

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Thomas Kirchner

Interaktion der Phosphoinositid-3-Kinase mit dem WNT-Signaltransduktionsweg



Dissertation

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

vorgelegt von
Steffen Ormanns

aus
Würzburg

Jahr
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karsten Spiekermann

Prof. Dr. Claus Belka

Prof. Dr. Markus Guba

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2015

Den Menschen gewidmet, die mich immer unterstützt haben,
meiner Frau Marisol Reynoso Rivera
und meinen Eltern Anita und Dr. med. Winfried Ormanns.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	
1.1 Kolorektales Karzinom – Epidemiologie und Ätiologie	8
1.2 Kolorektales Karzinom – Tumorstadium und Therapie	8
1.3 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms	9
1.4 Hypothese und Fragestellung	12
2 Material und Methoden	16
2.1.1 Chemikalien, Medien, Lösungen und molekularbiologische Reagenzien	16
2.2 Zellkultur und Zelllinien	16
2.2.1 Zelllinien	16
2.2.2 Standardkulturbedingungen, Passagieren und Einfrieren von Zelllinien	17
2.2.3 Herstellung von Wnt3a-konditioniertem Zellkulturmedium	18
2.3 Molekularbiologische Methoden	18
2.3.1 Plasmidpräparation	18
2.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	18
2.3.3 DNA-Aufreinigung aus enzymatischen Reaktionen	19
2.3.4 RNA-Aufreinigung aus Zellkulturen	19
2.3.5 Vermessen der Nukleinsäure-Konzentration	19
2.3.6 Plasmide	19
2.3.7 Klonierungen	21
2.3.7.1 pcl-neo- Δ 45- β -CateninER-myc	21
2.3.7.1.1 SOE-PCR zur Fusionsgen-Erzeugung	21
2.3.7.1.2 <i>Infusion</i> -Klonierung	23
2.3.7.1.3 Funktionelles Austesten des Expressionsvektors pcl-neo Δ 45- β -cateninER-myc	24

2.3.7.2	p7xTOP-GFP	25
2.3.7.3	pcl-neo-S552D- Δ 45- β -Catenin	26
2.3.7.4	pcl-neo-S552D- Δ 45- β -CateninER-myc	27
2.3.8	Sanger-Sequenzierung	28
2.3.9	Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)	28
2.3.10	Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)	29
2.4	Protein-basierte Methoden	30
2.4.1	Proteinextraktion und subzelluläre Fraktionierung	30
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.4.3	Western-Blot Analyse	31
2.4.3.1	Densitometrische Vermessung der Western-Blot Signalintensität	34
2.4.4	Proteinimmunopräzipitation (IP)	35
2.4.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	36
2.4.6	Immunhistochemische Färbung	36
2.5	Zellbiologische Methoden	37
2.5.1	Luciferase-Reportergen-Assay	37
2.5.2	Fluoreszenz-Reportergen-Assay	38
2.5.3	Induktion mit 4-Hydroxy-Tamoxifen	38
2.5.4	Inhibition des PI3K-Signalweges mit LY294.002	39
2.5.5	Aktivierung des WNT-Signalweges mit Lithium-Chlorid	39
2.5.6	Aktivierung des WNT-Signalweges mit Wnt3a-konditioniertem Medium	39
2.5.7	Inhibition der CK2 mit TBB	39
2.6	Statistik	39
3	Ergebnisse	40
3.1	PI3K-Inhibition supprimiert WNT-Signalwegaktivität	40

3.1.1	LY294.002 inhibiert PI3K	40
3.1.2	PI3K Inhibition durch LY supprimiert konstitutive WNT-Signalwegaktivität in SW480 und RWP-1 Zellen	41
3.1.3	PI3K Inhibition durch LY supprimiert exogen induzierte WNT-Signalwegaktivität in 293T, CHO-1 und HeLa Zellen	41
3.1.4	PI3K Inhibition durch LY supprimiert WNT-Zielgenexpression in 293T, RWP-1 und SW480 Zellen	42
3.1.5	Die Suppression der WNT-Signalwegaktivität durch LY ist PI3K-spezifisch	44
3.2	PI3K-Inhibition supprimiert WNT-Signalwegaktivität ohne die subzelluläre Verteilung von β-Catenin zu verändern	45
3.3	Die nukleäre Akkumulation stabilisierten β-Catenins induziert dosisabhängig WNT-Signalwegaktivität	47
3.4	PI3K-Inhibition supprimiert die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β-Catenins	49
3.5	Mechanismus der durch PI3K-Inhibition vermittelten WNT-Signalweghemmung	51
3.5.1	Phosphomimetische β -Catenin-Mutanten sind nicht in der Lage WNT-Signalwegaktivität unter PI3K-Inhibition zu erhalten	51
3.5.2	PI3K-Inhibition vermindert die Bindung von β -Catenin an Zielgenpromotoren	53
4	Diskussion	55
4.1	Für die transkriptionelle Transaktivierung von β-Catenin ist eine Wechselwirkung mit anderen Signaltransduktionswegen essentiell	55
4.2	Nukleär lokalisiertes β-Catenin als ein Kennzeichen von WNT-Signalwegaktivität	57
4.3	PI3K- und WNT-Signalwege als therapeutische Ziele	58
4.4	Limitationen	59
4.4.1	Verwendung unterschiedlicher Zelltypen	59
4.4.2	Spezifität der eingesetzten Inhibitoren	59
4.4.3	Experimentelle Induktion des nukleären Transports von β -Catenin	60
4.4.4	Fehlende <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Versuche	61

5	Zusammenfassung	62
6	Anhang	64
6.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer	64
6.2	Abkürzungen und Nomenklatur	64
6.3	Veröffentlichung, Vorträge, Posterpräsentation	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Nachwort und Danksagung	74

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom – Epidemiologie und Ätiologie

In den westlichen Industrienationen, wie Deutschland sind Krebserkrankungen nach kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Todesursache. Durch das steigende durchschnittliche Lebensalter, besteht bei diesen Erkrankungen eine steigende Inzidenz ^[1], wobei jedoch durch intensiviertere Vorsorgeuntersuchungen und Diagnosemaßnahmen, sowie verbesserte Therapiemöglichkeiten die Krebsmortalitätsraten seit den 90er Jahren leicht sinken ^[2]. Das **kolorektales Karzinom (KRK)** ist weltweit die dritthäufigste diagnostizierte Krebserkrankung mit geschätzten 1,2 Millionen Neuerkrankungen und 608700 Todesfällen pro Jahr und somit geschlechterübergreifend die zweithäufigste krebssbedingte Todesursache ^[3]. Die meisten Fälle treten in hochentwickelten Ländern auf, mit teils ansteigenden Inzidenzen in Ländern mit ehemals niedriger Prävalenz wie bspw. Spanien, während die USA als einziges hochentwickeltes Land sinkende Inzidenzen aufweisen, wahrscheinlich aufgrund verbesserter Vorsorge mit Entfernung präkanzeröser Läsionen ^[4]. Wie bei anderen Krebserkrankungen auch, ist die Mortalität des KRK aufgrund verbesserter Früherkennung seit einigen Jahren rückläufig ^[5]. Dennoch verdeutlichen diese Zahlen, dass KRK nach wie vor eines der bedeutendsten Gesundheitsprobleme westlicher Industrienationen darstellen.

Die Ätiologie der KRK ist multifaktoriell, jedoch sind eindeutige Risikofaktoren für die Entwicklung von KRK bekannt. Dazu gehören: hohes Lebensalter, Rauchen, Konsum roten Fleisches und prozessierter Fleischprodukte, Übergewicht sowie mangelnde körperliche Aktivität. Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung von KRK jedoch, ist eine positive Familienanamnese, was bereits auf die starke Bedeutung der Genetik in der kolorektalen Karzinogenese hinweist ^[6-8]. Auch Patienten, die an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen leiden, wie z.B. Colitis ulcerosa weisen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für KRK auf ^[9]. Insgesamt sind also schwerwiegende Risikofaktoren für die Entwicklung von KRK nur teilweise vermeidbar und ein tiefergehendes Verständnis der kolorektalen Karzinogenese somit nach wie vor nötig.

1.2 Kolorektales Karzinom – Tumorstadium und Therapie

Nach der Diagnose eines KRK richtet sich die Therapie nach dem vorliegenden Tumorstadium, das nach den Vorgaben der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) klassifiziert wird. Dieses wird einerseits durch die Infiltrationstiefe des Tumors in die Dickdarmwand (T), andererseits durch das Vorliegen von Lymphknoten (N) - oder Fernmetastasen (M) bedingt: Frühe KRK wachsen infiltrativ in

die Dickdarmwand (bis UICC Stadium II), entwickeln später Lymphknotenmetastasen (bis UICC Stadium III) und verursachen schließlich Fernmetastasen (UICC Stadium IV) ^[10].

Stadienunabhängig wird der Primärtumor operativ entfernt, was von einer ausgedehnten Lymphadenektomie begleitet wird. Dazu wird ab dem UICC-Stadium III eine adjuvante Chemotherapie angeschlossen. Im Stadium IV werden Leber- oder Lungenmetastasen, soweit möglich, operativ entfernt ^[11]. Das Tumorstadium wirkt sich trotz fortgeschrittener Therapiemöglichkeiten nach wie vor unmittelbar auf die Prognose der KRK-Patienten aus. So leben bspw. im Stadium I noch 93% der Patienten 5 Jahre nach der Diagnosestellung, während im Stadium IV ein 5-Jahres-Überleben von nur 8% besteht ^[12]. Dieser Zusammenhang zeigt, dass eine Verbesserung der Therapie v.a. von fortgeschrittenen KRK nach wie vor dringend notwendig ist.

1.3 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

KRK entwickeln sich aus normaler Dickdarmschleimhaut durch die Akkumulation von Mutationen in Schlüsselgenen. In einem ersten Schritt entstehen dabei nichtinvasive neoplastische Vorläuferläsionen mit geringer zellulärer Atypie, sogenannte Adenome. Diese nehmen im Laufe der Zeit an Größe und Atypie zu und entwickeln sich zu invasiv wachsenden Karzinomen, die letztendlich metastasieren (Abb.1). Dieser Vorgang wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und erlaubt eine histomorphologische Abgrenzung der verschiedenen Stadien. Antrieb dieser pathogenetischen Progression ist eine schrittweise Akkumulation genetischer und epigenetischer Alterationen durch tumortreibende Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ^[13, 14]. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die initiale Mutation des Tumorsuppressorgens *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, dessen Ausfall mit der Entwicklung von Adenomen korreliert ^[15]. Mutationen im *APC* Tumorsuppressorgen finden sich in 80% aller sporadischer KRK ^[16] und stellen das initiale Ereignis für die Einleitung der kolorektalen Karzinogenese dar. Die bedeutsame Rolle des *APC* Gens in diesem Prozess wird dadurch unterstützt, dass das heterozygote Vorliegen einer autosomal-dominant vererbten Keimbahnmutation in einem *APC*-Allel zum FAP-Syndrom (familiäre adenomatöse Polypose, FAP) führt. FAP-Patienten zeigen eine massenhaften Ausbildung von Adenomen im Dickdarm, von denen einige maligne entarten, sodass FAP als obligate Präkanzerose gilt ^[14, 17, 18]. Die Mutation des *APC*-Gens spielt also eine zentrale Rolle in der kolorektalen Karzinogenese und wird daher als Schlüsselmutation bezeichnet.

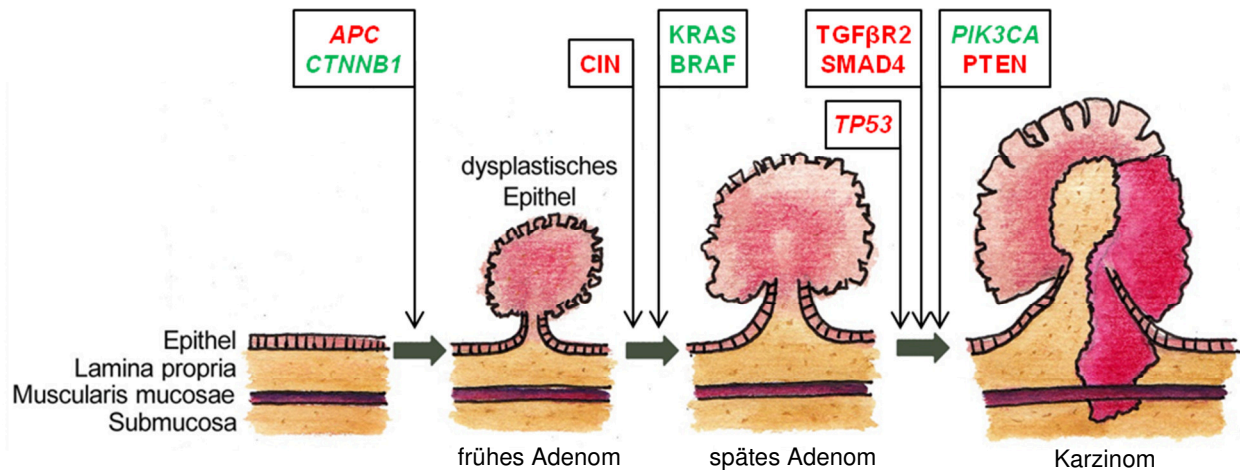


Abb.1 Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein

Verlust tumorsuppressiver Mechanismen (rot) und Zunahme onkogener Veränderungen (grün) im Verlauf der kolorektalen Tumorprogression (nach ^[19]). Nach initialer, den WNT-Signalweg dysregulierender Mutation, kommen in der Progression weitere tumorigene genetische Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen hinzu.

APC ist integraler Bestandteil des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges (im Folgenden als **WNT-Signalweg** bezeichnet), dessen Endstrecke bei Aktivierung zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors β -Catenin führt. Der WNT-Signalweg hat eine große Bedeutung im Signalaustausch multizellulärer Organismen und ist evolutionär hochkonserviert ^[20]. Die WNT-Liganden sind eine Familie sezernierter, cysteinreicher, lipid-modifizierter Proteine ^[21], die den lokal begrenzten Signalaustausch über kurze Distanzen bewirken ^[22, 23]. Die Interaktion der WNT-Liganden mit ihrem Rezeptor (Frizzled, frz), führt letztlich zur Inhibition des β -Catenin-Degradationskomplexes, der in Abwesenheit der Liganden β -Catenin phosphoryliert, somit für die Ubiquitinierung markiert und dem proteasomalen Abbau freigibt ^[24] (Abb. 2). Die durch WNT-Aktivität verursachte Inhibition des Degradationskomplexes, der sich u.a. aus APC, der Glykogensynthasekinase-3- β (GSK3 β) ^[25] und vielen weiteren Proteinen zusammensetzt, führt zur zytoplasmatischen Akkumulation von β -Catenin ^[26]. Dieses gelangt über direkte Interaktion mit Kernporen-Komplexen in den Zellkern ^[27], wo es an DNA-gebundene TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren bindet ^[28], um so die Transkription von WNT-Zielgenen zu aktivieren. Welche Faktoren den nukleären Import β -Catenins kontrollieren ist bisher nicht vollständig geklärt. Da es seine Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern erfüllt, wird nukleär akkumuliertes β -Catenin als Zeichen eines aktivierten WNT-Signalweges angesehen ^[29]. Darüber hinaus erfüllt β -Catenin noch eine weitere Funktion: in Epithelien verbindet es das Zell-Zell-Kontaktprotein E-Cadherin mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts, weshalb β -Catenin auch membranständig nachgewiesen wird ^[30]. In der normalen Dickdarmschleimhaut ist die Aktivität des WNT-Signalweges stark reguliert. Die in der Mehrzahl der KRK vorliegende APC-Mutation jedoch, führt durch eine konstitutive Inhibition des β -

Catenin-Degradationskomplexes zu einem gestörten Abbau und zytoplasmatischer Akkumulation von β -Catenin und dadurch als Schlüsselmutation zur konstitutiven Aktivität des Signaltransduktionsweges.

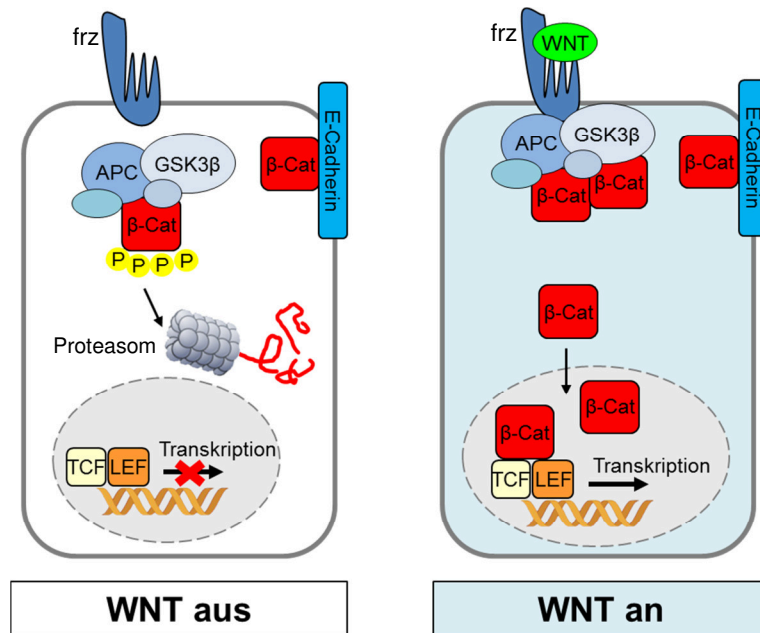


Abb. 2 Modell des WNT-Signalweges

Unter WNT-Einfluss („WNT an“) werden die Phosphorylierung und der folgende, durch Ubiquitinierung eingeleitete, proteasomale Abbau von β -Catenin verhindert. Der Degradationskomplex sättigt sich mit gebundenem β -Catenin. Neu synthetisiertes β -Catenin wird frei und gelangt in den Zellkern (nach [25]).

Der WNT-Signalweg übt seine Rolle in der Karzinogenese über die Effekte seiner Zielgene aus. Diese rufen zelluläre Eigenschaften hervor, die als Kennzeichen maligner Tumorerkrankungen, sog. „Hallmarks of Cancer“ bekannt sind [31, 32] und häufig eine treibende Kraft in der Karzinogenese darstellen. Dazu gehören Aufrechterhaltung proliferativer Signale [33-36], Abwehr antiproliferativer Signale, Aktivierung von Invasion und Metastasierung, unbegrenztes Replikationspotential [37], Induktion der Tumorangio-genese [38] und Resistenz gegenüber Apoptose bzw. Zelltod vermittelnden Stimuli [39]. Der WNT-Signalweg hat auch eine zentrale Bedeutung in der Tumorprogression, da entscheidende Transkriptionsfaktoren, die den Prozess der epithelio-mesenchymalen Transition (EMT) auslösen [40, 41], WNT-Zielgene sind. Diese regulieren die Expression epithelialer Marker herunter und steigern die Zellmotilität und Invasivität [42]. In diesem Prozess der Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe spielen Matrixmetalloproteasen, die teils direkte WNT-Zielgene sind [43, 44], eine wichtige Rolle. Anhand dieser, durch WNT-Zielgene verursachten Prozesse und zellulären Eigenschaften, wird die zentrale Bedeutung des WNT-Signalweges in der Initiation und Progression maligner Tumorerkrankungen offensichtlich.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der durch WNT-Aktivität ausgelösten zellulären Eigenschaften betrifft die fortwährende Erneuerung von Geweben aus ihren Stammzellen. Die Expression von WNT-Zielgenen markiert intestinale Stammzellen ^[45-47] und findet sich erwartungsgemäß überwiegend im Bereich der Kryptenbasis ^[48], wo sich das Stammzellkompartiment befindet ^[49]. WNT-Signalwegaktivität ist hierbei nicht nur ein Marker, sondern auch notwendig für den Erhalt der epithelialen Stammzellen des Darms ^[50, 51]. Interessanterweise ist seine Aktivität aber auch ein möglicher Marker kolorektaler Tumorstammzellen ^[52, 53]. Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften sind vermehrt resistent gegen Chemotherapeutika und daher eine mögliche Ursache für Therapieresistenz und Tumorrezidive ^[54, 55]. Darüber hinaus besteht ein wichtiger Zusammenhang zwischen Stammzelligkeit und Metastasierung, da Tumorzellen, die den für Metastasierung nötigen Prozess der EMT ^[56] durchmachen, vermehrt Stammzeleigenschaften aufweisen ^[57]. Tumorstammzellen können somit als mobile, mesenchymal differenzierte Zellen invasiv in umliegendes Gewebe eindringen und durch ihre Stammzeleigenschaften metastatische Absiedelungen bilden ^[58]. Diese, Therapieresistenz und Metastasierung auslösenden Eigenschaften des WNT-Signalweges, sind klinisch von besonderem Interesse, da der Großteil der KRK-Patienten nicht am Primärtumor, sondern an den Auswirkungen der Fernmetastasen verstirbt.

1.4 Hypothese und Fragestellung Interessanterweise ist der WNT-Signalweg nicht in allen Abschnitten eines KRK gleichsam aktiv. Die in allen Zellen eines KRK klonal vorliegende, initial entscheidende APC-Mutation lässt eine uniforme, genetisch determinierte Überaktivierung des WNT-Signalweges in allen Tumorzellen vermuten. WNT-Signalwegaktivität ist jedoch häufig heterogen im Tumor verteilt, mit erhöhter Aktivität im Bereich der Tumordinvasionsfront ^[59]. Dies zeigt sich in der Tumormorphologie und der heterogenen β -Catenin-Expression in den Kompartimenten Zellkern und Membran bzw. Zytoplasma. Im Bereich der Invasionsfront haben die Tumorzellen längliche oder rundliche, eher mesenchymale Morphologie, ohne ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte mit starker nukleärer β -Catenin-Expression (Abb. 3), während β -Catenin

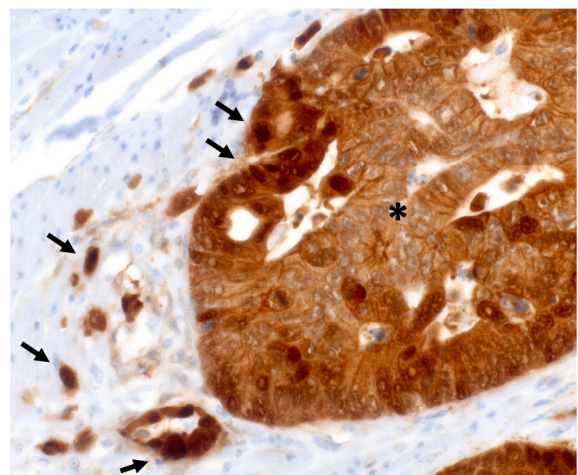


Abb. 3 Immunhistochemische Färbung für β -Catenin im Bereich der Invasionsfront eines Kolonkarzinoms. Die Tumorzellen im Zentrum (*) weisen membranständige Expression von β -Catenin auf, während im Bereich der Invasionsfront teilweise bis vollständig disseminierte Tumorzellen starke nukleäre β -Catenin Expression zeigen (→).

im Tumorzentrum meist membranös und zytoplasmatisch lokalisiert ist^[60]. Dieses tumormorphologische Phänomen hat auch klinische Bedeutung, da das Auftreten disseminierter, einzelner oder in kleinen Gruppen liegender Tumorzellen mit starker nukleärer β -Catenin Expression im Bereich der Invasionsfront, sogenannter „Tumorknospen“ (englisch: *tumor buds*), signifikant mit schlechtem Überleben von KRK-Patienten korreliert^[61]. Erwartungsgemäß werden im Bereich der Invasionsfront besonders mit Invasion assoziierte WNT-Zielgene, im Vergleich zum Tumorzentrum, stark exprimiert^[62].

Diese heterogene subzelluläre Verteilung von β -Catenin lässt darauf schließen, dass zusätzlich zu den deterministischen Mutationen immer noch ein regulierender Einfluss auf die WNT-Signalwegaktivität besteht^[60]. Dieser modulierende Einfluss könnte über die Induktion der nukleären Akkumulation oder durch transkriptionelle Transaktivierung β -Catenins, bspw. durch posttranslationale Modifikationen vermittelt werden. Auch die Modifikation von Co-Faktoren, die die nukleäre Translokation β -Catenins bewirken oder seine transkriptionelle Aktivität beeinflussen, ist ebenso denkbar wie eine Kombination der genannten Möglichkeiten.

Als Modulatoren der Aktivität des WNT-Signalwegs sind der mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK-Kaskade) bekannt^[59, 63, 64] oder Myofibroblasten im Bereich der Invasionsfront, die den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) sezernieren, wodurch der HGF-Rezeptor aktiviert werden kann^[52]. Dem MAPK-Kaskade- als auch dem HGF-System ist gemein, dass sie komplexe Interaktionen mit dem Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg (PI3K-Signalweg) aufweisen^[65, 66], der neben dem MAPK-Weg ein wichtiger Transduktor von Wachstumsfaktorsignalen auf Transkriptionsfaktoren ist.

Der PI3K-Signalweg ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, weil er einer der am häufigsten mutierten Signaltransduktionswege in humanen Krebserkrankungen ist^[67, 68] und seine Komponenten in ca. 50% aller KRK genetische Alterationen aufweisen^[69]. In der Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen ist PI3K I_A (im Folgenden als PI3K bezeichnet) am relevantesten in Krebserkrankungen^[70]. Wachstumsfaktor-Bindung an seinen jeweiligen Rezeptor führt über eine Reihe von Zwischenschritten^[71] zur Aktivierung der katalytischen p110-Untereinheit der PI3K (Abb. 4), die an der Zellmembran die Bildung von Phosphatidylinositol-4-5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3-4-5-Trisphosphat (PIP₃) katalysiert. Die PIP₃-Moleküle dienen dort als Ankerstruktur für Proteinkinase B (PKB, besser bekannt als AKT) die an spezifischen Aminosäureresten phosphoryliert und dadurch vollständig aktiviert wird^[72]. Aktiviertes AKT wiederum phosphoryliert zahlreiche Zielproteine und aktiviert letztlich Transkriptionsfaktoren mit u.a. angiogenetischer, anti-apoptotischer, Proliferations-,

Wachstums- und Invasions-fördernder Wirkung [68, 73]. Der physiologische Antagonist des PI3K-Signalweges ist das Tumorsuppressorprotein Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN), das umgekehrt die Bildung von PIP₂ aus PIP₃ katalysiert, die Menge an membrangebundenem PIP₃ reduziert und somit die Signalwegaktivität senkt [74]. Von besonderem Interesse sind die Interaktionen zwischen PI3K- und WNT-Signalweg in Malignomen mit genetisch alteriertem WNT-Signalweg, weil der PI3K Signalweg durch spezifische Inhibitoren experimentell und therapeutisch gehemmt werden kann [73] und somit möglicherweise indirekt eine Modulation des WNT-Signalweges erreicht werden könnte.

