

Das DKK1-Signalmolekül in der Karzinogenese des Barrett-assoziierten ösophagealen Adenokarzinoms

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

Eingereicht von:

Ann-Kristin Lamprecht

geboren am 17.05.1994 in Dessau, Sachsen-Anhalt

Angefertigt am:

Universitätsklinikum Leipzig AÖR

Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Betreuer:

Prof. Dr. Ines Gockel

Dr. Orestis Lyros

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 28.01.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1. Das ösophageale Adenokarzinom	6
1.1.1. Epidemiologie und Prognose	6
1.1.2. Die Barrett-Metaplasie als eine präkanzeröse Läsion	9
1.1.3. Früherkennungsstrategien und Therapieoptionen	11
1.2. Wnt/β-Catenin Signalweg	13
1.2.1. Bedeutung und Funktionsprinzip	13
1.2.2. Das Dickkopfprotein 1 (DKK1)	14
1.3. Zum Stand der Forschung	15
1.4. Hypothese	18
2. Materialien und Methoden	19
2.1. Materialien	19
2.2. Methoden	28
2.2.1. Zellkultur	28
2.2.2. Molekularbiologische Arbeiten	33
3. Ergebnisse	43
3.1. Analyse der DKK1-Serumkonzentrationen von EAC-Patienten	43
3.2. DKK1-Expression in den ösophagealen Zelllinien	47
3.3. Funktion von DKK1 in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie OE33	50
3.3.1. Behandlung der OE33-Zellen mit rekombinantem humanem DKK1	50
3.3.1.1. Einfluss von rhDKK1 auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg	50
3.3.1.2. Einfluss von rhDKK1 auf die Zellviabilität	51
3.3.2. DKK1-Knockdown	52
3.3.2.1. Protokolletablierung	52
3.3.2.2. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf die Viabilität der OE33-Zellen	56
3.3.2.3. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf die Proliferation der OE33-Zellen	58
3.3.2.4. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf die Motilität der OE33-Zellen	59
3.3.2.5. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf die Invasion der OE33-Zellen	61
3.3.2.6. Expression molekularer Marker und Zielstrukturen nach DKK1-Knockdown	62
3.3.2.7. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg	68
3.3.2.8. Behandlung mit rekombinantem humanem Wnt3a nach DKK1-Knockdown	69
4. Diskussion	74
4.1. Interpretation	74
4.1.1. DKK1 als ein serologischer Biomarker für das EAC	75
4.1.2. Expression von DKK1 während der neoplastischen Progression	78
4.1.3. DKK1 als ein Mediator der Karzinogenese im EAC	80
4.1.4. Effekt von DKK1 auf die Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalwegs	86
4.1.5. Effekt von Wnt3a auf die Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalwegs	88
4.2. Ausblick	89
5. Zusammenfassung	90
6. Literaturverzeichnis	92
Anlagen	103
Abbildungsverzeichnis	105
Tabellenverzeichnis	107
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	108
Lebenslauf	109
Danksagung	111

Abkürzungsverzeichnis

A:	Abb. abd. AFP AöR APC APS Aqua dest. ATCC AZ	Abbildung abdomino (-thorakal) Alpha-1-Fetoprotein Anstalt des öffentlichen Rechts <i>Adenomatous Polyposis Coli</i> Ammoniumpersulfat destilliertes Wasser <i>American Type Culture Collection</i> Allgemeinzustand
B:	Bcl2 Bcl-xL BE BMI bp BPE BSA bzw.	<i>B-cell lymphoma 2</i> <i>B-cell lymphoma-extra large</i> Barrett-Ösophagus <i>Body-Mass-Index</i> Basenpaare <i>Bovine Pituitary Extract</i> <i>Bovine Serum Albumin</i> beziehungsweise
C:	ca. CDK CDKN1/2A CDX1/2 cDNA CK1 cm ² CO ₂ Ct cTNM	circa <i>Cyclin-dependent Kinase</i> CDK-Inhibitor 1/2A <i>Caudal Type Homeobox 1/2</i> copy DNA <i>Casein Kinase 1</i> Quadratcentimeter Kohlenstoffdioxid <i>Cycle threshold</i> TNM-Klassifikation nach klinischer Untersuchung (prätherapeutisch)
D:	dd DMF DMSO DKK1 DNA dNTP Dr. med. ds Dsh	doppelt destilliert (Bidestillatus) Dimethylformamid Dimethylsulfoxid Dickkopfprotein 1 Desoxyribonukleinsäure Desoxynukleotid Doktor der Medizin doppelsträngig(e) <i>Dishevelled</i>
E:	EAC EDTA EGF ELISA EMT Eppi	ösophageales Adenokarzinom Ethylendiamintetraessigsäure <i>Epidermal Growth Factor</i> <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> Epitheliale-Mesenchymale-Transition Mikroreaktionsgefäß
F:	FKS Fz	Fetales Kälberserum <i>Frizzled</i>
G:	g G GERD GSK3 β	Gramm <i>Grading</i> (Differenzierungsstatus) gastroösophageale Refluxkrankheit <i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
H:	h H ₂ O HEPES	<i>hour(s)</i> (Stunde(n)) Wasser 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

	HGD	<i>high-grade dysplasia</i>
	HRP	Meerrettichperoxidase
I:	IGF1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
	IL	Interleukin
	ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
J:	jpeg	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
K:	kDa	Kilodalton
	kg	Kilogramm
	KFSM	<i>Keratinocyte Serum-Free Medium</i>
L:	l	Liter
	L	Lymphgefäßinvasion
	LEF1	<i>Lymphoid Enhancer-binding Factor 1</i>
	LFM	<i>Low Fat Milk Powder</i>
	log	Logarithmus
	LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
	LRP5/6	<i>LDL Receptor-related Protein 5/6</i>
M:	m	männlich
	m ²	Quadratmeter
	M	molare Masse
	MAPK	<i>Mitogen-activated Kinase</i>
	MCDB	<i>Molecular, Cellular, and Development Biology</i>
	MEK1/2	MAPK-Kinase 1/2
	metast.	metastasiert
	mg	Milligramm
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	min	Minute(n)
	Mio	Million(en)
	ml	Milliliter
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
	mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (Tetrazoliumsalz)
N:	Na-Bi	Natrium-Bisulfat
	NaCl	Natriumchlorid
	neo	neoadjuvant
	ng	Nanogramm
	NK	Negative Kontrolle
	nm	Nanometer
	nmol	Nanomol
	Nr.	Nummer
	NT	<i>Non Targeting</i>
	NTC	<i>Non Template Control</i>
O:	OP	Operation
P:	PBS	Phosphatgepufferte Salzsäure
	PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
	PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase 1</i>
	PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat
	Pn	Perineurale Invasion
	Prof.	Professor
	pTNM	TNM-Klassifikation nach pathologischer Untersuchung des Tumorsektats
Q:	qRT-PCR	quantitative RT-PCR

R:	R RCTx RFU rh RIPA RNA rpm RPMI RT-PCR	Resektionsstatus Radiochemotherapie <i>Relative Fluorescence Unit</i> rekombinant(es) human(es) <i>Radioimmunoprecipitation Assay</i> Ribonukleinsäure <i>rounds per minute</i> <i>Roswell Park Memorial Institute</i> <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
S:	SDS SDS-PAGE sec SEM Ser sFRP1 siRNA SOX9 STI	Natriumdodecylsulfat Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese Sekunde <i>Standard Error of the Mean</i> Serin <i>secreted Frizzled-related Protein 1</i> <i>small interfering RNA</i> <i>Sry-Box 9</i> <i>Soybean Trypsin Inhibitor</i>
T:	t Tab. TAE TBS TBST TCF TEMED TGF β Thr TNF α TNM TP53 Tyr	Zeit Tabelle Tris-Acetat-EDTA <i>Tris-Buffered Saline</i> <i>Tris-Buffered Saline and Tween-20</i> <i>T-cell Factor</i> Tetramethylethylendiamin <i>Transforming Growth Factor β</i> Threonin <i>Tumor Necrosis Factor α</i> <i>Tumor, Node, Metastasis</i> <i>Tumor Protein p53</i> Tyrosin
U:	u.a. UICC USA UV	unter anderem Internationale Vereinigung gegen Krebs <i>United States of America</i> Ultraviolett
V:	V VEGF VIS	Veneninvasion Volt <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> <i>Visible</i>
W:	w WIF1 Wnt	weiblich <i>Wnt Inhibitory Factor 1</i> <i>Wingless-type</i>
Y	ypTNM	pTNM-Klassifikation nach neoadjuvanter Therapie
Z:	z.B. z.T.	zum Beispiel zum Teil
Andere:	% °C μ g μ l μ m α β β -ME	Prozent Grad Celsius Mikrogramm Mikroliter Mikrometer Alpha Beta Beta-Mercaptoethanol

1. Einleitung

1.1. Das ösophageale Adenokarzinom

Das Ösophaguskarzinom ist das achthäufigste Karzinom weltweit (Kamangar *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012) und stellt die sechsthäufigste Todesursache unter allen karzinombedingten Todesfällen dar (Paulson und Reid, 2004). Man unterscheidet zwischen zwei Formen: das ösophageale Plattenepithelkarzinom, welches mit chronischem Rauchen und Alkoholkonsum assoziiert ist, sowie das ösophageale Adenokarzinom. Als präkanzeröse Läsion wird die Barrett-Metaplasie angesehen. Insgesamt ist das Plattenepithelkarzinom das häufigste Ösophaguskarzinom. In westlichen industrialisierten Nationen dominiert allerdings das ösophageale Adenokarzinom, wohingegen das Plattenepithelkarzinom im asiatischen Raum die vorherrschende Entität ist (Kamangar *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

1.1.1. Epidemiologie und Prognose

Risikofaktoren

Generell prädisponiert für die Entstehung des ösophagealen Adenokarzinoms sind Kaukasier, Personen mit einem hohen sozioökonomischen Status und das männliche Geschlecht (Ford *et al.*, 2005). Männer sind insgesamt 7–10fach häufiger betroffen als Frauen (Rutegård *et al.*, 2011). Die Ursachen für diesen geschlechtsspezifischen Faktor sind bisher noch unbekannt (Xie und Lagergren, 2016).

Ein symptomatischer gastroösophagealer Reflux ist in unserer Bevölkerung weit verbreitet (El-Serag *et al.*, 2014) und stellt einen Risikofaktor für die Entstehung des Barrett-Karzinoms dar (Lagergren *et al.*, 1999). Zu der typischen Refluxsymptomatik gehören Sodbrennen, epigastrisches Druck- und Völlegefühl, retrosternale Schmerzen, schlechter Mundgeruch sowie saures Aufstoßen bis hin zum Erbrechen. Eine Defizienz des unteren Ösophagussphinkters, Hiatushernien des Magens und viszerale Adipositas können die Regurgitation von Säure begünstigen. Auch der häufige Konsum von Nikotin, Kaffee und Schokolade sowie von fettreichen aber auch sauren und scharfen Speisen wirken refluxbegünstigend (Nebel *et al.*, 1976; Katz *et al.*, 2013). Die Speiseröhre verfügt über eine Vielzahl endogener Schutzmechanismen,

um eine effektive Selbstreinigung zu gewährleisten und den refluxinduzierten Gewebeschäden entgegenzuwirken. Dazu zählen u.a. die Speichelsekretion, Peristaltik und Schwerkraft sowie die Barrierefunktion der Schleimhaut selbst (Orlando, 2010). Bei einer normalen Kontaktzeit zwischen Refluxflüssigkeit und Ösophagasmukosa entwickeln sich daher zumeist keine Erosionen. Das Refluxat enthält allerdings nicht nur Magensäure, sondern auch Gallensalze, Pankreasenzyme, Bakterien und unverdaute Speisereste. Eine längerfristige Exposition der Ösophagasmukosa kann daher zu einer chronischen lokalen Entzündungsreaktion führen und über reaktive Metabolite oxidativen Stress verursachen. Dies begünstigt DNA-Schäden und regt die Zellproliferation an, was wiederum die Karzinogenese fördern kann (Abdel-Latif, *et al.*, 2009). Ein hoher BMI ist oft mit einer gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) assoziiert, wirkt aber auch über viele andere Faktoren karzinombegünstigend (Whiteman *et al.*, 2008). Bei einem BMI größer als 30 kg/m² liegt das relative Risiko ein ösophageales Adenokarzinom zu entwickeln im Vergleich zu Normalgewichtigen zwischen 2,4 und 2,8 (Hampel *et al.*, 2005; Kubo und Corley, 2006). Insbesondere die viszerale, stammbetonte Adipositas (Stammfettsucht) spielt eine entscheidende Rolle im Bezug auf das Karzinomrisiko (El-Serag *et al.*, 2005). Übergewichtige Männer neigen zu mehr viszeralem Fett als übergewichtige Frauen, was durchaus eine Erklärung für den geschlechtsspezifischen Faktor sein könnte (Vaughan *et al.*, 2002). Die erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen bei Adipositas könnten zudem die refluxassoziierte Entzündungsreaktion der Ösophagasmukosa begünstigen (Calle und Kaaks; 2004).

Weitere wichtige Risikofaktoren sind der Nikotinabusus (Vaughan *et al.*, 1995) und die Adipositas-assoziierte Fehlernährung, insbesondere die Einnahme von ungenügend Gemüse und Obst (Holmes und Vaughan, 2007). Alkoholkonsum spielt hingegen keine relevante Rolle in der Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms (Wu *et al.*, 2001). Eine Infektion mit *Helicobacter pylori* scheint protektiv auf die Entstehung des ösophagealen Adenokarzinoms zu wirken (Chow *et al.*, 1998a; Henrik *et al.*, 2001; Holmes und Vaughan, 2007). Dies ist vermutlich auf eine Atrophie der Magendrüsen durch *Helicobacter pylori* zurückzuführen, was längerfristig den Säuregehalt im Refluxat senkt (Blaser, 2008). Auch genetische Prädispositionen können bei der Entstehung des ösophagealen Adenokarzinoms von Bedeutung sein (Chak *et al.*, 2009; Gharakhani *et al.*, 2016).

Inzidenz

Obwohl das ösophageale Adenokarzinom insgesamt eine seltene Tumorentität ist, ist es in der westlichen Welt dennoch ein Tumor mit einer stark ansteigenden Inzidenz in den letzten Jahren (Vaughan und Fitzgerald, 2015). Zwischen 1975 und 2001 hat sich die Inzidenz allein in den USA insgesamt versechsfacht und dabei die Inzidenzraten anderer Karzinome überholt (Abb.1). Während noch im Jahr 1975 das Plattenepithelkarzinom der weitaus häufigste histologische Subtyp des Ösophaguskarzinoms war, hat es in der westlichen Welt mittlerweile seine führende Position an das Adenokarzinom abgegeben (Heitmiller und Sharma, 1996; Pohl und Welch, 2005; Kamangar *et al.*, 2006; Vaughan und Fitzgerald, 2015). Da sich der Inzidenzanstieg seitdem wieder verlangsamt hat, könnte nun ein Plateau erreicht sein (Pohl *et al.*, 2010; Hur *et al.*, 2013). Dennoch sind die Daten aufsehenerregend und die Gründe für die Zunahme in der Inzidenz weitgehend unbekannt. Die ebenfalls zunehmende Adipositas in den westlichen Nationen könnte eine Rolle spielen (Chow *et al.*, 1998b; Calle und Kaaks, 2004, Zhang *et al.*, 2012). Auch in asiatischen Populationen, in welchen das ösophageale Adenokarzinom immer sehr selten war, nimmt die Inzidenz zu (Fernandes *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

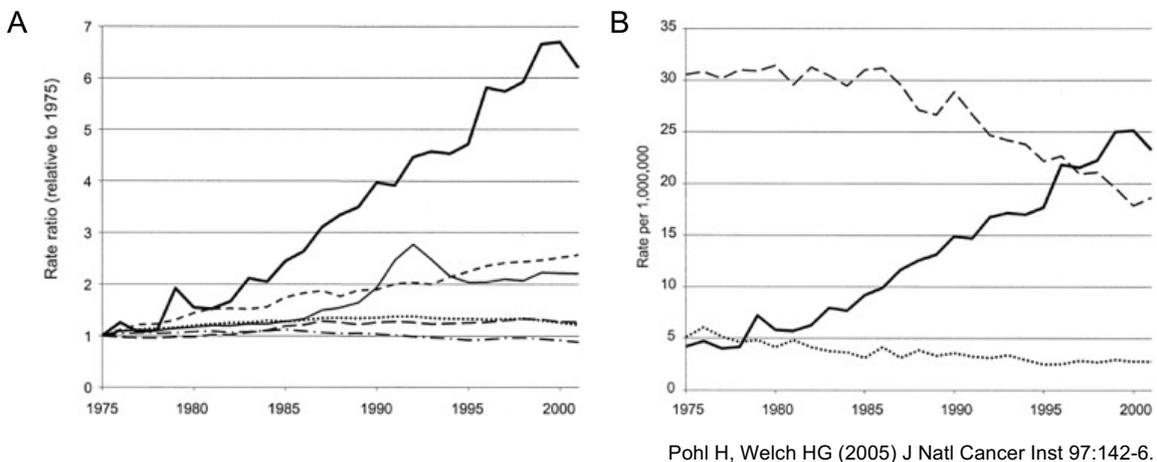


Abb.1: Inzidenz des Ösophaguskarzinoms (1975-2001). A: Relativer Inzidenzanstieg des Ösophaguskarzinoms im Vergleich zu anderen Karzinomen. Dicke durchgezogene Linie = ösophageales Adenokarzinom. Kurz gestrichelte Linie = Melanom. Durchgezogene Linie = Prostatakarzinom. Gestrichelte Linie = Mammakarzinom. Gepunktete Linie = Lungenkarzinom. Gestrichelte und gepunktete Linie = Kolorektales Karzinom. B: Inzidenz des Ösophaguskarzinoms in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp. Dicke durchgezogene Linie = ösophageales Adenokarzinom. Gestrichelte Linie = Plattenepithelkarzinom. Gepunktete Linie = nicht näher beschrieben.

Prognose

Da die ersten Symptome der Krebserkrankung, wie z.B. Dysphagie, Heiserkeit, gastrointestinale Blutungen und Kachexie, erst sehr spät in Erscheinung treten, wird das ösophageale Adenokarzinom zumeist in einem lokal fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert. Der fehlende Serosaüberzug und die gute lymphatische Drainage der Speiseröhre begünstigen die frühzeitige Bildung von Lymphknotenmetastasen sowie hämatogenen Metastasierungen in Leber, Lunge, Skelett, Peritoneum und Pleura. Die Lage in einem engen anatomischen Kompartiment mit unmittelbarer Nähe zum Tracheobronchialsystem kann zudem eine radikale chirurgische Resektion erschweren (Lordick *et al.*, 2013). Der Lymphknotenbefall ist der wesentlichste negative Prognoseparameter: Sobald der Tumor das zweite Drittel der Submukosa infiltriert (T1sm2), steigt die Zahl der befallenen Lymphknoten und die Prognose verschlechtert sich zugleich signifikant (Behrens *et al.*, 2011). Trotz intensivierter endoskopischer Überwachung, verbesserter chirurgischer Resektionsverfahren und moderner multimodaler stadiengerechter Therapiekonzepte bleibt die Prognose unbefriedigend und nur weniger als 5% der Patienten mit Fernmetastasierungen (M1) überleben die nächsten 5 Jahre (Farrow und Vaughan, 1996; Polednak, 2003; Cen *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2013).

1.1.2. Die Barrett-Metaplasie als eine präkanzeröse Läsion

Das erste Mal beschrieben wurde das intestinale Kryptenepithel („*columnar-lined esophagus*“) von dem britischen Chirurgen Norman Rupert Barrett im Jahre 1950 (Barrett, 1950). Da das Barrett-Epithel der Magenschleimhaut sehr ähnlich sieht, ging Barrett zunächst von einer kongenitalen Kondition mit einer zu kurzen Speiseröhre und einem sich daran anschließenden tubulären Magen aus. Bereits 11 Jahre später wurde durch Hayward eine Assoziation mit der Refluxkrankheit festgestellt (Hayward, 1961) und im Jahre 1975 wurde die Barrett-Metaplasie durch Naef mit der Entstehung des ösophagealen Adenokarzinoms vernetzt (Naef, 1975). Wenige Jahre später wurde sie als fakultative Präkanzerose anerkannt (Haggitt *et al.*, 1978; Reid und Weinstein, 1987). Die geschätzte Prävalenz der Barrett-Metaplasie ist parallel zum ösophagealen Adenokarzinom angestiegen, was z.T. auch auf eine verbesserte Diagnostik und verstärkte endoskopische Kontrollen zurückgeführt werden kann (Conio *et al.*, 2001).

Der Barrett-Ösophagus eine spezialisierte intestinale Metaplasie, welche das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel der distalen Speiseröhre ersetzt (American Gastroenterological Association *et al.*, 2011). Histologisch imponieren ungeordnete Krypten mit einschichtigem Zylinderepithel und ungleichmäßig eingestreuten Becherzellen. Bei ca. 10% der Patienten mit GERD lässt sich bei der Endoskopie eine Barrett-Metaplasie nachweisen (Reid und Weinstein, 1987; Koop, 2000). Man geht davon aus, dass die Barrett-Metaplasie eine erfolgreiche Adaptation an das raue intraluminale Klima bei chronischem gastroösophagealen Reflux darstellt (Orlando, 2006). Die Rolle des gastroösophagealen Reflux bei der Entstehung der Barrett-Metaplasie ist noch recht wenig untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des intestinalen Transkriptionsfaktors *CDX2*, einer der wichtigsten Mediatoren, durch Gallensäure stimuliert werden kann (Souza *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2011a, Tamagawa *et al.*, 2012). In der Barrett-Metaplasie wiederum führen die ständigen Verletzungen des Zylinderepithels durch die Refluxflüssigkeit zu einer gesteigerten Proliferation und zu einer Suppression der Apoptose im Kryptengrund (Fitzgerald *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2002).

Der Weg von der Barrett-Metaplasie über die Dysplasie zum Karzinom ist ein langwieriger mehrstufiger Prozess (Jankowski *et al.*, 1999; Theisen *et al.*, 2004). Barrett-Patienten haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein mehr als 100fach höheres Risiko ein ösophageales Adenokarzinom zu entwickeln (Hameeteman, *et al.*, 1989; Cameron *et al.*, 1995). Allerdings betrifft dies pro Jahr nur etwa 0,5% aller Barrett-Patienten (Cameron *et al.*, 1985; Yousef *et al.*, 2008; Sikkema *et al.*, 2010; American Gastroenterological Association *et al.*, 2011). Barrett-Patienten mit den histologischen Klassifikationen „*negative for dysplasia*“, „*indefinite for dysplasia*“ oder „*low-grade dysplasia*“ haben ein sehr niedriges Risiko zur neoplastischen Progression (Reid *et al.*, 2000). Bei einer „*high-grade*“ Dysplasie (*HGD*) besteht jedoch ein höheres Risiko eines koexistierenden oder sich entwickelnden Adenokarzinoms (Montgomery *et al.*, 2001). Konda *et al.* (2008) haben gezeigt, dass bei ca. 39,9% aller *HGD*-Patienten in den entsprechenden Gewebeproben ein koexistierendes invasives Adenokarzinom detektiert werden kann. Insgesamt scheint die *HGD* bezüglich der neoplastischen Progression allerdings sehr heterogen zu sein. So schwankt die kumulative 5-Jahres-Inzidenz des ösophagealen Adenokarzinoms bei *HGD*-Patienten in verschiedenen Studien zwischen 9 und 59% (Reid *et al.*, 2000; Schnell *et al.*, 2001). Die Therapie bei einer histologisch gesicherten *HGD* ist daher sehr umstritten.

1.1.3. Früherkennungsstrategien und Therapieoptionen

Früherkennungsstrategien

Aktuelle klinische Leitlinien empfehlen ein endoskopisches Screening der männlichen Bevölkerung mit symptomatischem gastroösophagealem Reflux und anderen Risikofaktoren auf eine bestehende Barrett-Metaplasie. Bei der Detektion eines Barrett-Ösophagus ist eine regelmäßige endoskopische Überwachung mit standardisierten Biopsieentnahmen indiziert (Shaheen *et al.*, 2016).

Insgesamt ist das ösophageale Adenokarzinom eine sehr seltene Todesursache unter Barrett-Patienten (Anderson *et al.*, 2003; Moayyedi *et al.*, 2008). Die regelmäßige endoskopische Überwachung der Barrett-Patienten mit gekoppelten 4-Quadranten-Biopsien ist sehr kostenintensiv, invasiv und oft zudem lästig und unangenehm für die Patienten. Da die meisten Barrett-Patienten während der endoskopischen Kontrollen kein Adenokarzinom entwickeln werden (Macdonald *et al.*, 1997; Hage *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2006) und die Wenigen, die ein Adenokarzinom entwickeln, trotz der relativ frühzeitigen Detektion mit einer sehr schlechten Prognose konfrontiert sind, sind die endoskopischen Überwachungsmethoden in ihrer Effektivität und Effizienz sehr umstritten. Viel diskutiert ist das endoskopische Routine-Screening der Risikobevölkerung mit symptomatischem gastroösophagealem Reflux. Zwar konnte gezeigt werden, dass über 95% aller Adenokarzinome in Individuen ohne vorheriger Barrett-Diagnose entstehen (Conio *et al.*, 2001; Dulai *et al.*, 2002). Allerdings ist die Zahl der Individuen mit Refluxbeschwerden in unserer Bevölkerung sehr groß (El-Serag *et al.*, 2014). Obwohl es sich bei der Screening-Endoskopie um ein weitgehend sicheres Verfahren handelt, könnte daher das Risiko von Komplikationen dem Nutzen überwiegen (Shaheen und Ransohoff, 2002). Es ist zudem nachgewiesen worden, dass selbst der gastroösophageale Reflux in 40-48% der Patienten, welche ein ösophageales Adenokarzinom entwickeln, fehlt (Lagergren *et al.*, 1999; Gerson *et al.*, 2002; American Gastroenterological Association *et al.*, 2011). Der Trend bewegt sich daher hin auf eine zu späte Diagnosestellung bei lebensbedrohlichem Adenokarzinom und zugleich hin auf die Überdiagnose von gutartigen Schleimhautveränderungen, welche die allermeisten Patienten zu Lebzeiten nie beeinträchtigen werden. Objektive, reproduzierbare, molekulare Marker für die Vorhersage eines Krebsrisikos bei bestehender Barrett-Metaplasie werden dringend gebraucht.

Therapieoptionen

Die Therapieentscheidung muss stadiengerecht und individuell adaptiert je nach Ausmaß des Lymphknotenbefalls und den Begleiterkrankungen der Patienten getroffen werden. Auf die Mukosa beschränkte Frühkarzinome (T1m) können endoskopisch kurativ reseziert werden. Sobald sich das Barrett-Karzinom auf die Submukosa ausgebreitet hat (T1sm1-3), sollte eine primäre Ösophagusresektion erfolgen. Voraussetzung für eine kurative Therapie ist ein lokalisiertes Barrett-Karzinom ohne entfernte Metastasen (Labenz *et al.*, 2015). Die Ösophagektomie hat eine signifikante perioperative Morbidität und Mortalität, welche in Abhängigkeit von der Häufigkeit der durchgeführten Prozeduren zwischen den verschiedenen Institutionen schwankt (Skipworth *et al.*, 2010). Die Mortalität beträgt bis zu 13,9% in „low-volume“ Kliniken und 4,7% in „high-volume“ Kliniken, wo die meisten Ösophagektomien durchgeführt werden (Reames *et al.*, 2014). Bei ca. 40% aller Patienten tritt zudem nach der Resektion ein Tumorrezidiv auf (Hulscher *et al.*, 2000; Abate *et al.*, 2010). Da die meisten Patienten bei der Detektion ein ösophageales Adenokarzinom in einem lokal fortgeschrittenen Tumorstadium aufweisen, wurden verschiedene multimodale Therapien in Ergänzung zur Ösophagektomie entwickelt, um die Überlebensraten zu verbessern und die Rezidivraten zu senken (Sjoquist *et al.*, 2011; van Hagen *et al.*, 2012; Lordick *et al.*, 2013). Das Ziel ist die Schrumpfung des Tumors, um seine Resektion zu erleichtern. Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium (T3-4) und unsicherer R0-Resektabilität sollten eine neoadjuvante Behandlung bekommen (Lordick *et al.*, 2013).

Bei Fernmetastasierungen (M1) ist die palliative Therapie die Therapie der Wahl (Labenz *et al.*, 2015). Die Verbesserung der Lebensqualität durch Wiederherstellung der Schluckfähigkeit mithilfe von Stents, Brachytherapie und Ernährungsoptimierung sowie die Symptomreduktion stehen hier an höchster Stelle. Eventuell kann eine palliative Tumorresektion, eine Chemo- und Strahlentherapie oder auch eine photodynamische Therapie erwogen werden. In der Zukunft denkbar wären zielgerichtete Therapien auf molekularer Ebene: Antikörper und andere kleine Moleküle könnten eingesetzt werden, um die Überlebenszeiten der Krebspatienten zu verlängern. Hierfür ist allerdings ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen und involvierten Signalwege notwendig.

1.2. Wnt/ β -Catenin Signalweg

Wnts sind cysteinreiche Glykoproteine, welche von den Epithelzellen sezerniert werden und als interzelluläre Signalmoleküle dienen. Beim Menschen sind 19 homologe Mitglieder der *Wnt*-Proteinfamilie bekannt, welche ganz unterschiedliche Signalwege aktivieren können (Thorstensen und Lothe, 2003; Logan und Nusse, 2004). Am besten untersucht ist der kanonische *Wnt/ β -Catenin* Signalweg. Dieser Signalweg ist in der Embryonalentwicklung essentiell für die Steuerung und Differenzierung der Zellen. Die Vielfalt und Komplexität der *Wnt*-Signalwege, deren viele Facetten sowie deren Relevanz für viele unterschiedliche Krankheiten und Therapien machen sie zu einem reizvollen Target der Forschung (Moon *et al.*, 2004).

1.2.1. Bedeutung und Funktionsprinzip

Das ösophageale Adenokarzinom weist eine starke Aktivierung des kanonischen *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs auf, welcher hauptsächlich mit der Entwicklung eines intestinalen Phänotyps assoziiert ist (Osterheld *et al.*, 2002; Gregorieff *et al.*, 2004). Die Aktivierung des Signalwegs führt zu einer Zunahme des Zellwachstums und simultan zu einem Verlust der Kontrollmechanismen der Apoptose. Damit trägt er zur Karzinogenese in vielen humanen Tumoren, wie z.B. dem Kolorektalkarzinom, bei (Bienz und Clevers, 2000; Polakis, 2000; Moon *et al.*, 2004).

Die Arbeitsgruppe um Vestweber und Kemler entdeckte im Jahre 1984 zunächst, dass β -Catenin an der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion beteiligt ist. β -Catenin verbindet dabei *E-Cadherin* mit α -Catenin, welches mit dem Aktin-Zytoskelett kommuniziert (Rimm *et al.*, 1995; Drees *et al.*, 2005). In den späten 1980ern erkannte man, dass β -Catenin zudem ein wichtiger Teil des kanonischen *Wnt*-Signalwegs ist (Wieschaus und Riggemann, 1987; Riggeman *et al.*, 1990). In der Abwesenheit von *Wnt*-Liganden ist zytoplasmatisches β -Catenin an den „*destruction complex*“ gebunden, wo es von der an *Axin* gebundenen *Casein Kinase 1 (CK1)* und der *Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)* phosphoryliert wird (Sakanaka *et al.*, 1999; Amit *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Phosphoryliertes β -Catenin wird daraufhin ubiquitinyliert, vom Proteasom erkannt und abgebaut (Aberle *et al.*, 1997). Durch den ständigen Abbau von β -Catenin bleiben die zytoplasmatischen Konzentrationen niedrig. Die Transkriptionsfaktoren *TCF* und *LEF1*

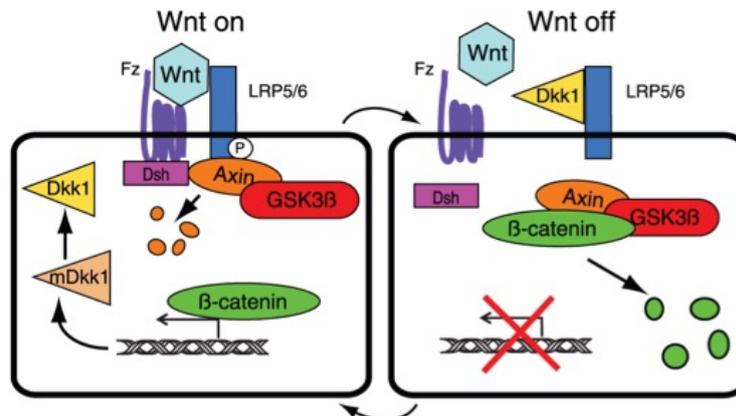
bilden im Nukleus mit dem Korepressor *Groucho* einen Transkriptions-inhibierenden Komplex (Roose *et al.*, 1998). Bei der Anwesenheit von *Wnt*-Liganden hingegen binden diese an den *Frizzled-LRP5/6*-Rezeptorkomplex. Folglich wird das zytoplasmatische Protein *Dishevelled* zur Plasmamembran rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert (Willert *et al.*, 1997; Amit *et al.*, 2002). *Dishevelled* wiederum hemmt die Aktivität des „*destruction complex*“: Es wird angenommen, dass *Dishevelled* mit *CK1* interagiert, und somit die Phosphorylierung von β -*Catenin* hemmt (Sakanaka *et al.*, 1999; Amit *et al.*, 2002). Es kommt zu einer Akkumulation an zytoplasmatischem β -*Catenin*, welches in den Nukleus transportiert wird. Dort tritt es mit den Transkriptionsfaktoren der *TCF/LEF*-Familie und anderen Koaktivatoren in Wechselwirkung, um die Transkription der *Wnt*-Zielgene zu steuern.

Es existieren einige extrazelluläre *Wnt*-Inhibitoren: Die *secreted Frizzled-related Proteins (sFRPs)* konkurrieren mit den *Frizzled*-Rezeptorproteinen um die Bindung von sekretorischen *Wnt*-Molekülen. Der *Wnt Inhibitory Factor 1 (WIF1)* kann ebenfalls *Wnt*-Moleküle binden und so deren Signalaktivität hemmen. Das Dickkopfprotein 1 (*DKK1*) wirkt indirekt als *Wnt*-Inhibitor, indem es mit dem *Wnt*-Korezeptor *LRP5/6* interagiert und somit die Formation des aktiven Rezeptorkomplexes verhindert (Thorstensen und Lothe, 2003).

1.2.2. Das Dickkopfprotein 1 (DKK1)

Die Familie der Dickkopfproteine besteht aus vier glykolisierten, sekretorischen Proteinen mit je zwei Cystein-reichen Domänen, welche über eine Linkerregion miteinander verknüpft sind: *DKK1*, *DKK2*, *DKK3* und *DKK4* (Krupnik *et al.*, 1999). *DKK1* bildet mit den *DKK1*-Rezeptoren *Kremen 1/2* und *LRP 5/6* einen ternären Komplex und induziert auf diese Weise eine Endozytose des gesamten *Frizzled-LRP5/6*-Rezeptorkomplexes (Bafico *et al.*, 2001; Semenov *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2002). Das *Wnt*-Signalmolekül kann somit nicht mehr an den Rezeptorkomplex binden und eine Aktivierung des kanonischen *Wnt*/ β -*Catenin* Signalwegs induzieren.

Viele *Wnt*-regulierten Gene, wie *Cyclin D1*, *Axin II* und *c-myc*, spielen eine wichtige Rolle im Zellzyklus und wirken proliferationsfördernd. Auch das *DKK1*-Gen ist ein Zielgen des *Wnt*/ β -*Catenin* Signalwegs (Niida *et al.*, 2004; Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005). Es handelt sich somit um einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus (Abb.2).



Pederson L, Jensen MH, Krishna S (2011) Plos One 6:e25550.

Abb.2: Schematische Darstellung des negativen Rückkopplungs-Mechanismus. Das *DKK1*-Gen ist ein Zielgen des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs. Es kodiert für ein Sekretionsprotein, welches den Signalweg inhibiert: *DKK1* bindet an den *LRP5/6*-Rezeptor und führt zu einer Endozytose des gesamten Rezeptorkomplexes. Das *Wnt*-Signalmolekül kann somit nicht mehr binden und den Signalweg aktivieren. Der „*destruction complex*“ sorgt für die Degradation von zytoplasmatischem *β-Catenin*.

