). Analog dazu findet sich in Patienten mit autosomal-dominant vererbt erhöhter Knochendichte eine *gain-of-function*-Mutation von LRP5 (Boyden, Mao et al. 2002; Little, Recker et al. 2002), die dazu führt, dass LRP5 die Wnt-Antagonisten SOST (Ellies, Viviano et al. 2006) und DKK1 (Ai, Holmen et al. 2005) nicht mehr binden kann. Ferner konnte durch den therapeutischen Einsatz von Antikörpern gegen SOST und sFRP1 in Tierexperimenten eine Zunahme der Knochendichte erreicht werden (Bodine, Stauffer et al. 2009).

Darüber hinaus konnten Mutationen in LRP6 mit atherosklerotischen Erkrankungsbildern assoziiert werden (Mani, Radhakrishnan et al. 2007). Zudem scheinen auch bestimmte Formen des Typ II Diabetes mit Mutationen in TCF7L2, einem Transkriptionsfaktor im Wnt-Signalweg, in Zusammenhang zu stehen (Grant, Thorleifsson et al. 2006).

Auch auf dem Gebiet der Neurologie und Psychiatrie stellte sich die Wnt-Signalwegforschung in den letzten Jahren als interessantes Feld heraus. So konnte nicht nur ein Zusammenhang von Wnt-*Signaling* mit der neuronalen Entwicklung gezeigt werden (Hur and Zhou 2010), sondern auch seine Bedeutung in der Entstehung von Krankheiten wie Morbus Alzheimer und Schizophrenie (Lovestone, Killick et al. 2007; da Cruz e Silva, Henriques et al. 2010; Ren, Rizavi et al. 2012).

B.6.3 Maligne Erkrankungen

Analog zu einem verminderten Wnt-*Signaling* in degenerativen Krankheiten geht eine ungehemmte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges oft mit malignen Erkrankungen einher. Bereits 1991 konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit Familiärer Adenomatöser Polyposis Coli (FAP) eine heterozygote Mutation im APC-Gen tragen (Kinzler, Nilbert et al. 1991; Nishisho, Nakamura et al. 1991), die mit dessen Aktivitätsverlust einhergeht. Später wurde festgestellt, dass bis zu 80 % aller sporadisch auftretenden Darmkrebserkrankungen mit APC-Mutationen assoziiert sind (Kinzler and Vogelstein 1996; Wood, Parsons et al. 2007). Auch Mutationen von Axin (Lammi, Arte et al. 2004) oder TCF4 (Bass, Lawrence et al. 2011) können zur Entstehung von Darmkrebs führen.

Karzinome im Gastrointestinaltrakt stellen allerdings bei weitem nicht die einzigen Tumorentitäten dar, die mit fehlreguliertem Wnt-*Signaling* in Zusammenhang gebracht wurden. Auch in hepatozellulären Karzinomen (HCC) (Rubinfeld, Robbins et al. 1997), Tumoren der Haut und in vielen weiteren Tumoren ließen sich Mutationen in Komponenten des Wnt-Signalweges finden (Reya and Clevers 2005).

B.6.4 Therapeutische Aspekte

Zahlreiche Arbeitsgruppen befassen sich schon seit Jahren mit dem Thema der gezielten Manipulation des Wnt-Signalweges durch *small molecule compounds* um neue Therapieoptionen in der Behandlung von Krebserkrankungen zu finden. Eine der ersten Ideen auf diesem Gebiet war es, die Interaktion von β -Catenin und TCF/LEF zu unterbinden; da diese Komponenten sehr weit *downstream* im kanonischen Wnt-Signalweg lokalisiert sind, stellen sie ein hochspezifisches Ziel für dort modulierend wirkende therapeutische Substanzen dar (Clevers and Nusse 2012). Bis heute konnte allerdings kein Wirkstoff identifiziert werden, der dies mit

bewiesener Spezifität und Effizienz gewährleisten kann. Obwohl mit PKF115-854 und CGP049090 zwei vielversprechende Substanzen zur Verfügung stehen (Lepourcelet, Chen et al. 2004), sind auch diese bislang nicht in klinischen Studien getestet worden.

Weiter *upstream* im Signalweg stellt Axin ein interessantes Ziel für künftige Therapien dar. Durch Hemmung des Enzyms *Tankyrase* durch Substanzen wie IWR (Lu, Ma et al. 2009) und XAV939 (Huang, Mishina et al. 2009) kann die intrazelluläre Konzentration von Axin erhöht werden; auch hier existieren jedoch bisher keine klinischen Studien.

In einem anderen Ansatz wurde durch die Hemmung von *Porcupine* mittels IWP2 die Sekretion von Wnts inhibiert (Lu, Ma et al. 2009). Ohne die durch *Porcupine* vermittelte Lipidmodifizierung kam es zu einer intrazellulären Akkumulation der Wnt-Moleküle. IWP2 wurde bisher nur in Zellkulturexperimenten mit Erfolg angewandt (Sato, van Es et al. 2011; ten Berge, Kurek et al. 2011). Aufgrund ihrer Hydrophobizität, erscheint es momentan nicht möglich, IWP2 *in vivo* einzusetzen.

C Zielsetzung und Fragestellung

In unserer Arbeitsgruppe wurde in HT1080-Zellen eine erhöhte Expression von Fzd8 nachgewiesen und seine grundlegende Rolle im Invasions- und Proliferationsverhalten von Tumorzellen belegt (Leitenstern et al., mündliche Mitteilung). Zudem war bekannt, dass Fzd8 durch Wnt3a negativ reguliert wird (Karow 2008), wodurch es als putativ negatives Wnt/ β -Catenin-Zielgen betrachtet werden kann (Karow 2008; Kolben 2010; Kolben, Perobner et al. 2012).

In dieser Arbeit sollte deswegen die Expressionsregulation von Fzd8 mittels einer molekularen Analyse seiner Promotorregion untersucht werden.

Folgende Fragen sollten hierbei bearbeitet werden:

- Lässt sich der Fzd8-Promotor strukturell in aktivierende und repressive Abschnitte einteilen? Kann man einen distalen Enhancer identifizieren?
- Kann die negative Regulation der mRNA-Expression von Fzd8 durch Wnt3a auch auf Promotorebene gezeigt werden?
- Gibt es Unterschiede bzgl. der Fzd8-Promotoraktivität in verschiedenen Zelllinien?
- Wie verhält sich die Promotoraktivität nach Manipulation von weiter *downstream*-liegenden Wnt/ β -Catenin-Signalwegkomponenten, insbesondere nach Knockdown von APC und β -Catenin?
- Lassen sich mittels *in silico*-Analyse Transkriptionsfaktoren identifizieren, durch die die Fzd8-Expression reguliert wird?

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde mit dem im ersten Abschnitt identifizierten Transkriptionsfaktor ZF5 weitergearbeitet, da dieser als möglicher Mediator des Fzd8-Promotors erachtet wurde.

Hierzu sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Korreliert eine erhöhte ZF5-Expression mit einer vermehrten Fzd8-Expression?
- Kann ZF5 durch den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg induziert werden?
- Vermittelt eine Überexpression von ZF5 eine vermehrte Expression von Fzd8?
- Zeigt eine Überexpression von ZF5 einen aktivierenden Einfluss auf den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg?

D Material und Methoden

D.1 Geräte und Materialien

D.1.1 Geräte

Autoklav 3850	Systec GmbH, Wetztenberg
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator Galaxy S	RS Biotech, Irvine, England
Eismaschine AF-10	Scotsman, Frimont, Italien
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur, Modell B1	PeqLab, Erlangen
Gel-Bilderfassungssystem Intas Gel Imager	Intas, Göttingen
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungssofen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Products, USA
Image Scanner	Pharmacia, Freiburg
Kühlschrank (4 °C)	Siemens, München
Magnetrührer Ika-Combimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskope: IX50 mit CCD Kamera Typ 3CCD UV-Lampe U-RFL-T IX70 mit POC Chamber SensiCam QE Tempcontrol 32-2 Uniblitz® VCM-D1 Shutter	Olympus, Feldkirchen-Westerham Sony, Köln Olympus, Feldkirchen-Westerham Olympus, Feldkirchen-Westerham Pecon, Erbach PCO CCD Imaging, Kehlheim Pecon, Erbach Vincent Associates, Rochester, USA
Mikrowellenofen R-6270	Sharp, Osaka, Japan
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
Nanodrop-Photometer	Thermo Scientific, USA
Orbitalschüttler: Certomat® R Infrons TR150 mit Heissluft Inkubatorofen ITE	Braun Biotech International, Melsungen Infrons AG, Bottmingen, Schweiz Infrons AG, Bottmingen, Schweiz
PCR Thermal Cycler: Gene Amp 2400 LightCycler™ II Mastercycler Gradient	Perking Elmer, Langen Roche, Mannheim Eppendorf, Hamburg
pH-Meter: Typ 526 mit pH Elektrode	WTW, Weilheim
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proteintransfereinheiten: Mini Protean Electrophoresis Cell Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München BioRad, München BioRad, München
Sicherheitswerkbänke: BDK 7419, Modell UVF 6.18S Herasafe Typ HS12	BDK, Sonnenbühl-Genkingen Heraeus Instruments, Göttingen

Spannungsquellen: Consort E143 Mighty Slim™	PeqLab, Erlangen Hoefler, Heidelberg
Stickstofftank Locator 4	Sigma, Taufkirchen
Spectrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Tiefkühlgefrierschrank: Colora UF 85-300S (-80 °C) Liebherr Premium Frost (-20 °C)	Colora, Lorch Liebherr, Ochsenhausen
Transilluminator DarkReader™	Clare Chemical Research, Dolores, USA
Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen: Analysenwaage, A 120 S Technische Waage, MA AF200	Satorius, Göttingen Satorius, Göttingen
Wärmeschränke: B30 BE30	Memmert, Schwabach Memmert, Schwabach
Wasserbäder: WB-14 Exatherm U3electronic	Memmert, Schwabach Julabo, Seelbach
Wasserdeionisierungseinheit Membrapure	MembraPURE, Bodenheim
Zentrifugen: Varifuge 3.0 R Sepatech Biofuge 15 Eppendorf 5415 D Kühlzentrifuge, Eppendorf 5415 R	Heraeus Sepatech, München Heraeus Sepatech, München Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

D.1.2 Chemikalien und Materialien

D.1.2.1 Bakterien, Nährlösungen und Antibiotika

Tabelle D-1: Bakterienstämme

<i>E. coli</i> C2925H (NEB, USA)
ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) <i>Tet^S</i> endA1 rspL136 (<i>Str^R</i>) dam13::Tn9 (<i>Cam^R</i>) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2
<i>E. coli</i> JM109 (NEB, USA)
endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ la- cIq lacZΔM15] hsdR17(r -m +)
<i>E. coli</i> TOP 10 (Invitrogen, USA)
F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara- leu)7697 galE15 galK16 rpsL(<i>Str^R</i>) endA1 λ-

Tabelle D-2: Nährmedien

DYT
16 g/l Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut) 10 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l NaCl
SOC-Medium
20 g/l Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut) 10 g/l Bacto-Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 1,2 g/l MgSO ₄ 40,95 g/l MgCl ₂ 20 g/l D(+)-Glukose

Die Sterilisierung der Nährmedien erfolgte entweder durch Autoklavieren oder Sterilfiltration. Feste Nährmedien wurden hergestellt, indem dem DYT-Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugegeben wurde.

Antibiotika

In den molekularbiologischen Teilen der Arbeit wurden Ampicillin und Kanamycin zur Selektion von Bakterien verwendet. Unter Berücksichtigung der Hitze-Instabilität dieser Stoffe wurden diese den Medien erst ab einer Temperatur von 50 °C in einer Konzentrationen von 200 µg/ml (Ampicillin) und 50 µg/ml (Kanamycin) zugegeben.

D.1.2.2 Oligonukleotide

Primer für DNA-Amplifikation mittels PCR

Alle Primer wurden mit Hilfe des Programmes SE Central (SciEdSoftware, Cary, USA) entworfen. Synthetisiert wurden sie von der Fa. Metabion, Martinsried. Kursiv gedruckte Elemente der Primer in der Tabelle stellen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (RE) dar. Zusätzlich wurden GC-Überhänge am 5'-Ende der Primer hinzugefügt, um die Bindungsaffinität der RE zu erhöhen.

Tabelle D-3: Primer für DNA-Amplifikation durch PCR

Name	Sequenz (5'→3')	T _m
Fzd8-Prom-forw-379	TCTGAACGGACAACCACGAGCTACC	77,0 °C
Fzd8-Prom-forw-316	CG- <i>GATATC</i> -CAGATACGTGTCGCGGAGT	73,0 °C
Fzd8-Prom-forw-591	CG- <i>GATATC</i> -CCTTGGAGATCTGTGCTATG	70,0 °C
Fzd8-Prom-forw-982	CG- <i>GATATC</i> -GGCTTGGCTGGTTTGAAACG	72,0 °C
Fzd8-Prom-forw-1339	CG- <i>GATATC</i> -AGCCGGGAAGTTGGGCTAAG	73,0 °C

Fzd8-Prom-forw-1558	CG- <i>GATATC</i> -AAGGACGGACGCCGGAGAAA	73,0 °C
Fzd8-Prom-forw-1742	CG- <i>GATATC</i> -CCAGAGGAAACTTGCGGCGC	75,0 °C
Fzd8-Prom-forw-2038	CG- <i>GATATC</i> -GGTTAGATTATCGGCAGACC	70,0 °C
Fzd8-Prom-forw- <i>EcoRV</i>	CG- <i>GATATC</i> -GCCACCCTCCTGGCTAACTGAAATG	76,0 °C
Fzd8-Prom-forw-Exten	GC- <i>GATATC</i> -CACCATCTGTGTTGCTCTT	70,0 °C
Fzd8-Prom-rev-135	TACACAGCGGCACGGTGATCTCTT	77,0 °C
Fzd8-Prom-rev-763	CG- <i>GGATCC</i> -GTCTCCTTCCTGCTGGACAC	77,0 °C
Fzd8-Prom-rev-364	CG- <i>GGATCC</i> -CGGGCCTCGGCTCATCGTCC	82,0 °C
Fzd8-Prom-rev-177	CG- <i>GGATCC</i> -GTCTGCCGATAATCTAACCC	75,0 °C
Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>	CG- <i>GGATCC</i> -GCCAGCAGCGAGGTCACCTCC	79,0 °C
ZF5- <i>EcoRV</i> -rev	GCACG- <i>GATATCT</i> -GATCCACGTCATCTCAGT	74,0 °C
ZF5- <i>NheI</i> -forw	GCACTC- <i>GCTAGC</i> - GATAATAGCCTGAGTTGTTTCATGG	77,0 °C

Primer für die RT-PCR

Alle Primer wurden mit dem Assay Design Center der Firma Roche, Mannheim (www.roche-applied-science.com) erstellt und anschließend mittels NCBI Nucleotide Blast Search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf putative Bindungsstellen an anderen mRNAs im Bereich der primerspezifischen Schmelztemperatur (T_m) untersucht, um Amplifikationsartefakte zu vermeiden. Alle Primer wurden von der Fa. Metabion, Martinsried synthetisiert mit Ausnahme der Primer für humanes β -Catenin, die von der Fa. SearchLC, Heidelberg erworben wurden (Tabelle D-4). Die entsprechenden Sonden wurden von der Fa. Roche bezogen (Tabelle D-5).

Tabelle D-4: Primer für RT-PCR

Name	Sequenz (5'→3')	T_m	Amplikon	Sonde
Human Catenin- β 1-f Human Catenin- β 1-r	Produkt von SearchLC GmbH, Heidelberg zur Anwendung mit LightCycler® Sybr Green I (http://www.search-lc.com/lc/info/Catenin.pdf)			
UPL-Fzd8-for	CGCCACGCGTTAATTCT	59 °C	64 bp	#73
UPL-Fzd8-rev	ATCTCGGGTTCTGGAAACG	60 °C		
UPL-GAPDH-for	AGCCACATCGTCCAGACAC	60 °C	66 bp	#60
UPL-GAPDH-rev	GCCAATACGACCAAATCC	60 °C		
UPL-ZF5-for	GGCACGAGAACAATATGCAC	59 °C	71 bp	#38
UPL-ZF5-rev	CTGTTCTGTCTCGCTCTGGA	59 °C		

Tabelle D-5: Universal Library Sonden für RT-PCR

Nummer	Sequenz (5'→3')	Assoziierte Primer
#38	GGAAGCAG	UPL-ZF5-for, UPL-ZF5-rev
#60	TGGGGAAG	UPL-GAPDH-for, UPL-GAPDH-rev
#73	GCTGAGGA	UPL-Fzd8-for, UPL-Fzd8-rev

Die Nukleotide der Sonden bestehen aus *locked nucleic acids* (LNA). Zur näheren Erläuterung siehe D.2.1.4.

D.1.2.3 Rekombinante Proteine und Antikörper

Tabelle D-6: Rekombinante Proteine

Rekombinantes humanes Wnt-3a	R&D Systems, USA
Rekombinantes murines Wnt-3a	R&D Systems, USA

Tabelle D-7: Antikörper

Antikörper und Sekundärantikörper:	
goat Anti- β -Aktin (I-19)	SCBT, USA
rabbit Anti- β -Catenin (C-18)	SCBT, USA
Donkey anti-rabbit IgG	GE Healthcare, USA
donkey anti-goat IgG-HRP	SCBT, USA

D.1.2.4 Small Interfering RNAs

Tabelle D-8: siRNAs

Ziel-RNA	siRNA-Name	Ziel Sequenz (5' \rightarrow 3')	Firma
APC	APC-hum#1	AATGAGAGCACTGATGATAAA	Qiagen, Hilden
β -Catenin	CTNNB1	AATGGTTGCCTTGCTCAACAA	Qiagen, Hilden
keine	Control siRNA	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	Qiagen, Hilden

D.1.2.5 Chemikalien, Enzyme und andere Materialien

Enzyme	
<i>Antarctic Phosphatase</i>	NEB, USA
<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>	NEB, USA
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	NEB, USA
Hot Star HiFidelity Polymerase	Qiagen, Hilden
Phusion Flash Polymerase	Finnzymes, Finnland
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen, USA
Restriktionsenzyme (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV, <i>Nhe</i> I, <i>Sac</i> II, <i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I)	NEB, USA
T4-Ligase	Roche, Mannheim
Kits	
BioLux [®] Gaussia Luciferase Assay Kit	NEB, USA
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
LightCycler TaqMan [®] Master	Roche, Mannheim
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
PeqGold Plasmid Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden

QIAmp DNA Blood Midi Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder Säulen	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Chemikalien und Materialien für die Molekularbiologie	
Agarose, Nusive	Biozym, Hameln
Agarose, Seakem GTG	Biozym, Hameln
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
DNA-Molekulargewichtsmarker <i>Generuler</i> 1kb	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
DNA-Molekulargewichtsmarker <i>Ultra Low Range</i>	PeqLab, Erlangen
DNA-Auftragspuffer, 10x	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Chemikalien und Materialien für die Mikrobiologie	
Ampicillin-Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	BD Bioscience, USA
Bacto Hefeextract	BD Bioscience, USA
Bacto Trypton	BD Bioscience, USA
D-Glucose	Sigma, Deisenhofen
Erlenmeyerkolben 100, 250 und 1000 ml	Wagner und Munz, München
Glycerin	Serva, Heidelberg
Kanamycinsulfat	Roche, Mannheim
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen, Polystyrol 10 cm Ø	Greiner, Nürtingen
Chemikalien und Materialien für die Zellbiologie	
αMEM mit L-Glutamin, ohne Nukleoside	PAA, Österreich
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose	PAA, Österreich
DMSO	Merck, Darmstadt
FCS	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Österreich
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Österreich
Zellkulturgefäße, (T25, T75)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6- und 96-well)	Nunc, Wiesbaden
Chemikalien und Materialien für die Proteinchemie	
Acrylamid : Bisacrylamid (37,1 : 1)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Cellophan	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma, Deisenhofen

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Geltrocknungsrahmen	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
<i>Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope</i>	BioRad, München
SDS	Serva, Heidelberg
SeeBlue® Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tris-Cl	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Western Lightening Plus ECL	Perkin-Elmer, USA
Whatman Filterpapier Nr. 1	Whatman/Vetter, Ammerbuch
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, USA

D.1.3 Säugetierzellen

D.1.3.1 hMSC-P (Prockop)

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) stammen von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Darwin Prockop von der Tulane University, USA. Dort wurde aus dem oberen, posterioren Beckenkamm erwachsener Spender Knochenmark entnommen und das Zellmaterial durch Dichtegradzentrifugation angereichert. Anschließend erfolgte die Identifizierung der hMSC durch ihre Fähigkeit zu Adhärenz an Plastik (Sekiya, Larson et al. 2002), wozu im Gegensatz hämatopoetische Stammzellen nicht fähig sind. Im Falle der hier verwendeten Zellen handelte es sich um Material von zwei verschiedenen Spendern. hMSC-P können sowohl osteogen, chondrogen und adipogen differenzieren. Die Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Prockop negativ auf HIV, Hepatitis-B und -C, Mycoplasmen, Bakterien und Pilze getestet. Die Durchflusszytometrie ergab folgendes Expressionsprofil: CD44, CD166, CD90, CD105, CD147, CD49c, CD29, CD49f und CD59 positiv; CD36, CD34, CD117 und CD45 negativ.

D.1.3.2 Fibrosarkomzellen HT1080

HT1080 sind hochinvasive und -proliferative Fibrosarkomzellen mit einer Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden. Auch bei Kultivierung der Zellen über mehrere Wochen in der Zellkultur zeigt sich keine Reduktion der Proliferation. Ursprünglich wurden die Tumorzellen aus dem Fibrosarkom eines 35 Jahre alten Kaukasiers gewonnen, der weder mit Chemo- noch Radiotherapie behandelt worden war (Rasheed, Nelson-Rees et al. 1974). HT1080 zeigen ein aktivierte ras-Onkogen und einen teilweise pseudodiploiden Chromosomensatz. Die Zellen wurden ebenfalls negativ auf Mycoplasmen, Bakterien, Pilze und die Viren EBV, HBV, HCV, HHV-8, HIV und HTLV-I/II getestet. Die Zellen wurden von der DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig bezogen.

D.1.3.3 HEK293

HEK-Zellen sind eine weitverbreitete Zelllinie in der Zellbiologie, da sie sich durch ein rasches Wachstum und gute Transfizierbarkeit auszeichnen. Diese fibroblastoiden Zellen wachsen als adhärenente Monolayer und haben eine Verdopplungszeit von ca. 20-24 Stunden. HEK steht für „Human Embryonic Kidney“-Zellen, es handelt sich aber nicht um reine menschliche embryonale Nierenzellen, sondern um eine durch Transformation von Teilen des Erbgutes des Adenovirus 5 genetisch veränderte Zelllinie (Louis, Eveleigh et al. 1997), wodurch sie Tumorzell-ähnliche Eigenschaften erhielten (Graham, Smiley et al. 1977). Insofern stellen die Zellen kein valides Modell für menschliche Zellen oder Tumorzellen dar. Sie werden deshalb vor allem in Experimenten verwendet, in denen weniger die Eigenschaft der Zelle im Vordergrund steht, als zum Beispiel für die bloße Überexpression eines bestimmten Proteins. Die Zellen wurden ebenfalls von der DMSZ in Braunschweig bezogen. Sie wurden negativ auf Mycoplasmen, EBV, HBV, HCV, HHV-8 und HIV getestet.

D.1.4 Plasmide

D.1.4.1 pCR4.1-TOPO

Der TOPO-Vektor findet vor allem bei Zwischenklonierungen von PCR-Produkten Verwendung, damit diese einfacher sequenziert werden können. DNA-Fragmente, die durch eine PCR unter Verwendung einer Taq-Polymerase generiert wurden, tragen an ihrem 3'-Ende ein Desoxyadenosin. Der zuvor linearisierte Vektor hingegen trägt an seinem 3'-Ende einen Desoxythymidin-Rest. Die an den Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I katalysiert

nun die Verbindung der beiden an den jeweiligen 3'-Enden überhängenden Moleküle und die PCR-Produkte können dadurch leicht in den Vektor ligiert werden (Shuman 1994). Der TOPO-Vektor trägt zur Selektion erfolgreich transformierter *E. coli* die Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin.

D.1.4.2 pGLuc-Basic

Der Vektor pGLuc-Basic der Fa. NEB enthält die an die humane Codonpräferenz angepasste codierende Sequenz des Reportergens Gaussia Luciferase (GLuc) (Tannous, Kim et al. 2005) ohne einen Promotor. Dieses Protein wurde erstmalig aus dem Meeresorganismus *Gaussia princeps* isoliert. Über die *multiple cloning site* (MCS) mit verschiedenen singulären Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen am 5'-Ende des Gens können Promotoren in den Vektor eingesetzt werden, um deren transkriptionsregulierende Funktionen zu untersuchen. Eine Lyse der Zellen ist hierfür nicht nötig, da die Gaussia Luciferase in den Überstand des Zellmediums sezerniert wird, worin dessen Aktivität quantifiziert werden kann. Der Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen, das die Selektion von transformierten Bakterien ermöglicht.

Abbildung D-1 gibt einen schematischen Überblick über den Vektor.

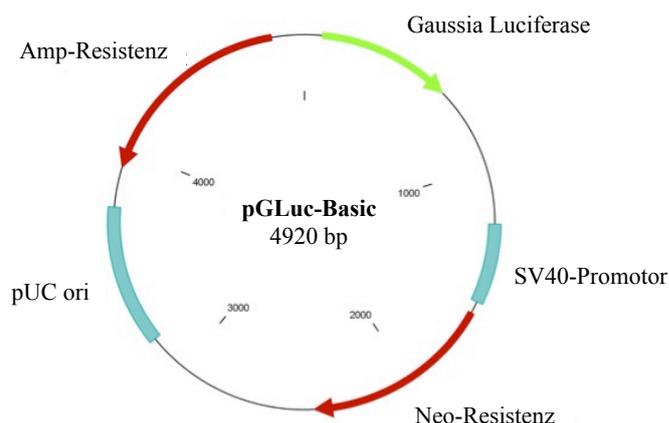


Abbildung D-1: Vektorkarte pGLuc-Basic.

Amp-Resistenz = Ampicillin-Resistenz, Neo-Resistenz = Neomycin-Resistenz, pUC ori = Plasmid *University of California origin of replication*, SV40-Promotor = *simian virus 40*-Promotor

In dieser Arbeit wurde der Vektor benutzt, um die Aktivität des Fzd8-Promotors zu quantifizieren. Hierfür wurde der Promotor über die Restriktionsschnittstellen *EcoRV* und *BamHI* in den Vektor eingefügt (siehe Abbildung D-2). In einem weiteren Schritt der Arbeit wurden 5'-und/oder 3'-trunkierte Varianten des Promotors erstellt, die immer über die oben genannten

Schnittstellen in den Vektor ligiert wurden. So konnte eine Kartierung von repressiven und aktivierenden Elementen innerhalb des Promotors erfolgen.

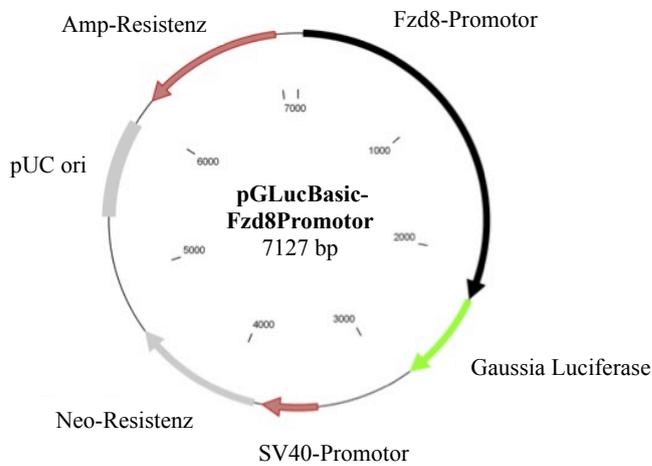


Abbildung D-2: Vektorkarte pGLucBasic-Fzd8Promotor.

Amp-Resistenz = Ampicillin-Resistenz, Neo-Resistenz = Neomycin-Resistenz, pUC ori = Plasmid *University of California origin of replication*, SV40-Promotor = *simian virus 40*-Promotor

D.1.4.3 pN3

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Vektor N3 verwendet, um Proteine überzuexprimieren. Dies wird dadurch gewährleistet, dass pN3 die Sequenz des Cytomegalie-Promotors vom *immediate early*-Typ enthält, der eine sehr hohe Aktivität besitzt. Dieser Vektor enthält außer den Resistenzgenen für Kanamycin und Neomycin, anhand derer transformierte Bakterien bzw. Zellen selektiert werden können, keine kodierenden DNA-Sequenzen. Durch die im Vektor vorhandene *multiple cloning site* (MCS) am 3'-Ende des CMV-Promotors können über singuläre Restriktionsschnittstellen DNA-Fragmente ligiert und somit die Überexpression eines entsprechenden Proteins erreicht werden. Für die richtige Prozessierung der mRNA ist ein SV40 Polyadenylierungssignal verantwortlich, das sich 3'-terminal an die MCS anschließt.

Das Plasmid pN3-Mock (pN3 ohne integriertes Transgen, siehe Abbildung D-3) diente in dieser Arbeit als Negativkontrolle.

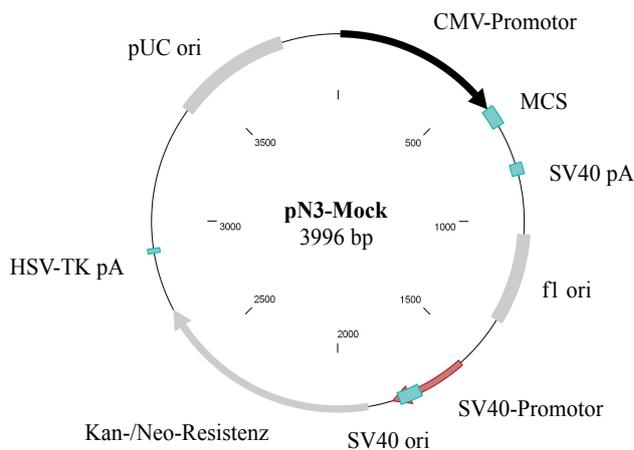


Abbildung D-3: Vektorkarte pN3-Mock.