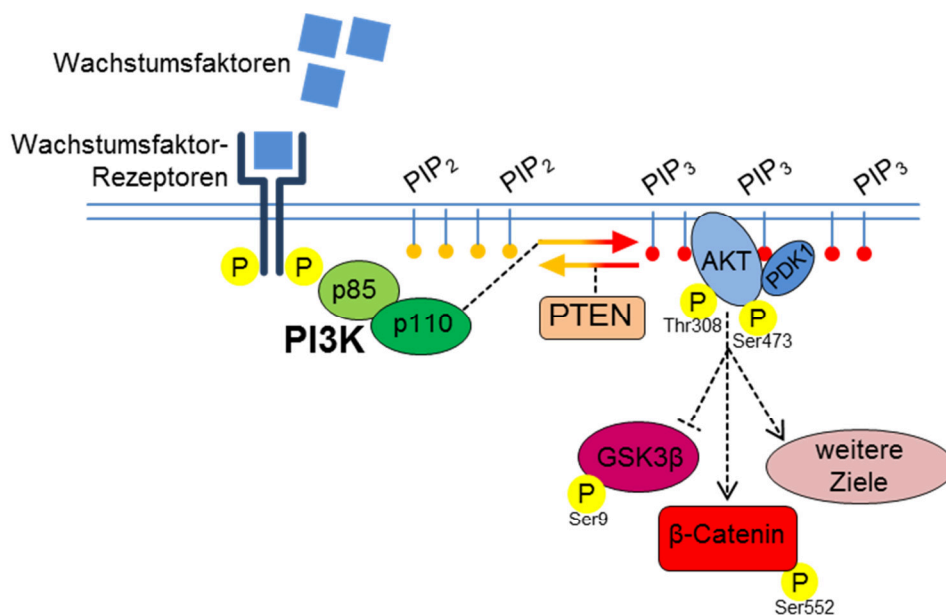


Abb. 4. Schematische Darstellung des PI3K-AKT-Signalweges

Liganden-Bindung an Wachstumsfaktor-Rezeptoren aktiviert PI3K, die an der Zellmembran PIP₂ zu PIP₃ umwandelt. Diese Reaktion wird von PTEN antagonisiert. An PIP₃ gebundenes AKT wird durch Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert selbst weitere Zielproteine wie GSK3β und β-Catenin, wodurch deren Aktivität moduliert wird (modifiziert nach [73]).

Die Interaktion beider Signaltransduktionswege ist durch eine widersprüchliche Datenlage bisher unklar: Einerseits gibt es Hinweise auf einen aktivierenden Einfluss des PI3K-Signalweges auf den WNT-Signalweg in extraintestinalen Zelllinien, in denen die nukleäre Translokation und transkriptionelle Aktivität β-Catenins durch AKT-vermittelte Phosphorylierung induziert wurde [75]. Andererseits wurde ein aktivierender Einfluss des PI3K-Signalweges auf den WNT-Signalweg in Zelllinien ohne Alterationen in WNT-Signalwegskomponenten ausgeschlossen [76].

Um eine mögliche Interaktion beider Signaltransduktionswege besser zu verstehen, wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob die PI3K-Signalwegaktivität die transkriptionelle Aktivität von β-Catenin beeinflusst und über welche Mechanismen diese Interaktion vermittelt werden könnte. Erkenntnisse über die genaue Regulation der transkriptionellen Aktivität β-Catenins und die dabei möglicherweise

beteiligten Kofaktoren könnten neue Therapieoptionen ermöglichen, die besonders für KRK-Patienten von Bedeutung wären.

2 Material und Methoden

2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), fötales Kälberserum (fetal bovine serum, FBS) und Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/m), sterile Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Kalzium und ohne Magnesium (PBS), sowie steriles Trypsin / EDTA in PBS (1:250; 0,25% / 0,02%) wurden bei Biochrom AG (Berlin) erworben. *Fugene 6* Transfektionsreagenz, *Complete* Proteaseinhibitoren-Cocktail und *PhosStop* Phosphataseinhibitoren-Cocktail wurden bei Roche (Penzberg) gekauft. Der *DC-Protein-Assay* sowie das vorverdünnte Bovines Serum-Albumin (BSA)-Standard Set zur Bestimmung der Proteinkonzentration und fettfreies Trockenmilchpulver für den Western Blot kamen von BioRad (München). Das *Immobilon* Chemolumineszenz-Reagenz (ECL) und die *Immobilon-P* Polyvinylidenfluorid- (PVDF-)Membranen kamen von Millipore (Schwalbach). Der Proteingrößenmarker *Precision plus*, DNA-Größenmarker *Generuler 1kB*, *Rapid-DNA-Ligation-Kit*, *Fast-Digest* Restriktionsenzyme, *FastMedia* LB-Amp-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml), DNA-Ladepuffer und das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* waren von Fermentas (St.Leon-Rot). Das *Pureyield Plasmid Midiprep Kit* wurde von Promega (Mannheim) bezogen. Die DNA-Polymerase *KOD* mit Korrekturlesefunktion (*proofreading*) wurde im Kit mit Nukleotiden, Puffer und MgSO₄ bei Merck (Darmstadt) erworben. Zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen und zur DNA-Aufreinigung aus enzymatischen Reaktionen wurde das *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Lifesciences, Freiburg i. Br.) verwendet. Ebenfalls von GE Healthcare Lifesciences waren die Autoradiographiefilme *Hyperfilm ECL*. Das *Infusion dry-down* PCR-Klonierungskit kam von Clontech (Frankfurt a.M.). Chemokompetente DH5-alpha E.coli-Bakterien zur Klonierung, Fluoreszenz-Sekundärantikörper, *OptiMEM*-Medium und das *Pro Long Gold* Eindeckmedium mit DAPI für die Immunfluoreszenz wurden bei Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), Ampicillin, Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), Agarose, *Rotiphorese* Acrylamid-Lösung, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), 4 x *Rotiload* Proteinladepuffer, Ampicillin und Ammoniumpersulfat (APS) wurden von Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Steriles Dimethylsulfoxid (DMSO), Paraformaldehyd (PFA), Ponceau-S-Lösung, Tween-20, Protein-G-gekoppelte Sepharose und alle übrigen Grundstoffe (Salze, Puffer etc.) waren von Sigma-Aldrich (München). Das *BigDye3.1 Direct Sequencing Kit*, *HiDi* Formamid und der *Fast SYBR Green Master Mix* wurden bei Applied Biosystems (Darmstadt) erworben. Das *DyeEx Spin Kit*, die *Qiashredder*-Säulen, das *RNeasy mini Kit* und das *Quantitect Reverse Transcription Kit* waren von Qiagen (Hilden). Alle Antikörper (siehe 2.4.3) wurden von CellSignaling (Frankfurt a.M.), Millipore (Schwalbach), Epitomics (Burlingame, CA, USA), Neomarkers (Fremont, CA, USA), Sigma und BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

2.2 Zellkultur und Zelllinien

2.2.1 Zelllinien

Alle Zelllinien, abgesehen von der RWP-1 Zelllinie wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben.

Die **HEK293T** (human embryonic kidney, 293T) Zelllinie ist weit verbreitet in Forschung und Biotechnologie. Sie ging aus humanen embryonalen Nierenzellen durch Transformation mit humanem Adenovirus Typ 5 hervor, die später stabil mit dem SV40 large T Antigen transfiziert wurde.

Die **CHO-1** (chinese hamster ovary) Zelllinie geht auf Ovarienzellen des chinesischen Hamsters zurück, wächst als Monolayer und findet breite Anwendung in Forschung und Biotechnologie ähnlich der HEK293T Zelllinie.

Die **HeLa** Zelllinie geht auf humane Zervixkarzinom-Zellen zurück und wächst als epithelialer Monolayer. Sie ist eine der am meisten verwendeten Zelllinie in der präklinischen Krebsforschung seit Jahrzehnten.

Die **SW480** Zelllinie stammt aus einem humanen Adenokarzinom des Kolons.

Die **RWP-1** Zelllinie stammt aus einem humanen duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Sie wurde von A.G. de Herreros (IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spanien) zur Verfügung gestellt.

Die **L-Zellen** sind eine fibroblastoide Maus-Bindegewebszelllinie die stabil mit einem Wnt3a-kodierenden Expressionskonstrukt (**Wnt3a-L-Zellen**) bzw. dem korrespondierenden Leervektor (**Kontroll-L-Zellen**) transfiziert wurden.

Die Identität der 293T, CHO-1, HeLa und SW480 Zelllinien wurde mittels DNA-Typisierung sichergestellt (DSMZ). Da die RWP-1 Zelllinie weder im Katalog der DSMZ noch der American Type Tissue Culture (ATCC) vorhanden ist, wurde hier lediglich die Einzigartigkeit des genetischen Profils der Zelllinie bestätigt um eine Kontamination mit anderen Zelllinien auszuschließen.

2.2.2 Standardkulturbedingungen, Passagieren und Einfrieren von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % FBS und Penicillin / Streptomycin (1000 U/ml / 1000 µg/ml) (DMEM/FBS) bei 37°C und 5 % CO² in einem Zellkulturinkubator bei konstanter Luftfeuchtigkeit in 25-cm² Zellkulturflaschen (T25-Flaschen) kultiviert. Alle Arbeiten an Zelllinien wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Spätestens wenn die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, das PBS entfernt und die Zellen mit 1 ml Trypsin / EDTA 5 min inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche wurde am Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die resultierende Zellsuspension wurde in 9 ml DMEM/FBS aufgenommen und hiervon 1 ml zur Erhaltung der Kultur mit 6 ml DMEM/FBS ausplattiert. Der Rest der Suspension wurde in Experimente eingesetzt oder verworfen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und die entstandene Zellsuspension 5 min bei 100 x g mit Hilfe einer Ausschwingrotorzentrifuge sedimentiert. Das entstandene Sediment wurde in 4 bis 6 ml Kryomedium (DMEM/FBS mit 10 % DMSO) resuspendiert und zu 2 ml Aliquots in 2 ml-Kryobehälter überführt. Die Kryobehälter wurden in einem Kühler (*Nalgene Mr. Frosty*, Thermo Scientific, Schwerte), der ein langsames Absinken der Temperatur mit einer Rate von ca. 1°C / min garantierte, in einem -80°C-Gefrierschrank eingefroren. Am Folgetag, wurden die Kryobehälter in die endgültige Lagerungsstelle im -80°C-Gefrierschrank oder in einen Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen von Zellkulturen wurden die Kryobehälter dem -80°C-Gefrierschrank oder dem Stickstofftank entnommen, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit 70% Ethanol desinfiziert und die

Zellsuspension in warmem DMEM/FBS aufgenommen. Die Suspension wurde 5 min bei 100 x g zentrifugiert, um die enthaltenen Zellen zu sedimentieren. Die sedimentierten Zellen wurden in 6 ml DMEM/FBS resuspendiert und in T25-Flaschen ausplattiert. Am Folgetag wurde die Vitalität der Zellen morphologisch am Phasenkontrastmikroskop beurteilt und das Medium erneuert, um nichtadhärente, tote Zellen zu entfernen.

2.2.3 Herstellung von Wnt3a-konditioniertem Zellkulturmedium

Der Zellkulturmediumüberstand von Wnt3a-produzierenden Zellen wurde als Wnt3a-konditioniertes Medium verwendet ^[77]. Dazu wurden Wnt3a-produzierende L-Zellen oder korrespondierende, den Leervektor exprimierende L-Zellen (Kontrolle) in 75-cm²-Flaschen (T75-Flaschen) mit 10 ml Zellkulturmedium kultiviert. Nach Erreichen von ca. 80% Konfluenz wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 4°C aufbewahrt sowie das Medium erneuert. Nach weiteren drei Tagen in Kultur wurde der Überstand erneut abgenommen und mit dem ersten Überstand vereint. Nach Filtration durch einen 0,2 µm PVDF-Spritzenfilter wurde das Medium direkt verwendet oder aliquotiert und zur Langzeitlagerung bei -20°C eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA in kleinem Maßstab, bspw. nach Klonierungen zu erhalten wurde eine einzelne Bakterienkolonie einer Kulturplatte in 5 ml Flüssigkultur aus Ampicillin-haltigem Luria Bertani-Medium (LB-Amp-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln (300 UpM) inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 5000 x g) und mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (Fermentas), nach den Anweisungen des Herstellerprotokolls, aufgearbeitet.

Zur Plasmidpräparation in größerem Maßstab wurde eine 5 ml LB-Amp-Kultur aus einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und 6 h bei 37°C unter ständigem Schütteln (300 UpM) inkubiert. Danach wurde mit dieser Vorkultur eine 250 ml LB-Amp-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln (300 UpM) inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterien sedimentiert (15 min, 5000 x g) und das Bakteriensediment, den Anweisungen des Herstellers folgend, mit Hilfe des *Pureyield Plasmid Midiprep Kits* (Promega) aufgearbeitet.

2.3.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von einzelnen DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe (bspw. nach Restriktionshydrolyse oder Polymerasekettenreaktionen (PCR)), wurden 9 Volumenteile des Reaktionsansatzes mit einem Volumenteil 10-fach DNA-Ladepuffer versetzt und die Mischung in ein 0,8% präparatives TAE-Agarosegel geladen. Die Größe der zu extrahierenden DNA-Fragmente wurde anhand eines parallel aufgetragenen DNA-Größenmarkers ermittelt und das gewünschte Fragment unter UV-Licht, mit Hilfe eines sterilen Skalpelles, ausgeschnitten. Hierbei wurde langwelliges, niederenergetisches UV-Licht verwendet und auf möglichst kurze UV-Exposition geachtet, um

eventuelle Schädigung der DNA zu vermeiden. Danach wurde das Agarosefragment mit Hilfe des *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (GE-Healthscare), den Herstellerangaben folgend, aufgearbeitet. Um möglichst hohe DNA-Konzentrationen zu erreichen, wurde die DNA schlussendlich in 20 µl Volumen eluiert.

2.3.3 DNA-Aufreinigung aus enzymatischen Reaktionen

Zur Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen wie bspw. Restriktionshydrolysen oder PCR wurde das gesamte Reaktionsvolumen mit Hilfe des *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet. Um möglichst hohe DNA-Konzentrationen zu erreichen wurde die DNA letztlich in 20 µl Volumen eluiert.

2.3.4 RNA-Aufreinigung aus Zellkulturen

293T Zellen wurden in 12-Napf-Platten kultiviert und die Experimente in Triplikaten durchgeführt. Nach dem Experiment wurden die Platten mit kaltem PBS gewaschen, das PBS vollständig abgesaugt und die Zellen in 350 µl RLT-Lysepuffer (Qiagen) lysiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde über eine *Qiasredder*-Säule homogenisiert und die RNA entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des *Qiagen RNeasy mini Kits* (Qiagen) aufgearbeitet.

2.3.5 Vermessen der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration gewonnener DNA oder RNA wurde am Spektralphotometer *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bestimmt. Das Gerät misst die Absorption einer Lösung bei 260 und 280 nm Wellenlänge. Vor der Konzentrationsbestimmung der Proben wurden Messungen mit dem Elutionsmedium (Puffer oder Wasser) durchgeführt. Der entstandene Leerwert („blank“) wird automatisch durch das Gerät von den gemessenen Werten abgezogen. Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe der Lambert-Beer-Gleichung bestimmt:

$$c = A \cdot \epsilon \cdot d$$

c = Konzentration, A = Absorption, ϵ = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke

Das Gerät berücksichtigt automatisch die geräteseitig vorgegebene Schichtdicke und den voreingestellten Extinktionskoeffizienten für die zu vermessende Probe, im Falle doppelsträngiger DNA mit $\epsilon = 50 \text{ ng}/(\text{cm} \cdot \mu\text{l})$ und für RNA mit $\epsilon = 40 \text{ ng}/(\text{cm} \cdot \mu\text{l})$. Zusätzlich wurde noch der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt um Hinweise auf eventuelle Verunreinigung der Probe zu erhalten. Reine Präparationen weisen einen 260/280 – Quotienten von ca. 1,8 auf.

2.3.6 Plasmide

p7xTOP-Flash und p7xFOP-Flash

Das Reporter-Gen-Plasmid p7xTOP-Flash basiert auf dem dem pTA-Luc Vektor von Clontech. Dieser Vektor enthält den minimalen „TA“-Promotor (Sequenz: TA), vor dem sich in Richtung 5´ sieben β -Catenin / TCF4 Bindeelemente (TBE´s) oder sog. TCF optimale Promotersequenzen (TOP-Sequenzen) „AGATCAAAGG“, getrennt durch die Sequenz „gggta“, befinden. Die künstlichen Promotersequenzen

steuern die Expression des in 3' Richtung kodierten Luciferase-Gens des Glühwürmchens *Photinus pyralis* (Firefly-Luciferase) abhängig von der Aktivität des WNT-Signalweges. Das Plasmid p7xFOF-Flash ist analog aufgebaut, jedoch jeweils mit mutierten TCF-Bindeelementen und diente als Kontrolle in Reporter-Experimenten. Beide Plasmide wurden im Labor von Randall T. Moon (University of Washington, USA) kloniert und über addgene (www.addgene.org) bezogen.

pRL-TK

Der pRL-TK Vektor (Promega) kodiert ein Luciferase-Gen aus der Seeanemone *Renilla reniformis* (Renilla-Luciferase) unter der Kontrolle des Herpes simplex Virus - Thymidinkinase-Promotors (HSV-TK), der eine mittlere Expressionsstärke verursacht. Das Plasmid dient als Kontrollvektor zum Normalisieren der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen in Luciferase-Reporter-Experimenten.

pBSKS-ERTM

Das Plasmid pBSKS-ERTM wurde von Gerard Evan (University of Cambridge, GB) zu Verfügung gestellt. Es kodiert für einen mutierten Östrogenrezeptor (ERTM), der den Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen im Vergleich zu Östrogen mit einer 1000-fach höheren Affinität bindet. Im Gegensatz zum wildtypischen Östrogenrezeptor, führt Tamoxifen beim ERTM nicht zu einer Blockade, sondern zu einer Aktivierung des Rezeptors^[78].

pcl-neo-Δ45-β-Catenin

Der pcl-neo-Δ45-β-Catenin Vektor basiert auf dem pcl-neo-Rückgrat (Promega), enthält einen CMV-Promotor und wurde von Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt. Es kodiert für eine degradationsresistente Deletionsmutante von β-Catenin, das vom β-Catenin Destruktionskomplex nicht mehr abgebaut werden kann, da ihm die dafür notwendige Phosphorylierungsstelle am Serin 45 fehlt. Überexpression dieses mutierten β-Catenins führt in bestimmten Zelllinien (293T, CHO-1) zu einer starken Aktivierung der β-Catenin-abhängigen Transkription^[79].

pEGFP-C1-myc

Das pEGFP-C1-Plasmid stammt von Clontech und kodiert ein verbessertes grün-fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP), mit angehängtem myc-Tag unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Es diente als Donor bei der Klonierung des p7xTOP-GFP Plasmids und als Positivkontrolle für die Expression des myc-Proteintags.

pcDNA3-CAT

Der pcDNA3-CAT Vektor (Invitrogen) kodiert die bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase. Das Plasmid dient als Kontrollplasmid in transfektionsbasierten Experimenten, um mögliche negative Effekte einer exogen induzierten Proteinexpression auszuschließen und so die Konformität zwischen den Experimenten herzustellen.

2.3.7 Klonierungen

2.3.7.1 pcl-neo- Δ 45- β -CateninER-myc

2.3.7.1.1 SOE-PCR zur Fusionsgen-Erzeugung

Um ein eukaryontisches Expressionsplasmid zu klonieren, mit dem die nukleäre Akkumulation eines mutierten, degradationsresistenten β -Catenin-Proteins (Δ 45- β -Catenin) induziert werden kann, wurde das Δ 45- β -Catenin-Gen aus dem Vektor pcl-neo- Δ 45- β -Catenin mit dem mutierten Östrogenrezeptor ERTM aus dem Vektor pBSKS-ERTM in einer sogenannten SOE-PCR (*splicing by overlength extension* – PCR) fusioniert^[80]. Danach wurde das Fusionsgen in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert (siehe 2.3.7.1.2; Abb. 5 und Abb. 6).

Eine SOE-PCR zur Fusion zweier DNA-Sequenzen läuft in drei Schritten ab:

1. Amplifikation des ersten Gens (Gen I), wobei am 3' Ende mit dem Primer-Überhang eine homologe Sequenz zum 5'-Ende der zweiten DNA-Sequenz erzeugt wird.

2. Amplifikation des zweiten Gens (Gen II), wobei am 5' Ende mit dem Primer-Überhang eine homologe Sequenz zum 3'-Ende der ersten DNA-Sequenz erzeugt wird.

3. SOE-PCR-Reaktion in der die beiden DNA-Fragmente sich gegenseitig über ihre homologen Enden verbinden, so als PCR-Primer dienen und die beiden Stränge von der Polymerase komplettiert werden. Um eine möglichst hohe Ausbeute an erzeugtem Fusionsgen zu erreichen, wurden die initial verwendeten Primer am 5' und 3' Ende des erzeugten Fusionsgens nach fünf Zyklen dazugegeben, um bereits entstandenes Fusionsgen direkt zu amplifizieren (Abb. 5).

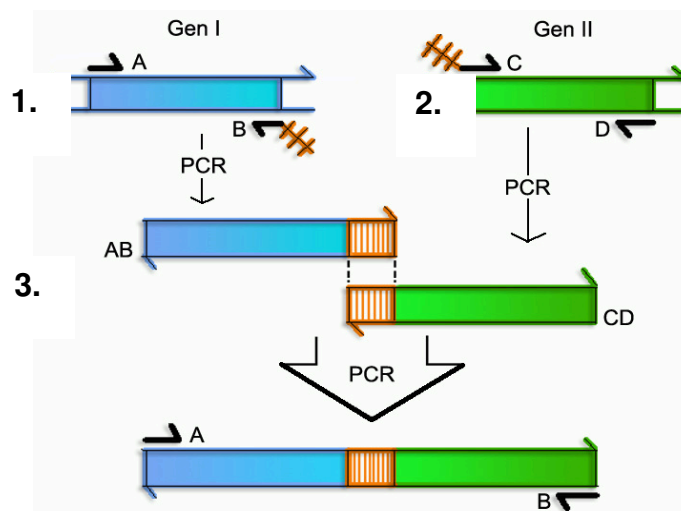


Abb. 5 Schematische Darstellung der SOE-PCR zur Erzeugung von Fusionsgenen.

In der **ersten PCR** wurde das Δ 45- β -Catenin-Gen aus dem Vektor pcl-neo- Δ 45- β -Catenin mittels folgender Primer amplifiziert:

Primer A 5'-TCTTAAGGCTAGAGTACCATGGCTACTCAAGCTGATTTG-3'

Primer B 5´-AGCACCCATTTTCATTTTCGCAGGTCAGTATCAAACCAGGCC-3´

Dabei führt Primer A einen 15 Basen-Überhang (unterstrichen) homolog zum Zielvektor nach Hydrolyse durch das Enzym Scal ein und Primer B einen 20 Basen langen Überhang (unterstrichen), homolog zum 5´-Ende des ERTM-Gens. Das entstehende Amplikon hat eine Länge von ca. 2350 Basenpaaren (bp).

Die PCR wurde mittels der KOD-Polymerase (Merck) nach folgendem Schema durchgeführt:

Reaktionsansatz (1 Reaktion à 25 µl):

Primermix A+B (je 20 µM)	0,5	µl
10x KOD-Puffer	2,5	µl
dNTP (je 2mM)	2,5	µl
MgSO ₄ (25mM)	2,25	µl
KOD-Polymerase	0,5	µl
Matrize	1,0	µl
H ₂ O	15,75	µl

Reaktionsbedingungen:

2 min	95°C	} 30 Wiederholungen
1 min	95°C	
20 s	Gradient 65°C – 72°C	
50 s	70°C	
5 min	70°C	

Um auch ohne vorherige Optimierung mit hoher Wahrscheinlichkeit ein PCR-Produkt zu erhalten, wurden insgesamt 8 Reaktionen à 25 µl bei verschiedenen Primerbindetemperaturen (Gradient 65°C – 72°C) durchgeführt. Alle Reaktionen wurden vereint, ein Aliquot mit DNA-Ladepuffer vermischt und dieses schließlich in ein 1,0% TBE-Agarosegel geladen. Ergab sich hierbei eine einzelne starke Bande, wurden die vereinten Reaktionen mit Hilfe des Enzyms DpnI hydrolysiert, um die als Matrize verwendete Plasmid-DNA zu fragmentieren. Denn DpnI hydrolysiert ausschließlich native methylierte DNA und somit keine durch PCR erzeugten DNA-Fragmente:

Reaktionsansatz:

PCR-Reaktion	190	µl
Fast digest Dpn I	1	µl
10 x Fast Digest Puffer	22	µl
H ₂ O	7	µl

Reaktionsbedingungen:

15 min	37°C
5 min	80°C

Danach wurde die gesamte Reaktion mit Hilfe des *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* aufgereinigt.

Ergaben sich initial mehrere Banden, wurde die gesamte Reaktion mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt, in ein präparatives TAE-Agarosegel geladen und die gewünschte Bande extrahiert. Auf eine DpnI-Hydrolyse konnte in diesem Fall verzichtet werden.

In der **zweiten PCR** wurde das ERTM-Gen aus dem Vektor pBSKS-ERTM mittels folgender Primer amplifiziert:

Primer C

5'-TGGTTTGATACTGACCTGCGAAATGAAATGGGTGCTTCAGG-3'

Primer D

5'-CGGGTCGACTCTAGCTACAGGTCCTCCTCGGAGATCAGCTTCTGCTCGATCGTGTTGGGGAA-3'

Wobei Primer C einen 18 Basen-Überhang (unterstrichen) homolog zum 3'-Ende des Δ 45- β -Catenin-Gens einführt und Primer D, neben einer für das myc-Proteintag kodierenden Sequenz (*kursiv*) einen 15 Basen langen Überhang (unterstrichen), homolog zum 3'-Ende des Zielvektors nach Hydrolyse mittels XbaI erzeugt.

Die PCR wurde analog zur ersten PCR mittels der KOD-Polymerase durchgeführt, mit einer, dem kürzeren Amplikon (ca. 1000 bp) angepassten, kürzeren Elongationszeit:

Reaktionsbedingungen:

2 min	95°C	} 30 Wiederholungen
1 min	95°C	
20 s	Gradient 65°C – 72°C	
20 s	70°C	
5 min	70°C	

Zur weiteren Aufbereitung der PCR-Produkte wurde wie bei der ersten PCR verfahren.

In der abschließenden **SOE-PCR** wurden nun die beiden extrahierten PCR-Produkte im molaren Mischungsverhältnis 1:1 in eine PCR-Reaktion eingesetzt und in fünf PCR-Zyklen amplifiziert:

Reaktionsansatz (1 Reaktion à 25 μ l):

10x KOD-Puffer	2,5 μ l
dNTP (je 2mM)	2,5 μ l
MgSO ₄ (25mM)	2,25 μ l
KOD-Polymerase	0,5 μ l
PCR-Produkte-Mix	1,0 μ l
H ₂ O	16,25 μ l

Reaktionsbedingungen:

2 min	95°C	} 5 Wiederholungen
1 min	95°C	
20 s	Gradient 65°C – 72°C	
70 s	70°C	

Zugabe der Primer A und D (Endkonzentration 0,4 μ M)

1 min	95°C	} 25 Wiederholungen
20 s	Gradient 65°C – 72°C	
70 s	70°C	
5 min	70°C	

Das entstandene Fusionsgen (ca. 3350 bp) wurde per Agarosegel-Extraktion isoliert.