1.3. Zum Stand der Forschung

Das Expressionsmuster und die Funktion von *DKK1* ist bei der Refluxösophagitis bereits umfangreich untersucht. Die Arbeitsgruppe um Ali *et al.* (2006) demonstrierten erstmals die signifikante Überexpression von *DKK1* bei Ösophagitis-Patienten im Vergleich zu Barrett-Metaplasie-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Die Hypothese, dass *DKK1* im distalen Ösophagus in Folge des gastroösophagealen Reflux stärker exprimiert wird, wurde durch Säurestimulation ösophagealer Plattenepithelzelllinien und anschließender Analyse bestätigt. Es konnte später gezeigt werden, dass die hohe *DKK1*-Expression ösophagealer Plattenepithelzellen bei der Refluxösophagitis auf den refluxassoziierten säure- und gallebedingten oxidativen Stress und *DNA*-Schaden zurückgeführt werden kann. Hohe extrazelluläre Konzentrationen an rekombinantem humanem *DKK1* wiederum konnten das Epithelwachstum hemmen und zelluläre Seneszenz über den *p16/Retinoblastoma*-Signalweg *in vitro* induzieren. Diese refluxassoziierte *DKK1*-vermittelte Seneszenz konnte mit der *DKK1*-vermittelten Hemmung des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs erklärt werden (Lyros *et al.*, 2014). Zelluläre Seneszenz ist ein Zustand des irreversiblen permanenten Zellzyklusarrests, bei dem die Zelle aber funktionsfähig und metabolisch aktiv bleibt. Insgesamt scheint *DKK1* als *Wnt*-Inhibitor bei der Refluxösophagitis eine wichtige Rolle in der Wachstumsinhibition und Gewebemöostase zu spielen.

Trotz der Abwesenheit robuster nukleärer β -Catenin-Akkumulation weist der *Wnt*/ β -Catenin Signalweg bereits in der Barrett-Metaplasie ein moderates Aktivierungsmuster auf (Lyros *et al.*, 2015). Es ist schon länger bekannt, dass der *Wnt*/ β -Catenin Signalweg für die Transkription verschiedener intestinaler Marker der Barrett-Metaplasie, wie *SOX9* und *CDX1*, verantwortlich ist (Lickert *et al.*, 2000; Blache *et al.*, 2004). Es konnte zudem demonstriert werden, dass eine Aktivierung des *Wnt*/ β -Catenin Signalwegs mit einer Intestinalisierung von humanen ösophagealen Keratinozyten *in vitro* einhergeht (Kong *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2011b). Der *Wnt*/ β -Catenin Signalweg könnte daher nicht nur bei der neoplastischen Progression, sondern auch bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Barrett-Metaplasie eine wichtige Rolle spielen (Chen *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass *DKK1* in der nicht-dyplastischen Barrett-Metaplasie als *Wnt*-Inhibitor für die relativ moderate *Wnt*-Aktivierung verantwortlich ist (Lyros *et al.*, 2015). Die *DKK1*-Expression ist dabei im Sinne des negativen Rückkopplungs-Mechanismus als eine regulative Antwort auf das *Wnt*-Signal zu verstehen.

Die Aktivität des *Wnt*/ β -Catenin Signalwegs nimmt in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz stetig zu (Bian *et al.*, 2000; Osterheld *et al.*, 2002; Clément *et al.*, 2006; Moyes *et al.*, 2012). Über welche Mechanismen es beim ösophagealen Adenokarzinom zu einer Aktivierung der β -Catenin-Transkriptionsaktivität kommt, ist noch nicht hinreichend untersucht. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass Mutationen in β -Catenin-, Axin- und APC- Genen, welche im kolorektalen Karzinom häufig sind (Munemitsu *et al.*, 1995; Polakis *et al.*, 1999), nur sehr selten in Adenokarzinomen des Ösophagogastrealen Übergangs nachzuweisen sind (Choi *et al.*, 2000). Inflammatorische Mediatoren, wie *TNF α* , konnten *in vitro* den *Wnt*/ β -Catenin Signalweg aktivieren (Tselepis *et al.*, 2002). Auch *Wnt*-unabhängige aktivierende Phosphorylierungen von β -Catenin durch Tyrosinkinasen sind denkbar (Brembeck *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; van Veelen *et al.*, 2011). Wie bereits durch Lyros *et al.* (2015) beschrieben, könnte ein Verlust der inhibitorischen Funktion von *DKK1* im Stadium der Barrett-Metaplasie zur aberranten Aktivierung des *Wnt*/ β -Catenin Signalwegs, und damit zur Karzinogenese, beitragen.

Die „klonale Evolution“ während der Progression von der Barrett-Metaplasie zum Adenokarzinom ist ein sehr komplexer dynamischer Prozess, bei dem genetische Veränderungen, chromosomale Instabilität und die Dysregulation ganz verschiedener Signalwege eine Rolle spielen (Nowell, 1976; Maley, 2007; Mendelson *et al.*, 2011, Pavlov *et al.*, 2014). Mutationen in *TP53* und *CDKN2A* sind frühe genetische Veränderungen, gefolgt von einer Verdopplung des Genoms. Viele molekulare Marker sind bereits in kleinen Studien bezüglich ihrer Funktion als Biomarker mit dem Ziel der Risikostratifizierung und Früherkennung analysiert worden (Tan *et al.*, 2016). So sind u.a. Tetraploidie und Aneuploidie, Mikrosatelliteninstabilität, Proliferationsmarker (z.B. immunhistochemischer Nachweis des *Ki-67* Antigens oder *Cyclin D1*-Überexpression) sowie *TP53-LOH* und *CDKN2A*-Anomalien bereits untersucht (Bani-Hani *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2000; Rabinovitch *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2001; Bian *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2004; Maley *et al.*, 2004; Galipeau *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2008; Kerkhof *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass während der neoplastischen Progression die Expression des Adhäsionsproteins *CD44* signifikant sinkt, während die *DKK1*-Expression stark zunimmt (Darlavoix *et al.*, 2009).

Für das ösophageale Adenokarzinom gibt es bisher keinen Biomarker, der mit ausreichender Sensitivität in der Lage ist, den Tumor in einem frühen, noch gut kurativen Stadium zu detektieren. Bisher ist die histologisch gesicherte „*high-grade*“ Dysplasie (*HGD*) im Barrett-Ösophagus der einzige, aber nicht sehr spezifische Marker für ein erhöhtes Risiko, ein ösophageales Adenokarzinom zu entwickeln. Die Anwendung von *DKK1* als ein serologischer Biomarker ist beim ösophagealen Adenokarzinom noch nicht erforscht. Ebenfalls ist über die Funktion von *DKK1* im ösophagealen Adenokarzinom bisher wenig bekannt. *DKK1* könnte über bisher unbekannte *DKK1*-Rezeptoren bzw. *DKK1*-getriggerte Signalwege die Karzinogenese beeinflussen. Sekretorische Proteine, wie das *DKK1*, haben den entscheidenden Vorteil, dass sie sich im Extrazellularraum anreichern. Dies macht sie als Biomarker und therapeutisches Target leicht zugänglich.

1.4. Hypothese

***DKK1* weist eine hohe Expression im ösophagealen Adenokarzinom auf. Aufgrund der bereits nachgewiesenen Heraufregulation des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs im ösophagealen Adenokarzinom liegt ein defekter negativer Rückkopplungs-Mechanismus von *DKK1* vor.**

Es ist anzunehmen, dass die *DKK1*-Expression, und damit auch die *DKK1*-Serumkonzentration, während der neoplastischen Progression und mit steigendem Tumorstadium zunimmt. Damit könnten die Voraussetzungen für einen geeigneten serologischen Biomarker gegeben sein. Das *DKK1*-Protein selbst hat dabei vermutlich keinen inhibitorischen Effekt auf den *Wnt/β-Catenin* Signalweg mehr. Denkbar wäre eine Dysregulation im *DKK1*-vermittelten Inhibitionsmechanismus sowie aberrante Aktivierungen nachgeschalteter Signalmoleküle. Hinsichtlich Proliferation, Migration und Invasion könnte *DKK1* eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen und somit zudem ein gutes therapeutisches Target darstellen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Autoklav 5050ELV – *Biomedis, Gießen*; Brutschrank APT.line™CB(E3) – *Binder, Tuttlingen*; Chemilumineszenz-Detektor MicroChemi 4.2 – *Biostep GmbH, Burkhardtsdorf*; Durchflusszytometer LSRII - *Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ*; Elektronikrührer MR3001 – *Heidolph, Schwabach*; Elektronikrührer Variomag – *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*; Fast Blotter Pierce G2 – *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*; Feinwaage AB104-S – *Mettler Toledo, Columbus, OH*; Feinwaage BP310S – *Sartorius, Göttingen*; Feinwaage OWA Labor 34.004 – *VEB Nagema, Dresden*; Mikroskop Axiovert25 – *Zeiss, Oberkochen*; Mikroskop CKX41 – *Olympus, Tokio, JPN*; Mikroskop-Kamera Axio Cam ERc5s (Primo vert) – *Zeiss, Oberkochen*; Multikanalpipette Discovery Comfort – *Kinesis GmbH, Langenfeld*; PCR-Gelelektrophorese-Kammer 40-0708 – *PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen*; PCR-Spannungsquelle 1000/500 - *Bio-Rad, Hercules, CA*; PCR-Zykler Gene Amp® PCR System 2700 – *Applied Biosystems, Waltham, MA*; PCR-Zykler TProfessional – *Biometra GmbH, Göttingen*; pH-Meter inoLab® – *WTW GmbH, Weilheim*; Pipetus – *Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt*; RotorGene 3000 – *Qiagen Corbett Research, Hilden*; Schüttler HS250 basic – *IKA Labortechnik, Staufen*; Schüttler Rotamax 120 – *Heidolph, Schwabach*; Spektramax M5 – *Molecular Devices, Sunnyvale, CA*; Spektrophotometer ND1000 – *PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen*; Sterilwerkbank HERAsafe – *Heraeus, Hanau*; Szintillationszähler LS6000 – *Beckman Coulter, Brea, CA*; Thermomixer comfort – *Eppendorf, Hamburg*; Thermomixer Thriller – *PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen*; Transilluminator G:Box – *Syngene, Cambridge, UK*; Vortexer VF2 – *IKA Labortechnik, Staufen*; Wasserbad – *Memmert, Schwabach*; Western Blot Gel-Gießvorrichtung Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stand & Clamps – *Bio-Rad, Hercules, CA*; Western Blot Gelelektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN®3 Cell – *Bio-Rad, Hercules, CA*; Western Blot Spannungsquelle PowerPac™ HC – *Bio-Rad, Hercules, CA*; Zentrifuge Biofuge fresco – *Heraeus, Hanau*; Zentrifuge Labofuge 400R – *Heraeus, Hanau*; Zentrifuge Multifuge X3R – *Heraeus, Hanau*

2.1.2. Software und Programme

Chemilumineszenz-Detektor	GelCapture –
MicroChemi 4.2	<i>Biostep GmbH, Burkhardtsdorf</i>
Spektrophotometer ND1000	ND-1000 V3.8.1 – <i>PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
Transilluminator G:Box	GeneSnap 7.12 – <i>Syngene, Cambridge, UK</i>
RotorGene 3000	RotorGene Analysis Software 6.1 – <i>Qiagen Corbett Research, Hilden</i>
SpektraMax M5	SpektraMax®Pro – <i>Molecular Devices, Sunnyvale, CA</i>
Mikroskop Axiovert25	ZEN lite 2012 – <i>Zeiss, Oberkochen</i>
Mikroskop CKX41	CellSensDimension – <i>Olympus, Tokio, JPN</i>
Densitometrie + Longimetrie	ImageJ 1.48v – <i>National Institute of Health, NY</i>
Statistik	GraphPad Prism 5.0 – <i>GraphPad Software Inc., La Jolla, CA</i>

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Blotpapier – *Th. Geyer, Renningen*; Companion plate (24 well) – *BD Biosciences, San Jose, CA*; Culture Insert in μ -Dish (35 mm, high) – *ibidi GmbH, Planegg/Martinsried*; Einmalhandschuh Nitril – *Hartmann Gruppe, Heidenheim an der Brenz*; Einwegpipetten (5ml, 10 ml, 25 ml) – *Greiner Bio-One, Kremsmünster*; Faltenfilter – *Munktell & Filtrak GmbH, Niederschlag*; Filter (0,2 μ m) – *Sarstedt, Nürnberg*; FluoroBlok™ tissue culture-treated inserts (Pore Size 8 μ m/48 Inserts) – *BD Biosciences, San Jose, CA*; Kryoröhrchen (1,8 ml) – *Sarstedt, Nürnberg*; Nitrozellulosemembran – *Amersham, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK*; PCR Tubes (0,2 ml, farblos) – *Greiner Bio-One, Kremsmünster*; Pipettenspitzen (1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l) – *Sarstedt, Nürnberg*; Pipettierschalen – *Brand*

GmbH, Riesa; qRT-PCR Tubes (0,2 ml, farblos) – *Sarstedt, Nürnberg*;
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) – *Sarstedt, Nürnberg*; Spritze (10 ml) – *Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ*; Zellkulturflaschen (75 cm², 25 cm²) – *Greiner Bio-One, Cellstar, Kremsmünster*; Zellkulturplatten (6 well, 24 well, 96 well) – *Greiner Bio-One, Cellstar, Kremsmünster*; Zellkulturröhrchen (15 ml) – *Sarstedt, Nürnberg*;
Zellkulturröhrchen (50 ml) - *Greiner Bio-One, Cellstar, Kremsmünster*; Zellschaber – *Sarstedt, Nürnberg*

2.1.4. Reagenzien und Chemikalien

AppliChem, Darmstadt: Brom-Phenol-Blau; Ethidiumbromidlösung; Kalium-Dihydrogenphosphat

Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ: Calcein

Biochrom GmbH, Berlin: Fetales Kälberserum (FKS); MCDB 153 Basal Medium

EMD Millipore, Billerica, MA: Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate

Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA: 0,05 % Trypsin/EDTA; KSFM; RPMI Medium 1640 (+L-Glutamin)

Perkin Elmer, Waltham, MA: Szintillationsflüssigkeit; ³H-Thymidin

ROTH, Karlsruhe: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES); 30%iges Acrylamid/Bis-Acrylamid; Ammoniumperoxodisulfat (APS); Bovine Serum Albumin (BSA); Dimethylformamid (DMF); Dimethylsulfoxid (DMSO); Essigsäure; Ethanol; Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Glycin; Isopropanol; Low Fat Milk Powder (LFM); Natriumchlorid (NaCl); Tris-HCl; Natriumdodecylsulfat (SDS); Natronlauge (6N), Nukleasefreies Water (steril); RNase Away; RotiMark TRICOLOR; Roti®-Free Stripping Buffer 2.0; Salzsäure (4N); Tetramethylethyldiamin (TEMED); Tris; NP-40/ Triton X-100; Tween-20

Sigma – Aldrich, St. Louis, MO: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT); Adenin; Agarose; β -Mercaptoethanol; Cholera toxin; Hydrokortison; Insulin-Transferrin-Selenium (ITS); Natrium-Bisulfid (Na-Bi); Natrium-Deoxycholat; Phosphatase-Inhibitor P5726-1ML; Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS); Ponceau S; Proteinase-Inhibitor P8340-1ML; Ribonuklease; Soybean Trypsin Inhibitor (STI); Trichloressigsäure; Tris Base

Thermo Fisher Scientific, Waltham, CA: 100 bp Gene Ruler (DNA Ladder); 6x DNA Loading (Dye), Bovine Pituitary Extract (BPE), Penicillin-Streptomycin, Glutamax

2.1.5. Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene ösophageale Zelllinien normoplastischen, metaplastischen, dysplastischen und kanzerogenen Ursprungs genutzt (Tab.1).

Tab.1: Ösophageale Zelllinien.

Name	Gewebeart	Firma	Katalog-Nr.
OE33	EAC (UICC: Iia)	Sigma – Aldrich	96070808
OE19	EAC (UICC: III)	Sigma – Aldrich	96071721
CP-A	Barrett-Metaplasie (nicht-dysplastisch)	ATCC	CRL-4027 TM
CP-B	Barrett-Metaplasie (HGD)	ATCC	CRL-4028 TM
EPC1-hTERT EPC2-hTERT	ösophageales Plattenepithel	Harada <i>et al.</i> , 2003	

2.1.6. Blutserum

Blutserum wurde für die Analyse der *DKK1*-Konzentrationen von Patienten mit ösophagealem Adenokarzinom (n=18) und histologisch gesicherter Barrett-Metaplasie (n=18) sowie von gesunden Kontrollpersonen (n=17) gesammelt (Tab.2). Die Patienten wurden im Universitätsklinikum Leipzig, auch im Rahmen des Aktionstages

„Speiseröhre – Vom Reflux zum Karzinom“ (31.01.2015), sowie im *Medical College of Wisconsin (Milwaukee, USA)* rekrutiert. Bei 4 Adenokarzinom-Patienten konnte aufgrund von Fernmetastasierungen (n=2), Komorbiditäten (n=1) oder einem deutlich reduzierten Allgemeinzustand (n=1) keine Ösophagusresektion durchgeführt werden. Im Falle einer Ösophagusresektion wurde jeweils in einem Zeitintervall von 1-10 Tagen vor der Operation, als auch zwischen dem 3. und 10. postoperativen Tag Blut entnommen. Bei 6 Adenokarzinom-Patienten war zum Zeitpunkt der präoperativen Blutentnahme bereits eine neoadjuvante Therapie durchgeführt worden. Direkt nach der Blutentnahme wurden die Proben mit der Multifuge X3R (*Haraeus, Hanau*) zentrifugiert (10 min, 4.400 rpm, 20°C), aliquottiert und bei -80°C gelagert. Alle Patienten haben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dem Forschungsprojekt gegeben. Die Genehmigung der Ethikkommission liegt vor (307/15-ff). Die klinischen und histopathologischen Daten der Patienten wurden dokumentiert. Die histopathologische Bestimmung des Tumorstadiums ((y)pTNM) konnte nur bei denjenigen Adenokarzinom-Patienten erfolgen, bei denen eine Ösophagusresektion im Universitätsklinikum Leipzig durchgeführt worden ist (n=14). Der Differenzierungsgrad der Karzinomzellen (*Grading*) war hingegen aus einer endoskopischen Biopsieentnahme bei allen Adenokarzinom-Patienten bekannt (n=18).

Tab.2: Patientencharakteristika.

Gesunde Kontrollpersonen (n=17)	
Geschlecht (m/w)	10/7
Alter	25-76 Jahre
Barrett-Metaplasie-Patienten (n=18)	
Geschlecht (m/w)	12/6
Alter	43-90 Jahre
Adenokarzinom-Patienten (n=18)	
Geschlecht (m/w)	17/1
Alter	44-79 Jahre
Tumorstadium (TNM)	
(y)pTis-T1/pT2/pT3	7/3/4
(y)pN0/pN+	11/3
cM0/cM1	16/2
Grading	
G1/G2/G3	7/6/5

2.1.7. Lösungen und Medien

Medien zur Zellkultivierung

OE33 und OE19	RPMI 1640/ 10% FKS
CP-A und CP-B	MCDB/ 5% FKS/ 1% ITS/ 2% Glutamax/ 1% Penicillin-Streptomycin/ 0,00625% Hydrokortison/ 0,125% rhEGF/ 0,00165% Choleratoxin/ 0,12% Adenin/ 0,95% BPE
EPC1-hTERT und EPC2-hTERT	KSFM/ 0,345% BPE/ 0,005% rhEGF/ 1% Penicillin-Streptomycin

Abstoppreagenzien

OE33 und OE19	RPMI 1640/ 10% FKS
CP-A und CP-B	MCDB/ 5% FKS
EPC1-hTERT und EPC2-hTERT	STI

Einfriermedien

OE33 und OE19	RPMI 1640/ 10% FKS/ 10% DMSO
CP-A und CP-B	RPMI 1640/ 10% FKS/ 10% DMSO
EPC1-hTERT und EPC2-hTERT	FKS/ 10% DMSO

Gebrauchslösungen

MTT-Stammlösung	5 mg/ml in PBS, steril filtriert (Lagerung bei 4°C im Dunkeln)
MTT-Abstoppreagenz	40 g SDS 100 ml Aqua dest. 100 ml DMF (pH 4,7)

Puffer

1 x Lysepuffer / RIPA (50 ml)	0,394 g Tris-HCl (pH 7,4) 0,4383 g NaCl 0,5 ml NP-40/Triton X-100 0,25 g Natrium-Deoxycholat
-------------------------------	---

1 x Inkubationspuffer (50 ml)	0,5 ml 10%ige SDS-Lösung + Aqua dest. 0,5% Proteinase-Inhibitor (frisch) 0,5% Phosphatase Inhibitor (frisch) 0,6655 g Tris (pH 6,8) 8 ml Glycerin 5 ml 10%ige SDS-Lösung + Aqua dest. 0,005 g Brom-Phenol-Blau 10% β -Mercaptoethanol (frisch)
1 x Trenngelpuffer (500 ml)	90,86 g Tris Base (pH 8,8) + Aqua dest.
1 x Sammelgelpuffer (500 ml)	30,25 g Tris Base (pH 6,8) + Aqua dest.
10 x Elektrophoresepuffer (1l)	10 g SDS 30,28 g Tris Base 144 g Glycin + Aqua dest.
1 x Fast-semidry-Transferpuffer (1l)	5,81 g Tris 4,77 g HEPES + Aqua dest. 0,2% EDTA (frisch) 0,26% Na-Bi (frisch) 0,26% DMF (frisch)
10 x TBS (1l)	24,2 g Tris Base (pH 7,6) 80 g NaCl + Aqua dest.
1 x TBST (1l)	1l 1 x TBS 1 ml Tween-20
10 x TAE (1l)	48,4 g Tris Base 11,4 ml Essigsäure 3,7 g EDTA + Aqua dest.

2.1.8. Kits

ELISA	Human Dkk-1 DuoSet ELISA (15 Plate) + DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 – <i>R&D Systems Inc., Minneapolis, MN</i> Human Dkk-1 Quantikine ELISA Kit – <i>R&D Systems Inc., Minneapolis, MN</i>
RNA-Isolation	RNeasy Mini Kit – <i>Qiagen, Hilden</i>
cDNA-Synthese	Revert Aid Kit – <i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA</i>
qRT-PCR	Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) – <i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA</i>
RT-PCR	DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) – <i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA</i>

2.1.9. Transfektionsmaterialien

Für den *DKK1-Knockdown* wurden ausschließlich Transfektionsmaterialien von *GE Dharmacon (Lafayette, CO)* verwendet (Tab.3).

Tab.3: Transfektionsmaterialien.

Produkt	Target-Sequenz	Katalog-Nr.
DharmaFECT 1 Transfection Reagent		T-2001-02
ON-TARGETplus SMARTpool, Human DKK1 (22943), 5 nmol	<i>GUUCUCAAUCCAACGCUA</i> <i>ACUGAUGAGUACUGCGCUA</i> <i>AGGUCUGUCUUGCCUUAUA</i> <i>UAGAAUAUCCAGCGUUG</i>	L-003843-01-0005
ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1,5 nmol	<i>UGGUUUACAUGUCGACUAA</i>	D-001810-01-05

2.1.10. Rekombinante Proteine

Für Behandlungen im Rahmen der Zellkultur-Experimente wurden rekombinantes humanes *DKK1*, *Wnt3a* und *VEGF* verwendet.

Dem MCDB- und KSFM-Vollmedium der Zelllinien *CP-A*, *CP-B*, *EPC1-hTERT* und *EPC2-hTERT* wurde *rhEGF* zugesetzt (Tab.4).

Tab.4: Rekombinante Proteine.

Protein	Firma	Katalog-Nr.
rhDKK1	R&D Systems Inc.	5439-DK-010
rhWnt3a	R&D Systems Inc.	5036-WN-010
rhVEGF	R&D Systems Inc.	#293-VE
rhEGF	Immuno Tools GmbH	11343406

2.1.11. Antikörper für Western Blot

Die für den *Western Blot* verwendeten Antikörper sind mitsamt Firma und Katalog-Nummer aufgelistet (Tab.5, Tab.6).

Tab.5: Primärantikörper für Western Blot.

Primärantikörper	Firma	Katalog-Nr.
DKK1	Abcam	ab109416
β -Aktin	Sigma-Aldrich	A1978
Phospho- β -Catenin (Ser552)	Cell Signaling Technology	#5651
β -Catenin	Cell Signaling Technology	#8480
Phospho-GSK3 β (Ser9)	Cell Signaling Technology	#5558
GSK3 β	Cell Signaling Technology	#12456
LRP6	R&D Systems Inc.	MAB2960
Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	#4060
Akt	Cell Signaling Technology	#4691
Phospho-Erk 1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	#4370
Erk 1/2	Cell Signaling Technology	#4695
p53	EMD Millipore	OP43
Bcl-xL	Cell Signaling Technology	#2764
Caspase 3	BD Transduction Laboratories	610323

Tab.6: Sekundärantikörper für Western Blot.

Sekundärantikörper	Firma	Katalog-Nr.
Goat-anti-Rabbit	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	111-035-045
Goat-anti-Mouse		115-035-068
Goat-anti-Rat		112-035-062

2.1.12. Primer für RT-PCR und qRT-PCR

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma *Sigma – Aldrich (München)* (Tab.7).

Tab.7: Primer für RT-PCR und qRT-PCR.

Gen	Sequenz - Forward	Sequenz - Reverse
DKK1	AGCGTTGTTACTGTGGAGAAG	GTGTGAAGCCTAGAAGAATTACTG
β-Aktin	CACTCTTCCAGCCTTCCTTC	GGTGTAAACGCAACTAAGTCATAG
Axin II	CCACTGGCCGATTCTTCCTT	TACCGGAGGATGCTGAAGGC
Cyclin D1	GGCGGATTGGAAATGAACTT	TCCTCTCCAAAATGCCAGAG
p21	GGAAGACCATGTGGACCTGT	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Kultur aller Zelllinien erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% im Brutschrank. Die OE33- und OE19-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 10% FKS-versetztem RPMI-1640 Medium kultiviert. Die Zelllinien CP-A, CP-B, EPC1-hTERT und EPC2-hTERT benötigen ein spezielles Kulturmedium, welches u.a. Wachstumsfaktoren und Antibiotika enthält und regelmäßig frisch hergestellt werden muss. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48h, um die Zellen mit genügend Nährstoffen zu versorgen. Waren die Zellen ca. 80% konfluent, wurden sie mit 0,05%igem Trypsin/EDTA abgelöst und in dem Verhältnis 1:4 gesplittet. Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden ausschließlich mit den OE33-Zellen durchgeführt.

Behandlung mit rekombinanten humanen Proteinen

Für die Inkubation mit rekombinantem humanem *DKK1* (*R&D Systems Inc., Minneapolis, MN*) wurden die *OE33*-Zellen mit 500.000 Zellen/Well auf 6well-Platten ausgesät und 24h später vor der Behandlung für 4h auf 1%iges FKS-Medium gesetzt. Der FKS-Gehalt im Medium wurde reduziert, um den Effekt von unspezifischen Wachstumsstimulatoren möglichst gering zu halten. Die Behandlung mit *rhDKK1* erfolgte in den Konzentrationen 250 ng/ml und 500 ng/ml für 24h (Lyros *et al.*, 2015). Bei der Behandlung mit *rhWnt3a* (*R&D Systems Inc., Minneapolis, MN*) nach dem *DKK1-Knockdown* wurde mit einer Konzentration von 200 ng/ml gearbeitet (Lyros *et al.* 2014; Lyros *et al.*, 2015). Die Behandlung mit *rhWnt3a* wurde 96h nach der Transfektion durchgeführt. Die Stimulationszeiten waren 1h und 4h.

DKK1-Knockdown

Das Ziel-Gen *DKK1* wurde mit Hilfe spezifischer *siRNAs* (*GE Dharmacon, Lafayette, CO*) in seiner Expression herunterreguliert. Als direkte Kontrolle für den *DKK1-Knockdown* dienten die mit den *Non Targeting siRNAs* (*NT-siRNAs*) behandelten *OE33*-Zellen. Die *siRNA*-Oligos wurden zunächst mit sterilem ddH₂O nach Herstellerangaben gelöst (20 µM), aliquottiert und bei -20°C gelagert. Vor jeder Verwendung musste eine 1:4 Verdünnung der *siRNAs* (5 µM) hergestellt werden. Für die Einfachtransfektion wurden die *OE33*-Zellen mit einer Dichte von 50.000 Zellen/Well in einer 6well-Platte ausgesät. Nach zwei Tagen war eine optimale Konfluenz der *OE33*-Zellen von ca. 60% für die Transfektion erreicht. Zunächst wurde ein Mediumwechsel mit 10%igem FKS-Medium auf 1.600 µl/Well durchgeführt. Pro 6well-Platte wurden drei Ansätze á 840 µl mit serumfreiem Medium, dem Transfektionsreagenz und den entsprechenden *siRNAs* (5 µM) hergestellt. Für die Negativkontrolle wurden ausschließlich 16 µl des Transfektionsreagenz in den ersten Ansatz zu dem serumfreien Medium gegeben. In den zweiten und dritten Ansatz wurden jeweils 21 µl der entsprechenden *siRNAs* und 16 µl des Transfektionsreagenz gegeben. Die drei Ansätze wurden nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf jeweils zwei Wells der 6-well Platte verteilt. Dazu wurden jeweils 400 µl des Ansatzes zu dem entsprechendem Well hinzugegeben. Die Endkonzentration der *siRNAs* auf den Zellen entsprach damit 25 nM. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Nach 48h wurde das Medium erstmals gewechselt und die Zellen für weitere 48h kultiviert. Um einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen durch das

Transfektionsreagenz oder die *siRNAs* sowie morphologische Veränderungen beurteilen zu können, wurde der Transfektionsverlauf mittels Fotodokumentation zum Zeitpunkt der Transfektion, nach 48h und nach 96h dokumentiert. Proteine und *RNAs* konnten 96h nach der Transfektion isoliert werden. Zum Zeitpunkt der Isolation wurde außerdem bei jedem Experiment das Medium der Zellen gesammelt, um mittels *ELISA* die Effektivität des *DKK1-Knockdowns* überprüfen zu können. Im Falle einer Behandlung der *Knockdown-Zellen* mit *rhWnt3a* wurden diese nach 96h zunächst für 4h auf 1%iges FKS-Medium gesetzt und anschließend mit der definierten Konzentration (200 ng/ml) in 1%igem FKS-Medium behandelt. Die Isolation der Proteine und *RNAs* erfolgte dann nach der entsprechenden Stimulationszeit.

MTT-Assay

Um den Effekt einer Behandlung mit *rhDKK1* sowie des *DKK1-Knockdowns* auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurde der *MTT-Assay* durchgeführt (Mosmann, 1983). Dazu wurden die *OE33-Zellen* mit dem wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalz *MTT* (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) inkubiert. Dieser Farbstoff wird durch mitochondriale Reduktasen metabolisch aktiver Zellen in ein blauviolett wasserunlösliches Formazan umgewandelt, was nach dem Lösen der Salzkristalle spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm quantifiziert werden kann. Damit ist der *MTT-Assay* ein gutes Maß für den Zellstoffwechsel und korreliert stark mit der Zellviabilität. Indirekt kann auf die Zellproliferation geschlossen werden.

Für den *MTT-Assay* wurden die *OE33-Zellen* in 96well-Platten ausgesät. Die Anzahl der benötigten Zellkulturplatten für ein Experiment orientierte sich an der Zahl der Messzeitpunkte. In jedes Well wurden 100 µl der Zellsuspension gegeben. Die *MTT*-Messungen wurden stets in sechsfachen Replikaten durchgeführt. Eine Reihe auf der 96well-Platte wurde ausschließlich mit Medium befüllt und diente für die Messungen als Leerwert bzw. Hintergrund. Die zweite Reihe bestand aus unbehandelten Zellen und diente als Kontrollreihe. In den folgenden Reihen konnte eine Behandlung der Zellen 24h nach dem *Splitten* durchgeführt werden (Abb.3). Zu einem spezifischen Messzeitpunkt wurden jeweils 10 µl der *MTT*-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) mit einer Multikanalpipette in jedes Well pipettiert. Die Inkubation mit dem gelben Tetrazoliumsalz erfolgte für 3h bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden in jedes Well 100 µl des *MTT*-Abstoppreagenz mit einer Multikanalpipette hinzugegeben und

Wound-Healing-Assay

Der *Wound-Healing-Assay* diente der Beurteilung der Zellmotilität und wurde in sterilen Petrischalen von *ibidi GmbH (Planegg/Martinsried)* durchgeführt. Diese haben einen Zellkultur-Einsatz mit zwei Kammern, in welche die Zellen gegeben werden. Nach Herausnahme des Einsatzes mit einer sterilen Pinzette sind die Zellen durch einen 500 µm breiten Spalt voneinander getrennt. Das Zuwachsen des Spaltes kann dann unter dem Mikroskop beobachtet und dokumentiert werden. 96h nach der *siRNA*-Transfektion waren die *OE33*-Zellen konfluent und der Zellkultur-Einsatz wurde entfernt. Der Zeitpunkt für die Herausnahme des Einsatzes wurde für die Auswertung auf 0h gesetzt und die Spaltbreite zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h und 24h dokumentiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde die gleiche Stelle für das Foto gewählt. Longimetrische Berechnungen für die Quantifikation der Spaltbreite wurden mit ImageJ 1.48v (*National Institute of Health, NY*) durchgeführt.

Transmigration-Assay

Um das Invasionsverhalten der *OE33*-Zellen nach dem *DKK1-Knockdown* zu untersuchen, wurde ein *Transmigration-Assay* durchgeführt. Hierzu wurden spezielle Zellkultureinsätze und die dazugehörigen 24well-Platten von *BD Biosciences (San Jose, CA)* benutzt. Die Zellkultureinsätze besitzen eine lichtundurchlässige Polyethylenterephthalat-Membran, durch deren 8 µm breite Poren die Zellen von der oberen in die untere Kammer migrieren können. Mittels Fluoreszenz können die Zellen in der unteren Kammer nach einer bestimmten Zeit mit einem Spektrometer („*from bottom reading*“) detektiert werden. Aufgrund der Lichtundurchlässigkeit der Membran bei 400–700 nm werden ausschließlich fluoreszenzmarkierte Zellen in der unteren Kammer gemessen. Das Fluoreszenzsignal korreliert daher mit der Zellzahl in der unteren Kammer. Dies entspricht der Anzahl transmigrierter Zellen.

Der *DKK1-Knockdown* wurde zunächst in den 6well-Platten nach Protokoll durchgeführt. 48h nach der Transfektion wurden die *OE33*-Zellen (Negative Kontrolle, *NT-siRNA*, *DKK1-siRNA*) trypsiniert, gezählt, in 2%igem FKS-Medium resuspendiert und in der entsprechenden 24well-Platte mit den Zellkultureinsätzen mit einer Dichte von 40.000 Zellen/Einsatz ausgesät. Die untere Kammer wurde mit 10%igem FKS-Medium befüllt, um einen Gradienten für die Transmigration zu schaffen. Bei dem Befüllen der Wells mit Medium wurde auf das Vermeiden von Luftblasen geachtet. Nach einer Inkubationszeit von 48h erfolgte die einstündige Färbung der Zellen mit

Calcein (4 µg/ml) und die abschließende Messung des Fluoreszenzsignals „from bottom“ bei einer Wellenlänge von 405/595 nm mit dem Spektramax M5 (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA*).

³H-Thymidine-Incorporation-Assay

Der *MTT-Assay* ist eine Methode zur Messung der Zellviabilität. Auf die Zellproliferation kann daraus nur indirekt geschlossen werden. Eine genauere Methode zur quantitativen und objektiven Messung der Zellproliferation stellt der *³H-Thymidine-Incorporation-Assay* dar. Bei jeder Zellteilung wird radioaktives ³H-Thymidin in die *DNA* eingebaut. Die gemessene Radioaktivität korreliert damit direkt mit der Proliferationsrate der Zellen.

Wie bei dem *Transmigration-Assay* wurde der *DKK1-Knockdown* bei den *OE33*-Zellen zunächst in den 6well-Platten nach Protokoll durchgeführt. Nach 48h wurden die *OE33*-Zellen (Negative Kontrolle, *NT-siRNA*, *DKK1-siRNA*) trypsiniert, gezählt, in 2%igem FKS-Medium resuspendiert und mit einer Dichte von 25.000 Zellen/Well in eine 24well Platte passagiert. Für die Positivkontrolle wurden die Negativen Kontrollzellen mit *rhVEGF* (*R&D Systems Inc., Minneapolis, MN*) behandelt. 24h später wurde ³H-Thymidin zu den *OE33*-Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 6h bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellproteine durch die Zugabe von 5%iger Trichloressigsäure gefällt. Die Inkubation mit Trichloessigsäure erfolgte für 10 min auf Eis. Mittels Natriumhydroxid wurden die Zellen durch alkalische Verseifung der Lipide lysiert und dadurch die *DNA* freigesetzt. Nach Hinzugabe der Szintillations-Flüssigkeit wurde die Radioaktivität mit dem Szintillationszähler LS6000 (*Beckman Coulter, Brea, CA*) gemessen.