CMV-Promotor = Cytomegalievirus-Promotor, fl ori = fl Phagen *origin of replication*, HSV-TK pA = Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase Polyadenylierungssignal, Kan-/Neo-Resistenz = Kanamycin/Neomycin-Resistenz, MCS = *multiple cloning site*, pUC ori = Plasmid *University of California origin of replication*, SV40 ori = *simian virus 40 origin of replication*, SV40 pA = *simian virus 40* Polyadenylierungssignal, SV40-Promotor = *simian virus 40*-Promotor

D.1.4.4 pEGFP-N3

Mit Hilfe des Vektors pEGFP-N3 (BD Clontech, USA) können fluoreszierende Fusionsproteine in transfizierten Zellen generiert werden. Dieser Vektor basiert auf dem Plasmid pN3 (siehe D.1.4.3). Das gewünschte Transgen kann man über die *multiple cloning site* (MCS) am 5'-Ende der EGFP-kodierenden Sequenz einbringen. So entsteht eine Fusion des Transgens mit dem N-Terminus des EGFP-Proteins. pEGFP-N3 enthält eine um zwei Aminosäuren modifizierte Variante des in der Qualle *Aequorea victoria* vorkommenden Fluoreszenzproteins *green fluorescent protein* (GFP) (Cormack, Valdivia et al. 1996), wodurch seine Fluoreszenz verstärkt wird. EGFP steht für *enhanced green fluorescent protein*. Es wurden außerdem 190 stumme Basenmutationen eingefügt, um die humane Codonpräferenz zu imitieren (Haas, Park et al. 1996). Das Extinktionsmaximum von EGFP liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 507 nm. Die Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien erfolgte mittels der Kanamycin-Resistenz. In dieser Arbeit wurde unter Verwendung dieses Vektors die Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der Plasmidgröße beurteilt.

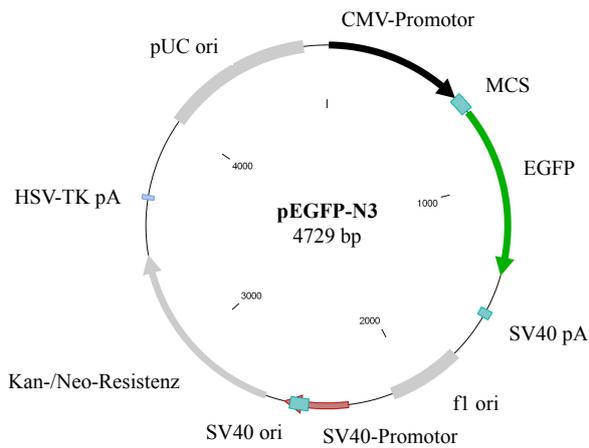


Abbildung D-4: Vektorkarte pEGFP-N3.

CMV-Promotor = Cytomegalievirus-Promotor, EGFP = *enhanced green fluorescent protein*, fl ori = fl Phagen *origin of replication*, HSV-TK pA = Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase Polyadenylierungssignal, Kan-/Neo-Resistenz = Kanamycin/Neomycin-Resistenz, MCS = *multiple cloning site*, pUC ori = Plasmid *University of California origin of replication*, SV40 ori = *simian virus 40 origin of replication*, SV40 pA = *simian virus 40* Polyadenylierungssignal, SV40-Promotor = *simian virus 40*-Promotor

D.1.4.5 pN3-BAR-GLuc

Mit Hilfe dieses Plasmids kann der Aktivierungsgrad des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges gemessen werden. Der Vektor enthält einen minimalen CMV-Promotor (CMV-Promotor min) und daran anschließend den β -Catenin-*activated reporter* (Bar), der aus einer zwölffachen Wiederholung der TCF/LEF-Konsensussequenz besteht. Am 3'-Ende dieses Fusionspromotors liegt die kodierende Sequenz für die Gaussia Luciferase (Biechele and Moon 2008). Im Falle der Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges steigt intranukleär die Konzentration von β -Catenin, wobei dieses mit den Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie interagiert. Es bildet sich ein Transkriptionskomplex, der an den Fusionspromotor des Plasmids binden kann. Dadurch wird die Transkription des Reportergens Gaussia Luciferase initiiert. Das Plasmid basiert auf dem Grundgerüst des pN3-Vektors.

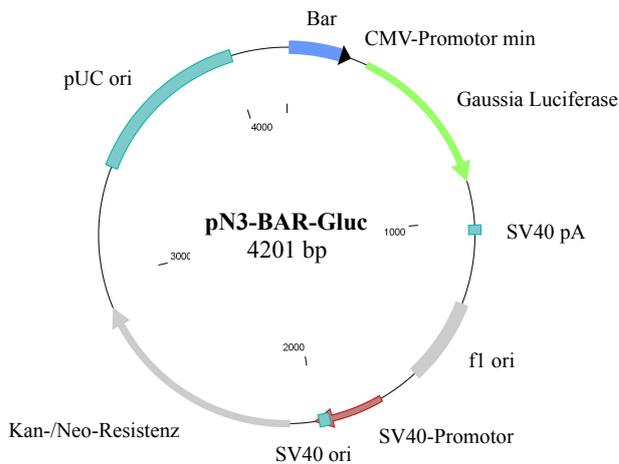


Abbildung D-5: Vektorkarte pN3-BAR-GLuc.

Bar = β -Catenin-activated reporter, CMV-Promotor min = Fragment des Cytomegalievirus-Promotors, f1 ori = f1 Phagen origin of replication, Kan-/Neo-Resistenz = Kanamycin/Neomycin-Resistenz, pUC ori = Plasmid University of California origin of replication, SV40 ori = simian virus 40 origin of replication, SV40 pA = simian virus 40 Polyadenylierungssignal, SV40-Promotor = simian virus 40-Promotor

D.1.5 Bioinformatische Hilfsmittel

Tabelle D-9:

Software	
Image Master Labscan 3.0	Pharmacia, Freiburg
Image QV 770	Intas, Göttingen
LightCycler® Software 3.5	Roche, Mannheim
MatInspector/MatBase	Genomatix, Munich
SECentral	SciEdSoftware, USA
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim

Tabelle D-10:

Online verfügbare bioinformatische Methoden		
Primerdesign für RT-PCR	Roche Universal Probe Library Assay Design Center	www.roche-applied-science.com
Kontrolle von Primerbindungsstellen	NCBI Nucleotide Blast Search	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
Identifikation potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen	MatInspector/MatBase	www.genomatix.de

D.2 Methoden

D.2.1 Molekularbiologische Methoden

D.2.1.1 Klonierung rekombinanter DNA-Sequenzen

D.2.1.1.1 PCR

Mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) kann durch DNA-Polymerasen zu einem gegebenen DNA-Matrizenstrang in 5'-3'-Richtung komplementäre DNA erzeugt werden. Für die Reaktion benötigt man außerdem Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und ein für die zu amplifizierende DNA-Sequenz spezifisches Primerpaar. Im ersten Schritt der Reaktion wird die DNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert und der Doppelstrang aufgelöst. Dies erfolgt, damit sich später die Primer spezifisch an die Matrize anlagern können. Man spricht hierbei von *annealing*. Haben sich die Primer angelagert, beginnt die Synthese des komplementären DNA-Strangs aus den dNTPs in der sogenannten Elongationsphase. Ein Zyklus besteht normalerweise aus Denaturierung, *annealing* sowie Elongation und wird meist 30 - 45 mal wiederholt.

Ansatz zur Amplifikation gewünschter Zielsequenzen:

Tabelle D-11: PCR-Ansatz

Substanz	Menge	Endkonzentration
Matrize	1 µl	
Primer	je 5 µl	1 µM
5x Puffer	10 µl	
5x Q-Solution	10 µl	1,3 x
H ₂ O	14 µl	
HotSar HiFidelity Polymerase	2 µl	2,5 U/µl
Gesamtvolumen	50 µl	

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verkürzungsvarianten des Fzd8-Promotors generiert. Die Klonierung erfolgte immer durch die gleichen Schritte:

1. PCR: pGLucBasic-Fzd8Promotor als Matrize und entsprechende *forward* und *reverse* Primer
2. Gelextraktion des PCR-Produktes und Restriktion mit *EcoRV* und *BamHI*
3. Ligation des PCR-Produktes in pGLucBasic über die Schnittstellen *EcoRV* und *BamHI*
4. Restriktionsanalyse mit *EcoRV* und *BamHI*, Kontrollverdau mit *SacII*
5. Sequenzierung und Abgleich der DNA-Sequenz mit der Online-Datenbank

Tabelle D-12 gibt eine Übersicht über alle generierten Varianten des Fzd8-Promotors und die jeweils verwendeten Primer (für Primersequenzen siehe D.1.2.2).

Tabelle D-12: Übersicht aller Fzd8-Promotorvarianten und zugehöriger Primer

Länge der Promotorvariante in bp	forward-Primer	Grafische Darstellung des Promotors	reverse-Primer
2233 bp (<i>full length</i>)	Fzd8-Prom-forw- <i>EcoRV</i>		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
5'-terminal trunkierte Promotorvarianten			
1917 bp	Fzd8-Prom-forw-316		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
1642 bp	Fzd8-Prom-forw-591		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
1251 bp	Fzd8-Prom-forw-982		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
894 bp	Fzd8-Prom-forw-1339		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
675 bp	Fzd8-Prom-forw-1558		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
491 bp	Fzd8-Prom-forw-1742		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
195 bp	Fzd8-Prom-forw-2038		Fzd8-Prom-rev- <i>BamHI</i>
3'-terminal trunkierte Promotorvarianten			
2056 bp	Fzd8-Prom-forw- <i>EcoRV</i>		Fzd8-Prom-rev-177
1869 bp	Fzd8-Prom-forw- <i>EcoRV</i>		Fzd8-Prom-rev-364
1470 bp	Fzd8-Prom-forw- <i>EcoRV</i>		Fzd8-Prom-rev-763
5'- und 3'-terminal trunkierte Promotorvariante			
488 bp	Fzd8-Prom-forw-982		Fzd8-Prom-rev-763

D.2.1.1.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese und Gelelution

Durch die Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle längenabhängig aufgetrennt. Dies dient der Überprüfung der Homogenität und Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente. Die negative Ladung von DNA bedingt durch die Phosphatgruppen bewirkt, dass sie in einem elektrischen Feld in Richtung Anode wandert. Die Molekülgröße bestimmt hierbei die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA: größere Moleküle wandern im elektrischen Feld langsamer, kleinere entsprechend schneller. Mit Hilfe einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Länge enthält und die neben den Proben aufgetragen wird, kann man die Größe der DNA-Fragmente abschätzen. Die DNA wird unter UV-Licht mit 302 nm Wellenlänge durch den Einsatz von DNA-interkalierendem Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Die Elektrophorese wurde in 0,7-3 %igen Agarosegelen durchgeführt, wobei die Konzentration des Agarosegels im indirekten Verhältnis zur erwarteten DNA-Fragmentgröße gewählt wurde. Zur Herstellung wurde die Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,3) für ca. zwei Minuten in einer Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt und

dadurch aufgelöst. Danach wurde die Lösung in Wasser auf ca. 55 °C abgekühlt und anschließend das Ethidiumbromid (0,05 % Endkonzentration) zugegeben. Die DNA-Proben wurden, nachdem ihnen 10fach konzentrierter Ladepuffer zugegeben worden war, in das ausgehärtete Gel aufgetragen und in TAE-Puffer mit 5-7 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt.

Anschließend wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter Verwendung des MinElute Gel Extraction Kits der Fa. Qiagen aus dem Gel aufgereinigt. Hierfür wurde zunächst das die DNA-Probe tragende Stück aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend in GC-Puffer aufgelöst. Nach der Auflösung wurde 70 %iges Isopropanol zugegeben. Die gelöste DNA wurde dabei an eine Silikatmembran gebunden. Etwaige Verunreinigungen wurden durch wiederholte Waschschrte mit entsprechenden Puffern nach Herstellerangabe entfernt. Am Ende wurde die gereinigte DNA in Aqua dest. gelöst und ihre Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt.

D.2.1.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien erfolgte unter Zuhilfenahme der Kits pegGOLD Plasmid Minirep Kit der Fa. PeqLab oder HiSpeed Plasmid Midi Kit der Fa. Qiagen. Diese Kits ermöglichen eine DNA-Isolierung bis zu einer Länge von 10 kb. Die Bakterien wurden zunächst durch Zentrifugieren von ihrem Kulturmedium separiert und danach in alkalischem Puffer lysiert (Birnboim and Doly 1979). Durch Zugabe von RNase wurde anschließend die RNA abgebaut, die Zellteile abzentrifugiert und danach wieder in Puffer gelöst. Die DNA wurde nun an eine Membran aus Silikat gebunden und Proteine und Zellteile in mehreren Waschschrten entsprechend den Herstellerangaben unter Zentrifugation eliminiert. Schließlich wurde die DNA mit Aqua dest. von der Membran aus Silikat gelöst und ihre Konzentration mit einem Photometer bei 260 nm vermessen.

D.2.1.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Das Maximum der Absorption von DNA liegt im Durchschnitt bei 260 nm ($A_{260\text{nm}}$). Die DNA-Konzentration ist dabei direkt proportional zur absorbierten Strahlung.

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

Um nachzuweisen, dass sich keine Proteine mehr in der Probe befinden, wurde zusätzlich das für Proteine typische Absorptionsmaximum bei 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) bestimmt. Je geringer die Absorption bei 280 nm ist, desto geringer ist die Verunreinigung durch Proteine. War der Quotient $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}} > 1,8$, konnte davon ausgegangen werden, dass eine DNA-Probe rein oder höchstens leicht kontaminiert war. Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Nanodrop-Photometer der Fa. Thermo Scientific, USA verwendet.

D.2.1.1.5 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Der sequenzspezifische Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme (RE) wurde genutzt, um Plasmide zu linearisieren oder DNA-Fragmente zuzuschneiden. Mit seiner Hilfe kann man entweder Plasmide analysieren bzw. DNA-Fragmente für eine weitere Verwendung modifizieren.

Für die Bestimmung der benötigten Menge des Restriktionsenzym wurde folgende Regel verwendet: 1 Unit (U) eines Restriktionsenzym ist die Menge, die zum Verdau von 1 μg λ -Phagen-DNA (48000 bp) innerhalb von sechzig Minuten unter optimalen Bedingungen notwendig ist.

$$\text{Menge RE (U)} = \frac{\text{Anzahl der Nukleotide in } \lambda}{\text{Anzahl der Nukleotide im Vektor bzw. Insert}} \times \frac{\text{Schnittstellen im Vektor bzw. Insert}}{\text{Schnittstellen in } \lambda}$$

Die geschnittene DNA wurde anschließend durch Elektrophorese separiert und mit dem MinElute Gel Extraction Kit der Fa. Qiagen, Hilden aus dem Gel gelöst. Die so gewonnenen modifizierten DNA-Fragmente wurden durch Ligation in die entsprechenden Vektoren für die Herstellung von Plasmiden verwendet. Für die Ligation wurden Insert- und Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Die Gesamtmasse der eingesetzten DNA betrug in der Regel 300 ng.

$$m(\text{Insert}) = a \times \frac{m(\text{gesamt})}{a + \frac{bp(\text{Vektor})}{bp(\text{Insert})}} \quad \text{mit } a = \frac{n(\text{Basenpaare Insert})}{n(\text{Basenpaare Vektor})}$$

$$m(\text{Vektor}) = m(\text{Gesamt}) - m(\text{Insert})$$

In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase der Fa. Roche mit der dazugehörigen ATP-haltigen Pufferlösung verwendet. Die Ligationsansätze wurden für zwölf Stunden bei 16 °C inkubiert.

D.2.1.1.6 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzen wurden von der Fa. Sequiserve (Vaterstetten) nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) mit fluoreszenzmarkierten dNTPs sequenziert. Analysiert wurden die Ergebnisse mit der online verfügbaren Software NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Spezialsoftware SECentral.

D.2.1.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Ziel der RNA-Isolierung ist eine selektive Extraktion von RNA aus lysierten Zellen. Hierfür wurde der RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen (Hilden) verwendet. Die Zellen wurden zunächst in 350 µl Guanidin-Isothiozyanat-Puffer (RLT-Puffer) lysiert und homogenisiert, wodurch vorhandene RNasen inaktiviert werden. Die Denaturierung vorhandener Proteine durch Reduktion erfolgte durch Zugabe von β -Mercaptoethanol zum Puffer (1 % Endkonzentration). Das Lysat wurde mit einer QIAshredder-Säule durch Zentrifugation für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (16100 x g) homogenisiert. Dem nun homogenen Lysat wurden 350 µl 70 %iges Ethanol zugegeben, wodurch die Bindefähigkeit der RNA an der RNeasy-Mini Säule optimiert werden sollte. Diese Suspension wurde anschließend in die Mitte der Membran der RNeasy Mini Säule pipettiert, anschließend wurde 15 Sekunden lang bei 16100 x g zentrifugiert. Nun wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und wieder zentrifugiert (15 Sekunden, 16100 x g), um überschüssiges nicht-RNA-Material zu eliminieren. Danach wurde die Säule noch zweimal mit RPE-Puffer durch Zentrifugieren (15 Sekunden, 16100 x g) gereinigt. Zuletzt wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt.

D.2.1.3 Synthese von cDNA

Um eine qRT-PCR durchführen zu können, muss zunächst die isolierte Total-RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und von genomischer DNA (gDNA) gereinigt werden. Hierfür wurde das Quantitect Reverse Transcription-Kit der Fa. Qiagen (Hilden) verwendet. 250-

1000 ng Total-RNA in einem maximalen Volumen von 12 µl wurden unter Zugabe von Oligo-dT-Primern, die an das Polyadenylierungssignal der mRNAs binden können, und Zufallsprimern in cDNA umgeschrieben. Für das Umschreiben von RNA in cDNA benötigt man das Enzym Reverse Transkriptase. Dieses Enzym findet sich in Retroviren und fungiert als RNA-abhängige DNA-Polymerase. Außerdem besitzt die Reverse Transkriptase eine RNase-Aktivität. So wird nach dem reversen Transkriptionsschritt die mRNA-Matrize abgebaut und es bleibt nur der neu synthetisierte cDNA-Strang übrig.

Zuerst wurden die Proben, denen zur Entfernung von gDNA 2 µl gDNA *Wipeout Buffer* (7 x) zugegeben worden war, für zwei Minuten bei 42 °C inkubiert. Danach wurde den Proben auf Eis ein Reaktionsmix aus Reverser Transkriptase, Primern und RT-Puffer (5 x) zugegeben. Die reverse Transkription fand bei 42 °C für 30 Minuten statt. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase für drei Minuten bei 95 °C inaktiviert. Die cDNAs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle D-13: Ansatz für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen/Reaktion
Quantitect Reverse Transkriptase	1 µl
Quantitect RT-Buffer (5x)	4 µl
RT-Primer-Mix	1 µl
Gesamt-RNA nach Eliminierung von gDNA	12 µl
Gesamtvolumen	18 µl

D.2.1.4 Quantitative RT-PCR

Quantitative Real-Time-PCR dient der spezifischen Ermittlung von DNA-Kopienzahlen in einer DNA-haltigen Probe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Das SYBR-Green-System:

Hierbei erfolgt die Ermittlung der DNA-Kopienzahl durch die Analyse der log-Phase einer PCR-Reaktion. In dieser Phase gilt, dass die Vermehrung des PCR-Produktes direkt proportional mit dem emittierten Fluoreszenzsignal korreliert. Prinzip der Methode beruht darauf, dass der fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green I mit der in der PCR entstehenden dsDNA interkaliert, wobei das dadurch entstehende Fluoreszenzsignal, das mit der Vermehrung der spezifischen dsDNA-Kopienzahl immer stärker wird, mittels des LightCyclers® II quantifiziert werden kann. Als Standard dient eine Verdünnungsreihe einer DNA-Probe mit imaginä-

rer Kopienzahl, mit der eine Standardkurve erstellt wird, anhand welcher die relative Kopienzahl in einer DNA-Probe gemessen werden kann. Mittels einer Schmelzkurvenanalyse am Ende der Reaktion wird die Spezifität der PCR-Produkte sichergestellt, um eine etwaige Interkalation von SYBR-Green I mit unspezifisch amplifizierter dsDNA ausschließen zu können. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die DNA denaturiert, indem die Temperatur kontinuierlich erhöht wird. Bei einer für die gesuchte dsDNA-Sequenz spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang, wodurch SYBR-Green I freigesetzt wird und das Fluoreszenzsignal abnimmt. Spezifische PCR-Produkte besitzen einen höheren Schmelzpunkt als Primerdimere. Unspezifische Produkte hingegen weisen in der Regel einen höheren oder niedrigeren Schmelzpunkt auf.

Für diese Methode wurden Primer-Sets der Fa. Search LC (www.search-lc.com) verwendet und das PCR-Programm gemäß den Herstellerangaben durchgeführt:

Tabelle D-14:

PCR-Schritte		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		95 °C	10 min
35 Zyklen	Denaturierung	95 °C	10 s
	Annealing	68 °C	10 s
	Elongation	72 °C	16 s
Schmelzkurvenanalyse	Beginn bei 58 °C, anschließend schrittweise Erhöhung um 0,1 °C/s bis 95 °C		

Der Ansatz für eine Reaktion erfolgte in den LightCycler-Glaskapillaren und setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle D-15:

Komponente	Menge in µl
cDNA	1 µl
Aqua dest.	7 µl
Primer-Set	1 µl
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche (Mannheim)	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I enthält SYBR Green I, die DNA-Polymerase, einen PCR-Puffer und dNTPs. Jeder Ansatz enthält zudem MgCl₂ in einer Konzentration von 1 mM.

Das UPL-System:

Diese Methode basiert auf der sequenzspezifischen Hydrolyse von Sonden, die eine gezielte Detektion von DNA-Sequenzen ermöglicht. Das Verfahren nennt sich TaqMan-Prinzip. Verwendet werden Sonden, die aus einer acht Nukleotide langen Sequenz bestehen und sowohl mit dem Reporterfarbstoff Fluoreszin als auch mit einem sogenannten Quencher-Farbstoff markiert sind. Befindet sich der Reporterfarbstoff in der Nähe des Quenchers - wenn also die Sonde intakt ist - wird das Fluoreszenzsignal von ihm durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) absorbiert und somit unterdrückt. Bindet nun aber die Sonde an die Zielsequenz der cDNA, so wird sie während der Elongationsphase der PCR durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut. Hierdurch entfernt sich der Reporter vom Quencher; die Fluoreszenz kann nicht länger absorbiert werden und wird freigesetzt. Mit steigender Zykluszahl der PCR, nimmt das Fluoreszenzsignal immer mehr zu und zwar direkt proportional zur Menge des entstehenden spezifischen PCR-Produkts.

Auf der Homepage der Fa. Roche können für jedes beliebige Zielgen die entsprechenden Primersequenzen mit der dazugehörigen Sonde in der *Universal Probe Library* (UPL) gefunden werden, wodurch die Spezifität sichergestellt wird. Die Sonde bindet innerhalb der durch die spezifischen Primer zu amplifizierenden Zielsequenz. Um eine möglichst große Bindungsaffinität der Sonde zu gewährleisten, bestehen deren Nukleotide aus *locked nucleic acids* (LNA). Hierin befindet sich zwischen C2 und C4 des Riboserings eine zusätzliche Sauerstoffmethylenbrücke, durch welche die Rigidität des Ribofuranoserings erhöht wird, was zu einer höheren Schmelztemperatur und zu einer stärkeren Hybridisierung mit komplementären DNA-Sequenzen führt.

Das Amplifikationsprogramm ist in folgender Tabelle gezeigt:

Tabelle D-16: Schritte der RT-PCR bei Verwendung des UPL-Systems

PCR-Schritte		Temperatur	Dauer
Denaturierung		95 °C	10 min
45 Zyklen	Denaturierung	95 °C	10 s
	Annealing	68 °C	10 s
	Elongation	72 °C	1 s
Kühlung		40 °C	30 s

Der Ansatz für eine Reaktion erfolgte in den LightCycler-Glaskapillaren in einem Gesamtvolumen von 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle D-17:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	1 µl	
Primer 1	0,2 µl	10 µM
Primer 2	0,2 µl	10 µM
Sonde	0,1 µl	100 nM
TaqMan Master (enthält HotSart Polymerase und dNTPs)	2 µl	
H ₂ O	6,5 µl	
Gesamtvolumen	10 µl	

D.2.2 Mikrobiologische Methoden

D.2.2.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme

Transformation bezeichnet die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterien. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die chemische Transformation durchgeführt, bei der durch kurzzeitiges Erhitzen von kompetenten *E. coli* in deren Zellwand Poren gebildet werden, durch welche Plasmid-DNA in das Zellinnere gelangen kann. Dort wird sie von den Bakterien repliziert.

Die Aufbewahrung der chemisch kompetenten *E. coli* erfolgte in Aliquots von 100 µl bei -80 °C. Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut worden waren, wurde ihnen 1-5 ng Plasmid-DNA oder 60 ng eines Ligationsansatzes zugegeben. Es folgte eine Inkubationsphase von 30 Minuten, um eine gleichmäßige Verteilung der DNA sicherzustellen. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 30-45 Sekunden bei 42 °C durchgeführt, durch den sich Poren in der Zellwand der Bakterien bildeten, wodurch die DNA in das Zellinnere der *E. coli* gelangen konnte. Anschließend wurde die Suspension für fünf Minuten auf Eis gekühlt; danach wurden zu 50 µl *E. coli*-Suspension 250 µl SOC-Medium bei Raumtemperatur zugegeben. Diese Suspension wurde bei 37 °C und 220 rpm in einem Schüttler für 60 Minuten inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Agarplatten verteilt, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen enthielten, und diese über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

D.2.2.2 Kultivierung und Selektion transformierter *E. coli*-Stämme

D.2.2.2.1 Wachstumsmedium

E. coli wurden im Wachstumsmedium DYT (pH 7,5) kultiviert. Festes Nährmedium wurde durch Zugabe von 15 g/dl Bacto-Agar zum DYT-Medium vor dem Autoklavieren hergestellt.

D.2.2.2.2 Antibiotika als Selektionsmittel

Um erfolgreich transformierte *E. coli*-Stämme selektionieren zu können, wurde dem jeweiligen Wachstumsmedium entsprechend der vom Plasmid getragenen Resistenz Kanamycin oder Ampicillin beigemischt. Es wurden Endkonzentrationen von 200 µg/ml für Ampicillin und 50 µg/ml für Kanamycin verwendet. Die Stocklösungen (200 mg/ml bzw. 50 mg/ml) der Antibiotika wurden durch Lösen in 70 %igem Ethanol für Ampicillin bzw. in sterilem ddH₂O für Kanamycin hergestellt.

D.2.2.2.3 Herstellung und Lagerung der Stammsammlung von *E. coli*-Stämmen

Für die Lagerung transformierter *E. coli*-Stämme wurden zunächst einzelne Klone in flüssigem DYT und dazugehörigem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 3 ml dieser Suspension mit 500 µl sterilem Glycerin (100 %) vermischt. Die Lagerung dieser Kultur erfolgte bei -80 °C. Jede Probe wurde in den Stammsammlungskatalog des Labors eingetragen. Jeder Eintrag beinhaltete den Genotyp der verwendeten *E. coli*, die Antibiotikaresistenz und das transformierte Plasmid. Für eine kürzere Lagerung der *E. coli*-Transformanten wurden Agarplatten mit Antibiotika verwendet, die nach Inkubation für zwölf Stunden bei 37 °C und im Anschluss bei 4 °C für bis zu sechs Wochen aufbewahrt wurden.

D.2.3 Zellbiologische Methoden

D.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Stammzellen, HT1080 und HEK-293 wurden jeweils auf die gleiche Weise kryokonserviert. Unterschiedlich waren allerdings je nach Zelllinie die Nährmedien, die zum Einfrieren verwendet wurden. Unabhängig von der Zellart wurden die Zellen zunächst trypsinisiert und ausgezählt, danach pro Kryoröhrchen der Fa. Nunc, Wiesbaden zwischen 0,5 bis 2 x 10⁶ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium eingesetzt. Die Röhrchen wurden nach mindestens zwei Stunden langer Kühlung bei -20 °C anschließend in einem Gefrierschrank bei -80 °C für weitere zwölf Stunden gelagert und letztendlich in flüssigem Stickstoff konserviert.

Als Einfriermedium wurde für hMSC ein Medium bestehend aus 65 % αMEM, 30 % FBS und 5 % DMSO verwendet. Für HT1080 und HEK-293 Zellen setzte sich das Einfriermedium aus 65 % DMEM, 30 % FBS und 5 % DMSO zusammen.

Um die Zellen in den Kryoröhrchen nach längerer Lagerung in Stickstoff wieder aufzutauen, wurden sie kurz in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, der Inhalt anschließend in 5 ml Medium bei Raumtemperatur gegeben und diese Lösung bei 500 x g für fünf Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren. Nun konnte das DMSO-haltige Einfriermedium abgesaugt werden, ohne die Zellen zu verlieren. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml ihres entsprechenden Kulturmediums behutsam resuspendiert, um die Zellen nicht zu schädigen. Die Suspension wurde in T75-Zellkulturflaschen gegeben und noch weitere 7 ml Kulturmedium zugegeben.

D.2.3.2 Kultivierung von Zellen

In T75-Zellkulturflaschen und dem entsprechenden Medium wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Analog zum Einfriermedium unterschied sich auch das Kulturmedium je nach Zelllinie. hMSC wurden in α MEM kultiviert, das 16,5 % FBS enthielt, HT1080 und HEK-293 Zellen in DMEM mit 10 % FBS. Beiden Medien enthielten außerdem 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin, um bakteriellen Kontaminationen vorzubeugen. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Bei Konfluenz der Zellen wurden sie entweder gesplittet oder für weitere Experimente verwendet.

D.2.3.3 Splitten von konfluenten Zellen

Waren Zellen in einer Kulturflasche zu 90 % konfluent, wurden sie gesplittet, d.h. unter Verwendung von Trypsin/EDTA-Lösung wurden die an der Kulturflasche adhärenen Zellen vom Kunststoff gelöst, um sie anschließend in mehrere Flaschen oder Versuchskavitäten aufzuteilen. Im Einzelnen setzten sich die Arbeitsschritte wie folgt zusammen: zunächst musste aus den Kulturflaschen das Medium vorsichtig abgesaugt werden. Um auch Reste des Mediums zu entfernen, wurden die Zellen in der T75-Flasche mit 3 ml PBS gewaschen. Auch dieses wurde anschließend abgesaugt. Nach dem Waschen wurde Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für bis zu zehn Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Aktivität des Trypsins zu erhöhen. Waren die Zellen von ihrer Kulturflasche gelöst, wurde die Suspension in ein Reaktionsröhrchen überführt und bei 500 x g zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren und so vom trypsinhaltigen Medium trennen zu können. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und neu ausgesät.