2.3.7.1.2 Infusion-Klonierung

Das Infusion PCR-Klonierungssystem von Clontech beruht auf einer proprietären DNA-Rekombinase, die in der Lage ist, DNA-Enden mit 15-Basenpaar-Homologie zu rekombinieren. Diese homologen

Überhänge werden am 5' und am 3' Ende des zu inserierenden DNA-Stückes mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern generiert. Eine Infusion-Klonierung besteht aus drei Schritten:

1. Öffnen des Ziel-Vektors pcl-neo- Δ 45- β -CateninER-myc durch Hydrolyse mittels der Enzyme Scal und Xbal:

<u>Hydrolyse:</u>		
Plasmid DNA	5	μ g
Scal	2	μ l
Xbal	2	μ l
10x FastDigest-Puffer	6	μ l
H ₂ O	ad 60	μ l

Gel-Extraktion des Plasmid-Rückgrats (siehe 2.3.2) und Konzentrationsbestimmung der DNA.

2. *Infusion*-Reaktion:

Mischen der DNA des Zielvektors mit der Insert-DNA im molaren Verhältnis 1:2;

Inkubation: 15 min bei 37°C, dann 15 min bei 50°C, danach sofort auf Eis und Zugabe von 40 μ l TE (pH 8,0). Als Kontrollreaktion wurde die gesamte Prozedur ohne das *Infusion*-Enzym durchgeführt.

3. Transformation in chemokompetente DH5 α -E.coli:

Zur Transformation wurden hochkompetente E.coli Stämme verwendet (sog. „*library efficiency*“, Effizienz 1×10^9 cfu/ μ g Plasmid-DNA, *Top10*, Invitrogen). Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 2,5 bis 5 μ l der vorverdünnten *Infusion*-Reaktion oder der Kontrollreaktion direkt in 50 μ l Bakteriensuspension pipettiert, durch sanftes Schütteln gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis, wurden die Mikroreaktionsgefäße 45 s bei 42°C im Heizblock inkubiert (sog. „*heat shock*“), danach sofort 2 min auf Eis gekühlt und 450 μ l SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben. Die Suspension wurde anschließend 1 h bei 37°C im Heizblock sanft geschüttelt (300 UpM). Letztlich wurden 100 μ l der Suspension auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Der Rest der Lösung wurde 2 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, in 100 μ l SOC aufgenommen und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten entnommen, die Effizienz der Klonierung durch Vergleich mit den Kontrollplatten beurteilt und 10 Kolonien in LB-Amp Medium angeimpft. 12-18 h später wurde Plasmid-DNA präpariert (siehe 2.3.1) und diagnostische Restriktionshydrolysen durchgeführt. Eine Auswahl der in diesen Untersuchungen positiven Klone wurde mittels der Sanger-Methode sequenziert.

2.3.7.1.3 Funktionelles Austesten des Expressionsvektors pcl-neo Δ 45- β -cateninER-myc

Nach Identifikation eines korrekten Plasmids durch diagnostische Restriktionshydrolyse und direkte Sanger-Sequenzierung, wurden 293T Zellen mit dem Plasmid transfiziert und die Expression des Transgens im Western Blot untersucht. Positivkontrollen (pcl-neo Δ 45- β -Catenin, pcDNA3-SMAD3-myc) und eine Negativkontrolle (pcl-neo) wurden ebenfalls transfiziert. Im Antikörper-basierten Nachweis von β -Catenin zeigte sich in den mit pcl-neo Δ 45- β -cateninER-myc transfizierten Zellen eine charakteristische Doppelbande, da hier einerseits das endogene β -Catenin (ca. 92 kD) und das Transgen (ca. 123 kD) zur Darstellung kommt (siehe Abb.6 und 7).

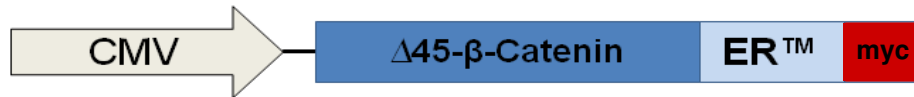


Abb. 6 Schematische Darstellung der Expressionskassette des Vektors pcl-neo- $\Delta 45$ - β -CateninER-myc, der für ein Fusionsgen aus degradationsresistentem β -Catenin ($\Delta 45$ - β -Catenin) und mutiertem Östrogenrezeptor (ERTM) kodiert. C-terminal angehängt das myc-peptid-tag.

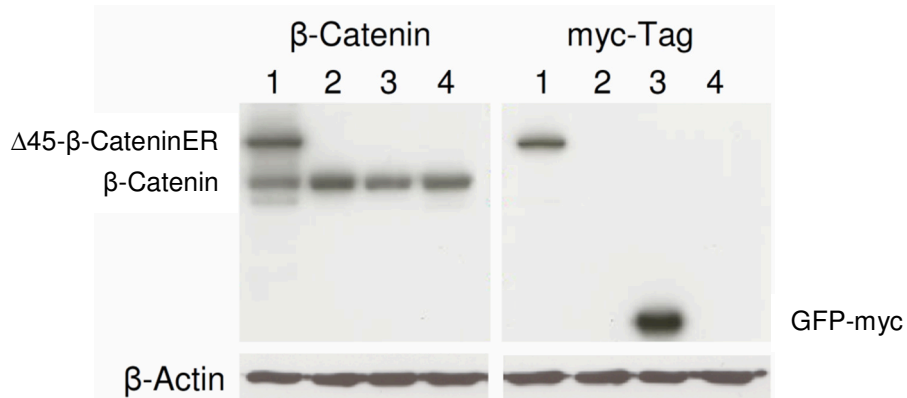


Abb. 7 Western Blot Analyse von 25 μ g Gesamtproteinlysaten von 293T Zellen transfiziert mit 2 μ g Plasmid DNA (1: pcl-neo $\Delta 45$ - β -CateninER-myc; 2: pcl-neo $\Delta 45$ - β -Catenin; 3: pEGFP-C1-myc; 4: pcl-neo) inkubiert mit anti- β -Catenin-Antikörper oder anti-myc-tag-Antikörpern.

Um anschließend die Funktion des experimentellen Systems, also die Induktion der nukleären Akkumulation des transgenen Fusionsproteins durch Zugabe von 4-OHT zu testen, wurden HeLa Zellen mit pcl-neo $\Delta 45$ - β -CateninER-myc transfiziert, mit 4-OHT bzw. als Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt und die Lokalisation des Fusionsproteins in der konventionellen Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt (Abb.8). Hierbei zeigte sich, dass unter 4-OHT-Behandlung das Fusionsprotein im Zellkern akkumuliert, während in den mit Ethanol behandelten Zellen eine über die gesamte Zelle verteilte Expression zu finden ist.

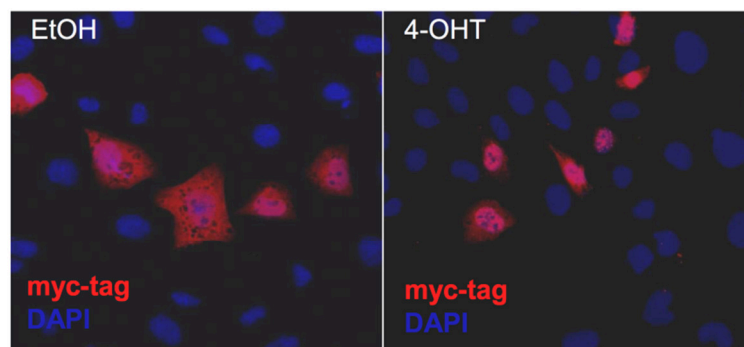


Abb.8 Konventionelle Immunfluoreszenzmikroskopie von HeLa Zellen nach transienter Transfektion mit pcl-neo $\Delta 45$ - β -CateninER-myc. 12 h nach Transfektion wurde EtOH bzw. 500 nM 4-OHT zugegeben und nach weiteren 4 h die Immunfluoreszenzfärbung für myc-tag durchgeführt. DAPI markiert die Zellkerne.

2.3.7.2 p7xTOP-GFP

Um den Aktivierungszustand des WNT Signalweges auch mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden darstellen zu können, wurde ein Reportergenvektor kloniert, der für EGFP unter der Kontrolle von WNT-abhängigen Promotoren kodiert (Abb. 9).

Der Vektor p7xTOP-Flash wurde hierzu mittels der Enzyme NcoI und FseI hydrolysiert, das Plasmid-Rückgrat Gel-extrahiert und somit das Luciferase-Gen herausgetrennt.

Das EGFP-Gen wurde aus dem Vektor pEGFP-C1 mit Hilfe folgender Primer amplifiziert (PCR siehe 2.3.6.1.1):

Forward: 5´- TCGCCACCATGGTGA - 3´

Reverse: 5´- AAGCCCGCCTTATCTA - 3´

Primer „forward“ diente lediglich der Amplifikation, während Primer „reverse“ eine FseI-Schnittstelle (CCGGCCGG) in das PCR-Produkt einführte. Die PCR-Produkte wurden vereint, aufgereinigt und mittels der Enzyme NcoI und FseI hydrolysiert. Danach wurde der gesamte Reaktionsansatz Gel-extrahiert (siehe 2.3.2).

Das EGFP-Insert und das vorher aus p7xTOP-Flash extrahierte Plasmid-Rückgrat wurden im molaren Verhältnis 1:3 gemischt und ligiert:

Gesamt DNA	100 ng (Insert + Rückgrat im Verhältnis 1:3)
T4-DNA-Ligase	1 µl
5 x Rapid-Ligation-Puffer	2 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 20°C inkubiert.

Die Transformation in DH5α-E-coli erfolgte analog zu wie in 2.3.7.1.2 beschrieben.

Als Kontrolle wurde die gesamte Reaktion ohne Zugabe der T4-DNA-Ligase durchgeführt.

Es wurden 10 Kolonien in LB-Amp-Medium angeimpft und Plasmid-DNA präpariert. Mit Hilfe einer diagnostischen Restriktionshydrolyse (NcoI/FseI) wurden potentiell richtige Klone identifiziert. Plasmid-DNA zweier in dieser Untersuchung korrekter Klone wurde in 293T Zellen transfiziert, die danach zur Induktion von WNT-Signalwegaktivität mit 30 mM LiCl stimuliert wurden (siehe 2.6.5). Die Expression des WNT-Reportergens EGFP wurde fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

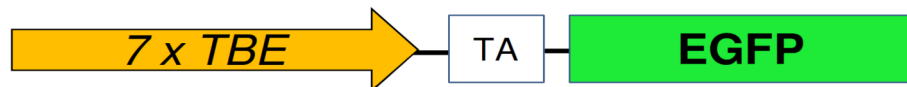


Abb. 9 Schematische Darstellung des Vektors p7xTOP-GFP der für ein verbessertes grün fluoreszierendes Protein (EGFP) unter der Kontrolle von sieben TCF-Bindeelementen (TBE's) bzw. TCF-optimalen Promotor-Elementen (TOP) kodiert. TA steht für den „TA-minimalen-Promotor“ (Sequenz: TA).

2.3.7.3 pcl-neo-S552D-Δ45-β-Catenin

Eine Änderung der Aktivität von Proteinen in der Signaltransduktion wird häufig über Phosphorylierungen von Serin-, Tyrosin oder Threoninresten reguliert. Um eine dauerhafte Phosphorylierung zu simulieren, kann zielgerichtet ein Aminosäurerest durch einen negativ geladenen Aminosäurerest, wie bspw. Aspartat ersetzt werden, da dieser in seinen Ladungseigenschaften einem phosphorylierten Aminosäurerest sehr ähnelt. Dieser wird als phosphomimetischer Aspartatrest bezeichnet. Um diesen im Bereich der putativen AKT-Phosphorylierungsstelle ^[75] am β-Catenin-Protein

einzuführen wurde das Plasmid *pcl-neo-Δ45-β-Catenin* als Ausgangsplasmid benutzt und das für Aspartat kodierende Codon mit Hilfe des *QuikChange site directed mutagenesis Kit* (Stratagene) und folgender Oligonukleotid-Primer eingeführt:

S552D-forward 5' CAGCGCCGTACGGATATGGGTGGGACA3'

S552D-reverse 5' TGTCCCACCCATATCCGTACGGCGCTG 3'

Der gesamte Vektor wurde mittels der *Pfu-Turbo* DNA-Polymerase, die Korrekturlese-kompetent ist (*proofreading*) amplifiziert, wobei die beiden Oligonukleotid-Primer die gewünschte Mutation (Ser→ Asp, **fett gedruckt**) in das PCR-Produkt einführen:

Reaktionsansatz (1 Reaktion à 50 µl):

10x Reaktionspuffer	5	µl
Primer S552D-forward	125	ng
Primer S552D-reverse	125	ng
<i>pcl-neo-Δ45-β-Catenin</i> (Matrize)	30	ng
dNTP-Mix	1	µl
<i>Pfu-Turbo</i> -Polymerase	1	µl
H ₂ O	ad 50	µl

Reaktionsbedingungen:

30 s	95° C	} 16 Wiederholungen
30 s	95° C	
60 s	55° C	
16 min	68° C	

Anschließend wurde der ursprünglich als Matrize verwendete Vektor mittels des Restriktionsenzym *DpnI* hydrolysiert (siehe 2.3.7.1.1). Nach Transformation in *E.coli* wurden die resultierenden korrekten Klone durch direkte Sanger-Sequenzierung identifiziert und bioinformatisch per Needle-Algorithmus mit der Matrize verglichen (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html, Abb. 10 A).

2.3.7.4 *pcl-neo-S552D-Δ45-β-CateninER-myc*

Die Einführung eines phosphomimetischen Aspartatrests am Aminosäurerest 552 wurde hier analog zur Klonierung von *pcl-neo-S552D-Δ45-β-Catenin* durchgeführt. Als Matrize wurde hier *pcl-neo-Δ45-β-CateninER-myc* verwendet. Die korrekte Insertion des mutierten Basentriplets wurde durch direkte Sanger-Sequenzierung identifiziert und bioinformatisch per Needle Algorithmus mit der Matrize verglichen (Abb. 10 B).

```

A   92 TTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGTACGGATATGGGTGGGAC/
    |||...|||
   98 TTCGTGCACATCAGGATACCCAGCGCCGTACGTCCATGGGTGGGAC/

B   97 CGTACGTCCATGGGTGGGACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCC
    |||...|||
  101 CgtACGGATATGGGTGGGACACAGCAGCAATTTGTGGAGGGGGTCC
  
```

Abb. 10 Vergleich der Sequenzierungsergebnisse von (A) *pcl-neo-Δ45-β-Catenin* und *pcl-neo-S552D-Δ45-β-Catenin* bzw. (B) *pcl-neo-Δ45-β-CateninER-myc* und *pcl-neo-S552D-Δ45-β-CateninER-myc* mittels des Needle Algorithmus. In beiden Plasmiden wurde das für Serin kodierende Basentriplett TCC gegen das für Aspartat kodierende Basentriplett GAT ausgetauscht.

2.3.8 Sanger-Sequenzierung

Zum Nachweis der korrekten Insertion von klonierten Genen und zum Ausschluss eventueller Mutationen wurden die klonierten Plasmide direkt nach der Sanger-Methode sequenziert. Verwendet wurde ein Kapillarsequenzier (ABI-Prism 3130 Genetic Analyzer) und das zugehörige BigDye 3.1 Sequencing Kit (ABI).

Reaktionsansatz:

BigDye Terminator 3.1	1	µl
5 x Sequencing Buffer	2	µl
Primer 10 µM	0,5	µl
Plasmid DNA	300	ng
H ₂ O	ad 10	µl

Reaktionsbedingungen:

96°C	10 s	} 15 Wiederholungen
60°C	90 s	

Danach wurde die PCR-Mischung mit Hilfe des *DyeEx Spin Kits* (Qiagen) aufgereinigt, 4 µl des gereinigten PCR-Produktes mit 16 µl HiDi-Formamid versetzt, 3 min bei 90°C denaturiert und danach im Kapillarsequenzier analysiert. Die resultierenden Sequenzen wurden bioinformatisch mit den erwarteten Mustersequenzen per Needle-Algorithmus verglichen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer befinden sich im Anhang.

2.3.9 Quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung der Expressionsniveaus verschiedener mRNA's wurde die gewonnene gesamt RNA zuerst mit dem *Quantitect-RT-Kit* (Qiagen), entsprechend den Herstellerangaben zu cDNA umgeschrieben. Eingesetzt wurde 1 µg RNA und Oligo-dT-Primer entsprechend der Empfehlungen des Herstellers. Die Kontamination der RNA durch genomische DNA wurde durch eine vorher durchgeführte DNase-Hydrolyse ausgeschlossen. 12,5 ng cDNA wurden in einem 20 µl-Ansatz in einem *LightCycler LC480* - Gerät (Roche) untersucht.

qRT-PCR Reaktionsansatz:

cDNA (50ng/µl)	0,25 µl
SYBR-green Mastermix	10,00 µl
Primermix (jeweils 2,5 µM)	4,00 µl
H ₂ O	5,75 µl

Reaktionsbedingungen:

Amplifikation:	
20 s	95°C
1 s	95°C
20 s	60°C
1 s	72°C
} 40 Wiederholungen	

Schmelzkurve:

10 s	98°C
60 s	60°C
5 min	98°C

Abkühlen:

30 s	40°C
	28

Die arithmetisch aus den Messkurven bestimmten Schwellenwert-Zyklen (engl. *crossing point*, CP) der einzelnen Proben wurden mit der $\Delta\Delta$ -CP-Methode^[81] auf die CP-Werte des Referenz-Gens (*GAPDH*) normalisiert und mit den Ergebnissen der Kontroll-Experimente verglichen. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer der untersuchten Gene befinden sich im Anhang.

2.3.10 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Im **Allgemeinen** ist die Chromatinimmunopräzipitation ein Verfahren, um die Bindung von Proteinen an DNA, bspw. von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen bestimmter Gene nachzuweisen. Dazu werden die an das Chromatin gebundenen Transkriptionsfaktoren durch Fixierung in 1% Formaldehyd reversibel mit der DNA vernetzt (sog. „*crosslinking*“). Anschließend wird das Chromatin durch Ultraschall in ca. 500 bp lange Stücke geschert. Nach Inkubation mit einem gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor gerichteten Antikörper wird dieser an Protein-A oder Protein-G gekoppelte Sepharoseperlen gebunden und somit die Chromatin-Transkriptionsfaktor-Antikörper-Komplexe präzipitiert. Nach mehreren Waschschritten wird die Bindung des Antikörpers an die Chromatin-Antikörperkomplexe wieder gelöst und letztlich die Vernetzung aufgehoben. Nach Aufreinigung der DNA kann, mit für bekannte Promotorsequenzen spezifischen Oligonukleotidprimern, in einer quantitativen PCR untersucht werden, wieviel Zielgenpromotor-DNA in einer Probe enthalten ist, ob also der Antikörper bestimmte Promotorregionen anreicht^[82].

Im **Speziellen** wurden SW480 Zellen in Duplikaten in 15 cm Schalen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Abkühlen auf RT, wurde das Medium abgesaugt und mit 37% Formaldehyd (Merck) versetzt, so dass eine 1% Formaldehydlösung entstand. Diese wurde 10 min auf die Zellen gegeben und danach das Formaldehyd durch Zugabe von 10 x Glycin (1.25 M, Endkonzentration 125 mM) für 5 min inaktiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in Natriumdodecylsulfatpuffer (SDS-Puffer, 50 mM Tris pH 8,1, 0,5 % SDS, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 x *Complete* Protease Inhibitor) von den Zellkulturplatten gekratzt. Nach Sedimentierung (3 min, 20000 x g) bei 4°C wurden die Zellen in Immunopräzipitationspuffer (IP-Puffer), bestehend aus zwei Teilen SDS-Puffer und einem Teil Triton-Verdünnungspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,6, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0, 0,2 % NaN₃, 5,0 % Triton X-100) resuspendiert. Das in der Lösung befindliche Chromatin wurde auf Eis, durch Ultraschallbehandlung (10 Stöße à 20 s mit 50 s Pause bei 85% Amplitude, HTU *Soni 130* Sonifizierer; G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) zu Fragmenten mit ca. 500 bp Länge geschert. Die Effizienz der Scherung wurde durch Untersuchung eines Aliquots der Lysate mittels DNA- Agarosegelelektrophorese beurteilt (nicht abgebildet). Die Protein-G gekoppelten Sepharoseperlen wurden nach viermaligem Waschen in PBS mit BSA (Endkonzentration 0,1 µg/µl) und Heringssperma-DNA (Sigma, Endkonzentration 75 ng/µl) 1 h bei 4°C geblockt. Alle Inkubationen wurden unter kontinuierlicher Bewegung, mittels eines Rotationsrades bei 4°C durchgeführt. Nach dem Sonifizieren wurden die Lysate 1 h bei 4°C mit geblockten Protein-G-gekoppelten Sepharoseperlen inkubiert, um anschließend unspezifisch an Sepharose bindendes Material zu sedimentieren (1 min, 3000 g). Nach diesem Schritt, wurden 100 µl Lysat als sog. „*Input*“ bei 4°C aufbewahrt. Danach wurden die Lysate mit 5 µg anti-β-Catenin-Antikörper (BD) bzw. 5 µg Maus-IgG1 (SCBT) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden 60 µl geblockte Protein-G-gekoppelte Sepharoseperlen dazugegeben, 1 h bei 4°C inkubiert und

danach sedimentiert (1 min, 3000 g). Die Sedimente wurden viermal in je 1 mL Puffer gewaschen, jeweils mit nachfolgender Sedimentierung, in dieser Reihenfolge: 1. „Mixed Micelle“-Puffer (20 mM Tris pH 8,1, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5% w/v Sucrose, 1% Triton X-100, and 0,2% SDS), 2. Puffer 500 (50 mM HEPES pH 7,5, 0,1% w/v Desoxycholsäure, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl und 1 mM EDTA), 3. LiCl-Detergenz- Waschpuffer (10 mM Tris pH 8,0, 0,5% Desoxycholsäure, 0,5% NP-40, 250 mM LiCl und 1 mM EDTA), und zuletzt 4. Tris-EDTA (pH 7,5). Nach dem letzten Waschschrift wurde das gebundene Protein zweimal 10 min mit je 125 µl Elutionspuffer eluiert (1% SDS, 0,1M NaHCO₃). Die folgenden Schritte wurden ebenso für die „Inputs“ durchgeführt. Die Quervernetzung der Transkriptionsfaktoren wurde durch Zugabe von 5 M NaCl (Endkonzentration 200 mM) und Inkubation bei 65°C über Nacht aufgebrochen. Danach wurde die enthaltene RNA durch 30-minütige Hydrolyse mit RNase A bei 37°C degradiert und anschließend die Proteine durch Protease K – Proteolyse (1 h, 45°C) abgebaut. Die enthaltene DNA wurde schließlich mit Hilfe des *PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

1 µl jeder Probe wurde in eine quantitative PCR Analyse eingesetzt (siehe 2.3.9) und die WNT-responsiven Promotorregion (WRE) des *Axin2*-Gens sowie die Promotorregion des Acetylcholinrezeptorgens (*AchR*) amplifiziert.

Die Signalunterschiede wurden mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{2^{((CP \text{ input})-(CP \text{ IP}))_{\beta\text{-Catenin}}}}{2^{((CP \text{ input})-(CP \text{ IP}))_{\text{IgG}}}} = \text{Input / IgG [\%]}$$

wobei CP = crossing point; input = Input-DNA; IP= präzipitierte DNA; β-Catenin = Werte der mit dem anti-β-Catenin-Antikörper präzipitierten Proben; IgG = Werte der mit dem Maus-IgG präzipitierten Proben.

Die Unterschiede in der Anreicherung einer Promotorregion wurden somit als relatives Vielfaches einer Veränderung („*fold enrichment*“), im relativen Vergleich zur IgG-präzipitierten Probe dargestellt ^[83]. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer befinden sich im Anhang.

2.4 Protein-basierte Methoden

2.4.1 Proteinextraktion und subzelluläre Fraktionierung

Zur Extraktion der gesamten Proteine aus Zellkulturen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen, das PBS gründlich abgesaugt und Protein-Lysepuffer in die Zellkulturplatte gegeben („*triple detergent lysis buffer*“ nach Maniatis et al., 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0.02 % NaN₃, 0.5 % Na-Desoxycholat, 0.1 % SDS, 1 % Nonidet P-40, 1x *Phosstop* Phosphataseinhibitoren-Cocktail, 1x *Complete* Proteaseinhibitorencocktail). Danach wurde die gesamte Flüssigkeit mit einem Zellschaber auf der geeigneten Zellkulturoberfläche zusammengeschaubt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß pipettiert und 10 min eisgekühlt auf einem Orbitalschüttler (300 UpM) inkubiert. Nach Sonifizierung der Proben (3 s, 75% Amplitude, HTU Soni 130 Sonifizierer; G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) wurde der nicht gelöste Zelldebris sedimentiert (10 min, 4°C, 20000 x g). Der Überstand wurde in frische Mikroreaktionsgefäße transferiert, für die weiteren Experimente verwendet oder zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

In zytoplasmatische und nukleäre Anteile **fraktionierte Lysate** wurden mittels hypotoner Lyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellen aus 10 cm Zellkulturplatten nach Waschen mit eiskaltem PBS in 500 µl eiskaltem hypotonem Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 0.1% NP-40, 1x *Complete*, 1x *Phosstop*) per Zellschaber gelöst, 10 min auf Eis inkubiert und danach durch dreimaliges Passieren durch eine 26 G – Nadel homogenisiert. Nach Zentrifugation (10 min, 800 x g, 4°C), wurde der Überstand in frische Mikroreaktionsgefäße überführt und als zytoplasmatisches Lysat aufbewahrt. Das Sediment wurde einmal mit PBS gewaschen, erneut wie zuvor zentrifugiert und danach in 50 µl TKM-Puffer (20 mM Tris-Azetat, pH 7.4, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1x *Complete*, 1x *Phosstop*) resuspendiert. Beide Fraktionen wurden wie oben beschrieben sonifiziert, erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 20.000 x g) und die Überstände nach Überführung in frische Mikroreaktionsgefäße als Lysate verwendet. Die Reinheit der subzellulären Fraktionen wurde durch Nachweis des ausschließlich zytoplasmatisch exprimierten Proteins α-Tubulin und des rein nukleär exprimierten Proteins Lamin B nachgewiesen. Der Nachweis dieser Proteine diente gleichzeitig der Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *DC Protein Assay System* (Biorad), streng den Herstellerangaben folgend, verwendet. Der Assay beruht prinzipiell auf dem Verfahren nach Lowry bei dem in alkalischem Milieu Proteine mit Kupfer-Tartrat komplexieren und in einem zweiten Schritt das sog. Folin-Ciocalteu-Reagenz vom proteingebundenen Kupfer reduziert wird, wobei proportional der enthaltenen Proteinkonzentration eine intensive Blaufärbung entsteht, deren Absorption bei 750 nm Wellenlänge quantifiziert werden kann.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde mittels einer Standardreihe aus in Wasser gelöstem bovinem Serumalbumin mit sieben verschiedenen Konzentrationen (2,0, 1,5, 1,0, 0,75, 0,5, 0,25, und 0,125 mg/ml; BioRad, München) eine Eichkurve erstellt und als Leerwert eine Probe des verwendeten Lysepuffers vermessen. Nach der Inkubation wurde die Absorption der Proben bei 750 nm Wellenlänge in einem Mikroplatten-Photometer (*Varioscan Flash Microplate reader*, Thermo) gemessen und die Absorption des Leerwerts abgezogen. Mit Hilfe der Absorptionen der Standards wurde eine Eichkurve generiert und die Proteinkonzentration der Proben folgendermaßen berechnet:

$$x = (f(x) - b) / m$$

Dabei bedeuteten: x = Proteinkonzentration in µg/ml, m = Steigung der Geraden, b = Achsenabschnitt f(x), f(x) = Absorption der gemessenen Probe.