2.2.2. Molekularbiologische Arbeiten

Sammeln von Zellkulturüberständen

Bei allen *Knockdown*-Experimenten wurde zum Zeitpunkt der Protein- und *RNA*-Isolation auch das Medium der *OE33*-Zellen gesammelt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern wurden die Mediumproben in der Biofuge fresco (*Heraeus, Hanau*) zentrifugiert (3 min, 3.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde jeweils abgenommen und das Pellet verworfen. Die Zellkulturüberstände wurden bei -80°C gelagert.

Isolation von Proteinen

Für die Isolation von Zellproteinen wurden die 6well-Platten zunächst auf dem Eis platziert und die Zellen wiederholt mit kaltem PBS gewaschen. Je nach Zelldichte wurden 75–150 µl Lysepuffer (RIPA) pro Well zu den Zellen gegeben. Vor jeder Verwendung wurde ein Proteinase-Inhibitor und der Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (*Sigma – Aldrich, St. Louis, MO*) zu dem RIPA-Puffer frisch hinzugegeben. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber vom Plattengrund gelöst und 20 min auf Eis lysiert. Wiederholtes Resuspendieren diente der Lyse von Zellbestandteilen. Nach 20-minütigem Zentrifugieren (13.000 rpm, 4°C) in der Biofuge fresco (*Heraeus, Hanau*) wurde der Überstand in 1,5 ml Eppis pipettiert und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Protein-Quantifikation

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Es handelt sich um eine photometrische Methode, bei der mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 (CBBG) gearbeitet wird. Dieser bildet mit den unpolaren kationischen Seitenketten der Proteine Komplexe und wird somit in seiner blauen anionischen Form stabilisiert. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 270 nm nach 595 nm. Die Absorptionsmessung bei 595 nm ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration. Für die Herstellung der Standardreihe wurde BSA (1 mg/ml) verwendet. Die Standardverdünnungen sowie die Verdünnungen der Proteinlysate erfolgten in PBS. Die Proteinlysate wurden jeweils in zwei Verdünnungen aufgetragen, um über Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors eine genauere Quantifikation mittels Mittelwertbildung zu ermöglichen. Die Absorptionsmessung wurde am Spektramax M5 (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA*) durchgeführt.

SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen mit Molekülmassen zwischen 5 und 250 kDa (Laemmli, 1970). Es handelt sich um ein diskontinuierliches System, bei dem die Polypeptidketten zunächst in einem pH-neutralen Sammelgel zwischen zwei Ionenfronten aufkonzentriert werden, um anschließend von einem gemeinsamen Startpunkt aus eine genauere Auftrennung zu ermöglichen.

(1) Herstellung der Gele

Für die SDS-PAGE werden Vertikalgele zwischen zwei Glasplatten benötigt. Diese wurden unter Verwendung von ddH₂O., Pufferlösung, 30%igem Acrylamid/Bis-Acrylamid, 10%igem SDS, 10%igem APS und TEMED mit der Gel-Gießvorrichtung von Bio-Rad (*Hercules, CA*) hergestellt und bei 4°C gelagert. Die Hinzugabe des Radikalstarters APS und des Katalysators TEMED induziert den Beginn der Radikalkettenreaktion und damit die Polymerisation des Gels. Für das Sammelgel und das Trenngel werden unterschiedliche Pufferlösungen benötigt, welche sich in ihrer Ionenstärke und ihrem pH-Wert unterscheiden. Dies ist für die Aufkonzentrierung des Probengemisches an der Trenngelfront essentiell. Acrylamid/Bis-Acrylamid dient als Quervernetzer und Porenbildner. Die eingesetzte Menge bestimmt daher die Porengröße des Gels und damit die Laufgeschwindigkeit der Proteine. In Abhängigkeit von der Molekülmasse des zu detektierenden Proteins wurde entweder mit 8%igen oder mit 12%igen Trenngelen gearbeitet. Durch das dem Gel zugesetzte Detergens SDS werden die Proteine denaturiert und mit einer Hülle negativ geladener SDS-Moleküle versehen. Dadurch wird die Eigenladung der linearisierten Proteine vernachlässigbar gering. Dies wiederum ermöglicht eine elektrophoretische Auftrennung in Abhängigkeit von der Molekülmasse.

(2) Probenvorbereitung

Jeweils 20 µg Protein der Proteinproben wurden mit dem Lysepuffer (RIPA) entsprechend verdünnt und daraufhin 1:1 mit dem Inkubationspuffer versetzt. Der Inkubationspuffer enthielt neben dem denaturierenden Detergens SDS auch das Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol, welches vor der Verwendung immer frisch hinzugefügt wurde und zu einer Spaltung der in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken führt. Die verdünnten Proteinproben wurden anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert. Das Zusammenspiel von SDS, Reduktionsmittel und Hitze ist essentiell für die vollständige Linearisierung der Proteine.

(3) SDS-PAGE

Die eigentliche SDS-PAGE wurde in der Gelelektrophorese-Kammer von Bio-Rad (*Hercules, CA*) durchgeführt. Dazu wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit dem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die denaturierten Proteinproben wurden in die Geltaschen aufgetragen und jede Geltasche dadurch mit

20 µg Protein befüllt. Als Größenmarker diente RotiMark TRICOLOR (ROTH, Karlsruhe). Das Anlegen einer elektrischen Spannung von 80 V an die Elektrophoresekammer setzte die Migration der negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode in Gang. Das in dem Inkubationspuffer enthaltene Bromphenolblau diente dabei als ein sichtbarer Frontmarker. Beim Erreichen der Trenngelfront nach etwa 20 min wurde die Spannung auf 120 V erhöht und das Gel eine weitere Stunde laufen gelassen.

Western Blot

Als *Western Blot* wird der Proteintransfer von dem Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran bezeichnet. Dazu wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, was eine Wanderung der Proteine in Richtung der Membran bewirkt (Elektrotransfer). In der vorliegenden Arbeit wurden Nitrozellulosemembranen für den „*semidry*“ Blot verwendet. Der Elektrotransfer fand in dem Fast Blotter Pierce G2 von *Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)* statt. Dieser wurde mit einem „*Sandwich*“, bestehend aus Filterpapier, der Nitrozellulosemembran und dem Gel, bestückt. Dabei wurde auf die Vermeidung von Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten geachtet. Für die Befeuchtung des „*Sandwichs*“ wurde ein spezieller Fast-semidry-Transferpuffer benötigt, dem vor der Verwendung EDTA (1 mM), Na-Bi (1,3 mM) und DMF (1,3 mM) frisch hinzugegeben werden mussten. In Abhängigkeit von der Molekülmasse des zu detektierenden Proteins schwankte die Zeit für den Blotvorgang zwischen 5 und 10 min. Zur direkten Kontrolle des Blotvorganges diente die Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceaurot. Das rötliche Hervortreten des Bandenmusters ermöglichte zudem eine Beschriftung der einzelnen Banden sowie das Zuschneiden der Membran.

Antikörperinkubation und Detektion

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper müssen die Antikörperbindungsstellen auf der Membran zunächst blockiert werden, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Als Blockpuffer diente eine in TBST-verdünnte 5%ige Milchlösung (LFM/TBST). Diese wurde mit dem Milchpulver frisch hergestellt und vor der Verwendung stets filtriert. Die Membran wurde im Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und die entsprechende Verdünnung des Primärantikörpers (Tab.8)

auf die Membran gegeben. Alle Primärantikörper sind vor der Verwendung getestet und die Verdünnung ist optimiert worden. Die Inkubation erfolgte bei 4°C auf dem Rüttler über Nacht.

Tab.8: Primärantikörper-Verdünnungen.

Primärantikörper	Verdünnung
DKK1	1:5.000 in 0,5% LFM/TBST
β-Aktin	1:1.000 in 0,5% LFM/TBST
Phospho-β-Catenin (Ser552)	1:1.000 in 1% BSA/TBST
β-Catenin	1:5.000 in 1% BSA/TBST
Phospho- GSK3β (Ser9)	1:1.000 in 1% BSA/TBST
GSK3β	1:5.000 in 1% BSA/TBST
LRP6	1:2.500 in 1% BSA/TBST
Phospho-Akt (Ser473)	1:1.000 in 1% BSA/TBST
Akt	1:1.000 in 1% BSA/TBST
Phospho-Erk 1/2 (Thr202/Tyr204)	1:1.000 in 1% BSA/TBST
Erk 1/2	1:1.000 in 1% BSA/TBST
p53	1:2.000 in 0,5% LFM/TBST
Bcl-xL	1:5.000 in 1% BSA/TBST
Caspase 3	1:1.000 in 1% BSA/TBST

Am folgenden Tag wurde zunächst die Antikörper-Verdünnung von der Membran entfernt. Die Membran wurde drei Mal für jeweils 10 min in TBST gewaschen und anschließend der entsprechende Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Als Sekundärantikörper wurden *Goat-anti-Rabbit*, *Goat-anti-Mouse* und *Goat-anti-Rat* Antikörper (*Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA*) verwendet. Diese sind mit einem Enzym, der Meerrettichperoxidase (*HRP*), gekoppelt, welches bei Hinzugabe der entsprechenden Substratlösung eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysieren kann und somit eine Detektion ermöglicht. Die *HRP*-konjugierten Sekundärantikörper wurden allesamt in einem Verhältnis von 1:7.500 in 0,5%iger LFM/TBST verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Rüttler. Es folgte wiederholt ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 10 min mit TBST, um unspezifisch bindende Antikörper zu entfernen. Als Substratlösung diente

das Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (EMD Millipore, Billerica, MA). Dieses wurde unter Vermeidung von Lichtexposition auf die Membran gegeben und das Chemilumineszenz-Signal in dem MicroChemi 4.2 Detektor (Biostep GmbH, Burkhardtsdorf) gemessen. Die Belichtungszeit variierte je nach Signalstärke. Sie wurde allerdings für jeden Antikörper konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Für Mehrfachdetektionen wurden die Membrane bis zu zwei Mal nach der ersten Detektion wiederverwendet und zuletzt stets das Referenzprotein β -Aktin detektiert. Das Strippen wurde nach Herstellerangaben mit dem Roti®-Free Stripping Buffer 2.0 (Roth, Karlsruhe) für 1h bei Raumtemperatur durchgeführt. Densitometrische Berechnungen erfolgten mit ImageJ 1.48v (National Institute of Health, NY) relativ zum Referenzprotein β -Aktin.

Isolation und Quantifikation von RNAs

Die totale RNA aus den Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Um im Rahmen der Qualitätskontrolle eine DNA-Kontamination auszuschließen, wurde von der isolierten RNA eine RT-PCR auf genomische DNA durchgeführt. Keine der isolierten RNA-Proben zeigte eine DNA-Kontamination. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte direkt vor der Reversen Transkription mit einem UV VIS Spektrophotometer, dem Nanodrop 1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen), bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Reverse Transkription

Für die Durchführung der qRT-PCR ist zunächst ein Umschreiben der RNA-Proben in cDNA nötig. Dabei wurde mit dem Revert Aid Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) gearbeitet und der Zyklus von Applied Biosystems (Waltham, MA) verwendet. Auch hier wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Alle cDNA-Proben wurden aus 1 μ g RNA hergestellt. Direkt nach der cDNA-Synthese erfolgte eine 1:5 Verdünnung der cDNA-Proben mit nukleasefreiem H₂O. Mit den verdünnten cDNA-Proben und einer cDNA-Kontrolle wurde zunächst eine RT-PCR mit dem β -Aktin Primer durchgeführt.

RT-PCR

Die *RT-PCR* wurde in dem Zykler von *Biometra GmbH (Göttingen)* mit dem *DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)* durchgeführt. Die Proben wurden je nach dem verwendeten Primer pipettiert (Tab.9) und die *RT-PCR* mit der entsprechenden Zyklenzahl gestartet (Tab.10). Um die Effektivität des *DKK1-Knockdowns* zu beurteilen wurde der *DKK1* Primer verwendet.

Alle für die *qRT-PCR* verwendeten Primer sind zunächst mittels konventioneller *RT-PCR* getestet worden.

Tab.9: Protokoll für die Herstellung der *RT-PCR*-Proben.

	β-Aktin Primer	DKK1 Primer
MasterMix	10 µl	10 µl
Primer <i>forward</i>	0,5 µl	0,5 µl
Primer <i>reverse</i>	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	8,5 µl	7 µl
RNA/ cDNA (1:5)	0,5 µl	2 µl

Tab.10: *RT-PCR*-Programm.

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale - Denaturierung	98°C	2 min	-
Denaturierung	94°C	10 sec	25 (DKK1 Primer)
Annealing	60°C	40 sec	40 (β-Aktin Primer)
Elongation	72°C	30 sec	
Finale - Elongation	72°C	5 min	-

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von den Nukleinsäure-Fragmenten der *RT-PCR*-Proben nach Molekulargewicht wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurde das Agarosepulver zunächst durch kurzes Aufkochen im TAE-Elektrophoresepuffer gelöst, mit dem *RNA/DNA*-bindenden Farbstoff Ethidiumbromid versetzt und anschließend in eine horizontale Gelkammer gegossen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit 1,5%igen Agarosegelen gearbeitet. Nach der Polymerisation wurden jeweils 10 µl der *RT-PCR*-Proben sowie 7 µl des *DNA*-Leiters in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde ca. 40 min bei einer Spannung von 100 V laufen gelassen und im Transilluminator G:Box mit der

Software GeneSnap 7.12 (*Syngene, Cambridge, UK*) detektiert. Die Belichtungszeit wurde je nach Signalintensität gewählt.

qRT-PCR

Um Veränderungen in der Genexpression nach dem *DKK1-Knockdown* quantifizieren zu können, wurde die *qRT-PCR* angewandt. Mittels *qRT-PCR* können, im Gegensatz zur konventionellen *RT-PCR*, aufgrund der hohen Sensitivität selbst kleinste Veränderungen im Expressionsmuster detektiert werden.

Die *cDNA*-Proben wurden zunächst mit dem entsprechendem Primer nach Protokoll pipettiert (Tab.11) und die Genexpressionsmessung anschließend mit dem RotorGene 3000 (*Qiagen Corbett Research, Hilden*) durchgeführt (Tab.12). Als *MasterMix* wurde fluoreszierendes SYBR® Green I (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*) verwendet. Die Interkalation des SYBR® Green I in doppelsträngige *DNA*s führt zu einem Fluoreszenzsignal, welches ab einem bestimmten Schwellenwert nach jedem Zyklus gemessen wird und sich proportional zu der Menge an zuvor eingesetzter *cDNA* verhält. Die *qRT-PCR* kann daher in Echtzeit („*Real Time*“) verfolgt werden.

Tab.11: Protokoll für die Herstellung der *qRT-PCR*-Proben.

MasterMix	10 µl
Primer <i>forward</i>	0,5 µl
Primer <i>reverse</i>	0,5 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	8 µl
<i>cDNA</i> (1:5)	1 µl

Tab.12: *qRT-PCR*-Programm.

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale - Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	40
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Hold	70°C	15 sec	
Schmelzkurve	70°C – 99°C (0,5°C/step)	5 sec/step	
Hold	30°C	1 min	

Die Stärke des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Zyklenzahl kann für jede Probe in einem Diagramm aufgezeichnet werden. Dieses wurde, wie auch die Standardkurve und die Schmelzkurve, von der RotorGene Analysis Software 6.1 (*Qiagen Corbett Research, Hilden*) automatisch bei jedem Lauf erstellt. Die Quantifizierung der erhaltenen Signale muss in der exponentiellen Phase der *qRT-PCR* erfolgen. Dazu wurde zunächst ein Fluoreszenz-Grenzwert ($C_t = \text{Cycle threshold}$) zu Beginn der exponentiellen Phase festgelegt. Dieser entsprach bei allen durchgeführten Analysen 10^{-2} RFU. Die C_t -Werte, welche wiederum der Zyklenzahl entsprechen, konnten dann für die einzelnen Proben abgelesen werden. Die Normierung der C_t -Werte erfolgte auf das Referenzgen *β -Aktin* und ermöglichte eine relative Quantifizierung der erhaltenen Daten. Die Berechnung erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Da bei der *qRT-PCR* aufgrund mangelnder Spezifität nicht zwischen verschiedenen *PCR*-Produkten unterschieden werden kann, erfolgte nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei werden die Amplifikate durch einen Temperaturgradienten (50–95 °C) aufgeschmolzen. Da jedes *DNA*-Fragment seinen spezifischen Schmelzpunkt besitzt, kann somit auf die Reinheit des *PCR*-Produktes geschlossen werden.

Alle Proben wurden in Duplikaten oder Triplikaten pipettiert. Es wurde immer eine Standardreihe, bestehend aus vier Standardverdünnungen, sowie eine negative Kontrolle ohne *cDNA* (*NTC = Non Template Control*) mitgeführt. Für die Herstellung der externen Standards wurden *RNAs* aus allen für diese Arbeit verwendeten Zellkulturlinien isoliert und eine Pool-*cDNA* aus jeweils 5 μg *RNA* geschrieben. Es wurden daraus folgende Standard-Verdünnungen hergestellt: 1:5, 1:50, 1:100, 1:500.

ELISA

Für die Bestimmung der *DKK1*-Konzentration im Zellkulturüberstand nach erfolgtem *DKK1-Knockdown* wurde das DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 sowie das dazugehörige Human Dkk-1 DuoSet ELISA von *R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN)* verwendet. Zellkulturüberstände wurden jeweils in einer 1:3 Verdünnung aufgetragen. Als Verdünnungsreagenz diente PBS mit 1% gelöstem BSA. Die Analyse der *DKK1*-Serumkonzentrationen von *EAC*-Patienten, Barrett-Metaplasie-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde hingegen mit dem Human Dkk-1 Quantikine ELISA Kit (*R&D Systems Inc., Minneapolis, MN*) durchgeführt, welches für Blutserum validiert ist. Alle Blutserumproben wurden in einer 1:8 Verdünnung aufgetragen.

Die ELISAs erfolgten nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers. Die Absorption wurde bei 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 450 nm mit dem Spektramax M5 (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA*) gemessen. Die Darstellung der DKK1-Serumkonzentrationen erfolgte in *Box-Plot*-Diagrammen nach der Tukey-Methode (Tukey, 1977).

Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Alle Graphen und Statistiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software Inc., La Jolla, CA*) erstellt. Die erhobenen Daten wurden zunächst mit dem *D'Agostino-Pearson-Test* auf Normalverteilung getestet. Bei einer Stichprobenzahl $n < 8$ wurde der *Kolmogorow-Smirnow-Test* zur Normalitätstestung verwendet. Im Falle einer Normalverteilung wurde für den Vergleich zweier voneinander unabhängigen Gruppen der t-Test für unabhängige Stichproben (ungepaarter t-Test) und für den Vergleich von drei oder mehr voneinander unabhängigen Gruppen der *One-Way-Anova* (Post-hoc-Test: *Bonferroni's Multiple Comparison Test*) angewandt. Waren die erhobenen Daten nicht normalverteilt, erfolgte die Ermittlung des Signifikanzniveaus bei dem Vergleich zweier voneinander unabhängigen Gruppen mit dem *Mann-Whitney-U-Test* und bei dem Vergleich von drei oder mehr voneinander unabhängigen Gruppen mit dem *Kruskal-Wallis-Test* (Post-hoc-Test: *Dunn's Multiple Comparison Test*). Bei normalverteilten abhängigen Stichproben, wie es beim Vergleich der prä- und postoperativen DKK1-Serumkonzentrationen der EAC-Patienten der Fall war, wurde die statistische Testung mit dem t-Test für abhängige Stichproben (gepaarter t-Test) durchgeführt. Bei der Auswertung der *MTT-Assays*, der *Wound-Healing-Assays* und der Experimente mit *rhWnt3a*-Behandlung musste aufgrund der verschiedenen Messzeitpunkte bzw. der *rhWnt3a*-Behandlung eine dritte Variable in der Statistik berücksichtigt werden. In den genannten Fällen wurde daher als Testverfahren der *Two-Way-Anova* (Post-hoc-Test: *Bonferroni's Multiple Comparison Test*) angewandt. Alle ermittelten Werte wurden als Mittelwert mit dazugehörigem Standardfehler (*Standard Error of the Mean - SEM*) abgebildet.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der DKK1-Serumkonzentrationen von EAC-Patienten

Um die Anwendung von *DKK1* als einen serologischen Biomarker zu untersuchen, wurden Patienten mit ösophagealem Adenokarzinom (*EAC*-Patienten, n=18) und histologisch gesicherter Barrett-Metaplasie (*BE*-Patienten, n=18) sowie gesunde Kontrollpersonen (Kontrollen, n=17) rekrutiert und die *DKK1*-Serumkonzentrationen mittels *ELISA* bestimmt. Bei den *EAC*-Patienten wurde jeweils die erstmalig bestimmte *DKK1*-Serumkonzentration vor der operativen Tumorresektion für die Auswertung verwendet. Die *DKK1*-Serumkonzentrationen der gesunden Kontrollpersonen, *BE*-Patienten und *EAC*-Patienten unterscheiden sich nicht voneinander (Abb.4). Dennoch ist erkennbar, dass die *EAC*-Patienten mit einem Wert von 4,925 ng/ml im Vergleich zu den Kontrollen ein deutlich höheres Maximum der *DKK1*-Serumkonzentrationen besitzen. Einer der untersuchten *BE*-Patienten weist mit einer mit einer *DKK1*-Serumkonzentration von 4,971 ng/ml jedoch den höchsten in der Kohorte gemessenen Wert auf, der noch über dem Maximum aller untersuchten *EAC*-Patienten liegt.

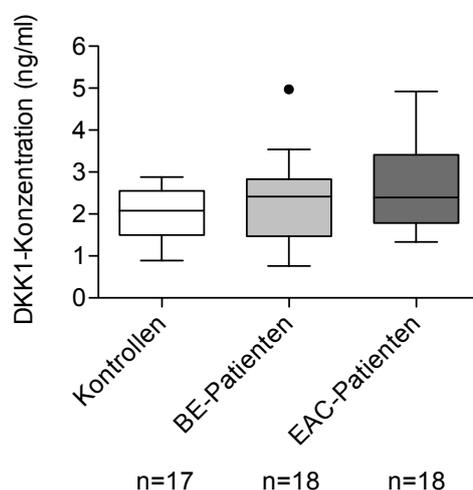
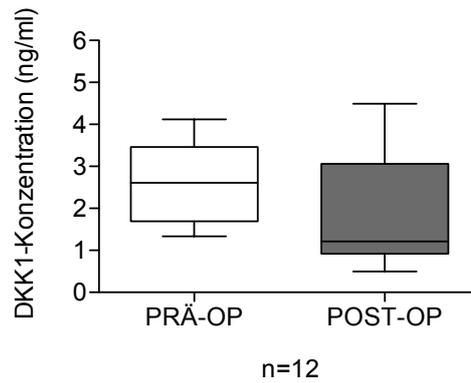


Abb.4: *DKK1*-Serumkonzentrationen (ng/ml) bei gesunden Kontrollpersonen, Barrett-Metaplasie-Patienten und Adenokarzinom-Patienten mittels *ELISA*. Die *ELISAs* zur Bestimmung der *DKK1*-Konzentrationen im Blutserum von gesunden Kontrollpersonen (Kontrollen, n=17), Barrett-Metaplasie-Patienten (*BE*-Patienten, n=18) und Adenokarzinom-Patienten (*EAC*-Patienten, n=18) wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt ist für jede Personengruppe jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum nach der Tukey-Methode. Die statistische Testung erfolgte mit dem *One-Way-Anova* ($p=0,162$).

Um eine Beeinflussung der *DKK1*-Serumkonzentrationen der *EAC*-Patienten durch die Ösophagusresektion beurteilen zu können, wurden die aus prä- und postoperativen Blutentnahmen ermittelten *DKK1*-Serumkonzentrationen miteinander verglichen. Von den 14 *EAC*-Patienten, welche eine Ösophagusresektion erhalten haben, konnte lediglich bei 12 *EAC*-Patienten neben der präoperativen Blutentnahme auch eine postoperative Blutentnahme durchgeführt werden ($n=12$). Die postoperativen *DKK1*-Konzentrationen im Blutserum der *EAC*-Patienten sind im Vergleich zum präoperativ-ermittelten Wert nicht signifikant verändert (Abb.5A). Eine Tendenz hin zu niedrigeren *DKK1*-Serumkonzentrationen nach der chirurgischen Tumorsektion ist allerdings erkennbar ($p=0,1$). Während der Median der präoperativ-ermittelten *DKK1*-Serumkonzentrationen bei einem Wert von 2,608 ng/ml liegt, beträgt er postoperativ nur noch 1,212 ng/ml. Lediglich bei zwei *EAC*-Patienten sind die postoperativen *DKK1*-Serumkonzentrationen im Vergleich zum präoperativ-ermittelten Wert angestiegen (Abb.5B). Bei Patient 1 beträgt die relative Zunahme der postoperativen *DKK1*-Serumkonzentration 146,6%. Bei Patient 2 beträgt sie 115,8%. Bei beiden *EAC*-Patienten haben sich die *DKK1*-Serumkonzentrationen postoperativ daher mehr als verdoppelt. Bei den restlichen 10 Patienten sind die postoperativen *DKK1*-Serumkonzentrationen im Vergleich zum präoperativ-ermittelten Wert allerdings gesunken. Bei Patient 12 ist die postoperative Abnahme maximal und beträgt 87,4%.

Das nach der Ösophagektomie aus dem Resektat ermittelte histopathologische Tumorstadium ($(y)pTNM$) und das bei allen rekrutierten *EAC*-Patienten prätherapeutisch aus der Biopsie bestimmte *Grading* (*G*) wurden für die weitere Subgruppen-Analyse herangezogen. Die *TNM*-Klassifikation für ösophageale Karzinome beschreibt verschiedene Schweregrade je nach Ausdehnung des Primärtumors (*T*), Ausmaß des regionären Lymphknotenbefalls (*N*) und Vorhandensein von Fernmetastasierungen (*M*). Bei dem histopathologischen *Grading* werden unterschiedliche Differenzierungsgrade bzw. *G*-Stadien voneinander abgegrenzt: *G1* steht für gut differenziertes malignes Gewebe, *G2* repräsentiert ein mäßiges und *G3* ein schlechtes Differenzierungsmuster. Die *EAC*-Patienten weisen keine Unterschiede in ihren *DKK1*-Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors, dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls und dem Differenzierungsgrad der ösophagealen Karzinomzellen auf (Abb.6A-C).

A



B

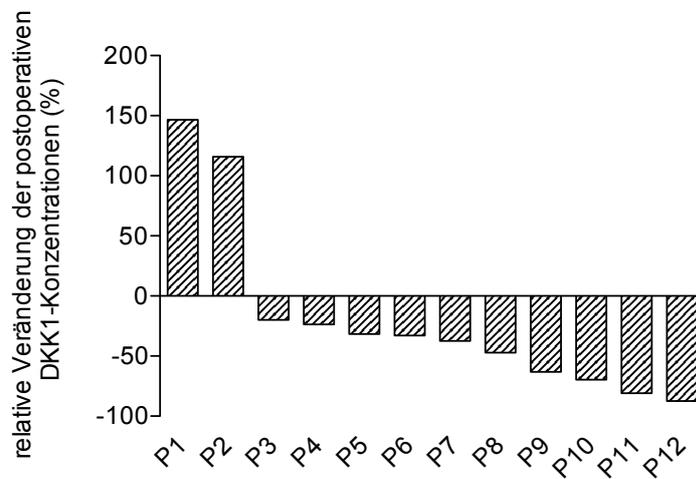


Abb.5: DKK1-Serumkonzentrationen (ng/ml) bei Adenokarzinom-Patienten vor und nach der chirurgischen Tumorresektion mittels *ELISA*. A: Vergleich der präoperativen (PRÄ-OP) und postoperativen (POST-OP) *DKK1*-Serumkonzentrationen bei Adenokarzinom-Patienten (n=12). Die Bestimmung der *DKK1*-Konzentrationen wurde mittels *ELISA* in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt ist für jede Personengruppe jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum nach der Tukey-Methode. Die statistische Testung erfolgte mit dem abhängigen t-Test ($p=0,1$). B: Dargestellt ist die relative Veränderung der postoperativen *DKK1*-Serumkonzentrationen im Vergleich zum präoperativ-ermittelten Wert in % bei Patient 1 (P1) bis Patient 12 (P12). Die relativen Werte sind in absteigender Reihenfolge sortiert.

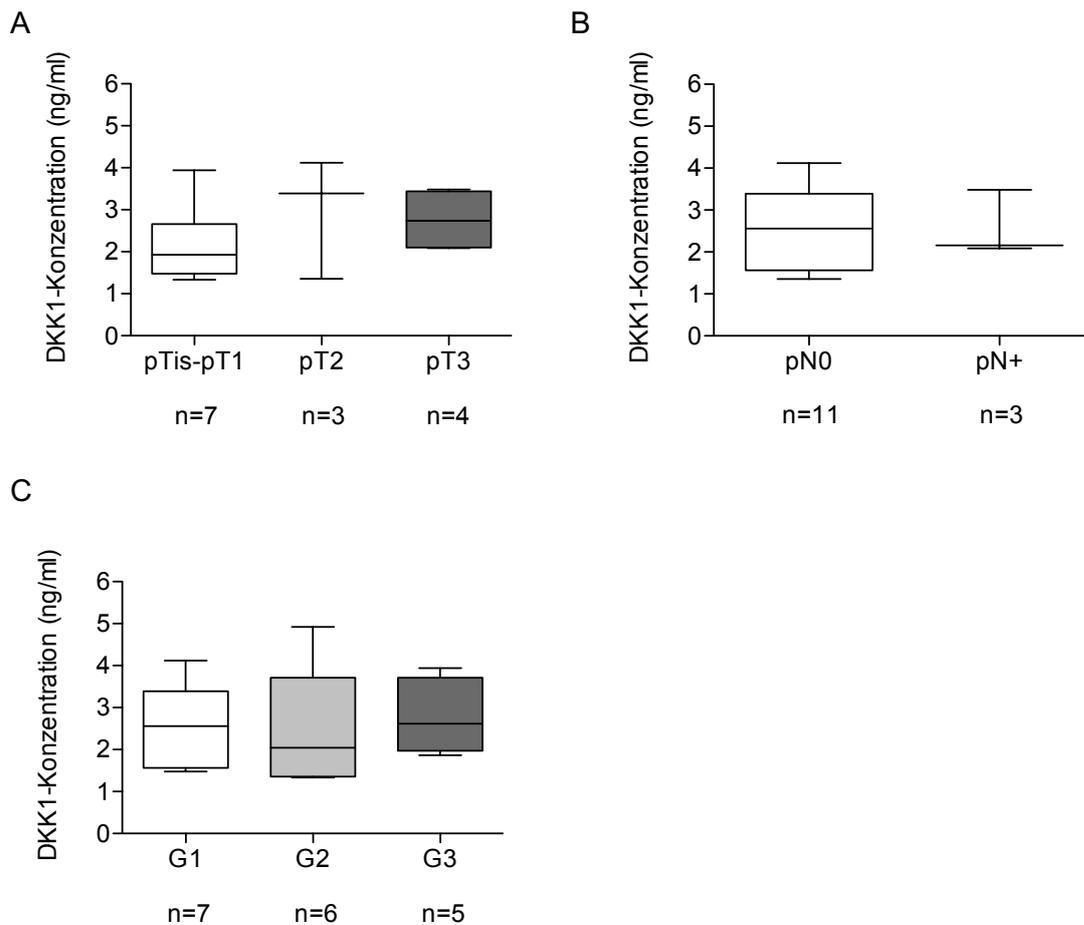
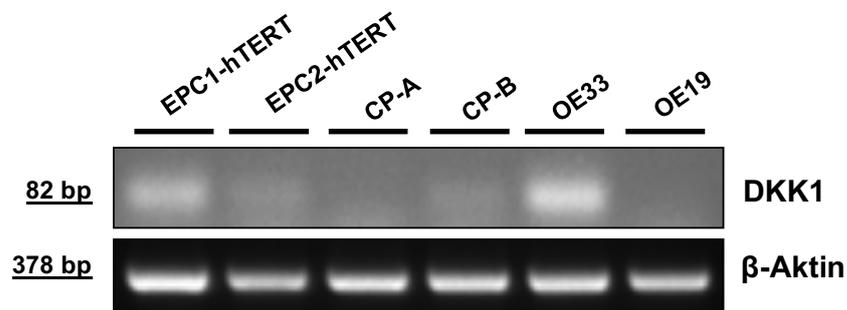


Abb.6.: DKK1-Serumkonzentrationen (ng/ml) bei Adenokarzinom-Patienten in Abhängigkeit von dem histopathologischen Tumorstadium (TNM-Klassifikation) und dem Differenzierungsgrad der Karzinomzellen (Grading) mittels ELISA. A: Darstellung der präoperativ-ermittelten DKK1-Serumkonzentrationen bei Adenokarzinom-Patienten (n=14) in Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors (pTis-pT1/pT2/pT3). Die Bestimmung der DKK1-Konzentrationen wurde mittels ELISA in Duplikaten durchgeführt. Die statistische Testung erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis-Test*. B: Darstellung der präoperativ-ermittelten DKK1-Serumkonzentrationen bei Adenokarzinom-Patienten (n=14) in Abhängigkeit von dem Ausmaß des regionären Lymphknotenbefalls (pN0/pN+). Die Bestimmung der DKK1-Konzentrationen wurde mittels ELISA in Duplikaten durchgeführt. Die statistische Testung erfolgte mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. C: Darstellung der präoperativ-ermittelten DKK1-Serumkonzentrationen bei Adenokarzinom-Patienten (n=18) in Abhängigkeit von dem Differenzierungsgrad der ösophagealen Karzinomzellen (G1/G2/G3). Die Bestimmung der DKK1-Konzentrationen wurde mittels ELISA in Duplikaten durchgeführt. Die statistische Testung erfolgte mit dem *Kruskal-Wallis-Test*. Dargestellt ist für jede Personengruppe jeweils das Minimum, das untere Quartil, der Median, das obere Quartil und das Maximum nach der Tukey-Methode.

3.2. DKK1-Expression in den ösophagealen Zelllinien

Die humanen ösophagealen Zelllinien *EPC1-hTERT*, *EPC2-hTERT*, *CP-A*, *CP-B*, *OE33* und *OE19* repräsentieren das ösophageale Plattenepithel und unterschiedliche Stadien vor und während der neoplastischen Progression. Damit bieten sie ein geeignetes *in vitro* Modell, um die Expression und Sekretion von *DKK1* auf dem Weg vom ösophagealen Plattenepithel über die Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz mittels *RT-PCR*, *qRT-PCR* und *Western Blot* zu untersuchen. Die *DKK1*-Genexpression in den ösophagealen Plattenepithelzelllinien *EPC1-hTERT* und *EPC2-hTERT* sowie in den metaplastischen Zelllinien *CP-A* und *CP-B* liegt auf einem niedrigen Expressionsniveau (Abb.7). Untereinander bestehen keine signifikanten Unterschiede. Es wird dennoch ersichtlich, dass *EPC1-hTERT* eine tendenziell höhere *DKK1*-Genexpression als *EPC2-hTERT*, *CP-A* und *CP-B* aufweist. Die *DKK1*-Genexpression in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* ist hingegen stark heraufreguliert: Im Vergleich zur Zelllinie *EPC1-hTERT*, deren Mittelwert der relativen *DKK1*-Genexpression bei 0,76 liegt, erreicht die relative *DKK1*-Genexpression in *OE33* mit einem Mittelwert von 1,92 ca. 2,5fach höhere Werte. Die ösophageale Adenokarzinomzelllinie *OE19* zeigt allerdings keine erhöhte *DKK1*-Genexpression. Die mit der Analyse der Genexpression erhaltenen Ergebnisse konnten mittels *Western Blot* auf Proteinexpressionsebene bestätigt werden (Abb.8). Die *DKK1*-Proteinexpression nimmt in der Zelllinien-Sequenz *CP-A* – *CP-B* – *OE33* zu.