D.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellzahlen bestimmt, z.B. um in Versuchen eine gewünschte Zellmenge aussäen zu können. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zahl mit folgender Formel bestimmt:

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

D.2.3.5 Transiente Transfektion von Plasmiden und siRNA

Ziel der transienten Transfektion ist es, zellfremde DNA oder RNA in eukaryote Zellen zu schleusen. In dieser Arbeit wurde hierzu die Methode der Lipofektion genutzt. Grundidee hierbei ist, dass sich aus der negativ geladenen Nukleinsäure und dem positiv geladenen, amphiphilen Lipofektionsreagenz Mizellen bilden können. Diese bestehen aus einer kugelförmigen Doppelmembran, die im Inneren die in die Zelle zu bringende Nukleinsäure enthält. Mizellen können durch Endozytose von eukaryoten Zellen aufgenommen werden, im Inneren der Zelle wird ihr Inhalt wieder freigesetzt und die zellfremde Nukleinsäure gelangt schließlich in den Zellkern (Zabner, Fasbender et al. 1995). Eine zur Hypothese der Endozytose alternative Idee besagt, dass die Liposomen oder Mizellen direkt mit der Zellmembran fusionieren können und die Nukleinsäure auf diesem Weg in das Innere der Zelle kommt (Felgner, Gadek et al. 1987). Die Schritte der Lipofektion sind identisch für die verschiedenen verwendeten Zellarten und für die unterschiedlichen Nukleinsäurearten und werden deshalb im Folgenden allgemein erläutert.

In Vorbereitung auf eine Transfektion wurden die Zellen einen Tag vor Durchführung des Experimentes in einer Konfluenz von in etwa 60 % in 6-well Kavitäten ausgesät. Höhere Konfluenz wurde vermieden, da dies die Transfektionseffizienz negativ beeinflusste. Im ersten Arbeitsschritt wurde Lipofectamine 2000 (Fa. Invitrogen) mit serumfreiem DMEM gemischt und für fünf Minuten inkubiert. Als nächstes wurde die zu transfizierende Nukleinsäure dazugegeben und dieses Gemisch für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu verwendende Menge Lipofectamine 2000 berechnete sich mit der folgenden Formel für Plasmid-DNA, welche immer in einer Endkonzentration von 1,92 µg/6-well Kavität eingesetzt wurde:

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

Für die Transfektion von siRNA wurde folgende Formel verwendet, wobei siRNAs in einer Endkonzentration von 40 nM/Kavität eingesetzt wurden:

$$V(\text{Lipofectamine 2000}) = n(\text{siRNA in nM}) \times 2$$

Während der 20-minütigen Inkubation wurde das alte Kulturmedium der Zellen abgesaugt und durch frisches ersetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Lipofektionsansatz tropfenweise und gleichmäßig in das Medium der in 6-well Kavitäten ausgesäten Zellen gegeben. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von sechs Stunden bei 37 °C. Abschließend wurde der Lipofektionsansatz abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt.

D.2.4 Proteinchemische Methoden

D.2.4.1 Isolierung von Zytoplasma- und Membranproteinen

Um den Knockdown von β -Catenin in HT1080-Zellen auf Proteinebene nachzuweisen, wurde die Western Blot Methode eingesetzt. Hierzu mussten zunächst die zytoplasmatischen Proteine aus den Zellen isoliert werden. Die Zellen wurden nach einer definierten Zeit nach Transfektion zunächst trypsiniert, sedimentiert und in PBS resuspendiert. Die Zellen wurden ausgezählt und Aliquots á 100000 Zellen generiert. Danach wurde bei 500 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 18 μ l Lysepuffer (50 mM Na₂HPO₄; 50 mM NaH₂PO₄, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100; 1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Cocktail; pH 6,0) resuspendiert und anschließend gemischt, um die Zellen aufzulösen. Das Zelllysate wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 x g für zehn Minuten und bei 4 °C zentrifugiert. So erhielt man die löslichen zytoplasmatischen Proteine im Überstand. Dieser wurde zur weiteren Verwendung in ein neues Gefäß transferiert und mit 5 μ l Laemmli-Auftragspuffer (0,4 M Tris, pH 6,8, 4 % SDS, 20 %, Glycerol, 10 % DTT, eine Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt.

D.2.4.2 Western Blot und Proteinnachweis

D.2.4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen bzw. zu identifizieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Proteinlysate wurden hierzu auf ein Gel aufgetragen und mittels diskontinu-

ierlicher Elektrophorese (Laemmli 1970) aufgetrennt. Die verwendeten Gele und Puffer enthielten SDS. Dieses ist notwendig, um die 3D-Struktur der Proteine zu denaturieren und den Proteinen - entsprechend ihrem Molekulargewicht - eine negative Ladung zu verleihen. Es wurden Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10 % verwendet. Die Proben, die bereits Laemmli-Auftragspuffer enthielten, wurden in die Geltaschen aufgetragen, nachdem sie für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 5000 x g für zehn Sekunden zentrifugiert worden waren. Zunächst wurde für die ersten 15 Minuten der Elektrophorese eine Spannung von 80 V angelegt, danach für weitere 60 Minuten eine Spannung von 120 V. Das Gel befand sich hierbei in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) in einem TransBlot Module der Fa. Biorad, München. Neben den Proben wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen, um später das gesuchte Protein ermitteln zu können.

D.2.4.2.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden sie - ebenfalls im TransBlotModule der Firma Biorad - auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Vor dem eigentlichen Transfer der Proteine wurde die Membran zunächst für 15 Minuten in methanolhaltigem Transferpuffer (25 mM Tris-Base, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol) äquilibriert. Der Transfer wurde in Transferpuffer bei 70 mA für 90 Minuten durchgeführt. Das Transfersystem setzte sich, wie folgt, zusammen: Kathode, Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, Schwamm und Anode.

D.2.4.2.3 Immundetektion der Zielproteine

Um die gesuchten Proteinbanden – in diesem Fall β -Catenin bzw. als Kontrolle β -Aktin - sichtbar machen zu können, wurden die entsprechenden Primär- und Sekundärantikörper und TBST-Puffer (20 mM TRIS/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton X-100) verwendet. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte erläutert, die nach modifizierten Angaben von Gershoni und Palade (Gershoni and Palade 1983) durchgeführt wurden. Alle Reaktionsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde in 5 %iger Magermilchlösung auf Basis von Aqua dest. inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, mögliche freie Bindungsstellen an den Proteinen zu sättigen, an denen die Primärantikörper sonst fälschlicherweise binden könn-

ten. Als nächstes erfolgte eine einstündige Inkubation in TBST-Puffer, in dem die Primärantikörper in ihrer jeweilig verdünnten Konzentration gelöst waren (siehe Tabelle D-18). Es folgten zwei Waschschriffe von jeweils zehn Minuten in reinem TBST-Puffer, um Reste des Primärantikörpers zu entfernen. Danach wurde die Membran für weitere 30 Minuten in TBST-Puffer inkubiert, der die Sekundärantikörper in verdünnter Konzentration enthielt. Abschließend wurde wieder zweimal für zehn Minuten in reinem TBST-Puffer gewaschen.

Tabelle D-18: Verdünnungen von Primär- und Sekundärantikörpern

Primärantikörper	Verdünnung	Puffer	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti- β -Catenin	1:600	TBST	Anti-rabbit	1:10000
Anti- β -Aktin	1:500	TBST	Anti-goat	1:16000

Um die gesuchten Proteinbanden auf der Membran schließlich auf einem Film sichtbar machen zu können, musste sie noch zuvor für 60 Sekunden in Entwicklerlösung (R&D Systems, USA) gegeben werden. Prinzip der Visualisierung ist, dass der Sekundärantikörper, der an den F_C -Teil des proteinspezifischen Primärantikörpers bindet, mit *horseradish peroxidase* (HRP) markiert ist. Die Entwicklerlösung enthält Luminol, dessen Oxidation durch HRP katalysiert wird. Diese Chemolumineszenzreaktion emittiert Licht der Wellenlänge 428 nm.

D.2.4.3 Gaussia-Luciferase-Aktivitätsquantifizierung

Um die Aktivität der unterschiedlichen Fzd8-Promotorvarianten oder des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges messen zu können, wurde als Reporterprotein die Gaussia Luciferase verwendet bzw. als Reporterplasmide pGLuc-Basic (siehe D.1.4.2) oder pN3-Bar-GLuc. Die für Gaussia Luciferase kodierenden Plasmide wurden in hMSC oder HT1080 transfiziert und so konnte bei Erfolg der Transfektion deren Aktivität im Überstand der Zellen bestimmt werden. Die Gaussia Luciferase-abhängige Reaktion benötigt kein ATP. Das Enzym katalysiert die Oxidation des Substrates Coelenterazin, wobei Licht mit der Wellenlänge 466 nm emittiert wird. Hierzu wurde das Gaussia-Luciferase-Kit der Fa. NEB verwendet. Nach unterschiedlichen, definierten zeitlichen Abständen nach Transfektion wurden jeweils 50 μ l des Überstandes des Zellmediums abgenommen und in eine Kavität einer schwarzen 96-Wellplatte überführt. Zu den 50 μ l Überstand wurde vor der Messung das Gaussia Luciferase-Substrat gegeben, welches vorher im dazugehörigen Puffer in 100-facher Konzentration in 50 μ l gelöst worden war. Es wurde darauf geachtet, dass das Zeitfenster zwischen Zugabe des Substrat und dem Messvorgang sehr kurz war, um den Verlust an Luciferase-Aktivität möglichst gering zu halten. Die Messung erfolgte in einem Luminometer, dem Spectrofluorimeter

Safire 2, TECAN, Crailsheim, bei 466 nm. Das Messergebnis wurde in *relative light units* (RLU) angegeben und anschließend in einer Doppelbestimmung auf die Gesamtproteinmenge einer Probe mittels des BCA-Assays normiert.

D.2.4.4 BCA-Assay

Um die Gesamtproteinmenge in Zellüberständen bestimmen zu können, wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Proteine und Bicinchoninsäure (BCA) unter Zugabe von Cu^{2+} einen blauen Cu^{2+} -Komplex ausbilden. Dieser Komplex kann quantitativ bei 560 nm bestimmt werden und korreliert positiv mit der Gesamtproteinmenge.

In Vorbereitung der Messung wurden 50 μl der zu analysierenden Probe 130 μl Lysepuffer, bestehend aus 10 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl_2 und 1 mM EGTA mit 2 μM β -Mercaptoethanol und 1 % (v/v) Proteinase-Inhibitor, zugegeben und anschließend für 120 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schwenker inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Übertragung der Lösung in transparente 96-Kavitate und die Zugabe von 100 μl Uptima-Lösung (Fa. Interchim, Frankreich). Es wurde anschließend für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde die optische Dichte bei 562 nm mittels eines ELISA-Readers bestimmt. Mittels einer Standardkurve, die anhand einer Verdünnungsreihe von BSA in einer Konzentration von 1 mg/ml bis 15,6 $\mu\text{g/ml}$ erstellt wurde, konnte die Quantifizierung der Proteinkonzentration der Probe erfolgen.

D.2.4.5 Proteindetektion durch Fluoreszenznachweis

Da in dieser Arbeit teilweise Plasmide sehr unterschiedlicher Größe transfiziert wurden, sollte sichergestellt werden, dass mit allen gleiche Transfektionsraten erzielt wurden. Dafür wurden das Plasmid pEGFP-N3 mit jeweils einem besonders großen und einem relativ kleinen Plasmidkonstrukt kotransfiziert. Erfolgreich mit pEGFP-N3 transfizierte Zellen sollten unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm grünes Licht der Wellenlänge 507 nm ausstrahlen. Anhand der grün leuchtenden Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl kann auf den Anteil erfolgreich transfizierter Zellen geschlossen werden. Hierzu wurden unter dem Mikroskop in drei verschiedenen Gesichtsfeldern einer 6-well-Kavität alle sichtbaren Zellen unter normalem Licht und alle grün fluoreszierenden Zellen unter Exzitation bei 488 nm ausgezählt. Der Quotient aus beiden Summen steht für die Transfektionseffizienz.

D.2.5 Datenanalyse

Für die Analyse der Daten wurde das Programm Excel (Microsoft Office XP) verwendet. Statistische Signifikanz wurde mittels Durchführung des Student's T-Test ermittelt. Es wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung jeweils zweier Triplikat-Ansätze miteinander verglichen. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ (*) bzw. $< 0,01$ (**) angesetzt.

E Ergebnisse

E.1 Klonierung des Fzd8-Promotors und trunkierter Varianten

E.1.1 Kartierung des Fzd8-Transkriptionsstarts mittels der RLM-RACE-Methode

Im Rahmen der Analyse der Fzd8-mRNA bzw. zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurde in unserem Labor eine *RNA-ligase mediated rapid amplification of cDNA ends* (RLM-RACE) mit cDNAs aus verschiedenen Zellpopulationen (HT1080, hMSC und HEK293) durchgeführt (Geißler et al., persönliche Mitteilung). Hierbei wurden unterschiedliche, am 5'-Ende verkürzte und auch verlängerte Fzd8-mRNAs detektiert, deren Translation im Vergleich zur publizierten Fzd8-mRNA (NM_031866.2) teilweise zu einer um 52 Aminosäuren verkürzten Proteinisoform führt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in diesen Varianten das erste Startcodon der mRNA nicht mehr vorhanden ist. Die Abweichungen zum publizierten Transkriptionsstart (TSS) bewegten sich in einem Rahmen von bis zu 20 bp *upstream* bis 72 bp *downstream*. Ausschließlich in HT1080-Zellen wurden zwei zusätzliche TSS detektiert, die die Translation eines vollständigen Fzd8-Proteins garantieren. In den anderen beiden Zelllinien wurden nur weitere TSS *downstream* des publizierten TSS gefunden, deren Translation zu einem N-terminal verkürzten Protein führt (Lechner 2013).

Um die Promotorregion von Frizzled 8 zu charakterisieren, sollte deshalb ein DNA-Abschnitt von 2233 bp amplifiziert werden, der bis auf eine Überlappung von 45 bp mit der Fzd8-mRNA *upstream* vom publizierten TSS liegt. Es wurde davon ausgegangen, dass dieser Bereich alle für die Promotorfunktion relevanten Abschnitte beinhalten sollte. Für die Amplifizierung des Bereiches wurden die beiden Primer Fzd8-Prom-forw-*EcoRV* und Fzd8-Prom-rev-*BamHI* generiert. Die 45 bp, die mit der Fzd8-mRNA überlappen, beinhalten die 5'-UTR von Fzd8 (5 bp) und die ersten 40 bp, die für das Fzd8-Signalpeptid kodieren, aber in verkürzten mRNA-Produkten noch als Promotorbereich fungieren.

Strukturell weist der Promotor von Fzd8 einige Besonderheiten auf. Er besitzt in der Nähe des publizierten TSS weder eine TATA-Box, noch ein *B recognition element* (BRE), noch ein Initiator-Element (Inr) oder eine CAAT-Box. Es lässt sich somit kein typischer *core*-Promotor identifizieren. Der GC-Gehalt des klonierten putativen *full length*-Promotors liegt bei 64 % und bietet dadurch vielfältige Möglichkeiten zur epigenetischen Modifizierung zum Beispiel in Form von Methylierungen.

E.1.2 Generierung des Reporterplasmids pGLucBasic-Fzd8Promotor

In Absicht die Fzd8-Transkriptionsregulation und den Fzd8-Promotor näher charakterisieren zu können, sollte der Promotor in das Reporterplasmid pGLuc-Basic ligiert werden, um später dieses Plasmid in eukaryote Zellen transfizieren und die Aktivität des Promotors mittels des Reportergens *Gussia Luciferase* quantifizieren zu können.

Die Fzd8-Promotorregion wurde im ersten Schritt aus humaner genomischer DNA mittels PCR unter Verwendung der Primer Fzd8-Prom-forw-379 und Fzd8-Prom-rev-135 amplifiziert. Diese erste PCR zeigte in der Gelelektrophorese nicht wie erwartet ein Produkt von 2700 bp (siehe Abbildung E-1 A), deshalb wurde eine *Nested-PCR* unter Verwendung der Primer Fzd8-Prom-forw-*EcoRV* und Fzd8-Prom-rev-*BamHI* angeschlossen, die wie erwartet ein Produkt in der Länge von 2233 bp zeigte (siehe Abbildung E-1 B). Dieses PCR-Produkt wurde nun in den Vektor pCR4.1-TOPO ligiert und sequenziert, um die korrekte Sequenz in Übereinstimmung mit der Datenbank sicherstellen zu können. Im nächsten Schritt wurde der Fzd8-Promotor aus dem Vektor pCR.4.1-TOPO über die Restriktionsenzymstellen *EcoRV* und *BamHI* ausgeschnitten (siehe Abbildung E-1 C). Das so präparierte DNA-Fragment konnte nun in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pGLuc-Basic ligiert werden. So wurde das Plasmid pGLuc-Basic-Fzd8Promotor generiert (siehe Abbildung E-1 D). Zuletzt erfolgte eine Restriktionsanalyse des Plasmids, um sicherzustellen, dass sich das Insert im Vektor befindet. Wiederum wurden *EcoRV* und *BamHI* bzw. als Kontrolle *SacII* verwendet. Nach Lage der Schnittstellen auf dem Vektor mussten diese beiden Ansätze Banden bei 4920 bp (pGLuc-Basic) und 2233 bp (Fzd8-Promotor) für den Verdau mit *EcoRV* und *BamHI* bzw. für den Verdau mit *SacII* Banden bei 6430 bp und 723 bp ergeben. In beiden Restriktionsansätzen konnte das erwartete Bandenmuster mittels der Gelelektrophorese bestätigt werden (siehe Abbildung E-1 E).

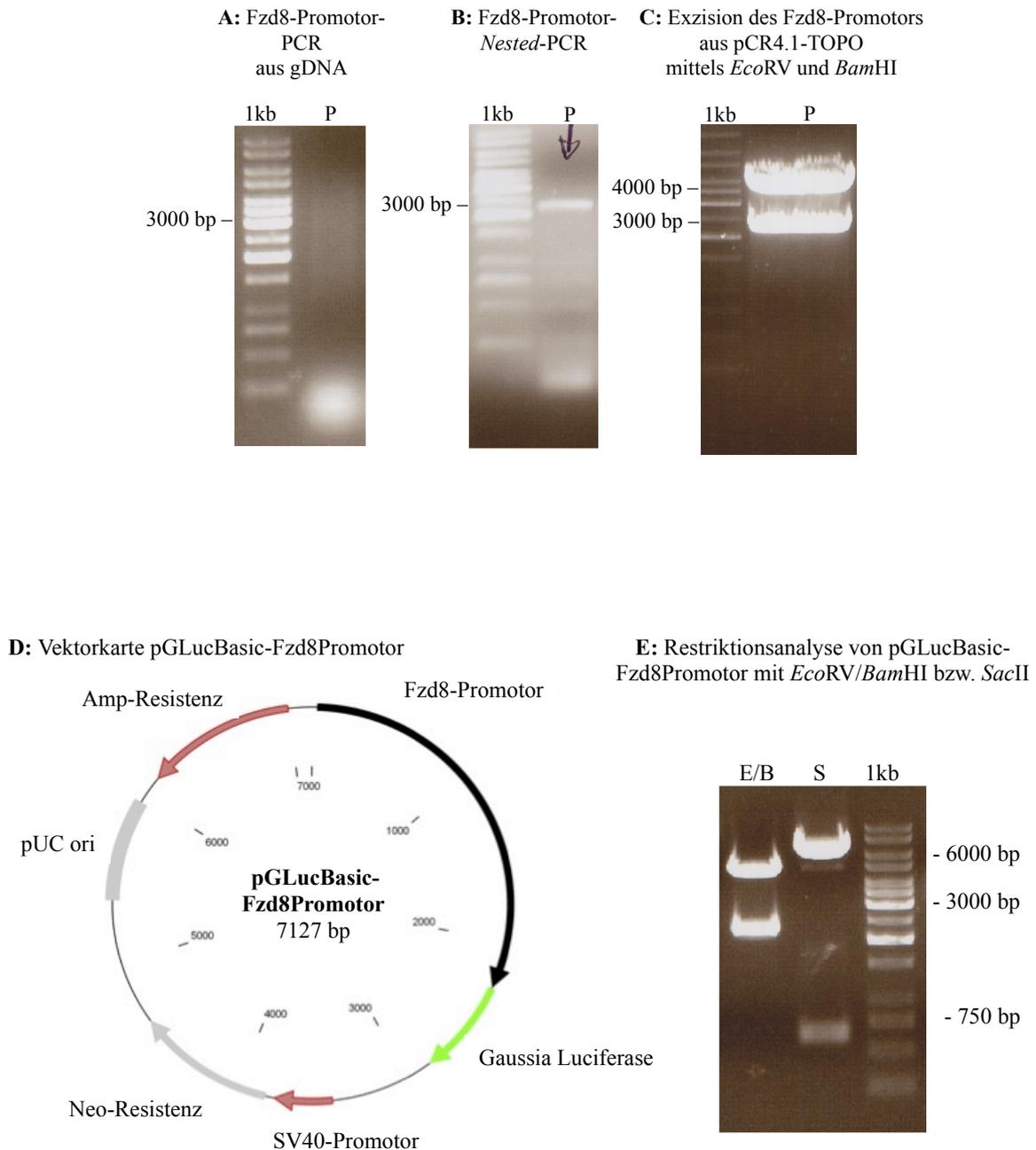


Abbildung E-1: Klonierung des Reporterplasmids pGLucBasic-Fzd8Promotor.

- A:** Kein Nachweis des Fzd8-Promotor PCR-Produkts aus gDNA bei 2700 bp
- B:** Nachweis des Produktes der Fzd8-Promotor-Nested-PCR bei 2233 bp
- C:** Nachweis von Banden bei 3957 bp (Vektor pGLucBasic) und 2233 bp (Insert Fzd8-Promotor)
- D:** Vektorkarte des pGLuc-Basic-Fzd8Promotor-Plasmids
- E:** Nachweis der entsprechenden Banden nach Restriktionsanalyse von pGLucBasic-Fzd8Promotor

1kb = DNA-Größenstandards, Amp-Resistenz = Ampicillin-Resistenz, E/B = Doppelverdau mit *EcoRV* und *Bam*HI, gDNA = genomische DNA, Neo-Resistenz = Neomycin-Resistenz, P = PCR-Produkt, pUC ori = Plasmid *University of California origin of replication*, S = Verdau mit *Sac*II, SV40-Promotor = *simian virus 40*-Promotor

E.1.3 Überprüfung der Funktionalität von pGLucBasic-Fzd8Promotor

Um sicherzustellen, dass das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Promotor funktionstüchtig ist, wurde es in HT1080-Tumorzellen transfiziert. Als Negativkontrolle diente hierbei die Transfektion des Vektors pGLuc-Basic, der vor dem Gaussia Luciferase-Gen keinen Promotor trägt. Am Tag zwei nach Transfektion wurden Überstände aus dem Medium der transfizierten Zellen abgenommen und die Gaussia Luciferase-Aktivität bestimmt. Die so erhaltenen *relative light units* (RLU) wurden auf die Gesamtproteinmenge mittels BCA-Assay normiert. Die zu pGLucBasic-Fzd8Promotor gehörigen Werte werden im Folgenden als Referenz verwendet und entsprechend als 100 % festgesetzt. Der pGLucBasic-Fzd8Promotor zeigte in HT1080-Zellen eine ca. siebenfach höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zu pGLuc-Basic (siehe Abbildung E-2).

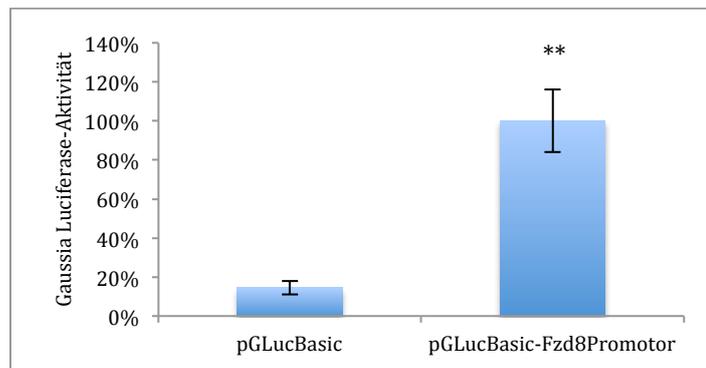


Abbildung E-2: pGLucBasic-Fzd8Promotor in HT1080, Tag 2.

Die Aktivität von pGLucBasic-Fzd8Promotor wurde als 100 % definiert. Dieses Plasmid zeigte in HT1080-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle pGLucBasic eine deutlich höhere Aktivität.

Der gleiche Versuch wurde auch in hMSC durchgeführt. In dieser Zellpopulation hingegen konnte bei pGLucBasic-Fzd8Promotor eine nicht signifikante, im Mittel um 12 % höhere Gaussia Luciferase-Aktivität als bei pGLuc-Basic nachgewiesen werden (Abbildung E-3).

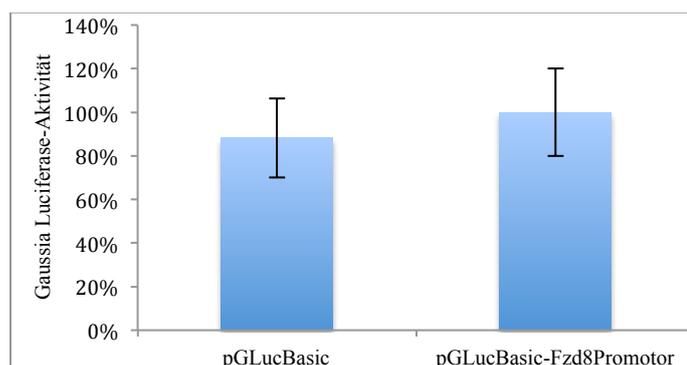


Abbildung E-3: pGLucBasic-Fzd8Promotor in hMSC, Tag 2.

E.1.4 Überprüfung der Vollständigkeit der putativen Promotorregion

Um sicherzustellen, dass das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Promotor alle wichtigen Elemente der Fzd8-Promotorregion enthält, sollte eine in 5'-Richtung um ca. 1100 bp längere Promotorvariante generiert und diese ebenfalls in den Vektor pGLuc-Basic ligiert werden. So wurde das Plasmid pGLucBasic-Fzd8PromotorXL generiert. Die Gaussia Luciferase-Aktivität dieses Konstrukts sollte mit der von pGLucBasic-Fzd8Promotor verglichen werden.

Für die PCR-Amplifikation wurde gDNA eingesetzt und die Primer Fzd8-Prom-forw-Exten (beinhaltet Schnittstelle für *EcoRV*) und Fzd8-Prom-rev-BamHI verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *BamHI* verdaut und über diese Schnittstellen in den Zielvektor ligiert. Am Ende erfolgte wieder ein analytischer Restriktionsverdau der generierten Klone mit *EcoRV*, *BamHI* und in der Kontrolle mit *SacII*, um den Erfolg der Ligation zu überprüfen. Das erwartete Bandenmuster von 4920 bp (Vektor) und 3305 bp (Insert) für den Verdau mit *EcoRV* und *BamHI* bzw. 625 bp und 7600 bp für *SacII* konnte mittels einer analytischen Gelelektrophorese bestätigt werden (siehe Abbildung E-4).

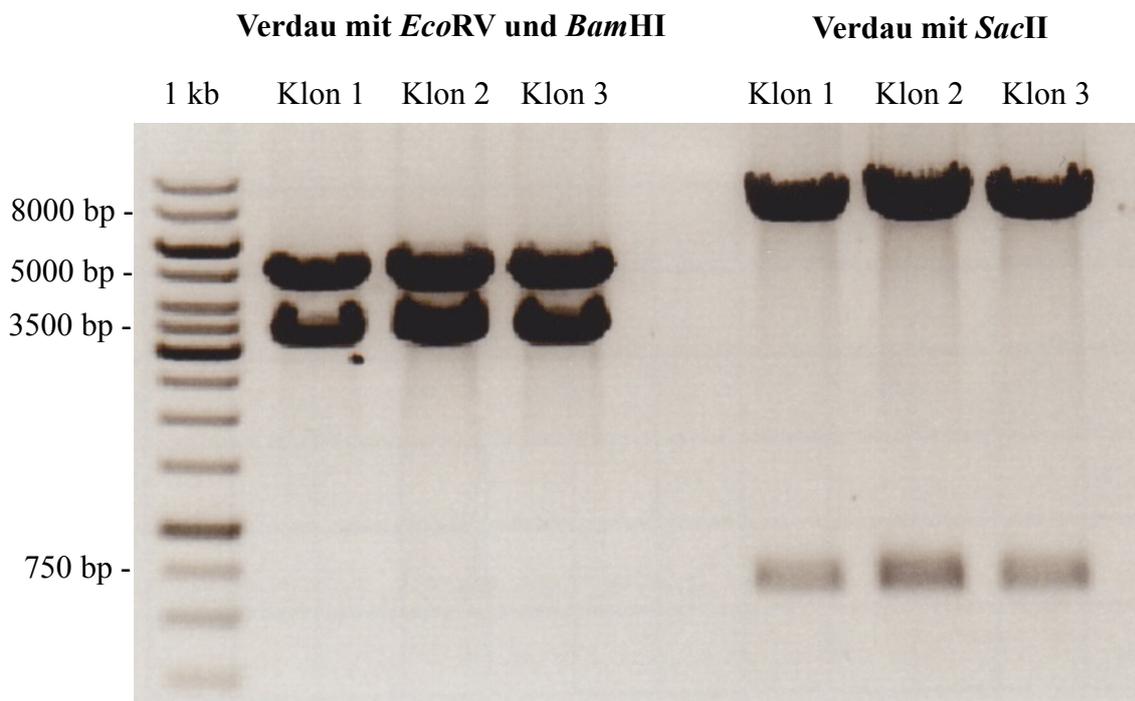


Abbildung E-4: Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau verschiedener Klone von pGLucBasic-Fzd8PromotorXL.

Auch nach mehreren Versuchen konnte in der Sequenzierung kein völlig fehlerfreies Plasmid dieser prolongierten Promotorvariante gefunden werden. Drei Plasmide konnten generiert werden, die im Vergleich zur Datenbanksequenz jeweils nur eine Punktmutation trugen. Die-

se drei Varianten wurden in HT1080-Zellen transfiziert und ihre Aktivität mit der von pGLucBasic-Fzd8Promotor verglichen (siehe Abbildung E-5). Das gleiche wurde auch in hMSC durchgeführt, allerdings nur mit einem der drei Plasmide (siehe Abbildung E-6).

Da ein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Plasmide pGLucBasic-Fzd8Promotor und pGLucBasic-Fzd8PromotorXL weder in HT1080 noch in hMSC festgestellt werden konnte, wurde angenommen, dass alle wesentlichen Elemente des Fzd8-Promotors in dem Konstrukt pGLucBasic-Fzd8Promotor, das die 2233 bp lange Promotorsequenz enthält, vorhanden sind. Auf weitere Versuche mit pGLucBasic-Fzd8PromotorXL wurde deshalb verzichtet.