2.4.3 Western-Blot Analyse

Puffer und Lösungen

4 x Tris-HCl-pH 6,8

6,05 g	Tris-Base in 40 ml H ₂ O
0,4 g	SDS
ad 100ml	H ₂ O
pH6,8 mit	1N-HCl

4 x Tris-HCl-pH 8,8
 91,0 g Tris-Base in 300 ml H₂O
 2,0 g SDS
 ad 500 ml H₂O
 pH8,8 mit 1N-HCl

5 x Running buffer (Laemmli = TGS)
 15,1 g Tris Base
 72,0 g Glycin
 5,0 g SDS
 ad 1000ml H₂O

10 x Transferpuffer (= TG)
 30,2 g Tris-Base
 144,2 g Glycin
 Ad 500 ml H₂O

10 x TBS
 15,76g Tris/HCl
 7,57g NaCl
 ad 1000 ml H₂O
 pH7,5 mit NaOH

10 x TBS/T
 1000 ml 10 x TBS
 10 ml Tween-20

Blotto
 100 ml TBS/T
 5 g fettfreies Trockenmilchpulver

Western-Blot

Zur nicht-denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde ein zehnpromtentes Trenngel, nach folgender Zusammensetzung, gegossen:

Acrylamid 30%	5 ml
4xTris-HCl, pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O	6,25 ml
APS	200 µl
TEMED	40 µl
	= 15 ml

Die Reagenzien wurden vermischt, vorsichtig zwischen zwei Glasplatten einer PAGE-Vorrichtung gegossen und mit 100% Ethanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde der Ethanol vollständig abgegossen. Ein Sammelgel, das anschließend auf das Trenngel gegossen wurde, setzte sich folgendermaßen zusammen:

Acrylamid 30%	650 µl
4xTris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	20 µl
	= 5 ml

Durch Einsetzen eines Kammes nach dem Gießen wurden Probestaschen geformt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Probestaschen gespült und die Gele in die mit Laemmli-Puffer gefüllte Gellaufkammer eingespannt. Es wurden jeweils 25 µg Gesamtprotein

(falls nicht anders angegeben), versetzt mit *Rotiload*-Ladepuffer (SDS 8 % w/v, β -Mercaptoethanol 20% v/v, Glycerin 40% v/v, Bromphenolblau 0,015% w/v, phosphatgepuffert), 5 min bei 95°C erhitzt, danach sofort auf Eis gelagert und in die Proben tasche geladen. In die erste Tasche wurden 10 μ l Proteingrößenmarker (*Precision Plus*, Fermentas) geladen. Die Gele wurden ca. 15 min bei 80 V laufen gelassen, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten und dann noch einmal ca. 1- 1,5 h bei 150 V bis das Bromphenolblau des Ladepuffers aus dem Gel in den Laemmli puffer übertrat.

Eine PVDF-Membran (Porengröße 0,45 μ m) wurde 15 s in Methanol eingeweicht, in Wasser gespült und danach in gebrauchsfertigem Transferpuffer (1x Transferpuffer mit 10% Methanol) einige Minuten äquilibriert. Auch Blotting-Schwämme und Whatman-Papiere wurden vorher in gebrauchsfertigem Transferpuffer eingeweicht. Die Gele wurden kurz in Wasser gewaschen, in der Blotting-Kassette auf eine PVDF-Membran gelegt, das Ganze zwischen zwei Whatman-Papiere und ganz außen zwei Blotting-Schwämme geklemmt. Die fertigen, verschlossenen Blotting-Kassetten wurden zusammen mit einem Kühlelement in die Blotting-Kammer gegeben, diese bis zum Rand mit Transferpuffer gefüllt und 1h bis 1,5 h bei 400 mA und 4°-10°C geblotet.

Nach dem Blotten wurden die Membranen aus der Blotting-Kassette entnommen und die korrekte Übertragung des Proteingrößenmarkers überprüft. Zur Qualitätskontrolle des Proteintransfers, wurden die Membranen kurz in Wasser geschwenkt und 5 min in Ponceau-S Lösung unter Agitation auf dem Orbitalschüttler (30 UpM) inkubiert. Das überschüssige Ponceau-S wurde abgegossen und die Membranen mit Wasser so lange gewaschen, bis sich rote bis rosa Proteinbanden klar darstellten. Die Membran wurde dann 30 min in Blotto geblockt, kurz in TBS/T gewaschen und mit dem in Blotto verdünnten Primärantikörper inkubiert (siehe Tabelle 1). Die Primärantikörper verdünnung wurde zur Konservierung mit Natrium-Azid versetzt (Endkonzentration 200 μ g/ml), bei 4°C aufbewahrt und mehrfach verwendet.

Primärantikörper und Verdünnungen

Tabelle 1

Antigen	Klon	Verdünnung	Hersteller
β -Catenin	14	1 :10.000	BD
β -Actin	AC-74	1 :30.000	Sigma Aldrich
GFP	D5.1	1 :2000	CellSignaling
phosphoAKT (Ser 473)	D9E	1 :2000	CellSignaling
AKT	11E7	1 :2000	CellSignaling
myc-tag	9E10	1 :2000	Millipore
CdC37	D11A3	1 :2000	CellSignaling
phosphoCdC37 (Ser 13)	polyklonal	1 :2000	CellSignaling
LEF-1	C12A5	1 :250	CellSignaling
Cyclin-D1	Y69	1 :500	Neomarkers
c-MYC	DCS-6	1 :5000	Epitomics
α -Tubulin	TUB 2.1	1 :10.000	Sigma Aldrich
Lamin B	M-20	1 :500	Santa Cruz Biotechnology
phospho- β -Catenin (Ser 552)	polyklonal	1 :1000	CellSignaling

Die Membranen wurden mit den Primärantikörpern über Nacht, bei 4°C inkubiert, unter kontinuierlicher Agitation mit Hilfe eines Rollenschüttlers. Am Folgetag wurden die Membranen dreimal 5 min in TBS/T gewaschen und 1 h mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Thermo Scientific; Verdünnung 1:10.000 in Blotto) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, erneut dreimal in TBS/T und zuletzt einmal in

TBS gewaschen, immer unter kontinuierlicher Agitation. Die Membranen wurden mit je 1 ml gebrauchsfertiger ECL-Lösung überschichtet, 5 min inkubiert, überschüssiges ECL-Substrat abgegossen und die Membran zwischen zwei transparente Folien gelegt. In der Dunkelkammer wurden die Röntgenfilme, je nach Signalstärke, zwischen 1 s und 10 min auf die abgedeckte Membran gelegt und somit belichtet. Die Filme wurden so lange im Entwicklerbad (Agfa, München) geschwenkt bis eine gewünschte Signalstärke erreicht war. Danach verblieben die Filme ca. 5 bis 10 min im Fixierbad (Agfa) und wurden zuletzt mit Wasser gespült und getrocknet. Auf die trockenen Filme wurden die Positionen der Markerbanden von den Membranen übertragen.

Um eine erneute Antikörper-Färbung durchzuführen, wurden die Membranen teils mehrfach wieder vom Primärantikörper befreit (sog. „*stripping*“). Hierzu wurden die Membranen 20 min bei RT mit *Restore Stripping Buffer* (Pierce) auf einem Orbitalschüttler (30 UpM) inkubiert, kurz in Wasser gewaschen, erneut 30 min in Blotto geblockt und erneut mit Primärantikörper inkubiert. Zur mittelfristigen Lagerung wurden die Membranen in TBS bei 4°C aufbewahrt oder zur längerfristigen Lagerung, nach dem *stripping*, in Wasser gewaschen, kurz in Methanol eingeweicht und luftgetrocknet.

2.4.3.1 Densitometrische Vermessung der Western Blot-Signalintensität

Zur besseren Vergleichbarkeit und zur Darstellung geringer Expressionsunterschiede wurde die Signalintensität im Western Blot densitometrisch bestimmt. Dazu wurden die Western Blot-Filme unter gleichen Bedingungen digitalisiert (gescannt) und die Banden in einem Graustufenbild von mind. 600 dpi Auflösung arrangiert. Anschließend wurden die Banden mit Hilfe der *ImageJ*-Bildverarbeitungssoftware (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) densitometrisch verglichen, indem die Signalintensitäten zweidimensional dargestellt und die Flächen der resultierenden Plotkurven miteinander verglichen wurden (Abb. 11). Berechnet wurde der Quotient aus der Signalstärke des untersuchten Proteins und der Signalstärke der zugehörigen Reinheits- bzw. Ladekontrolle Lamin B für nukleäre Extrakte (Tabelle 2).

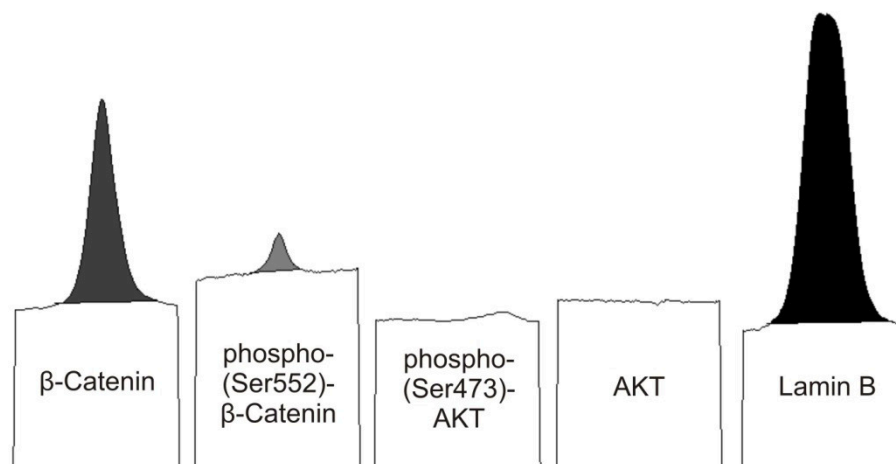


Abb. 11 Exemplarische Plotkurve der densitometrischen Vermessung der Western Blot Signalintensitäten für die LY-behandelten SW480 Zellen aus der Abbildung 19 C (siehe Tabelle 2, letzte Spalte) für β-Catenin, phospho-(Ser552)-β-Catenin und die Ladekontrolle Lamin B. Die eingefärbten Flächen entsprechen den gemessenen, auf die Fläche geplotteten Signalstärken. Der basale Hintergrund der unterschiedlichen WB-Filme stellt sich als Kasten unterschiedlicher Höhe dar.

SW480				
DMSO		LY		
Fläche	Quotient	Fläche	Quotient	
Lamin-B	15.243.782	1	12.744.368	1
p-β-Catenin	5.115.276	0,34	501.749	0,04
β-Catenin	4.653.326	0,31	4.899.033	0,38

Tabelle 2 Beispiel einer Berechnung der relativen densitometrisch bestimmten Signalstärken der nukleären Extrakte aus Abb. 18 C, durch Bestimmung der Fläche der Plotkurven, mit Hilfe der ImageJ Software. Die Signalintensitäten wurden jeweils für β-Catenin, phospho-(Ser552)-β-Catenin relativ zur Signalintensität der zugehörigen Ladekontrolle Lamin B angegeben.

2.4.4 Proteinimmunopräzipitation

In dieser Arbeit wurde die Proteinimmunopräzipitation lediglich eingesetzt, um die in der Chromatinimmunopräzipitation verwendeten Materialien (anti-β-Catenin-Antikörper (BD), murines Immunglobulin G1 (IgG1, SCBT), Protein-G-gekoppelten Sepharoseperlen (Sigma)) auf ihre Eignung für dieses Verfahren zu testen. Das ursprünglich aus G-Streptokokken isolierte Zellwandprotein G bindet den Fc-Teil von Immunglobulinen. Da es sich beim verwendeten anti-β-Catenin-Antikörper um einen murinen IgG1-Antikörper handelt, wurde wegen der hohen Bindungsaffinität des Protein-G für Immunglobuline vom Maus IgG1-Typ, Protein-G-gekoppelte Sepharose verwendet.

Dazu wurden SW480 Zellen in zwei 15 cm Zellkulturschalen bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in insgesamt 500 µl RIPA-Puffer (1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% Natriumdesoxycholate, 1 mM EDTA) von der Kulturplatte gelöst und 10 min bei kontinuierlicher Agitation mittels eines Rotationsrades bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurden die Protein-G gekoppelten Sepharoseperlen dreimalig in kaltem PBS gewaschen (jeweils 1 min Sedimentierung bei 2000 x g und folgende Resuspension in 1 ml PBS). Anschließend wurden die Zellen durch Sonifizieren aufgebrochen (5 Stöße à 10 S bei 75% Amplitude auf Eis) und der Detritus durch 10 min Zentrifugation (20000 x g, 4°C) sedimentiert. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (siehe oben) und gleiche Mengen Lysat auf zwei 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt. Das Volumen wurde mit RIPA-Puffer auf einen Milliliter aufgefüllt und 50 µl Protein-G gekoppelte Sepharoseperlen dazugegeben. Zum Entfernen unspezifisch an die Perlen bindenden Materialies („pre-clearing“) wurden die Mikroreaktionsgefäße dann 30 min bei 4° C sanft geschüttelt, anschließend die Perlen sedimentiert (1 min, 2000 x g) und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Vom Überstand wurden jeweils 5 µl abgenommen und auf Eis aufbewahrt (als sog. „Input“). Anschließend wurden 5 µg anti-β-Catenin-Antikörper bzw. 15 µg murines Immunglobulin G1 als Kontrolle dazugegeben und 2 h bei 4° C sanft geschüttelt. Letztlich wurden 50 µl gewaschener, Protein-G gekoppelter Sepharoseperlen dazugegeben und nach erneuter sanfter Hin- und Herbewegung (1h, 4°C), die Perlen sedimentiert (1 min, 2000 x g). Das Sediment wurde 5 mal 5 min bei RT unter Bewegung mit jeweils 1 ml RIPA-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Sediment mit 40 µl 2-fach Ladepuffer 5 min bei 95° C aufgekocht, kurz bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand in eine Western Blot Analyse eingesetzt. Als Vergleichskontrolle wurden die „Inputs“ ebenfalls 1:1 mit 2 x Ladepuffer aufgekocht und in die Western Blot Analyse eingesetzt. Die Membran wurde mit dem anti-β-Catenin-Antikörper und dem anti-β-Actin-Antikörper gefärbt. Es zeigte sich dass der anti-β-Catenin-Antikörper zusammen mit den Protein-G gekoppelten Sepharoseperlen in der Lage ist β-Catenin zu präzipitieren, während durch das weit im Überschuss zugegebene Kontroll-IgG1 kein im Western Blot nachweisbares β-Catenin präzipitiert wird (Abb. 12).

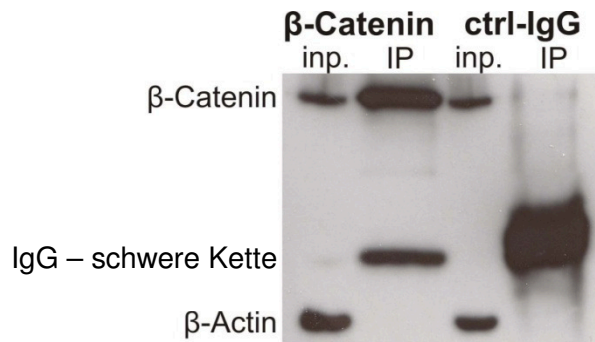


Abb. 12 Proteinimmunopräzipitation eines Proteinlysates von SW480 Zellen mit anti- β -Catenin-Antikörper oder Kontroll-IgG1 (ctrl-IgG) gefärbt für β -Catenin (92 kD) und β -Actin (42 kD). Der HRP-gekoppelte Anti-Maus-Sekundärantikörper bindet auch an das im Überschuss vorhandene Maus-IgG des anti- β -Catenin-Antikörpers und des murinen Kontroll-IgG1. Daher findet sich eine Bande auf Höhe der schweren Kette des IgG (ca. 55 kD), die aufgrund des Überschusses in der Kontrollreaktion entsprechend stärker ausfällt.

2.4.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis bestimmter Proteine wurden die Zellen in Suspension in 6-Napf-Zellkulturplatten ausgesät, in denen mehrere runde sterilisierte Deckgläser (8 mm Durchmesser) ausgelegt waren. Bei Erreichen der gewünschten Wachstumsdichte (i.d.R. 70 – 80% Konfluenz) wurden die entsprechenden Experimente durchgeführt (Einzelheiten siehe dort). Nach Beendigung des Experiments wurden die Deckgläser aus der 6-Napf-Platte in eine 12-Napf-Platte überführt, kurz in kaltem PBS gewaschen und 10 min in 4% PFA fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen 15 min mittels 0,1% Triton-X100 (Sigma) in PBS permeabilisiert und danach 30 min in FBS geblockt. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Deckgläser mit den entsprechenden Primärantikörperverdünnungen (alle 1:100 in PBS / FBS 50% / 0,05% Tween-20) 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Deckgläser mit den Sekundärantikörpern (AF546- oder AF488-gekoppelte Ziege-anti-Hase- bzw. Ziege-anti-Maus-Antikörper (Invitrogen) 1:500 in PBS / FBS 50% / 0,05% Tween-20) 1 h unter Lichtabschluss inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt, die Deckgläser mit Hilfe des Eindeckmediums *Prolong Gold* (mit DAPI, Invitrogen) mit der Zell-abgewandten Seite auf einen Objektträger geklebt, mit Eindeckmedium überschichtet und einem vollständig alle runden Deckgläsern bedeckendem großen Deckglas belegt. Die Bilder der Experimente wurden an einem Leica *SP5* konfokalen Laserscanning-Mikroskop durch ein Ölimmersionsobjektiv mit 620-facher Vergrößerung erzeugt. Überlagerung und Bearbeitung der einzelnen Kanäle erfolgte mit der proprietären Leica Imaging-Software des *SP5* Mikroskopes. Konventionell erzeugte Immunfluoreszenzbilder wurden an einem Zeiss *Axioskop* Fluoreszenzmikroskop mit der Zeiss *Axiovision* Software aufgenommen.

2.4.6 Immunhistochemische Färbung

Zum immunhistochemischen Nachweis der β -Catenin-Expression in formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Tumormaterial wurden 4 μ m dicke Gewebeschnitte angefertigt und mit einem vorverdünnten Maus-anti- β -Catenin-Antikörper (Klon 14; Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA) auf einem Ventana *Benchmark XT* Färbeautomaten gefärbt. Die Detektion und Farbreaktion erfolgte mit dem *XT Ultra View* Diaminobenzidin-Kit (Ventana Medical Systems).

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Luciferase-Reportergen-Assay

Im **Allgemeinen** kann in Luciferase-Reportergen-Assays die Auswirkung eines Signaltransduktionsweges auf die transkriptionelle Aktivität eines Transkriptionsfaktors über den Nachweis der emittierten Lumineszenz einer Luciferase nachgewiesen werden, welche direkt proportional zu ihrer Expressionsstärke ist. Die Expression der Luciferase geschieht in Abhängigkeit von möglichst spezifischen Promotorsequenzen für den untersuchten Signaltransduktionsweg. Hier wurde der Reportergenvektor p7xTOP-Flash verwendet, der 7 optimierte β -Catenin-Bindesequenzen (sog. TBE's) enthält. Als Kontrolle wurde der gleiche Vektor mit 7 mutierten TBE's, an die β -Catenin nicht mehr binden kann, eingesetzt (siehe 2.3.5). Die Plasmide wurden zusammen mit dem Kontrollplasmid pRL-TK, das zum Normalisieren der Transfektionseffizienz diente und den entsprechenden, je nach Experiment verwendeten Plasmiden, transfiziert. Nach Beendigung des Experiments wurden Lysate mit Hilfe eines speziellen Lysepuffers (*Passive Lysis Buffer*, Promega) hergestellt, die Zellen durch Schockfrost bei -80°C aufgebrochen, eine Probe der Lysate in 96-Napf-Platten gegeben und im Luminometer (Orion II, Berthold Technologies, Bad Wildbad) untersucht. Das Luminometer verfügte über zwei automatische Injektoren, einen für das Firefly-Luciferase-Substrat und einen für das Renilla-Luciferase-Substrat. Im ersten Schritt wurde eine definierte Menge des Firefly-Luciferase-Substrates zur Probe gegeben und die emittierte Lumineszenz gemessen. Im zweiten Schritt wurde das Renilla-Luciferase-Substrat zugegeben, das durch seinen niedrigen pH-Wert die Firefly-Luciferase-Aktivität beendet (sog. „*quenching*“) und es wurde die Lumineszenz der Renilla-Luciferase gemessen. Letztlich wurde ein Quotient aus den Emissionswerten der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase gebildet, was einen normalisierten Vergleich unterschiedlicher Proben erlaubte. Im **Speziellen** wurden hier 1×10^4 Zellen in 24-Napf-Platten ausgesät und am Folgetag das Medium gewechselt. Dann wurden die Zellen mit pTOP-Flash oder pFOP-Flash zusammen mit pRL-TK im Verhältnis 1:10 transfiziert. Co-transfiziert wurde je nach Experiment, entweder ein den WNT-Signalweg aktivierendes Plasmid oder, als Kontroll-Plasmid, pcDNA3-CAT nach folgender Zusammensetzung:

pTOP-Flash oder pFOP-Flash	100 ng
pRL-TK	10 ng
WNT-Aktivator-Plasmid oder pcDNA3-CAT	140 ng
Fugene 6	0,75 μl
OptiMEM	ad 20 μl

Das serumfreie Medium OptiMEM (Invitrogen) wurde in sterilen Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt, Fugene 6 direkt in das Medium pipettiert, mittels eines Verwirblers (Vortexer) gemischt und abzentrifugiert. Nach 5 min Inkubationszeit wurden die jeweiligen Plasmid-DNA's hinzugegeben, erneut gemischt und abzentrifugiert und nach 15 min Inkubation tropfenweise in das Zellkulturmedium pipettiert. Nach 4 h wurden die Zellen, wie in den einzelnen Experimenten angegeben, behandelt. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen, alle Flüssigkeit abgesaugt, 100 μl *Passive Lysis Buffer* (PLB, Promega) dazugegeben und die Zellkulturplatte 15 min bei RT und 100 UpM auf dem

Orbitalschüttler geschüttelt. Danach wurde die Platte im -80°C Kühlschrank gefroren, erneut 15 min bei RT und 100 UpM auf dem Orbitalschüttler wieder aufgetaut und 25 bis 50 µl des Lysates in eine 96-Napf-Platte übertragen. Die Lumineszenzen der Proben wurden dann im Luminometer Orion II durch automatische Zugabe des Firefly- bzw. Renilla-Substrates (Promega DLR-Kit) gemessen. Die gemessenen Firefly-Lumineszenz-Werte wurden auf die zugehörigen Renilla-Lumineszenz-Werte normalisiert und schließlich ein Quotient aus den normalisierten Werten der mit pTOP-Flash oder pFOP-Flash durchgeführten Experimente gebildet (sog. TOP/FOP-Quotient).

Alle Experimente wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt und mehrfach wiederholt.

2.5.2 Fluoreszenz-Reporter-Gen-Assay

Analog zum Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde im Fluoreszenz-Reporter-Gen-Assay das Reporter-Gen EGFP (enhanced green fluorescent protein, verbessertes grün fluoreszierendes Protein) in Abhängigkeit von 7 TBE's exprimiert. Es ermöglichte so die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von transkriptioneller WNT-Signalwegaktivität anhand des Nachweises der EGFP-Expression. Außerdem ließ sich das entstandene EGFP auf Proteinebene im Western Blot oder mittels FACS-Analyse („fluorescence activated cell sorting“) nachweisen und somit transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität semi-quantitativ messen.

Die Zellen wurden hierzu, wie unter 2.4.5 beschrieben, ausgesät und am Folgetag das Medium gewechselt. Dann wurden die Zellen mit pTOP-GFP und pcl-neo-Δ45-β-CateninER-myc oder pcDNA3-CAT wie unter 2.5.1 beschrieben, nach folgendem Protokoll transfiziert:

pTOP-GFP	1 µg
pcl-neo-Δ45-β-CateninER-myc oder pcDNA3-CAT	1 µg
Fugene 6	6 µl
OptiMEM	ad 100 µl

Nach 4 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und die entsprechenden im Experiment verwendeten Substanzen zugegeben. Nach weiteren 12 bis 24 h wurden die Glasplättchen aus den Zellkulturschalen entfernt und für die Immunfluoreszenz aufgearbeitet (siehe 2.4.5). Die verbliebenen adhärennten Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen und zu Proteinlysaten verarbeitet (siehe 2.4.1).

2.5.3 Induktion mittels 4-Hydroxy-Tamoxifen

Das transgene Protein Δ45-β-CateninER-myc besteht aus einem degradationsresistenten, mutierten β-Catenin das an einen mutierten, Tamoxifen-sensitiven Östrogenrezeptor (ERTM) fusioniert wurde. In Zellen, die das Transgen exprimieren, kann die nukleäre Akkumulation des Transgens durch Behandlung mit Tamoxifen induziert werden. Als Steroid-Verbindung unterliegt Tamoxifen einem ausgeprägten first-pass Effekt in der Leber, wo der deutlich aktivere Metabolit 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) entsteht. Daher wurde in den Experimenten 4-OHT verwendet, in Ethanol verdünnt (10 mM) und aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. In den Experimenten wurde 4-OHT in einer maximalen Konzentration von 500 nM, verdünnt in frischem DMEM/FBS eingesetzt. Die hohe Konzentration der 4-OHT-

Stammlösung (10 mM) ermöglichte eine niedrige Ethanol-Endkonzentration von nur 0,05 ‰, was potentielle ethanoltoxische Effekte minimierte.

2.5.4 Inhibition des PI3K-Signalweges mit LY294.002

2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromon (LY294.002, LY, Sigma-Aldrich) ist ein spezifischer PI3K-Inhibitor mit einer IC_{50} von $1,4 \mu\text{M}$ ^[84]. LY wurde in DMSO gelöst und bei -20°C aufbewahrt. LY wurde in frischem Zellkulturmedium verdünnt und entsprechend des experimentellen Ansatzes zu den Zellen gegeben (siehe Ergebnisteil).