A



B

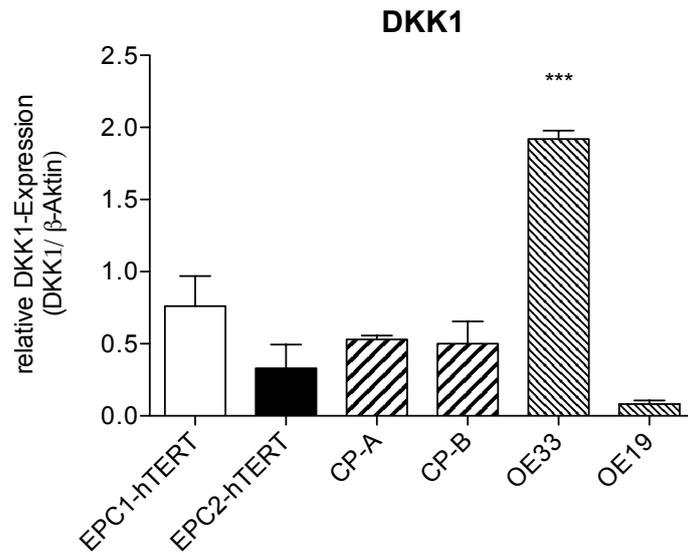


Abb.7: DKK1-Genexpression in den ösophagealen Zelllinien *EPC1-hTERT*, *EPC2-hTERT*, *CP-A*, *CP-B*, *OE33* und *OE19* mittels RT-PCR und qRT-PCR. A: *DKK1*-Genexpression mittels RT-PCR. Die RT-PCR-Proben wurden zur elektrophoretischen Auftrennung auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und die *DKK1*-Genexpression detektiert. B: *DKK1*-Genexpression mittels qRT-PCR. Die Bestimmung wurde in Duplikaten durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden mit der β -Aktin-Genexpression normalisiert. Die Berechnung mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode erfolgte relativ zur *DKK1*-Genexpression der *EPC1-hTERT*-Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Proben (N=3, n=6, One-Way-Anova, ***=p<0,0001).

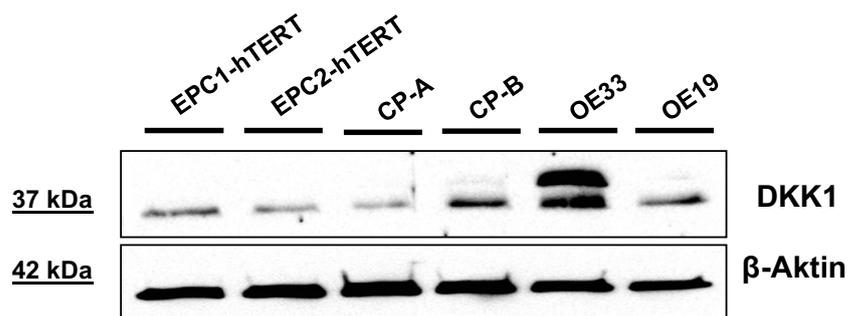


Abb.8: DKK1-Proteinexpression in den ösophagealen Zelllinien *EPC1-hTERT*, *EPC2-hTERT*, *CP-A*, *CP-B*, *OE33* und *OE19* mittels Western Blot. Der Western Blot wurde mit den Proteinproben von unbehandelten *EPC1-hTERT*-, *EPC2-hTERT*-, *CP-A*-, *CP-B*-, *OE33*- und *OE19*-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 μ g Proteinprobe aufgetragen und die *DKK1*-Proteinexpression detektiert (N=1).

Auffällig ist der Unterschied der *DKK1*-Expression in den beiden ösophagealen Adenokarzinomzelllinien *OE33* und *OE19*. Die *OE19*-Zellen zeigen in der *Western Blot* Analyse eine um etwa 90% geringere *DKK1*-Expression als die *OE33*-Zellen, obwohl diese ein höheres Tumorstadium vertreten (Abb.9). Aufgrund der hohen *DKK1*-Expression in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* eignet sich diese Zelllinie besonders gut, um die Funktion von *DKK1* im ösophagealen Adenokarzinom zu untersuchen. Die nachfolgenden *Knockdown*-Experimente mittels *DKK1*-spezifischer *siRNAs* wurden daher ausschließlich mit den *OE33*-Zellen durchgeführt.

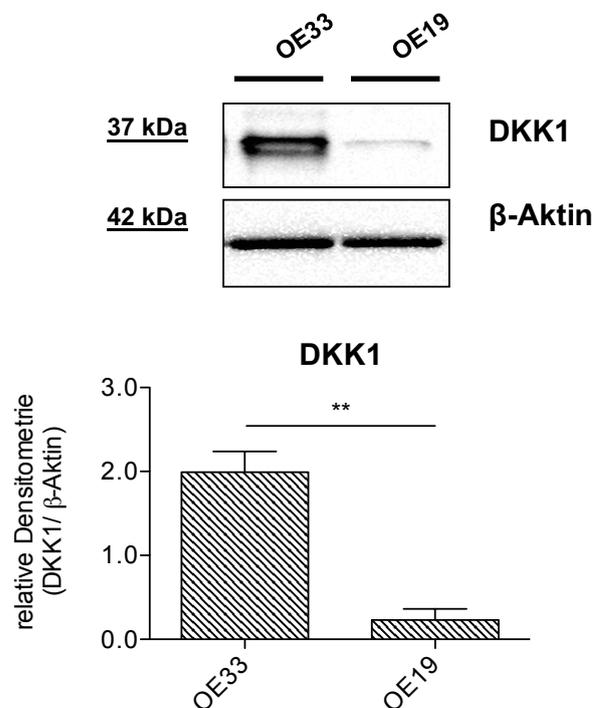


Abb.9: Vergleich der *DKK1*-Proteinexpression in den ösophagealen Adenokarzinomzelllinien *OE33* und *OE19* mittels *Western Blot*. Die *Western Blots* wurden mit den Proteinproben von unbehandelten *OE33*-Zellen und unbehandelten *OE19*-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 µg Proteinprobe aufgetragen und die *DKK1*-Proteinexpression detektiert. Die densitometrische Berechnung erfolgte mit ImageJ 1.48v relativ zu *β-Aktin*. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 4 (*OE33*) und 3 (*OE19*) voneinander unabhängigen Proben ($N_{OE33}=4 / N_{OE19}=3$, unabhängiger t-Test, $**=p<0,01$).

3.3. Funktion von DKK1 in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie OE33

Um die Funktion von *DKK1* in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* zu untersuchen, wurde auf zwei Ebenen gearbeitet: Zunächst wurden die *OE33*-Zellen mit rekombinantem humanem *DKK1* behandelt, um den Einfluss von exogenem *DKK1* auf den *Wnt/β-Catenin* Signalweg und die Zellviabilität zu untersuchen. Über einen zweiten Ansatz wurde der Effekt der Herunterregulation der endogenen *DKK1*-Expression mittels *DKK1-Knockdown* durch spezifische *siRNAs* auf die Zellviabilität, Proliferation, Motilität und Invasion der *OE33*-Zellen analysiert.

3.3.1. Behandlung der OE33-Zellen mit rekombinantem humanem DKK1

3.3.1.1. Einfluss von rhDKK1 auf den Wnt/β-Catenin Signalweg

DKK1 agiert auf dem Stadium der Barrett-Metaplasie als ein Inhibitor des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs (Lyros *et al.*, 2015). Ein Verlust dieser inhibitorischen Funktion könnte, wie bereits einleitend erwähnt, zur Karzinogenese des ösophagealen Adenokarzinoms beitragen. Da das *DKK1*-Gen selbst ein Zielgen des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs ist (Niida *et al.*, 2004; Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005), kann anhand der endogenen *DKK1*-Expression auf die Aktivität des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs geschlossen werden. Bei intaktem negativen Rückkopplungs-Mechanismus müsste daher die Behandlung der *OE33*-Zellen mit dem *Wnt*-Inhibitor *DKK1* zu einer verminderten Aktivität im *Wnt/β-Catenin* Signalweg und damit in Folge zu einer verminderten endogenen *DKK1*-Expression führen. Die Behandlung mit *rhDKK1* erfolgte in den Konzentrationen 250 ng/ml und 500 ng/ml für einen Zeitraum von 24h. Die *DKK1*-Proteinexpression der *OE33*-Zellen verändert sich nach der Behandlung mit *rhDKK1* im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nicht (Abb.10).

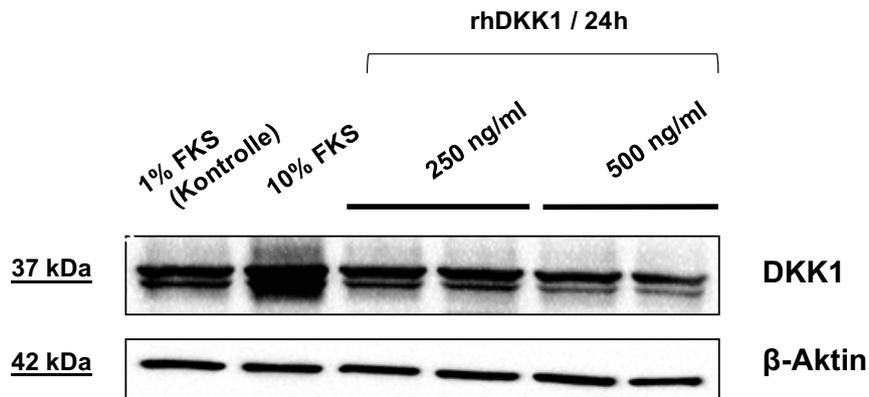


Abb.10: DKK1-Proteinexpression der OE33-Zellen nach Behandlung mit *rhDKK1* mittels *Western Blot*. Die Behandlung mit *rhDKK1* erfolgte in den Konzentrationen 250 ng/ml und 500 ng/ml über einen Zeitraum von 24h. Der *Western Blot* wurde mit den Proteinproben von unbehandelten OE33-Zellen in 1%igem FKS-Medium (Kontrolle), von unbehandelten OE33-Zellen in 10%igem FKS-Medium, von mit 250 ng/ml *rhDKK1* behandelten OE33-Zellen und mit 500 ng/ml *rhDKK1* behandelten OE33-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 µg Proteinprobe aufgetragen und die *DKK1*-Proteinexpression detektiert (N=1).

3.3.1.2. Einfluss von *rhDKK1* auf die Zellviabilität

In der vorliegenden Arbeit diente der *MTT*-Assay als ein Maß für die Beurteilung der Viabilität der OE33-Zellen. Die Behandlung mit *rhDKK1* erfolgte dazu ebenfalls in den Konzentrationen 250 ng/ml und 500 ng/ml. Die *MTT*-Assays wurden jeweils 24h, 48h und 72h nach der Behandlung mit *rhDDK1* durchgeführt. Die Viabilität der mit *rhDKK1*-behandelten OE33-Zellen unterscheidet sich in dem Zeitraum des Experiments nicht von der Viabilität der unbehandelten Kontrollzellen (Abb.11).

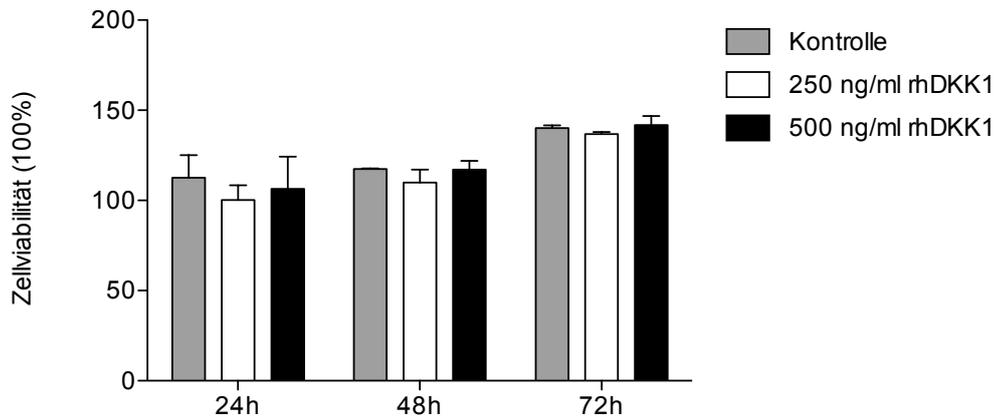


Abb.11: Viabilität der OE33-Zellen nach Behandlung mit rhDKK1 mittels MTT-Assay. Die Behandlung mit rhDKK1 erfolgte in den Konzentrationen 250 ng/ml und 500 ng/ml. Der Zeitpunkt der Behandlung wurde auf 0h gesetzt. Die Zeitpunkte für die MTT-Assays waren 24h, 48h und 72h. Die Bestimmung wurde in sechsfachen Replikaten durchgeführt. Die Berechnung erfolgte relativ zu den Werten der unbehandelten Kontrollzellen im ersten Experiment zum Zeitpunkt 24h, welche auf 100% gesetzt worden sind. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 2 voneinander unabhängigen Experimenten (N=2, n=N*6, Two-Way-Anova).

3.3.2. DKK1-Knockdown

3.3.2.1. Protokolletablierung

Aufgrund der hohen *DKK1*-Expression der OE33-Zellen bietet die Herunterregulation der endogenen *DKK1*-Expression mittels *siRNA*-vermitteltem *Knockdown* eine gute Möglichkeit, um die Funktion von *DKK1* durch Genausschaltung zu untersuchen. Das Protokoll für den *siRNA-Knockdown* musste zu Beginn optimiert und der ideale Zeitpunkt für die Proteinisolierung bestimmt werden. Die Effektivität des *DKK1-Knockdowns* wurde zunächst mittels *Western Blot* überprüft. Als negative Kontrolle dienten OE33-Zellen, welche ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelt worden sind. Als direkte Kontrolle für den *DKK1-Knockdown* dienten jedoch die mit den *Non Targeting siRNAs* (*NT-siRNAs*) behandelten OE33-Zellen. Die *NT-siRNAs* binden im Gegensatz zu den *DKK1-siRNAs* an keine *mRNA*-Sequenzen.

Der *DKK1-Knockdown* wurde als Einfachtransfektion mit Proteinisolation nach 72h und 96h durchgeführt (Abb.12). Die *DKK1*-Proteinexpression der *DKK1-Knockdown* Zellen ist im Vergleich zu den mit den *NT-siRNAs* behandelten *OE33*-Zellen nach 96h stärker reduziert als nach 72h. Die Signifikanz des Unterschiedes in der *DKK1*-Expression nach 96h konnte mittels *RT-PCR*, *qRT-PCR*, *Western Blot* und *ELISA* demonstriert werden (Abb.13A-D).

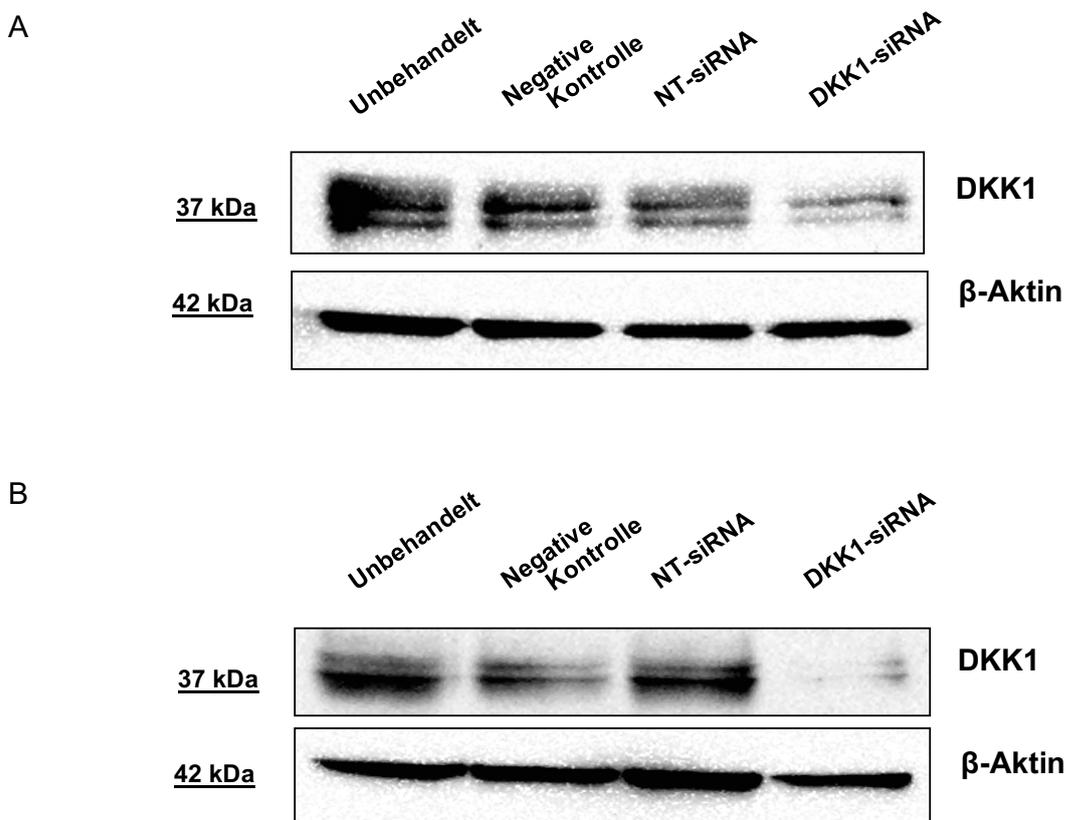
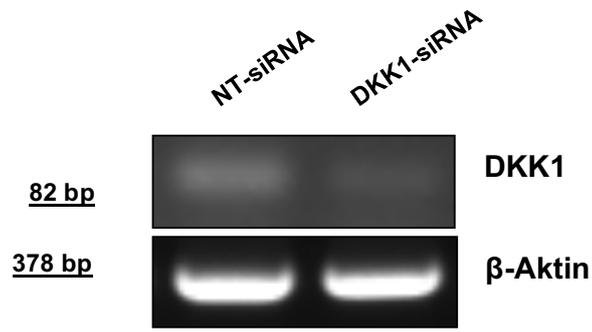


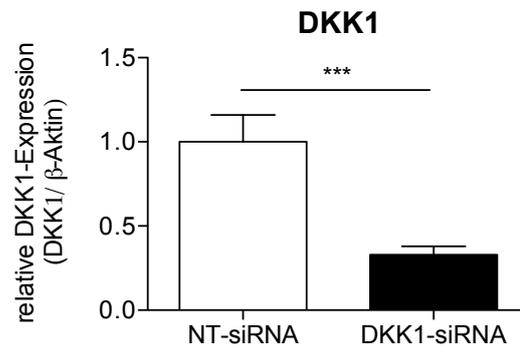
Abb.12: *DKK1*-Proteinexpression der *OE33*-Zellen nach *DKK1-Knockdown* mittels *Western Blot*.

A: Einfachtransfektion mit Proteinisolation nach 72h (N=1). B: Einfachtransfektion mit Proteinisolation nach 96h (N=1). Die beiden *Western Blots* wurden mit den Proteinproben von unbehandelten *OE33*-Zellen, von negativen Kontrollzellen (=ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelte *OE33*-Zellen), von mit *NT-siRNAs* behandelten *OE33*-Zellen und mit *DKK1-siRNAs* behandelten *OE33*-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 µg Proteinprobe aufgetragen die *DKK1*-Proteinexpression detektiert.

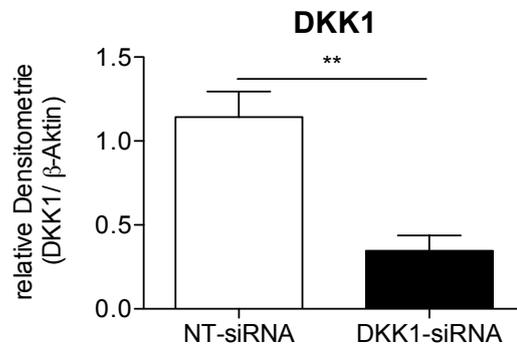
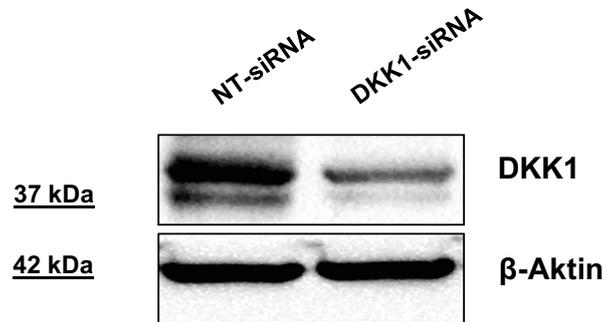
A



B



C



D

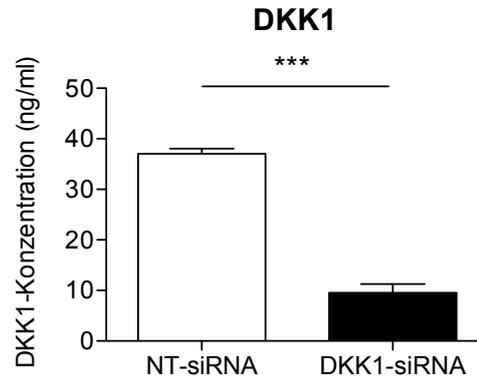


Abb.13: Effektivität des *DKK1*-Knockdowns bei den *OE33*-Zellen mittels *RT-PCR*, *qRT-PCR*, *Western Blot* und *ELISA*. Darstellung der *DKK1*-Expression in Abhängigkeit von der Behandlung (*NT-siRNA* / *DKK1-siRNA*). Die Isolation von Proteinen und *RNAs* erfolgte 96h nach der Einfachtransfektion. A: *DKK1*-Genexpression mittels *RT-PCR*. Die *RT-PCR*-Proben wurden zur elektrophoretischen Auftrennung auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und die *DKK1*-Genexpression detektiert (N=1). B: *DKK1*-Genexpression mittels *qRT-PCR*. Die Bestimmung wurde je nach Lauf in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden mit der β -*Aktin*-Genexpression normalisiert. Die Berechnung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfolgte relativ zur jeweiligen *NT-siRNA*-Kontrolle, welche auf 1 gesetzt worden ist. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem *SEM* aus jeweils 5 voneinander unabhängigen Experimenten (N=5, n=12, unabhängiger t-Test, ***=p<0,0001). C: *DKK1*-Proteinexpression mittels *Western Blot*. Für die SDS-PAGE wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 μ g Proteinprobe aufgetragen und die *DKK1*-Proteinexpression detektiert. Die densitometrische Berechnung erfolgte mit ImageJ 1.48v relativ zu β -*Aktin*. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem *SEM* aus jeweils 5 voneinander unabhängigen Experimenten (N=5, unabhängiger t-Test, **=p<0,01). D: *DKK1*-Konzentrationen (ng/ml) im Zellkulturmedium mittels *ELISA*. Die Bestimmung wurde in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem *SEM* aus jeweils 5 voneinander unabhängigen Experimenten (N=5, n=10, unabhängiger t-Test, ***=p<0,0001).

Nach der Transfektion waren keine der Behandlung geschuldeten zytotoxischen Effekte durch das Transfektionsreagenz oder die *siRNAs* ersichtlich. Ebenso gab es keine Veränderungen in der Zellmorphologie zwischen den mit den *DKK1-siRNAs* transfizierten *OE33*-Zellen und den Kontrollzellen. Dies wurde mit Fotografien zum Zeitpunkt 96h nach der *siRNA*-Transfektion dokumentiert (Abb.14).

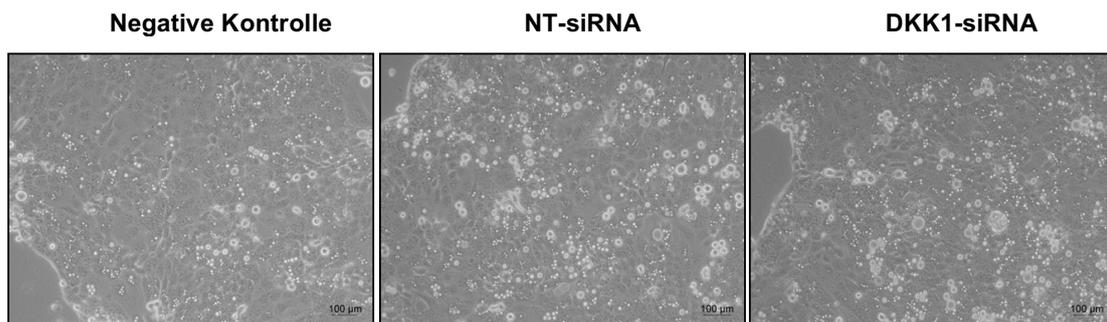


Abb.14: Fotografie der *OE33*-Zellen nach *DKK1-Knockdown*. Die Fotografien wurden zum Zeitpunkt 96h nach der *siRNA*-Transfektion angefertigt. (100fache Vergrößerung)

3.3.2.2. Einfluss des *DKK1*-Knockdowns auf die Viabilität der *OE33*-Zellen

Um die Zellviabilität nach dem *DKK1-Knockdown* beurteilen zu können, wurden *MTT*-Assays angewandt. Indirekt kann auf die Zellproliferation geschlossen werden. Um die *MTT*-Assays über einen Zeitraum von 144h nach der Transfektion durchführen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass die *DKK1*-Proteinexpression in diesem Zeitraum niedrig bleibt. Daher wurde im Vorfeld eine *siRNA*-Transfektion mit Proteinisolation nach 96h und 144h durchgeführt. Die *DKK1*-Proteinexpression ist auch nach 144h vergleichbar der nach 96h herunterreguliert (Abb.15A).

Die mit den *DKK1-siRNAs* transfizierten *OE33*-Zellen weisen im Vergleich zu den mit den *NT-siRNAs* transfizierten Kontrollzellen eine signifikant herabgesetzte Zellviabilität auf (Abb.15B). In dem Zeitintervall 96h bis 120h nach der Transfektion verändert sich die Zellviabilität der *DKK1-Knockdown*-Zellen nur minimal, während die der *NT-siRNA*-Kontrollzellen um mehr als 100% zunimmt. Zu dem Zeitpunkt 120h nach der Transfektion tritt der Unterschied in der Zellviabilität deutlich hervor (*= $p < 0,05$) und ist nach 144h stark ausgeprägt (**= $p < 0,01$).

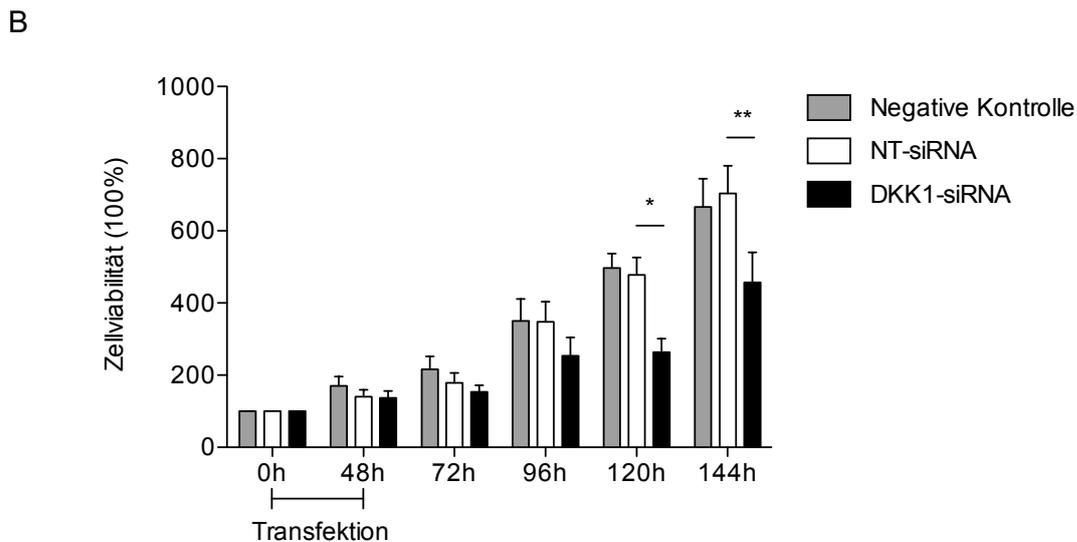
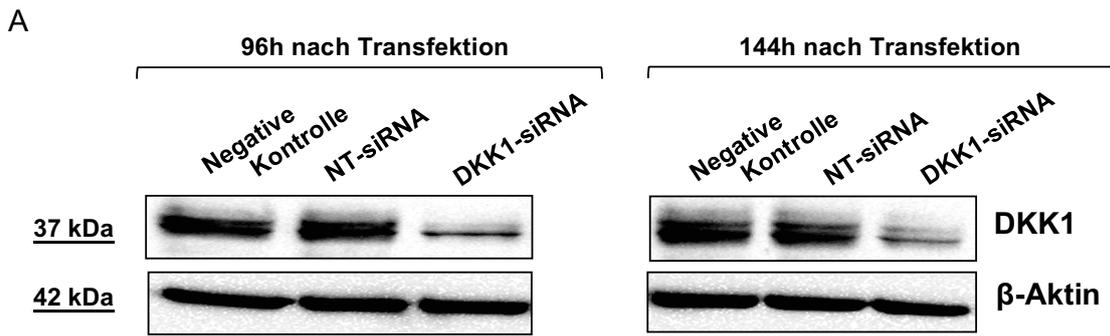


Abb.15: Viabilität der OE33-Zellen nach DKK1-Knockdown mittels MTT-Assay. A: DKK1-Proteinexpression nach DKK1-Knockdown mittels Western Blot. Die Proteinisolierung erfolgte 96h und 144h nach der Transfektion. Die beiden Western Blots wurden mit den Proteinproben von negativen Kontrollzellen (=ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelte OE33-Zellen), von mit NT-siRNAs behandelten OE33-Zellen und mit DKK1-siRNAs behandelten OE33-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 μ g Proteinprobe aufgetragen und die DKK1-Proteinexpression detektiert (N=1). B: Zellviabilität nach DKK1-Knockdown mittels MTT-Assay. Der Zeitpunkt der Transfektion wurde auf 0h gesetzt. Die Zeitpunkte für die MTT-Assays waren entweder 0h, 48h, 72h, 96h (Exp.1) oder 96h, 120h, 144h (Exp.2). Die Bestimmung wurde in sechsfachen Replikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 3 (Exp.1) und 4 (Exp.2) voneinander unabhängigen Experimenten ($N_{0h,48h,72h,96h}=3$ / $N_{96h,120h,144h}=4$, $n=N*6$, Two-Way-Anova, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$).

3.3.2.3. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf die Proliferation der OE33-Zellen

Eine herabgesetzte Viabilität der *OE33*-Zellen nach *DKK1-Knockdown* kann ganz unterschiedliche Ursachen haben. Dabei ist wichtig zwischen Veränderungen in der Apoptoseregulation und proliferationshemmenden Einflüssen zu differenzieren. Um einen direkten Effekt des *DKK1-Knockdowns* auf die Zellproliferation aufzudecken, wurde der ³H-Thymidine-Incorporation-Assay durchgeführt.

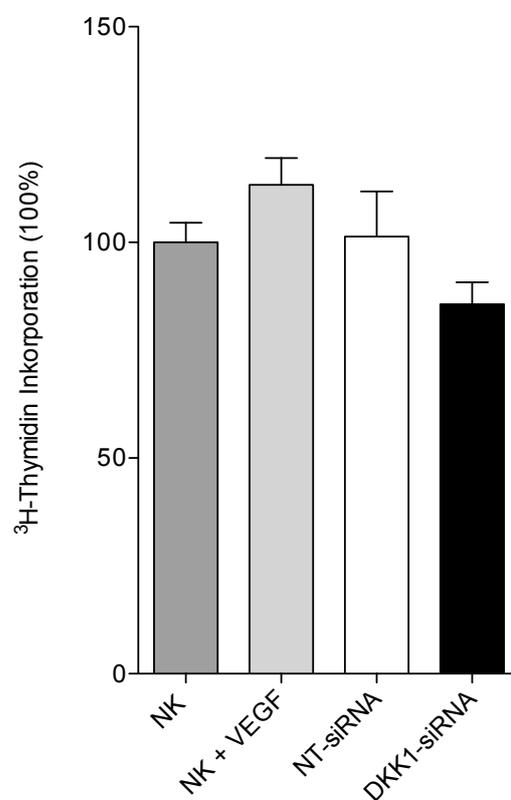


Abb.16: Proliferationsrate der *OE33*-Zellen nach *DKK1-Knockdown* mittels ³H-Thymidine-Incorporation-Assay. Der ³H-Thymidine-Incorporation-Assay wurde mit negativen Kontrollzellen (NK=ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelte *OE33*-Zellen), mit negativen Kontrollzellen nach *rhVEGF*-Behandlung (NK + VEGF=Positivkontrolle), mit *NT-siRNAs* behandelten *OE33*-Zellen und mit *DKK1-siRNAs* behandelten *OE33*-Zellen durchgeführt. Die ³H-Thymidin Inkorporation (100%) entspricht der Proliferationsrate der *OE33*-Zellen. Für die Auswertung wurden die Messergebnisse der Negativen Kontrolle (NK) auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM (N=1, n_{NK,NK+VEGF}=4 / n_{NT-siRNA}=3 / n_{DKK1-siRNA}=5, *Kruskal-Wallis-Test*, *=*p*<0,05).

Für den ^3H -Thymidine-Incorporation-Assay wurden die OE33-Zellen mit radioaktivem ^3H -Thymidin behandelt, welches im Rahmen der Zellteilung in die DNA eingebaut wird (^3H -Thymidin Inkorporation). Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge an inkorporiertem ^3H -Thymidin und damit direkt mit der Proliferationsrate der Zellen. Als Positivkontrolle dienten mit *rhVEGF* behandelte OE33-Zellen. VEGF ist nicht nur ein bedeutender Wachstumsfaktor für die Endothelzellen und damit potenter Stimulator der Angiogenese, sondern wirkt im Tumormilieu auch autokrin mitogen auf die Tumorzellen selbst (Duffy *et al.*, 2004). Die mit den *DKK1-siRNAs* transfizierten OE33-Zellen zeigen im Vergleich zu den mit den *NT-siRNAs* transfizierten OE33-Zellen keine veränderte Proliferationsrate (Abb.16). Insgesamt unterscheiden sich jedoch die zentralen Tendenzen der verschiedenen Gruppen (NK, NK+VEGF, NT-siRNA, DKK1-siRNA) signifikant voneinander (*= $p < 0,05$), was lediglich auf eine Tendenz der *DKK1-Knockdown*-Zellen hin zu einer niedrigeren Proliferationsrate hindeutet.

3.3.2.4. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf die Motilität der OE33-Zellen

Um die Motilität der OE33-Zellen nach *DKK1-Knockdown* zu untersuchen, wurden *Wound-Healing-Assays* mit einer negativen Kontrolle, welche ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelt worden ist, sowie mit den transfizierten OE33-Zellen (Transfektion mit *NT-siRNAs* und *DKK1-siRNAs*) durchgeführt. Die Herausnahme des Zellkultur-Einsatzes erfolgte 96h nach der Transfektion. Dieser Zeitpunkt wurde für die Auswertung auf 0h gesetzt.

Das Zuwachsen des Spaltes wurde mit Fotografien zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h und 24h dokumentiert (Abb.17A). Zum Zeitpunkt 0h sind die beiden Zellfronten durch einen 500 μm breiten Spalt voneinander getrennt. Nach 24h ist der Spalt bei der negativen Kontrolle und bei den mit den *NT-siRNAs* transfizierten OE33-Zellen im Vergleich zu den mit den *DKK1-siRNAs* transfizierten OE33-Zellen bereits vollständig zugewachsen. Aus der grafischen Darstellung der relativen Spaltbreite (100%) in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt geht hervor, dass die mit den *DKK1-siRNAs* transfizierten OE33-Zellen eine viel langsamere Motilität als die *NT-siRNA*-Kontrollzellen aufweisen (Abb.17B). Die Motilität der *DKK1-Knockdown*-Zellen ist im Vergleich zu den *NT-siRNA*-Kontrollzellen signifikant reduziert (**= $p < 0,001$).