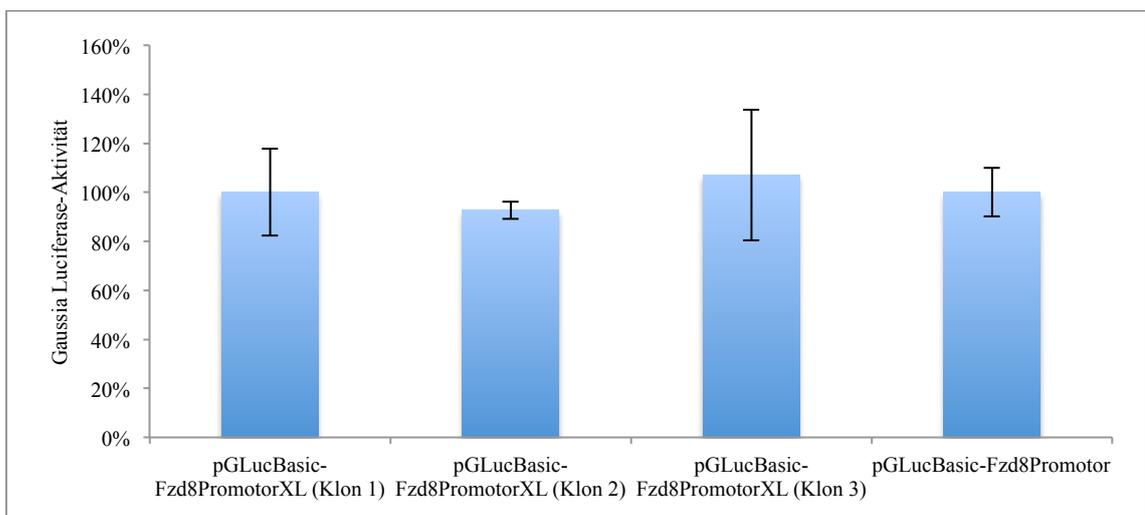


Abbildung E-5: Promotoraktivität verschiedener pGLucBasic-Fzd8PromotorXL-Klone in HT1080, Tag 2.

Die Aktivität von pGLucBasic-Fzd8Promotor wurde als 100 % definiert. Keine der längeren Promotorvarianten (pGLucBasic-Fzd8PromotorXL Klon 1-3) zeigte im Vergleich eine signifikant veränderte Promotoraktivität.

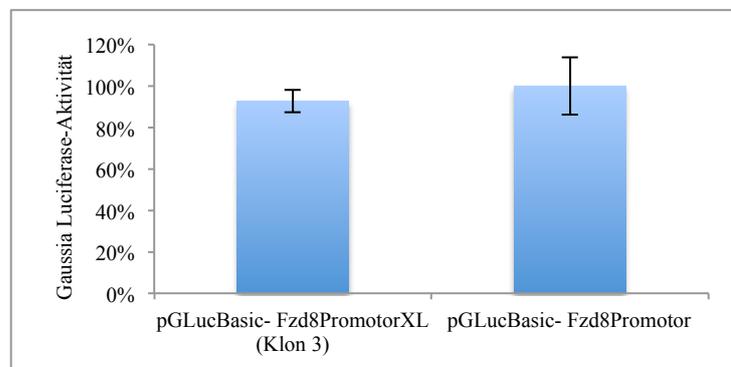


Abbildung E-6: pGLucBasic-Fzd8PromotorXL in hMSC, Tag 2.

Die Aktivität von pGLucBasic-Fzd8Promotor wurde als 100 % definiert. Die längere Promotorvariante (pGLucBasic-Fzd8PromotorXL Klon 3) zeigt im Vergleich keine signifikant veränderte Aktivität.

E.1.5 Klonierung 5'- und 3'-terminal trunkierter Promotorvarianten

Um die Promotorregion von *Fzd8* näher charakterisieren und in verschiedene Abschnitte einteilen zu können, wurden mehrere 5'- und 3'-trunkierte Varianten des Promotors generiert, die in das Reporterplasmid pGLucBasic ligiert wurden. Eine Verkürzung des Promotors führt zu einem Verlust von Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, die entweder repressiv oder aktivierend auf die Transkriptionrate wirken können. Durch Verkürzung des Promotors sollten daher Rückschlüsse auf aktivierende bzw. repressive Elemente ermöglicht werden. Als Matrize für jede Amplifikation der verschiedenen Varianten diente das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Promotor. Es wurden für die jeweilige PCR Primer generiert, die an definierten Stellen innerhalb der Promotorregion binden können und zudem die für die Klonierung notwendigen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthalten (siehe D.1.2.2). Alle Primer, mit denen am 5'-Ende trunkierte Promotorvarianten erstellt werden sollten, enthielten eine Schnittstelle für *EcoRV*; diejenigen, mit denen am 3'-Ende trunkierte Varianten amplifiziert werden sollten, eine Schnittstelle für *BamHI* (siehe Tabelle D-12). Auf diese Art konnte jede Promotorvariante über die gleichen Restriktions-Schnittstellen in den Vektor pGLuc-Basic ligiert werden. Das Verfahren wurde bereits unter E.1.2 für pGLucBasic-Fzd8Promotor beschrieben, allerdings wurde bei der Generierung der verkürzten Varianten auf eine Zwischenklonierung in den Vektor pCR4.1-TOPO verzichtet.

Durch transiente Transfektion dieser verschiedenen Promotor-Reporterplasmidvarianten in HT1080-, hMSC- und HEK293-Zellen sollte deren Aktivitätsniveau untereinander verglichen werden.

E.1.6 Sicherstellung gleicher Transfektionseffizienzen

In dieser Arbeit wurden Plasmide sehr unterschiedlicher Größe verwendet und transfiziert. Die Größe bewegte sich zwischen ca. 8300 bp (pGLucBasic-Fzd8PromotorXL) und ca. 5200 bp für das Plasmid mit der kürzesten 5'-terminal trunkierten Promotorsequenz von 195 bp. Um die mit diesen Plasmiden ermittelten Gaussia Luciferase Aktivitäten miteinander vergleichen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass mit allen Reporterplasmidkonstrukten gleiche Transfektionseffizienzen erzielt werden konnten. Hierzu wurde eine Kotransfektion von jeweils dem größten und dem kleinsten *Fzd8*Promotor-Reporterplasmid zusammen mit dem Plasmid pEGFP-N3 in hMSC durchgeführt. pEGFP-N3 diente hierbei als Transfektionskontrolle (siehe Herstellerinformationen <http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pEGFP-N3.pdf>). Als Positivkontrolle wurde pEGFP-N3 alleine transfiziert.

Für die Transfektion wurde immer die gleiche Gesamtmenge an Plasmid-DNA von 1,92 µg pro 6-well Kavität eingesetzt. Im Falle der Kotransfektion von zwei Plasmiden wurden von jedem Plasmid jeweils 0,96 µg pro 6-well Kavität eingesetzt.

Unter dem Mikroskop wurden an Tag 3 nach Transfektion in jeder Kavität jeweils drei Gesichtsfelder ausgezählt und jeweils einmal die Gesamtzahl der Zellen und einmal die Zahl EGFP-positiver Zellen bestimmt. Die Transfektionseffizienz wurde dadurch ermittelt, dass die Zahl der mit EGFP markierten Zellen mit der der unmarkierten Zellen in Relation gesetzt wurde.

Die Auszählung der Zellen ergab, dass unabhängig von der Größe des kotransfizierten Fzd8Promotor-Reporterplasmids ca. 30 % aller Zellen mit EGFP markiert waren (siehe Abbildung E-7). Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Transfektionseffizienzen der einzelnen Plasmide festgestellt werden.

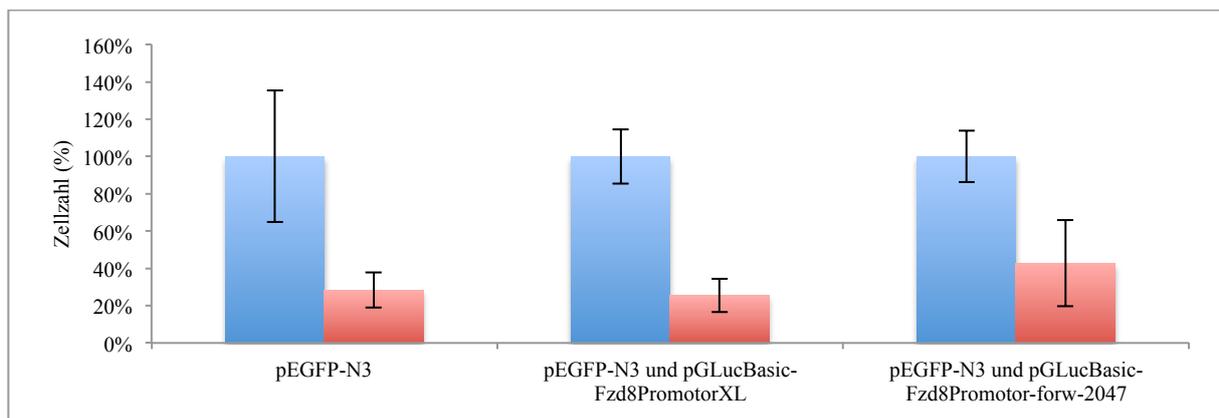


Abbildung E-7: Auszählung von hMSC nach Transfektion verschiedener Plasmide an Tag 3.

Die blauen Balken stehen für die Gesamtzellzahl, die als 100 % definiert wurde, die roten Balken für den Anteil der EGFP-markierten Zellen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Transfektionseffizienzen verschieden großer Plasmide.

E.2 Fzd8-Promotorstudien in hMSC, HT1080- und HEK293-Zellen

Alle wie unter D.2.1.1 und E.1.5 beschrieben generierten Fzd8Promotor-Reporterkonstrukte wurden transient in verschiedene Zelllinien transfiziert, um die Promotoraktivität vergleichend zu analysieren und damit aktivierende von repressiven Elementen innerhalb des Promotors unterscheiden zu können. In einem separaten Versuchsansatz wurden die mit den Reporterplasmiden transfizierten Zellen mit rekombinantem humanen Wnt3a

(rhWnt3a) in einer Konzentration von 75 ng/ml stimuliert. Damit sollte überprüft werden, ob die Stimulation mit Wnt3a mit einer verminderten Fzd8-Promotoraktivität assoziiert ist.

In diesem Zusammenhang konnte durch Frau Dr. Karow gezeigt werden, dass Fzd8 ein negatives Wnt-Targetgen darstellt (Karow 2008). Demnach müsste eine Wnt3a-Stimulation auch auf die Promotoraktivität negativ wirken. Alle Promotor-Reportergenplasmide wurden sowohl in HT1080 als auch in hMSC transfiziert, einzelne auch in HEK-Zellen.

Tabelle E-1 gibt einen Überblick über alle verwendeten Plasmide und ihre Nomenklatur.

Tabelle E-1: Nomenklatur der Fzd8-Promotor-Reportergenplasmide

Name des Plasmids	Länge der Promotorvariante in bp	Grafische Darstellung der Promotorvariante
pGLucBasic-Fzd8Promotor	2233 bp (<i>full length</i>)	
5'-terminal trunkierte Promotorvarianten		
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-316	1917 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-591	1642 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982	1251 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1339	894 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1558	675 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1742	491 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-2038	195 bp	
3'-terminal trunkierte Promotorvarianten		
pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763	1470 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-364	1869 bp	
pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-177	2056 bp	
5'- und 3'-terminal trunkierte Promotorvariante		
pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982-rev-763	488 bp	

E.2.1 Fzd8-Promotorstudien in HT1080-Zellen

E.2.1.1 Transfektion 5'-terminal-trunkierter Promotorvarianten

Die verschiedenen 5'-terminal trunkierten Promotorvarianten zeigten in HT1080 sehr unterschiedliche Aktivitäten. Alle bis auf den *full length*-Promotor wurden durch Stimulation mit rhWnt3a reprimiert. Statistische Signifikanz wurde allerdings im Vergleich zu unstimulierten Zellen nicht erreicht (p-Werte zwischen 0,1 und 0,9). Es zeigte sich, dass eine Deletion der ersten 316 bp des Promotors zu einer Aktivitätssteigerung auf 193 % führte (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-316). pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-591 wies allerdings eine Aktivität von nur 156 % auf. Eine weitere Aktivitätszunahme auf 342 % (p-Wert 0,045) zeigte sich nach Deletion der ersten 982 bp (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982).

Die bei Basenpaar 1339 und 2038 des *full length*-Promotors verkürzten Promotorvarianten zeigten wiederum eine signifikant niedrigere Aktivität als der pGLucBasic-Fzd8Promotor. Sie lag zwischen 32 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1339) und 8 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-2038). Die Aktivitätswerte der Plasmide pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1558 und pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-2038 lagen im Mittel sogar bis zu 5 % unter dem der Negativkontrolle durch pGLucBasic. Abbildung E-8 stellt eine grafische Übersicht über die Versuchsergebnisse dar.

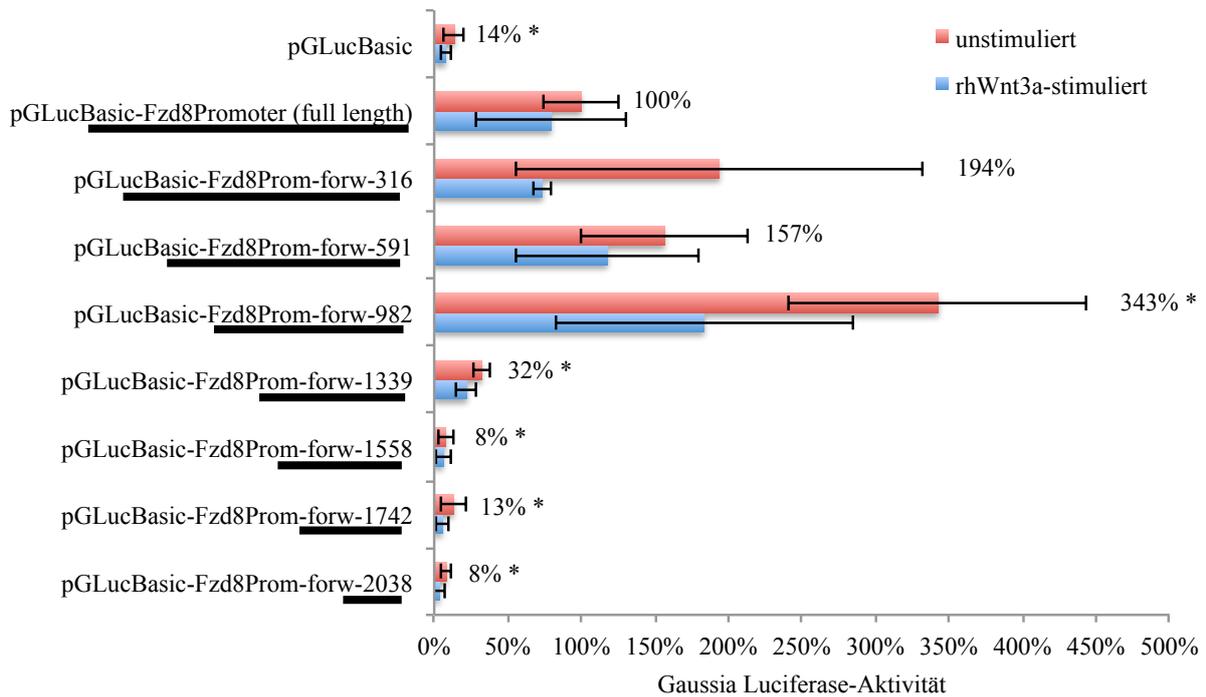


Abbildung E-8: Aktivität 5'-terminal trunkierter Promotorvarianten in HT1080 zwei Tage nach Transfektion.

Signifikanzen sind immer auf den Wert von pGLucBasic-Fzd8Promotor (*full length*) (unstimuliert) bezogen, der als 100 % definiert wurde. Tendenziell zeigte sich eine negative Wirkung auf die Promotoraktivität durch Wnt3a-Stimulation, die Werte ergaben jedoch im Vergleich zu unstimulierten Zellen keine statistische Signifikanz. Die schwarzen Balken unter den Plasmidnamen stellen eine grafische Darstellung der jeweiligen Promotorvariante dar.

E.2.1.2 Transfektion 3'-terminal und beidseitig trunkierter Promotorvarianten

Die am 3'-Terminus verkürzten Promotorvarianten zeigten sehr unterschiedliche Aktivitäten. Auch diese wurden durch Wnt3a negativ reguliert, allerdings nicht mit statistischer Signifikanz (p-Werte zwischen 0,06 und 0,5). Analog zu den niedrigen Aktivitäten der Konstrukte pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1339, -forw-1742 und -forw-2038, ging eine Deletion des Endstückes des Promotors mit einer Zunahme der Promotoraktivität einher. Bereits die 3'-terminale Verkürzung des Promotors um 177 bp (pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-177) zeigte eine Aktivität von 379 %. pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-364 wies eine Aktivität von 105 % auf. Dies legt nahe, dass sich in den letzten 364 bp des Promotors nicht nur repressive, sondern auch aktivierende Elemente befinden müssen, die in dieser Verkürzungsvariante deletiert wurden. Die 3'-terminale Verkürzung um 763 bp (pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763) bewirkte eine Zunahme der Promotoraktivität auf 2075 %. Anhand dieser Daten konnte davon ausgegangen werden, dass sich im Bereich von Basenpaar 982 und 1470 ein stark aktivierendes Element (Enhancer) befinden muss. Es konnte in HT1080 gezeigt werden, dass dieser Bereich mit 1745 % ebenfalls eine sehr hohe Aktivität besitzt (siehe Abbildung E-9).

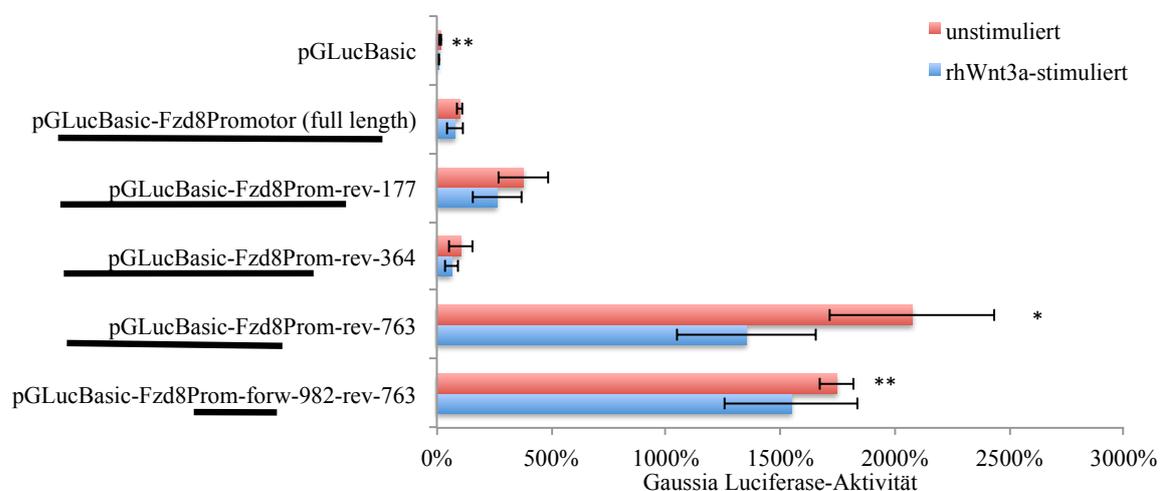


Abbildung E-9: Aktivität 3'-terminal trunkierter Promotorvarianten in HT1080, Tag 2 nach Transfektion.

Signifikanzen sind immer auf den Wert von pGLucBasic-Fzd8Promotor (*full length*) (unstimuliert) bezogen, der als 100 % definiert wurde. Die Negativkontrolle pGLucBasic zeigt im Vergleich zu pGLucBasic-Fzd8-Promotor eine signifikant niedrigere Aktivität. Es zeigte sich, dass eine 3'-terminale Verkürzung des Fzd8-Promotors mit einer signifikanten Zunahme seiner Aktivität einhergeht und der Bereich des putativen Enhancer-Elements (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982-rev-763) ebenfalls signifikant höhere Aktivität besitzt als der *full length*-Promotor. Die schwarzen Balken unter den Plasmidnamen repräsentieren eine grafische Darstellung der jeweiligen Promotorvariante.

E.2.2 Fzd8-Promotorstudien in hMSC

E.2.2.1 Transfektion 5'-terminal-trunkierter Promotorvarianten

Auch in hMSC wurden sämtliche Promotorvarianten transient transfiziert und in einem separaten Ansatz mit 75 ng/ml rekombinatem humanen Wnt3a stimuliert. Die Gaussia Luciferase-Aktivität wurde anschließend an Tag 2 bestimmt. Tendenziell zeigte sich ein ähnliches Aktivitätsmuster der Verkürzungsvarianten wie in HT1080, allerdings waren die Unterschiede weniger stark ausgeprägt.

Die Stimulation der transient transfizierten Zellen mit rhWnt3a zeigte keinen signifikant repressiven Effekt auf die Promotoraktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen (p-Werte zwischen 0,051 und 0,9). In der Tendenz ließ sich aber durch die Stimulation wie auch in HT1080 eine negative Regulation für fast alle Promotorvarianten zeigen.

Die 5'-terminale Verkürzung um 316 bp zeigte eine Aktivitätszunahme auf 171 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-316). Analog zu den Werten in HT1080 fiel die Aktivität mit der Verkürzung um 591 bp wieder auf 161 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-591). Die nächste Verkürzungsvariante pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982 erreichte Werte von 136 %. Die Werte dieser ersten drei Verkürzungsvarianten erreichten im Vergleich zu pGLucBasic-Fzd8Promotor (*full length*) keine statistische Signifikanz in hMSC.

Statistisch signifikant hingegen konnte auch in hMSC die Repression der Promotoraktivität durch seine 3'-terminal gelegenen letzten 894 bp gezeigt werden. Die Aktivitätswerte lagen hier bei 70 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1339), 60 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1558), 61 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-1742) und 57 % (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-2038). Damit lagen diese Werte wie auch in HT1080 deutlich unter dem Wert der Negativkontrolle pGLucBasic, die einen Gaussia Luciferase Wert von 101 % erzielte (siehe Abbildung E-10).

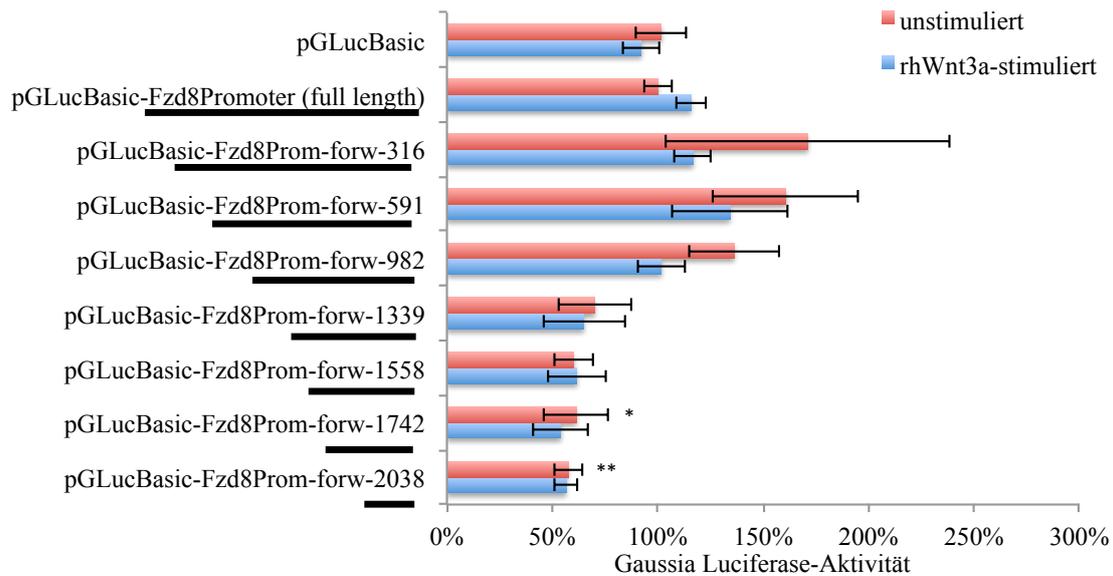


Abbildung E-10: Aktivität 5'-terminal trunkierter Promotorvarianten in hMSC, Tag 2 nach Transfektion.

Es konnte auch in Stammzellen gezeigt werden, dass sich vor allem im 3'-terminalen Bereich des Promotors stark repressive Elemente befinden müssen und ebenfalls im Bereich des 5'-Terminus. Werte von pGLucBasic-Fzd8Promotor (*full length*) wurden als 100 % definiert. Eine Wnt3a-Stimulation war mit einer leicht verminderten Promotoraktivität assoziiert. Die schwarzen Balken unter den Plasmidnamen repräsentieren eine grafische Darstellung der jeweiligen Promotorvariante.

E.2.2.2 Transfektion 3'-terminal- und beidseitig trunkierter Promotorvarianten

Die 3'-trunkierten Promotorvarianten verhielten sich nach Transfektion in hMSC ähnlich wie in HT1080, insgesamt aber zeigten auch diese Konstrukte in Stammzellen eine erheblich niedrigere Aktivität. Eine signifikante Aktivitätssteigerung im Vergleich zu pGLucBasic-Fzd8Promotor (*full length*) konnte nur für das putative Enhancer-Element gezeigt werden (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982-rev-763, Aktivität unstimuliert 231 %).

Auch bei diesem Versuch schien sich Wnt3a-Stimulierung negativ auf die Aktivität der Promotorvarianten auszuwirken. Allerdings konnte lediglich für das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982-rev-763 eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität nach Stimulierung mit rhWnt3a gezeigt werden (siehe Abbildung E-11).

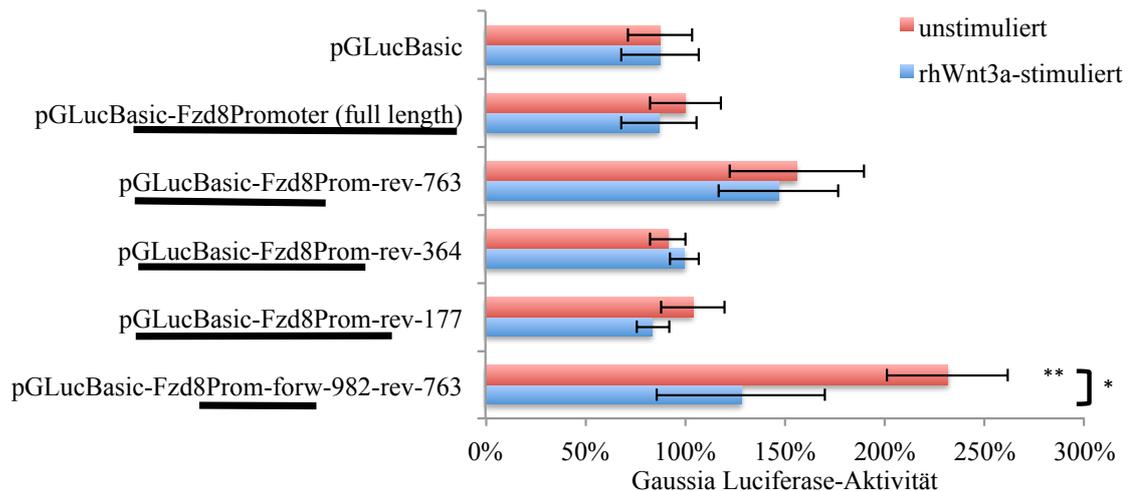


Abbildung E-11: Aktivität 3'-terminal trunkierter Promotorvarianten in hMSC, Tag 2 nach Transfektion.

Es konnte gezeigt werden, dass das putative Enhancer-Element (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-982-rev-763) auch in hMSC eine signifikant höhere Aktivität aufweist als der *full length*-Promotor. Die Werte von pGLucBasic-Fzd8Promotor wurden als 100 % definiert. Die schwarzen Balken unter den Plasmidnamen sind eine grafische Darstellung der Promotorvariante.

E.2.3 Fzd8-Promotorstudien in HEK293-Zellen

Die am 3'-Terminus verkürzten Promotorvarianten wurden auch in HEK293-Zellen transfiziert. pGLucBasic-Fzd8Promotor zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle pGLucBasic eine 12-fach höhere Aktivität. Die trunkierten Varianten verhielten sich in ihrer Aktivität in dieser Zelllinie interessanterweise anders als in hMSC und HT1080. In jenen Zelllinien zeigte das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763 die höchsten Gaussia Luciferase-Werte. In den HEK-Zellen aber war es das Konstrukt mit der 3'-terminal nur um 177 bp verkürzte Promotorvariante (pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-177), das die höchsten Werte erzielte (412 % im Verhältnis zu pGLucBasic-Fzd8Promotor). Die anderen beiden 3'-terminal verkürzten Promotorvarianten zeigten hingegen ähnliche Gaussia Luciferase-Werte wie der *full length*-Promotor (siehe Abbildung E-12).

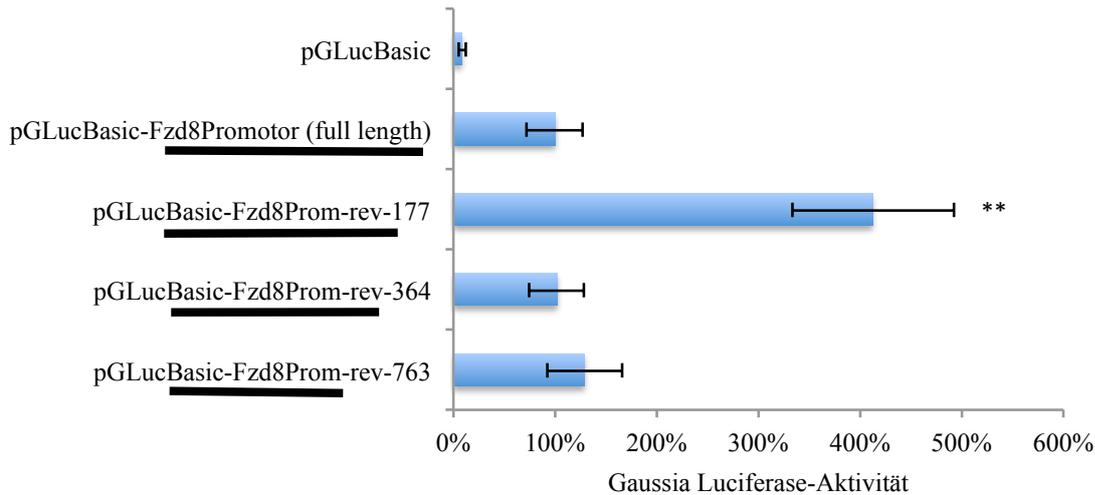


Abbildung E-12: Aktivität 3'-terminal trunkierter Promotorvarianten in HEK-Zellen, Tag 2 nach Transfektion.