2.5.5 Aktivierung des WNT-Signalweges mit Lithium-Chlorid

Lithium-Chlorid (LiCl, Sigma) ist ein spezifischer Inhibitor der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) ^[85]. Durch Inhibition dieses essentiellen Bestandteiles des β -Catenin-Degradationskomplexes kommt es zu zytoplasmatischer Akkumulation von β -Catenin, letztlich gelangt β -Catenin vermehrt in den Zellkern und aktiviert die Transkription seiner Zielgene. LiCl wird weitverbreitet zur Simulation eines aktivierten WNT-Signalweges verwendet. In den Experimenten wurde LiCl 30 mM in frischem Zellkulturmedium verdünnt und dann zu den Zellen gegeben (siehe Ergebnisteil).

2.5.6 Aktivierung des WNT-Signalweges mit Wnt3a-konditioniertem Medium

Wnt3a-konditioniertes Medium und korrespondierendes Kontrollmedium wurde wie unter 2.2.3 beschrieben hergestellt und direkt unverdünnt nach Filtration zu den Zellen im TOP-Flash Reporter-Gen-Assay gegeben wie unter 2.5.1 beschrieben.

2.5.7 Inhibition der CK2 mit TBB

Da LY294.002 *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf das Enzym Caseinkinase 2 (CK2) ausüben kann ^[86], wurden Kontrollexperimente mit dem spezifischen CK2-Inhibitor 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB, Sigma) durchgeführt. TBB wurde sowohl unter normalen Zellkulturbedingungen, als auch unter Serumentzug in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (siehe Ergebnisteil). TBB wurde in DMSO gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Statistik

Die statistische Signifikanz des Unterschiedes zweier experimenteller Gruppen wurde mittels eines einseitigen Student-T-Tests in Microsoft *Excel* berechnet. Unterschiede mit einem p-Wert von über 0,05 wurden als nicht signifikant (n.s.), p-Werte unter 0,05 als signifikant (*) und unter 0,01 als hochsignifikant (**) eingestuft.

3. Ergebnisse

3.1 PI3K Inhibition supprimiert WNT-Signalwegaktivität

3.1.1 LY294.002 inhibiert PI3K

Aufgrund des Überschusses an Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium, ist davon auszugehen, dass PI3K unter Standardkulturbedingungen aktiv ist. Daher wurde für die Untersuchungen ein inhibitorischer Ansatz gewählt. Um zunächst eine optimale Konzentration von LY für die Experimente zu finden, wurde der inhibitorischen Effekt von LY294.002 (LY) auf die Aktivität der PI3K nachgewiesen. Hierzu wurden Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von LY behandelt und als Indikator die Auswirkungen auf den Phosphorylierungszustands der Kinase AKT untersucht, die ein bekannten Zielproteins der PI3K ist.

Dazu wurden 293T und CHO-1 Zellen mit vorab durch eine Testreihe (nicht abgebildet) eingegrenzten Konzentrationen von LY behandelt und die Effekte auf Proteinebene im Western Blot untersucht. Da bei aktiver PI3K AKT am Serinrest 473 phosphoryliert wird ^[87], diente hierbei die phospho-AKT (Ser473) Proteinmenge als Indikator der PI3K Aktivität. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 25 μ M LY zu einer deutlichen Abnahme der Proteinmenge von phospho-AKT (Ser473) führte, während die Behandlung mit 5 μ M LY keine wesentlichen Effekte aufwies. Die Proteinmengen von gesamt-AKT und außerdem von β -Catenin sowie des Referenz-Proteins β -Aktin blieben jedoch unter LY-Behandlung unverändert. Die Abnahme der phospho-AKT(Ser473)-Menge unter LY-Behandlung, deutete auf die Inhibition der PI3K durch LY, auch unter Standardkulturbedingungen mit Serumstimulation hin, ohne die Gesamtmenge exprimierten β -Catenins oder AKT's zu verändern (Abb.13).

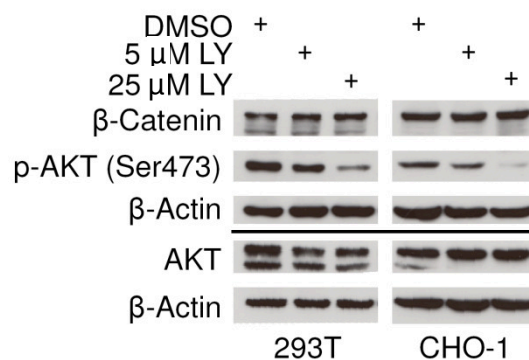


Abb. 13 LY inhibiert die PI3K-Aktivität ohne die AKT- oder β -Catenin-Expression zu beeinflussen

Western Blot Analyse von 25 μ g Gesamtproteinlysate aus 293T und CHO-1 Zellen, die in DMEM/FBS mit den angegebenen Konzentrationen LY bzw. mit DMSO für 12 h behandelt wurden.

3.1.2 PI3K Inhibition durch LY supprimiert konstitutive WNT-Signalwegaktivität in SW480 und RWP-1 Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob PI3K die WNT-Signalwegaktivität beeinflusst, wurden die RWP-1 und SW480 Zelllinien verwendet, in denen der WNT-Signalweg durch jeweils eine trunkierende Mutation im APC-Tumorsuppressorgen konstitutiv aktiviert ist ^[18, 88]. Der Einfluss der Inhibition der PI3K durch LY auf die transkriptionelle Aktivität des WNT-Signalweges wurde in beiden Zelllinien mit Hilfe eines Luciferase Reportergen-Assays untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der transkriptionellen WNT-Signalwegaktivität durch Inhibition der PI3K mittels LY (Abb. 14).

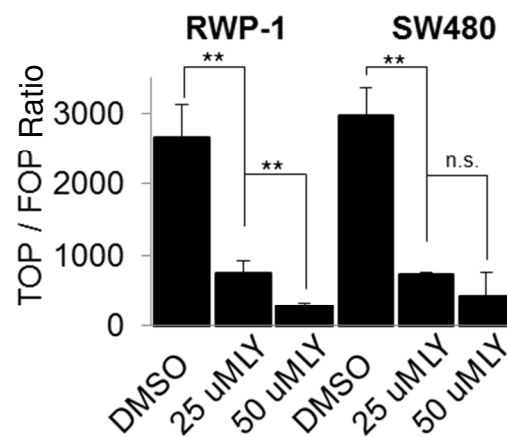


Abb. 14 PI3K-Inhibition supprimiert konstitutive WNT-Signalwegaktivität

Luciferase-Reportergen-Assay von RWP-1 und SW480 Zellen. Nach Transfektion mit pTOP-Flash bzw. pFOP-Flash und pRL-TK Plasmiden wurde nach 4 h das Medium gegen DMEM/FBS mit den angegebenen LY Konzentrationen ausgetauscht und nach weiteren 12 h der Luciferase-Reportergen-Assay mit Hilfe eines Luminometers vermessen. Abgebildet sind die Verhältnisse (Ratio) der TOP zu FOP Signalstärken.

3.1.3 PI3K Inhibition durch LY supprimiert exogen induzierte WNT-Signalwegaktivität in 293T, CHO-1 und HeLa Zellen

Um die Auswirkungen der Inhibition der PI3K in Zelllinien ohne genetische Alteration des WNT-Signalwegs zu untersuchen, wurde WNT-Signalwegaktivität in 293T, CHO-1 und HeLa-Zellen durch Stimulation mit Lithiumchlorid (LiCl) oder Wnt3a induziert. LiCl ist ein spezifischer Inhibitor der GSK3 β , einem essentiellen Bestandteil des β -Catenin-Degradationskomplexes und führt zu vermindertem Abbau und damit zu vermehrter zytoplasmatischer sowie letztlich auch nukleärer Akkumulation von β -Catenin, was die Transkription von WNT-Zielgenen induziert ^[85]. Wnt3a ist ein physiologischer, potenter Agonist am Frizzled-Rezeptor und aktiviert somit direkt den WNT-Signalweg. Wie erwartet, induzierte die Stimulation mit LiCl eine starke Reaktion im Luciferase-Reportergen-Assay, die durch gleichzeitige Behandlung mit LY reprimiert werden konnte (Abb. 15 A). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach direkter Stimulation des WNT-Signalweges mit Wnt3a-konditioniertem Medium (Abb. 15 B).

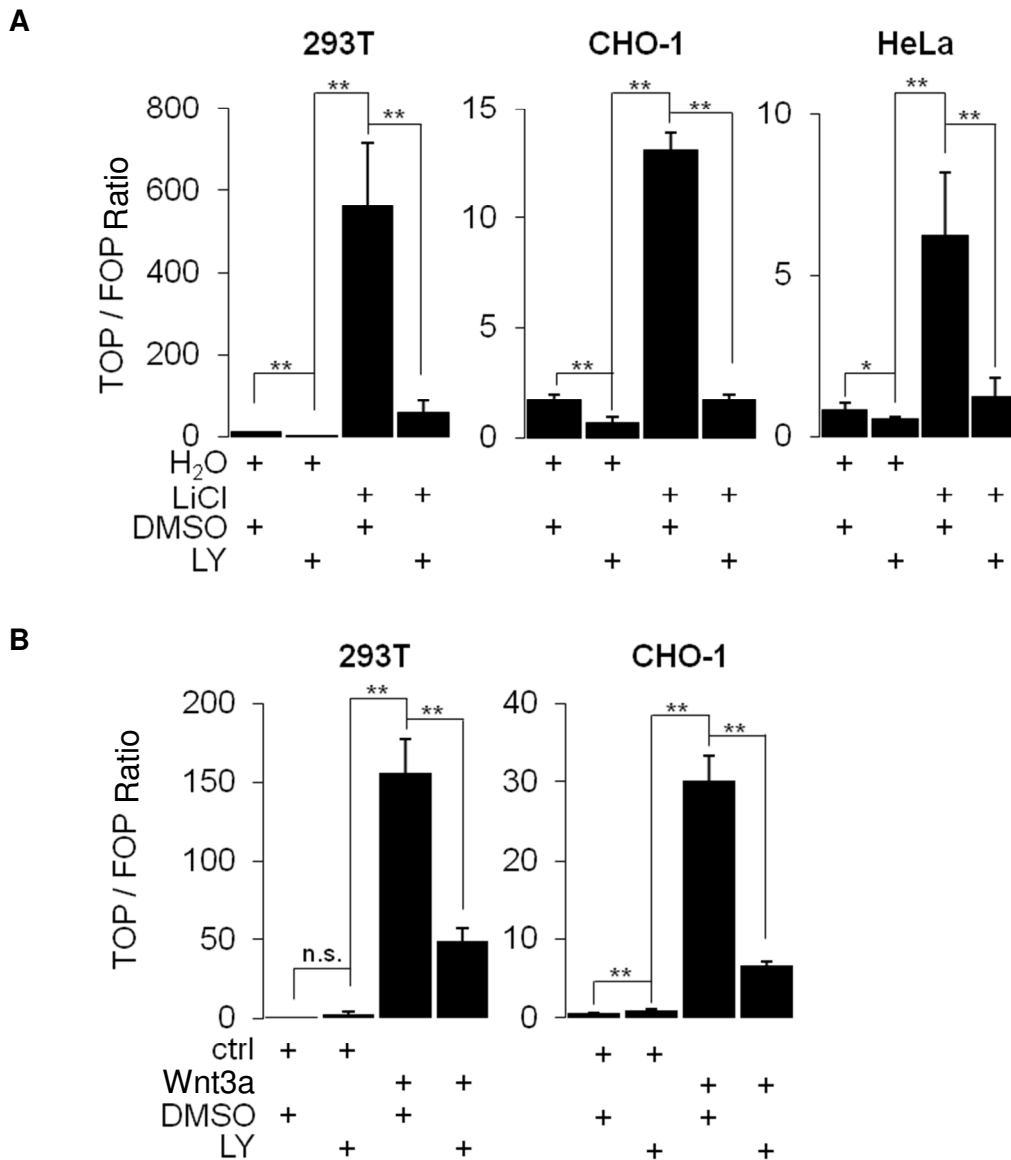


Abb. 15 PI3K-Inhibition supprimiert exogen induzierte WNT-Signalwegaktivität

Luciferase Reportergen Assay in 293T, CHO-1 und HeLa Zellen. Nach Transfektion mit pTOP-Flash bzw. pFOP-Flash und pRL-TK Plasmiden wurde nach 4 h das Medium gegen DMEM/FBS mit 30 mM LiCl (LiCl) (A) bzw. Wnt3a-konditioniertem Medium (Wnt3a) oder Kontrollmedium (ctrl) (B) und / oder 25 µM LY (LY) bzw. DMSO (DMSO) ausgetauscht und nach weiteren 12 h der Luciferase Reportergen Assay ausgewertet. Abgebildet sind die Verhältnisse (Ratio) der TOP zu FOP Signalstärken.

3.1.4 PI3K Inhibition durch LY supprimiert WNT-Zielgenexpression in 293T, RWP-1 und SW480 Zellen

Um nun zu testen, ob sich die im artifiziellen Luciferase-Reportergen-Assay gezeigte Reduktion der transkriptionellen WNT-Signalwegaktivität durch Inhibition der PI3K tatsächlich auch auf die Expression von WNT-Zielgenen auswirkte, wurden 293T Zellen mit dem Reportergenplasmid pTOP-GFP transfiziert und anschließend zur Inhibition der PI3K mit LY bzw. der Kontrollsubstanz DMSO behandelt. Der WNT-Signalweg wurde parallel mittels LiCl stimuliert und als Kontrolle die Experimente ohne LiCl-Stimulation und ohne Inhibition der PI3K (durch Zugabe der Lösungsmittel H₂O für LiCl und

DMSO für LY) durchgeführt. In der quantitativen PCR-Analyse wurde jeweils die Induktion der Zielgenexpression im relativen Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (H₂O + DMSO) untersucht und zum besseren Vergleich auf die Expression des Referenzgens *GAPDH* normalisiert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression der mRNA des Reportergens *GFP* (LiCl+DMSO: 30-fach, LiCl+LY: 11-fach) sowie der mRNA des WNT-Zielgens *Axin2*^[89] (LiCl+DMSO: 3,8-fach, LiCl+LY: 1,9-fach) durch PI3K-Inhibition mittels LY. Auch eine geringe, aber nicht signifikante Reduktion der Expression des WNT-Zielgens *SP5*^[90] konnte gezeigt werden (Abb. 16).

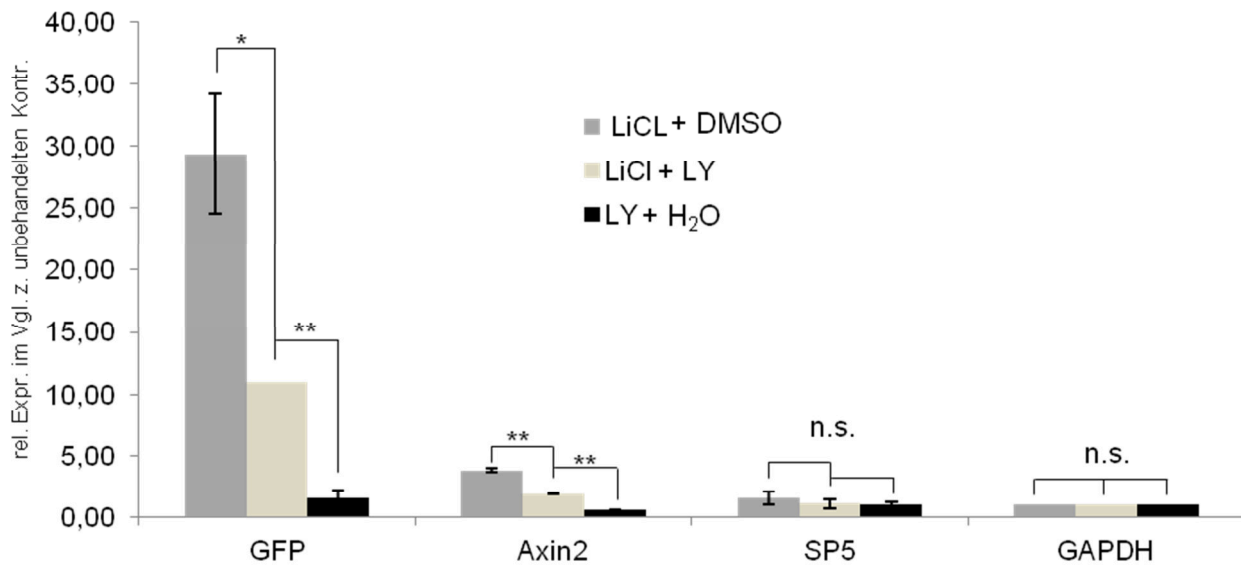


Abb. 16 PI3K-Inhibition supprimiert exogen induzierte Expression von WNT-Zielgenen

Quantitative RT-PCR-Analyse. 293T Zellen wurden in 12-Napf-Platten ausgesät und mit je 1 µg pTOP-GFP transfiziert. Nach 4 h wurde das Medium gegen DMEM/FBS mit 30 mM LiCl und / oder 25 µM LY bzw. DMSO ausgetauscht und nach weiteren 24 h die gesamte RNA der Zellen gewonnen. Nach reverser Transkription wurden die mRNA-Mengen der abgebildeten Gene per qRT-PCR gemessen und Expressionsunterschiede mittels der $\Delta\Delta$ -CP-Methode berechnet. Abgebildet sind jeweils die relativen Expressionstärken im Vergleich zur DMSO- und H₂O-behandelten Kontrolle.

Um diese, nach artifizieller Stimulation des WNT-Signalweges auf mRNA-Ebene gemessenen Ergebnisse abzusichern, wurde daraufhin untersucht, ob sich die PI3K-Inhibition auch auf die Expression von WNT-Zielgenen auf Proteinebene, in Zelllinien mit konstitutiv aktivem WNT-Signalweg auswirkt. Hierzu wurden RWP-1 und SW480 Zellen 12 h lang mit LY bzw. der Kontrollsubstanz DMSO behandelt und die Expression von WNT-Zielgenen im Western Blot untersucht. LY-Behandlung reduzierte hierbei deutlich die Expression der WNT-Zielgene c-MYC^[33, 34], Cyclin-D1^[35, 36] und LEF-1^[91] (Abb. 17).

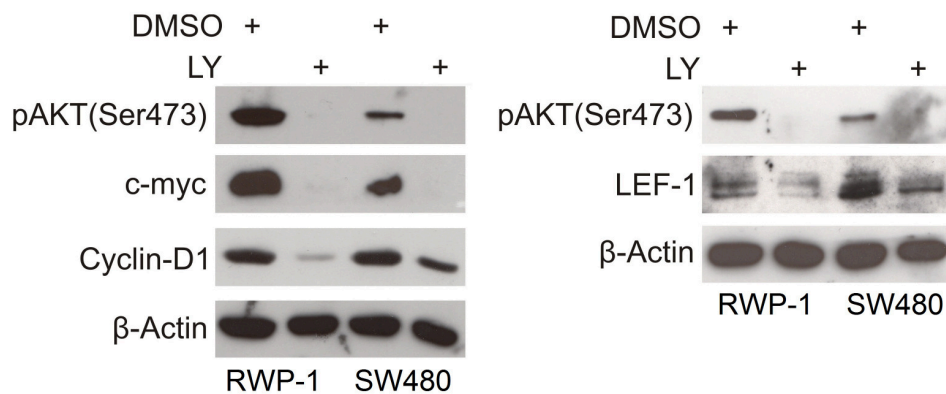


Abb. 17 PI3K-Inhibition supprimiert die endogene Expression von WNT-Zielgenen

Western Blot Analyse von 30 µg Gesamtproteinlysate von RWP-1 und SW480 Zellen 12 h nach Behandlung mit 25 µM LY bzw DMSO.

3.1.5 Die Suppression der WNT-Signalwegaktivität durch LY ist PI3K-spezifisch

Kinaseinhibitoren inhibieren allgemein eine Vielzahl an verschiedenen Kinasen. So inhibiert LY *in vitro* neben der PI3K, ebenfalls das Enzym Caseinkinase 2 (CK2)^[86], das teils indirekt und teils durch direkte Interaktion mit β-Catenin eine Rolle in der Aktivierung des WNT-Signalwegs spielt^[92-94]. Daher sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte von LY auf die WNT-Signalwegaktivität über eine Inhibition der CK2 und somit PI3K-unabhängig vermittelt werden. CK2 ist ein konstitutiv aktives Enzym, das u.a. das Hsp90-Co-Chaperon Cdc37 am Serinrest 13 phosphoryliert. Als Indikator der CK2 Aktivität^[95] wurde daher die phospho-Cdc37(Ser13) Expressionsstärke in LY-behandelten 293T und CHO-1 Zellen mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich einerseits, dass die Behandlung mit LY keinen Einfluss auf die Expressionsstärke von phospho-Cdc37(Ser13) hatte, während gleichzeitig die phospho-AKT(Ser473)-Expression deutlich reduziert wurde (Abb. 18 A). Die Inhibition der CK2 mit dem spezifischen Inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB), hatte andererseits keinen Einfluss auf die phospho-AKT(Ser473)-Expression. Somit war anhand des Indikatorproteins phospho-Cdc-37 keine Inhibition der CK2 durch LY nachzuweisen. Hinzu kommt, dass ein inhibierender Einfluss von LY auf die Aktivität der CK2 *in vivo* allein dadurch unwahrscheinlich war, dass selbst der spezifische CK2 Inhibitor TBB einen inhibierenden Effekt lediglich bei hohen Konzentrationen (100 µM) und unter Serumentzug (1 % FBS) zeigte (Abb. 18 B).

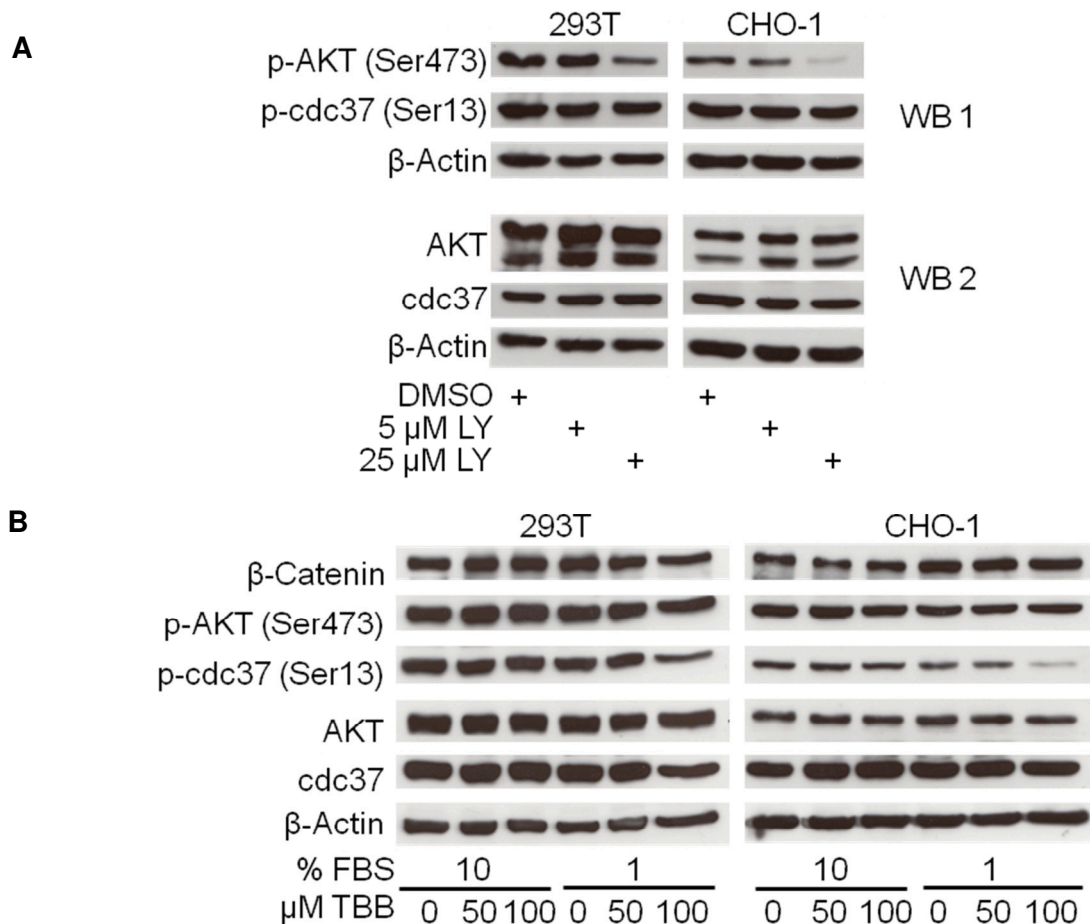


Abb. 18 LY hat keinen inhibitorischen Effekt auf CK2

A Western Blot Analyse von jeweils 25 μg Gesamtproteinlysate von 293T und CHO-1 Zellen, behandelt mit den angegebenen LY-Konzentrationen für 12 h. **B** Western Blot Analyse von 25 μg Gesamtproteinlysate von 293T und CHO-1 Zellen behandelt mit den angegebenen TBB-Konzentrationen mit und ohne Serumentzug (1% bzw. 10% FBS) für 12 h.

3.2 PI3K-Inhibition supprimiert WNT-Signalwegaktivität, ohne die subzelluläre Verteilung von β-Catenin zu verändern

Da WNT-Signalwegaktivität mit einer vermehrten nukleären Akkumulation von β-Catenin assoziiert ist, sollte im Folgenden die Frage überprüft werden, ob die beobachtete Reduktion der WNT-Signalwegaktivität durch Inhibition der PI3K, über eine Änderung der Menge nukleär lokalisierten β-Catenins verursacht wird. Hierzu wurde das Reportergenplasmid pTOP-GFP kloniert (siehe 2.3.7.2), bei dem grün fluoreszierendes Protein (GFP) in Abhängigkeit der WNT-Signalwegaktivität, analog zum pTOP-Flash-Vektor exprimiert wurde. Nach Transfektion von pTOP-GFP in RWP-1 und SW480 Zellen, zeigte sich eine deutliche Abnahme der GFP-Expression unter PI3K-Inhibition durch LY. Gleichzeitig war unter Einsatz der Immunfluoreszenzmikroskopie keine Änderung der intrazellulären Lokalisation von β-Catenin nachweisbar (Abb. 19 A). Die verminderte transkriptionelle Aktivität des WNT-

Signalweges wurde anhand der geringeren Expression von GFP zusätzlich im Western Blot von Gesamtproteinlysaten desselben Experiments semiquantitativ nachgewiesen (Abb. 19 B).

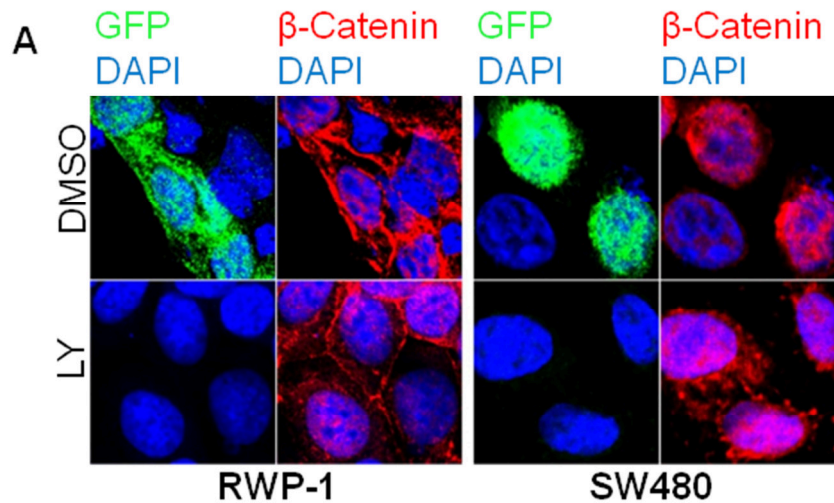


Abb. 19 A PI3K-Inhibition supprimiert WNT-Signalwegaktivität ohne Einfluss auf die nukleäre β -Catenin Expression

Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von RWP-1 und SW480 Zellen. Die Zellen wurden 4 h nach Transfektion mit pTOP-GFP mit 25 μ M LY oder DMSO behandelt und nach weiteren 12 h die für β -Catenin und GFP spezifische Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. DAPI markiert die Zellkerne.