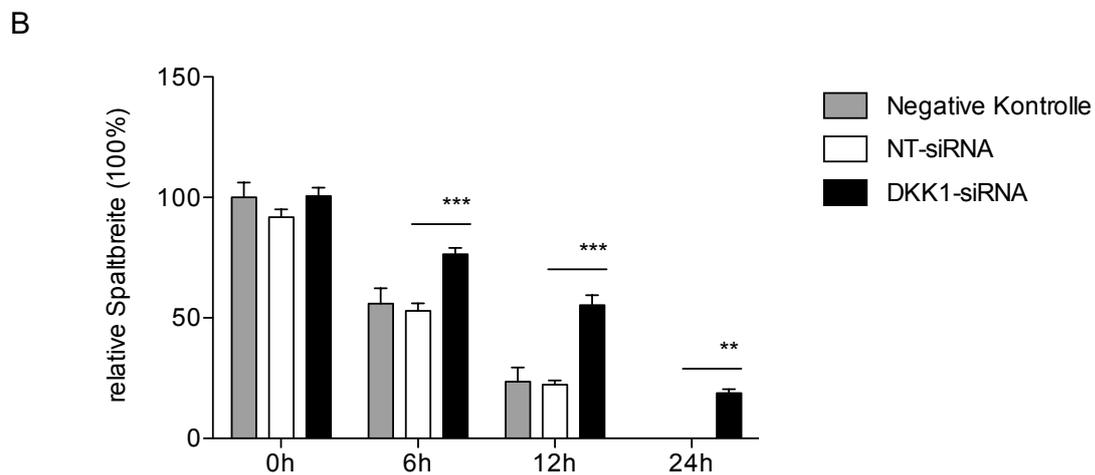
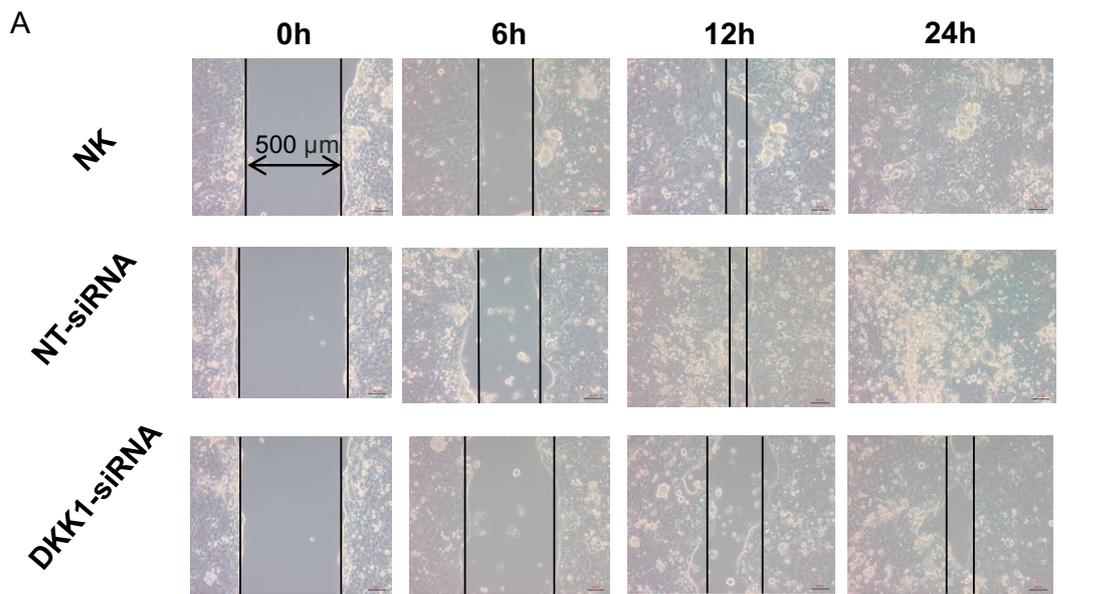


Abb.17: Motilität der OE33-Zellen nach DKK1-Knockdown mittels Wound-Healing-Assay.

A: Fotografie der Negativen Kontrolle (NK =ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelte OE33-Zellen) sowie der mit den NT-siRNAs und DKK1-siRNAs behandelten OE33-Zellen zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h und 24h. Zu dem Zeitpunkt 0h sind die beiden Zellfronten durch einen 500 μm breiten Spalt voneinander getrennt. (100fache Vergrößerung) B: Grafische Darstellung der berechneten relativen Spaltbreite (100%) in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt. Die Herausnahme des Zellkultur-Einsatzes erfolgte 96h nach der Transfektion. Dieser Zeitpunkt wurde auf 0h gesetzt. Die Messung der Spaltbreite (Longimetrie) wurde mit ImageJ 1.48v durchgeführt. Für die Auswertung wurde die Spaltbreite der Negativen Kontrolle (NK) zum Zeitpunkt 0h auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus 6 voneinander unabhängigen Experimenten (N=6, Two-Way-Anova, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$).

3.3.2.5. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf die Invasion der OE33-Zellen

Der *Transmigration-Assay* misst die Transmigration der *OE33*-Zellen durch eine lichtundurchlässige porenhaltige Polyethylenterephthalat-Membran und kann daher als Maß für die Beurteilung des Invasionsverhaltens nach dem *DKK1-Knockdown* herangezogen werden. Mittels Fluoreszenz können die transmigrierten Zellen in der unteren Kammer mit einem Spektrometer „*from bottom*“ (405/595 nm) detektiert werden. Die *DKK1-Knockdown*-Zellen besitzen kein verändertes Invasionsverhalten im Vergleich zu den mit den *NT-siRNAs* transfizierten *OE33*-Zellen (Abb.18).

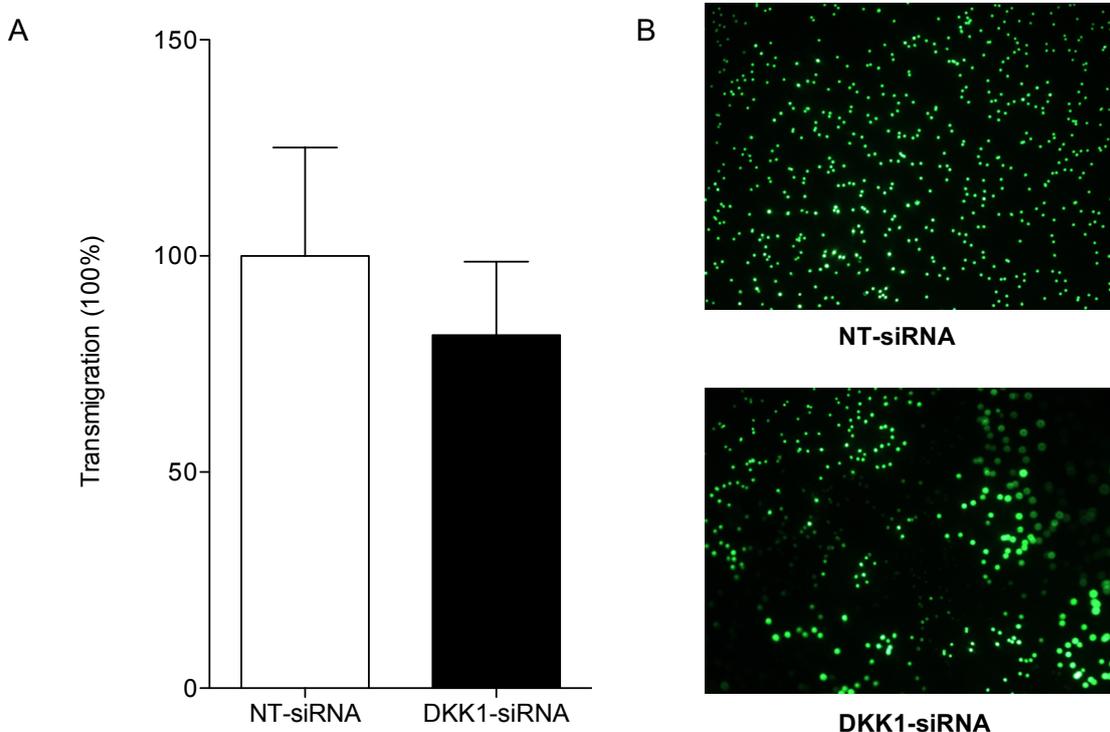


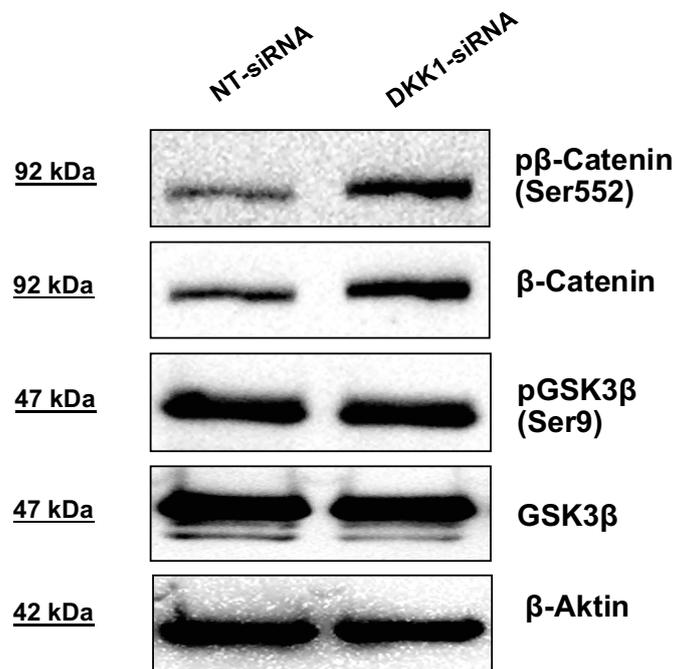
Abb:18: Invasion der *OE33*-Zellen nach *DKK1 Knockdown* mittels *Transmigration-Assay*.
A: Grafische Darstellung der berechneten relativen Transmigration (100%) in Abhängigkeit von der Behandlung (*NT-siRNA* / *DKK1-siRNA*). Die Fluoreszenzmessung „*from bottom*“ (405/595 nm) erfolgte 96h nach der Transfektion. Für die Auswertung wurden die Messergebnisse der mit den *NT-siRNAs* transfizierten *OE33*-Zellen auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM ($N=1$, $n_{NT-siRNA}=2$ / $n_{DKK1-siRNA}=3$, unabhängiger t-Test). B: Fotografie der fluoreszenzmarkierten transmigrierten *OE33*-Zellen zum Zeitpunkt der Messung.

3.3.2.6. Expression molekularer Marker und Zielstrukturen nach DKK1-Knockdown

Um eine molekulare Ursache für die detektierten phänotypischen Veränderungen zu finden, wurden weiterführende Proteinanalysen nach *DKK1-Knockdown* durchgeführt. Diese sollten die Aktivierung verschiedener Signalwege und Targetproteine aufzeigen. Dabei wurde der Fokus auf die Beeinflussung des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs, der *DKK1*-Rezeptorexpression, des Tumorwachstums und der Apoptoseregulation gelegt.

Mittels *Western Blot* wurde zunächst das Aktivierungsmuster der Signalmoleküle des *Wnt*-Signalwegs *β-Catenin* und *GSK3β* untersucht (Abb.19). Während sich das Aktivierungsmuster von *GSK3β* nach dem *DKK1-Knockdown* nicht verändert, nimmt die Phosphorylierung von *β-Catenin* am Serin 552 signifikant zu (*= $p < 0,05$). Parallel dazu zeigt *β-Catenin* eine tendenzielle Zunahme in der Expression ($p = 0,09$).

A



B

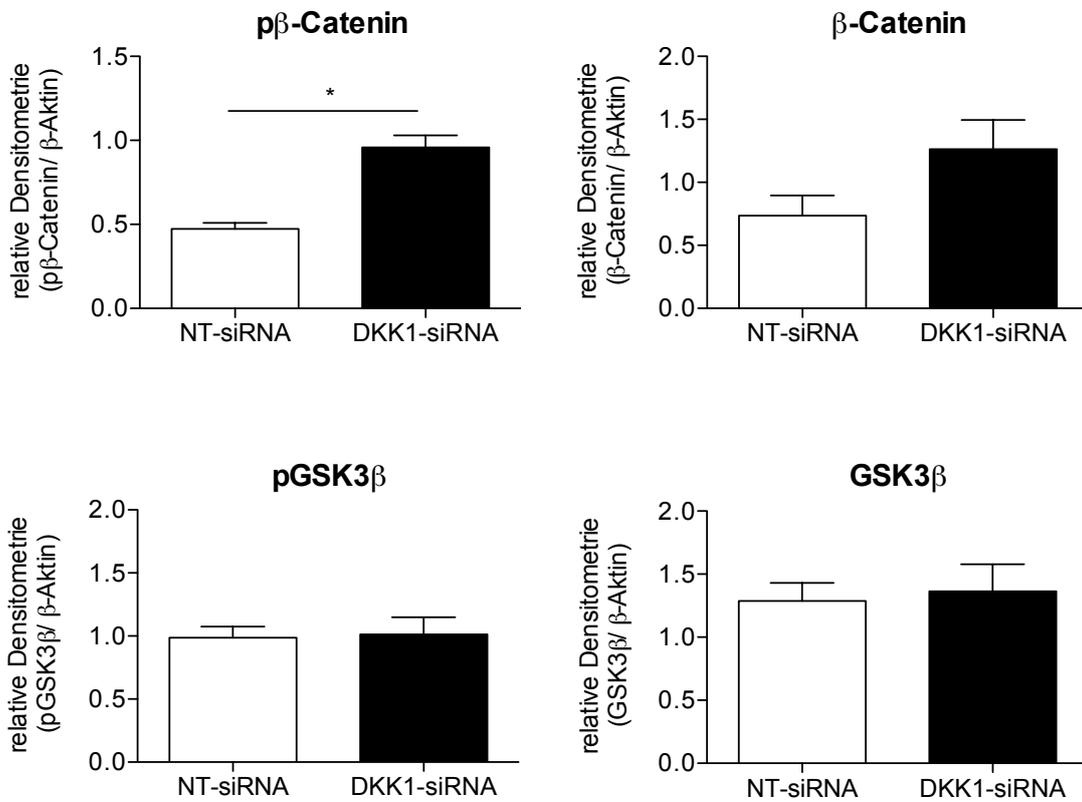


Abb.19: Aktivierungsmuster von β -Catenin und GSK3 β nach DKK1-Knockdown mittels Western Blot. A: Die Western Blots wurden mit den Proteinproben von mit NT-siRNAs behandelten OE33-Zellen und mit DKK1-siRNAs behandelten OE33-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 8%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 μ g Proteinprobe aufgetragen und p β -Catenin (Ser552), β -Catenin, pGSK3 β (Ser9) und GSK3 β detektiert. B: Die densitometrische Berechnung erfolgte mit ImageJ 1.48v relativ zu β -Aktin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 2 (p β -Catenin), 5 (β -Catenin) und 8 (pGSK3 β /GSK3 β) voneinander unabhängigen Proben ($N_{p\beta\text{-Catenin}}=2 / N_{\beta\text{-Catenin}}=5 / N_{p\text{GSK}3\beta/\text{GSK}3\beta}=8$, unabhängiger t-Test, $*=p<0,05$)

Im Zusammenhang mit den Signalmolekülen des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs wurde auch die Proteinexpression des *Wnt*-Korezeptors und *DKK1*-Rezeptors *LRP6* mittels *Western Blot* untersucht. Es zeigte sich jedoch kein verändertes Expressionsmuster von *LRP6* nach *DKK1*-Knockdown (Abb.20).

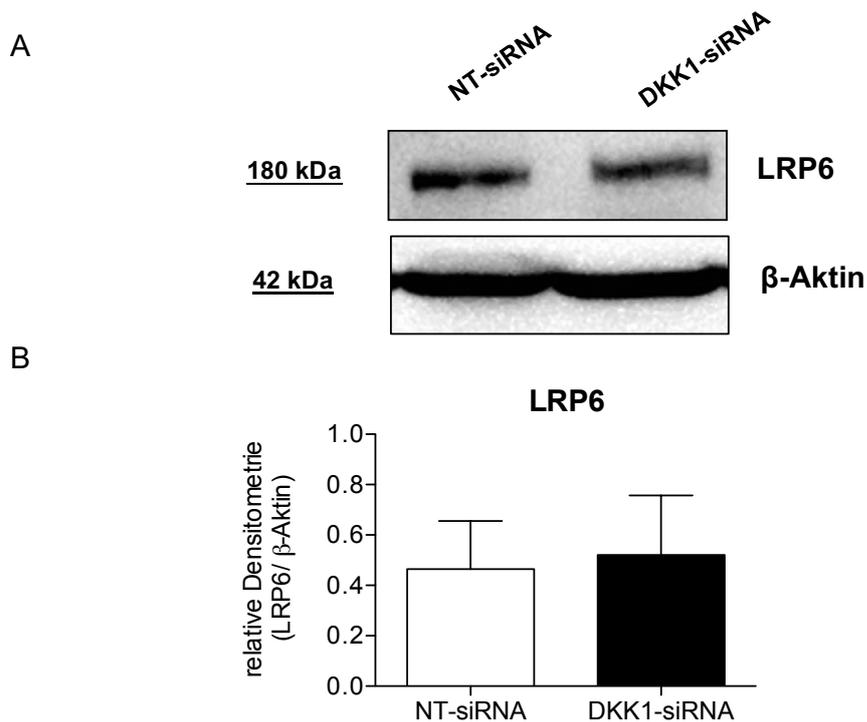
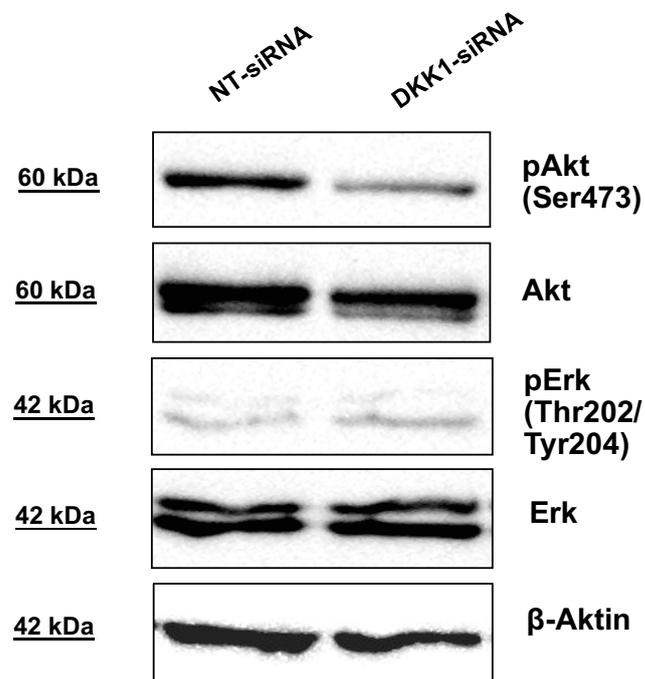


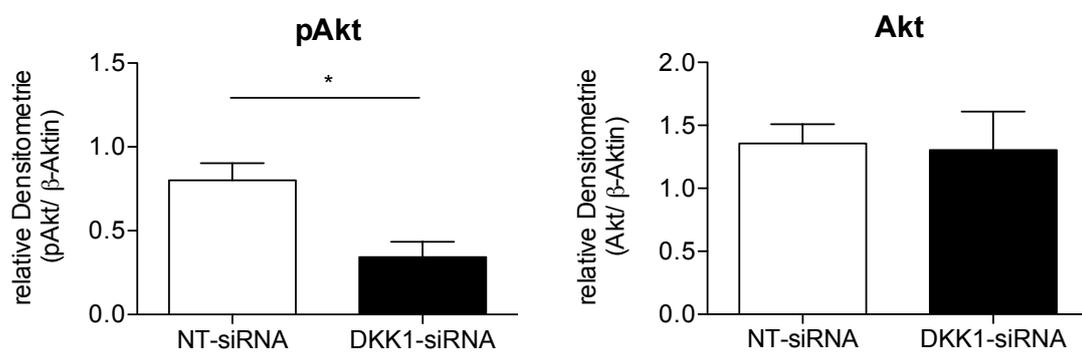
Abb.20: Proteinexpression von *LRP6* nach *DKK1*-Knockdown mittels *Western Blot*. A: Die *Western Blots* wurden mit den Proteinproben von mit *NT-siRNAs* behandelten *OE33*-Zellen und mit *DKK1-siRNAs* behandelten *OE33*-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 8%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 µg Proteinprobe aufgetragen und die *LRP6*-Proteinexpression detektiert. B: Die densitometrische Berechnung erfolgte mit ImageJ 1.48v relativ zu *β-Aktin*. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem *SEM* aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Proben ($N_{LRP6}=3$, unabhängiger t-Test).

Weiterführend wurde das Aktivierungsmuster der proliferationsfördernden Kinasen *Erk* und *Akt* mittels *Western Blot* betrachtet (Abb.21). Die Proteinkinase *Erk* zeigt nach *DKK1-Knockdown* kein verändertes Aktivierungsmuster. Bei der Proteinkinase *Akt* konnte allerdings bei den *DKK1-Knockdown*-Zellen eine signifikante Dephosphorylierung am Serin 473 nachgewiesen werden (*= $p < 0,05$).

A



B



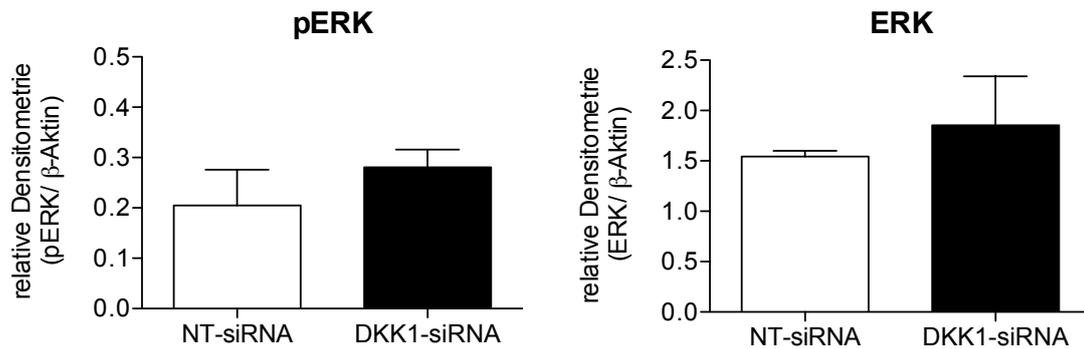
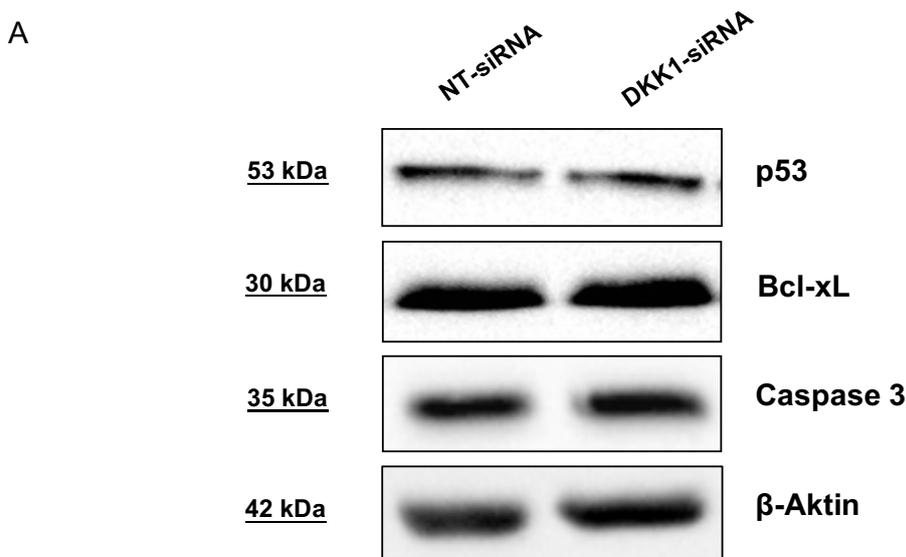


Abb.21: Aktivierungsmuster von Akt und Erk nach DKK1-Knockdown mittels Western Blot.

A: Die Western Blots wurden mit den Proteinproben von mit NT-siRNAs behandelten OE33-Zellen und mit DKK1-siRNAs behandelten OE33-Zellen durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 8%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 μ g Proteinprobe aufgetragen und pAkt (Ser473), Akt, pErk (Thr202/Tyr204) und Erk detektiert. B: Die densitometrische Berechnung erfolgte mit ImageJ 1.48v relativ zu β -Aktin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 3 (pAkt/Akt) und 2 (pErk/Erk) voneinander unabhängigen Proben ($N_{pAkt/Akt}=3$ / $N_{pErk/Erk}=2$, unabhängiger t-Test, $*=p<0,05$).

Als Marker für die Apoptoseregulation dienten in der vorliegenden Arbeit die Moleküle p53, Bcl-xL und Caspase 3. Das Aktivierungsmuster von p53, als auch die Proteinexpression von Bcl-xL und Caspase 3, wird durch die Behandlung mit den DKK1-siRNAs nicht beeinflusst (Abb.22).



B

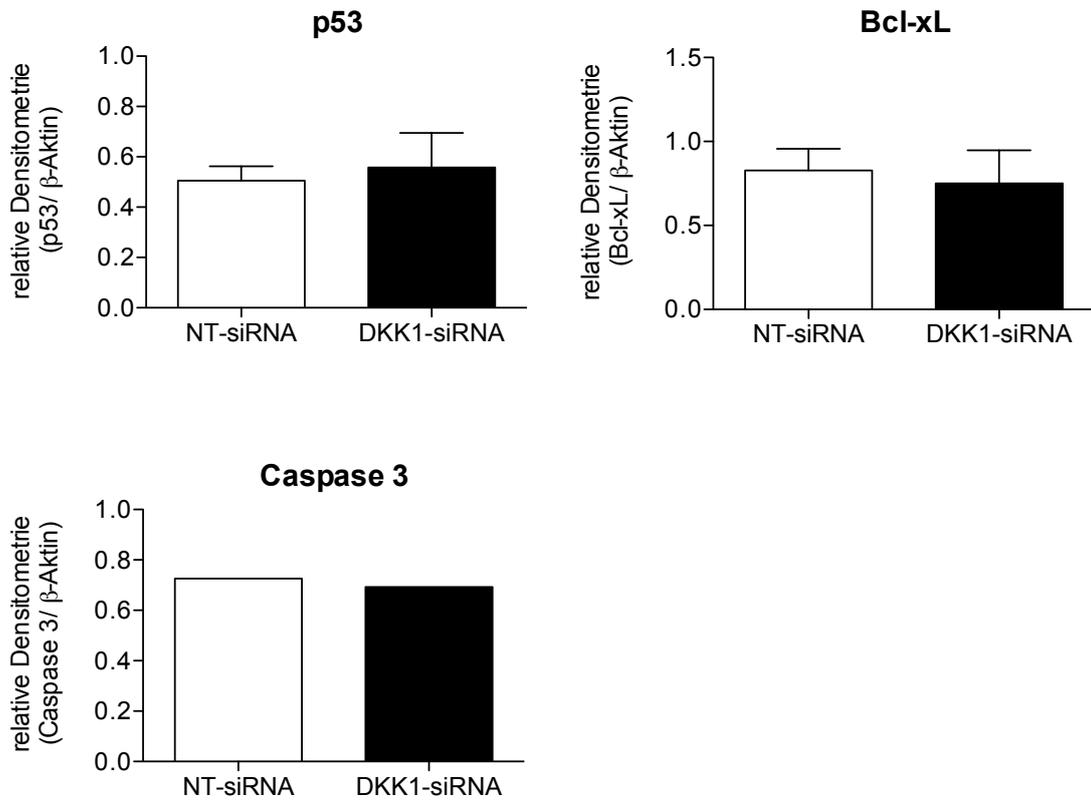


Abb.22: Aktivierungsmuster von *p53* sowie Proteinexpression von *Bcl-xL* und *Caspase 3* nach *DKK1-Knockdown* mittels *Western Blot*. A: Die *Western Blots* wurden mit den Proteinproben von mit *NT-siRNAs* behandelten *OE33-Zellen* und mit *DKK1-siRNAs* behandelten *OE33-Zellen* durchgeführt. Für die *SDS-PAGE* wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 μ g Proteinprobe aufgetragen und *p53*, *Bcl-xL* und *Caspase 3* detektiert. B: Die densitometrische Berechnung erfolgte mit ImageJ 1.48v relativ zu β -Aktin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 3 (*p53*), 2 (*Bcl-xL*) und 1 (*Caspase 3*) voneinander unabhängigen Proben ($N_{p53}=3 / N_{Bcl-xL}=2 / N_{Caspase\ 3}=1$, unabhängiger t-Test)

3.3.2.7. Einfluss des DKK1-Knockdowns auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg

Um zu untersuchen, ob die intrazelluläre Stabilisierung von β -Catenin nach *DKK1-Knockdown* mit einer erhöhten β -Catenin-Transkriptionsaktivität einhergeht, wurde mittels *qRT-PCR* die Genexpression der *Wnt*-Zielgene *Axin II* und *Cyclin D1* bestimmt. Die Genexpression von *Axin II* und *Cyclin D1* ist nach *DKK1-Knockdown* trotz der nachgewiesenen verstärkten Phosphorylierung von β -Catenin am Serin 552 nicht verändert (Abb.23).

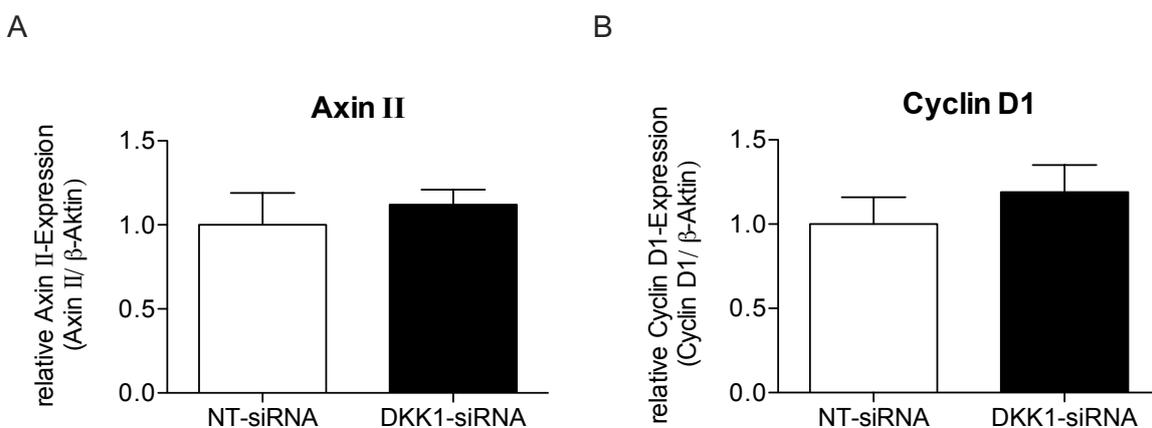


Abb.23: Genexpression von *Axin II* und *Cyclin D1* nach *DKK1-Knockdown* mittels *qRT-PCR*. A: *Axin II*-Genexpression. B: *Cyclin D1*-Genexpression. Die Bestimmung wurde je nach Lauf in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden mit der β -Aktin-Genexpression normalisiert. Die Berechnung mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode erfolgte relativ zur jeweiligen *NT-siRNA*-Kontrolle, welche auf 1 gesetzt worden ist. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 5 voneinander unabhängigen Experimenten (N=5, n=12, unabhängiger t-Test).

Zusätzlich zu den *Wnt*-Zielgenen *Axin II* und *Cyclin D1* wurde die Genexpression von *p21* (*CDK-Inhibitor 1A* / *CDKN1A*) untersucht. Über eine Induktion des Zellzyklusarrests ist *p21* in der Lage, *Wnt*-unabhängig die Zellproliferation zu regulieren (Xiong *et al.*, 1992; el-Deiry *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993). Die Genexpression von *p21* ist bei den *DKK1-Knockdown*-Zellen signifikant erhöht (Abb.24). In Zusammenhang mit der unveränderten *Wnt*-Zielgenexpression nach *DKK1-Knockdown* lässt sich daher vermuten, dass die nach *DKK1-Knockdown* detektierten phänotypischen Veränderungen auf die Aktivierung von *Wnt*-unabhängigen intrazellulären Signalwegen zurückzuführen sind.

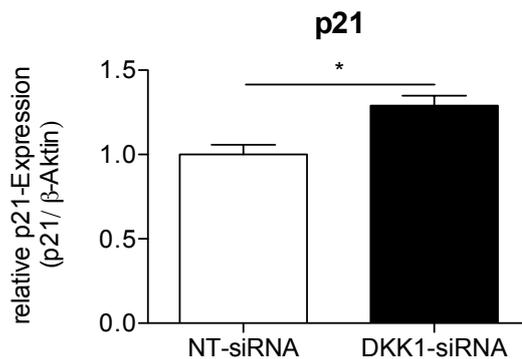


Abb.24: Genexpression von *p21* nach *DKK1*-Knockdown mittels *qRT-PCR*. Die Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden mit der β -Aktin-Genexpression normalisiert. Die Berechnung mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode erfolgte relativ zur jeweiligen *NT-siRNA*-Kontrolle, welche auf 1 gesetzt worden ist. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem *SEM* aus jeweils 2 voneinander unabhängigen Experimenten (N=2, n=6, unabhängiger t-Test, *=p=0,05).

3.3.2.8. Behandlung mit rekombinantem humanem *Wnt3a* nach *DKK1*-Knockdown

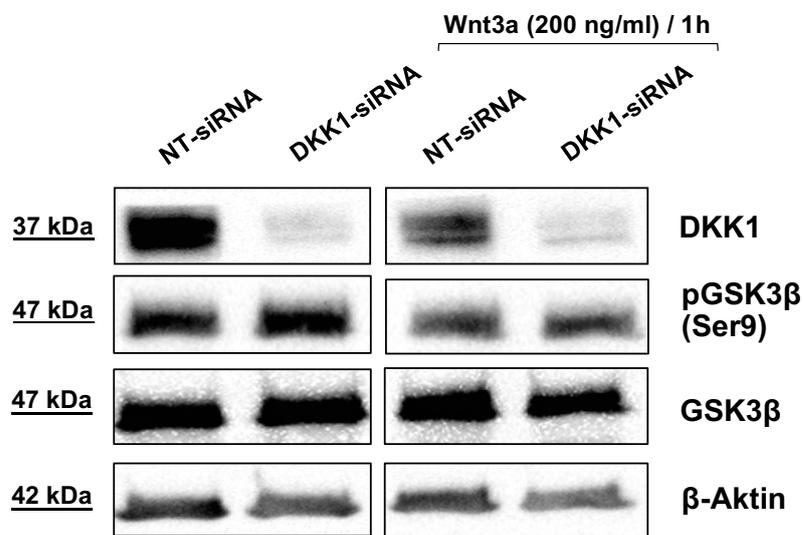
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *OE33*-Zellen nicht nur mit dem vermeintlichen *Wnt*-Inhibitor *rhDKK1* behandelt, sondern auch mit dem als *Wnt*-Stimulator bekanntem *rhWnt3a*. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Wnt3a* über eine Heraufregulation des *Wnt*/ β -*Catenin* Signalwegs in verschiedenen humanen Tumoren die Proliferation als auch Migration der Karzinomzellen fördern und dadurch die Tumorprogression steuern kann (Kaur *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015).

Um den Effekt von *rhWnt3a* auf den *Wnt*/ β -*Catenin* Signalweg und die Viabilität der ösophagealen Adenokarzinomzellen zu untersuchen, wurden *Western Blots*, *qRT-PCRs* und *MTT-Assays* bei den mittels *siRNAs* transfizierten *OE33*-Zellen nach Behandlung mit *rhWnt3a* durchgeführt.

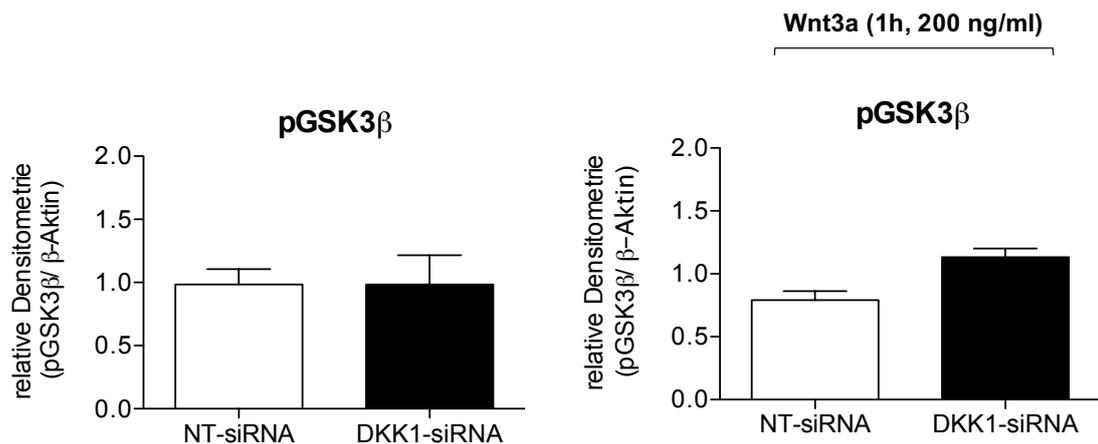
Einfluss auf die Aktivität im Wnt/ β -Catenin Signalweg

Nach *DKK1-Knockdown* und anschließender Behandlung mit *rhWnt3a* verändert sich das Aktivierungsmuster des Signalmoleküls des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs *GSK3 β* nicht (Abb.25). Auch *DKK1* selbst zeigt nach *rhWnt3a*-Behandlung kein verändertes Expressionsmuster. Die Proteinexpression von *DKK1* ist nach *DKK1-Knockdown* ohne und mit *rhWnt3a*-Behandlung gleichermaßen herunterreguliert.