Die Werte von pGLucBasic-Fzd8Promotor (*full length*) wurden als 100 % definiert. In HEK-Zellen zeigte das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-177 eine signifikant höhere Aktivität als der *full length*-Promotor. Dies deutet darauf hin, dass die letzten 3'-terminal gelegenen 177 bp des Fzd8-Promotors in HEK293-Zellen als starker Repressor fungieren. Die schwarzen Balken unter den Plasmidnamen repräsentieren eine grafische Darstellung der jeweiligen Promotorvariante.

E.2.4 Zusammenfassende Ergebnisse der Promotorkartierung

Die Experimente mit verschiedenen Reporterplasmiden, die 5'- bzw. 3'-trunkierte Varianten des Fzd8-Promotors enthielten, wiesen darauf hin, dass der Fzd8-Promotor durch Wnt3a negativ reguliert wird (siehe Abbildung E-11), was sich mit der Beschreibung von Fzd8 als negativem Wnt3a-Targetgen in hMSC deckt (Karow 2008)

Des Weiteren ließen sich innerhalb der Promotorregion aktivierende von repressiven Elementen abgrenzen (vergleiche u.a. E.2.1). Abbildung E-13 stellt eine zusammenfassende grafische Übersicht über die Ergebnisse der Promotorkartierung dar.

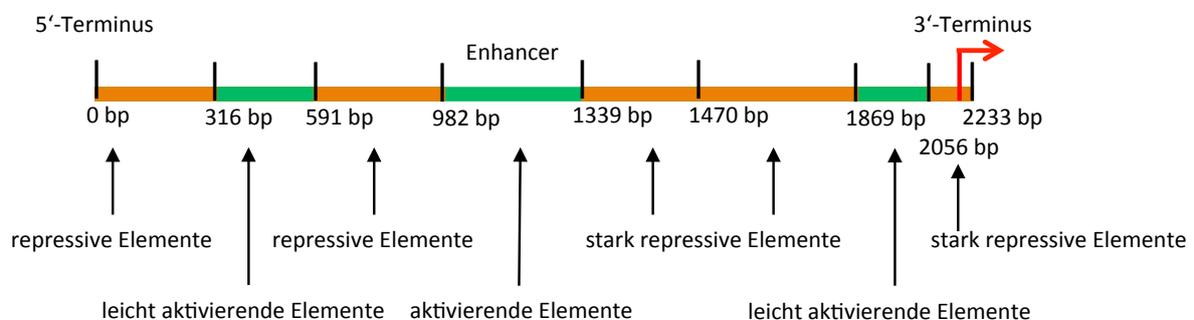


Abbildung E-13: Einteilung des Fzd8-Promotors in aktivierende und repressive Abschnitte anhand der Reporterplasmidversuchsergebnisse in hMSC, HT1080- und HEK293-Zellen.

Der rote Pfeil vor dem 3'-Terminus des Promotors repräsentiert den publizierten TSS von Fzd8.

E.3 Effekte des APC- und β -Catenin-Knockdowns auf die Fzd8-Promotoraktivität

Nachdem Fzd8 in früheren Arbeiten bereits als negatives Wnt-Targetgen beschrieben worden war (Karow 2008), sollte in der hier vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob auch in der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionskaskade weiter *downstream* eingreifende Manipulation mit Veränderungen der Fzd8-Promotoraktivität assoziiert ist. Frau Dr. Karow konnte bereits zeigen, dass ein siRNA-vermittelter Knockdown von β -Catenin einen inhibierenden Effekt auf das Wnt-Signaling hat (Karow 2008). Ein APC-Knockdown geht mit einer starken Stimulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges einher, da das APC-Protein einen wesentlichen Bestandteil des β -Catenin-Degradationskomplexes darstellt. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob bzw. in welchem Maße der Knockdown von APC- bzw. β -Catenin einen Einfluss auf die Fzd8-Promotoraktivität hat. Dafür sollten die jeweilige siRNAs und Fzd8-Promotor-Reporterplasmide in hMSC bzw. HT1080 kotransfiziert werden.

E.3.1 Bestimmung der siRNA vermittelten Knockdowneffizienzen von APC- und β -Catenin in hMSC und HT1080-Zellen

hMSC

Die Knockdowneffizienzen von APC und β -Catenin in hMSC wurden in der Arbeitsgruppe bereits früher auf mRNA-Ebene nachgewiesen und sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Kolben 2010).

Tabelle E-2: siRNA-vermittelte Knockdowneffizienzen von APC und β -Catenin in hMSC (Kolben 2010)

mRNA-Knockdowneffizienzen		
	Tag 1	Tag 7
APC	93 %	65 %
β -Catenin	93 %	82 %

Auf Proteinebene betrug der β -Catenin-Knockdown in hMSC ab Tag 3 nach Transfektion 21 %. An Tag 7 wies der Knockdown 64 % auf (Kolben 2010).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich hMSC eingesetzt, die das Plasmid pN3-BAR-GLuc stabil in ihr Genom integriert hatten (BAR-Reporter-hMSC). Diese Zellen dienen als Reporterzellen für den Aktivierungsgrad des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Karow 2008;

Kolben, Perobner et al. 2012; Perobner, Karow et al. 2012). Ein Knockdown von β -Catenin, der ein vermindertes Wnt/ β -Catenin-Signal zur Folge hat, führt in diesen Zellen zu verminderter Gaussia Luciferase-Aktivität. Um den Tag mit dem effektivsten β -Catenin-Knockdown bzw. dem niedrigsten Wnt/ β -Catenin-Signal zu bestimmen, wurde nach Transfektion der β -Catenin-siRNA die Gaussia Luciferase-Aktivität an den Tagen 1, 2, 3, 7 und 10 bestimmt. Es zeigte sich, dass die Gaussia Luciferase-Aktivität nach Transfektion von siRNA bereits am ersten Tag nach Transfektion leicht erniedrigt war. Eine signifikante Verminderung konnte man an Tag 7 und 10 feststellen (siehe Abbildung E-14).

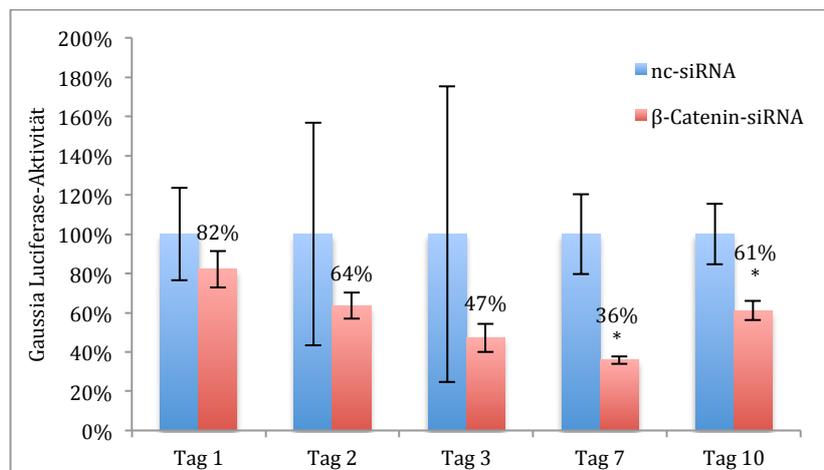


Abbildung E-14: Auswirkung von β -Catenin-Knockdown auf BAR-Reporter-hMSC.

Die y-Achse zeigt die Gaussia Luciferase-Aktivität, die hier stellvertretend für das Aktivierungsniveau des Wnt/ β -Catenin-Signalweges steht. Die zur Negativkontrolle (nc-siRNA) gehörigen Werte wurden als 100 % definiert und die Werte nach β -Catenin-Knockdown (siRNA) in Relation gesetzt. Bereits an Tag 3 nach Transfektion der siRNA zeigte sich ein deutlicher Einbruch der Wnt/ β -Catenin-Signalstärke. Statistisch signifikante Daten konnten an den Tagen 7 und 10 nach Transfektion gezeigt werden.

HT1080-Zellen

In HT1080-Zellen wurde die Knockdowneffizienz für β -Catenin im Rahmen dieser Arbeit neu bestimmt. Abbildung E-15 zeigt die prozentuale Knockdowneffizienz auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit der Zeit. Als Negativkontrolle wurden mit nc-siRNA transfizierte HT1080-Zellen verwendet. Signifikanzen beziehen sich auf die Werte der Negativkontrolle.

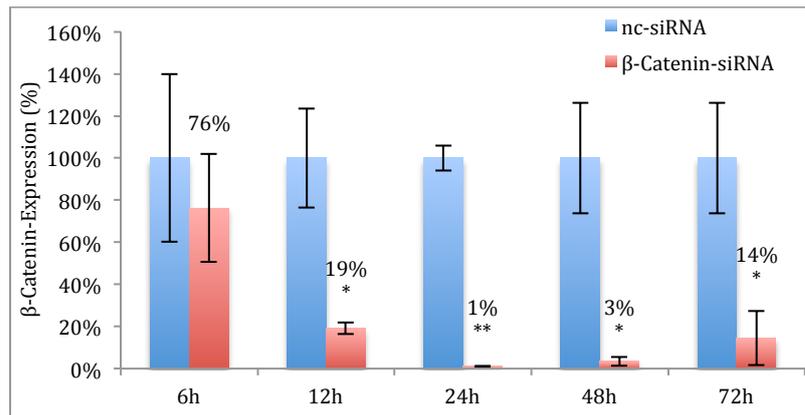


Abbildung E-15: Effizienz des siRNA-vermittelten Knockdowns von β -Catenin in HT1080-Zellen auf mRNA-Ebene.

Um den Knockdown von β -Catenin auch auf Proteinebene mittels Western Blot nachzuweisen, wurden Proteinlysate zu den gleichen Messzeitpunkten wie für die mRNA-Analyse erstellt. Die Detektion von β -Catenin im Western Blot zeigte, dass der Knockdown auf Proteinebene erst 72 Stunden nach Transfektion sichtbar wird, also erst ca. 60 Stunden nach dem Sichtbarwerden des Knockdowns auf mRNA-Ebene. Die Effizienz wurde mittels Densitometrie semiquantitativ ausgewertet. Der β -Catenin-Knockdown betrug nach 72 Stunden 32 % (siehe Abbildung E-16).

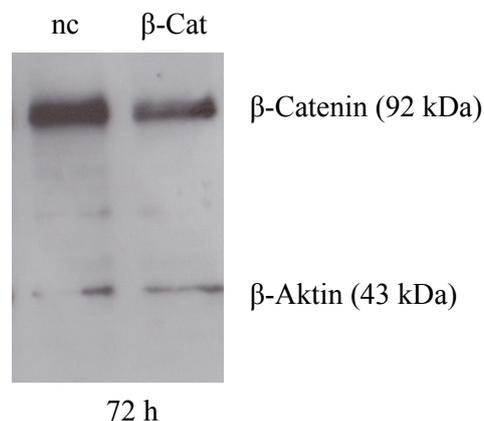


Abbildung E-16: Western Blot nach siRNA-vermitteltem Knockdown von β -Catenin in HT1080-Zellen.

Es wurden Zellysate 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion von β -Catenin-siRNA bzw. nc-siRNA generiert. Das *housekeeping*-Gen β -Aktin wurde zur Proteinnormierung detektiert. 72 Stunden nach Transfektion der siRNA konnte mittels Densitometrie eine Knockdowneffizienz für β -Catenin von 32 % nachgewiesen werden. Nach 24 und 48 Stunden war auf Proteinebene noch kein Knockdown zu sehen.

nc = *negative control*-siRNA, β -Cat = β -Catenin-siRNA

E.3.2 Fzd8-Promotoraktivität unter β -Catenin-Knockdown in HT1080-Zellen

Um zu eruieren, ob bzw. inwiefern eine Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges einen aktivierenden Effekt auf die Fzd8-Promotoraktivität ausübt, wurde β -Catenin-siRNA mit Fzd8-Promotor-Reporterplasmiden in HT1080 kotransfiziert und die Gaussia Luciferase-Aktivität an Tag 2 nach Transfektion quantifiziert. Es wurden in diesem Versuch der putative Fzd8-*full length*-Promotor, ein Plasmid, das die repressiven Elemente (pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-2038) und eines, das überwiegend die aktivierenden Elemente des Promotors beinhaltet (pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763), eingesetzt. Auf den *full length*-Promotor hatte der Knockdown von β -Catenin keinen signifikanten Einfluss. Interessanterweise aber zeigte der Knockdown von β -Catenin einen starken repressiven Effekt auf die Aktivität des Reporterplasmids pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763, das das putative Enhancer-Element und damit wenige repressive Elemente enthält. Auch die Transfektion des Plasmids pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-2038 war mit einer Reduktion der Gaussia-Aktivität nach Knockdown von β -Catenin assoziiert (siehe Abbildung E-17).

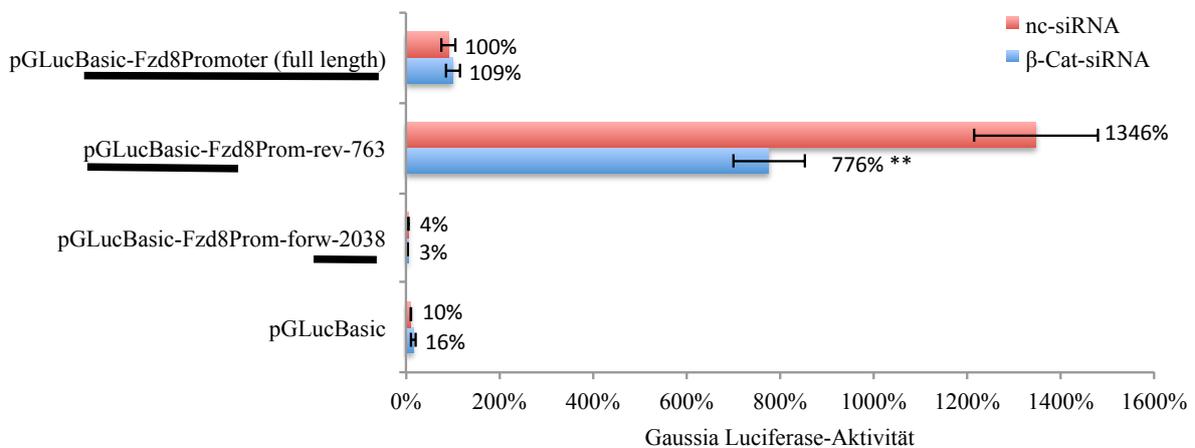


Abbildung E-17: Fzd8-Promotoraktivität nach β -Catenin-Knockdown in HT1080, Tag 2.

Die Gaussia-Werte von pGLucBasic-Fzd8Promoter (*full length*) wurden als 100 % definiert. Es zeigte sich eine deutlich reduzierte Promotoraktivität des Plasmids pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763 nach Knockdown von β -Catenin. Die schwarzen Balken unter den Plasmidnamen stellen die jeweiligen Promotorverkürzungsvarianten dar.

E.3.3 Fzd8-Promotoraktivität unter APC- und β -Catenin-Knockdown in hMSC

Nach dem Versuchsergebnis, dass der Fzd8-Promotor nach Knockdown von β -Catenin in HT1080 wider Erwarten weniger aktiv ist, wurde der Versuch auch in hMSC durchgeführt

und um den Knockdown von APC erweitert. Das beruhte auf der Annahme, dass, wenn der Fzd8-Promotor durch β -Catenin-Knockdown in seiner Aktivität reprimiert werden kann, er nach Knockdown von APC, der mit einer Stimulierung des kanonischen Wnt-Signalweges weiter *downstream* einhergeht, eine höhere Aktivität zeigen müsste.

Nachdem im Vorfeld in hMSC gezeigt worden war, dass der siRNA-vermittelte Knockdown von β -Catenin an Tag 7 nach Transfektion besonders ausgeprägt ist, wurde ein Zeitplan entworfen, dem entsprechend zunächst der Knockdown in den hMSC durchgeführt wurde. Danach wurde das jeweilige Fzd8-Reporterplasmid so transfiziert, dass Tag 7 nach Transfektion der siRNAs und Tag 3 nach Transfektion des Plasmids zusammenfielen.

In diesem Versuch wurden die beiden Plasmide pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-316 und pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763 eingesetzt. Nach Transfektion des jeweiligen Plasmides wurde die Gaussia Luciferase-Aktivität an den Tagen 1, 3 und 7 gemessen. Die Annahme, dass der Fzd8-Promotor nach APC-Knockdown eine höhere Aktivität aufweist, konnte für beide Promotorkonstrukte an den Tagen 3 und 7 mit signifikanten Daten belegt werden (siehe Abbildung E-18). In einem separaten Ansatz wurden mit pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-316 transfizierte APC- bzw. β -Catenin-Knockdown-Stammzellen mit rhWnt3a in einer Konzentration von 75 nM/Kavität stimuliert. Tendenziell zeigte sich, dass auch bei APC- bzw. β -Catenin-Knockdown eine Stimulation mit Wnt3a mit einer Reduktion der Fzd8-Promotoraktivität einherging, allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Am deutlichsten war dieser negative Effekt der Wnt3a-Stimulation auf die Fzd8-Promotoraktivität in APC-Knockdown-Zellen zu sehen (siehe Abbildung E-19).

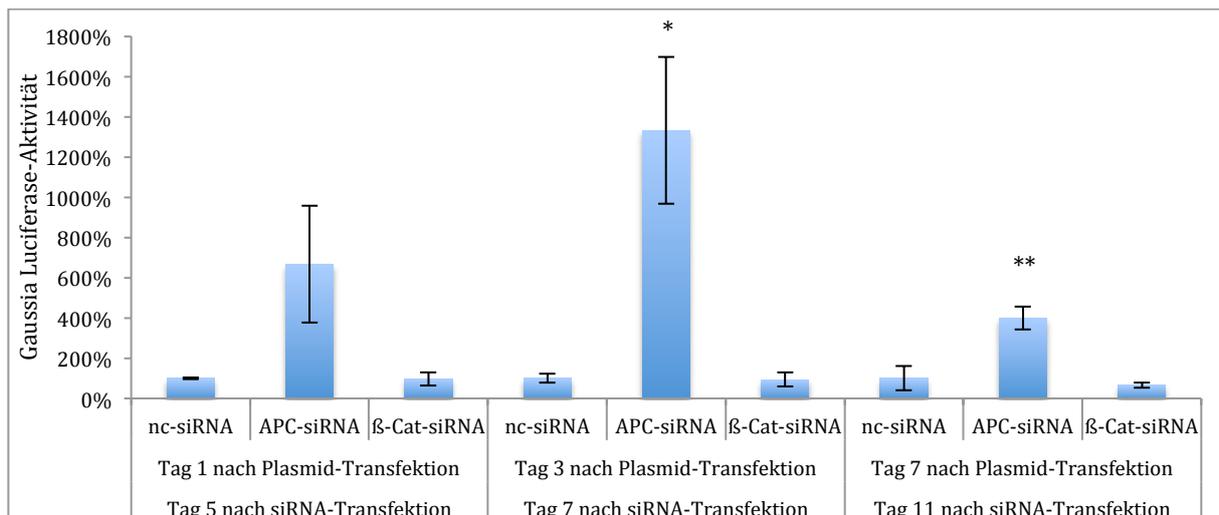


Abbildung E-18: Gaussia Luciferase-Aktivität von pGLucBasic-Fzd8Prom-763 nach β -Catenin- und APC-Knockdown in hMSC.

Der jeweilige Tageswert der mit nc-siRNA transfizierten Zellen wurde als 100 % definiert. Es konnte eine signifikante Aktivitätssteigerung der Fzd8-Promotoraktivität in APC-Knockdownzellen an den Tagen 3 und 7 nach Plasmidtransfektion bzw. an Tag 7 und 11 nach Transfektion der APC-siRNA gezeigt werden. Der β -Catenin-Knockdown hatte einen leicht repressiven Effekt auf die Promotoraktivität. Signifikanzen beziehen sich auf die mit nc-siRNA transfizierten Zellen.

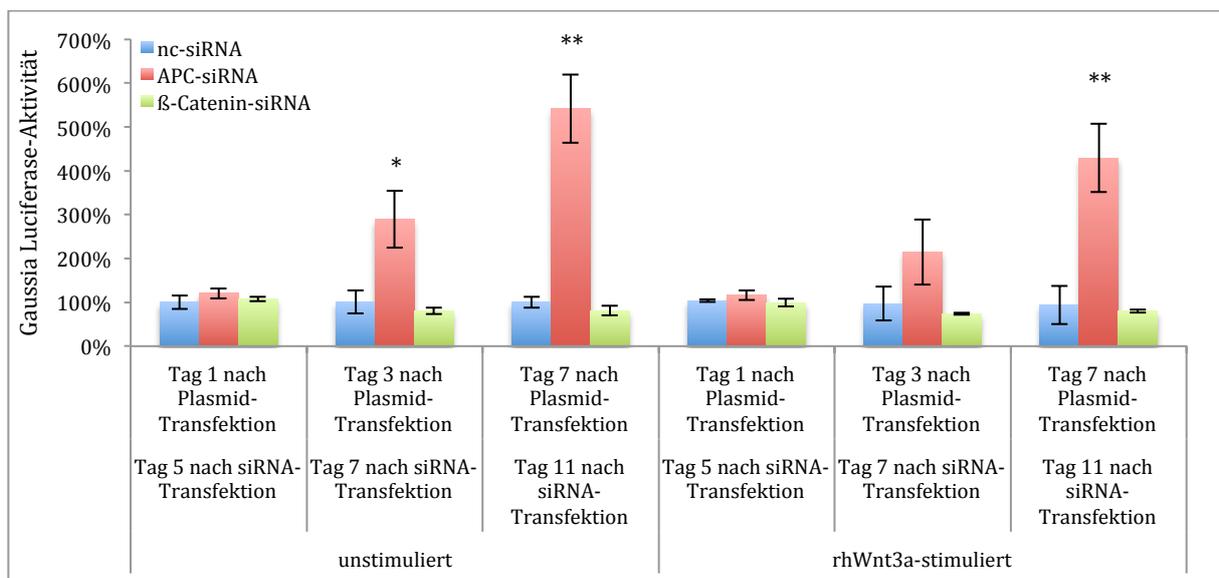


Abbildung E-19: Gaussia Luciferase-Aktivität von pGLucBasic-Fzd8Prom-forw-316 nach β -Catenin- und APC-Knockdown in hMSC bei gleichzeitiger Stimulation mit rhWnt3a.

Der jeweilige Tageswert der mit nc-siRNA transfizierten, unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert. Es konnte eine signifikante Aktivitätssteigerung der Fzd8-Promotors in APC-Knockdownzellen an den Tagen 3 und 7 nach Plasmid-Transfektion bzw. an Tag 7 und 11 nach Transfektion der APC-siRNA gezeigt werden. β -Catenin-Knockdown hatte einen leicht repressiven Effekt auf die Promotoraktivität. Die Stimulation der Zellen mit rhWnt3a führte zu einer leichten Verringerung der Promotoraktivität. Besonders deutlich war dieser Effekt in APC-Knockdown-Zellen zu sehen. Ein signifikanter Unterschied der Promotoraktivität in stimulierten und unstimulierten Zellen ließ sich allerdings nicht feststellen. Signifikanzen beziehen sich auf mit nc-siRNA transfizierte Zellen.

E.4 *in silico*-Analyse des Fzd8-Promotors

Um die Regulation eines Promotors zu verstehen, müssen die Transkriptionsfaktoren, die seine Aktivität beeinflussen, identifiziert werden. Um potentielle Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren innerhalb des Fzd8-Promotors zu eruieren, wurde eine *in silico*-Analyse unter Zuhilfenahme der *online*-verfügbaren Software MatInspector der Firma Genomatix, München, durchgeführt. Bei der Analyse des Fzd8-Promotors wurde die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Transkriptionsfaktor an den Promotor binden kann, auf 100 % gesetzt (*core similarity* und *matrix similarity* jeweils 100 %), um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Dies bedeutet, dass sich die DNA-Erkennungssequenz eines Transkriptionsfaktors komplett im Promotor wiederfinden muss, um eine mögliche Interaktion anzuzeigen (Cartharius, Frech et al. 2005).

Von besonderem Interesse war dabei das Verteilungsmuster der möglichen Bindungsstellen eines Transkriptionsfaktors im Promotorbereich, da anhand der Verteilung der Bindungsstellen eine mögliche Hypothese über den Effekt des entsprechenden Transkriptionsfaktors auf den Promotor ableitbar ist. Deshalb wurde für bestimmte Transkriptionsfaktoren neben der Gesamtanzahl ihrer Bindungsstellen im Fzd8-Promotor auch die Anzahl ihrer Bindungsstellen in den repressiven Abschnitten (1-982 bp und 1470-2233 bp) sowie im putativen Enhancer-Element (982-1339 bp) ermittelt.

Bei dieser Analyse erschien der Transkriptionsfaktor ZF5 von besonderem Interesse. ZF5 steht für *zinc finger* Protein 5, auch bekannt als ZFP161, und ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der ursprünglich als Repressor am c-myc-Promotor beschrieben wurde (Sobek-Klocke, Disque-Kochem et al. 1997). Er kam vor allem als Aktivator in Betracht, da er einige Bindungsstellen im putativen Enhancer-Element besitzt (siehe Tabelle E-3). Allerdings weist er auch in den repressiven Elementen mehrere Bindungsstellen auf.

Tabelle E-3: *In silico*-Analyse des Fzd8-Promotors hinsichtlich möglicher Bindungsstellen von ZF5

Anzahl möglicher Bindungsstellen von ZF5			
<i>full length</i> - Fzd8- Promotor	1-982 bp (repressive Abschnitte)	982-1339 bp (Enhancer Element)	1339-2233 bp (repressive Abschnitte)
16	2	5	9

Im folgenden Abschnitt der Arbeit sollte untersucht werden, ob ZF5 einen Effekt auf die Expression von Fzd8 hat und ob die Regulation seiner Expression mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Zusammenhang steht.

E.5 ZF5 als putativer Aktivator am Fzd8-Promotor

E.5.1 ZF5-Expressionsvergleich in hMSC und HT1080

Unter der Annahme, dass ZF5 als Aktivator des Fzd8-Promotors fungieren könnte, sollte zunächst das basale ZF5-Expressionsniveau in hMSC mit dem in HT1080 mit Hilfe der qRT-PCR verglichen werden. In einer früheren Arbeit konnte bereits festgestellt werden, dass in HT1080-Zellen Fzd8 im Vergleich zu hMSC vermehrt exprimiert wird (Leitenstern et al., persönliche Mitteilung). Die Werte der ZF5-Expression wurden auf das *housekeeping*-Gen GAPDH normiert.

In HT1080-Zellen konnte dabei eine ca. 5-fach höhere Expression von ZF5 festgestellt werden als in hMSC (siehe Abbildung E-20). In HT1080 liegt somit sowohl eine erhöhte Expression von Fzd8 als auch von ZF5 vor.

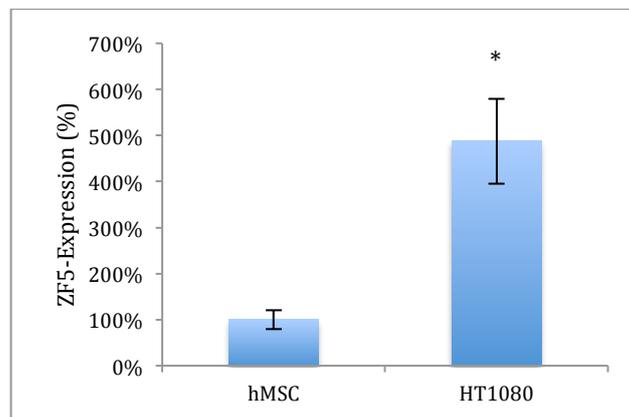


Abbildung E-20: ZF5-mRNA Expression in hMSC und HT1080-Zellen.

Die basale Expression von ZF5 in hMSC wurde als 100 % definiert. Im Vergleich dazu zeigte sich in HT1080 eine ca. 5-fach höhere Expression.

E.5.2 ZF5 als positives Wnt/ β -Catenin-Zielgen

E.5.2.1 *In silico*-Analyse der ZF5-Promotorregion

Die bisherigen Daten der hier vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Fzd8 durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg induziert werden kann, obwohl es durch Wnt3a reprimiert wird. Aufgrund der Ergebnisse der *in silico*-Analyse des Fzd8-Promotors wurde die Hypothese formuliert, dass die Induktion von Fzd8 durch ZF5 vermittelt sein könnte. Nach dieser Hypothese könnte ZF5 ein positives Wnt/ β -Catenin-Targetgen darstellen. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst mit dem Programm MatInspector innerhalb der Promotorregion von ZF5 (3200 bp *upstream* des Transkriptionsstarts von ZF5 laut Datenbankeintrag

NM_001243702.1) nach Bindungsstellen von TCF/LEF gesucht. Hierbei wurden fünf putative TCF/LEF-Konsensussequenzen identifiziert.

E.5.2.2 ZF5-Expression nach Wnt3a-Stimulation

Im nächsten Schritt sollte mit Hilfe der qRT-PCR untersucht werden, ob die Stimulation von HT1080 und hMSC mit rhWnt3a eine Erhöhung der Expression von ZF5 bewirken kann. Hierzu wurden HT1080-Zellen mit rhWnt3a in einer Konzentration von 150 ng/ml stimuliert und die Expression von ZF5 an Tag 1, 2 und 3 gemessen und anschließend auf GAPDH normiert. Es zeigte sich an allen Tagen nach rhWnt3a-Stimulation eine leichte Induktion von ZF5 (siehe Abbildung E-21).

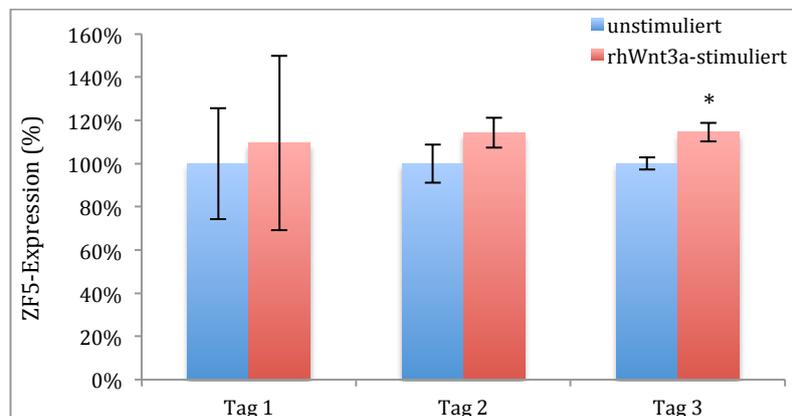


Abbildung E-21: ZF5-mRNA-Expression in HT1080-Zellen nach Stimulation mit rhWnt3a.