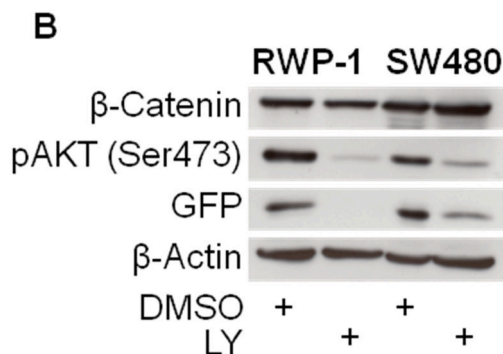
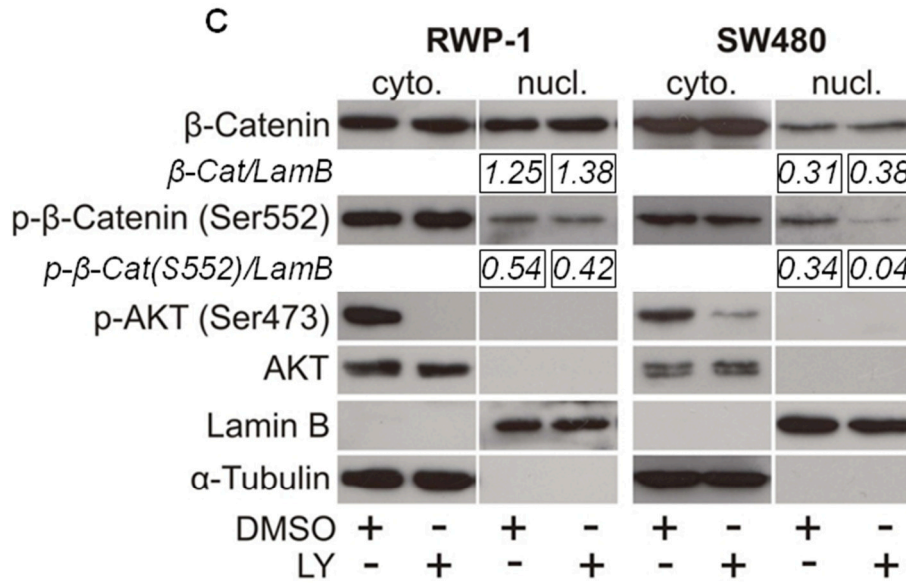


Abb. 19 B PI3K-Inhibition supprimiert transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität

Western Blot Analyse von 25 μ g Gesamtproteinlysate der übrigen Zellen des Immunfluoreszenzexperimentes 19 A.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte durch minimale, nicht in der Immunfluoreszenzmikroskopie darstellbare Änderungen der nukleären β -Catenin Expression verursacht wurden, wurde die Menge nukleären β -Catenins in subzellulären Proteinfractionen im Western Blot untersucht und die gemessenen Signalstärken zur relativen Vergleichbarkeit densitometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass PI3K-Inhibition die gesamte Menge nukleären β -Catenins nicht reduzierte. Jedoch ließ sich hier eine deutliche Abnahme der nukleären Expression von an der putativen AKT-Site Serin 552 ^[75] phosphoryliertem β -Catenin nachweisen (Abb. 19 C).



	RWP-1				SW480			
	DMSO		LY		DMSO		LY	
	Fläche*	Quotient	Fläche*	Quotient	Fläche*	Quotient	Fläche*	Quotient
Lamin-B	8.820.447	1	8.586.326	1	15.243.782	1	12.744.368	1
p-β-Catenin	4.740.154	0,54	3.634.205	0,42	5.115.276	0,34	501.749	0,04
β-Catenin	10.989.589	1,25	11.868.832	1,38	4.653.326	0,31	4.899.033	0,38

Abb. 19 C PI3K-Inhibition hat keinen Einfluss auf die nukleäre β-Catenin Expression

Western Blot Analyse von 15 µg zytoplasmatischer und nukleär angereicherter Proteinlysate von RWP-1 und SW480 Zellen, mit 25 µM LY oder DMSO für 12 h behandelt wurden. Der densitometrische Vergleich der Signalintensitäten der nukleären gesamt-β-Catenin Expression und der nukleären Expression von phospho-(Ser552)-β-Catenin mit der Signalintensität der Ladekontrolle Lamin B, wie in oben stehender Tabelle berechnet, ist in den Boxen unterhalb der zugehörigen Bande dargestellt. (* Flächeneinheit: (relative) Pixel)

Somit zeigten die Ergebnisse, dass der WNT-Signalweg-inhibierende Effekt der PI3K-Inhibition nicht durch Änderung der subzellulären Verteilung von gesamt-β-Catenin, bspw. durch verminderte nukleäre Expression, verursacht wurde. Stattdessen weißt die Reduktion des nukleären Gehalts an phospho-(Ser552)-β-Catenin unter PI3K-Inhibition, auf einen möglicherweise AKT-vermittelten Mechanismus einer PI3K-abhängigen Aktivierung des WNT-Signalweges hin.

3.3 Die nukleäre Akkumulation stabilisierten β-Catenins induziert dosisabhängig WNT-Signalwegaktivität

Da sich in den vorausgegangenen Experimenten kein Hinweis auf einen Einfluss der PI3K-Inhibition auf den nukleären Transport von β-Catenin ergab, sollte im Weiteren überprüft werden, ob PI3K-Aktivität einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität β-Catenins ausübt. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid kloniert, das für ein degradationsresistentes β-Catenin-Östrogenrezeptor-Fusionsprotein kodiert, dessen nukleäre Translokation durch Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen (4-

OHT), durch Bindung an den Östrogenrezeptor induzierbar ist. Zudem wurde am 3'-Ende eine für das myc-Peptid-Tag kodierende Sequenz eingeführt, um exogenes und endogenes β -Catenin-Protein unterscheiden zu können (siehe 2.3.7.1). Somit konnte nun der nukleäre Import β -Catenins und eine mögliche transkriptionelle Transaktivierung experimentell entkoppelt untersucht werden.

Um die Funktion des Fusionskonstruktes zu testen, wurde untersucht ob unter Standardkulturbedingungen, also bei aktiver PI3K, die nukleäre Akkumulation β -Catenins die Transkription von WNT-Zielgenen antreibt. Dazu wurde $\Delta 45$ - β -CateninER-myc in 293T Zellen exprimiert und der Effekt einer Behandlung mit 4-OHT im Luciferase-Reportergen-Assay untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Zunahme der transkriptionelle Aktivität des WNT-Signalweges abhängig von der 4-OHT-Konzentration (Abb. 19 A). Eine ähnliche Reaktion, wenn auch weniger stark ausgeprägt, zeigte sich auch in CHO-1 und HeLa Zellen (Abb. 20 B).

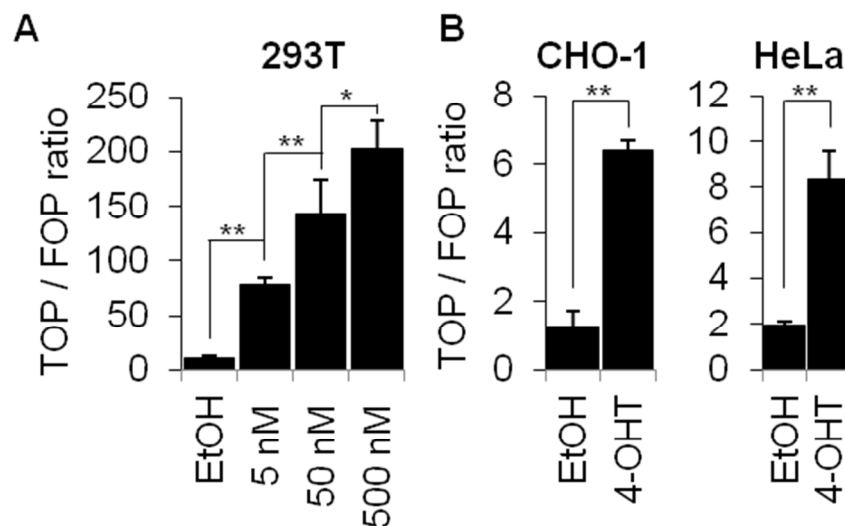


Abb. 20 Nukleäre Akkumulation von $\Delta 45$ - β -CateninER induziert transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität

Luciferase Reportergen-Assay in 293T, CHO-1 und HeLa Zellen. Nach Transfektion mit pTOP-Flash bzw. pFOP-Flash, pRL-TK und pcl-neo- $\Delta 45$ - β -CateninER-myc Plasmiden wurde nach 12 h das Medium gegen DMEM/FBS mit den angegebenen Konzentrationen 4-OHT oder EtOH (**A**) bzw. gegen 500 nM 4-OHT oder EtOH (**B**) ausgetauscht und nach weiteren 12 h der Luciferase Reportergen-Assay ausgewertet. Abgebildet sind die Verhältnisse von TOP zu FOP Signalstärken.

Um nun sicherzustellen, dass tatsächlich die Zellen, in denen β -Catenin im Zellkern akkumulierte auch eine erhöhte WNT-Signalwegaktivität aufwiesen, wurde die nukleäre Akkumulation von $\Delta 45$ - β -CateninER-myc in 293T und CHO-1 Zellen induziert und die transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität mit Hilfe des Reportergenplasmids pTOP-GFP fluoreszenzmikroskopisch *in situ* bestimmt. Die Expression des Reportergens EGFP, indizierte hierbei eine Aktivierung des WNT-Signalweges in den Zellen, die eine nukleäre Akkumulation von $\Delta 45$ - β -CateninER-myc durch 4-OHT Behandlung aufwiesen (Abb. 21). Dagegen war im Kontrollexperiment $\Delta 45$ - β -CateninER-myc überwiegend zytoplasmatisch

lokalisiert und erwartungsgemäß fluoreszenzmikroskopisch keine wesentliche Reporterexpression nachweisbar. Diese Experimente zeigten, dass die nukleäre Akkumulation von β -Catenin bei aktiver PI3K eine transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität induzierte.

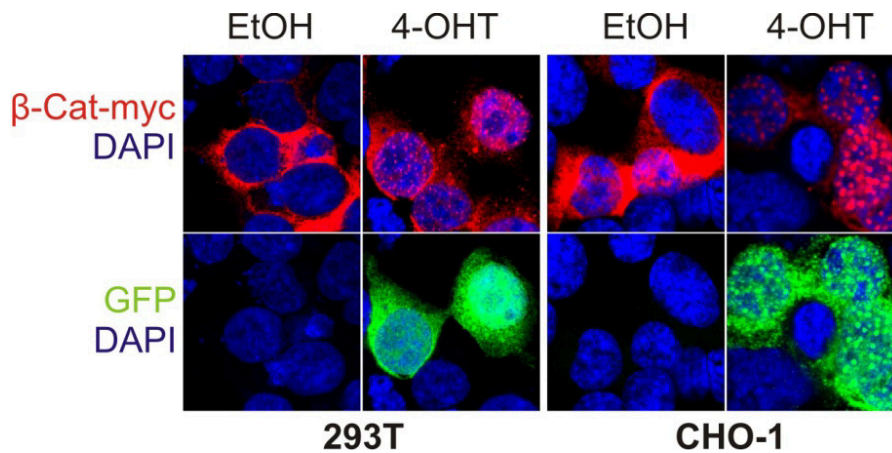


Abb. 21 Nukleäre Akkumulation von $\Delta 45$ - β -CateninER induziert transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität
Nachweis exogener β -Catenin- und EGFP-Expression mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie von 293T und CHO-1 Zellen, die mit pCl-neo- $\Delta 45$ - β -CateninER-myc und dem Reporter-genvektor pTOP-GFP transfiziert, nach 4 h mit 500 nM 4-OHT bzw. EtOH behandelt sowie nach weiteren 12 h fixiert und gefärbt wurden.

3.4 PI3K Inhibition supprimiert die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins

Um nun in einem nächsten Schritt zu testen, ob nukleär akkumuliertes β -Catenin PI3K-Aktivität benötigt um transkriptionell aktiv zu sein, wurde in 293T, CHO-1 Zellen und HeLa-Zellen $\Delta 45$ - β -CateninER-myc exprimiert und die nukleäre Akkumulation des exogenen β -Catenins, mittels 4-OHT induziert. Gleichzeitig wurde PI3K durch LY-Behandlung inhibiert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Steigerung der β -Catenin-abhängigen Transkription, durch nukleäre Akkumulation von β -Catenin, nicht jedoch bei gleichzeitiger PI3K-Inhibition durch LY (Abb. 22 A und B). Um auszuschließen dass lediglich Untergruppen der Zellen die fluoreszenzmikroskopisch beobachteten Phänomene aufwiesen, wurden die Ergebnisse abschließend durch Western Blot Analyse semiquantitativ bestätigt: Induktion der nukleären Akkumulation von β -Catenin mittels 4-OHT, führte zu einer deutlich gesteigerten Expression des Reportergens EGFP, die durch PI3K-Inhibition mittels LY reprimiert wurde (Abb. 23).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins von der Aktivität der PI3K abhängig ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine PI3K-abhängige Transaktivierung die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins maßgeblich beeinflusst.

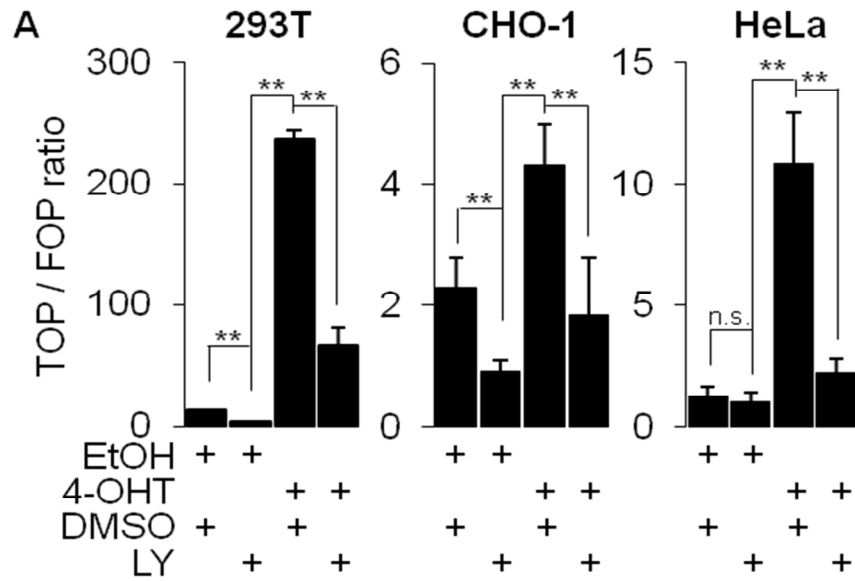


Abb. 22 A PI3K-Inhibition supprimit die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins

Luciferase Reporterassay in 293T, CHO-1 und HeLa Zellen. Nach Transfektion mit pTOP-Flash bzw. pFOP-Flash, pRL-TK und pcl-neo- Δ 45- β -CateninER-myc Plasmiden wurde nach 12 h das Medium gegen DMEM/FBS mit 500 nM 4-OHT oder EtOH, mit 25 μ M LY oder DMSO ausgetauscht und nach weiteren 12 h der Luciferase-Reportergen-Assay ausgewertet. Abgebildet sind die Verhältnisse von TOP zu FOP Signalstärken.

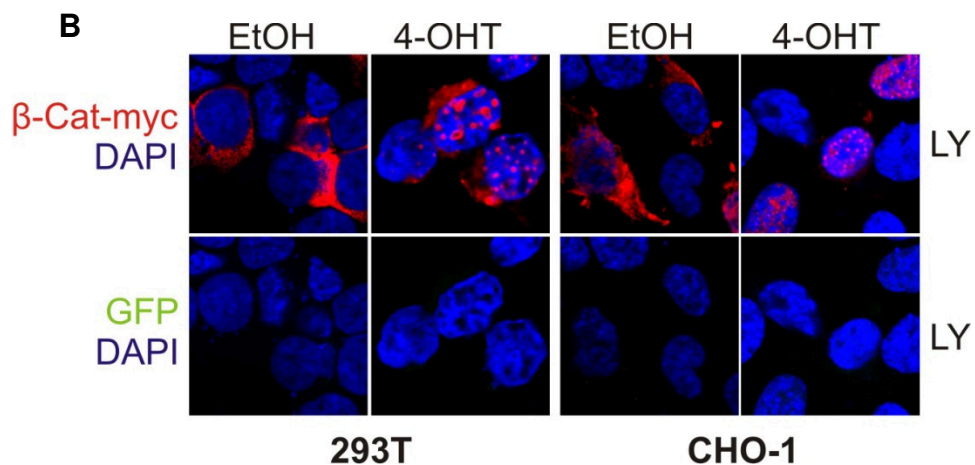


Abb. 22 B PI3K-Inhibition supprimit die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins

Nachweis exogener β -Catenin- und EGFP-Expression mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie von 293T und CHO-1 Zellen, die mit pcl-neo- Δ 45- β -CateninER-myc und dem Reporter-genvektor pTOP-GFP transfiziert und nach 4 h mit 500 nM 4-OHT und 25 μ M LY bzw DMSO behandelt und nach weiteren 12 h fixiert und gefärbt wurden.

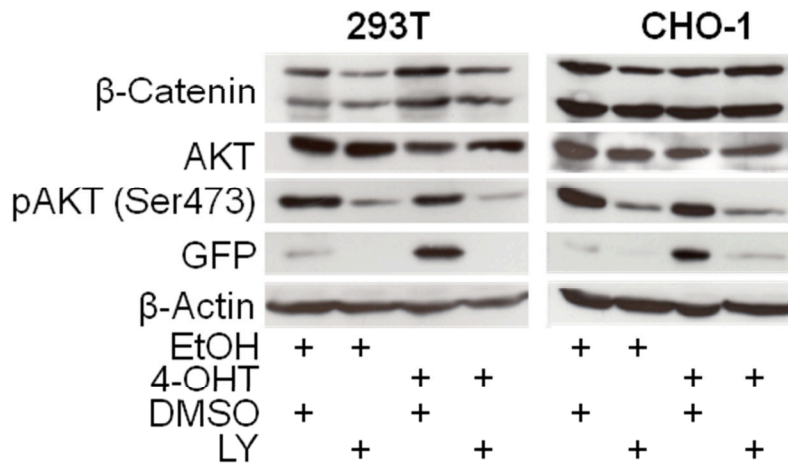


Abb. 23 PI3K-Inhibition supprimiert die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins

Western-Blot-Analyse von 25 μ g Gesamtproteinlysat von 293T und CHO-1 Zellen. Nach Transfektion mit pTOP-GFP und pCl-neo- Δ 45- β -CateninER-myc Plasmiden wurde nach 12 h das Medium gegen DMEM/FBS mit 500 nM 4-OHT oder EtOH, mit 25 μ M LY oder DMSO ausgetauscht und nach weiteren 12 h Proteinlysate hergestellt.

3.5 Mechanismus der durch PI3K-Inhibition vermittelten WNT-Signalweghemmung

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass sich PI3K-Aktivität nicht auf den nukleären Import β -Catenins auswirkt. Sie ließen jedoch vermuten, dass eine PI3K-abhängige Transaktivierung die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins maßgeblich beeinflusst. Eine solche Transaktivierung könnte über posttranslationale Modifikationen, bspw. Phosphorylierungen^[75] vermittelt werden, die die transkriptionelle Aktivität β -Catenins steigern oder auch die Bindung an die Promotoren seiner Zielgene verbessern. Diese Fragestellungen wurden im Folgenden bearbeitet.

3.5.1 Phosphomimetische β -Catenin-Mutanten sind nicht in der Lage WNT-Signalwegaktivität unter PI3K-Inhibition aufrecht zu erhalten

AKT kann β -Catenin am Serinrest 552 phosphorylieren, was in nicht-intestinalen Zelllinien zu einer nukleären Akkumulation β -Catenins und Steigerung β -Catenin-abhängiger Transkription führte^[75]. Da AKT durch PI3K aktiviert wird, sollte überprüft werden ob diese AKT-vermittelte Phosphorylierung β -Catenins entscheidend für seine transkriptionellen Aktivität ist. Dazu wurde getestet, ob β -Catenin mit einer phosphomimetischen Mutation, die eine Phosphorylierung am Serinrest 552 simuliert, auch trotz PI3K-Inhibition transkriptionell aktiv bleibt. Nach Expression einer stabilisierten, phosphomimetischen β -Catenin-Mutante (S552D- Δ 45 β -Catenin^[75]) bzw. der nicht-phosphomimetischen Kontrolle (Δ 45 β -Catenin^[79]) in 293T-Zellen, zeigte sich im Luciferase-Reportergen-Assay, dass S552D- Δ 45 β -Catenin, wie Δ 45 β -Catenin, ebenfalls nicht in der Lage war unter PI3K-Inhibition transkriptionelle WNT-

Signalwegaktivität aufrecht zu erhalten. Dagegen induzierte die Expression beider Varianten bei aktiver PI3K eine starke transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität (Abb. 24 A). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Phosphorylierung am Serinrest 552 nicht die entscheidende PI3K-vermittelte posttranslationale Modifikation in der transkriptionellen Aktivierung β -Catenins zu sein scheint.

Da in den vorhergehenden Experimenten nicht die Bedeutung der S552-Phosphorylierung für den nukleären Transport β -Catenins untersucht wurde und da sich unter PI3K-Inhibition eine Abnahme nukleären phospho-(Ser552)- β -Catenins gezeigt hatte (Abb. 19 C), sollte nun im Anschluss überprüft werden, ob nukleär akkumuliertes S552D-phosphomimetisches Δ 45 β -Catenin auch unter PI3K-Inhibition transkriptionell aktiv ist. Dazu wurde analog zu den vorhergehenden Experimenten ein S552D- Δ 45 β -Catenin-Östrogenrezeptor-Fusionskonstrukt kloniert. Die Induktion transkriptioneller WNT-Signalwegaktivität durch nukleäre Akkumulation des resultierenden Fusionsproteins (S552D-45 $\Delta\beta$ -CateninER-myc) wurde im Luciferase-Reporter-Gen-Assay getestet. Nach Transfektion von pcl-neo-S552D-45 $\Delta\beta$ -CateninER-myc in 293T Zellen wurde PI3K-Aktivität mittels LY inhibiert und gleichzeitig die nukleäre Akkumulation von S552D- Δ 45 β -CateninER-myc mittels 4-OHT induziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit den Lösungsmitteln DMSO bzw. EtOH behandelt und die Experimente gleichsam mit pcl-neo-45 $\Delta\beta$ -CateninER-myc durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass auch phosphomimetisches S552D-45 $\Delta\beta$ -CateninER-myc, trotz forcierter nukleärer Akkumulation, nicht in der Lage war transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität bei PI3K-Inhibition aufrecht zu erhalten. Sowohl bei Δ 45- β -CateninER-myc-Expression, als auch bei S552D- Δ 45 β -CateninER-myc-Expression, supprimierte PI3K-Inhibition die durch nukleäre Akkumulation beider β -Catenin-Varianten verursachte transkriptionelle WNT-Signalwegaktivität in einem ähnlichen Ausmaß (Abb. 24 B).

Die Daten zeigen, dass die Inhibition der WNT-Signalwegaktivität durch PI3K-Inhibition nicht allein durch phosphomimetische S552D-Varianten von β -Catenin antagonisiert werden kann. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die PI3K-vermittelte transkriptionelle Aktivierung von β -Catenin von aktivierenden Ereignissen abhängt, die über eine AKT-vermittelte Phosphorylierung β -Catenins am Serinrest 552 hinaus gehen. Diese Daten widerlegen somit die Behauptung von Fang et al.^[75], dass die Phosphorylierung β -Catenins am Serinrest 552 der entscheidende Schritt in der PI3K-vermittelten transkriptionellen Aktivierung β -Catenins ist. Somit könnte die PI3K-vermittelte transkriptionelle Aktivierung von β -Catenin bspw. über zusätzliche Phosphorylierungsstellen erfolgen, die hier nicht untersucht wurden.

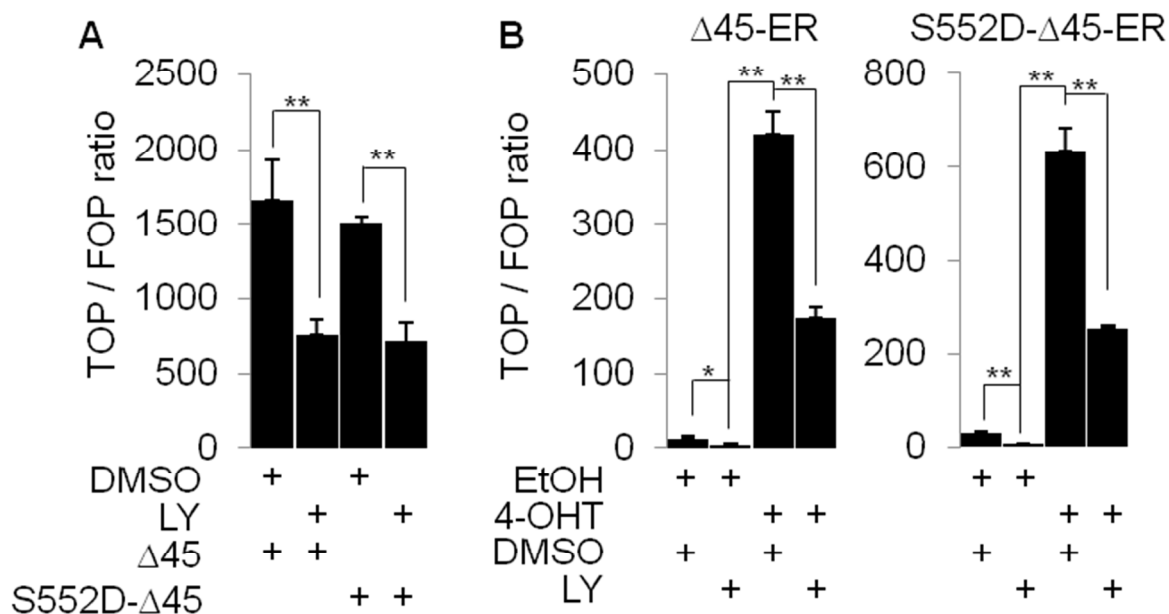


Abb. 24 Eine phosphomimetische S552D-β-Catenin-Mutante erhält die transkriptionelle Aktivität β-Catenins unter PI3K-Inhibition nicht aufrecht

TOP-Flash Luciferase-Reporterassay. **A** 293T Zellen wurden mit pcl-neo-45Δβ-Catenin oder pcl-neo-S552D-45Δβ-Catenin und den Reportervektoren transfiziert und 12 h mit 25 μM LY bzw. DMSO behandelt. **B** 293T Zellen wurden mit pcl-neo-45Δβ-CateninER oder pcl-neo-S552D-45Δβ-CateninER transfiziert und 12 h mit 25 μM LY oder DMSO sowie 500 nM 4-OHT bzw. EtOH behandelt.