A



B



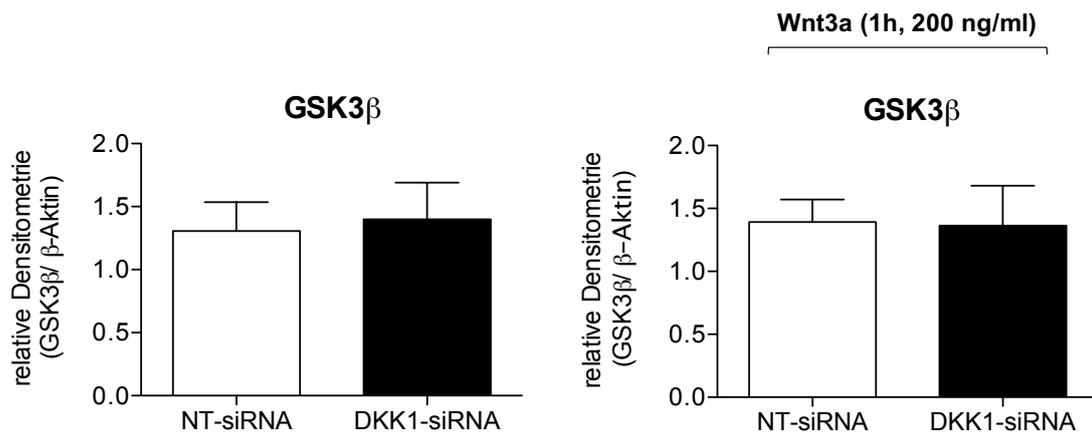
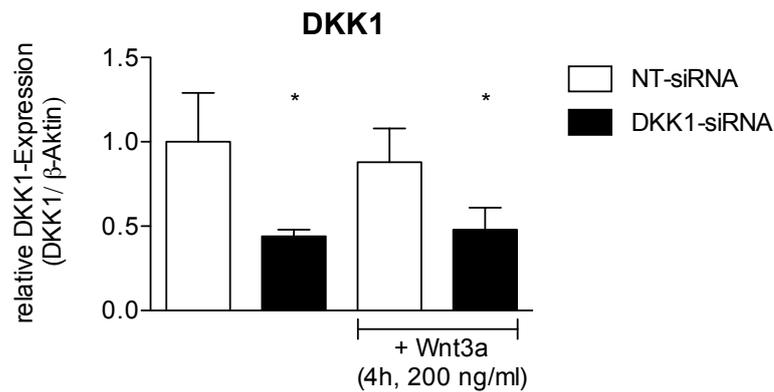


Abb.25: Aktivierungsmuster von GSK3 β nach DKK1-Knockdown und Behandlung mit rhWnt3a mittels Western Blot. Die Behandlung mit rhWnt3a (1h, 200 ng/ml) erfolgte 96h nach der Transfektion. Die Western Blots wurden mit den Proteinproben von mit NT-siRNAs behandelten OE33-Zellen und mit DKK1-siRNAs behandelten OE33-Zellen ohne und mit rhWnt3a-Behandlung durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden 12%ige Trenngele verwendet. In die Taschen der Gele wurden jeweils 20 μ g Proteinprobe aufgetragen und DKK1, pGSK3 β (Ser9) und GSK3 β detektiert. Die densitometrische Berechnung erfolgte mit ImageJ 1.48v relativ zu β -Aktin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Experimenten (N=3, Two-Way-Anova).

Die Behandlung mit rhWnt3a führt zudem unabhängig vom DKK1-Knockdown zu keiner Veränderung in der Genexpression der Wnt-Zielgene *Axin II* und *Cyclin D1* im Vergleich zu den nicht mit rhWnt3a behandelten OE33-Zellen (Abb.26). Zusammen betrachtet scheint die Behandlung der OE33-Zellen mit rhWnt3a daher keinen Einfluss auf die β -Catenin-Transkriptionsaktivität und somit auf die Aktivität im Wnt/ β -Catenin Signalweg zu haben.

A



B

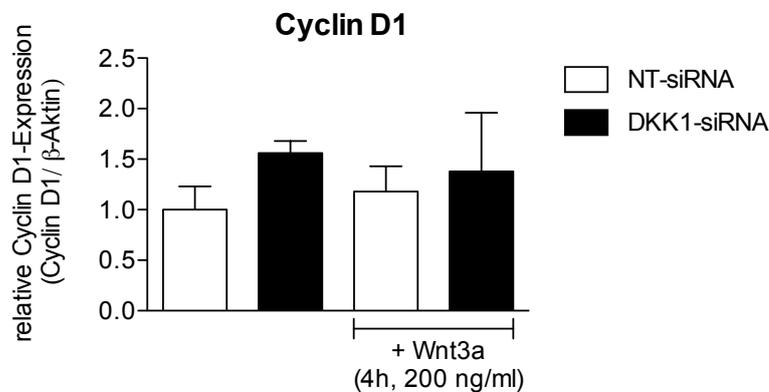
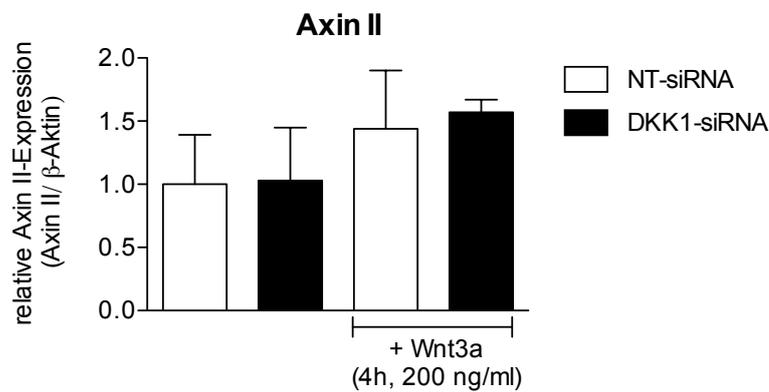


Abb.26: Genexpression von *DKK1*, *Axin II* und *Cyclin D1* nach *DKK1*-Knockdown und Behandlung mit *rhWnt3a* mittels *qRT-PCR*. A: *DKK1*-Genexpression. B: *Axin II*- und *Cyclin D1*-Genexpression. Die Behandlung mit *rhWnt3a* (4h, 200 ng/ml) erfolgte 96h nach der Transfektion. Die Bestimmung wurde in Duplikaten durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden mit der β -Aktin-Genexpression normalisiert. Die Berechnung mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode erfolgte relativ zur unbehandelten *NT-siRNA*-Kontrolle, welche auf 1 gesetzt worden ist. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 2 voneinander unabhängigen Experimenten (N=2, n=4, *Two-Way-Anova*, $*=p<0,05$).

Einfluss auf die Viabilität der OE33-Zellen

Um den Effekt von *rhWnt3a* auf die Viabilität der *OE33*-Zellen zu untersuchen, erfolgten *MTT*-Assays nach *DKK1-Knockdown* und Behandlung mit *rhWnt3a*. Die Behandlung mit *rhWnt3a* in der Konzentration 200 ng/ml wurde 96h nach der *siRNA*-Transfektion durchgeführt. Die *MTT*-Assays erfolgten zum Zeitpunkt der Behandlung sowie 24h und 48h nach der Behandlung mit *rhWnt3a*. Die Behandlung mit *rhWnt3a* zeigt unabhängig vom *DKK1-Knockdown* keinen Einfluss auf die Viabilität der *OE33*-Zellen. Es bestehen keine Unterschiede im Vergleich zu den nicht mit *rhWnt3a* behandelten *OE33*-Zellen (Abb.27).

Da die Viabilität bei den *DKK1-Knockdown*-Zellen und den *NT-siRNA*-Kontrollzellen in dem Zeitintervall 120h bis 144h gleichermaßen zunimmt (Abb.15), ist der Effekt des *DKK1-Knockdowns* selbst auf die Viabilität der *OE33*-Zellen aus dem Diagramm aufgrund der relativen Darstellung nicht ersichtlich.

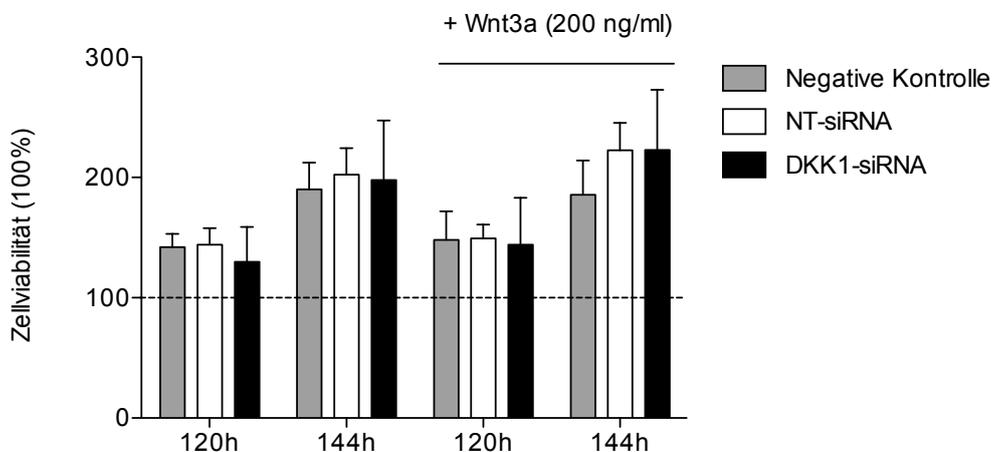


Abb.27: Viabilität der *OE33*-Zellen nach *DKK1-Knockdown* und Behandlung mit *rhWnt3a* mittels *MTT*-Assay. Der Zeitpunkt der Transfektion wurde auf 0h gesetzt. Die Stimulation mit *rhWnt3a* (200 ng/ml) erfolgte 96h nach der Transfektion. Die Zeitpunkte für die *MTT*-Assays waren 96h, 120h und 144h. Die Bestimmung wurde in sechsfachen Replikaten durchgeführt. Für die Auswertung wurden die jeweils ersten Messergebnisse zum Zeitpunkt 96h auf 100 % gesetzt und die relative Zunahme über die Zeit berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem SEM aus jeweils 4 (96h, 120, 144h) und 2 (96h, 120h, 144h + Wnt3a) voneinander unabhängigen Experimenten ($N_{96h,120h,144h}=4$ / $N_{96h,120h,144h+Wnt3a}=2$, $n=N*6$, *Two-Way-Anova*).

4. Diskussion

4.1. Interpretation

Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsmuster und die Funktion von *DKK1* im ösophagealen Adenokarzinom zu untersuchen. Im Rahmen eines *in vivo* Modells wurde daher Blutserum von Adenokarzinom-Patienten vor und nach der Tumorresektion gesammelt und die *DKK1*-Serumkonzentrationen mittels *ELISA* bestimmt sowie mit der histopathologischen *TNM*-Klassifikation und dem Differenzierungsgrad der ösophagealen Karzinomzellen (*Grading*) korreliert. Die *DKK1*-Serumkonzentrationen von Barrett-Metaplasie-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurden ebenfalls bestimmt und in die vergleichende Analyse mit einbezogen. *In vitro* wurden die ösophagealen Plattenepithelzelllinien *EPC1-hTERT* und *EPC2-hTERT*, die nicht-dyplastische Barrett-Epithelzelllinie *CP-A* und die *HGD*-Barrett-Epithelzelllinie *CP-B*, als auch die beiden ösophagealen Adenokarzinomzelllinien *OE33* und *OE19* für die Expression und Sekretion von *DKK1* mittels *RT-PCR*, *qRT-PCR* und *Western Blot* charakterisiert. Die Funktion von *DKK1* wurde in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* durch Behandlung mit *rhDKK1* sowie mittels spezifischem *siRNA*-vermitteltem *Knockdown* untersucht. Hierfür wurde die Zellviabilität, Proliferation, Motilität und Invasion der *OE33*-Zellen nach *DKK1*-*Knockdown* bestimmt und anschließend eine umfassende Expressionsanalyse mittels *Western Blot* und *qRT-PCR*, auch in Abhängigkeit von einer *rhWnt3a*-Behandlung, durchgeführt.

Im Folgenden soll anhand der dargelegten Ergebnisse die Rolle von *DKK1* als ein potentieller serologischer Biomarker und als ein Mediator der Karzinogenese im ösophagealen Adenokarzinom ausführlich erläutert werden.

4.1.1. DKK1 als ein serologischer Biomarker für das EAC

In der Mehrzahl aller ösophagealen Plattenepithelkarzinome und Lungenkarzinome wird das *DKK1*-Gen hoch exprimiert. Dementsprechend konnten bei den jeweiligen Tumorpatienten signifikant höhere *DKK1*-Serumkonzentrationen detektiert werden als bei den gesunden Kontrollpersonen. Dies galt auch für frühe Tumorstadien. Nach chirurgischer Tumorresektion waren die *DKK1*-Serumkonzentrationen im Vergleich zum präoperativ-ermittelten Wert stark abgesunken (Yamabuki *et al.*, 2007). Für ösophageale Plattenepithelkarzinome und Lungenkarzinome konnte zudem gezeigt werden, dass eine hohe *DKK1*-Expression mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert ist (Makino *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2014). Für die Früherkennung des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms könnten die *DKK1*-Konzentrationen im Blutserum von diagnostischer Bedeutung sein (Begenik *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2016).

Das Expressionsmuster und die prognostische Relevanz von *DKK1* sind bereits in vielen anderen humanen Karzinomen analysiert. Eine *DKK1*-Überexpression ist nicht nur beim ösophagealen Plattenepithelkarzinom und Lungenkarzinom, sondern auch beim Mammakarzinom, Nierenkarzinom, Hepatozellulären Karzinom, Osteosarkom, Wilm's Tumor, Hepatoblastom, Cholangiokarzinom, ovariellen endometrioiden Adenokarzinom, Zervixkarzinom, Glioblastom, Pankreaskarzinom, Magenkarzinom, Multiplen Myelom, Prostatakarzinom, Larynxkarzinom und Blasenkarzinom bekannt (Tian *et al.*, 2003; Wirths *et al.*, 2003; Chamorro *et al.*, 2005; Patil *et al.*, 2005; Forget *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013; Rachner *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015). In zwei aktuellen Metaanalysen konnte die prognostische Signifikanz der *DKK1*-Überexpression in verschiedenen soliden humanen Tumoren bestätigt werden (Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Die Anwendung von *DKK1* als ein serologischer Biomarker ist beim Hepatozellulären Karzinom bereits umfangreich untersucht (Tung *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015; Fouad *et al.*, 2016). Insbesondere in Kombination mit dem Tumormarker *AFP* konnte *DKK1* die Sensitivität für die Detektion des Hepatozellulären Karzinoms erheblich steigern (Jang *et al.*, 2016).

Wie bereits einleitend beschrieben gibt für das ösophageale Adenokarzinom bisher noch keinen Biomarker, der mit ausreichender Sensitivität in der Lage ist, den Tumor in einem frühen, noch gut kurativen Stadium zu detektieren. Die Identifikation und Etablierung von serologischen Biomarkern, sowohl für die Risikostratifizierung und Karzinomdetektion im Stadium der Barrett-Metaplasie, als auch bei *EAC*-Patienten für die Abschätzung der Prognose und Rezidivkontrolle nach der chirurgischen Tumorsektion, ist daher von großer klinischer Relevanz. Während der neoplastischen Progression von der Barrett-Metaplasie zum ösophagealen Adenokarzinom nimmt die Expression von *DKK1* stark zu (Darlavoix *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Anwendung von *DKK1* als ein serologischer Biomarker für das ösophageale Adenokarzinom erstmalig untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die *DKK1*-Serumkonzentrationen von gesunden Kontrollpersonen (n=17), Barrett-Metaplasie-Patienten (n=18) und *EAC*-Patienten (n=18) nicht signifikant voneinander unterscheiden. Bei den *EAC*-Patienten konnten allerdings im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen deutlich höhere Maximalkonzentrationen von *DKK1* im Blutserum detektiert werden. Bei einem *EAC*-Patienten mit multiplen Knochen- und Lungenmetastasen (cM1) lag der mittels *ELISA* bestimmte *DKK1*-Wert bei 4,925 ng/ml, während bei den gesunden Kontrollpersonen die *DKK1*-Serumkonzentrationen einen Wert von 2,881 ng/ml nicht überstiegen. *DKK1* wird jedoch nicht bei allen *EAC*-Patienten gleichermaßen hoch exprimiert. Einige *EAC*-Patienten (n=6) hatten zum Zeitpunkt der Rekrutierung bereits eine neoadjuvante Therapie erhalten, welche durchaus einen Einfluss auf die präoperativ-ermittelten *DKK1*-Serumkonzentrationen haben könnte. Auffällig sind nicht nur die interindividuellen Unterschiede in den *DKK1*-Serumkonzentrationen der *EAC*-Patienten, sondern auch die große Spannbreite der *DKK1*-Serumkonzentrationen der *BE*-Patienten, was in Kombination mit den relativ niedrigen Stichprobenzahlen eine statistische Signifikanz des *DKK1*-Anstieges während der neoplastischen Progression erschwert. Obwohl die Mehrheit der *BE*-Patienten ebenso niedrige *DKK1*-Serumkonzentrationen wie die gesunden Kontrollpersonen besitzen, werden insgesamt eben auch höhere Werte bis zu 4,971 ng/ml erreicht. Damit liegt die maximale *DKK1*-Serumkonzentration bei den *BE*-Patienten noch leicht über dem Maximum der *DKK1*-Serumkonzentrationen bei den *EAC*-Patienten. Die große Spannbreite der *DKK1*-Serumkonzentrationen bei den *BE*-Patienten könnte eventuell

auf zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestehende refluxinduzierte Entzündungen der Ösophagasmukosa zurückzuführen sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ösophagitis-Patienten im Vergleich zu den *BE*-Patienten deutlich erhöhte *DKK1*-Serumkonzentrationen aufweisen (Ali *et al.*, 2006; Lyros *et al.*, 2014). *DKK1* scheint daher auch Potential als ein Entzündungsmarker und -mediator zu haben (Ueland *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2009; Hardy *et al.*, 2012; Chae *et al.*, 2016; Juarez *et al.*, 2016). Da die meisten *BE*-Patienten aufgrund der Pathophysiologie ebenfalls unter pathologischem Reflux leiden, könnte es in der Klinik bei Screeninguntersuchungen schwierig sein, anhand von erhöhten *DKK1*-Serumkonzentrationen entzündliches von tumorösem Geschehen zu differenzieren. Sinnvoll wäre daher die Bestimmung von *DKK1* in Kombination mit anderen Tumormarkern, wie es z.B. bereits beim Hepatozellulärem Karzinom demonstriert werden konnte (Jang *et al.*, 2016).

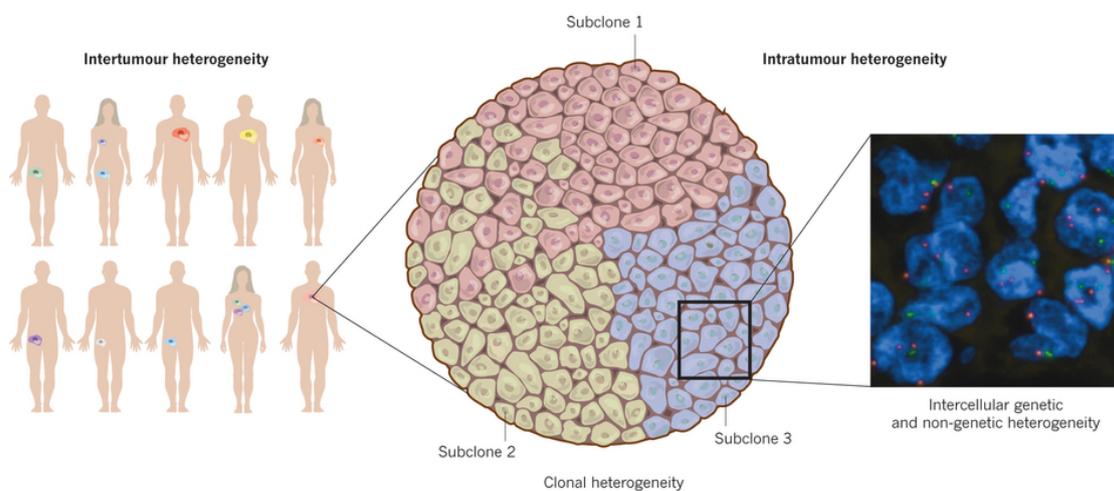
Nach der chirurgischen Tumorresektion zeigten die *EAC*-Patienten eine Tendenz hin zu niedrigeren *DKK1*-Serumkonzentrationen im Vergleich zum präoperativ-ermittelten Wert ($p=0,1$). Von den 12 *EAC*-Patienten, deren prä- und postoperativen *DKK1*-Serumkonzentrationen miteinander verglichen worden sind, konnte lediglich bei 2 *EAC*-Patienten eine postoperative Zunahme in den *DKK1*-Serumkonzentrationen detektiert werden. Bei den restlichen 10 *EAC*-Patienten konnten postoperativ deutlich niedrigere Werte bis zu 12,6% des präoperativen Ausgangswertes nachgewiesen werden. Beide *EAC*-Patienten, bei denen nach der chirurgischen Tumorresektion eine Zunahme in den *DKK1*-Serumkonzentrationen detektiert werden konnte, hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine postoperative Pneumonie erlitten, welche eventuell für den erhöhten *DKK1*-Wert mitverantwortlich sein könnte (Guo *et al.*, 2015). Ebenso ist eine Beeinflussung der postoperativen *DKK1*-Serumkonzentrationen durch lokale Entzündungen und Wundheilungsprozesse aufgrund des chirurgischen Eingriffs denkbar. Die stärkste postoperative Zunahme in den *DKK1*-Serumkonzentrationen zeigte ein *EAC*-Patient, welcher wenige Monate nach der Ösophagusresektion an Lokalrezidiven im linken Hauptbronchus und in der linken Achselhöhle verstorben ist. Dies könnte auf eine prognostische Relevanz der *DKK1*-Serumkonzentrationen hindeuten. In Abhängigkeit von der Ausdehnung des Primärtumors, dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls und dem Differenzierungsgrad der ösophagealen Karzinomzellen zeigten sich jedoch keine Unterschiede in den präoperativ-ermittelten *DKK1*-Serumkonzentrationen der *EAC*-Patienten.

Um eine Aussage über die klinische Relevanz von *DKK1* als ein serologischer Biomarker für das ösophageale Adenokarzinom treffen zu können, ist eine weiterführende Patientenrekrutierung mit dem Ziel größerer Stichprobenzahlen erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig *EAC*-Patienten mit frühem Tumorstadium (pTis-1, pN0, M0) untersucht. Eine Untersuchung an *EAC*-Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien (pT2-3, pN+) sowie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorhandenen Fernmetastasierungen (cM1) stellen ein noch zu validierendes Patientenkollektiv dar. Ein besseres Verständnis ist insbesondere über die Rolle von *DKK1* als ein Entzündungsmarker notwendig, um eine Aussage über die Spezifität von *DKK1* treffen zu können. Neben der chirurgischen Tumorresektion muss auch der Effekt einer neoadjuvanten Therapie auf die *DKK1*-Serumkonzentrationen der *EAC*-Patienten weiterführend untersucht werden. Ebenfalls ist eine Langzeitüberwachung der Patienten nach Tumorresektion mit entsprechenden Nachbestimmungen der *DKK1*-Serumkonzentrationen im Hinblick auf die Untersuchung der prognostischen Relevanz von *DKK1* sowie der Relevanz von *DKK1* als ein Marker für die Früherkennung von Rezidiven sinnvoll. Insbesondere sollte die Anwendung von *DKK1* in Kombination mit anderen Tumormarkern untersucht werden, da aufgrund der dargelegten Ergebnisse die alleinige Anwendung von *DKK1* als ein serologischer Biomarker zur Früherkennung fraglich erscheint.

4.1.2. Expression von *DKK1* während der neoplastischen Progression

Mittels *RT-PCR*, *qRT-PCR* und *Western Blot* wurde die Expression und Sekretion von *DKK1* in den ösophagealen Zelllinien *EPC1-hTERT*, *EPC2-hTERT*, *CP-A*, *CP-B*, *OE19* und *OE33* untersucht sowie miteinander verglichen. In der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* konnte eine starke *DKK1*-Gen- und Proteinexpression detektiert werden. Die ösophagealen Plattenepithelzelllinien *EPC1-hTERT* und *EPC2-hTERT* sowie die metaplastischen Zelllinien *CP-A* und *CP-B* zeigten hingegen eine vergleichsweise niedrige *DKK1*-Expression. Über die Zelllinien-Sequenz *CP-A* – *CP-B* – *OE33* konnte allerdings eine Zunahme in der *DKK1*-Proteinexpression nachgewiesen werden, was auf eine zunehmende *DKK1*-Expression während der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz hindeutet. Dies wiederum steht mit den Ergebnissen von Darlavoix *et al.* (2009) im Einklang, welche zeigen, dass die Expression von *DKK1* während der neoplastischen Progression stark zunimmt.

Interessant ist die im Vergleich zu den *OE33*-Zellen stark verminderte *DKK1*-Expression in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE19*, obwohl diese einem höheren Tumorstadium zugeordnet ist. Die verschiedenen Zelllinien repräsentieren allerdings nur einen aus einer humanen Gewebeprobe entnommenen Zellklon und damit nicht die gesamte Gewebemasse. Unzweifelhaft verdeutlicht der Unterschied in der *DKK1*-Expression zwischen den ösophagealen Adenokarzinomzelllinien *OE33* und *OE19* daher die große intertumorale und intratumorale regionale Heterogenität (Abb.28). Ursache ist die hohe mutationale Komplexität des ösophagealen Adenokarzinoms (Chong *et al.*, 2013; Dulak *et al.*, 2013; Nones *et al.*, 2014; Weaver *et al.*, 2014), was die Identifikation von therapeutischen Targets und damit effektive zielgerichtete Therapien deutlich erschwert. Diese sind zumeist nur auf eine spezifische Tumorzell-Subpopulation gerichtet, was zu einer Selektion und Anreicherung der resistenten Tumorzell-Subpopulationen führt. Das wiederum begünstigt die Tumorprogression sowie die Entstehung von Rezidiven (Diaz-Cano, 2012; Somasundaram *et al.*, 2012).



Burrell RA, Mc Granahan N, Bartek J, Swanton C (2013) Nature 501:338-45.

Abb.28: Schematische Darstellung der intertumoralen und intratumoralen Heterogenität.

Heterogenität besteht innerhalb eines Tumortyps zwischen den verschiedenen Individuen (=intertumorale Heterogenität) und innerhalb des Tumors selbst (= intratumorale Heterogenität). Dieser besteht aus zahlreichen Tumorzell-Subpopulationen, welche jeweils durch ein unterschiedliches Gen- und Proteinexpressionsmuster gekennzeichnet sind. Innerhalb einer Tumorzell-Subpopulation besteht interzelluläre Heterogenität aufgrund genetischer Instabilitäten, was wiederum die Entstehung neuer Tumorzell-Subpopulationen triggern kann.

Es konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden, dass eine große intratumorale Heterogenität bei Adenokarzinom-Patienten aufgrund Therapieresistenz mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Obulkasim *et al.*, 2016). Verschiedene spezifische Therapien sollten daher stets kombiniert werden, um möglichst viele Tumorzell-Subpopulationen anzugreifen und zu bekämpfen. Insgesamt steht der Unterschied in der *DKK1*-Expression zwischen den ösophagealen Adenokarzinomzelllinien *OE33* und *OE19* mit der Heterogenität der *in vivo* Daten im Einklang. Daher ist denkbar, dass nicht alle *EAC*-Patienten von einer zielgerichteten Therapie mit *DKK1* als therapeutischem Target gleichermaßen profitieren würden.

4.1.3. *DKK1* als ein Mediator der Karzinogenese im *EAC*

Nach der Transfektion einer Fibroblastenzelllinie mit *DKK1*-exprimierenden Plasmiden konnte interessanterweise eine erhöhte migratorische Aktivität der Zellen mittels *Matrigel-Invasion-Assay* detektiert werden, obwohl *DKK1* als ein Inhibitor des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs bekannt ist (Yamabuki *et al.*, 2007). Der Einbau von *DKK1*-exprimierenden Vektoren in ösophageale Plattenepithelkarzinomzellen führte dementsprechend zu vermehrter Zellproliferation und einer gesteigerten Invasionsfähigkeit (Li *et al.*, 2011). Zudem konnte bei einer humanen Pankreas-Adenokarzinomzelllinie eine reduzierte migratorische Aktivität der Karzinomzellen nach *DKK1-Knockdown* nachgewiesen werden (Takahashi *et al.*, 2010). Bei humanen Larynxkarzinomzellen führte der *DKK1-Knockdown* zu einer Hemmung der Zellproliferation, -migration und -invasion (Shi *et al.*, 2014). Auch bei humanen Cholangiokarzinomzellen zeigte sich nach *DKK1-Knockdown* eine herabgesetzte Migrations- und Invasionsfähigkeit, während die Proliferation jedoch unbeeinflusst blieb (Shi *et al.*, 2013). Ebenso konnte bei Hepatozellulären Karzinomzelllinien mittels *DKK1*-exprimierenden Vektoren sowie *DKK1-Knockdown* mehrfach gezeigt werden, dass *DKK1* die Migration und Invasion der Karzinomzellen fördert (Tung *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015). Die hierfür zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher unbekannt.

Als therapeutisches Target ist *DKK1* bereits beim Multiplen Myelom, Osteosarkom, Lungenkarzinom und Mammakarzinom *in vivo* untersucht worden (Fulciniti *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2010; Pozzi *et al.*, 2013; Iyer *et al.*, 2014; Göbel *et al.*, 2015; Goldstein *et al.*, 2016). So konnte z.B. in Mausmodellen die Behandlung von Tumor-*Xenografts* mit monoklonalen *DKK1*-Antikörpern (BHQ880) das Wachstum des Multiplen Myeloms hemmen sowie osteolytische Knochenmetastasen reduzieren (Fulciniti *et al.*, 2009; Pozzi *et al.*, 2013). Die aktive Impfung mit einem *DKK1*-DNA-Impfstoff konnte zudem *in vivo* nicht nur das Tumorwachstum hemmen, sondern sogar die Entstehung des Multiplen Myeloms verhindern (Qian *et al.*, 2012).

Die Studienergebnisse deuten allsamt darauf hin, dass *DKK1* in vielen humanen Tumoren einen wichtigen Mediator der Karzinogenese darstellt. Über die Funktion von *DKK1* im ösophagealen Adenokarzinom ist bisher jedoch wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Funktion von *DKK1* in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* untersucht. Dazu wurde zunächst eine Behandlung der *OE33*-Zellen mit *rhDKK1* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit *rhDKK1* keinen Effekt auf die endogene *DKK1*-Proteinexpression der *OE33*-Zellen hat. Diese wurde als ein indirektes Maß für die Zielgen-Expression im *Wnt/β-Catenin* Signalweg herangezogen (Niida *et al.*, 2004; Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005). Bei den *MTT*-Assays zeigte sich dementsprechend nach *rhDKK1*-Behandlung keine veränderte Zellviabilität. Daraus lässt sich schließen, dass das rekombinante humane *DKK1* in den *OE33*-Zellen in den verwendeten Konzentrationen (250 ng/ml, 500 ng/ml) vermutlich keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität im *Wnt/β-Catenin* Signalweg hat. Die starke endogene *DKK1*-Expression der *OE33*-Zellen selbst könnte jedoch zu einer Rezeptorblockade führen und so das Wirken von exogen appliziertem *rhDKK1* auf den *Wnt/β-Catenin* Signalweg und die Zellviabilität maskieren („*receptor exhaustion*“). Interessant ist, dass die *DKK1*-Proteinexpression der *OE33*-Zellen in 10%igem FKS-Medium im Vergleich zu den Kontrollzellen in 1%igem FKS-Medium sichtbar erhöht ist (Abb.10). FKS enthält eine komplexe Mischung zahlreicher Proteine, unter welchen sich neben Enzym-Inhibitoren und Hormonen auch eine große Menge an Wachstumsfaktoren befinden. Es könnte somit sein, dass *DKK1* in stärker proliferierenden *OE33*-Zellen höher exprimiert ist. Dies würde auf eine positive Korrelation zwischen *DKK1*-Expression und Tumorwachstum hindeuten.

Der weiterführenden Untersuchung der Funktion von *DKK1* diene der *DKK1-Knockdown* mittels *siRNA*-Transfektion. Die effektive Herunterregulation der endogenen *DKK1*-Expression der *OE33*-Zellen konnte mittels *Western Blot*, *RT-PCR*, *qRT-PCR* und *ELISA* bestätigt werden. Die *MTT-Assays* und die *Wound-Healing-Assays* zeigten eine deutlich herabgesetzte Zellviabilität (**= $p < 0,01$) und Motilität (**= $p < 0,001$) der *DKK1*-defizienten *OE33*-Zellen im Vergleich zu den *NT-siRNA*-Kontrollzellen. Beim ^3H -*Thymidine-Incorporation-Assay* konnte bei den *DKK1-Knockdown*-Zellen jedoch lediglich eine Tendenz hin zu einer niedrigeren Proliferationsrate detektiert werden, während das Invasionsverhalten der *DKK1*-defizienten *OE33*-Zellen im *Transmigration-Assay* im Vergleich zu den *NT-siRNA*-Kontrollzellen keine Veränderung zeigte.

Die umfassende Expressionsanalyse nach *DKK1-Knockdown* sollte eine molekulare Ursache für die detektierten phänotypischen Veränderungen aufdecken. Dazu wurden die Signalmoleküle des *Wnt*-Signalweges β -*Catenin* und *GSK3 β* , der *Wnt*-Korezeptor und *DKK1*-Rezeptor *LRP6*, die proliferationsfördernden Kinasen *Erk* und *Akt* sowie die apoptotischen Regulatoren *p53*, *BclxL* und *Caspase 3* mittels *Western Blot* Analyse untersucht (Abb.29). Es konnte zunächst eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von β -*Catenin* am Serin 552 nach *DKK1-Knockdown* detektiert werden (*= $p < 0,05$). Dies kann vermutlich auch auf das tendenziell verstärkte Vorhandensein von intrazellulärem „Gesamt“- β -*Catenin* nach *DKK1-Knockdown* zurückgeführt werden. Die Phosphorylierung von β -*Catenin* durch *Akt* und Proteinkinase A am Serin 552 kann eine nukleäre Akkumulation von β -*Catenin* induzieren und auf diese Weise dessen Transkriptionsaktivität steigern (Taurin *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007). Diese intrazelluläre Stabilisierung von β -*Catenin* ist interessant im Hinblick auf die Rolle von *DKK1* als *Wnt*-Inhibitor, erlaubt jedoch keine Aussage über die tatsächliche β -*Catenin*-Transkriptionsaktivität. Daher ist kein direkter Rückschluss auf die Aktivität im *Wnt*/ β -*Catenin* Signalweg und damit auf die Funktion von *DKK1* als *Wnt*-Inhibitor möglich. Wie bereits einleitend erwähnt, bildet *DKK1* mit dem löslichen Rezeptor *Kremen 1/2* und dem in der Zellmembranverankerten Rezeptor *LRP 5/6* einen ternären Komplex, welcher die Endozytose des gesamten *Frizzled-LRP5/6*-Rezeptorkomplexes induziert (Bafico *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2002). Eine verstärkte Proteinexpression von *LRP6* nach *DKK1-Knockdown* würde daher für eine Funktion von *DKK1* als *Wnt*-Inhibitor sprechen. Allerdings zeigte *LRP6* nach *DKK1-Knockdown* kein verändertes Expressionsmuster.