Der jeweilige Tageswert der ZF5-Expression in unstimulierten Zellen wurde als 100 % definiert. Es zeigte sich an allen Tagen nach Stimulation mit rhWnt3a eine leichte Induktion von ZF5.

Das gleiche Experiment wurde auch in hMSC durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit rhWnt3a in einer Konzentration von 75 ng/ml stimuliert und die ZF5-Expression an den Tagen 1, 3 und 7 nach Stimulation gemessen. An Tag 1 konnte keine Induktion von ZF5 registriert werden, an den Tagen 3 und 7 hingegen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression. An Tag 3 betrug die Zunahme 37 % und an Tag 7 ca. 400 % (siehe Abbildung E-22).

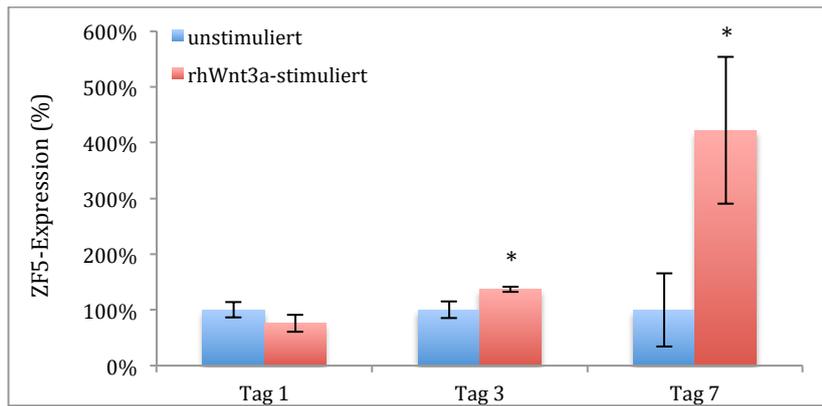


Abbildung E-22: ZF5-mRNA-Expression in hMSC nach Stimulation mit rhWnt3a.

Die basale ZF5-Expression wurde als 100 % definiert. Es zeigte sich an Tag 3 und 7 nach Stimulation mit rhWnt3a eine signifikante Induktion der ZF5-Expression.

E.5.2.3 ZF5-Expression nach APC- und β -Catenin-Knockdown

Um zu eruieren, ob bzw. inwiefern eine Manipulation am Wnt/ β -Catenin-Signalweg weiter stromabwärts einen Einfluss auf die ZF5-Expression ausüben kann, wurden in hMSC verschiedene siRNA-vermittelte Knockdowns von Wnt/ β -Catenin-Signalwegskomponenten durchgeführt und danach mittels qRT-PCR die Expression von ZF5 an Tag 1, 3 und 7 quantifiziert. Die Werte wurden anschließend auf GAPDH normiert. Es zeigte sich, dass ZF5 nach APC-Knockdown im Vergleich zu mit nc-siRNA transfizierten Zellen höher exprimiert wird, während der Knockdown von β -Catenin mit einer leicht erniedrigten Expression assoziiert war. Die Werte erreichten allerdings keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung E-23). Lediglich an Tag 7 war eine statistisch signifikant höhere Expression von ZF5 unter APC-Knockdown im Vergleich zu β -Catenin-Knockdown zu beobachten (p-Wert 0,04).

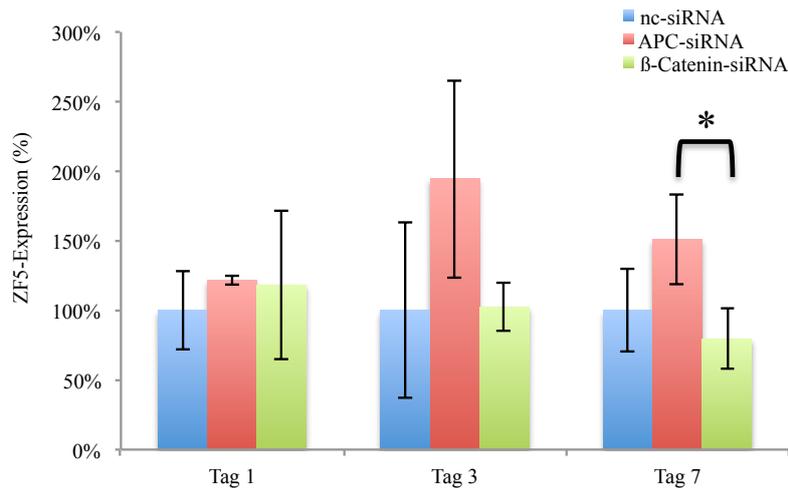


Abbildung E-23: Expression von ZF5 nach Knockdown von β -Catenin und APC.

Der jeweilige Tageswert von nc-siRNA transfizierten Zellen wurde als 100 % definiert. Die Daten zeigen, dass ZF5 nach Knockdown von APC verstärkt, nach Knockdown von β -Catenin verringert exprimiert wird.

E.5.3 Überexpression von ZF5

E.5.3.1 Klonierung von pN3-ZF5

Mit dem Ziel die transkriptionellen Effekte von ZF5 auf die Fzd8-Expression zu eruieren, sollte ein Überexpressionsvektor für ZF5 generiert werden. Hierzu wurde die kodierende Sequenz von ZF5 aus cDNA von hMSC mittels PCR unter Verwendung der Primer ZF5-*NheI*-forw und ZF5-*EcoRV*-rev amplifiziert. Gelelektrophoretisch konnte das erwartete DNA-Fragment von 1451 bp bestätigt werden (siehe Abbildung E-24). Diese Bande wurde aus dem Gel eluiert und mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *EcoRV* in einem präparativen Verdau geschnitten, um später in den mit den RE *NheI* und *SmaI* linearisierten Vektor pN3 ligiert werden zu können. Korrekte Klone wurden durch einen analytischen Verdau mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *XbaI* gesucht, wobei diese in der Gelelektrophorese zwei Banden zeigen sollten (3913 bp = Vektor pN3, 1451 bp = Insert ZF5). Klone mit dem erwarteten Bandenmuster wurden zur Sequenzierung eingeschickt und mit der Datenbanksequenz von ZF5 (NM_001143823) abgeglichen.

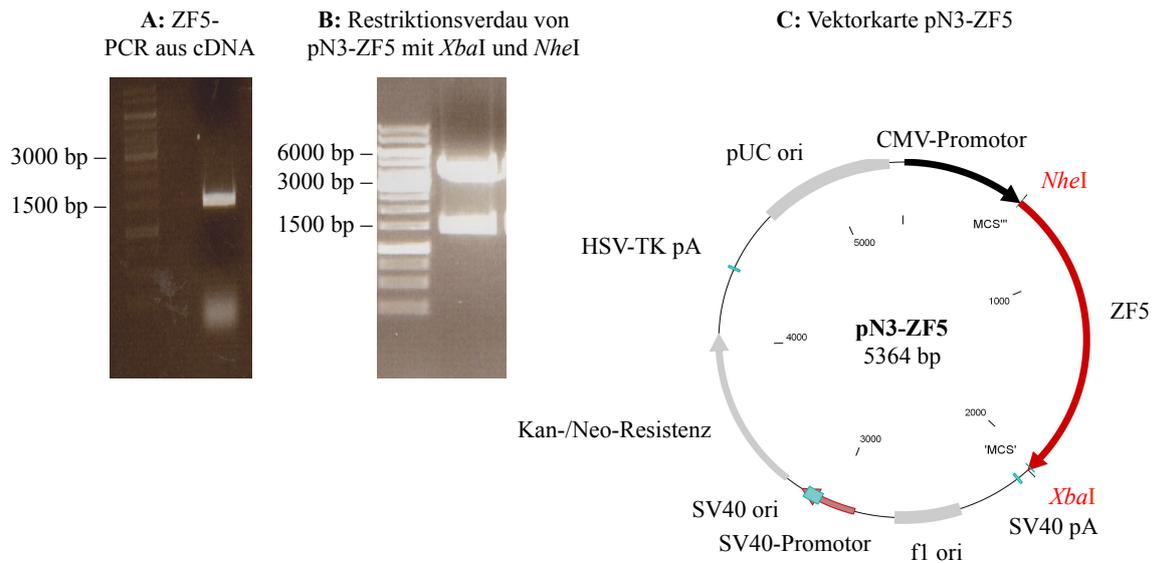


Abbildung E-24: Klonierung von pN3-ZF5.

Links in den Gelelektrophoresebildern ist jeweils der 1 kb-DNA-Marker zu sehen, rechts ist das PCR-Produkt (A) bzw. der Restriktionsverdau (B) aufgetragen. (C) stellt eine schematische Übersicht über das Pasmid pN3-ZF5 dar.

CMV-Promotor = Cytomegalievirus-Promotor, fl ori = fl Phagen *origin of replication*, HSV-TK pA = Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase Polyadenylierungssignal, Kan-/Neo-Resistenz = Kanamycin/Neomycin-Resistenz, pUC ori = Plasmid *University of California origin of replication*, SV40 ori = *simian virus 40 origin of replication*, SV40 pA = *simian virus 40* Polyadenylierungssignal, SV40-Promotor = *simian virus 40*-Promotor, ZF5 = *zinc finger protein 5*

E.5.3.2 Effekte der ZF5-Überexpression auf die Fzd8-Expression

Der ZF5-Überexpressionsvektor pN3-ZF5 wurde in HT1080 transfiziert und an Tag 3 nach Transfektion Lysate der Zellen erstellt. Mittels RT-PCR sollte nun zum einen gemessen werden, ob ZF5 überexprimiert wird, und zum anderen, inwieweit dies eine Veränderung der Fzd8-Expression zur Folge hatte. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem leeren pN3-Vektor transfiziert worden waren (pN3-Mock); diese Werte wurden als 100 % definiert und die ZF5- bzw. Fzd8-Expression dazu in Relation gesetzt. Die Werte von ZF5 und Fzd8 wurden schließlich auf die GAPDH-Expression normiert. Im Rahmen dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass mit einer Transfektion von pN3-ZF5 eine Überexpression von ZF5 erreicht werden kann (siehe Abbildung E-25). Zudem führte eine Überexpression von ZF5 zu einer Erhöhung der Fzd8-Expression (p-Wert 0,042) (siehe Abbildung E-26).

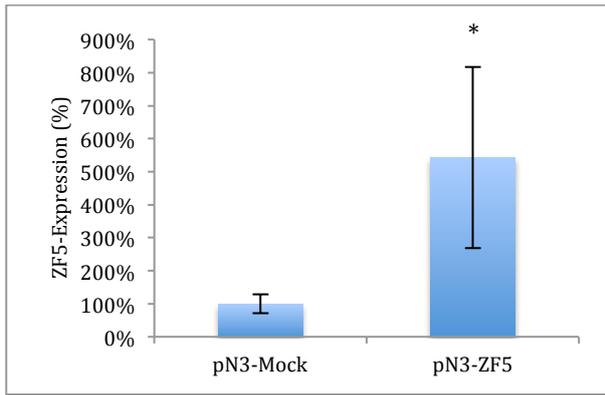


Abbildung E-25: ZF5-Expression an Tag 3 nach Transfektion von pN3-ZF5 in HT1080.

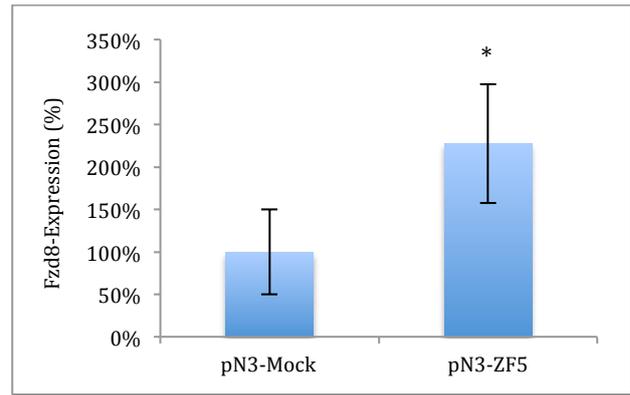


Abbildung E-26: Fzd8-Expression an Tag 3 nach Transfektion von pN3-ZF5 in HT1080.

E.5.3.3 Effekt der ZF5-Überexpression auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

In diesem Versuch sollte nun untersucht werden, ob bzw. inwiefern die ZF5-Überexpression mittels pN3-ZF5 einen aktivierenden Effekt auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg ausübt. Die zugrundeliegende Annahme war hierbei, dass ZF5 ein positives Wnt/ β -Catenin-Zielgen ist und seinerseits den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren kann, was wiederum einen positiven *feedback loop* implementieren würde.

Zu diesem Zweck wurden die beiden Plasmide pN3-ZF5 und pN3-BAR-GLuc, das mittels Gaussia Luciferase eine Quantifizierung des Aktivierungsgrades des Wnt/ β -Catenin-Signalweges erlaubt, in HT1080-Zellen kotransfiziert und die Gaussia Luciferase-Aktivität an den Tagen 3 und 5 nach Transfektion bestimmt. Die Luciferase-Werte der mit pN3-Mock transfizierten Zellen wurden als 100 % definiert. An Tag 3 zeigte sich bei pN3-ZF5 transfizierten Zellen eine Zunahme der Gaussia Luciferase-Aktivität von 9 %, an Tag 5 eine Zunahme um 24 % (siehe Abbildung E-27). Die Werte erreichten allerdings keine statistische Signifikanz.

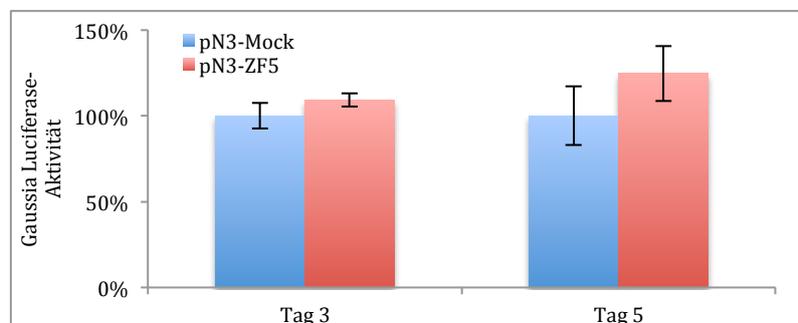


Abbildung E-27: Quantifizierung der Wnt/ β -Catenin-Signalstärke mittels des Reporterplasmids pN3-BAR-GLuc nach Überexpression von ZF5 in HT1080-Zellen.

F Diskussion

F.1 Strukturelle Aspekte der Fzd8-Promotorregion

Die Bestimmung des Fzd8-TSS unter Verwendung der RLM-RACE-Methode zeigte, dass außer dem publizierten TSS (siehe NM_031866.2) verschiedene andere TSS vorliegen, die entweder weiter *upstream* oder *downstream* vom publizierten TSS liegen. Eine *in silico*-Analyse der klonierten Promotorregion brachte die Erkenntnis, dass sich in der Nähe des publizierten TSS weder eine TATA-Box, noch ein BRE oder ein *Initiator*-Element befinden, also keines der Elemente, die für klassische *core*-Promotoren charakterisierend sein können (Dikstein 2011). Ferner wurde ein GC-Gehalt der Promotorregion von 65 % bestimmt.

Welche Effekte mit der Verschiebung des TSS um mehr als 6 bp hinsichtlich der Translation und der Funktionalität des Fzd8-Proteins einhergehen, wurde in einer anderen Arbeit in unserer Gruppe untersucht. Eine Verschiebung des TSS nach *downstream* um mehr als 5 bp führt dabei zu einem verkürzten und in seiner Funktion eingeschränkten Fzd8-Protein (Lechner 2013). Interessanterweise wurde nur in HT1080-Zellen auch ein TSS detektiert der 20 bp *upstream* vom publizierten TSS liegt, also damit auch die Translation eines vollständigen Fzd8-Proteins garantiert.

Der Fzd8-Promotor erfüllt die Kriterien einer CpG-Inselregion. Diese DNA-Abschnitte des Genoms sind dadurch gekennzeichnet, dass sie einen erhöhten GC-Gehalt (> 50 %) und geringe CpG-Depletion aufweisen, meist nicht methyliert und länger als 1000 bp sind. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte sind CpG-Inseln ein relativ homogener Teil des Genoms, obgleich ihre jeweiligen Sequenzen unterschiedlich sein können (Bird, Taggart et al. 1985; Illingworth, Gruenewald-Schneider et al. 2010). Etwa 70 % aller Promotoren sind mit CpG-Inseln assoziiert. Sie stellen somit den häufigsten Typus eines Promotors dar (Saxonov, Berg et al. 2006). Wie dies auch hier der Fall ist, besitzen CpG-Insel-Promotoren oft keine TATA-Box (Reynolds, Basu et al. 1984). In Genomen, in denen DNA-Methylierung eine wichtige Rolle in der Expressionsregulation von Genen spielt, stellen CpG-Inseln wichtige, hochkonservierte regulatorische Strukturen dar (Deaton and Bird 2011). Im nicht-methylierten Zustand wird durch CpG-Insel-Promotoren die Transkription der entsprechenden Gene gefördert (Ramirez-Carrozzi, Braas et al. 2009; Deaton and Bird 2011). CpG-Inseln besitzen auffallend wenig Nukleosomen; die DNA ist somit für Transkriptionsfaktoren einfach zugänglich und die Nukleosomen müssen nicht erst vor Transkriptionsinitiation ATP-

abhängig von der Promotorregion gelöst werden (Ramirez-Carrozzi, Braas et al. 2009). Allerdings können CpG-Insel-Promotoren auf zwei typische Arten abgeschaltet werden: Zum einen durch Methylierung und zum anderen durch Proteine der *polycomb*-Gruppe (Deaton and Bird 2011). Vielfach wurde bereits ein Zusammenhang von *silencing* von Tumorsuppressorgenen durch Methylierung bei Krebserkrankungen gezeigt. Auch in der X-Chromosom-Inaktivierung spielt es eine wichtige Rolle (Sado, Fenner et al. 2000; Jones and Baylin 2007). Während das relativ stabile *silencing* durch Methylierung nur an wenigen CpG-Insel-Promotoren eine Rolle zu spielen scheint, stellt *silencing* durch *polycomb*-Proteine eine dynamische Art der Expressionsrepression dar (Xie, Everett et al. 2013).

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die Transkription von Genen in Eukaryoten durch zwei wesentliche Promotorbereiche reguliert wird: Zum einen durch Enhancer-Elemente, auf die weiter unten eingegangen werden soll, und zum anderen durch den *core*-Promotor (Dikstein 2011). Letzterer stellt den Sequenzbereich vor einem Gen dar, an den die RNA-Polymerase II unter Mithilfe von verschiedenen Transkriptionsfaktoren binden kann und nach Ausbildung eines Präinitiationskomplexes (PIC) die Transkription initiiert wird (Smale 2001). Theoretisch könnte also ein universelles Bindungsmotiv auf der DNA für die RNA-Polymerase II ausreichen, um den TSS für jedes Gen zu markieren. In der Realität aber existieren viele verschiedene solche Motive und nur einige von ihnen wurden bisher charakterisiert (Juven-Gershon, Hsu et al. 2008).

Core-Promotoren lassen sich prinzipiell in die zwei Gruppen *focused* und *dispersed* einordnen. *Focused core*-Promotoren sind dadurch gekennzeichnet, dass sie einen singulären TSS beinhalten und phylogenetisch sehr alt sind. Diese Art von Promotoren besitzen oft eine TATA-Box (Juven-Gershon, Hsu et al. 2008). Allerdings befindet sich in maximal 35 % aller Promotoren des menschlichen Genoms eine TATA-Box (Gershenzon and Ioshikhes 2005; Kim, Barrera et al. 2005; Yang, Bolotin et al. 2007; Moshonov, Elfakess et al. 2008).

Dispersed core-Promotoren besitzen mehrere verschiedene TSS und kommen in Vertebraten häufiger vor als *core*-Promotoren vom *focused*-Typ (Juven-Gershon, Hsu et al. 2008). Ferner sind *dispersed core*-Promotoren auffallend oft in Promotoren mit hohem GC-Gehalt zu finden und sie beinhalten normalerweise keines der typischen *core*-Promotorelemente wie z.B. die TATA-Box oder ein Inr-Element (FitzGerald, Shlyakhtenko et al. 2004; Bajic, Tan et al. 2006; Carninci, Sandelin et al. 2006; Sandelin, Carninci et al. 2007). Allgemein ist allerdings bisher die transkriptionelle Regulation an *core*-Promotoren vom *dispersed*-Typ nur unzuläng-

lich verstanden, da sich hier bisher kein definitives Motiv festmachen lässt, an dem die RNA-Polymerase II bindet (Frith, Valen et al. 2008; Dikstein 2011).

Darüber wie es nun zu verschiedenen TSS innerhalb eines Gens kommt, gibt es zwei verschiedene Theorien, die sich allerdings nicht gegenseitig ausschließen (Dikstein 2011). Zum einen ist es denkbar, dass der PIC durch einen Transkriptionsfaktor rekrutiert wird, der weiter *upstream* des TSS an der DNA bindet. Dadurch dass die RNA Polymerase II nun nicht selbst rigide an einen bestimmten DNA-Abschnitt gebunden ist, kann sie durch die höhere Flexibilität an unterschiedlichen Punkten der DNA die Transkription starten. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der Transkriptionsapparat selbst schwach an verschiedenen Punkten in einer Promotorregion binden und von dort die Transkription starten kann (Dikstein 2011).

Anhand dieser Gegebenheiten ist also der Fzd8-Promotor den GC-reichen Promotoren vom *dispersed*-Typ zuzuordnen, die die Mehrheit der Promotoren im menschlichen Genom darstellen. Frith und Valen postulieren, dass lediglich der TSS durch eine spezielle lokale DNA-Sequenz, die Transkriptionsrate aber von distalen Enhancern bestimmt wird (Frith, Valen et al. 2008). Demnach scheint die Tatsache der verschiedenen TSS im Fzd8-Promotor nur wenig mit dessen Expressionslevel unter physiologischen Bedingungen in den verschiedenen Zelllinien zu tun zu haben. Thorsen et al. aber belegen in einer Studie, dass alternative TSS durchaus spezifisch in Tumoren zu finden sind und assoziieren ferner verändertes *Wnt-Signaling* mit der Verschiebung von TSS (Thorsen, Schepeler et al. 2011). TCF12 existiert sowohl in einer langen als auch in einer kurzen Isoform, wobei die lange Variante in gesundem und auch in Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte. Die kurze Isoform konnte in der Studie allerdings nur in Tumorzellen detektiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in 21 von 23 Tumorgewebeproben eine erhöhte TCF12-Expression vorliegt (Thorsen, Schepeler et al. 2011). Eine Verschiebung des TSS von TCF12 korreliert hierin mit einer Zunahme der Expression.

Somit ist es also durchaus denkbar, dass der alternative Fzd8-TSS 20 bp *upstream* vom publizierten TSS in HT1080-Zellen tumorspezifisch für die erhöhte Expression von Fzd8 in HT1080-Zellen mitverantwortlich sein könnte.

F.2 Reportergergenversuche mit dem Fzd8-Promotor

F.2.1 Klonierung des Fzd8-Promotors und verkürzter Varianten

Um die Aktivität eines Promotors quantifizieren zu können, werden vielfach Reporter gene verwendet, denen man den zu untersuchenden Promotor vorschaltet. In dieser Arbeit wurde die Fzd8-Promotoraktivität mit Hilfe der Gaussia Luciferase-Expression mittels Chemolumineszenz in *relative light units* quantifiziert. Dies ist gängige Praxis und erfolgt oft in Promotoranalysen wie zum Beispiel in der Analyse des Pendrin-Promotors (Rozenfeld, Efrati et al. 2011).

Innerhalb eines Promotors befinden sich neben dem *core*-Promotor noch andere wichtige Elemente, die für die Regulation der Transkriptionsrate essenziell sind, die so genannten Aktivatoren (Enhancer) und Repressoren (*silencer*) (Fuda, Ardehali et al. 2009). Dabei regulieren diese DNA-Abschnitte meist nicht selbst direkt die Transkription, sondern interagieren mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wodurch die Transkriptionrate beeinflusst wird. Die Expression von Transkriptionsfaktoren ist oft zellspezifisch reguliert, was die Grundlage für unterschiedliche Expressionraten ein und desselben Gens in verschiedenen Geweben darstellt (Turner, Alt et al. 2010). Transkriptionsfaktoren können die Transkriptionsrate über verschiedene Mechanismen positiv oder negativ beeinflussen. Zum Beispiel kann durch Interaktion eines Promotors mit einem Transkriptionsfaktor und dessen Koaktivatoren oder Korepressoren die entsprechende Chromatinstruktur so verändert werden, dass die Transkription erschwert oder aber auch erleichtert wird (Fuda, Ardehali et al. 2009). In der Regel binden Transkriptionsfaktoren an definierte DNA-Abschnitte, den sog. Konsensussequenzen. Schneidet man aus einem Promotor nun die Konsensussequenz für einen bestimmten Transkriptionsfaktor heraus, kann dieser nicht mehr Einfluss auf die Transkription nehmen. Nach diesem Prinzip wurden neben dem Plasmid pGLucBasic-Fzd8-Promotor, das den putativen *full length*-Promotor von 2233 bp Länge enthält, die verschiedenen 5'-terminal und 3'-terminal verkürzten Fzd8-Promotorvarianten generiert. Hat eine Verkürzung des Promotors eine Zunahme der Aktivität zur Folge, lässt dies den Rückschluss zu, dass der deletierte Abschnitt Bindungsstellen für repressiv wirkende Transkriptionsfaktoren beinhalten muss, es sich somit um ein repressives Element im Promotor handelte. Entsprechend geht die Deletion eines aktivierenden Elements mit einer Abnahme der Promotoraktivität einher.

F.2.2 Überprüfung der Funktionalität des pGLucBasic-Fzd8Promotors

Das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Promotor wurde sowohl in HT1080-Tumorzellen als auch in hMSC transfiziert und es zeigte sich, dass der putative *full length*-Promotor in HT1080 eine ca. siebenfach höhere Aktivität als in hMSC besitzt. Dies kann als analog zu der erhöhten Expressionsrate von Fzd8 in HT1080 angesehen werden, die vor kurzem im Rahmen einer weiteren Promotionsarbeit in unserem Labor nachgewiesen wurde (Leitenstern, mündliche Mitteilung).

F.2.3 Überprüfung der Vollständigkeit der putativen Promotorregion

Die Klonierung des Plasmids pGLucBasic-Fzd8PromotorXL, das einen Fzd8-Promotor von ca. 3200 bp beinhaltet, hatte zum Ziel, sicherzustellen, dass sich im putativen *full length*-Promotor von 2233 bp alle wichtigen aktivierenden oder repressiven Abschnitte des Promotors befinden. Tatsächlich zeigte pGLucBasic-Fzd8PromotorXL im Vergleich zu pGLucBasic-Fzd8Promotor weder in HT1080 noch in hMSC eine signifikant höhere oder niedrigere Aktivität. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich in den 1000 bp *upstream* vom putativen *full length*-Promotor keine weiteren wichtigen regulativen Elemente lokalisiert sind. Zu bedenken ist allerdings, dass sich Enhancer-Elemente auch in viel größerer Entfernung zum Promotor befinden können, teilweise sogar auf anderen Chromosomen (Sanyal, Lajoie et al. 2012). Dies wurde in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt, da die Aufgabenstellung sich auf die unmittelbare Promotorregion von Fzd8 fokussiert war.

F.2.4 Sicherstellung gleicher Transfektionseffizienzen

Da im Rahmen der Klonierung der Reporterplasmide, die unterschiedliche Verkürzungsvarianten des Fzd8-Promotors enthielten, Plasmide unterschiedlicher Größe (zwischen 5200 und 8300 bp) generiert wurden, sollte für alle Plasmide die gleiche Transfektionseffizienz sichergestellt werden. Hierzu wurden jeweils das kleinste und größte Fzd8-Promotor-Reporterplasmid zusammen mit dem Plasmid pN3-EGFP in hMSC kotransfiziert. GFP eignet sich besonders gut zur Evaluierung von Transfektionseffizienzen, da erfolgreich transfizierte Zellen einfach unter dem Mikroskop zu identifizieren und auszuzählen sind (Labas, Gurskaya et al. 2002; Miyawaki 2002). In dieser Arbeit konnte die Transfektionseffizienz unabhängig von der kotransfizierten Plasmidgröße mit ca. 30 % bestimmt werden. In einer

früheren Arbeit in unserem Labor wurde die Transfektionseffizienz in hMSC mit Lipofectamine 2000 ebenfalls mittels Transfektion von EGFP mit ca. 50 % bestimmt (Hoelters, Ciccarella et al. 2005). Allerdings wurden in jener Arbeit die transfizierten hMSC bereits 24 Stunden nach Transfektion ausgezählt und nicht erst nach 72 Stunden wie in der hier vorliegenden Arbeit. Es ist also möglich, dass die ursprüngliche Transfektionseffizienz höher als 30 % war, wenn man berücksichtigt, dass die Abnahme der Expression von EGFP mehr als 24 Stunden nach Transfektion ein bereits beschriebenes Phänomen darstellt (Tseng, Haselton et al. 1997). Insgesamt aber konnte durch diese Kotransfektionsexperimente sichergestellt werden, dass alle Fzd8-Promotor-Reportergenplasmide eine ähnliche Transfektionseffizienz besitzen und ihre Aktivitätswerte unter diesem Gesichtspunkt vergleichbar sind.

F.2.5 Fzd8-Promotorstudien in hMSC, HT1080- und HEK293-Zellen

Abbildung E-13 bietet einen Überblick über die Ergebnisse der Versuche mit den Reporterplasmiden und stellt die verschiedenen repressiven und aktivierenden Elemente im Fzd8-Promotor dar. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Promotorverkürzungsvarianten in den unterschiedlichen Zelllinien jeweils ähnlich verhielten und somit eine Kartierung des Promotors in aktivierende und repressive Elemente möglich war. Durch welche genauen Sequenzabschnitte der jeweilige Promotorabschnitt als Aktivator oder Repressor fungiert, ließ sich durch diese Art der Kartierung allerdings nicht weiter eingrenzen. Deutlich war auch in diesen Versuchen die grundsätzlich höhere Aktivität des Fzd8-Promotors und aller trunkierter Varianten in HT1080 im Vergleich zu hMSC zu beobachten. In hMSC zeigten die Verkürzungen des Promotors ähnliche Ergebnisse wie in HT1080, allerdings waren die Aktivitätswerte deutlich niedriger. Wie unter F.2.2 bereits diskutiert wurde, hat der Fzd8-Promotor in hMSC eine sehr niedrige Aktivität, was als analog zu der niedrigen Expression von Fzd8 in hMSC angesehen werden kann (Leitenstern, mündliche Mitteilung).