3.5.2 PI3K-Inhibition vermindert die Bindung von β-Catenin an Zielgenpromotoren

Ein weiterer möglicher Einfluss des PI3K-Signalwegs auf die Aktivität des WNT-Signalwegs könnte über eine Modulation der Bindungsaffinität β-Catenins an seine Zielgenpromotoren erfolgen. Um zu untersuchen, ob die PI3K-vermittelte transkriptionelle Transaktivierung von β-Catenin mit einer veränderten Bindung an die Promotor-Sequenzen seiner Zielgene assoziiert ist, wurde daher getestet ob β-Catenin in Gegenwart von LY noch an die Promotor-Sequenzen seiner Zielgene bindet. Dazu wurden SW480 Zellen 12 h mit 25 μM LY bzw. der äquivalenten Menge DMSO behandelt, die an β-Catenin gebundenen DNA-Fragmente in einer Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) aufgereinigt und schließlich in eine quantitativen PCR-Analyse eingesetzt.

Es zeigte sich, dass unter PI3K-Inhibition die DNA des WNT-responsiven Elementes (WRE) des stark regulierten WNT-Zielgens *Axin2* ^[89], nach Chromatinimmunopräzipitation mit einem β-Catenin Antikörper, deutlich vermindert anreichterte. Durch Inhibition der PI3K hatte β-Catenin also weniger stark an das WRE des WNT-Zielgens *Axin2* gebunden (Abb. 25). Dies bedeutet, dass PI3K-Aktivität bei der Bindung von β-Catenin an die Promotor-Sequenzen von WNT-Zielgenen involviert zu sein scheint.

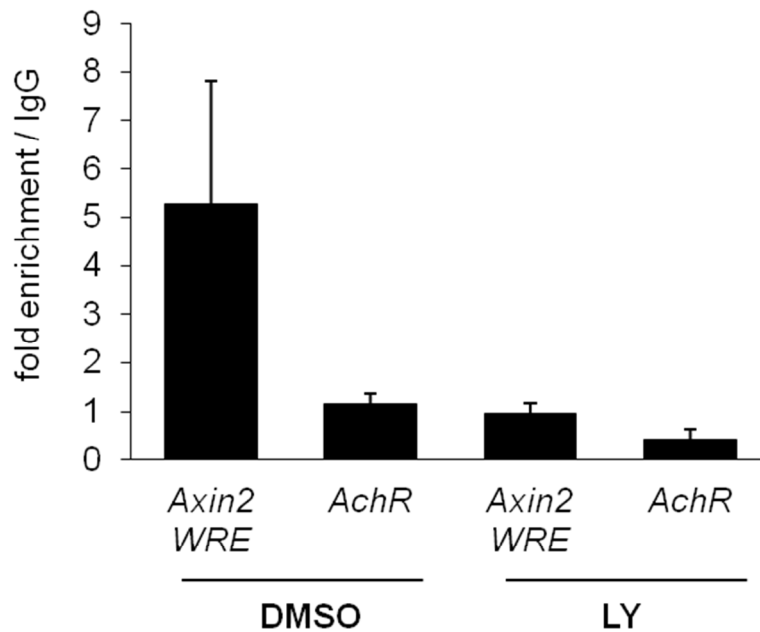


Abb. 25 PI3K-Inhibition supprimiert die Bindung β -Catenins an Zielgen-Promotor-Sequenzen
 Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) von SW480-Zellen nach 12 h Behandlung mit 25 μ M LY bzw. DMSO. An β -Catenin gebundenes Chromatin wurde nach Scherung präzipitiert, aufgereinigt und in einer quantitativen PCR-Analyse die Anreicherung des WRE des WNT-Zielgens *Axin2* untersucht. Die Promotorregion des nicht durch WNT regulierten Azetylcholinrezeptorgens (*AchR*) wurde als Kontrolle untersucht. Die Werte der jeweils mittels des β -Catenin-Antikörpers präzipitierten Probe wurde relativ auf die Werte der mittels normalen Maus-IgG1 präzipitierten Probe bezogen (sog. „fold enrichment / IgG“). Die Experimente wurden an zwei unterschiedlichen Tagen wiederholt und insgesamt als Duplikate ausgewertet.

4 Diskussion

Durch die in der Mehrzahl aller KRK vorliegende initiale *APC*-Mutation kommt dem WNT-Signalweg eine entscheidende Bedeutung als treibende Kraft der kolorektalen Karzinogenese zu. Sein letztllicher Effektor β -Catenin erfüllt seine Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern, wobei die Regulation des nukleären Imports und der transkriptionellen Transaktivierung β -Catenins nicht vollständig aufgeklärt sind. In diesem Zusammenhang scheinen weitere Signaltransduktionswege einen modulierenden Einfluss auszuüben. Aufgrund der schwierigen therapeutischen Erreichbarkeit des WNT-Signalweges könnten sich diese modulierenden Signaltransduktionswege als potentielle Ziele eines therapeutischen Angriffes auf den WNT-Signalweg erweisen.

4.1 Für die transkriptionelle Transaktivierung von β -Catenin ist eine Wechselwirkung mit anderen Signaltransduktionswegen essentiell

Die vorliegende Arbeit identifiziert PI3K und damit den PI3K-Signalweg als einen wichtigen Modulator der WNT-Signalwegaktivität. In verschiedenen kultivierten Zelllinien mit wildtypischem WNT-Signalweg oder WNT-Signalweg-aktivierenden Mutationen im *APC*-Gen wurde gezeigt, dass die Inhibition der PI3K sowohl die β -Catenin-abhängige Transkription, als auch die Expression der WNT-Zielgene *Axin2*, *Cyclin-D1*, *c-MYC* und *LEF-1* supprimierte. Auch wenn die Reduktion der *Cyclin-D1*- und der *c-MYC*-Expression teilweise durch die Inhibition der PI3K-Signaltransduktion selbst erklärt werden könnte^[96], sind *Axin2* und *LEF-1* spezifische WNT-Zielgene^[89, 97], sodass von einer klaren Interaktion zwischen WNT und dem PI3K-Signalweg ausgegangen werden kann. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen eine starke Suppression exogen mittels LiCl oder Wnt3a induzierter WNT-Signalwegaktivität durch Inhibition der PI3K. Sogar in Zellen mit WNT-Signalweg-aktivierender *APC*-Mutation, führte PI3K-Inhibition zu einer starken Abnahme der WNT-Signalweg-aktivität und dieser Effekt basierte offenbar auf verminderter Bindung β -Catenins an die Promotorsequenzen von WNT-Zielgenen sodass pharmakologische PI3K-Inhibition in KRK, die in über 80% *APC*-Mutationen aufweisen, eine interessante Therapieoption sein könnte.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten, die zeigen, dass der PI3K-Antagonist PTEN in der Lage ist, WNT-Signalwegaktivität zu hemmen^[98]. Daher aktiviert auch der Knockout von *PTEN* im Kontext einer *APC*-Inaktivierung synergistisch beide Signaltransduktionswege und induziert verstärkte intestinale Tumorigenese^[99]. Des Weiteren stimuliert PI3K nach Aktivierung durch Prostaglandin E2 den WNT-Signalweg und das Wachstum *APC*-mutierter kolorektaler Tumorzellen, was eine weitere

spezifische Verbindung des PI3K-Signalweges zum WNT-Signalweg darstellt ^[100]. Darüber hinaus ist der WNT-Signalweg, entsprechend seiner Bedeutung für intestinale Stammzellen, essentiell in der Regeneration und Homöostase intestinaler Gewebe ^[101], interessanterweise benötigt er aber für die Regeneration der Darmschleimhaut bei bakteriellen Infektionen die Aktivität des PI3K-Signalweges ^[102]. Die Abhängigkeit der Funktion des WNT-Signalweges vom PI3K-Signalweg in der Aufrechterhaltung von Geweben besteht zudem auch in hämatopoetischen Stammzellen ^[103]. Die klinische Bedeutung des PI3K-Signalweges in der kolorektalen Karzinogenese ergibt sich außerdem aus seiner hohen Mutationsfrequenz: In 27% aller KRK finden sich PTEN-Mutationen und in 23% *PIK3CA*-Mutationen ^[104]. Letztere sind darüber hinaus mit schlechtem Überleben von KRK-Patienten assoziiert ^[105]. Diese Daten belegen eine spezifische und notwendige Verbindung beider Signaltransduktionswege, besonders in der Tumor- und Stammzellbiologie.

Ein möglicher Knotenpunkt der Interaktion beider Signaltransduktionswege liegt in GSK3 β , die von AKT am Serinrest 9 phosphoryliert und dadurch inhibiert werden kann. Dies scheint die WNT-Signalwegaktivität durch verminderten Abbau β -Catenins zu steigern ^[106-108]. Jedoch supprimierte PI3K-Inhibition auch durch GSK3 β -Inhibition mittels LiCl induzierte WNT-Signalwegaktivität. Zudem wurde die durch degradationsresistente β -Catenin-Mutanten verursachte WNT-Signalwegaktivität durch PI3K-Inhibition gehemmt. Da auch nukleär akkumuliertes β -Catenin PI3K-Aktivität zur Transkription benötigte, weisen die Ergebnisse also vielmehr auf einen direkten, PI3K-vermittelten transaktivierenden Effekt auf β -Catenin hin, der sich nicht auf die Stabilität oder subzelluläre Lokalisation β -Catenins auswirkt.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass PI3K-Aktivität nicht nur synergistisch mit dem WNT-Signalweg agiert, sondern dass ein aktiver PI3K-Signalweg eine notwendige Voraussetzung für volle transkriptionelle Aktivität von β -Catenin ist. Dies könnte möglicherweise durch direkte Phosphorylierung von β -Catenin durch AKT vermittelt werden ^[75], jedoch waren phosphomimetische S552D- β -Catenin-Mutanten, trotz experimentell induzierter nukleärer Akkumulation, nicht in der Lage, die Suppression der WNT-Signalwegaktivität durch PI3K-Inhibition aufzuheben. Dies deutet darauf hin, dass die PI3K-vermittelte transkriptionelle Aktivierung von β -Catenin, durch aktivierende Ereignisse über eine Serin552-Phosphorylierung hinaus vermittelt wird.

Weiterhin ließ die Beobachtung heterogener WNT-Signalwegaktivität trotz *APC*-Mutation in allen klonal abstammenden Zellen in KRK vermuten, dass weitere Einflussfaktoren die WNT-Signalwegaktivität, besonders im Bereich der Invasionsfront modulieren ^[60, 62]. Vor dem Hintergrund einer *APC*-Mutation erwies sich v.a. MAPK-Aktivität als bedeutsamer Aktivator des WNT-Signalweges ^[64], der durch

Blockade des EGFR inhibiert und durch onkogenes KRAS stimuliert werden konnte ^[59]. Die Daten dieser Arbeit identifizieren den PI3K/AKT-Signalweg als weiteren essentiellen Modulator des WNT-Signalweges, dessen Einfluss die heterogene Verteilung der WNT-Signalwegaktivität in KRK erklären könnte.

4.2 Nukleär lokalisiertes β -Catenin als ein Kennzeichen von WNT-Signalwegaktivität

In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor wird nukleär exprimiertes β -Catenin allgemein als Zeichen eines aktivierten WNT-Signalweges angesehen ^[29]. Mutationen im *APC*- oder β -Catenin-Gen *CTNNB1* führen zu einer Stabilisierung von β -Catenin und in der Folge zu seiner zytoplasmatischen Akkumulation. Dieser Zustand scheint Grundvoraussetzung, jedoch alleine nicht ausreichend für die Überaktivierung des WNT-Signalweges zu sein ^[64]. β -Catenin gelangt schließlich in den Zellkern und aktiviert die Transkription der WNT-Zielgene. Es ist bislang jedoch nur unvollständig geklärt, welche Faktoren den nukleären Import β -Catenins kontrollieren und ob nukleär lokalisiertes β -Catenin generell transkriptionell aktiv ist. Dies scheint abhängig vom Zelltyp zu sein ^[109] und könnte möglicherweise durch externen Einfluss moduliert werden. PI3K-Inhibition selbst übte in den vorliegenden Experimenten keinen Einfluss auf die nukleäre Expression β -Catenins aus. Jedoch war PI3K-Aktivität notwendige Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivität nukleären β -Catenins, da unter PI3K-Inhibition trotz starker nukleärer β -Catenin-Akkumulation keine β -Catenin-abhängige Transkription stattfand. Also ist nukleär lokalisiertes β -Catenin zumindest *in vitro* offenbar nicht notwendigerweise transkriptionell aktiv und benötigt eine Transaktivierung durch externe Einflüsse. In der *in vivo*-Situation jedoch, fand sich nukleäre β -Catenin-Expression in Zellen mit starker WNT-Aktivität ^[59] und korrelierte in KRK mit der Expression des WNT-Zielgens *c-MYC* ^[110]. Da sich nukleär lokalisiertes β -Catenin in KRK häufig im Bereich der Invasionsfront findet, scheinen die Tumorzellen *in vivo* also permanenten externen Einflüssen ausgesetzt zu sein, die die nukleäre Translokation und die transkriptionelle Transaktivierung β -Catenins bewirken ^[60]. Hierfür könnte u.a. MAPK-Signalwegaktivität verantwortlich sein, da bspw. humane *KRAS*-mutierte KRK als auch transgene Mäuse mit gleichzeitiger *APC*- und *KRAS*-Mutation vermehrt nukleäres β -Catenin aufwiesen ^[59, 63]. Darüber hinaus hat der Nachweis nukleär exprimierten β -Catenins auch klinische Bedeutung, da dies mit der Tumorgroße in Kolonadenomen ^[111] sowie der Prognose von KRK-Patienten ^[112] korrelierte. Interessanterweise bestanden in Kolonkarzinomen mit hoher nukleärer β -Catenin-Expression signifikant häufiger Fernmetastasen ^[113]. Bei gleichzeitig

vorliegender Aktivierung des PI3K-Signalweges jedoch, wiesen alle Tumoren mit hoher nukleärer β -Catenin-Expression Fernmetastasen auf, während PI3K-Signalwegaktivität allein das Auftreten von Fernmetastasen nicht beeinflusste. Diese Daten identifizierten PI3K als ausschlaggebenden Koaktivator des WNT-Signalweges, mit besonderer Funktion in der Metastasierung von Kolonkarzinomen. Da auch hier kein Zusammenhang zwischen PI3K-Signalwegaktivität und nukleärer β -Catenin-Expression bestand, liegt hier ein zusätzlicher Effekt weiterer Einflussgrößen nahe, die die nukleäre Translokation β -Catenins kontrollieren, während PI3K-Aktivität die transkriptionelle Aktivität β -Catenins moduliert ^[113]. Darüber hinaus, erwies sich somit der PI3K-Signalweg aufgrund seiner Funktion in der Metastasierung von Kolonkarzinomen als möglicher wichtiger therapeutischer Angriffspunkt.

4.3 PI3K- und WNT-Signalwege als therapeutische Ziele

Eine Inhibition des WNT-Signalweges erscheint aufgrund seiner grundlegenden Bedeutung in der Tumorigenese v.a. von KRK, aber auch von hepatozellulären Karzinomen und Mammakarzinomen als eine attraktive therapeutische Strategie ^[114]. Der WNT-Signalweg ist aber bisher nur schwierig therapeutisch erreichbar, da β -Catenin keine Kinase oder Rezeptor ist, sondern ein Transkriptionsfaktor, dessen Auswirkungen sich im Zellkern abspielen. Während *in vitro* und *in vivo* zahlreiche Substanzen und Strategien erfolgreich zur Inhibition des WNT-Signalweges eingesetzt wurden ^[115], wurde lediglich eine Substanz (PRI-724, ein Inhibitor der Interaktion von β -Catenin und seinem Kofaktor Creb-bindendes Protein (CBP) ^[116]) bisher in einer kleinen klinischen Phase I-Studie getestet ^[117]. Es liegt daher nahe, den WNT-Signalweg modulierende Signaltransduktionswege, wie den PI3K-Signalweg, als potentielle therapeutische Ziele in WNT-getriebenen Tumorerkrankungen zu betrachten.

Aufgrund der überdurchschnittlichen Häufung von Alterationen im PI3K-Signalweg in unterschiedlichen Krebserkrankungen, wurde seine Bedeutung in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumoren früh erkannt ^[70, 118] und daher versucht PI3K als therapeutisches Ziel zu nutzen ^[73]. Mehrere PI3K-Inhibitoren waren in der Hemmung des Wachstums von KRK-Zelllinien mit alteriertem WNT-Signalweg in präklinischen Modellen *in vitro* und *in vivo* wirksam ^[119-122]. Teilweise sind diese Substanzen auch bereits in der Phase-III-Erprobung angekommen ^[123]. Klinische Erfahrungen zum Einsatz von PI3K-Inhibitoren in der Behandlung solider Tumoren sind jedoch nach wie vor begrenzt und die bisherigen Studienergebnisse eher ernüchternd ^[124]. Die Studien wurden ausschließlich in kleinen heterogenen Gruppen von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorleiden durchgeführt und erreichten hier als

Einzelsubstanz in einigen Fällen lediglich einen Halt des Krankheitsfortschritts (sog. „stable disease“) ^[125-127]. Alleinige PI3K-Inhibition scheint also, zumindest in fortgeschrittenen Tumorerkrankungen, bisher nicht die erhoffte therapeutische Wirksamkeit zu haben, was auf mögliche weitere entscheidende Einflussgrößen in der Aktivierung des WNT-Signalweges hinweist. Daher könnte eine multimodale Therapie, die mehrere, den WNT-Signalweg stimulierende Signaltransduktionswege angreift möglicherweise bessere therapeutische Wirksamkeit haben.

4.4 Limitationen

4.4.1 Verwendung unterschiedlicher Zelltypen

In dieser Arbeit kamen neben vier humanen Zelllinien (SW480, RWP-1, HeLa und 293T) auch eine Hamsterzelllinie (CHO-1) zum Einsatz. Die RWP-1 und die SW480 Zellen verfügen durch ihre trunkierende *APC*-Mutation über einen konstitutiv aktivierten WNT-Signalweg und sind daher als gut geeignete Modellsysteme zu betrachten, um den WNT-Signalweg zu studieren. Auch wenn in dieser Arbeit lediglich eine kolorektale Zelllinie (SW480), verwendet wurde, lassen doch die erzielten Ergebnisse, aufgrund der zentralen Bedeutung des WNT-Signalweges in der kolorektalen Karzinogenese, generell auch eine Übertragung auf die in diesem Prozess stattfindende Signaltransduktion zu. Im Gegensatz dazu, wurden für die Experimente der nukleären β -Catenin-Translokation, Zelllinien mit wildtypischem WNT-Signalweg benötigt, da die hohe endogene WNT-Signalwegaktivität bspw. in konstitutiv WNT-aktiven KRK-Zelllinien, die exogene Stimulation durch Induktion der nukleären β -Catenin-Akkumulation vollständig überlagerte (Daten nicht gezeigt). Die in der nicht-humanen CHO-1 Zelllinie gewonnenen Daten zeigen, dass die gezeigten Mechanismen über Speziesgrenzen hinweg bestehen. Da es sich beim WNT-Signalweg um einen evolutionär hochkonservierten Signalweg handelt, kann daher allgemeine Gültigkeit dieser Zusammenhänge angenommen werden.

4.4.2 Spezifität der eingesetzten Inhibitoren

LY hemmt überwiegend und hocheffizient PI3K ^[86]. Wie alle anderen pharmakologisch wirksamen Kinaseinhibitoren auch, ist LY nicht vollständig Ziel-spezifisch und inhibiert eine Vielzahl anderer Kinasen. So übt LY dazu einen geringen inhibitorischen Effekt auf die CK2 aus ^[86], der sich allerdings nur *in vitro* nachweisen lässt. Eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch off-target-Effekte

wurde durch Kontrollexperimente ausgeschlossen, die zeigten, dass LY unter den experimentellen Bedingungen keine inhibitorische Wirkung auf die CK2 ausübt. LY kann darüber hinaus auch GSK3 β hemmen ^[86], was wiederum, analog der Wirkung von LiCl, einen stimulierenden Effekt auf die WNT-Signalwegaktivität hätte. Ein über potentielle weitere Ziele von LY vermittelter Effekt kann somit also nicht ausgeschlossen werden. Der Einsatz modernerer, möglicherweise spezifischerer PI3K-Inhibitoren wie bspw. NVP-BKM-120 ^[128] oder ein molekularbiologischer Ansatz, durch siRNA-vermittelten Knockdown der PI3K, könnte diese Frage klären helfen.

Für die experimentelle Stimulation des WNT-Signalweges durch Inhibition der GSK3 β wurde LiCl eingesetzt. Auch wenn LiCl noch andere Kinasen neben der GSK3 inhibiert ^[86], ist seine Verwendung zur experimentellen Stimulation des WNT-Signalwegs allgemein etabliert ^[129]. Zur Absicherung wurden die Experimente jedoch auch durch weniger artifizielle Aktivierung des WNT-Signalweges, durch Stimulation mittels Wnt3a-haltigen Zellkulturmediums, durchgeführt.

4.4.3 Experimentelle Induktion des nukleären Transports von β -Catenin

Da die genauen Mechanismen des nukleären Imports von β -Catenin bisher noch nicht geklärt sind, wurde in dieser Arbeit ein System zum experimentell induzierbaren nukleären Transport von β -Catenin entwickelt, das es erlaubt eine transkriptionelle Transaktivierung unabhängig vom nukleären Transport zu untersuchen. Durch diese strikte mechanistische Trennung ist es jedoch mit diesem System nicht möglich, Mechanismen, die eine transkriptionelle Transaktivierung und gleichzeitig den nukleären Import verursachen zu untersuchen. Ziel dieser Experimente war es, die transkriptionelle Aktivierung nukleär lokalisierten β -Catenins zu untersuchen, während zukünftige Studien die Mechanismen des nukleären Imports zum Gegenstand haben könnten.

β -Catenin benötigt als Transkriptionsfaktor ohne eigene DNA-Bindedomäne weitere Interaktionspartner zur Transkription seiner Zielgene. Um auszuschließen, dass die Fusion der beiden Proteine β -Catenin und Östrogenrezeptor, die in einem deutlich größeren Protein resultiert, hierauf unerkannte Effekte ausübt, wurden Reporter-gen-Assays durchgeführt. Da das Fusionsgen-System hier durchwegs transkriptionell aktiv war, wurde das System als funktionell angesehen. Außerdem ist die Fusion eines Transkriptionsfaktors mit ERTM ein etabliertes Verfahren um Tamoxifen-abhängig die Transkription seiner Zielgene zu induzieren ^[57, 130].

4.4.4 Fehlende *in vitro* und *in vivo* Versuche

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Aktivität der PI3K für die transkriptionelle Aktivität des WNT-Signalweges entscheidend ist, da die Aktivität der PI3K die Bindung von β -Catenin an die Promotorsequenzen seiner Zielgene verbessert. Den exakten Mechanismus dieser Interaktion klären die vorliegenden Daten jedoch nur teilweise auf. Zumindest konnte gezeigt werden dass, anders als von Fang et al. postuliert ^[75], die Phosphorylierung β -Catenins am Serinrest 552 nicht ausschließlich entscheidend für seine transkriptionelle Aktivität ist und weitere, PI3K-vermittelte Ereignisse dafür notwendig sind. Tiefgreifendere biochemische Studien zur Interaktion von PI3K-nachgeschalteten Elementen mit β -Catenin auf Proteinebene, könnten weitere Einsicht in diese Fragestellung bringen.

Die Ergebnisse der PI3K-Inhibition und der experimentellen nukleären β -Catenin-Akkumulation zeigten deutliche Effekte auf Zielgen-, bzw. transkriptioneller Ebene. Untersuchungen zur funktionellen Auswirkung wie bspw. Migration, Proliferation und Invasion könnten sich als interessante Folgeprojekte anschließen. Im Allgemeinen werden darüber hinaus die Untersuchung der Tumorbildung und die Ausbildung von Metastasen in immuninkompetenten Nacktmäusen (NOD-SCID-Mäusen) als Goldstandard zur Messung biologischer Aggressivität angesehen. Diese funktionellen Untersuchungen gestalten sich jedoch in den verwendeten Zelllinien problematisch, da bspw. 293T und CHO-1 kein invasives Wachstum zeigen und daher die Auswirkung der experimentellen nukleären β -Catenin-Akkumulation hier nicht untersucht werden kann. Es wurde jedoch mehrfach gezeigt, dass PI3K-Inhibition Wachstum und sogar Metastasierung in KRK-Zelllinien verhindert ^[120-122]. Somit wurde dem PI3K-Signalweg im Kontext einer Überaktivierung des WNT-Signalweges ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Metastasierung zugewiesen.

Eine andere Limitation der Untersuchungen besteht darin, dass ausschließlich die Auswirkungen der Inhibition der PI3K auf WNT-Signalwegaktivität getestet wurden. Eine positive Wirkung gesteigerter PI3K-Signalwegaktivität auf den WNT-Signalweg konnte experimentell nicht gezeigt werden, denn weder die Expression konstitutiv aktiver AKT-Mutanten, noch eine Behandlung mit EGF oder Insulin, hatte im TOP-Flash Reporterassay wesentliche Auswirkung auf die WNT-Signalwegaktivität in 293T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine wahrscheinliche Ursache hierfür ist, dass der PI3K-Signalweg bereits unter Grundbedingungen eine sehr hohe Aktivität in den verwendeten Zellen aufweist, da einerseits die Experimente unter 10% Serumstimulation, d.h. unter Überschuss von PI3K-stimulierenden Wachstumsfaktoren durchgeführt wurden und die Zellen andererseits sehr hohe Proteinmengen aktivierten AKT's (Ser473-phospho-AKT) exprimierten. Auch nach Serumentzug und Stimulation mit

EGF oder Insulin ließ sich hier jedoch ein positiver Effekt nicht reproduzierbar nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich könnten qRT-PCR-Messungen der WNT-Zielgene in den RWP1- und den SW480-Zellen die Daten der Zielgenexpression erweitern.

5 Zusammenfassung

Der WNT-Signalweg spielt in der Tumorigenese maligner Erkrankungen eine wesentliche Rolle, besonders von KRK, die in der Mehrzahl genetische Alterationen in WNT-Signalwegkomponenten, und dadurch konstitutive WNT-Signalwegaktivität aufweisen. Bei aktivem WNT-Signalweg akkumuliert sein zentraler Effektor, der Transkriptionsfaktor β -Catenin, durch verminderten Abbau im Zytoplasma und schließlich auch im Zellkern, was als Zeichen eines aktivierten WNT-Signalwegs angesehen wird. Welche Faktoren den nukleären Import β -Catenins kontrollieren und ob β -Catenin hierbei transkriptionell aktiviert wird, ist jedoch nur unvollständig aufgeklärt. Stimulierende und teils auch hemmende Interaktionen mit dem WNT-Signalweg wurden für mehrere andere Signaltransduktionswege beschrieben, u.a. den PI3K-Signalweg, der in KRK häufig mutiert und dadurch konstitutiv aktiviert ist.