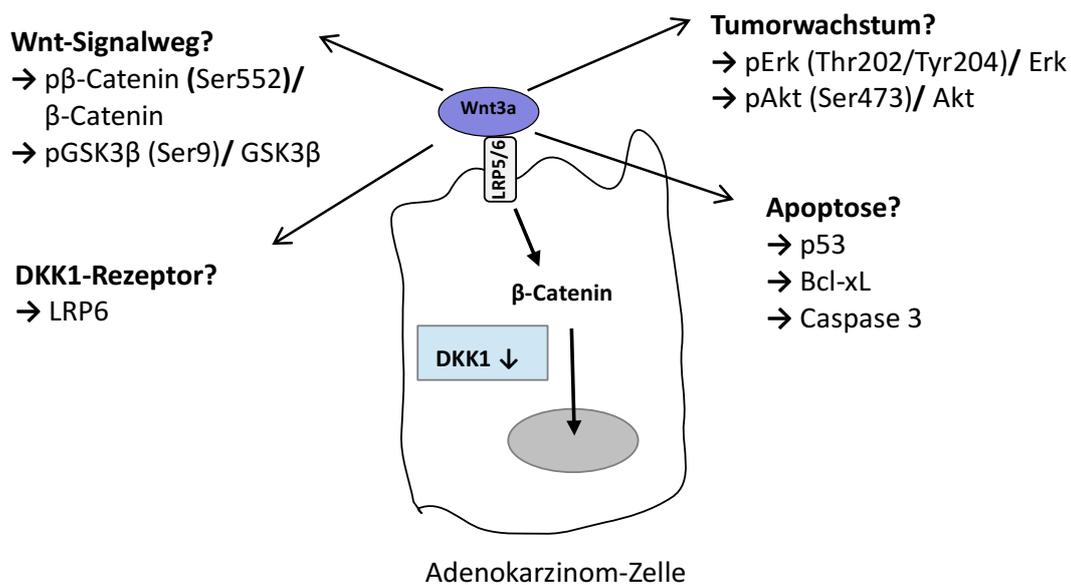


Abb.29: Schematische Darstellung der mittels *Western Blot* untersuchten molekularen Markern nach *DKK1-Knockdown*. Die *Western Blot* Analyse nach *DKK1-Knockdown* sollte die Aktivierung verschiedener Signalwege und Targetproteine aufzeigen. Sie legte ihren Fokus auf die Beeinflussung des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs, der *DKK1*-Rezeptorexpression, des Tumorwachstums und der Apoptoseregulation. Dazu wurde das Aktivierungsmuster der beiden Signalmoleküle des *Wnt*-Signalwegs *β-Catenin* und *GSK3β*, die Expression des *Wnt*-Korezeptors und *DKK1*-Rezeptors *LRP6*, das Aktivierungsmuster der proliferationsfördernden Kinasen *Erk* und *Akt*, das Aktivierungsmuster des Tumorsuppressorproteins *p53* sowie die Proteinexpression von *Bcl-xL* und *Caspase 3* untersucht.

Ebenso veränderte sich das Aktivierungsmuster von *p53* sowie die Proteinexpression von *BclxL* und *Caspase 3* nach *DKK1-Knockdown* nicht. *Caspase 3* ist ein Bestandteil der Enzymkaskade zur Einleitung der Apoptose und damit ein proapoptotischer Marker (Kurokawa und Kornbluth, 2009). *Bcl-xL* gehört zu der Familie der *Bcl2*-Proteine: Durch eine Stabilisierung der Mitochondrienmembran wirkt es antiapoptotisch, indem es die *Caspase*-Aktivierung über freigesetzte intramitochondriale Proteine verhindert (Arbel *et al.*, 2012). *p53* wird vom *TP53*-Tumorsuppressor-Gen kodiert und agiert als Transkriptionsfaktor, welcher nach *DNA*-Schädigungen intrazellulär akkumuliert (Latonen und Laiho, 2005). Über eine verstärkte Transkription der proapoptotischen *Bcl2*-Proteine führt er zu einer Induktion der Apoptose sowie über Produktion von *p21* zu einem Zellzyklusarrest, was wiederum die *DNA*-Reperatur begünstigt (Harris und Levine, 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch die Transkription von *DKK1* selbst durch *p53* induziert werden kann, was zunächst eine Rolle von *DKK1* in der Apoptoseregulation vermuten lässt (Wang *et al.*, 2000).

Bei der Proteinkinase *Akt* konnte eine signifikante Dephosphorylierung nach *DKK1-Knockdown* nachgewiesen werden ($*=p<0,05$), während die Proteinkinase *Erk* kein verändertes Aktivierungsmuster zeigte. Dieses Ergebnis ist von Relevanz, da die verstärkte Dephosphorylierung der Proteinkinase *Akt* eine molekulare Ursache für die reduzierte Zellviabilität und Motilität der *DKK1-Knockdown*-Zellen darstellen könnte. *Akt* ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, auch genannt Proteinkinase B, welche nach Aktivierung durch Phosphorylierung am Threonin 308 und am Serin 473 über die *PIP3*-abhängige *PDK1* die Zellmotilität steigert und damit die Karzinogenese entscheidend vorantreiben kann (Kim *et al.*, 2001; Chin und Toker, 2009). In Antwort auf den Insulin-Stimulus spielt *Akt* z.B. eine wichtige Rolle im Zellwachstum über die Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors *mTOR* (Navé *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass *mTOR* wiederum zu einer gesteigerten Migration, Invasion und Metastasierung von Karzinomzellen beitragen kann (Zhou und Huang, 2011). Die Proteinkinase *Akt* wird im ösophagealen Adenokarzinom überexprimiert, was mit einer schlechten Prognose für die *EAC*-Patienten assoziiert ist (Saeed *et al.*, 2016). Daher könnte *Akt* eine wichtige Rolle in der Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms spielen und mit der starken *DKK1*-Expression in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* in Zusammenhang stehen. Über eine Aktivierung *Wnt*-unabhängiger intrazellulärer Signalwege mit Beteiligung der Proteinkinase *Akt* könnte *DKK1* die Zellviabilität und Motilität der *OE33*-Zellen steigern und auf diese Weise zur Tumorprogression beitragen.

Neben *Akt* könnte zudem *p21* für die viabilitäts- und motilitätssteigernde Wirkung von *DKK1* mitverantwortlich sein. Mittels *qRT-PCR* konnte eine heraufregulierte Genexpression von *p21* nach *DKK1-Knockdown* nachgewiesen werden ($*=p<0,05$). Als ein Zielgen des Transkriptionsfaktors *p53* ist *p21* hauptsächlich für den durch *p53*-induzierten Zellzyklusarrest über eine Inhibition der *Cyclin*-Kinasen verantwortlich (el-Deiry *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993). Auch über eine Interaktion mit dem DNA-Replikations- und -Reparaturfaktor *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*) kann *p21* einen Zellzyklusarrest induzieren (Xiong *et al.*, 1992). Die heraufregulierte Genexpression von *p21* spricht daher für einen verstärkten Zellzyklusarrest nach *DKK1-Knockdown*. Da sich das Aktivierungsmuster von *p53* nach *DKK1-Knockdown* jedoch nicht verändert, muss *p21* hier über andere Wege reguliert werden.

Eventuell ist eine Inaktivierung von *p21* in dem durch *DKK1* getriggerten *Akt*-abhängigen Signalweg involviert. Rössing *et al.* (2001) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die *Akt*-abhängige Phosphorylierung von *p21* die Inhibition der *Cyclin*-Kinasen sowie die Interaktion mit dem *DNA*-Replikations- und Reparaturfaktor *PCNA* verhindert und somit die Induktion des Zellzyklusarrests gehemmt wird. Zhou *et al.* (2001) haben zudem nachgewiesen, dass *Akt* über eine Inaktivierung von *p21* das Tumorzellwachstum vorantreibt. Ein Zusammenspiel von der Proteinkinase *Akt* und *p21* ist in der Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms daher durchaus möglich.

Abbildung 30 stellt einen denkbaren durch *DKK1* getriggerten *Wnt*-unabhängigen Signalweg hypothetisch dar. Es wird angenommen, dass die *DKK1*-Überexpression im ösophagealen Adenokarzinom über noch unbekannte Mechanismen zu einer verstärkten Aktivierung der Kinase *Akt* führt, welche die Zellviabilität und Motilität der ösophagealen Adenokarzinomzellen fördert. Eine *Akt*-abhängige Inaktivierung von *p21* könnte zudem zu einer Inhibition des Zellzyklusarrests führen, was die *DNA*-Reparatur beeinträchtigt und das durch *Akt* geförderte Tumorzellwachstum weiter vorantreibt. *DKK1* könnte somit über eine Steigerung der Zellviabilität und Motilität ein Mediator der Karzinogenese im ösophagealen Adenokarzinom sein.

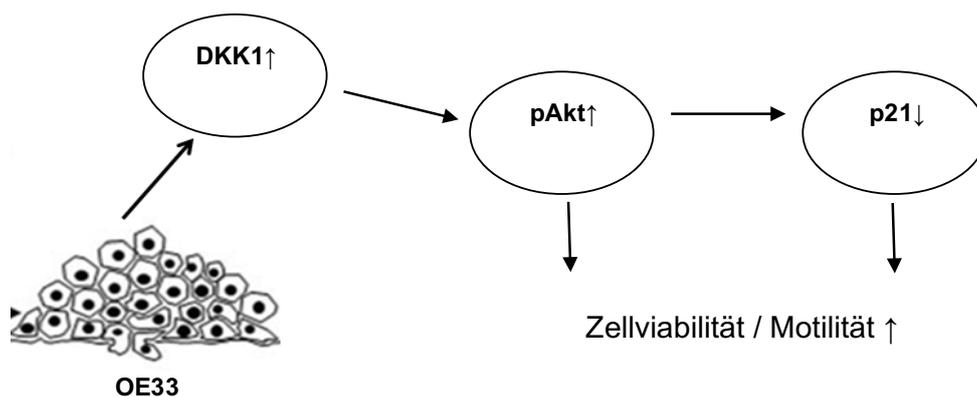


Abb.30: Schematische Darstellung eines denkbaren durch *DKK1* getriggerten *Wnt*-unabhängigen Signalwegs mit Beteiligung der Kinase *Akt* (hypothetisch). Die *DKK1*-Überexpression in den ösophagealen Adenokarzinomzellen könnte zu einer verstärkten Aktivierung der Proteinkinase *Akt* führen. Diese wiederum könnte direkt als auch indirekt über eine Inaktivierung von *p21* die Zellviabilität und Motilität der ösophagealen Adenokarzinomzellen steigern. *DKK1* könnte somit ein Mediator der Karzinogenese im ösophagealen Adenokarzinom sein.

4.1.4. Effekt von DKK1 auf die Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalwegs

Die Aktivität des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs nimmt in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz stetig zu (Bian *et al.*, 2000; Osterheld *et al.*, 2002; Clément *et al.*, 2006; Moyes *et al.*, 2012). Es ist noch unbekannt, welche Mechanismen für diese Heraufregulation verantwortlich sind. Einige regulatorische Moleküle des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs sind während der neoplastischen Progression von der Barrett-Metaplasie zum ösophagealen Adenokarzinom in ihrem Expressionsmuster verändert. So konnte z.B. eine Inaktivierung der löslichen *Wnt*-Inhibitoren *sFRP1* und *WIF1* durch Promotormethylierung im Stadium der Barrett-Metaplasie sowie eine Heraufregulation der Expression des *Wnt2a*-Genes während der neoplastischen Progression nachgewiesen werden (Clément *et al.*, 2006; Clément *et al.*, 2008). Lyros *et al.* (2015) haben bereits beschrieben, dass auch ein Verlust der inhibitorischen Funktion von *DKK1* im Stadium der Barrett-Metaplasie entscheidend zur aberranten Aktivierung des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs beitragen könnte. *DKK1* könnte daher einen relevanten Tumorsuppressor im ösophagealen Adenokarzinom darstellen.

Die Rolle von *DKK1* als ein Tumorsuppressor ist bereits beim kolorektalen Karzinom beschrieben: Im Gegensatz zu der *DKK1*-Überexpression, welche in vielen soliden humanen Tumoren detektiert werden kann, konnte beim kolorektalen Karzinom interessanterweise eine Herunterregulation der endogenen *DKK1*-Expression durch Promotormethylierung nachgewiesen werden (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005; Aguilera *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Die Folge ist ein fehlender negativer Rückkopplungs-Mechanismus von *DKK1*, was vermutlich zu der Heraufregulation des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs im kolorektalen Karzinom beiträgt (Gonzalez-Sancho *et al.*, 2005). Dieser wiederum treibt die Migration, Invasion und Metastasierung der Kolonkarzinomzellen voran (Brabletz *et al.*, 1999; Hlubek *et al.*, 2004). Für das Hepatozelluläre Karzinom, Mammakarzinom und Larynxkarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass die *DKK1*-Überexpression mit einer Akkumulation von intrazellulärem β -Catenin assoziiert ist (Yu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014). Dies wiederum deutet auf einen defekten negativen Rückkopplungs-Mechanismus hin. Ein Funktionsverlust von *DKK1* als ein *Wnt*-Inhibitor bei gleichzeitig bestehender *DKK1*-Überexpression ist in der Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms daher durchaus denkbar.

Die Behandlung der OE33-Zellen mit *rhDKK1* hat bereits gezeigt, dass *DKK1* in den OE33-Zellen vermutlich keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität im *Wnt/β-Catenin* Signalweg hat. Nach *DKK1-Knockdown* ist es allerdings zu einer intrazellulären Stabilisierung von *β-Catenin* gekommen, während sich die Proteinexpression des *Wnt*-Korezeptors und *DKK1*-Rezeptors *LRP6* im Vergleich zu den *NT-siRNA*-Kontrollzellen nicht veränderte. Schließlich konnte gezeigt werden, dass der *DKK1-Knockdown* keinen Einfluss auf die Genexpression der *Wnt*-Zielgene *Axin II* und *Cyclin D1* hat. Das bedeutet, dass *DKK1*, trotz der mittels *Western Blot* detektierten intrazellulären Stabilisierung von *β-Catenin* nach *DKK1-Knockdown*, keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität im *Wnt/β-Catenin* Signalweg hat. Dies konnte bereits in Voruntersuchungen mit den OE33-Zellen gezeigt werden: Während noch in der metaplastischen Barrett-Epithelzelllinie *CP-A* nach *DKK1-Knockdown* eine verstärkte *β-Catenin*-Transkriptionsaktivität mittels *Luciferase-Assay* nachgewiesen werden konnte, veränderte sich die *β-Catenin*-Transkriptionsaktivität bei den OE33-Zellen nach *DKK1-Knockdown* nicht (Lyros *et al.*, 2015). Der Funktionsverlust von *DKK1* als ein *Wnt*-Inhibitor könnte für die Heraufregulation des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs im ösophagealen Adenokarzinom mitverantwortlich sein und somit, unabhängig von den durch *DKK1* getriggerten Signalwegen, die Karzinogenese vorantreiben.

Insgesamt scheint *DKK1* im ösophagealen Adenokarzinom eine Doppelfunktion zu besitzen: Auf der einen Seite agiert *DKK1* als ein Tumorsuppressor, indem es der Heraufregulation des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs im Stadium der Barrett-Metaplasie entgegenwirkt. Auf der anderen Seite kann *DKK1* über eine Aktivierung *Wnt*-unabhängiger Signalwege die Viabilität und Motilität der ösophagealen Adenokarzinomzellen steigern. Auch im kolorektalen Karzinom ist das Verhalten von *DKK1* paradox. Trotz der nachweislich herunterregulierten endogenen *DKK1*-Expression im kolorektalen Karzinom konnten bei Kolonkarzinom-Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien erhöhte *DKK1*-Serumkonzentrationen detektiert werden (Gurluler *et al.*, 2014). Diese gehen vermutlich mit der gesteigerten Invasionsfähigkeit, Dedifferenzierung und Metastasierung des Tumors einher und weisen daher auf das Potential von *DKK1* als ein Mediator der Karzinogenese.

4.1.5. Effekt von Wnt3a auf die Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalwegs

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen eine fortschreitende Dysregulation des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs während der neoplastischen Progression zum ösophagealen Adenokarzinom erkennen. Die Steuerung und Kontrolle des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs entzieht sich zunehmend dem üblichen *Wnt*-Inhibitor *DKK1*. Unklar ist allerdings noch, in welchem Ausmaß der Verlust der inhibitorischen Funktion von *DKK1* zu einer Heraufregulation des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs führt und welche anderen Faktoren, wie z.B. *Wnt*-unabhängige aktivierende Phosphorylierungen von β -Catenin durch Tyrosinkinasen (Brembeck *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; van Veelen *et al.*, 2011), *E-Cadherin*-Verlust (Bailey *et al.*, 1998) oder auch eine Inaktivierung der löslichen *Wnt*-Inhibitoren *sFRP1* und *WIF1* sowie eine *Wnt2a*-Überexpression (Clément *et al.*, 2006; Clément *et al.*, 2008) möglicherweise dazu beitragen. Vermutlich ist eine multifaktorielle Steuerung des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs anzunehmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Behandlung der *DKK1-Knockdown-OE33*-Zellen mit *rhWnt3a* zu keinem veränderten Aktivierungsmuster von *GSK3 β* führt. Zusammen mit der an *Axin* gebundenen *Casein Kinase 1 (CK1)* ist *GSK3 β* für die Phosphorylierung von zytoplasmatischem β -Catenin, und damit für dessen Degradation durch proteasomalen Abbau, zuständig (Aberle *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002). Die Aktivität von *GSK3 β* kann durch *Akt*-vermittelte Phosphorylierung am Serin 9 gehemmt werden (Cross *et al.*, 1995; Srivastava und Pandey, 1998). Eine verstärkte Phosphorylierung von *GSK3 β* am Serin 9 könnte daher mit einer Heraufregulation des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs einhergehen. Bei der Bestimmung der *Wnt*-Zielgen-Expression mittels *qRT-PCR* konnte im Einklang mit dem unveränderten Aktivierungsmuster von *GSK3 β* gezeigt werden, dass sich die Expression der *Wnt*-Zielgene *Axin II* und *CyclinD1* nach Behandlung mit *rhWnt3a* im Vergleich zu den unbehandelten *OE33*-Zellen nicht verändert. Damit übereinstimmend zeigte auch die Zellviabilität durch die Behandlung mit *rhWnt3a* keine Veränderung im Vergleich zu den unbehandelten *OE33*-Zellen. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass sich die Aktivität des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs durch die Behandlung mit *rhWnt3a* nicht beeinflussen oder steigern lässt. *Wnt3a* hat vermutlich auf Grund der konsekutiven Aktivierung des *Wnt/ β -Catenin* Signalwegs in den *OE33*-Zellen seine Funktion als ein Hauptaktivator verloren.

4.2. Ausblick

Zu den während der neoplastischen Progression erworbenen tumorspezifischen Eigenschaften gehören die Fähigkeit zur Proliferation sowie zur Invasion und Metastasierung, die Resistenz gegenüber der Apoptose, die Beseitigung von Wachstumsinhibitoren, die Etablierung einer replikativen Immortalität und die Induktion der Angiogenese (Hanahan und Weinberg, 2011). Ein Tumor ist demnach mehr als eine homogene proliferierende Zellmasse und besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, in denen je nach Mikromilieu bestimmte Signalwege und damit einhergehende Eigenschaften dominieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *DKK1* die Zellviabilität und Motilität ösophagealer Adenokarzinomzellen (*OE33*-Zellen) fördert. Weitere auf diese Ergebnisse aufbauende Experimente könnten die klinische Relevanz von *DKK1* als ein Mediator der Karzinogenese im ösophagealen Adenokarzinom weiterführend untersuchen. Denkbar wären *in vivo* Experimente in Mausmodellen mit Tumor-*Xenografts* unter Verwendung von *DKK1*-Antikörpern. Ebenso wäre eine Betrachtung der Chemosensitivität der *OE33*-Zellen nach *DKK1-Knockdown* vielversprechend für zukünftige Therapieansätze. Die ösophageale Adenokarzinomzelllinie *OE19* weist trotz des fortgeschrittenen Tumorstadiums eine wesentlich niedrigere *DKK1*-Expression als die *OE33*-Zellen auf. Der modellhafte Vergleich beider Zelllinien könnte hier einen Beitrag zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen *DKK1*-Expression und Zellmotilität leisten. Auch der Einfluss von *DKK1* auf Stroma- und Endothelzellen kann untersucht werden, um seinen parakrinen Effekt auf das Tumormikromilieu aufzuklären. Weitere Fragen, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr beantwortet werden konnten, sind: Warum wird *DKK1* im ösophagealen Adenokarzinom hoch exprimiert? Spielen vielleicht neben dem heraufregulierten *Wnt/β-Catenin* Signalweg auch inflammatorische Mediatoren, wie z.B. *TNFα*, eine Rolle?

Die in dieser Arbeit aufgezeigten interindividuellen Unterschiede im *DKK1*-Expressionsmuster könnten in Kombination mit der großen intratumoralen Heterogenität des ösophagealen Adenokarzinoms limitierende Faktoren für Therapieansätze sein. Im Hinblick auf die Funktion von *DKK1* als ein potentieller serologischer Biomarker ist die weiterführende Patientenrekrutierung mit dem Ziel größerer Stichprobenzahlen von großer klinischer Relevanz.

5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Das DKK1-Signalmolekül in der Karzinogenese des Barrett-assoziierten ösophagealen Adenokarzinoms

Eingereicht von Ann-Kristin Lamprecht

Angefertigt am Universitätsklinikum Leipzig AöR,
Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Betreut von Prof. Dr. Ines Gockel und Dr. Orestis Lyros

März 2017

Die Inzidenz des Barrett-assoziierten ösophagealen Adenokarzinoms (*EAC*) steigt in den westlichen Ländern stetig an. Die molekularen Mechanismen in der Pathophysiologie während der neoplastischen Progression von der Barrett-Metaplasie zum Adenokarzinom sind jedoch weitgehend unbekannt. Das Gen Dickkopf 1 (*DKK1*) kodiert für ein Sekretionsprotein, welches den *Wnt/β-Catenin* Signalweg inhibiert. *DKK1*, welches auch ein *Wnt*-Zielgen ist, ist parallel zum konsekutiv aktiven *Wnt/β-Catenin* Signalweg im *EAC* überexprimiert. Daher ist für *DKK1* im *EAC* ein defekter negativer Rückkopplungs-Mechanismus anzunehmen. Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendung von *DKK1* als einen serologischen Biomarker und die Rolle von *DKK1* in der Tumorbologie anhand eines *in vitro* Zellkultur-Modells zu untersuchen.

Die *DKK1*-Serumkonzentrationen von *EAC*-Patienten (n=18) wurden mittels *ELISA* vor und nach der chirurgischen Tumorresektion bestimmt und mit dem histopathologischen Tumorstadium (*TNM*-Klassifikation) sowie mit dem Differenzierungsgrad der ösophagealen Karzinomzellen (*Grading*) korreliert. Die *DKK1*-Serumkonzentrationen von Barrett-Metaplasie-Patienten (n=18) und gesunden Kontrollpersonen (n=17) wurden ebenfalls bestimmt und in die Analyse mit einbezogen. Die ösophagealen Plattenepithelzelllinien *EPC1-hTERT* und *EPC2-hTERT*, die nicht-dysplastische Barrett-Epithelzelllinie *CP-A* und die *HGD*-Barrett-Epithelzelllinie *CP-B*, als auch die beiden ösophagealen Adenokarzinomzelllinien *OE33* und *OE19* wurden für die Expression und Sekretion von *DKK1* mittels *RT-PCR*, *qRT-PCR* und *Western Blot* charakterisiert. Die Funktion von *DKK1* wurde in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* durch Behandlung mit *rhDKK1* und *rhWnt3a* sowie mittels spezifischem *siRNA*-vermitteltem *Knockdown* untersucht.

Die *DKK1*-Konzentrationen im Blutserum der gesunden Kontrollpersonen, Barrett-Metaplasie-Patienten und *EAC*-Patienten zeigten keine signifikanten Unterschiede, obwohl bei den *EAC*-Patienten deutlich höhere Maximalkonzentrationen von *DKK1* detektiert werden konnten als bei den gesunden Kontrollpersonen. Nach der chirurgischen Tumorsektion zeigten die *EAC*-Patienten eine Tendenz hin zu niedrigeren *DKK1*-Serumkonzentrationen. Die Ausdehnung des Primärtumors, der Ausmaß des Lymphknotenbefalls und der Differenzierungsgrad der Karzinomzellen hatten jedoch keinen Einfluss auf die *DKK1*-Serumkonzentrationen. Die ösophageale Adenokarzinomzelllinie *OE33* zeigte von allen ösophagealen Zelllinien die stärkste *DKK1*-Expression. Eine Stimulation mit exogenem *rhDKK1* hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des *Wnt/β-Catenin* Zielgens *DKK1* und die Zellviabilität, während eine Herunterregulation der endogenen *DKK1*-Expression mittels *siRNA*-vermitteltem *Knockdown* zu einer deutlichen Hemmung der Zellviabilität und Motilität der *OE33*-Zellen führte. Es zeigte sich eine intrazelluläre Stabilisierung von *β-Catenin* bei unveränderter *Wnt*-Zielgenexpression und eine signifikante Dephosphorylierung von der Kinase *Akt* (*= $p < 0,05$). Außerdem konnte eine Zunahme in der Genexpression von *p21* detektiert werden. Die Behandlung der *DKK1-Knockdown-OE33*-Zellen mit *rhWnt3a* führte zu keinem veränderten Aktivierungsmuster von *GSK3β* und hatte zudem keinen Einfluss auf die *Wnt*-Zielgenexpression und die Zellviabilität.

Es konnte gezeigt werden, dass *DKK1* in der ösophagealen Adenokarzinomzelllinie *OE33* *Wnt*-unabhängige intrazelluläre Signalwege reguliert, welche die Zellviabilität und Motilität der Karzinomzellen steigern. Über noch unbekannte Mechanismen kommt es dabei zu einer verstärkten Aktivierung der Kinase *Akt*, welche ihrerseits, vermutlich auch über eine Inaktivierung von *p21*, eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie spielt. Der Verlust der inhibitorischen Funktion von *DKK1* im Stadium der Barrett-Metaplasie könnte zudem für die Heraufregulation des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs mitverantwortlich sein und auf diese Weise zusätzlich zur Tumorprogression beitragen. *Wnt3a* hingegen hat vermutlich auf Grund der konsekutiven Aktivierung des *Wnt/β-Catenin* Signalwegs in den *OE33*-Zellen seine Funktion als ein Hauptaktivator verloren. Die weiterführende Untersuchung von *DKK1* als ein Mediator der Karzinogenese im ösophagealen Adenokarzinom ist von großer klinischer Relevanz. Ebenfalls sind im Hinblick auf die Funktion von *DKK1* als ein potentieller serologischer Biomarker größere klinische Studien notwendig.

6. Literaturverzeichnis

Abate E, DeMeester SR, Zehetner J, Oezcelik A, Ayazi S, Costales J, Banki F, Lipham JC, Hagen JA, DeMeester TR. Recurrence after esophagectomy for adenocarcinoma: defining optimal follow-up intervals and testing. *J Am Coll Surg* 2010;210:428-35.

Abdel-Latif MM, Duggan S, Reynolds JV, Kelleher D. Inflammation and esophageal carcinogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:396-404.

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997;16:3797–3804.

Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, González-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006;25:4116–21. doi: 10.1038/sj.onc.1209439

Ali I, Raffiee P, Hogan WJ, Jacob HJ, Komorowski RA, Haasler GB, Shaker R. Dickkopf homologs in squamous mucosa of esophagitis patients are overexpressed compared with Barrett's patients and healthy controls. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1437-48.

American Gastroenterological Association, Spechler SJ, Sharma P, Souza RF, Inadomi JM, Shaheen NJ. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 2011;140:1084-91.

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Sushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CK1 phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 2002;16:1066-76.

Anderson LA, Murray LJ, Murphy SJ, Fitzpatrick DA, Johnston BT, Watson RG, McCarron P, Gavin AT. Mortality in Barrett's oesophagus: results from a population based study. *Gut* 2003;52:1081–4.

Arbel N, Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J Biol Chem* 2012;287:23152-61.

Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6. *Nat Cell Biol* 2001;3:683-6.

Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N, Barr H, Warner P, Jankowski J. Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. *Am J Pathol* 1998;152:135-44.

Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ, Mapstone N, Briggs JA, Forman D, Wild CP. Prospective study of cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: Association with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1316-21.

Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg* 1950;38:175-82.

Begenik H, Kemik AS, Emre H, Dulger AC, Demirkiran D, Ebinc S, Kemik O. The association between seum Dickkopf-1 levels and esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Exp Toxicol* 2014;33:785-8.

Behrens A, Pech O, Graupe F, May A, Lorenz D, Ell C. Barrett's adenocarcinoma of the esophagus – better outcomes through new methods of diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:313-9.

Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT, Fontolliet C, Benhattar J. Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2000;114:583–90.

Bian YS, Osterheld MC, Fontolliet C, Bosman FT, Benhattar J. P16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 2002;122:1113-21.

Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103:311–20.

Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 2004;166:37–47.

Blaser MJ. Disappearing microbiota: Helicobacter pylori protection against esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008;1:308–11.

- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T.** beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999;155:1033-8.
- Bradford MM.** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W.** Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:51–59.
- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C.** The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013;501:338-45.
- Calle EE, Kaaks R.** Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4:579–91.
- Cameron AJ, Lomboy CT, Pera M, Carpenter HA.** Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 1995;109:1541-6.
- Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS.** The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985;313:857-9.
- Cen P, Banki F, Cheng L, Khalil K, Du XL, Fallon M, Amato RJ, Kaiser LR.** Changes in age, stage distribution, and survival of patients with esophageal adenocarcinoma over three decades in the United States. *Ann Surg Oncol* 2012;19:1685-91.
- Chae WJ, Ehrlich AK, Chan PY, Teixeira AM, Henegariu O, Hao L, Shin JH, Park JH, Tang WH, Kim ST, et al.** The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 2016;44:246-58.
- Chak A, Falk G, Grady WM, Kinnard M, Elston R, Mittal S, King JF, Willis JE, Kondru A, Brock W, Barnholtz-Sloan J.** Assessment of familiarity, obesity, and other risk factors for early age of cancer diagnosis in adenocarcinomas of the esophagus and gastroesophageal junction. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1913-21.
- Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE.** FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J* 2005;24: 73–84.
- Chao DL, Sanchez CA, Galipeau PC, Blount PL, Paulson TG, Cowan DS, Ayub K, Odze RD, Rabinovitch PS, Reid BJ.** Cell proliferation, cell cycle abnormalities, and cancer outcome in patients with Barrett's esophagus: a long-term prospective study. *Clin Cancer Res* 2008;14:6988–95.
- Chen L, Li M, Li Q, Wang CJ, Xie SQ.** DKK1 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion through β -catenin/MMP7 signaling pathway. *Mol Cancer* 2013;12:157. doi: 10.1186/1476-4598-12-157.
- Chen X, Jiang K, Fan Z, Liu Z, Zhang P, Zheng L, Peng N, Tong J, Ji G.** Aberrant expression of Wnt and Notch signal pathways in Barrett's esophagus. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:473–83.
- Chin YR, Toker A.** Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 2009;21:470-6.
- Choi YW, Heath EI, Heitmiller R, Forastiere AA, Wu TT.** Mutations in β -Catenin and APC Genes are Uncommon in Esophageal and Esophagogastric Junction Adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2000;13:1055-9.
- Chong IY, Cunningham D, Barber LJ, Campbell J, Chen L, Kozarewa I, Fenwick K, Assiotis I, Guettler S, Garcia-Murillas I, et al.** The genomic landscape of oesophagogastric junctional adenocarcinoma. *J Pathol* 2013;231:301-10.
- Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, et al.** An inverse relation between cagA+ strains of Helicobacter pylori infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998a;58:588–90.
- Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, Dubrow R, Schoenberg JB, Mayne ST, Farrow DC, et al.** Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1998b;90:150–5.
- Clément G, Braunschweig R, Pasquier N, Bosman FT, Benhattar J.** Alterations of the Wnt signaling pathway during the neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Oncogene* 2006;25:3084-92.
- Clément G, Guilleret I, He B, Yagui-Beltrán A, Lin YC, You L, Xu Z, Shi Y, Okamoto J, Benhattar J, et al.** Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promotor occurs early in the carcinogenesis of Barrett's esophagus. *Cancer Sci* 2008;99:46-53.

- Conio M, Cameron AJ, Romero Y, Branch CD, Schleck CD, Burgart LJ, Zinsmeister AR, Melton LJ 3rd, Locke GR 3rd.** Secular trends in the epidemiology and outcome of Barrett's oesophagus in Olmsted County, Minnesota. *Gut* 2001;48:304-9.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-9.
- Darlavoix T, Seelentag W, Yan P, Bachmann A, Bosman FT.** Altered expression of CD44 and DKK1 in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2009;454:629-37.
- Diaz-Cano SJ.** Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design. *Int J Mol Sci* 2012;13:1951-2011.
- Dong LL, Qu LY, Chu LY, Zhang XH, Liu YH.** Serum level of DKK-1 and its prognostic potential in non-small cell lung cancer. *Diagn Pathol* 2014;9:52. doi: 10.1186/1746-1596-9-52.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI.** α -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 2005;123:903-15.
- Duffy AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.** Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. In: Harmey JH, editor. *VEGF and Cancer*. Springer Science & Business Media; 2004. pp133-144.
- Dulai GS, Guha S, Kahn KL, Gornbein J, Weinstein WM.** Preoperative prevalence of Barrett's esophagus in esophageal adenocarcinoma: A systematic review. *Gastroenterol* 2002;122:26-33.
- Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, Fox C, Stewart C, Bandla S, Imamura Y, Schumacher SE, Shefler E, et al.** Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet* 2013;45:478-86.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
- El-Serag HB, Kvapil P, Hacken-Bitar J, Kramer JR.** Abdominal obesity and the risk of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2151-6.
- El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J.** Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2014;63:871-80.
- Evans SC, Gillis A, Geldenhuys L, Vaninetti NM, Malatjalian DA, Porter GA, Guernsey DL, Casson AG.** Microsatellite instability in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Lett* 2004;212:241-51.
- Fang D., Hawke D., Zheng Y., Xia Y., Meisenhelder J., Nika H., Mills G.B., Kobayashi R., Hunter T., Lu Z.** Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 2007;282:11221-9.
- Farrow DC, Vaughan TL.** Determinants of survival following the diagnosis of esophageal adenocarcinoma (United States). *Cancer Causes Control* 1996;7:322-7.
- Fernandes ML, Seow A, Chan YH, Ho KY.** Opposing trends in incidence of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in a multi-ethnic Asian country. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1430-6.
- Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G.** Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest* 1996;98:2120-8.
- Ford AC, Forman D, Reynolds PD, Cooper BT, Moayyedi P.** Ethnicity, gender, and socioeconomic status as risk factors for esophagitis and Barrett's esophagus. *Am J Epidemiol* 2005;162:454-60.
- Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, Tanguay S, Lapointe R.** The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer* 2007;96:646-53.
- Fouad YM, Mohamed HI, Kamal EM, Rasek MA.** Clinical significance and diagnostic value of serum dickkopf-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 2016;51:1133-7.
- Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, Shen Z, Patel N, Tai YT, Chauhan D.** Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood* 2009;114: 371-9. doi: 10.1182/blood-2008-11-191577.

Galipeau PC, Li X, Blount PL, Maley CC, Sanchez CA, Odze RD, Ayub K, Rabinovitch PS, Vaughan TL, Reid BJ. NSAIDs modulate CDKN2A, TP53, and DNA content risk for future esophageal adenocarcinoma. *PLoS Med* 2007;4:e67.

Gerson LB, Shetler K, Triadafilopoulos G. Prevalence of Barrett's esophagus in asymptomatic individuals. *Gastroenterol* 2002;123:461-7.

Gharakhani P, Fitzgerald RC, Vaughan TL, Palles C, Gockel I, Tomlinson I, Buas MF, May A, Gerges C, Anders M, et al. Genome-wide association studies in oesophageal adenocarcinoma and Barrett's oesophagus: a large scale meta-analysis. *Lancet Oncol* 2016;17:1363-73.

Göbel A, Browne AJ, Thiele S, Rauner M, Hofbauer LC, Rachner TD. Potentiated suppression of Dickkopf-1 in breast cancer by combined administration of the mevalonate pathway inhibitors zoledronic acid and statins. *Breast Cancer Res Treat* 2015;145:623-31.

Goldstein SD, Trucco M, Guzman WB, Hayashi M, Loeb DM. A monoclonal antibody against the Wnt signaling dickkopf-1 inhibits osteosarcoma metastasis in a preclinical model. *Oncotarget* 2016;7:21114-23.

Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A. The wnt antagonist dickkopf-1 gene is a downstream target of beta-catenin/tcf and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 2005;24:1098-103.

Gregorieff A, Grosschedl R, Clevers H. Hindgut defects and transformation of the gastro-intestinal tract in *Tcf4(-/-)/Tcf1(-/-)* embryos. *EMBO J* 2004;23:1825-33.

Guo Y, Mishra A, Howland E, Zhao C, Shukla D, Weng T, Liu L. Platelet-derived Wnt antagonist Dickkopf-1 is implicated in ICAM-1/VCAM-1-mediated neutrophilic acute lung inflammation. *Blood* 2015;126:2220-9.

Gurluler E, Tumay LV, Guner OS, Kucukmetin NT, Hizli B, Zorluoglu A. The role of preoperative serum levels for Dickkopf-related protein 1 as a potential marker of tumor invasion in patients with stage II and III colon cancer. *Eur Rev Pharmacol Sci* 2014;18:1742-7.

Hage M, Siersema PD, van Dekken H, Steyerberg EW, Dees J, Kuipers EJ. Oesophageal cancer incidence and mortality in patients with long-segment Barrett's oesophagus after a mean follow-up of 12.7 years. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:1175-9.

Haggitt RC, Tryzelaar J, Ellis FH, Colcher H. Adenocarcinoma complicating columnar epithelium-lined (Barrett's) esophagus. *Am Clin Pathol* 1978;70:1-5.

Hameeteman W, Tytgat GNJ, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1989;96:1249-56.

Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005;143:199-211.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.

Harada H, Nakagawa H, Oyama K, Takaoka M, Andl CD, Jacobmeier B, von Werder A, Enders GH, Opitz OG, Rustgi AK. Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation. *Mol Cancer Res* 2003;1:729-38.

Hardy R, Juarez M, Naylor A, Tu J, Rabbitt EH, Filer A, Stewart PM, Buckley CD, Raza K, Cooper MS. Synovial DKK1 expression is regulated by local glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R226.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005;24:2899-908.

Hayward J. The lower end of the oesophagus. *Thorax* 1961;16:36-41.

He S, Lu Y, Liu X, Huang X, Keller ET, Qian CN, Zhang J. Wnt3a: functions and implications in cancer. *Chin J Cancer* 2015;34:554-62.

He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T et al. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 2007;39:189-98.

Heitmiller RF, Sharma RR. Comparison of prevalence and resection rates in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:130-6.

Henrik SJ, Forsgren A, Berglund G, Florén CH. Helicobacter pylori infection is associated with a decreased risk of developing oesophageal neoplasma. *Helicobacter* 2001;6:310-16.

Hlubek F, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2004;108:321-6.

Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Sem Rad Oncol* 2007;17:2-9.

Huang Y, Yang X, Zhao F, Shen Q, Wang Z, Lv X, Hu B, Yu B, Fan J, Qin W. Overexpression of Dickkopf-1 predicts poor prognosis for patients with hepatocellular carcinoma after orthotopic liver expression by promoting cancer metastasis and recurrence. *Med Oncol* 2014;31:966. doi: 10.1007/s12032-014-0966-8.

Hulscher JB, van Sandick JW, Tijssen JG, Obertop H, van Lanschoot JJ. The recurrence pattern of esophageal carcinoma after transhiatal resection. *J Am Coll Surg* 2000;191:143-8.

Hur C, Miller M, Kong CY, Dowling EC, Nattinger KJ, Dunn M, Feuer EJ. Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality. *Cancer* 2013;119:1149-58.

Iyer SP, Beck JT, Stewart AK, Shah J, Kelly KR, Isaacs R, Bilic S, Sen S, Munshi NC. A Phase IB multicentre dose-determination study of BHK880 in combination with anti-myeloma therapy and zoledronic acid in patients with relapsed or refractory multiple myeloma and prior skeletal-related events. *Br J Haematol* 2014;167:366-75.

Jang ES, Jeong SH, Kim JW, Choi YS, Leissner P, Brechot C. Diagnostic Performance of Alpha-Fetoprotein, Protein Induced by Vitamin K Absence, Osteopontin, Dickkopf-1 and Its Combinations for Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2016;11:e0151069. doi: 10.1371/journal.pone.0151069.

Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999;154:965-973.

Jiang T, Huang L, Zhang S. DKK-1 in serum as a clinical and prognostic factor in patients with cervical cancer. *Int J Biol Markers* 2013;28:221-5. doi: 10.5301/jbm.5000005.

Juarez M, McGettrick HM, Scheel-Toellner D, Yeo L, Spengler J, de Paz B, Hardy R, Cooper M, Raza K, Buckley CD, et al. DKK1 expression by synovial fibroblasts in very early rheumatoid arthritis associates with lymphocyte adhesion in an in vitro flow co-culture system. *Arthritis Res Ther* 2016;18:14. doi: 10.1186/s13075-016-0915-3.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;24:2137-50.

Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2013;108:308-28.

Kaur N, Chettiar S, Rathod S, Rath P, Muzumdar D, Shaikh ML, Shiras A. Wnt3a mediated activation of Wnt/ β -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Mol Cell Neurosci* 2013;54:44-57.

Kerkhof M, Steyerberg EW, Kusters JG, van Dekken H, van Vuuren AJ, Kuipers EJ, Siersema PD. Aneuploidy and high expression of p53 and Ki67 is associated with neoplastic progression Barrett esophagus. *Cancer Biomark* 2008;4:1-10.

Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J* 2001;15:1953-62.

Kim SU, Park JH, Kim HS, Lee JM, Lee HG, Kim H, Choi SH, Baek S, Kim BK, Park JY, et al. Serum Dickkopf-1 as a Biomarker for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Yonsei Med J* 2015;56:1296-306.

Konda VJ, Ross AS, Ferguson MK, Hart JA, Lin S, Naylor K, Noffsinger A, Posner MC, Dye C, Cislo B, et al. Is the risk of concomitant invasive esophageal cancer in high-grade dysplasia in Barrett's esophagus overestimated? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:159-64.

Kong J, Crissey MA, Funakoshi S, Kreindler JL, Lynch JP. Ectopic Cdx2 expression in murine esophagus models an intermediate stage in the emergence of Barrett's esophagus. *PLoS One* 2011a;6:e18280.

Kong J, Crissey MA, Stairs DB, Sepulveda AR, Lynch JP. Cox2 and beta-catenin/T-cell factor signaling intestinalize human esophageal keratinocytes when cultured under organotypic conditions. *Neoplasia* 2011b;13:792-805.

Kong J, Nakagawa H, Isariyawongse BK, Funakoshi S, Silberg DG, Rustgi AK, Lynch JP. Induction of intestinalization in human esophageal keratinocytes is a multistep process. *Carcinogenesis* 2009;30:122-30.

Koop H. Reflux disease and Barrett's esophagus. *Endoscopy* 2000;32:101-7.

- Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robinson K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, et al.** Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 1999;238:301-13.
- Kubo A, Corley DA.** Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:872-8.
- Kurokawa M, Kornbluth S.** Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell* 2009;138:838-54.
- Labenz J, Koop H, Tannapfel A, Kiesslich H, Hölscher AH.** The epidemiology, diagnosis and treatment of Barrett's carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112:224-34. doi: 10.3238/arztebl.2015.0224.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5. doi: 10.1038/227680a0.
- Lagergren J, Bergström R, Lingren A, Nyrén O.** Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999;340:825-31.
- Latonen L, Laiho M.** Cellular UV damage responses—functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755:71-89.
- Lee N, Smolarz AJ, Olson S, David O, Reiser J, Kutner R, Daw NC, Prockop DJ, Horwitz EM, Gregory CA.** A potential role for Dkk-1 in the pathogenesis of osteosarcoma predicts novel diagnostic and treatment strategies. *Br J Cancer* 2007;97:1552-9.
- Li S, Qin X, Liu B, Sun L, Zhang X, Li Z, Shan B, You J, Zhou Q.** Dickkopf-1 is involved in invasive growth of esophageal cancer cells. *J Mol Histol* 2011;42:491-8.
- Lickert H., Domon C., Huls G., Wehrle C., Duluc I., Clevers H., Meyer B.I., Freund J.N., Kemler R.** Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development* 2000;127:3805-13.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X.** Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837-47.
- Liu QR, Li YF, Deng ZQ, Cao JQ.** Prognostic Significance of Dickkopf-1 in Gastric Cancer Survival: A Meta-Analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2016;20:170-5. doi: 10.1089/gtmb.2015.0154.
- Liu Y, Tang W, Xie L, Wang J, Deng Y, Peng Q, Zhai L, Li S, Qin X.** Prognostic significance of dickkopf-1 overexpression in solid tumors: a meta-analysis. *Tumor Biol* 2014;35:3145-54.
- Liu Z, Sun B, Qi L, Li Y, Zhao X, Zhang D, Zhang Y.** Dickkopf-1 expression is down-regulated during the colorectal adenoma-carcinoma sequence and correlates with reduced microvessel density and VEGF expression. *Histopathology* 2015;67:158-66.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- Logan CY, Nusse R.** The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
- Lordick F, Hölscher AH, Haustermans K, Wittekind C.** Multimodal treatment of esophageal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2013;398:177-187.
- Lyros O, Rafiee P, Nie L, Medda R, Jovanovic N, Otterson MF, Behmaram B, Gockel I, Mackinnon A, Shaker R.** Wnt/ β -Catenin Signaling Activation beyond Robust Nuclear β -Catenin Accumulation in Nondysplastic Barrett's Esophagus: Regulation via Dickkopf-1. *Neoplasia* 2015;17:598-611. doi: 10.1016/j.neo.2015.07.006.
- Lyros O, Rafiee P, Nie L, Medda R, Jovanovic N, Schmidt J, Mackinnon A, Venu N, Shaker R.** Dickkopf-1, the Wnt antagonist, is induced by acid pH and mediates epithelial cellular senescence in human reflux esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;306:G557-74.
- Macdonald CE, Wicks AC, Playford RJ.** Ten years' experience of screening patients with Barrett's oesophagus in a university teaching hospital. *Gut* 1997;41:303-7.
- Makino T, Yamasaki M, Takemasa I, Takeno A, Nakamura Y, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Matsuura N, Mori M, et al.** Dickkopf-1 expression as a marker for predicting clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2058-64.
- Maley CC, Galipeau PC, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Blount PL, Reid J.** The combination of genetic instability and clonal expansion predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2004;64:7629-33.

- Maley CC.** Multistage carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Canc Lett* 2007;245:22-32.
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, et al.** Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 2002;417:664-7.
- Mendelson J, Song S, Li Y, Maru DM, Mishra B, Davila M, Hofstetter WL, Mishra L.** Dysfunctional transforming growth factor- β signaling with constitutively active notch signaling in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 2011;117:3691-702.
- Moayyedi P, Burch N, Akhtar-Danesh N, Enaganti SK, Harrison R, Talley NJ, Jankowski J.** Mortality rates in patients with Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:316-20.
- Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Lamps LW, Lauwers GY, Lazenby AJ, Lewin DN, Robert ME, Washington K, et al.** Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol* 2001;32:379-88.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A.** WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004;5:691-701.
- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- Moyes LH, McEwan H, Radulescu S, Pawlikowski J, Lamm CG, Nixon C, Sansom OJ, Going JJ, Fullarton GM, Adams PD.** Activation of Wnt signalling promotes development of dysplasia in Barrett's oesophagus. *J Pathol* 2012;228:99-112.
- Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P.** Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:3046-50.
- Naef AP, Savary M, Ozzello L.** Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1975;70:826-35.
- Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR.** Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* 1999;344 Pt2:427-31.
- Nebel OT, Fornes MF, Castell DO.** Symptomatic gastroesophageal reflux: incidence and precipitation factors. *Am J Dig Dis* 1976;21:953-6.
- Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T.** DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 2004;23: 8520-6. doi: 10.1038/sj.onc.1207892.
- Nones K, Waddell N, Wayte N, Patch AM, Bailey P, Newell F, Holmes O, Fink JL, Quinn MC, Tang YH, et al.** Genomic catastrophes frequently arise in esophageal adenocarcinoma and drive tumorigenesis. *Nat Commun* 2014;5:5224. doi: 10.1038/ncomms6224.
- Nowell PC.** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-28.
- Obulkasim A, Yistra B, van Essen HF, Benner C, Stenning S, Langley R, Allum W, Cunningham D, Inam I, Hewitt LC, et al.** Reduced genomic tumor heterogeneity after neoadjuvant chemotherapy is related to favorable outcome in patients with esophageal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9857.
- Orlando RC.** Mucosal Defense in Barrett's Esophagus. In: Sharma P, editor. *Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford; 2006. pp. 60-72.
- Orlando RC.** The Integrity of the Esophageal Mucosa. Balance Between Offensive and Defensive Mechanisms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24:873-82.
- Osterheld MC, Bian YS, Bosman FT, Benhattar J, Fontolliet C.** Beta-catenin expression and its association with prognostic factors in adenocarcinoma developed in Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2002;117:451-6.
- Patil MA, Chua MS, Pan KH, Lin R, Cheung ST, Ho C, Fan ST, Cohen SN, Chen X, So S.** An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005;24:3737-47.
- Paulson TG, Reid J.** Focus on Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Cancer cell* 2004;6:11-6.
- Pavlov K, Meijer C, van den Berg A, Peters FT, Kruyt FA, Kleibeuker JH.** Embryological signaling pathways in Barrett's metaplasia development and malignant transformation; mechanisms and therapeutic opportunities. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;92:25-37.

- Pederson L, Jensen MH, Krishna S.** Dickkopf1 – A New Player in Modelling the Wnt Pathway. *PLoS ONE* 2011;6:e25550. doi: 10.1371/journal.pone.0025550.
- Peng YH, Xu YW, Guo H, Huang LS, Tan HZ, Hong CQ, Li SS, Xu LY, Li EM.** Combined detection of serum Dickkopf-1 and its autoantibodies to diagnose esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 2016;5:1388-96.
- Pohl H, Sirovich B, Welch G.** Esophageal adenocarcinoma incidence: are we reaching the peak? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1468-70.
- Pohl H, Welch HG.** The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:142-6.
- Polakis P.** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837–51.
- Polakis P, Hart M, Rubinfeld B.** Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999;470:23–32.
- Polednak AP.** Trends in survival for both histologic types of esophageal cancer in US surveillance, epidemiology and end results areas. *Int J Cancer* 2003;105:98–100.
- Pozzi S, Fulciniti M, Yan H, Vellet S, Eda H, Patel K, Santo L, Cirstea D, Hideshima T, Schirtzinge L, Kuhstoss S, et al.** In vivo and in vitro effects of a novel anti-Dkk1 neutralizing antibody in multiple myeloma. *Bone* 2013;53:487-96.
- Qian J, Xie J, Hong S, Yang J, Zhang L, Han X, Wang M, Zhan F, Shaughnessy JD Jr, Epstein J, et al.** Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma. *Blood* 2007;110:1587–94.
- Qian J, Zheng Y, Zheng C, Wang L, Qin H, Hong S, Li H, Lu Y, He J, Yang J.** Active vaccination with Dickkopf-1 induces protective and therapeutic antitumor immunity in murine multiple myeloma. *Blood* 2012;119:161-9.
- Rabinovitch PS, Longton G, Blount PL, Levine DS, Reid J.** Predictors of progression in Barrett's esophagus III: baseline flow cytometric variables. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3071-83.
- Rachner TD, Thiele S, Göbel A, Browne A, Fuessel S, Erdmann K, Wirth MP, Fröhner M, Todenhöfer T, Muders MH, et al.** High serum levels of Dickkopf-1 are associated with a poor prognosis in prostate cancer patients. *BMC Cancer* 2014;14:649.
- Reames BN, Ghaferi AA, Birkmeyer JD, Dimick JB.** Hospital volume and operative mortality in the modern era. *Ann Surg* 2014;260:244-51.
- Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS.** Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: Baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1669-76.
- Reid BJ, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, Blount PL, Rabinovitch PS.** Predictors of progression on Barrett's esophagus II: baseline 17 p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2839-48.
- Reid BJ, Weinstein WM.** Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Annu Rev Med* 1987;38:477-92.
- Reis M, Czupalla CJ, Ziegler N, Devraj K, Zinke J, Seidel S, Heck R, Thom S, Macas J, Bockamp E.** Endothelial Wnt/beta-catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *J Exp Med* 2012;209:1611–27. doi: 10.1084/jem.20111580.
- Riggleman B, Schedl P, Wieschaus E.** Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by *wingless*. *Cell* 1990;63:549–60.
- Rimm DL, Koslov ER, Kebraie P, Cianci CD, Morrow JS.** α 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:8813–7.
- Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O, Clevers H.** The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 1998;395:608–12.
- Rössing L, Jadidi AS, Urbich C, Badorf C, Zeiher AM, Dimmeler S.** Akt-dependent phosphorylation of p21 (Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:5644–57.
- Rutegård M, Lagergren P, Nordenstedt H, Lagergren J.** Oesophageal adenocarcinoma: the new epidemic in men? *Maturitas* 2011;69:244–8.

- Saeed N, Shridhar R, Hoffe S, Almhanna K, Meredith KL.** AKT expression is associated with degree of pathologic response in adenocarcinoma of the esophagus treated with neoadjuvant therapy. *J Gastrointest Oncol* 2016;7:158-65.
- Sakanaka C, Leong P, Xu L, Harrison SD, Williams LT.** Casein kinase epsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12548-52.
- Sato N, Yamabuki T, Takano A, Koinuma J, Aragaki M, Masuda K, Ishikawa N, Kohno N, Ito H, Miyamoto M, et al.** Wnt inhibitor Dickkopf-1 as a target for passive cancer immunotherapy. *Cancer Res* 2010;70:5326-36.
- Schnell TG, Sontag SJ, Chejfec G, Aranha G, Metz A, O'Connell S, Seidel UJ, Sonnenberg A.** Long-term nonsurgical management of Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastroenterol* 2001;120:1607-19.
- Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, He X.** Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 2001;11:951-961. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00290-1.
- Shaheen N, Ransohoff DF.** Gastroesophageal reflux, Barrett esophagus, and esophageal cancer: clinical applications. *JAMA* 2002;287:1982-6.
- Shaheen NJ, Falk GW, Iyer PG, Gerson LB, American College of Gastroenterology.** ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol* 2016;111:30-50.
- Sharma P, Falk GW, Weston AP, Reker D, Johnston M, Sampliner RE.** Dysplasia and cancer in a large multicenter cohort of patients with Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:566-72.
- Shen CH, Hsieh HY, Wang YH, Chen SY, Tung CL, Wu JD, Lin CT, Chan MW, Hsu CD, Chang D.** High Dickkopf-1 expression is associated with poor prognosis in patients with advanced urothelial carcinoma. *Exp Ther Med* 2010;1:893-8.
- Shen Q, Fan J, Yang XR, Tan Y, Zjao W, Xu Y, Wang N, Niu Y, Wu Z, Zhou J, et al.** Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a large-scale multicentre study. *Lancet Oncol* 2012;13:817-26.
- Shi RY, Yang XR, Shen QJ, Yang LX, Xu Y, Qiu SJ, Sun YF, Zhang X, Wang Z, Zhu K, et al.** High expression of Dickkopf-related protein 1 is related to lymphatic metastasis and indicates poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma patients after surgery. *Cancer* 2013;119:993-1003.
- Shi Y, Gong HL, Zhou L, Tian J, Wang Y.** Dickkopf-1 is a novel prognostic biomarker for laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2014;134:753-9.
- Sikkema M, de Jonge PJ, Steyerberg EW, Kuipers EJ.** Risk of esophageal adenocarcinoma and mortality in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;8:235-44.
- Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, Gebski V, Australasian Gastro-Intestinal Trials Group.** Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 2011;12:681-92.
- Skipworth RJ, Parks RW, Stephans NA, Graham C, Brewster DH, Garden OJ, Paterson-Brown S.** The relationship between hospital volume and post-operative mortality rates for upper gastrointestinal cancer resections: Scotland 1982-2003. *Eur J Surg Oncol* 2010;36:141-7.
- Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M.** Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. *Adv Pharmacol* 2012;65:335-59.
- Souza RF, Krishnan K., Spechler S.J.** Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G211-G218.
- Souza RF, Shewmake K, Terada LS, Spechler J.** Acid exposure activates the mitogen-activated protein kinase pathways in Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 2002;122:299-307.
- Srivastava AK, Pandey SK.** Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol Cell Biochem* 1998;182:135-41.
- Sun DK, Wang L, Wang JM, Zhang P.** Serum Dickkopf-1 levels as a clinical and prognostic factor in patients with bladder cancer. *Genet Mol Res* 2015;14:18181-7.
- Takahashi N, Fukushima T, Yorita K, Tanaka H, Chijiwa K, Kataoka H.** Dickkopf-1 is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells and is involved in invasive growth. *Int J Cancer* 2010;126:1611-20.

Tamagawa Y, Ishimura N, Uno G, Yuki T, Kazumori H, Ishihara S, Amano Y, Kinoshita Y. Notch signaling pathway and Cdx2 expression in the development of Barrett's esophagus. *Lab Invest* 2012;92:896-909.

Tan C, Qian X, Guan Z, Yang B, Ge Y, Wang F, Cai J. Potential biomarkers for esophageal cancer. *Springerplus* 2016;5:467.

Tao YM, Liu Z, Liu HL. Dickkopf-1 (DKK1) promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Diss* 2013;45:251-7.

Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2006;281:9971-6.

Theisen J, Nigro JJ, DeMeester TR, Peters JH, Gastal OL, Hagen JA Hashemi M, Bremner CG. Chronology of the Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Dis Esophagus* 2004;17:67-70.

Thorstensen L, Lothe RA. The WNT Signaling Pathway and Its Role in Human Solid Tumors. *Atlas of Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2003;7:146-61. doi: 10.4267/2042/37975.

Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2483-94.

Tukey JW. *Exploratory Data Analysis.* Addison-Wesley 1977.

Tselepis C, Perry I, Dawson C, Hardy R, Darnton SJ, McConkey C, Stuart RC, Wright N, Harrison R, Jankowski JA. Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene* 2002;21:6071-81.

Tung EK, Mak CK, Fatima S, Lo RC, Zhao H, Zhang C, Dai H, Poon RT, Yueng MF, Lai CL, et al. Clinicopathological and prognostic significance of serum and tissue Dickkopf-1 levels in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2011;31:1494-506.

Ueland T, Otterdal K, Lekva T, Halvorsen B, Gabrielsen A, Sandberg WJ, Paulsson-Berne G, Pedersen TM, Folkersen L, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1228-34.

van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ, et al. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2074-84.

van Veelen W, Le NH, Helvensteijn W, Blonden L, Theeuwes M, Bakker ER, Franken PF, van Gurp L, Meijlink F, van der Valk MA. beta-Catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* 2011;60:1204-12.

Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB. Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: Adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:85-92.

Vaughan TL, Kristal AR, Blount PL, Levine DS, Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Reid BJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use, body mass index, and anthropometry in relation to genetic and flow cytometric abnormalities in Barrett's Esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:745-52.

Vaughan TL, Fitzgerald RC. Precision prevention of oesophageal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:243-8. doi: 10.1038/nrgastro.2015.24.

Vestweber D, Kemler R. Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell Different* 1984;15:269-73.

Wang J, Shou J, Chen X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* 2000;19:1843-8.

Weaver JM, Ross-Innes CS, Shannon N, Lynch AG, Forshew T, Barbera M, Murtaza M, Ong CA, Lao-Sirieix P, Dunning MJ, et al. Ordering of mutations in preinvasive disease stages of esophageal carcinogenesis. *Nat Genet* 2014;46:837-43.

Weng LH, Wang CJ, Ko JY, Sun YC, Su YS, Wang FS. Inflammation induction of Dickkopf-1 mediates chondrocyte apoptosis in osteoarthritic joint. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:933-43.

Whiteman DC, Sadeghi S, Pandeya N, Smithers BM, Gotley DC, Bain CJ, Webb PM, Green AC, Australian Cancer Study. Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus. *Gut* 2008;57:173-80.

Wieschaus E, Riggelman R. Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 1987;49:177-84.

Willert K, Brink M, Wodarz A, Varmus H, Nusse R. Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled. *EMBO J* 1997;16:3089-96.

Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kühne T, Goodyer CG, Albrecht S, Von Schweinitz D, Pietsch T. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* 2003;83:429-34.

Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, Galipeau PC, Longton G, Blount PL, Reid BR. p16 INK4a lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Res* 2001;61:8284-9.

Wu A, Wan P, Bernstein L. A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control* 2001;12:721-32.

Xie SH, Lagergren J. The Male Predominance in Esophageal Adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:338-47.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366:701-4.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992;71:505-14.

Xu WH, Liu ZB, Yang C, Qin W, Shao ZM. Expression of dickkopf-1 and beta-catenin related to the prognosis of breast cancer patients with triple negative phenotype. *PLoS One* 2012;7:e37624. doi: 10.1371/journal.pone.0037624.

Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, et al. Dickkopf-1 as a Novel Serologic and Prognostic Biomarker for Lung and Esophageal Carcinomas. *Cancer Res* 2007;67:2517-25.

Yang H, Chen GD, Fang F, Liu Z, Lau SH, Zhang JF, Lau WY, Yang LY. Dickkopf-1: as a diagnostic and prognostic serum marker for early hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2013;28:286-29.

Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, Galway K, Johnston BT, Murray L. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008;168:237-49.

Yu B, Yang X, Xu Y, Yao G, Shu H, Lin B, Hood L, Wang H, Yang S, Gu J, Fan J, Qin W. Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic/nuclear beta-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 2009;50: 948-57. doi: 10.1016/j.jhep.2008.11.020.

Zhang H, Jin G, Shen H. Epidemiologic differences in esophageal cancer between Asian and Western populations. *Chin J Cancer* 2012;31:281-6.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localisation of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001;3:245-52.

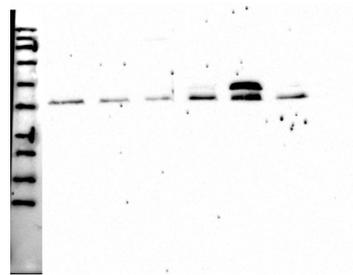
Zhou H, Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci* 2011;12:30-42.

Zhou SJ, Zhou SR, Yang XXQ, Qin CX, Wang ZL. Serum Dickkopf-1 expression level positively correlates with a poor prognosis in breast cancer. *Diagn Pathol* 2014;9:161.

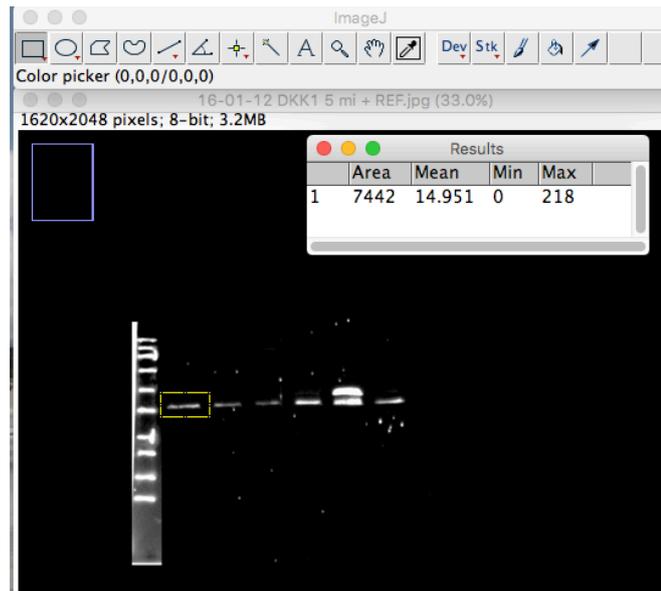
Zhou Y, Liu F, Xu Q, Wang X. Analysis of the expression profile of Dickkopf-1 gene in human glioma and the association with tumor malignancy. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:138. doi: 10.1186/1756-9966-29-138.

Anlagen

A



B



C

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
1							AK		Area	Wert	Samples	Densitometry	
238	WB Proteine 45/ 44/ 55/ 46/ 36/ 29.4												
239													
240													
241							Dkk1	7442	14.951	EPC1-hTERT		0.356945041	
242							Dkk1	7442	9.036	EPC2-hTERT		0.190761696	
243							Dkk1	7442	8.036	CP-A		0.149922576	
244							Dkk1	7442	23.082	CP-B		0.458649605	
245							Dkk1	7442	83.898	OE33		2.022857143	
246							Dkk1	7442	17.323	OE19		0.417673297	
247	37 kDa						DKK1	b-Actin	7442	41.886			
248								b-Actin	7442	47.368			
249	42 kDa						β-Aktin	b-Actin	7442	53.601			
250								b-Actin	7442	50.326			
251								b-Actin	7442	41.475			
252								b-Actin	7442	41.475			
253													

Abb.31: Vorgehen bei der densitometrischen Berechnung für die *Western Blot* Auswertung (exemplarisch). A: *Western Blot*. B: Öffnen des *Western Blots* im *jpeg*-Format mit ImageJ 1.48v. *Edit* → *Invert*. Auswählen der zu messenden Bande (*Region of Interest*) mittels Rechteck in der Toolbox Palette. *Analyze* → *Measure*. ImageJ 1.48v misst die durchschnittliche Pixelintensität (*Mean*) im ausgewählten Bereich. Verschiebung des Rechtecks unter konstanter Beibehaltung der Area und Messung der restlichen Banden. Ebenso wird mit dem dazugehörigem *Western Blot* des Referenzproteins *β-Aktin* verfahren. C: Kopieren der ermittelten Werte in die entsprechende Exel-Datei. Die densitometrische Berechnung erfolgt relativ zu *β-Aktin*.

Tab.13: Klinische Daten der EAC-Patienten (n=18).

Nr.	m/w	Alter	Tumorstadium/Resektion/Grading	neoRCTx	OP
001	m	77	pT3/N2(3/22)/M0/L1/V1/Pn0/R0/G2	nein	abd.-thorakal
002	m	50	cM0/G1	ja	nein, da Komorbiditäten
003	m	57	pT1b/N0(0/33)/M0/L0/V0/Pn0/R0/G1	nein	abd.-thorakal
004	m	58	ypT3/N2(5/21)/M0/L1/V0/Pn0/Rx/G3	ja	abd.-thorakal
005	w	74	ypT2/N0(0/16)/M0/L1/V0/Pn0/R0/G2	ja	abd.-thorakal
006	m	72	pT1b/N0(0/11)/M0/L0/V0/Pn0/R0/G2	nein	abd.-thorakal
007	m	64	cM1/G2	nein	nein, da metast.
008	m	74	cM1/G3	nein	nein, da metast.
009	m	44	pT2/N0(0/10)/M0/L1/V0/Pn0/R1/G1	nein	abd.-thorakal
010	m	69	pT1b/N0(0/19)/M0/L0/V0/Pn0/R0/G1	nein	abd.-thorakal
011	m	56	pT1b/N0(0/26)/M0/L0/V0/Pn0/R0/G2	nein	abd.-thorakal
012	m	71	cM0/G3	ja	nein, da reduzierter AZ
013	m	74	pT1b/N0/M0/L0/V0/R0/G3	nein	transhiatal
014	m	64	ypT3/N1/M0/L0/V0/R1/G3	ja	transhiatal
015	m	71	pTis/N0/M0/L0/V0/R0/G1	nein	transhiatal
016	m	54	ypT3/N0/M0/L0/V0/R0/G2	ja	transhiatal
017	m	56	ypTis/N0/M0/L0/V0/R0/G1	ja	transhiatal
018	m	79	ypT2/N0/M0/L0/V0/R0/G1	ja	transhiatal

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

- Abb.1: Inzidenz des Ösophaguskarzinoms (1975-2001).
aus: Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:142-6.
- Abb.2: Schematische Darstellung des negativen Rückkopplungs-Mechanismus.
aus: Pedersen L, Jensen MH, Krishna S. Dickkopf1 - A New Player in Modelling the Wnt Pathway. *PLoS ONE* 2011;6:e25550. doi: 10.1371/journal.pone.0025550.

Materialien und Methoden

- Abb.3: Schematische Darstellung des *MTT*-Testverfahrens.

Ergebnisse

- Abb.4: *DKK1*-Serumkonzentrationen (ng/ml) bei gesunden Kontrollpersonen, Barrett-Metaplasie-Patienten und Adenokarzinom-Patienten mittels *ELISA*.
- Abb.5: *DKK1*-Serumkonzentrationen (ng/ml) bei Adenokarzinom-Patienten vor und nach der chirurgischen Tumorsektion mittels *ELISA*.
- Abb.6: *DKK1*-Serumkonzentrationen (ng/ml) bei Adenokarzinom-Patienten in Abhängigkeit von dem histopathologischen Tumorstadium (*TNM*-Klassifikation) und dem Differenzierungsgrad der Karzinomzellen (*Grading*) mittels *ELISA*.
- Abb.7: *DKK1*-Genexpression in den ösophagealen Zelllinien *EPC1-hTERT*, *EPC2-hTERT*, *CP-A*, *CP-B*, *OE33* und *OE19* mittels *RT-PCR* und *qRT-PCR*.
- Abb.8: *DKK1*-Proteinexpression in den ösophagealen Zelllinien *EPC1-hTERT*, *EPC2-hTERT*, *CP-A*, *CP-B*, *OE33* und *OE19* mittels *Western Blot*.
- Abb.9: Vergleich der *DKK1*-Proteinexpression in den ösophagealen Adenokarzinomzelllinien *OE33* und *OE19* mittels *Western Blot*.
- Abb.10: *DKK1*-Proteinexpression der *OE33*-Zellen nach Behandlung mit *rhDKK1* mittels *Western Blot*.
- Abb.11: Viabilität der *OE33*-Zellen nach Behandlung mit *rhDKK1* mittels *MTT*-Assay.
- Abb.12: *DKK1*-Proteinexpression der *OE33*-Zellen nach *DKK1*-Knockdown mittels *Western Blot*.
- Abb.13: Effektivität des *DKK1*-Knockdowns bei den *OE33*-Zellen mittels *RT-PCR*, *qRT-PCR*, *Western Blot* und *ELISA*.
- Abb.14: Fotografie der *OE33*-Zellen nach *DKK1*-Knockdown.
- Abb.15: Viabilität der *OE33*-Zellen nach *DKK1*-Knockdown mittels *MTT*-Assay.
- Abb.16: Proliferationsrate der *OE33*-Zellen nach *DKK1*-Knockdown mittels ³H-Thymidine-Incorporation-Assay.
- Abb.17: Motilität der *OE33*-Zellen nach *DKK1*-Knockdown mittels *Wound-Healing*-Assay.
- Abb.18: Invasion der *OE33*-Zellen nach *DKK1*-Knockdown mittels *Transmigration*-Assay.

- Abb.19: Aktivierungsmuster von β -Catenin und GSK3 β nach DKK1-Knockdown mittels Western Blot.
- Abb.20: Proteinexpression von LRP6 nach DKK1-Knockdown mittels Western Blot.
- Abb.21: Aktivierungsmuster von Akt und Erk nach DKK1-Knockdown mittels Western Blot.
- Abb.22: Aktivierungsmuster von p53 sowie Proteinexpression von Bcl-xL und Caspase 3 nach DKK1-Knockdown mittels Western Blot.
- Abb.23: Genexpression von Axin II und Cyclin D1 nach DKK1-Knockdown mittels qRT-PCR.
- Abb.24: Genexpression von p21 nach DKK1-Knockdown mittels qRT-PCR.
- Abb.25: Aktivierungsmuster von GSK3 β nach DKK1-Knockdown und Behandlung mit rhWnt3a mittels Western Blot.
- Abb.26: Genexpression von DKK1, Axin II und Cyclin D1 nach DKK1-Knockdown und Behandlung mit rhWnt3a mittels qRT-PCR.
- Abb.27: Viabilität der OE33-Zellen nach DKK1-Knockdown und Behandlung mit rhWnt3a mittels MTT-Assay.

Diskussion

- Abb.28: Schematische Darstellung der intertumoralen und intratumoralen Heterogenität.
aus: Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. Nature 2013;501:338-45.
- Abb.29: Schematische Darstellung der mittels Western Blot untersuchten molekularen Markern nach DKK1-Knockdown.
- Abb.30: Schematische Darstellung eines denkbaren durch DKK1 getriggerten Wnt-unabhängigen Signalwegs mit Beteiligung der Kinase Akt (hypothetisch).

Anlagen

- Abb.31: Vorgehen bei der densitometrischen Berechnung für die Western Blot Auswertung (exemplarisch).

Tabellenverzeichnis

Materialien und Methoden

- Tab.1: Ösophageale Zelllinien.
- Tab.2: Patientencharakteristika.
- Tab.3: Transfektionsmaterialien.
- Tab.4: Rekombinante Proteine.
- Tab.5: Primärantikörper für *Western Blot*.
- Tab.6: Sekundärantikörper für *Western Blot*.
- Tab.7: Primer für *RT-PCR* und *qRT-PCR*.
- Tab.8: Primärantikörper-Verdünnungen.
- Tab.9: Protokoll für die Herstellung der *RT-PCR*-Proben.
- Tab.10: *RT-PCR*-Programm.
- Tab.11: Protokoll für die Herstellung der *qRT-PCR*-Proben.
- Tab.12: *qRT-PCR*-Programm.

Anlagen

- Tab.13: Klinische Daten der *EAC*-Patienten (n=18).

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Ines Gockel für die Betreuung und Finanzierung meiner Promotionsarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Orestis Lyros für die Betreuung und fachliche Unterstützung.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. René Thieme. Mein Dank geht auch an das Team von Prof. Dr. rer. nat. Gabriela Aust und Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ für die Hilfe und das Bereitstellen der Gerätschaften für einzelne Experimente.

Bei Prof. Dr. Parvaneh Rafiee und der MTA Linghui Nie bedanke ich mich für die Betreuung und fachliche Unterstützung während meiner Forschungsarbeit im *Medical College of Wisconsin (Milwaukee, USA)* sowie bei Prof. Dr. Reza Shaker für die finanzielle Ermöglichung.

Ich bedanke mich zudem für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Förderung durch das Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät Leipzig.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Patienten des Universitätsklinikum Leipzig AÖR, die sich zur freiwilligen Teilnahme an dem Forschungsprojekt bereiterklärt haben.