Einige Promotorvarianten wurden auch in HEK293-Zellen transfiziert. Hier zeigte sich im Vergleich zu den Versuchen in HT1080 und hMSC, dass das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-177, das eine 3'-terminale Verkürzung des Promotors um 177 bp beinhaltet, im Vergleich zu den anderen Plasmiden die höchste Aktivität besaß (siehe Abbildung E-12). In hMSC und HT1080 zeigte aber das Plasmid pGLucBasic-Fzd8Prom-rev-763 (3'-terminale Verkürzung des Promotors um 763 bp) die höchsten Aktivitätsraten. Aufgrund der Gegebenheit, dass der Promotor eines Gens durch Interaktion mit zellspezifischen Transkriptionsfaktoren dessen gewebespezifische Transkriptionsrate bedingt (Turner, Alt et al. 2010), können

gleiche Promotoren in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Transkriptionsraten bedingen. In diesem Fall lässt es die Schlussfolgerung zu, dass in HEK-Zellen Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, die in den 3'-terminalen 177 bp des Fzd8-Promotors binden können und dort als starke Repressoren wirken. In hMSC und HT1080 sind diese Transkriptionsfaktoren wohl nicht oder in geringerer Konzentration als in HEK-Zellen vorhanden.

F.2.6 Das putative Fzd8-Enhancer-Element

Auffällig ist, dass der Fzd8-Promotor in der Nähe des publizierten TSS stark repressive Elemente besitzt. Ein starker Aktivator aber befindet sich im Bereich zwischen 982-1339 bp des *full length* Promotors, der sich in einer Distanz von 718 bp vom publizierten TSS befindet. Dieser Bereich könnte als distaler Enhancer fungieren.

Enhancer sind DNA-Abschnitte, die als regulatorische Elemente Einfluss auf die Transkriptionsrate von Genen nehmen können, indem sie auch über größere Distanzen mit deren Promotoren interagieren können (Marsman and Horsfield 2012). Meist befinden sich Enhancer in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten (Ritter, Dong et al. 2012) und aktivieren die Transkription eines nahegelegenen Gens, allerdings können sie aber auch in großer Entfernung zum Gen liegen, aber durch Änderung in der 3D-Struktur der DNA in räumliche Nähe zu einem Promotor gebracht werden (Sanyal, Lajoie et al. 2012). Grundsätzlich können Enhancer die RNA-Polymerase II und Transkriptionsfaktoren rekrutieren, die wiederum mit Koaktivatoren interagieren. Es kommt zu einer Dekondensierung der Chromatinstruktur durch Entfernung von Nukleosomen bzw. zu einer Biegung der DNA, was die Initiation der Transkription erleichtert (Clapier and Cairns 2009). Vorherrschendes Model über die Funktion von Enhancern ist, dass sie durch Ausbildung einer Chromatinschleife in die Nähe eines Promotors gebracht werden (siehe Abbildung F-1) und dass erst dadurch die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und die Initiation der Transkription ermöglicht wird (Bulger and Groudine 1999; de Laat, Klous et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die meisten Promotoren im menschlichen Genom mit einem einzigen Enhancer interagieren. Allerdings besitzen 25 % der Promotoren zwei oder mehr dieser aktivierenden Sequenzbereiche (Chepelev, Wei et al. 2012).

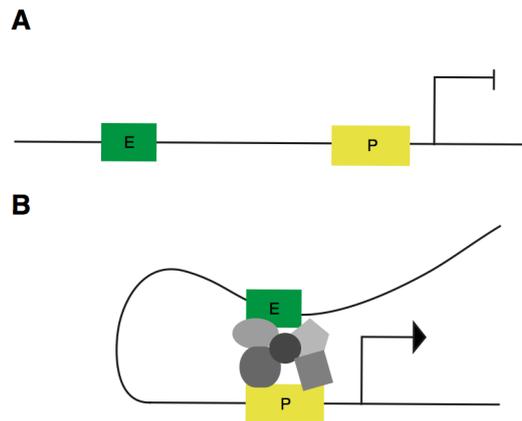


Abbildung F-1: Ausbildung einer Chromatinschleife zwischen Enhancer und Promotor (Marsman and Horsfield 2012).

A: Gentranskription ist inaktiv, da sich der Enhancer (E) nicht in Nähe des Promotors (P) befindet.

B: Gentranskription wird aktiviert, da der Enhancer in die Nähe des Promotors transloziert wurde und nun Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren rekrutiert werden können.

Auffallend ist, dass 5'-terminal trunkierte Promotorvarianten, die den putativen Enhancer nicht enthalten, eine sehr niedrige Aktivität besitzen, die teilweise sogar unter den Werten der Negativkontrolle liegen (vgl. Abbildung E-8). Dies belegt, dass der Bereich zwischen 982-1339 bp im *full length*-Promotor essenziell für die Transkription von *Fzd8* ist. Da der gleiche Effekt sowohl in hMSC als auch in HT1080 zu beobachten ist (vgl. Abbildung E-8 und Abbildung E-10), ist aber nicht davon auszugehen, dass der Enhancer spezifisch in HT1080 aktiv ist und allein für die starke Überexpression von *Fzd8* in dieser Zelllinie verantwortlich ist.

Ob es tatsächlich zur Ausbildung einer Chromatinschleife zwischen putativem Enhancer *Fzd8*-Promotor kommt, könnte in Zukunft etwa durch die sog. *chromosome conformation capture*-Methode (3C) untersucht werden (Hakim and Misteli 2012). Inwiefern dieser DNA-Abschnitt weitere typische Merkmale eines Enhancers trägt, wie etwa bestimmte Histonmodifikationen, könnte in Zukunft mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) nachgewiesen werden (Barski, Cuddapah et al. 2007; Heintzman, Hon et al. 2009).

F.3 Regulation der Fzd8-Expression durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob bzw. inwieweit Aktivierung bzw. Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges Auswirkungen auf die Promotoraktivität von Fzd8 zeigen. In vorhergegangenen Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe wurde Fzd8 als negatives Zielgen des kanonischen Wnt-Signalweges beschrieben (Karow 2008; Kolben 2010).

Nachdem die verschiedenen Fzd8-Promotorvarianten in HT1080 oder hMSC transfiziert worden waren, wurden die Zellen mit rhWnt3a in einer Konzentration von 75 ng/ml stimuliert. Wnt3a wurde bisher als „kanonisch“ wirkendes Wnt charakterisiert (Kikuchi, Yamamoto et al. 2007). Tatsächlich konnte für beinahe alle Reporterplasmide, die Fzd8-Promotorvarianten trugen, nach Stimulation mit rhWnt3a eine leichte Verringerung der Aktivität festgestellt werden (vergleiche E.2.1 und E.2.2). Allerdings waren die Einbrüche der Fzd8-Expression auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit Wnt3a deutlicher ausgeprägt und betragen bis zu 80 % (Karow 2008). In der Arbeit von Dr. Karow wurden die Zellen allerdings mit einer Wnt3a-Konzentration von 150 ng/ml stimuliert, was den stärkeren Effekt erklären könnte.

Um Modulationen im kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg weiter *downstream* in der Signalwegskaskade vorzunehmen, wurden in HT1080 und hMSC jeweils APC und β -Catenin durch Transfektion der jeweiligen siRNAs ausgeschaltet. Ein APC-Knockdown ist mit einer deutlichen Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, ein β -Catenin-Knockdown dagegen mit einer Inhibition assoziiert (Karow 2008). Interessanterweise wurden bei Kotransfektion von siRNA gegen APC bzw. β -Catenin und Fzd8-Promotor-Reporterplasmiden reproduzierbar der Erwartung entgegengesetzte Phänomene beobachtet. Inhibition des Wnt-Signalweges durch β -Catenin-Knockdown bewirkte eine Verminderung der Fzd8-Promotoraktivität, Aktivierung durch APC-Knockdown aber führte zu Induktion der Promotoraktivität (vergleiche E.3.2 und E.3.3). In vorangegangenen Arbeiten in unserem Labor wurde allerdings bereits mehrmals auf mRNA-Ebene gezeigt, dass Fzd8 nach Knockdown von β -Catenin vermehrt und nach Knockdown von APC vermindert exprimiert wird (Karow 2008; Kolben 2010).

Der Fzd8-Promotor reagierte auch unter Knockdown von β -Catenin mit einer verminderten Aktivität unter Stimulation mit Wnt3a (siehe Abbildung E-19). Dies legt den Schluss nahe, dass Wnt3a seinen repressiven Effekt auf den Fzd8-Promotor nicht durch den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt, sondern vielmehr durch einen anderen, nicht-kanonischen Signalweg. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich gezeigt werden, dass Wnt3a durchaus auch über nicht-kanonische Signalwege wirken kann und sich kanonische

und nicht-kanonische Effekte von Wnt3a sogar antagonisieren können (Qu, Wang et al. 2013). Ob ähnliche Effekte in der Regulation von Fzd8 auch eine Rolle spielen, könnte Gegenstand künftiger Arbeiten auf diesem Forschungsgebiet sein.

Ein weiterer wichtiger Punkt, besteht darin, dass kanonisches Wnt-Signaling auch eine Repression von Genen bewirken kann. In *Drosophila* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass kanonisches Wnt-Signaling direkt, also durch den Komplex aus TCF/LEF und β -Catenin, über das Bindungsmotiv AGAWAW repressiv an Promotoren wirken kann (Hoverter and Waterman 2008). Dieses Motiv ist sehr kurz und degeneriert. Es kommt somit sehr häufig in der menschlichen DNA vor. Allerdings bietet es wohl nur eine schwache Bindungsstelle für TCF/LEF und β -Catenin. Eine stabile Bindung erscheint generell eher ungewöhnlich und abhängig von der Anwesenheit weiterer Kofaktoren (Hoverter and Waterman 2008). Auch im Fzd8-Promotor findet sich dieses Motiv dreimal. Allerdings können auf Grund der Daten dieser Arbeit keine Aussagen darüber getroffen werden, ob ihnen eine Rolle in der Wnt3a-vermittelten Repression von Fzd8 zuzuordnen ist.

Eine weitere Arbeit aus unserem Labor identifizierte mit Wnt8b kürzlich einen möglichen Liganden für Fzd8 (Lechner 2013). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Wnt8b ebenfalls den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert und in hohen Konzentrationen Fzd8 induzieren kann, während es in niedrigeren Leveln die Fzd8-Expression reprimiert (Lechner 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Fzd8-Promotor durchaus durch Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges positiv regulierbar ist, Wnt3a aber einen repressiven Effekt auf ihn ausübt.

F.4 ZF5 als möglicher Aktivator des Fzd8-Promotors

Nachdem durch die Reportergergenversuche eine Kartierung des Fzd8-Promotors in aktivierende und repressive Abschnitte erfolgt war (siehe Abbildung E-13), wurde er mit Hilfe der Software MatInspector auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht (siehe E.4), wobei unter Berücksichtigung der Literatur vor allem der Transkriptionsfaktor ZF5 als interessanter Kandidat in der Transkriptionsregulation von Fzd8 erschien.

Das ZF5-Protein beinhaltet fünf C-terminale Zinkfinger-Motive und eine konservierte, N-terminale POZ-Domäne. POZ ist ein Akronym für Poxvirus und Zinkfinger. Diese Domäne ermöglicht eine spezifische Protein-Protein-Interaktion (Bardwell and Treisman 1994). Es wurde gezeigt, dass ZF5 je nach Promotor gegensätzliche Effekte ausüben kann. So aktiviert es den Promotor des HI-Virus, dagegen bewirkt es eine Repression am Promotor der HSV-Thymidinkinase (Numoto, Yokoro et al. 1999). Die POZ-Domäne konnte als das repressive, die Zinkfinger-Domäne als das aktivierende Element definiert werden (Kaplan and Calame 1997).

ZF5 besitzt laut MatInspector 16 Bindungsstellen in der gesamten Fzd8-Promotorregion, wobei er sowohl im Enhancer-Element, als auch in den 3'-terminalen repressiven Abschnitten des Promotors binden kann. Es lässt sich also allein anhand der Verteilung der Bindungsstellen keine eindeutige Hypothese über den Effekt von ZF5 am Fzd8-Promotor ableiten, zumal ZF5 in der Literatur sowohl als Repressor als auch als Aktivator beschrieben ist (Numoto, Yokoro et al. 1999).

Allerdings konnte im Vergleich von hMSC mit HT1080 gezeigt werden, dass ZF5 in HT1080 deutlich höher exprimiert wird. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese formuliert, dass in HT1080-Zellen eine erhöhte Expression von Fzd8 und ZF5 positiv miteinander korrelieren. Somit könnte ZF5 am Fzd8-Promotor als Aktivator fungieren. Dies sollte im letzten Teil der Arbeit experimentell durch die Überexpression von ZF5 analysiert werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Expression von ZF5 durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert wird. Dem lag die Idee zugrunde, dass Fzd8 zum einen durch Wnt3a direkt negativ reguliert werden kann (siehe F.3), es aber ebenso möglich ist, dass die Effekte des Wnt/ β -Catenin-Signalings auf die Fzd8-Expression indirekt vermittelt sein könnten, d.h. durch Induktion eines Aktivators oder Repressors wie z.B. ZF5.

F.4.1 ZF5 als positives Wnt/ β -Catenin-Zielgen

Bekannte Wnt/ β -Catenin-Zielgene wie zum Beispiel Cyclin D1 (Tetsu and McCormick 1999), Dkk-1 (Niida, Hiroko et al. 2004) oder MT1-MMP (Takahashi, Tsunoda et al. 2002) sind dadurch charakterisiert, dass sie innerhalb ihres Promotors eine oder mehrere TCF/LEF-Bindungsstellen aufweisen (Hurlstone and Clevers 2002). Eine *in silico*-Analyse der Promotorregion von ZF5 (3200 bp *upstream* des TSS) ergab, dass sich in ihr fünf putative TCF/LEF-Bindungsstellen befinden.

Unsere Experimente zeigten, dass ZF5 tatsächlich durch Wnt3a-Stimulation in hMSC und HT1080 induziert wird (siehe Abbildung E-21 und Abbildung E-22). Auch durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges mittels eines APC-Knockdowns war eine leichte Erhöhung der ZF5-Expression zu beobachten (siehe Abbildung E-23). Diese Daten legen zum ersten mal den Schluss nahe, dass ZF5 ein positives Wnt/ β -Catenin-Zielgen darstellen könnte. Über die transkriptionelle Regulation von ZF5 liegen in der verfügbaren Literatur bisher keine weiteren Erkenntnisse vor.

F.4.2 Überexpression von ZF5: Effekte auf die Fzd8-Expression und den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Mit dem Vektor pN3-ZF5 konnte eine ca. 5-fache Überexpression von ZF5 erreicht werden (siehe Abbildung E-25). Die ZF5-Überexpression ging mit einer deutlichen Induktion der Fzd8-Expression einher (siehe Abbildung E-26). Insofern scheint eine partielle positive Regulation von Fzd8 durch ZF5 in HT1080-Zellen mechanistisch durchaus eine Rolle zu spielen.

Als letztes sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von ZF5 einen positiven Effekt auf den Aktivierungsgrad des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ausüben kann. Dabei wurde eine Zunahme des Wnt/ β -Catenin-Signalings nach Überexpression von ZF5 beobachtet (siehe Abbildung E-27). Somit scheint ein positiver *feedback loop*, indem der Wnt/ β -Catenin-regulierte ZF5 die Expression von Fzd8 steuert und damit zu einem verstärkten Wnt/ β -Catenin-Signaling führt, zumindest in HT1080-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen (siehe Abbildung F-2).

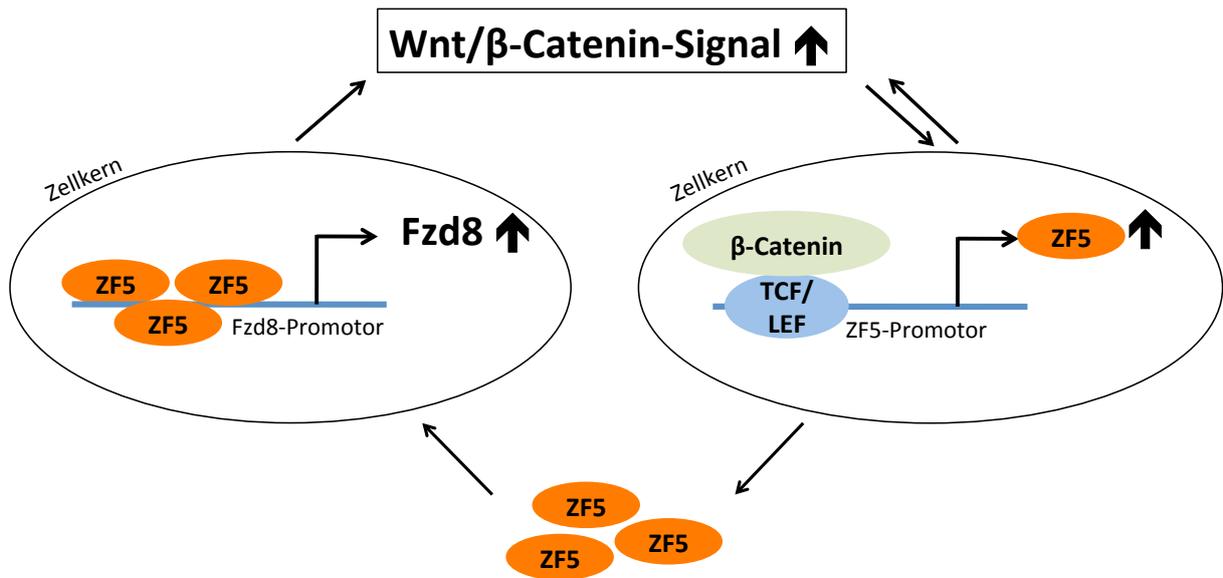


Abbildung F-2: Positiver *feedback loop* zwischen ZF5 und Fzd8 über den Wnt/β-Catenin-Signalweg

Eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges führt zu einer Induktion von ZF5. Durch ZF5 wird Fzd8 vermehrt exprimiert, was mit einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges einhergeht (Leitenstern et al., mündliche Mitteilung). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von ZF5 zu einer Induktion des Wnt/β-Catenin-Signalweges führt.

G Resümee und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Fzd8-Promotorregion erfolgreich klassifiziert, kartiert und mit ZF5 ein potentieller aktivierender Transkriptionsfaktor identifiziert werden.

In seiner Struktur ist der Fzd8-Promotor den Promotoren vom *dispersed*-Typ zuzuordnen und somit der größten Klasse von Promotoren im menschlichen Genom (Juven-Gershon, Hsu et al. 2008): Er besitzt keine typischen *core*-Promotorelemente, ist mit 65 % GC-reich und verfügt über verschiedene TSS, wie der Großteil aller Gene (Saxonov, Berg et al. 2006). Da der Fzd8-Promotor die Kriterien einer CpG-Insel erfüllt, könnte in künftigen Arbeiten auf diesem Gebiet die Frage interessant sein, ob und inwiefern der Methylierungsstatus für seine Aktivitätsregulation in verschiedenen Zelllinien eine Rolle spielt.

Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein alternativer TSS für die starke Fzd8-Expression in HT1080-Zellen verantwortlich ist. So bleibt die Frage bisher offen, ob auch im Falle von Fzd8 durch Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signals die Rekrutierung von verschiedenen TSS gesteuert werden kann. Ähnliches konnte bereits für TCF12 gezeigt werden (Thorsen, Schepeler et al. 2011).

Außerdem ließ sich ein putatives distales Enhancer-Element im Fzd8-Promotor identifizieren. Nach Datenlage der vorliegenden Arbeit ist nicht von einer tumorspezifischen Aktivität dieses Enhancers auszugehen. 25 % der Promotoren interagieren allerdings mit mehreren Enhancer-Elementen, die sich auch in großer Entfernung im Genom befinden können (Chepelev, Wei et al. 2012).

Bisher wurde Fzd8 als negatives Wnt/ β -Catenin-Zielgen beschrieben (Kolben 2010). Interessanterweise aber konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Fzd8-Promotor zwar unter Wnt3a-Stimulation reprimiert wird. APC- und β -Catenin-Knockdown-Experimente zeigten jedoch, dass der Fzd8-Promotor unter positiver Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu stehen scheint. Demnach ist es denkbar, dass für die hohe Fzd8-Expressionsrate in HT1080 ein positiver *feedback loop* verantwortlich ist, in dem erhöhtes Wnt/ β -Catenin-Signaling zu einer Induktion von Fzd8 führt. Erhöhte Fzd8-Expression geht wiederum mit einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges einher (Leitenstern et al., mündliche Mitteilung).

Da im Rahmen dieser Arbeit der Transkriptionsfaktor ZF5 als putativ positives Wnt/ β -Catenin-Zielgen und als möglicher Aktivator am Fzd8-Promotor charakterisiert werden konnte, ist es denkbar, dass dieser putative positive *feedback loop* über ZF5 verstärkt wird. Zu klä-

ren bleibt allerdings die Frage, über welchen Signalweg Wnt3a seine repressive Wirkung am Fzd8-Promotor vermittelt.

Durch seine wichtige Rolle in der Steuerung grundlegender Zellfunktionen und der Entstehung von Tumoren, stellt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ein interessantes therapeutisches Ziel dar. Allerdings existiert bis heute keine Substanz, die durch Modulation dieses Signalweges zufriedenstellende Ergebnisse in der Behandlung von Krebserkrankungen leisten kann. Durch seine ausgesprochen hohe Komplexität und durch die vielfach pleiotropen Effekte seiner Komponenten ist es äußerst schwierig, gezielt in den kanonischen Wnt-Signalweg einzugreifen (Clevers and Nusse 2012). Als Beispiel sei hier die GSK3 β genannt, die sowohl aktivierende als auch hemmende Funktion im Wnt-Signalweg ausüben kann und somit kein gutes Ziel einer Therapie darstellt (Clevers and Nusse 2012).

Neuere Studien belegen, dass pathologische Veränderungen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg wegen dessen Kontextabhängigkeit nicht mittels einer einzelnen Strategie therapeutisch behandelt werden können (Anastas and Moon 2013). Deshalb ist es von großer Bedeutung, dass das immer komplexer werdende Wissen über die kontextabhängige Rolle des Wnt/ β -Catenin-*Signalings* Einzug in die Klinik findet, um in Zukunft erfolgversprechende Therapien anbieten zu können (Anastas and Moon 2013).

H Literaturverzeichnis

- Ahumada, A., D. C. Slusarski, et al. (2002). "Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP." *Science* **298**(5600): 2006-2010.
- Ai, M., S. L. Holmen, et al. (2005). "Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling." *Molecular and cellular biology* **25**(12): 4946-4955.
- Amit, S., A. Hatzubai, et al. (2002). "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." *Genes Dev* **16**(9): 1066-1076.
- Anastas, J. N. and R. T. Moon (2013). "WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer." *Nature reviews. Cancer* **13**(1): 11-26.
- Andl, T., S. T. Reddy, et al. (2002). "WNT signals are required for the initiation of hair follicle development." *Developmental cell* **2**(5): 643-653.
- Arce, L., N. N. Yokoyama, et al. (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." *Oncogene* **25**(57): 7492-7504.
- Bajic, V. B., S. L. Tan, et al. (2006). "Mice and men: their promoter properties." *PLoS genetics* **2**(4): e54.
- Banziger, C., D. Soldini, et al. (2006). "Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells." *Cell* **125**(3): 509-522.
- Bardwell, V. J. and R. Treisman (1994). "The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif." *Genes & development* **8**(14): 1664-1677.
- Barski, A., S. Cuddapah, et al. (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." *Cell* **129**(4): 823-837.
- Bass, A. J., M. S. Lawrence, et al. (2011). "Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion." *Nature genetics* **43**(10): 964-968.
- Belenkaya, T. Y., C. Han, et al. (2002). "pygopus Encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling." *Development* **129**(17): 4089-4101.
- Belenkaya, T. Y., Y. Wu, et al. (2008). "The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network." *Dev Cell* **14**(1): 120-131.
- Bhanot, P., M. Brink, et al. (1996). "A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor." *Nature* **382**(6588): 225-230.
- Biechele, T. L. and R. T. Moon (2008). "Assaying beta-catenin/TCF transcription with beta-catenin/TCF transcription-based reporter constructs." *Methods in molecular biology* **468**: 99-110.
- Bilic, J., Y. L. Huang, et al. (2007). "Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation." *Science* **316**(5831): 1619-1622.
- Billin, A. N., H. Thirlwell, et al. (2000). "Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6882-6890.
- Bird, A., M. Taggart, et al. (1985). "A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA." *Cell* **40**(1): 91-99.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic acids research* **7**(6): 1513-1523.
- Bodine, P. V., B. Stauffer, et al. (2009). "A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation." *Bone* **44**(6): 1063-1068.

- Bourhis, E., C. Tam, et al. (2010). "Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6." *J Biol Chem* **285**(12): 9172-9179.
- Boutros, M., N. Paricio, et al. (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell* **94**(1): 109-118.
- Bovolenta, P., P. Esteve, et al. (2008). "Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease." *J Cell Sci* **121**(Pt 6): 737-746.
- Boyden, L. M., J. Mao, et al. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." *The New England journal of medicine* **346**(20): 1513-1521.
- Brown, S. D., R. C. Twells, et al. (1998). "Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(3): 879-888.
- Bryja, V., E. R. Andersson, et al. (2009). "The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo." *Molecular biology of the cell* **20**(3): 924-936.
- Bulger, M. and M. Groudine (1999). "Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation." *Genes & development* **13**(19): 2465-2477.
- Cabrera, C. V., M. C. Alonso, et al. (1987). "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene." *Cell* **50**(4): 659-663.
- Carninci, P., A. Sandelin, et al. (2006). "Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution." *Nature genetics* **38**(6): 626-635.
- Cartharius, K., K. Frech, et al. (2005). "MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites." *Bioinformatics* **21**(13): 2933-2942.
- Cavallo, R. A., R. T. Cox, et al. (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." *Nature* **395**(6702): 604-608.
- Chan, S. D., D. B. Karpf, et al. (1992). "Two homologs of the Drosophila polarity gene frizzled (fz) are widely expressed in mammalian tissues." *J Biol Chem* **267**(35): 25202-25207.
- Chen, W., D. ten Berge, et al. (2003). "Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4." *Science* **301**(5638): 1391-1394.
- Chepelev, I., G. Wei, et al. (2012). "Characterization of genome-wide enhancer-promoter interactions reveals co-expression of interacting genes and modes of higher order chromatin organization." *Cell research* **22**(3): 490-503.
- Choi, J., S. Y. Park, et al. (2004). "Adenomatous polyposis coli is down-regulated by the ubiquitin-proteasome pathway in a process facilitated by Axin." *The Journal of biological chemistry* **279**(47): 49188-49198.
- Clapier, C. R. and B. R. Cairns (2009). "The biology of chromatin remodeling complexes." *Annual review of biochemistry* **78**: 273-304.
- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." *Cell* **149**(6): 1192-1205.
- Cliffe, A., F. Hamada, et al. (2003). "A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling." *Curr Biol* **13**(11): 960-966.
- Cong, F., L. Schweizer, et al. (2004). "Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP." *Development* **131**(20): 5103-5115.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* **173**(1 Spec No): 33-38.
- Coudreuse, D. Y., G. Roel, et al. (2006). "Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells." *Science* **312**(5775): 921-924.
- da Cruz e Silva, O. A., A. G. Henriques, et al. (2010). "Wnt signalling is a relevant pathway contributing to amyloid beta-peptide-mediated neuropathology in Alzheimer's disease." *CNS & neurological disorders drug targets* **9**(6): 720-726.

- Dajani, R., E. Fraser, et al. (2003). "Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex." *EMBO J* **22**(3): 494-501.
- Daniels, D. L. and W. I. Weis (2005). "Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation." *Nat Struct Mol Biol* **12**(4): 364-371.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, et al. (2001). "Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains." *Nature* **412**(6842): 86-90.
- DasGupta, R. and E. Fuchs (1999). "Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation." *Development* **126**(20): 4557-4568.
- Davidson, G., W. Wu, et al. (2005). "Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction." *Nature* **438**(7069): 867-872.
- de Laat, W., P. Klous, et al. (2008). "Three-dimensional organization of gene expression in erythroid cells." *Current topics in developmental biology* **82**: 117-139.
- Deaton, A. M. and A. Bird (2011). "CpG islands and the regulation of transcription." *Genes & development* **25**(10): 1010-1022.
- Dejmek, J., A. Sahlholm, et al. (2006). "Wnt-5a/Ca²⁺-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells." *Mol Cell Biol* **26**(16): 6024-6036.
- Dikstein, R. (2011). "The unexpected traits associated with core promoter elements." *Transcription* **2**(5): 201-206.
- Dillman, A. R., P. J. Minor, et al. (2013). "Origin and evolution of dishevelled." *G3* **3**(2): 251-262.
- Dong, Y., W. Lathrop, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of LR3, a novel LDL receptor family protein with mitogenic activity." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3): 784-790.
- Egger-Adam, D. and V. L. Katanaev (2010). "The trimeric G protein Go inflicts a double impact on axin in the Wnt/frizzled signaling pathway." *Dev Dyn* **239**(1): 168-183.
- Ellies, D. L., B. Viviano, et al. (2006). "Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity." *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **21**(11): 1738-1749.
- Ellwanger, K., H. Saito, et al. (2008). "Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density." *Molecular and cellular biology* **28**(15): 4875-4882.
- Esufali, S. and B. Bapat (2004). "Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation." *Oncogene* **23**(50): 8260-8271.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7413-7417.
- FitzGerald, P. C., A. Shlyakhtenko, et al. (2004). "Clustering of DNA sequences in human promoters." *Genome research* **14**(8): 1562-1574.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* **57**(2): 279-288.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-1272.
- Frith, M. C., E. Valen, et al. (2008). "A code for transcription initiation in mammalian genomes." *Genome research* **18**(1): 1-12.
- Fuda, N. J., M. B. Ardehali, et al. (2009). "Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo." *Nature* **461**(7261): 186-192.

- Fujino, T., H. Asaba, et al. (2003). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 229-234.
- Galli, L. M., T. L. Barnes, et al. (2007). "Porcupine-mediated lipid-modification regulates the activity and distribution of Wnt proteins in the chick neural tube." *Development* **134**(18): 3339-3348.
- Gao, C. and Y. G. Chen (2010). "Dishevelled: The hub of Wnt signaling." *Cell Signal* **22**(5): 717-727.
- Gat, U., R. DasGupta, et al. (1998). "De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin." *Cell* **95**(5): 605-614.
- George, S. T., A. E. Ruoho, et al. (1986). "N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors." *J Biol Chem* **261**(35): 16559-16564.
- Gershenson, N. I. and I. P. Ioshikhes (2005). "Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis." *Bioinformatics* **21**(8): 1295-1300.
- Gershoni, J. M. and G. E. Palade (1983). "Protein blotting: principles and applications." *Analytical biochemistry* **131**(1): 1-15.
- Giese, K., J. Cox, et al. (1992). "The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures." *Cell* **69**(1): 185-195.
- Go, G. W. and A. Mani (2012). "Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis." *The Yale journal of biology and medicine* **85**(1): 19-28.
- Gong, Y., R. B. Slee, et al. (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." *Cell* **107**(4): 513-523.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *The Journal of general virology* **36**(1): 59-74.
- Graham, T. A., C. Weaver, et al. (2000). "Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex." *Cell* **103**(6): 885-896.
- Grant, S. F., G. Thorleifsson, et al. (2006). "Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes." *Nature genetics* **38**(3): 320-323.
- Guder, C., I. Philipp, et al. (2006). "The Wnt code: cnidarians signal the way." *Oncogene* **25**(57): 7450-7460.
- Ha, N. C., T. Tonzuka, et al. (2004). "Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation." *Mol Cell* **15**(4): 511-521.
- Haas, J., E. C. Park, et al. (1996). "Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein." *Current biology : CB* **6**(3): 315-324.
- Habas, R., I. B. Dawid, et al. (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." *Genes & development* **17**(2): 295-309.
- Habas, R., Y. Kato, et al. (2001). "Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1." *Cell* **107**(7): 843-854.
- Hakim, O. and T. Misteli (2012). "SnapShot: Chromosome confirmation capture." *Cell* **148**(5): 1068 e1061-1062.
- He, X., M. Semenov, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." *Development* **131**(8): 1663-1677.
- Hecht, A., K. Vlemingx, et al. (2000). "The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates." *EMBO J* **19**(8): 1839-1850.
- Hedgepeth, C. M., M. A. Deardorff, et al. (1999). "Regulation of glycogen synthase kinase 3beta and downstream Wnt signaling by axin." *Molecular and cellular biology* **19**(10): 7147-7157.

- Heintzman, N. D., G. C. Hon, et al. (2009). "Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression." *Nature* **459**(7243): 108-112.
- Heisenberg, C. P., M. Tada, et al. (2000). "Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation." *Nature* **405**(6782): 76-81.
- Henderson, B. R. and F. Fagotto (2002). "The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport." *EMBO reports* **3**(9): 834-839.
- Hey, P. J., R. C. Twells, et al. (1998). "Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family." *Gene* **216**(1): 103-111.
- Hoelters, J., M. Ciccarella, et al. (2005). "Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells." *The journal of gene medicine* **7**(6): 718-728.
- Hofmann, K. (2000). "A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling." *Trends Biochem Sci* **25**(3): 111-112.
- Hoppler, S. and C. L. Kavanagh (2007). "Wnt signalling: variety at the core." *Journal of cell science* **120**(Pt 3): 385-393.
- Hoverter, N. P. and M. L. Waterman (2008). "A Wnt-fall for gene regulation: repression." *Science signaling* **1**(39): pe43.
- Hsieh, J. C., A. Rattner, et al. (1999). "Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3546-3551.
- Huang, H. and X. He (2008). "Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights." *Curr Opin Cell Biol* **20**(2): 119-125.
- Huang, S. M., Y. M. Mishina, et al. (2009). "Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling." *Nature* **461**(7264): 614-620.
- Huber, A. H., W. J. Nelson, et al. (1997). "Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin." *Cell* **90**(5): 871-882.
- Hur, E. M. and F. Q. Zhou (2010). "GSK3 signalling in neural development." *Nature reviews. Neuroscience* **11**(8): 539-551.
- Hurlstone, A. and H. Clevers (2002). "T-cell factors: turn-ons and turn-offs." *EMBO J* **21**(10): 2303-2311.
- Illingworth, R. S., U. Gruenewald-Schneider, et al. (2010). "Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome." *PLoS genetics* **6**(9).
- Ishitani, T., S. Kishida, et al. (2003). "The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling." *Mol Cell Biol* **23**(1): 131-139.
- Itasaki, N., C. M. Jones, et al. (2003). "Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling." *Development* **130**(18): 4295-4305.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2007). "The epigenomics of cancer." *Cell* **128**(4): 683-692.
- Juven-Gershon, T., J. Y. Hsu, et al. (2008). "The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription." *Current opinion in cell biology* **20**(3): 253-259.
- Kadowaki, T., E. Wilder, et al. (1996). "The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing." *Genes Dev* **10**(24): 3116-3128.
- Kaplan, J. and K. Calame (1997). "The ZIN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression." *Nucleic acids research* **25**(6): 1108-1116.
- Karow, M. (2008). *Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Analyse einzelner Signalkomponenten und derer funktionellen Bedeutung bei Proliferation und Invasion. Dissertationsschrift an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dissertation.*
- Katanaev, V. L., R. Ponzelli, et al. (2005). "Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila." *Cell* **120**(1): 111-122.

- Kato, M., M. S. Patel, et al. (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." *J Cell Biol* **157**(2): 303-314.
- Kay, B. K. and J. W. Kehoe (2004). "PDZ domains and their ligands." *Chem Biol* **11**(4): 423-425.
- Kelly, O. G., K. I. Pinson, et al. (2004). "The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice." *Development* **131**(12): 2803-2815.
- Kikuchi, A., S. Kishida, et al. (2006). "Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications." *Experimental & molecular medicine* **38**(1): 1-10.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto, et al. (2007). "Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors." *Cell Signal* **19**(4): 659-671.
- Kim, D. H., Y. Inagaki, et al. (1998). "A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E." *J Biochem* **124**(6): 1072-1076.
- Kim, T. H., L. O. Barrera, et al. (2005). "A high-resolution map of active promoters in the human genome." *Nature* **436**(7052): 876-880.
- Kimelman, D. and W. Xu (2006). "beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective." *Oncogene* **25**(57): 7482-7491.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, et al. (1991). "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21." *Science* **253**(5020): 661-665.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* **87**(2): 159-170.
- Kirikoshi, H., J. Koike, et al. (2000). "Molecular cloning and genomic structure of human frizzled-3 at chromosome 8p21." *Biochem Biophys Res Commun* **271**(1): 8-14.
- Kirikoshi, H., N. Sagara, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of human Frizzled-4 on chromosome 11q14-q21." *Biochem Biophys Res Commun* **264**(3): 955-961.
- Koike, J., A. Takagi, et al. (1999). "Molecular cloning of Frizzled-10, a novel member of the Frizzled gene family." *Biochem Biophys Res Commun* **262**(1): 39-43.
- Kolben, T. (2010). "Wnt/ β -Catenin-Signalling an der Oberfläche von humanen mesenchymalen Stammzellen: Expression und Regulation der Frizzled-Rezeptoren." *Dissertationsschrift an der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Kolben, T., I. Perobner, et al. (2012). "Dissecting the impact of Frizzled receptors in Wnt/beta-catenin signaling of human mesenchymal stem cells." *Biological chemistry* **393**(12): 1433-1447.
- Komekado, H., H. Yamamoto, et al. (2007). "Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a." *Genes Cells* **12**(4): 521-534.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1998). "Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1248-1256.
- Korkut, C., B. Ataman, et al. (2009). "Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless." *Cell* **139**(2): 393-404.
- Kuhl, M., L. C. Sheldahl, et al. (2000). "The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape." *Trends Genet* **16**(7): 279-283.
- Kurayoshi, M., H. Yamamoto, et al. (2007). "Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling." *Biochem J* **402**(3): 515-523.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J Mol Biol* **157**(1): 105-132.

- Labas, Y. A., N. G. Gurskaya, et al. (2002). "Diversity and evolution of the green fluorescent protein family." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(7): 4256-4261.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lammi, L., S. Arte, et al. (2004). "Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer." American journal of human genetics **74**(5): 1043-1050.
- Lechner, F. (2013). "Die Bedeutung verschiedener Frizzled8-Isoformen und Wnt8B im Wnt/ β -Catenin-Signalweg von mesodermalen Tumorzellen." Dissertationsschrift an der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Lee, E., A. Salic, et al. (2003). "The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway." PLoS Biol **1**(1): E10.
- Lepourcelet, M., Y. N. Chen, et al. (2004). "Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex." Cancer Cell **5**(1): 91-102.
- Li, V. S., S. S. Ng, et al. (2012). "Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex." Cell **149**(6): 1245-1256.
- Li, X., Y. Zhang, et al. (2005). "Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling." The Journal of biological chemistry **280**(20): 19883-19887.
- Liepinsh, E., L. Banyai, et al. (2006). "NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1." J Mol Biol **357**(3): 942-950.
- Lin, K., S. Wang, et al. (1997). "The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11196-11200.
- Little, R. D., R. R. Recker, et al. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." The New England journal of medicine **347**(12): 943-944; author reply 943-944.
- Liu, C., Y. Li, et al. (2002). "Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." Cell **108**(6): 837-847.
- Liu, G., A. Bafico, et al. (2003). "A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor." Mol Cell Biol **23**(16): 5825-5835.
- Liu, J., Y. Xing, et al. (2006). "The third 20 amino acid repeat is the tightest binding site of APC for β -catenin." J Mol Biol **360**(1): 133-144.
- Liu, T., A. J. DeCostanzo, et al. (2001). "G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the β -catenin-Lef-Tcf pathway." Science **292**(5522): 1718-1722.
- Liu, X., T. Liu, et al. (1999). "Activation of a frizzled-2/ β -adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via Galphao and Galphat." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14383-14388.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Losick, V. P., L. X. Morris, et al. (2011). "Drosophila stem cell niches: a decade of discovery suggests a unified view of stem cell regulation." Developmental cell **21**(1): 159-171.
- Louis, N., C. Eveleigh, et al. (1997). "Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line." Virology **233**(2): 423-429.
- Lovestone, S., R. Killick, et al. (2007). "Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder." Trends in neurosciences **30**(4): 142-149.
- Lu, J., Z. Ma, et al. (2009). "Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response." Bioorganic & medicinal chemistry letters **19**(14): 3825-3827.

- Lu, W., V. Yamamoto, et al. (2004). "Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth." *Cell* **119**(1): 97-108.
- Luo, W., H. Zou, et al. (2005). "Axin contains three separable domains that confer intramolecular, homodimeric, and heterodimeric interactions involved in distinct functions." *The Journal of biological chemistry* **280**(6): 5054-5060.
- MacDonald, B. T., K. Tamai, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* **17**(1): 9-26.
- Macheda, M. L., W. W. Sun, et al. (2012). "The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling." *The Journal of biological chemistry* **287**(35): 29312-29323.
- Magoori, K., M. J. Kang, et al. (2003). "Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E." *J Biol Chem* **278**(13): 11331-11336.
- Mani, A., J. Radhakrishnan, et al. (2007). "LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors." *Science* **315**(5816): 1278-1282.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." *Nature* **417**(6889): 664-667.
- Mao, B., W. Wu, et al. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." *Nature* **411**(6835): 321-325.
- Mao, J., J. Wang, et al. (2001). "Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway." *Mol Cell* **7**(4): 801-809.
- Marsman, J. and J. A. Horsfield (2012). "Long distance relationships: enhancer-promoter communication and dynamic gene transcription." *Biochimica et biophysica acta* **1819**(11-12): 1217-1227.
- Mason, J. O., J. Kitajewski, et al. (1992). "Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line." *Mol Biol Cell* **3**(5): 521-533.
- McMahon, A. P. and 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.
- Mi, K., P. J. Dolan, et al. (2006). "The low density lipoprotein receptor-related protein 6 interacts with glycogen synthase kinase 3 and attenuates activity." *The Journal of biological chemistry* **281**(8): 4787-4794.
- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context." *PLoS Biol* **4**(4): e115.
- Mikels, A. J. and R. Nusse (2006). "Wnts as ligands: processing, secretion and reception." *Oncogene* **25**(57): 7461-7468.
- Miyawaki, A. (2002). "Green fluorescent protein-like proteins in reef Anthozoa animals." *Cell structure and function* **27**(5): 343-347.
- Moller, S., J. Vilo, et al. (2001). "Prediction of the coupling specificity of G protein coupled receptors to their G proteins." *Bioinformatics* **17 Suppl 1**: S174-181.
- Moshonov, S., R. Elfakess, et al. (2008). "Links between core promoter and basic gene features influence gene expression." *BMC genomics* **9**: 92.
- Moxham, C. P. and C. C. Malbon (1985). "Fat cell beta 1-adrenergic receptor: structural evidence for existence of disulfide bridges essential for ligand binding." *Biochemistry* **24**(22): 6072-6077.
- Mulligan, K. A., C. Fuerer, et al. (2012). "Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by maintaining Wingless solubility." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(2): 370-377.
- Neth, P., M. Ciccarella, et al. (2006). "Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **24**(8): 1892-1903.

- Niida, A., T. Hiroko, et al. (2004). "DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway." *Oncogene* **23**(52): 8520-8526.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, et al. (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." *Science* **253**(5020): 665-669.
- Noordermeer, J., J. Klingensmith, et al. (1994). "dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*." *Nature* **367**(6458): 80-83.
- Numoto, M., K. Yokoro, et al. (1999). "ZF5, which is a Kruppel-type transcriptional repressor, requires the zinc finger domain for self-association." *Biochemical and biophysical research communications* **256**(3): 573-578.
- Nusse, R., A. Brown, et al. (1991). "A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family." *Cell* **64**(2): 231.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." *Cell* **31**(1): 99-109.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* **289**(5480): 739-745.
- Pan, C. L., P. D. Baum, et al. (2008). "C. elegans AP-2 and retromer control Wnt signaling by regulating mig-14/Wntless." *Developmental cell* **14**(1): 132-139.
- Panakova, D., H. Sprong, et al. (2005). "Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling." *Nature* **435**(7038): 58-65.
- Patthy, L. (2000). "The WIF module." *Trends Biochem Sci* **25**(1): 12-13.
- Penton, A., A. Wodarz, et al. (2002). "A mutational analysis of dishevelled in *Drosophila* defines novel domains in the dishevelled protein as well as novel suppressing alleles of axin." *Genetics* **161**(2): 747-762.
- Perobner, I., M. Karow, et al. (2012). "LRP6 mediates Wnt/beta-catenin signaling and regulates adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells." *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**(11): 1970-1982.
- Pierce, K. L., R. T. Premont, et al. (2002). "Seven-transmembrane receptors." *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**(9): 639-650.
- Pinson, K. I., J. Brennan, et al. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." *Nature* **407**(6803): 535-538.
- Port, F., M. Kuster, et al. (2008). "Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless." *Nat Cell Biol* **10**(2): 178-185.
- Prasad, B. C. and S. G. Clark (2006). "Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*." *Development* **133**(9): 1757-1766.
- Qu, F., J. Wang, et al. (2013). "WNT3A modulates chondrogenesis via canonical and non-canonical Wnt pathways in MSCs." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **18**: 493-503.
- Ramirez-Carrozzi, V. R., D. Braas, et al. (2009). "A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling." *Cell* **138**(1): 114-128.
- Rasheed, S., W. A. Nelson-Rees, et al. (1974). "Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)." *Cancer* **33**(4): 1027-1033.
- Ren, X., H. S. Rizavi, et al. (2012). "Altered Wnt signalling in the teenage suicide brain: focus on glycogen synthase kinase-3beta and beta-catenin." *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*: 1-11.
- Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." *Nature* **434**(7035): 843-850.
- Reya, T., A. W. Duncan, et al. (2003). "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." *Nature* **423**(6938): 409-414.

- Reynolds, G. A., S. K. Basu, et al. (1984). "HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions." *Cell* **38**(1): 275-285.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* **50**(4): 649-657.
- Ritter, D. I., Z. Dong, et al. (2012). "Transcriptional enhancers in protein-coding exons of vertebrate developmental genes." *PLoS One* **7**(5): e35202.
- Rocheleau, C. E., W. D. Downs, et al. (1997). "Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos." *Cell* **90**(4): 707-716.
- Rozenfeld, J., E. Efrati, et al. (2011). "Transcriptional regulation of the pendrin gene." *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **28**(3): 385-396.
- Rubinfeld, B., P. Robbins, et al. (1997). "Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines." *Science* **275**(5307): 1790-1792.
- Rubinfeld, B., B. Souza, et al. (1993). "Association of the APC gene product with beta-catenin." *Science* **262**(5140): 1731-1734.
- Sado, T., M. H. Fenner, et al. (2000). "X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation." *Developmental biology* **225**(2): 294-303.
- Sagara, N., G. Toda, et al. (1998). "Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7." *Biochem Biophys Res Commun* **252**(1): 117-122.
- Saitoh, T., M. Hirai, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of human Frizzled-5 gene on chromosome 2q33.3-q34 region." *Int J Oncol* **19**(1): 105-110.
- Saitoh, T., M. Hirai, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of human Frizzled-8 gene on chromosome 10p11.2." *Int J Oncol* **18**(5): 991-996.
- Sandelin, A., P. Carninci, et al. (2007). "Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies." *Nature reviews. Genetics* **8**(6): 424-436.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**(12): 5463-5467.
- Sanyal, A., B. R. Lajoie, et al. (2012). "The long-range interaction landscape of gene promoters." *Nature* **489**(7414): 109-113.
- Sato, A., T. Kojima, et al. (1999). "Dfrizzled-3, a new Drosophila Wnt receptor, acting as an attenuator of Wingless signaling in wingless hypomorphic mutants." *Development* **126**(20): 4421-4430.
- Sato, T., J. H. van Es, et al. (2011). "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts." *Nature* **469**(7330): 415-418.
- Saxonov, S., P. Berg, et al. (2006). "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(5): 1412-1417.
- Schlessinger, K., A. Hall, et al. (2009). "Wnt signaling pathways meet Rho GTPases." *Genes & development* **23**(3): 265-277.
- Schulte, G. (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors." *Pharmacol Rev* **62**(4): 632-667.
- Schwarz-Romond, T., M. Fiedler, et al. (2007). "The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization." *Nat Struct Mol Biol* **14**(6): 484-492.
- Segditsas, S. and I. Tomlinson (2006). "Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway." *Oncogene* **25**(57): 7531-7537.

- Sekiya, I., B. L. Larson, et al. (2002). "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality." *Stem cells* **20**(6): 530-541.
- Semenov, M., K. Tamai, et al. (2005). "SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor." *The Journal of biological chemistry* **280**(29): 26770-26775.
- Semenov, M. V. and M. Snyder (1997). "Human dishevelled genes constitute a DHR-containing multigene family." *Genomics* **42**(2): 302-310.
- Semenov, M. V., K. Tamai, et al. (2001). "Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6." *Current biology : CB* **11**(12): 951-961.
- Shimizu, H., M. A. Julius, et al. (1997). "Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin." *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **8**(12): 1349-1358.
- Shuman, S. (1994). "Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase." *The Journal of biological chemistry* **269**(51): 32678-32684.
- Simons, M., W. J. Gault, et al. (2009). "Electrochemical cues regulate assembly of the Frizzled/Dishevelled complex at the plasma membrane during planar epithelial polarization." *Nat Cell Biol* **11**(3): 286-294.
- Smale, S. T. (2001). "Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation." *Genes & development* **15**(19): 2503-2508.
- Smolich, B. D., J. A. McMahon, et al. (1993). "Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface." *Mol Biol Cell* **4**(12): 1267-1275.
- Sobek-Klocke, I., C. Disque-Kochem, et al. (1997). "The human gene ZFP161 on 18p11.21-pter encodes a putative c-myc repressor and is homologous to murine Zfp161 (Chr 17) and Zfp161-rs1 (X Chr)." *Genomics* **43**(2): 156-164.
- Sobrado, P., A. Jedlicki, et al. (2005). "Basic region of residues 228-231 of protein kinase CK1alpha is involved in its interaction with axin: binding to axin does not affect the kinase activity." *Journal of cellular biochemistry* **94**(2): 217-224.
- Spink, K. E., P. Polakis, et al. (2000). "Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction." *EMBO J* **19**(10): 2270-2279.
- Stamos, J. L. and W. I. Weis (2013). "The beta-catenin destruction complex." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**(1): a007898.
- Strand, M. and C. A. Micchelli (2011). "Quiescent gastric stem cells maintain the adult Drosophila stomach." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(43): 17696-17701.
- Sugioka, K., K. Mizumoto, et al. (2011). "Wnt regulates spindle asymmetry to generate asymmetric nuclear beta-catenin in *C. elegans*." *Cell* **146**(6): 942-954.
- Takacs, C. M., J. R. Baird, et al. (2008). "Dual positive and negative regulation of wingless signaling by adenomatous polyposis coli." *Science* **319**(5861): 333-336.
- Takada, R., Y. Satomi, et al. (2006). "Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion." *Dev Cell* **11**(6): 791-801.
- Takahashi, M., T. Tsunoda, et al. (2002). "Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers." *Oncogene* **21**(38): 5861-5867.
- Tamai, K., M. Semenov, et al. (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." *Nature* **407**(6803): 530-535.
- Tamai, K., X. Zeng, et al. (2004). "A mechanism for Wnt coreceptor activation." *Mol Cell* **13**(1): 149-156.
- Tanaka, K., Y. Kitagawa, et al. (2002). "Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **277**(15): 12816-12823.

- Tannous, B. A., D. E. Kim, et al. (2005). "Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo." Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy **11**(3): 435-443.
- ten Berge, D., D. Kurek, et al. (2011). "Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells." Nature cell biology **13**(9): 1070-1075.
- Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." Nature **398**(6726): 422-426.
- Thorpe, C. J., A. Schlesinger, et al. (1997). "Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm." Cell **90**(4): 695-705.
- Thorsen, K., T. Schepeler, et al. (2011). "Tumor-specific usage of alternative transcription start sites in colorectal cancer identified by genome-wide exon array analysis." BMC genomics **12**: 505.
- Tickenbrock, L., K. Kossmeier, et al. (2003). "Differences between the interaction of beta-catenin with non-phosphorylated and single-mimicked phosphorylated 20-amino acid residue repeats of the APC protein." Journal of molecular biology **327**(2): 359-367.
- Tokuhara, M., M. Hirai, et al. (1998). "Molecular cloning of human Frizzled-6." Biochem Biophys Res Commun **243**(2): 622-627.
- Tolwinski, N. S., M. Wehrli, et al. (2003). "Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity." Developmental cell **4**(3): 407-418.
- Tseng, W. C., F. R. Haselton, et al. (1997). "Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression." The Journal of biological chemistry **272**(41): 25641-25647.
- Turner, J. D., S. R. Alt, et al. (2010). "Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more." Biochemical pharmacology **80**(12): 1860-1868.
- Umbhauer, M., A. Djiane, et al. (2000). "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling." EMBO J **19**(18): 4944-4954.
- Unterseher, F., J. A. Hefele, et al. (2004). "Paraxial protocadherin coordinates cell polarity during convergent extension via Rho A and JNK." EMBO J **23**(16): 3259-3269.
- Uren, A., F. Reichsman, et al. (2000). "Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling." J Biol Chem **275**(6): 4374-4382.
- van Amerongen, R. and R. Nusse (2009). "Towards an integrated view of Wnt signaling in development." Development **136**(19): 3205-3214.
- van Beest, M., D. Dooijes, et al. (2000). "Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs." J Biol Chem **275**(35): 27266-27273.
- van den Heuvel, M., C. Harryman-Samos, et al. (1993). "Mutations in the segment polarity genes wingless and porcupine impair secretion of the wingless protein." EMBO J **12**(13): 5293-5302.
- Vinson, C. R. and P. N. Adler (1987). "Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*." Nature **329**(6139): 549-551.
- Vlad, A., S. Rohrs, et al. (2008). "The first five years of the Wnt targetome." Cell Signal **20**(5): 795-802.
- Wallingford, J. B. and R. Habas (2005). "The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity." Development **132**(20): 4421-4436.
- Wang, H. Y., T. Liu, et al. (2006). "Structure-function analysis of Frizzleds." Cell Signal **18**(7): 934-941.
- Wang, X. D., H. Inzunza, et al. (2013). "Mutations in the Hedgehog Pathway Genes SMO and PTCH1 in Human Gastric Tumors." PLoS One **8**(1): e54415.

- Wang, Y. K., C. H. Samos, et al. (1997). "A novel human homologue of the *Drosophila* frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23." *Hum Mol Genet* **6**(3): 465-472.
- Wehrli, M., S. T. Dougan, et al. (2000). "arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling." *Nature* **407**(6803): 527-530.
- Wharton, K. A., Jr. (2003). "Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction." *Dev Biol* **253**(1): 1-17.
- Willert, K., J. D. Brown, et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." *Nature* **423**(6938): 448-452.
- Wong, G. T., B. J. Gavin, et al. (1994). "Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes." *Mol Cell Biol* **14**(9): 6278-6286.
- Wong, H. C., A. Bourdelas, et al. (2003). "Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled." *Mol Cell* **12**(5): 1251-1260.
- Wood, L. D., D. W. Parsons, et al. (2007). "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." *Science* **318**(5853): 1108-1113.
- Wu, G., G. Xu, et al. (2003). "Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase." *Mol Cell* **11**(6): 1445-1456.
- Wu, X., X. Tu, et al. (2008). "Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling." *Cell* **133**(2): 340-353.
- Xie, R., L. J. Everett, et al. (2013). "Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells." *Cell Stem Cell* **12**(2): 224-237.
- Xing, Y., W. K. Clements, et al. (2003). "Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex." *Genes Dev* **17**(22): 2753-2764.
- Xing, Y., W. K. Clements, et al. (2004). "Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function." *Mol Cell* **15**(4): 523-533.
- Xu, Y. K. and R. Nusse (1998). "The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases." *Curr Biol* **8**(12): R405-406.
- Yanagawa, S., Y. Matsuda, et al. (2002). "Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*." *The EMBO journal* **21**(7): 1733-1742.
- Yanfeng, W. A., H. Berhane, et al. (2011). "Functional dissection of phosphorylation of Dishevelled in *Drosophila*." *Developmental biology* **360**(1): 132-142.
- Yang, C., E. Bolotin, et al. (2007). "Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters." *Gene* **389**(1): 52-65.
- Yost, C., M. Torres, et al. (1996). "The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3." *Genes Dev* **10**(12): 1443-1454.
- Zabner, J., A. J. Fasbender, et al. (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." *J Biol Chem* **270**(32): 18997-19007.
- Zecca, M., K. Basler, et al. (1996). "Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient." *Cell* **87**(5): 833-844.
- Zeng, X., H. Huang, et al. (2008). "Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions." *Development* **135**(2): 367-375.

- Zeng, X., K. Tamai, et al. (2005). "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." *Nature* **438**(7069): 873-877.
- Zeng, Y. A. and R. Nusse (2010). "Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture." *Cell Stem Cell* **6**(6): 568-577.
- Zhai, L., D. Chaturvedi, et al. (2004). "Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine." *The Journal of biological chemistry* **279**(32): 33220-33227.
- Zinovyeva, A. Y., Y. Yamamoto, et al. (2008). "Complex network of Wnt signaling regulates neuronal migrations during *Caenorhabditis elegans* development." *Genetics* **179**(3): 1357-1371.

I Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Jochum danken, unter deren Leitung ich am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie arbeiten durfte. Der Geist des Hauses war auf ganz besondere Weise von ihrer Persönlichkeit geprägt. Ich schätze mich glücklich, durch ihre Schule gegangen sein zu dürfen, sei es in den Seminaren im Institut oder auf der Winter School in Tiers.

Auch zu danken habe ich Herrn Prof. Dr. Weber, an dessen Institut ich nach der Umstrukturierung und Umbenennung meine Promotionsarbeit fertigstellen durfte.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann, der das Programm „Förderung von Forschung und Lehre“ (FöFoLe) und den Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“ ins Leben gerufen hat, in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist. Das Programm bietet eine einmalige Gelegenheit, Erfahrungen in der Forschung zu sammeln.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. Neth. Einen besseren Betreuer als ihn kann man sich nicht wünschen. Nicht nur hat er die praktische Arbeit mit immer neuen Ideen und größtem persönlichen Interesse vorangetrieben, auch in der Korrekturphase der Dissertation hat er mich durch sein unermessliches Engagement enorm unterstützt und immer wieder motiviert. Schön waren auch die vielen Gespräche und Diskussionen, die weit mehr als die Forschung zum Thema hatten. Unter Dr. Neth erlernt man nicht nur das Handwerkszeug der guten wissenschaftlichen Arbeit, sondern auch einen generell wachen und kritischen Geist zu entwickeln.

Zu großem Dank bin ich auch meinen Mitdoktoranden Dr. Iris Peröbner, Simon Capovilla, Ulli Leitenstern, Rafael Metzler und Tobias Greve verpflichtet. Vor allem die beiden zuerst genannten unterstützen mich als Neuling im Labor bei allen Fragen, die sich mir stellen, mit größter Geduld und Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Felix Lechner für die schöne Zusammenarbeit bedanken. Er begann mit mir gleichzeitig im Labor zu arbeiten und ist mir ein lieber Freund geworden.

Claudia Geißler und Lourdes Ruiz-Heinrich habe ich für die gute Einarbeitung in die verschiedenen Methoden und für eine sehr angenehme Atmosphäre im Labor zu danken.

Dr. Tanja Popp, Dr. Virginia Alonso Egea und Thomas Pitsch möchte ich für die freundschaftliche und kollegiale Nachbarschaft danken, in der immer gute Laune herrschte.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre im Haus danken.

Die letzten Zeilen der Danksagung sollen meiner Familie gehören. Ganz besonders möchte ich meiner Mutter danken, die mich mein Leben lang großherzig und großzügig unterstützt hat. Das Entstehen dieser Arbeit verfolgte sie auf unverzichtbare Weise unterstützend mit. Auch meinem Vater möchte ich für sein Verständnis im Zusammenhang mit den Schwierigkeiten einer experimentellen Doktorarbeit danken.

Großer Dank gilt auch meinen lieben Großeltern in Wildthurn, in deren Haus ich eine sorgenfreie und glückliche Kindheit genießen durfte. Da ich ohne ihn wahrscheinlich niemals Medizin studiert hätte und er mir - vielleicht noch nicht einmal bewusst - in vielerlei Hinsicht ein Vorbild war, möchte ich diese Arbeit meinem Großvater Dr. Hans Lermer widmen.

Zuletzt muss ich Olga Bürger danken, meiner lieben Freundin und Verlobten, die monate- wenn nicht jahrelang mit meiner Doktorarbeit konfrontiert war und trotzdem bei mir geblieben ist.