Um hier Klarheit zu schaffen, wurden die transkriptionelle Transaktivierung und der nukleäre Transport von β -Catenin experimentell entkoppelt. Dazu wurde ein mutiertes β -Catenin-Fusionsgen kloniert, dessen nukleäre Akkumulation mittels 4-OHT-Zugabe induzierbar ist. In Reporteragen-Assays und durch Untersuchung der Expression von WNT-Zielgenen wurde gezeigt, dass WNT-Signalwegaktivität von aktiver PI3K abhängt, da trotz nukleärer Akkumulation von β -Catenin die LY-vermittelte PI3K-Inhibition WNT-Signalwegaktivität supprimierte. PI3K-Inhibition hemmte die transkriptionelle Aktivität des WNT-Signalwegs durch verminderte Bindung von β -Catenin an seine Zielgenpromotoren, ohne die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin zu verändern. Da phosphomimetische S552D- β -Catenin-Mutanten den inhibitorischen Effekt von LY nicht antagonisieren konnten, scheint die PI3K-vermittelte Transaktivierung β -Catenins dabei durch Ereignisse vermittelt zu werden, die über eine Phosphorylierung β -Catenins am Serinrest 552 hinaus gehen. Diese Arbeit zeigt, dass Aktivität des PI3K-Signalweges für die transkriptionelle Aktivität nukleär lokalisierten β -Catenins notwendig ist, ohne selbst die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin zu beeinflussen. Die Aktivität des WNT-Signalweges hängt somit maßgeblich von der Aktivität des PI3K-Signalweges ab. Aus diesen Ergebnissen lässt sich

ein hypothetisches 3-Signal-Modell der transkriptionellen Transaktivierung β -Catenins ableiten, in dem WNT-Signalwegaktivität zur zytoplasmatischen Stabilisierung β -Catenins führt (1), PI3K-Aktivität die transkriptionelle Transaktivierung vermittelt (2) und eine dritte Einflussgröße den nukleären Import β -Catenins induziert (3) (Abb. 26). Da der WNT-Signalweg bisher therapeutisch nur schwer angreifbar ist, bieten die hier vorliegenden Ergebnisse darüber hinaus die Grundlage einer möglichen Therapie WNT-Signalweg-getriebener Malignome durch Inhibition des PI3K-Signalweges. Dieser Zusammenhang könnte sich besonders für die Therapie von KRK als bedeutsam erweisen.

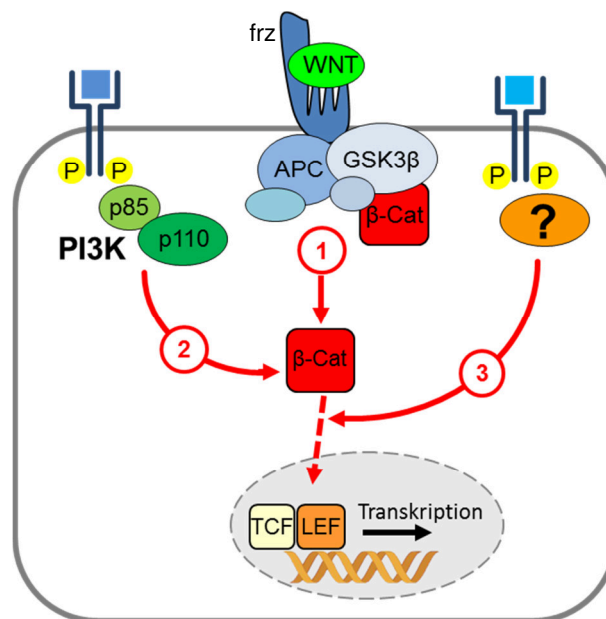


Abb. 26 Hypothetisches Drei-Signal-Modell der transkriptionellen Aktivierung von β -Catenin:

(1) Nach Freisetzung aus dem Degradationskomplex und zytoplasmatischer Stabilisierung, wird (2) β -Catenin durch den PI3K-Signalweg transkriptionell aktiviert, während (3) andere Einflüsse den nukleären Import induzieren.

6 Anhang

6.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer

Sequenzierung:

T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGAA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'
β-CatER fwd	5'-CCACCCTGGTGCTGACTATC-3'
S552D fwd	5'-TCCCCTGGCCTCTGATAAAG-3'

Quantitative RT-PCR:

GAPDH F	5'-GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC-3'
GAPDH R	5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'
GFP F	5'-AGAACGGCATCAAGGTGAAC-3'
GFP R	5'-TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG-3'
Axin2 F	5'-AGGCCAGTGAGTTGGTTGTC-3'
Axin2 R	5'-CATCCTCCCAGATCCTCA-3'
SP5 F	5'-GCGGCGAGGGGCAAGGGC-3'
SP5 R	5'-CGCCGAGGCATGGACACCCG-3'

qPCR nach Chromatin-Immunopräzipitation:

AchR - Fwd	5'-CCTTCATTGGGATCACCACG-3'
AchR - Rev	5'-AGGAGATGAGTACCAGCAGGTTG-3'
Axin 2 WRE- Fwd	5'-CTGGAGCCGGCTGCGCTTTGATAA-3'
Axin 2 WRE - Rev	5'-CGGCCCGAAATCCATCGCTCTGA-3'

6.2 Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
AF488	AlexaFluor 488 nm
AF546	AlexaFluor 546 nm
AKT	Protein Kinase B, PKB; v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Amp	Ampicillin
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Tissue Culture
BSA	bovines Serum-Albumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase,
Cdc-37	Hsp90 co-chaperone Cdc37
CHO-1	chinese hamster ovary
CK2	Caseinkinase 2
CMV	Cytomegalievirus
c-MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, DNS
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EGFR	epidermal growth factor receptor, ErbB-1, HER1
EMT	epithelio-mesenchymale Transition
ER TM	Tamoxifen-sensitiver Östrogenrezeptor
EtOH	Ethanol
FAP	familial adenomatous polyposis
FBS	fetal bovine serum, fötales Kälberserum
FOP	mutierter TCF optimaler Promotor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3
h	hora, die Stunde (lat.)
HGFR	hepatocyte growth factor receptor, c-MET
HNPCC	hereditary non-polyposis cancer
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich Peroxidase
HSV-TK	Herpes simplex Virus - Thymidinkinase-Promotors
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	kolorektales Karzinom
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LEF-1	lymphocyte enhancement factor 1
LiCl	Lithiumchlorid
LY294.002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromon, LY
M	molar
MAPK	mitogen activated protein kinase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	millimolar
μ M	mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nM	nanomolar
NOD-SCID	non obese diabetic – severe combined immunodeficiency
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKC1	Phosphatidylinositol-dependent Kinase 1

PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
PIP2	Phosphatidylinositol-4-5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3-4-5-Trisphosphat
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure, RNS
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOC	Super optimal broth medium with glucose
SOE	splicing by overlength extension
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBB	4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole
TBE	TCF binding element
TBS	Tris-buffered saline
TBS/T	Tris-buffered saline / Tween 20
TCF	t-cell factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOP	TCF optimal promotor
Tris-HCl	Tris- Hydrochlorid
UICC	Union internationale contre le cancer
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WNT	Akronym aus " <i>wingless</i> " (Drosophila-Phänotyp) und " <i>INT-1</i> " (Integrationsstelle des mouse mammary tumor virus MMTV)

Nomenklatur

Gene, Marken-Eigennamen und englische Fachbegriffe sind *kursiv* gedruckt und letztere in Anführungszeichen gesetzt.

Auf die deutschen Abkürzungen DNS und RNS wurde zu Gunsten der weitaus gebräuchlicheren englischen Abkürzungen DNA und RNA verzichtet.

6.3 Veröffentlichung, Vorträge und Posterpräsentation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Mai 2014
in der Zeitschrift *Oncotarget* (Impact Factor 2013: 6,63) veröffentlicht:

“WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear β -Catenin depend on active PI3K signaling”

Ormanns S, Neumann J, Horst D, Kirchner T, Jung A. *Oncotarget*. 2014 May 30;5(10):2999-3011.
PMID: 24930890

96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), Berlin, 2012:

Vortrag: *„Nukleäre Translokation und Aktivierung von β -Catenin sind unabhängige Events in der Aktivierung des WNT-Signalwegs“*

Ormanns S, Kirchner T, Jung A

VII Deutsch–Spanisches-Pathologen-Treffen der Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), Valencia, Mai 2014:

Vortrag: *„Stimulating crosstalk of PI3K signaling and the WNT cascade advances colon cancer“*

Ormanns S, Neumann J, Horst D, Kirchner T, Jung A

98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), Berlin, Juni 2014:

Posterpräsentation: *„WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear β -Catenin depend on active PI3K signaling“*

Ormanns S, Neumann J, Horst D, Kirchner T, Jung A

7 Literaturverzeichnis

1. Balmain A, Barrett JC, Moses H and Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular carcinogenesis*. 1993; 7(3):139-146.
2. Wolf U, Barnes B, Bertz J, Haberland J, Laudi A, Stöcker M, Schönfeld I and Kurth B-M. Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (RKI) in Berlin. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*. 2011; 54(11):1229-1234.
3. Heidelberg D. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. Internet: [http://www dkfz-heidelberg de](http://www.dkfz-heidelberg.de). 2010.
4. Center MM, Jemal A, Smith RA and Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2009; 59(6):366-378.
5. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zaubler AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I and Seeff LC. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 2010; 116(3):544-573.
6. Ferrari P, Day NE, Boshuizen HC, Roddam A, Hoffmann K, Thiébaud A, Pera G, Overvad K, Lund E and Trichopoulos A. The evaluation of the diet/disease relation in the EPIC study: considerations for the calibration and the disease models. *International journal of epidemiology*. 2008; 37(2):368-378.
7. Giovannucci E. Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2006; 354(21):2287-2288; author reply 2287-2288.
8. Boyle P, Anderson BO, Andersson LC, Ariyaratne Y, Auleley GR, Barbacid M, Bartelink H, Baselga J, Behbehani K, Belardelli F, Berns A, Bishop J, Brawley O, Burns H, Clanton M, Cox B, et al. Need for global action for cancer control. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008; 19(9):1519-1521.
9. Itzkowitz SH and Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2004; 126(6):1634-1648.
10. Wittekind C and Meyer H-J. (2013). *TNM: Wiley-VCH*.
11. Pox C, Aretz S, Bischoff S, Graeven U, Hass M, Heußner P, Hohenberger W, Holstege A, Hübner J and Kolligs F. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0—Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2013; 51(08):753-854.
12. O'Connell JB, Maggard MA and Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004; 96(19):1420-1425.
13. Fearon ER and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5):759-767.
14. Kinzler KW and Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996; 87(2):159-170.
15. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B and Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992; 359(6392):235-237.
16. Bienz M and Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 2000; 103(2):311-320.
17. Galiatsatos P and Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *The American journal of gastroenterology*. 2006; 101(2):385-398.
18. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S and Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 1991; 253(5020):665-669.
19. Markowitz SD and Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361(25):2449-2460.
20. Petersen CP and Reddien PW. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell*. 2009; 139(6):1056-1068.
21. Tanaka K, Kitagawa Y and Kadowaki T. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(15):12816-12823.
22. Strand M and Micchelli CA. Quiescent gastric stem cells maintain the adult Drosophila stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(43):17696-17701.
23. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M and Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 2010; 469(7330):415-418.

24. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A and Kemler R. β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *The EMBO journal*. 1997; 16(13):3797-3804.
25. Clevers H and Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012; 149(6):1192-1205.
26. Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM and Mahmoudi T. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*. 2012; 149(6):1245-1256.
27. Fagotto F, Glück U and Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Current Biology*. 1998; 8(4):181-190.
28. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O and Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates β -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*. 1996; 86(3):391-399.
29. Fodde R and Tomlinson I. Nuclear beta-catenin expression and Wnt signalling: in defence of the dogma. *The Journal of pathology*. 2010; 221(3):239-241.
30. Nelson W, Wilson R, Wollner D, Mays R, McNeill H and Siemers K. (1992). Regulation of epithelial cell polarity: a view from the cell surface. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 621-630.
31. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.
32. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674.
33. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998; 281(5382):1509-1512.
34. Wilkins JA and Sansom OJ. C-Myc is a critical mediator of the phenotypes of Apc loss in the intestine. *Cancer research*. 2008; 68(13):4963-4966.
35. Tetsu O and McCormick F. β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999; 398(6726):422-426.
36. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R and Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(10):5522-5527.
37. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, Del Valle I, Hein K, Vogt R and Kemler R. Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. 2012; 336(6088):1549-1554.
38. Zhang X, Gaspard JP and Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research*. 2001; 61(16):6050-6054.
39. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ and Boman BM. Evidence That APC Regulates Survivin Expression A Possible Mechanism Contributing to the Stem Cell Origin of Colon Cancer. *Cancer research*. 2001; 61(24):8664-8667.
40. Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A and Postigo A. β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(48):19204-19209.
41. Howe LR, Watanabe O, Leonard J and Brown AM. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer research*. 2003; 63(8):1906-1913.
42. Heuberger J and Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010; 2(2).
43. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F and Kirchner T. β -Catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American journal of pathology*. 1999; 155(4):1033-1038.
44. Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y and Furukawa Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene*. 2002; 21(38):5861-5867.
45. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H and Peters PJ. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. 2007; 449(7165):1003-1007.
46. Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH and Simeone DM. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(24):10158-10163.

47. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D and Haramis A-P. The β -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002; 111(2):241-250.
48. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destrée O, Kielman M and Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*. 2005; 129(2):626-638.
49. Barker N, van Oudenaarden A and Clevers H. Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls. *Cell stem cell*. 2012; 11(4):452-460.
50. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ and Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature genetics*. 1998; 19(4):379-383.
51. Reya T and Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005; 434(7035):843-850.
52. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G and Medema JP. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology*. 2010; 12(5):468-476.
53. Kemper K, Prasetyanti PR, De Lau W, Rodermond H, Clevers H and Medema JP. Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*. 2012; 30(11):2378-2386.
54. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G and Medema JP. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell stem cell*. 2007; 1(4):389-402.
55. Singh A and Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010; 29(34):4741-4751.
56. Thiery JP, Acloque H, Huang RY and Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139(5):871-890.
57. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC and Shipitsin M. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008; 133(4):704-715.
58. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*. 2011:313-319.
59. Horst D, Chen J, Morikawa T, Ogino S, Kirchner T and Shivdasani RA. Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer research*. 2012; 72(6):1547-1556.
60. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R and Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(18):10356-10361.
61. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H and Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002; 40(2):127-132.
62. Hlubek F, Brabletz T, Budczies J, Pfeiffer S, Jung A and Kirchner T. Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007; 121(9):1941-1948.
63. Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, Rosty C, Abal M, El Marjou F, Smits R, Louvard D, Fodde R and Robine S. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology*. 2006; 131(4):1096-1109.
64. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, Broadbent T, Sarkar S, Burt RW and Jones DA. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell*. 2009; 137(4):623-634.
65. Mendoza MC, Er EE and Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences*. 2011; 36(6):320-328.
66. Maulik G, Madhiwala P, Brooks S, Ma P, Kijima T, Tibaldi E, Schaefer E, Parmar K and Salgia R. Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2002; 6(4):539-553.
67. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B and Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004; 304(5670):554.
68. Yuan T and Cantley L. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008; 27(41):5497-5510.

69. Network CGA. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487(7407):330-337.
70. Engelman JA, Luo J and Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006; 7(8):606-619.
71. Fruman DA and Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2014; 13(2):140-156.
72. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM and Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307(5712):1098-1101.
73. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9(8):550-562.
74. Song MS, Salmena L and Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012; 13(5):283-296.
75. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T and Lu Z. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282(15):11221-11229.
76. Ng SS, Mahmoudi T, Danenberg E, Bejaoui I, de Lau W, Korswagen HC, Schutte M and Clevers H. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling does not activate the wnt cascade. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284(51):35308-35313.
77. Shibamoto S, Higano K, Takada R, Ito F, Takeichi M and Takada S. Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 1998; 3(10):659-670.
78. Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG and Evan GI. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic acids research*. 1995; 23(10):1686-1690.
79. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B and Kinzler KW. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*. 1997; 275(5307):1787-1790.
80. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK and Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 1989; 77(1):61-68.
81. Schmittgen TD and Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008; 3(6):1101-1108.
82. Das PM, Ramachandran K, vanWert J and Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *BioTechniques*. 2004; 37(6):961-969.
83. Hahn S, Jackstadt R, Siemens H, Hunten S and Hermeking H. SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition. *The EMBO journal*. 2013; 32(23):3079-3095.
84. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY and Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269(7):5241-5248.
85. Stambolic V, Ruel L and Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Current biology : CB*. 1996; 6(12):1664-1668.
86. Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal*. 2000; 351(Pt 1):95-105.
87. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal*. 1996; 15(23):6541-6551.
88. Pujal J, Capella G and Real FX. The Wnt pathway is active in a small subset of pancreas cancer cell lines. *Biochimica et biophysica acta*. 2006; 1762(1):73-79.
89. Jho E-h, Zhang T, Domon C, Joo C-K, Freund J-N and Costantini F. Wnt/ β -catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and cellular biology*. 2002; 22(4):1172-1183.
90. Weidinger G, Thorpe CJ, Wuennenberg-Stapleton K, Ngai J and Moon RT. The Sp1-Related Transcription Factors *sp5* and *sp5-like* Act Downstream of Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesoderm and Neuroectoderm Patterning. *Current biology*. 2005; 15(6):489-500.
91. Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V and Engelhardt JF. Wnt-3A/ β -catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(36):33398-33410.
92. Ji H, Wang J, Nika H, Hawke D, Keezer S, Ge Q, Fang B, Fang X, Fang D, Litchfield DW, Aldape K and Lu Z. EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. *Molecular cell*. 2009; 36(4):547-559.

93. Song DH, Dominguez I, Mizuno J, Kaut M, Mohr SC and Seldin DC. CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of β -catenin potentiates Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(26):24018-24025.
94. Gao Y and Wang H-y. Casein Kinase 2 is activated and essential for Wnt/ β -Catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(27):18394-18400.
95. Miyata Y and Nishida E. Evaluating CK2 activity with the antibody specific for the CK2-phosphorylated form of a kinase-targeting cochaperone Cdc37. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008; 316(1-2):127-134.
96. Gera JF, Mellinshoff IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu J-h, Sawyers CL and Lichtenstein AK. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(4):2737-2746.
97. Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V and Engelhardt JF. Wnt-3A/ β -catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(36):33398-33410.
98. Persad S, Troussard AA, McPhee TR, Mulholland DJ and Dedhar S. Tumor suppressor PTEN inhibits nuclear accumulation of β -catenin and T cell/lymphoid enhancer factor 1-mediated transcriptional activation. *The Journal of cell biology*. 2001; 153(6):1161-1174.
99. Marsh V, Winton DJ, Williams GT, Dubois N, Trumpp A, Sansom OJ and Clarke AR. Epithelial Pten is dispensable for intestinal homeostasis but suppresses adenoma development and progression after Apc mutation. *Nature genetics*. 2008; 40(12):1436-1444.
100. Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM and Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin- β -catenin signaling axis. *Science*. 2005; 310(5753):1504-1510.
101. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006; 127(3):469-480.
102. Brown JB, Cheresch P, Goretsky T, Managlia E, Grimm GR, Ryu H, Zadeh M, Dirisina R and Barrett TA. Epithelial phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for β -catenin activation and host defense against *Citrobacter rodentium* infection. *Infection and immunity*. 2011; 79(5):1863-1872.
103. Perry JM, He XC, Sugimura R, Grindley JC, Haug JS, Ding S and Li L. Cooperation between both Wnt/ β -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes & development*. 2011; 25(18):1928-1942.
104. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR and Futreal PA. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic acids research*. 2011; 39(suppl 1):D945-D950.
105. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, Chan AT, Engelman JA, Kraft P, Cantley LC, Giovannucci EL and Fuchs CS. PIK3CA Mutation Is Associated With Poor Prognosis Among Patients With Curatively Resected Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(9):1477-1484.
106. Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Bertrand F, Cherqui G, Perret C and Capeau J. Insulin and IGF-1 stimulate the β -catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3 β inhibition and Ras activation. *Oncogene*. 2001; 20(2):252-259.
107. Castellone MD, De Falco V, Rao DM, Bellelli R, Muthu M, Basolo F, Fusco A, Gutkind JS and Santoro M. The β -catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation. *Cancer research*. 2009; 69(5):1867-1876.
108. Song S, Mazurek N, Liu C, Sun Y, Ding QQ, Liu K, Hung M-C and Bresalier RS. Galectin-3 mediates nuclear β -catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3 β activity. *Cancer research*. 2009; 69(4):1343-1349.
109. Prieve MG and Waterman ML. Nuclear localization and formation of β -catenin-lymphoid enhancer factor 1 complexes are not sufficient for activation of gene expression. *Molecular and cellular biology*. 1999; 19(6):4503-4515.
110. Obrador-Hevia A, Chin SF, Gonzalez S, Rees J, Vilardell F, Greenson JK, Cordero D, Moreno V, Caldas C and Capella G. Oncogenic KRAS is not necessary for Wnt signalling activation in APC-associated FAP adenomas. *The Journal of pathology*. 2010; 221(1):57-67.
111. Brabletz T, Herrmann K, Jung A, Faller G and Kirchner T. Expression of nuclear β -catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *The American journal of pathology*. 2000; 156(3):865-870.
112. Baldus SE, Monig SP, Huxel S, Landsberg S, Hanisch FG, Engelmann K, Schneider PM, Thiele J, Holscher AH and Dienes HP. MUC1 and nuclear β -catenin are coexpressed at the invasion front

- of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004; 10(8):2790-2796.
113. Ormanns S, Neumann J, Horst D, Kirchner T and Jung A. WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear beta-Catenin depend on active PI3K signaling. *Oncotarget*. 2014; 5(10):2999-3011.
 114. Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer. *The EMBO journal*. 2012; 31(12):2737-2746.
 115. Anastas JN and Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013; 13(1):11-26.
 116. Ma H, Nguyen C, Lee KS and Kahn M. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene*. 2005; 24(22):3619-3631.
 117. El-Khoueiry A, Ning Y, Yang D, Cole S and Kahn M. A phase I first-in-human study of PRI-724 in patients (pts) with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013; 31:2501.
 118. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM and Riggins GJ. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004; 304(5670):554-554.
 119. Garcia-Echeverria C and Sellers W. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*. 2008; 27(41):5511-5526.
 120. Schmidt-Kittler O, Zhu J, Yang J, Liu G, Hendricks W, Lengauer C, Gabelli SB, Kinzler KW, Vogelstein B, Huso DL and Zhou S. PI3Kalpha inhibitors that inhibit metastasis. *Oncotarget*. 2010; 1(5):339-348.
 121. Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M and Yamakawa M. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002; 8(6):1957-1963.
 122. Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S and Yamakawa M. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer*. 2002; 94(12):3127-3134.
 123. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y and Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *Journal of hematology & oncology*. 2013; 6(1):88.
 124. Rodon J, Dienstmann R, Serra V and Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013; 10(3):143-153.
 125. Papadopoulos K, Tabernero J, Markman B, Patnaik A, Tolcher A, Baselga J, Shi W, Egile C, Ruiz-Soto R and Laird AD. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of SAR245409 (XL765), a novel, orally administered PI3K/mTOR inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2014:clincanres. 2403.2013.
 126. Ando Y, Inada-Inoue M, Mitsuma A, Yoshino T, Ohtsu A, Suenaga N, Sato M, Kakizume T, Robson M and Quadt C. A Phase I dose-escalation study of buparlisib (BKM120), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer science*. 2014.
 127. Shapiro GI, Rodon J, Bedell C, Kwak EL, Baselga J, Braña I, Pandya SS, Scheffold C, Laird AD and Nguyen LT. Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of SAR245408 (XL147), an Oral Pan-Class I PI3K Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2014; 20(1):233-245.
 128. Maira S-M, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, Schnell C, Guthy D, Nagel T and Wiesmann M. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics*. 2012; 11(2):317-328.
 129. Verheyen EM and Gottardi CJ. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases. *Developmental Dynamics*. 2010; 239(1):34-44.
 130. Tenbaum SP, Ordonez-Moran P, Puig I, Chicote I, Arques O, Landolfi S, Fernandez Y, Herance JR, Gispert JD, Mendizabal L, Aguilar S, Ramon y Cajal S, Schwartz S, Jr., Vivancos A, Espin E, Rojas S, et al. beta-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nature medicine*. 2012; 18(6):892-901.

8 Nachwort und Danksagung

Diese Arbeit ist das Ergebnis einer schrittweisen Anpassung und Neuausrichtung. Ursprünglich als Promotionsprojekt im Promotionsstudiengang Molekulare Medizin (FöFoLe) mit einer etwas anderen Zielsetzung begonnen, wurde immer wieder ein neuer, funktionierender Ansatz gesucht, letztendlich gefunden und daraus eine interessante Geschichte geformt.

Ich möchte mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung bedanken, der mich über Jahre begleitet hat, mir Ideen, Feedback, Kritik und Anleitung gab und mir vor allem die Freiheit ließ, meine Ideen so umzusetzen, wie ich es mir vorstellte, auch wenn es so dann nicht immer direkt zielführend war. Ein großer Dank gebührt auch Herrn Professor Dr. med. Thomas Kirchner, an dessen Institut ich diese Arbeiten überwiegend neben meiner Tätigkeit als Assistenzarzt durchführen konnte. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. David Horst für konstruktive Beiträge und die ein oder andere „schmissige Formulierung“ bei der Erstellung des *Oncotarget*-Manuskripts bedanken, sowie dafür, dass ich Teile der Arbeiten in der Revisionsphase der Publikation in seinem Labor durchführen konnte. Vielen Dank an Herrn Dr. med. Karl Dichtl und Herrn Professor Dr. Dr. Johannes Heesemann vom Max-von-Pettenkofer-Institut für die großzügige Bereitstellung der konfokalen Laserscanningmikroskopie und an Herrn Dr. rer. nat. René Jackstadt und Frau Stefanie Hahn für unschätzbare methodische als auch moralische Unterstützung. Ich möchte mich bei Herrn Professor Antonio Garcia de Herreros, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, in dessen Labor ich während eines der besten Jahre meines Lebens arbeitete, für die RWP-1 Zelllinie und wertvolle Erfahrungen bedanken. Danke an G. Evan (University of Cambridge, GB) für das pBSKS-ERTM-Plasmid und an M. Königshoff (Comprehensive Pneumology Center Munich) für die Wnt3a-L-Zelllinien. Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Silvio Scheel, mit dem ich mitunter die lustigsten Momente in meiner Anfangszeit im Labor erlebt habe und alle Mitarbeiter der AG Jung sowie des Pathologischen Instituts der LMU, die mich bei meinen Arbeiten unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Ormanns, Steffen

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Interaktion der Phosphoinositid-3-Kinase mit dem WNT-Signaltransduktionsweg

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08.10.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand